

ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Π. ΚΑΒΕΛΑΚΗ
ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2018

«Είσαστε όλοι εδώ για να μάθετε την ακριβή επιστήμη και την υψηλή τέχνη της κατασκευής των φίλτρων,...Σ' αυτό το μάθημα δεν υπάρχουν ανόητα κουνήματα ραβδιών», συνέχισε. «Πολλοί από σας θα δυσκολευτούν να πιστέψουν πως πρόκειται για μαγεία. Ακόμη, πιστεύω πως πολλοί λίγοι από σας θα καταλάβουν την ομορφιά του τσουκαλιού που σιγοβράζει, το λεπτό άρωμα των ατμών του, ή τη ντελικάτη δύναμη των φίλτρων καθώς κυλούν μέσα στις ανθρώπινες φλέβες, μαγεύοντας το μυαλό κι αιχμαλωτίζοντας τις αισθήσεις...Εγώ μπορώ να σας διδάξω πώς να κλείνετε σε μπουκαλάκια τη φήμη, τη δόξα την αγάπη, ακόμη και τον ξαφνικό θάνατο!...»

«Πότερ!» φώναξε ξαφνικά ο καθηγητής Σνέιπ. «Τι θα δημιουργούσα, αν έριχνα σκόνη από ρίζα ασφόδελου σε αφέψημα από ξύλο με σαράκι;»

Ο Χάρι Πότερ και η Φιλοσοφική Λίθος

Τζ. Κ. Ρόουλινγκ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Κανόνες ασφάλειας
Τετράδιο εργαστηρίου και αναφορά

ΑΣΚΗΣΕΙΣ:

ΘΕΩΡΙΑ I. Φωτοσύνθεση-Γενικά
II. Βασικές διεργασίες φωτοσύνθεσης
III. Οι χλωροπλάστες
IV. Η ενέργεια του φωτός
V. Δομικές μονάδες συλλογής φωτός
VI. Δυο φωτοσυστήματα σε σειρά
VII. Φωτοσύστημα II
VIII: Φωτοσύστημα I
IX: Οι φωτεινές αντιδράσεις με λίγα λόγια

ΠΕΙΡΑΜΑ 1 Φωτοεπαγόμενη μεταφορά πρωτονίων σε μεμβράνες
χλωροπλαστών

ΘΕΩΡΙΑ I. Αμινοξέα
II. Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων
III. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

ΠΕΙΡΑΜΑ 2 Αναλυτικές μέθοδοι για τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση
αμινοξέων - 2 εργαστηριακές ημέρες

ΘΕΩΡΙΑ I. Ισοηλεκτρική εστίαση
II. Ηλεκτροφόρηση σε δυο διαστάσεις

ΠΕΙΡΑΜΑ 3 Ισοηλεκτρική εστίαση και ηλεκτροφόρηση σε δυο διαστάσεις - 2
εργαστηριακές ημέρες

ΘΕΩΡΙΑ Οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις σε βιολογικά δείγματα

ΠΕΙΡΑΜΑ 4 α. Ποσοτικός προσδιορισμός της βιταμίνης C σε διάφορα δείγματα
μέσω οξειδοαναγωγικής τιτλοδότησης με DCIP
β. Οξειδοαναγωγικά συστήματα των φωτοσυστημάτων I και II

ΘΕΩΡΙΑ Ποιοτική, ποσοτική ανάλυση και ταυτοποίηση υδατανθράκων

ΠΕΙΡΑΜΑ 5 α. Ανίχνευση υδατανθράκων με δοκιμή αναγωγής (αντιδραστήριο Benedict)

β. Ποσοτικός προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων (μέθοδος αντιδραστηρίου DNAS)

γ. Ανίχνευση σακχάρων με χρήση χρωματογραφίας χάρτου.

Πείραμα blue bottle

ΘΕΩΡΙΑ I. Ένζυμα-Γενικά

II. Ακίνητοποιημένα ένζυμα

III. Μέθοδοι ακίνητοποίησης ενζύμων

IV. Χαρακτηρισμός του ακίνητοποιημένου ενζύμου

ΠΕΙΡΑΜΑ 6 Μελέτη της ενεργότητας και της θερμικής σταθερότητας ακίνητοποιημένης υπεροξειδάσης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

Παρόλο που οι περισσότεροι από εσάς έχετε περάσει ήδη τρία χρόνια στα εργαστήρια της χημείας χωρίς να προκαλέσετε ή να πάθετε το παραμικρό ατύχημα αυτός δεν είναι λόγος για υπερβολική αυτοπεποίθηση. Σίγουρα κανείς δεν πρόκειται να σας κατηγορήσει για υπερβολική προσοχή όταν κατά κανόνα τα 'υλικά' για τη δουλειά σας είναι τοξικά, εύφλεκτα, προκαλούν ερεθισμούς κ.τ.λ. Βέβαια όλα αυτά είναι πραγματικά επικίνδυνα μόνο όταν χρησιμοποιούνται λανθασμένα. Η εμπειρία δείχνει ξεκάθαρα ότι όσο πιο καλά προετοιμασμένοι για το συγκεκριμένο πείραμα έρχονται οι φοιτητές στο εργαστήριο τόσο ελαττώνονται οι πιθανότητες για την πρόκληση ατυχήματος. Εντούτοις, επικίνδυνες καταστάσεις μπορεί να προκύψουν ξαφνικά και γι' αυτό πρέπει να είστε προετοιμασμένοι, να γνωρίζετε-και να τηρείτε- τους κανόνες ασφάλειας (όχι μόνο γενικούς κανόνες αλλά και αυτούς που αφορούν κάθε πείραμα ειδικότερα). Η ασφάλεια στο εργαστήριο πρέπει να είναι βασική σας προτεραιότητα. Φυσικά δε μιλάμε μόνο σε προσωπικό επίπεδο αφού εξίσου σημαντική είναι και η ασφάλεια των συναδέλφων σας. Η απροσεξία ενός από εσάς μπορεί να προκαλέσει ατύχημα σε άλλους.

Τα πειράματα στα εργαστήρια αυτά έχουν σχεδιαστεί να είναι όσο γίνεται πιο ασφαλή. Όμως καμία προετοιμασία ή προηγούμενος έλεγχος των πειραμάτων δεν μπορεί να αντικαταστήσει τις δικές σας γνώσεις για κάθε πείραμα ή ακόμα και την κοινή λογική (η οποία πρέπει να εφαρμόζεται αυτόματα!). Δυστυχώς πολλές φορές καταστάσεις που μπορεί να οδηγήσουν σε ατυχήματα δεν αντιμετωπίζονται με την απαιτούμενη σοβαρότητα, ιδιαίτερα σε ένα εργαστήριο βιοχημείας. Οι φοιτητές (και όχι μόνο!) έχουν συχνά την εντύπωση ότι δουλεύουν όχι τόσο με επικίνδυνα χημικά αντιδραστήρια αλλά κυρίως με βιομόρια, επομένως δεν είναι απαραίτητη τόση σχολαστικότητα με την ασφάλεια. Φυσικά αυτό δεν είναι αλήθεια μια και πολλά αντιδραστήρια εξακολουθούν να είναι εύφλεκτα ή/και τοξικά ανεξάρτητα από το πού προέρχονται. Επιπλέον, υλικά όπως πιπέτες Pasteur ή τζάμακια ηλεκτροφόρησης που είναι κατασκευασμένα από λεπτό, εύθραυστο γυαλί μπορεί να προκαλέσουν σοβαρούς τραυματισμούς αν είμαστε απρόσεκτοι κατά τη χρήση τους ή την απορριψή τους.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Πιπέτες Pasteur και σπασμένα γυαλικά δεν απορρίπτονται ΠΟΤΕ απευθείας στα σκουπίδια αλλά σε συγκεκριμένα δοχεία που υπάρχουν πάνω στους πάγκους σας (το ίδιο ισχύει για κοφτερά αντικείμενα π.χ. νυστέρια, βελόνες). αλλά και για βιολογικό υλικό που είναι πιθανά μολυσματικό (αίμα, βακτήρια).

Επίσης στα εργαστήρια Βιοχημείας γίνεται εκτεταμένη χρήση ηλεκτρικών συσκευών όπως θερμαινόμενες πλάκες ανάδευσης, υδρόλουτρα, τροφοδοτικά κ.τ.λ. και οποιαδήποτε απροσεξία μπορεί να έχει σοβαρές (εγκαύματα) ή και δραματικές συνέπειες (ηλεκτροπληξία).

Η σωστή μεταχείριση/απόρριψη όλων των χημικών αντιδραστηρίων είναι απαραίτητη για τη διασφάλιση όχι μόνο ενός ασφαλούς εργαστηριακού περιβάλλοντος αλλά γενικά για την προστασία της φύσης και της υγείας. Κάποια από τα υγρά χημικά αντιδραστήρια και τα μίγματα αντιδράσεων από κάθε πείραμα είναι σχετικά ασφαλή και μπορείτε να τα πετάτε στο νεροχύτη όμως για όλα τα υπόλοιπα υπάρχουν συγκεκριμένα δοχεία για την απόρριψή τους, ενώ για κάποια από αυτά πρέπει να γίνει συγκεκριμένη κατεργασία πριν τα απορρίψουμε. Στην αρχή κάθε εργαστηριακής άσκησης οι υπεύθυνοι του εργαστηρίου θα σας ενημερώνουν για τις παραπάνω διαδικασίες, αν όμως έχει γίνει κάποια παράλειψη ή εσείς δεν είστε σίγουροι για το πώς πρέπει να χειριστείτε/απορρίψετε κάποιο υλικό/αντιδραστήριο ΡΩΤΗΣΤΕ πριν προχωρήσετε.

ΕΞΟΙΚΕΙΩΘΕΙΤΕ με τη λειτουργία κάθε οργάνου και ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσης του. Αν δεν είστε σίγουροι πώς να χρησιμοποιήσετε ένα όργανο ή μία συσκευή συμβουλευτείτε ένα μέλος του προσωπικού - έτσι προλαμβάνεται τυχόν βλάβη που μπορεί να προξενηθεί στο όργανο και εσείς έχετε εμπιστοσύνη στα αποτελέσματα που παίρνετε.

Πέρα από τις ιδιαιτερότητες όσον αφορά το υλικό κάθε άσκησης υπάρχουν γενικοί κανόνες οι οποίοι πρέπει να εφαρμόζονται ΣΕ ΚΑΘΕ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ χημείας:

-Κάποια μορφή προστασίας για τα μάτια σας είναι απαραίτητη σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Αν δεν έχετε ήδη γυαλιά, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιείτε τα γυαλιά ασφαλείας που σας παρέχονται, σε κάθε πείραμα και σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Οι φακοί επαφής προφανώς δεν προστατεύουν επαρκώς τα μάτια σας και πρέπει ΟΠΩΣΔΗΠΟΤΕ να φοράτε και τα γυαλιά ασφαλείας επιπλέον.

-Ποτέ μη δουλεύετε μόνοι στο εργαστήριο.

-Να είστε εξοικειωμένοι με σας ιδιότητες όλων των χημικών αντιδραστηρίων που πρόκειται να χρησιμοποιήσετε μια συγκεκριμένη εργαστηριακή μέρα. Με μια γρήγορη ματιά στα MSDS φυλλάδια ενημερώνεστε για την τοξικότητα, δραστηριότητα, μεθόδους απόρριψης κ.τ.λ. των ουσιών με τις οποίες θα δουλέψετε στο πείράμά σας. Οι περισσότερες από τις πληροφορίες αυτές θα σας δοθούν από τους υπεύθυνους του εργαστηρίου τη μέρα του πειράματος, ενώ κάθε πρωτοβουλία από μέρους σας στο θέμα αυτό είναι παραπάνω από ευπρόσδεκτη.

-Όταν χρειαστεί να παρατηρήσετε πηκτή σε λάμπα UV ή γενικά να εκτεθείτε σε UV ακτινοβολία προστατέψτε τα μάτια σας (και όλο το πρόσωπό σας) με την ειδική κάσκα που θα σας δοθεί. Καλό θα είναι επίσης να έχετε καλύψει και τα χέρια σας (τα μανίκια της εργαστηριακής ποδιάς κατεβασμένα και φυσικά γάντια!).

Με βάση τα παραπάνω είναι αυτονόητο ότι πρέπει να φοράτε γάντια όταν πρόκειται να χρησιμοποιήσετε επικίνδυνα αντιδραστήρια ή μολυσματικό βιολογικό υλικό. Επιδιώξτε να δουλεύετε στις εστίες σε αυτές τις περιπτώσεις. Είναι προτιμότερο να καθυστερήσετε περιμένοντας τη σειρά σας για μια θέση στην εστία παρά να επιβαρύνετε την υγεία σας (και αυτή των συναδέλφων σας) με έκθεση σε ουσίες τοξικές ιδιαίτερα αν είναι πτητικές!

-Φαγητό ποτό και κάπνισμα δεν επιτρέπονται εντός του εργαστηριακού χώρου.

-Πειράματα εκτός αυτών που είναι προγραμματισμένα δεν επιτρέπονται.

-Όλα τα χημικά εργαστήρια είναι εξοπλισμένα με πυροσβεστήρες, σταθμούς πλύσης για τα μάτια, φαρμακείο και δοχεία απόρριψης επικίνδυνων χημικών αντιδραστηρίων (εργαστήριο βιοχημείας: οργανικές ενώσεις, χλωριωμένες οργανικές ενώσεις, ανόργανες ενώσεις, απόβλητα ακρυλαμιδίου, απόβλητα με βρωμιούχο αιθίδιο). Εντοπίστε τις θέσεις των παραπάνω στο εργαστήριο και για οποιαδήποτε διευκρίνιση όσον αφορά τις χρήσεις τους μη διστάσετε να ρωτήσετε τους υπεύθυνους του εργαστηρίου.

-Είναι αυτονόητο αλλά...δεν θα σας επιτραπεί να δουλέψετε στο εργαστήριο αν δεν φοράτε εργαστηριακή ποδιά. Επίσης τα παπούτσια σας θα πρέπει να είναι κλειστά και άνετα (όχι σαγιονάρες, όχι τακούνια στιλέτο!).

-Τα προσωπικά σας αντικείμενα (τσάντες, μπουφάν, lap top, κινητά κλπ.) δεν πρέπει ποτέ να παραμένουν στον πάγκο ή στο πάτωμα κατά την παραμονή σας στο

εργαστήριο. Για την (ασφαλή) φύλαξή τους υπάρχουν συγκεκριμένα ντουλάπια φύλαξης με την ένδειξη ΑΠΟΣΚΕΥΕΣ μέσα στο εργαστήριο.

-ΑΥΤΟΝΟΗΤΟ...αλλά το υπενθυμίζουμε: ΠΑΝΤΑ να πλένετε τα χέρια σας όταν ολοκληρώσετε το πείραμα και πριν φύγετε από το εργαστήριο.

Οι κανόνες ασφάλειας σε καμία περίπτωση δεν έχουν στόχο να σας αποτρέψουν από το να δουλέψετε στο χώρο ενός χημικού εργαστηρίου ή να βάλουν φρένο στην απόδοσή σας. Ο στόχος είναι να αποκτήσετε μια υγιή αντίληψη για πιθανές επικίνδυνες καταστάσεις, να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητά σας ως φοιτητές και αργότερα ως εργαζόμενους σε ανάλογους χώρους, να προστατευθεί η υγεία (προσωπική και γενική) και φυσικά να γίνεται η μικρότερη δυνατή επιβάρυνση του περιβάλλοντος από τα εργαστηριακά απόβλητα.

ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

M. Armour, Hazardous Laboratory Chemicals Disposal Guide, 2nd ed. (1996), CRC Press (Boca Raton, FL).

K. Barker, Editor, At the bench: A Laboratory Navigator (1998), Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY).

C. Gorman, Editor, Working Safely with Chemicals in the Laboratory, 2nd ed. (1994), Genium Publishing Corp. (Schnectady, NY).

G. Lowry and R. Lowry, Lowry's Handbook of right-to-know and emergency Planning (1990), Lewis Publishers (Chelsea, MI).

Prudent Practices in the Laboratory: Handling and Disposal of Chemicals (1995), National Research Council, National Academy Press (Washington, DC)

On the web:

[Biological safety manual](#), Michigan State University, February 2017 (προσπέλαση 7/7/2017)

[Biological safety manual](#), Yale University, May 2017 (προσπέλαση 7/7/2017)

ΤΕΤΡΑΔΙΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΦΟΡΑ

Μια εργαστηριακή μέρα δεν τελειώνει με την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας και την αποχώρηση από το εργαστήριο. Όλοι οι ερευνητές έχουν την υποχρέωση να συντάσσουν γραπτές αναφορές του τρόπου διεξαγωγής και των αποτελεσμάτων των πειραμάτων τους. Οι αναφορές αυτές ενδέχεται να διαβαστούν και από άλλους, επομένως πρέπει να είναι γραμμένες με οργανωμένο, ακριβή, ξεκάθαρο, και χωρίς περιττές λεπτομέρειες τρόπο. Αυτό σημαίνει ότι οι λεπτομέρειες της πειραματικής διαδικασίας, οι παρατηρήσεις και τα αποτελέσματα πρέπει να καταγράφονται στο τετράδιο του εργαστηρίου κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος. Το τετράδιο σας θα είναι πολύ πιο λειτουργικό εάν η παραπάνω καταγραφή γίνεται μόνο στη δεξιά σελίδα ενώ η αριστερή χρησιμοποιείται για τυχόν τροποποιήσεις της πειραματικής διαδικασίας, παρατηρήσεις, υπολογισμούς κ.τ.λ.

Το παρακάτω διάγραμμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως οδηγός για το δικό σας τετράδιο εργαστηρίου:

I. Εισαγωγή

- (α) Σκοπός/στόχος του πειράματος
- (β) Θεωρία

II. Πειραματική διαδικασία

- (α) Υλικά, αντιδραστήρια, διαλύματα (και σε πιο στάδιο χρειάζονται όπου αυτό είναι κατανοητό)
- (β) όργανα
- (γ) οργανόγραμμα
- (δ) καταγραφή των σταδίων της πειραματικής διαδικασίας

Το κομμάτι αυτό πρέπει να έχει ολοκληρωθεί ΠΡΙΝ από την είσοδό σας στο εργαστήριο. Εάν αυτό δεν έχει γίνει δεν θα σας επιτραπεί να αρχίσετε το πείραμα

III. Μετρήσεις και υπολογισμοί

(α) Καταγράψτε όλα τα αριθμητικά αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας και/ή τυχόν υπολογισμούς που κάνατε κατά τη διάρκειά της.

(β) Παρουσιάστε τα τελικά αποτελέσματα σε πίνακες διαγράμματα, σχήματα όπου αυτό είναι απαραίτητο.

IV. Αποτελέσματα και συζήτηση

(α) Συμπεράσματα

(β) Σύγκριση αποτελεσμάτων με αντίστοιχη βιβλιογραφία

(γ) Σχολιασμός των αποτελεσμάτων σας. Πετύχατε ή όχι τον στόχο του πειράματος;

(δ) Βιβλιογραφία (αν χρησιμοποιήσατε πέρα από το βιβλίο των ασκήσεων)

Η τελική αναφορά θα είναι χειρόγραφη (εκτός των διαγραμμάτων), μπορεί και στο ίδιο το τετράδιο εάν θέλετε ή γραμμένη εξ αρχής στον υπολογιστή σε ξεχωριστό χαρτί.

Διευκρινίσεις που αφορούν τα διάφορα τμήματα της εργαστηριακής αναφοράς

I. Εισαγωγή

Στο κομμάτι αυτό παρουσιάστε με 3 ή 4 προτάσεις το σκοπό του πειράματος. Αναφέρετε με λίγα λόγια τη θεωρία πίσω από το πείραμα. Εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί μια τεχνική για πρώτη φορά, δώστε μια πολύ σύντομη περιγραφή της μεθόδου. Μπορείτε να συμπεριλάβετε χημικές ή βιοχημικές αντιδράσεις όπου αυτές υπάρχουν.

II. Πειραματική διαδικασία

Αρχίστε το κομμάτι αυτό, αναφέροντας τα υλικά και τα αντιδραστήρια που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στο πείραμα. Στη συνέχεια, σχεδιάστε ένα οργανόγραμμα που θα περιγράφει βήμα-βήμα την πορεία του πειράματος όπως π.χ αυτό που σας δίνεται στο τελευταίο πείραμα (απομόνωση DNA από E. Coli). Η αναφορά μέχρι το σημείο αυτό, είναι υποχρεωτικό να έχει ολοκληρωθεί ΠΡΙΝ αρχίσετε το εργαστήριο. Στη συνέχεια, θα καταγράφετε τις παρατηρήσεις σας κατά τη διάρκεια του πειράματος και συμπληρώνετε την πειραματική διαδικασία

επιτόπου ή αργότερα, αν επιθυμείτε. Κύριο κριτήριο για το επίπεδο λεπτομέρειας στο στάδιο, αυτό είναι η δυνατότητα ορθής εκτέλεσης του πειράματος από ένα συνάδελφό σας που θα έχει στη διάθεσή του μόνο τη δική σας αναφορά. Επίσης θα πρέπει να αναφέρετε οποιαδήποτε αλλαγή πραγματοποιήθηκε στο υλικό σας (διαφορά χρώματος, διαφορά διαλυτότητας κ.τ.λ.). Όλα τα αποτελέσματά σας (φάσματα, αριθμητικά δεδομένα, φωτογραφίες) πρέπει να συμπεριλαμβάνονται επίσης.

III. Δεδομένα και υπολογισμοί

Είναι προφανές πως όλα τα αριθμητικά δεδομένα προκύπτουν κατά την εξέλιξη του πειράματος πρέπει να καταγράφονται στο τετράδιο του εργαστηρίου και όχι σε κομμάτια χαρτιού ή χαρτί χεριών. Για τα περισσότερα πειράματα, η καλύτερη παρουσίαση των δεδομένων είναι σε πίνακα ή/και γραφική παράσταση. Η γραφική παράσταση μπορεί να γίνεται σε χαρτί μιλιμετρέ απευθείας στο τετράδιο ή στον υπολογιστή με τη βοήθεια προγράμματος.

IV. Αποτελέσματα και συζήτηση

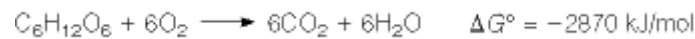
Αυτό είναι το πιο σημαντικό κομμάτι της αναφοράς, επειδή απαντά στις ερωτήσεις ‘Απαντήθηκαν τα ερωτήματα που είχαν τεθεί στην αρχή του πειράματος;’ και ‘Ποια είναι η σημασία των αποτελεσμάτων σας;’. Όλα τα συμπεράσματά σας πρέπει να υποστηρίζονται από τα πειραματικά σας δεδομένα. Φυσικά όπου υπάρχει η δυνατότητα, είναι απολύτως αποδεκτό να συγκρίνετε τα δικά σας αποτελέσματα με αντίστοιχα από βιβλιογραφία. Αντίστοιχα, μπορείτε να δώσετε μια ερμηνεία για τυχόν προβλήματα που αντιμετωπίσατε κατά την εκτέλεση του πειράματος, και να προτείνετε τρόπους αποφυγής ανάλογων προβλημάτων στο μέλλον.

Όλες οι αναφορές που χρησιμοποιήσατε (βιβλία, άρθρα, ιστοσελίδες) πρέπει καταγράφονται στο τέλος της αναφοράς σας σύμφωνα με τον τρόπο που έχει γίνει αντίστοιχη καταγραφή στο τέλος κάθε εργαστηριακής άσκησης.

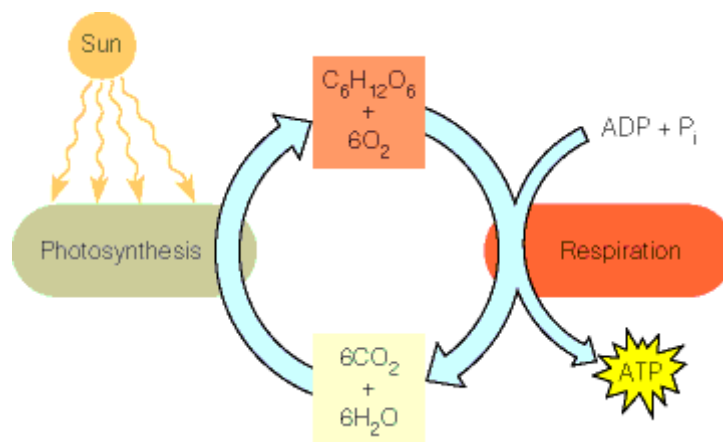
ΠΕΙΡΑΜΑ 1: ΦΩΤΟΕΠΑΓΩΜΕΝΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΧΛΩΡΟΠΛΑΣΤΩΝ- Στοιχεία θεωρίας

I. ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ-ΓΕΝΙΚΑ

Οι τρόποι με τους οποίους οι οργανισμοί απορροφούν και αποθηκεύουν με τη μορφή του ATP, ένα σημαντικό μέρος της ενέργειας που απελευθερώνεται από την οξείδωση των υδατανθράκων έχουν ήδη παρουσιαστεί λεπτομερώς. Χρησιμοποιώντας τη γλυκόζη ως παράδειγμα έχουμε:

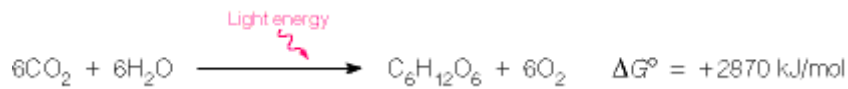


Όμως είναι προφανές ότι η ζωή δεν μπορεί να στηρίζεται στον οξειδωτικό μεταβολισμό για την εξασφάλιση της ενέργειας που είναι απαραίτητη για τη διατήρησή της και κυρίως δεν μπορεί να διοχετεύει συνεχώς οργανικό άνθρακα στην ατμόσφαιρα με τη μορφή CO_2 . Η παραπάνω αντίδραση είναι μόνο το ένα μέρος του μεγάλου κύκλου ενέργειας - άνθρακα στη φύση (εικόνα 1):



ΕΙΚΟΝΑ 1: Ο κύκλος του άνθρακα στη φύση

Μια διαδικασία «αντίστροφη» της οξείδωσης των υδατανθράκων πραγματοποιείται από φυτά, φύκη και ορισμένους μικροοργανισμούς. Για να εξασφαλίσουν τα τεράστια ποσά ενέργειας που απαιτούνται για την πραγματοποίησή της, χρησιμοποιούν ενέργεια από το ηλιακό φως:



Η διαδικασία αυτή ονομάζεται **φωτοσύνθεση** και ο ρόλος που διαδραματίζει όσον αφορά τη διατήρηση της ζωής είναι προφανής:

- Παρέχει υδατάνθρακες για την παραγωγή ενέργειας σε φυτά και ζώα.
- Είναι το κύριο μονοπάτι μέσω του οποίου ο άνθρακας επιστρέφει στη βιόσφαιρα.
- Είναι η κύρια πηγή οξυγόνου και εμπλουτισμού της γήινης ατμόσφαιρας στο στοιχείο αυτό.

Σήμερα γνωρίζουμε πλέον ότι η φωτοσύνθεση αποτελεί την πρωταρχική πηγή ενέργειας σχεδόν για όλες τις μορφές ζωής και πραγματοποιείται σε φυτά, φύκη και πολλούς προκαρυωτικούς οργανισμούς – τα παραπάνω αποτελούν πηγή τροφής για όλους τους υπόλοιπους οργανισμούς.

II. ΟΙ ΒΑΣΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΗΣ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗΣ

Η γενική αντίδραση της φωτοσύνθεσης όπως παρουσιάστηκε προηγουμένως είναι φυσικά υπεραπλουστευμένη αφού είναι φυσικό η διεργασία αυτή να περιλαμβάνει και άλλα ενδιάμεσα στάδια. Επιπλέον, η εξόζη δεν είναι ο μοναδικός υδατάνθρακας που παράγεται. Συνεπώς, μια πιο γενική μορφή της φωτοσυνθετικής αντίδρασης είναι η εξής:



όπου $[\text{CH}_2\text{O}]$ είναι ένας οποιοσδήποτε υδατάνθρακας.

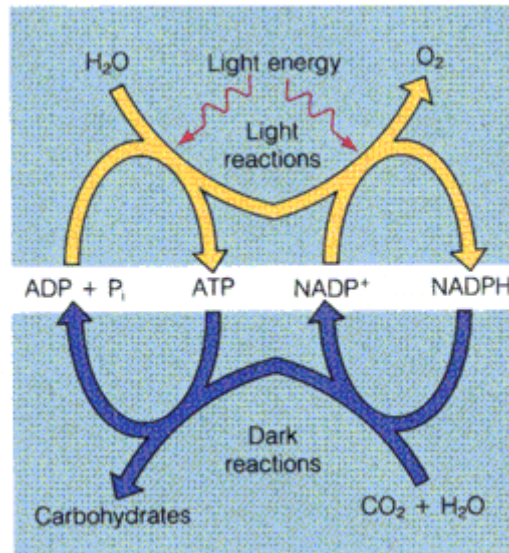
Επειδή η καύση των υδατανθράκων και ο σχηματισμός CO_2 , είναι μια οξειδωτική διαδικασία, η μετατροπή του CO_2 σε υδατάνθρακα περιλαμβάνει την αναγωγή του άνθρακα. Στην παραπάνω αντίδραση, το H_2O είναι ο αναγωγικός παράγοντας, πράγμα που ισχύει για τα φυτά, τα περισσότερα φύκη και τα κυανοβακτήρια. Όμως ένας σημαντικός αριθμός βακτηριδίων χρησιμοποιεί διαφορετικά αναγωγικά κατά τη φωτοσυνθετική διαδικασία. Επομένως μια γενικότερη (και σωστότερη) διατύπωση της παραπάνω εξίσωσης είναι η εξής:



όπου H_2A είναι ένα γενικό αναγωγικό και A είναι το οξειδωμένο προϊόν.

Πειράματα τα οποία ξεκίνησαν από το 1930 (C.B. van Neil) οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το οξυγόνο που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης προέρχεται από το H_2O και όχι από το CO_2 .

Σε καμία περίπτωση όμως δεν πρέπει να θεωρήσουμε ότι το ηλιακό φως αυτόματα οδηγεί στην αναγωγή του CO_2 από το H_2O . Η διαδικασία που παρουσιάζεται συνοπτικά στην παραπάνω αντίδραση χωρίζεται σε δυο επιμέρους διαδικασίες σε όλους τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς (εικόνα 2):



ΕΙΚΟΝΑ 2: Οι δυο επιμέρους διαδικασίες της φωτοσύνθεσης

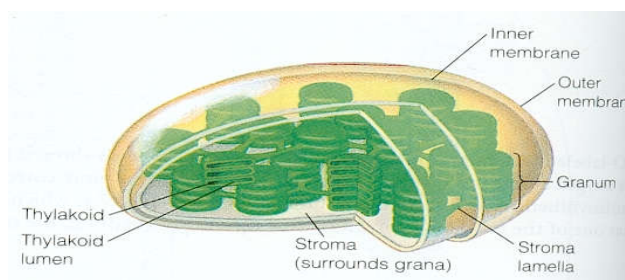
Κατά τη διάρκεια της πρώτης υποδιαδικασίας, σε μια σειρά βημάτων που ονομάζονται **φωτεινές αντιδράσεις**, ενέργεια από το ηλιακό φως χρησιμοποιείται για την φωτοχημική οξείδωση του νερού. Η διαδικασία αυτή εξυπηρετεί δυο σκοπούς:

1. Ο οξειδωτικός παράγοντας NADP^+ ανάγεται σε NADPH παράγοντας αναγωγικά ισοδύναμα και το νερό οξειδώνεται σε O_2 .
2. Ένα μέρος της ηλιακής ενέργειας <<δεσμεύεται>> μέσω της φωσφορυλίωσης του ADP και την μετατροπή του σε ATP - μια διαδικασία γνωστή ως φωτοφωσφορυλίωση.

Κατά τη διάρκεια της δεύτερης υποδιαδικασίας, σε μια σειρά βημάτων που ονομάζονται **σκοτεινές αντιδράσεις**, το NADPH και το ATP που έχουν παραχθεί κατά τη διάρκεια των φωτεινών αντιδράσεων χρησιμοποιούνται στην αναγωγική σύνθεση των υδατανθράκων από CO₂ και H₂O. Οι αντιδράσεις αυτές ονομάστηκαν σκοτεινές απλά για να δοθεί έμφαση στο γεγονός ότι δεν χρειάζονται την άμεση συμμετοχή της ηλιακής ενέργειας και δεν σημαίνει σε καμία περίπτωση ότι πραγματοποιούνται μόνο στο σκοτάδι.

III. ΟΙ ΧΛΩΡΟΠΛΑΣΤΕΣ

Η φωτοσυνθετική διαδικασία στα ανώτερα φυτά και φύκη πραγματοποιείται σε συγκεκριμένα οργανίδια του κυττάρου που ονομάζονται **χλωροπλάστες** (εικόνα 3). Στα φυτά, οι περισσότεροι από τους χλωροπλάστες απαντώνται στα κύτταρα που βρίσκονται ακριβώς κάτω από την επιφάνεια του φύλλου (κύτταρα του μεσόφυλλου). Κάθε κύτταρο περιέχει περίπου 20 με 30 χλωροπλάστες. Η φυσιολογία των οργανιδίων αυτών μοιάζει μ' εκείνη των μιτοχονδρίων. Η εσωτερική μεμβράνη περικλείει μια «διπλωμένη» εσωτερική μεμβράνη, **τα θυλακοειδή**. Η σύνθεση των μεμβρανών αυτών είναι μάλλον ασυνήθιστη. Περιέχουν μονάχα ένα μικρό ποσοστό φωσφολιπιδίων αλλά είναι πλούσιες σε γλυκολιπίδια. Περιέχουν επίσης πολλές πρωτεΐνες και κάποιες από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές είναι συνδεδεμένες με ορισμένες από αυτές. Άλλες φωτοσυνθετικές χρωστικές, όπως οι χλωροφύλλες a και b δεν είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες αλλά αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες.



ΕΙΚΟΝΑ 3. Σχηματικό διάγραμμα χλωροπλάστη

Ο διαχωρισμός των αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης μέσα στο χλωροπλάστη είναι απλός. Η απορρόφηση του φωτός και όλες οι φωτεινές αντιδράσεις πραγματοποιούνται μέσα ή πάνω στις θυλακοειδείς μεμβράνες. Το ATP και το NADPH που παράγονται από τις αντιδράσεις αυτές απελευθερώνονται στο stroma όπου και πραγματοποιούνται όλες οι συνθετικές σκοτεινές αντιδράσεις.

IV. Η ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣ

Για να γίνει κατανοητός ο μηχανισμός δέσμευσης και χρήσης της ηλιακής ενέργειας, θα αναφέρουμε περιληπτικά λίγα λόγια για τη φύση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Το φως (και όλες οι άλλες μορφές ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας) έχει δυο μορφές: κυματική και σωματιακή. Μπορούμε να χαρακτηρίσουμε ένα συγκεκριμένο είδος ακτινοβολίας αναφέροντας το μήκος κύματος (λ) ή τη συχνότητά της (ν). Οι παράμετροι αυτές χαρακτηρίζουν την κυματική φύση του φωτός. Εάν κύματα με μήκος λ περνάνε από το σημείο παρατήρησης με ταχύτητα c , τότε ο αριθμός των κυμάτων που περνούν από το συγκεκριμένο σημείο ανά δευτερόλεπτο είναι η συχνότητα, ν . Επομένως

$$\nu = c/\lambda$$

όπου c είναι η ταχύτητα του φωτός, $2,99 \times 10^8$ m/s.

Όμως για να μπορέσουμε να καταλάβουμε πως είναι δυνατό να αποκομίσουμε ενέργεια από το φως, είναι απαραίτητο να λάβουμε υπόψη μας τη σωματιακή φύση του. Πρέπει να φανταστούμε τη δέσμη φωτός σα μια ροή φωτεινών σωματιδίων ή **φωτονίων**. Κάθε φωτόνιο συνδέεται με μια μονάδα ενέργειας που ονομάζεται **quantum**. Η ενεργειακή αξία ενός quantum- με άλλα λόγια η ενέργεια ανά φωτόνιο- συνδέεται με τη συχνότητα του φωτός με μια από τις βασικότερες σχέσεις της φυσικής, το νόμο του Planck:

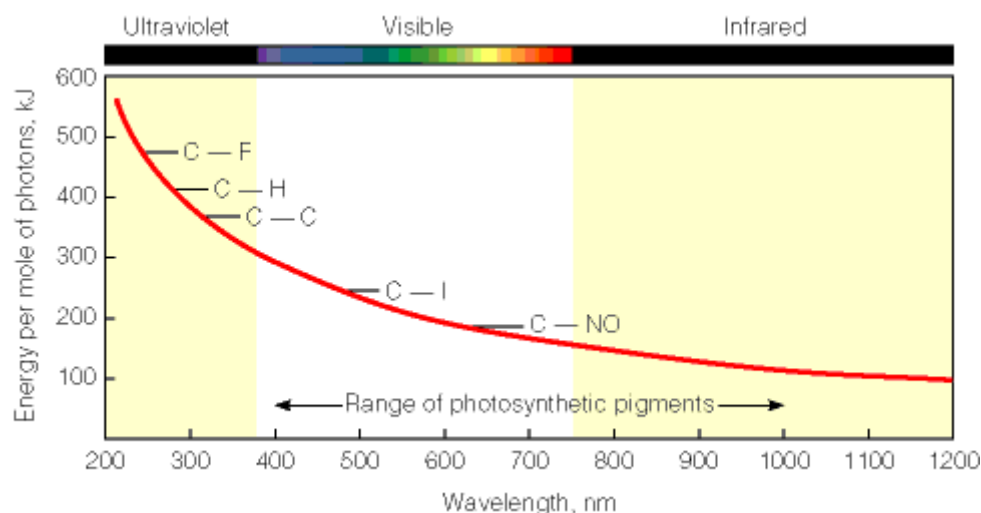
$$E = h\nu$$

όπου h είναι η σταθερά του Planck, $6,6 \times 10^{-34}$ J s.

Όμως οι βιοχημικοί σπάνια κάνουν χρήση του όρου «φωτόνια». Ενδιαφέρονται κυρίως για το πώς η ακτινοβολία προάγει χημικές ή βιοχημικές διαδικασίες, οι οποίες συνήθως εκφράζονται σε μοριακή βάση, οπότε η πιο κατάλληλη μονάδα για το σκοπό αυτό είναι η **ενέργεια ενός mole φωτονίων** ($6,023 \times 10^{23}$ φωτόνια). Ένα mole φωτονίων ονομάζεται **einstein**.

Η διαδικασία της φωτοσύνθεσης εξαρτάται κυρίως από την ακτινοβολία που αντιστοιχεί στην περιοχή του ορατού και του εγγύς υπέρυθρου (εικόνα 4). Αν σκεφτούμε με βάση την ενέργεια των φωτονίων, τότε μιλάμε για την περιοχή ανάμεσα στο σπάσιμο των ομοιοπολικών δεσμών και της ενεργοποίησης των

μοριακών δονήσεων. Τα φωτόνια στο ορατό και το κοντινό υπέρυθρο δεν προκαλούν ιδιαίτερες καταστροφές στους μοριακούς δεσμούς, αλλά μπορούν να προκαλέσουν μεταπτώσεις στις ηλεκτρονικές καταστάσεις των οργανικών μορίων. Με άλλα λόγια μπορούν να κατευθύνουν αντιδράσεις ώστε να δεσμεύσουν ενέργεια σε χημική μορφή.

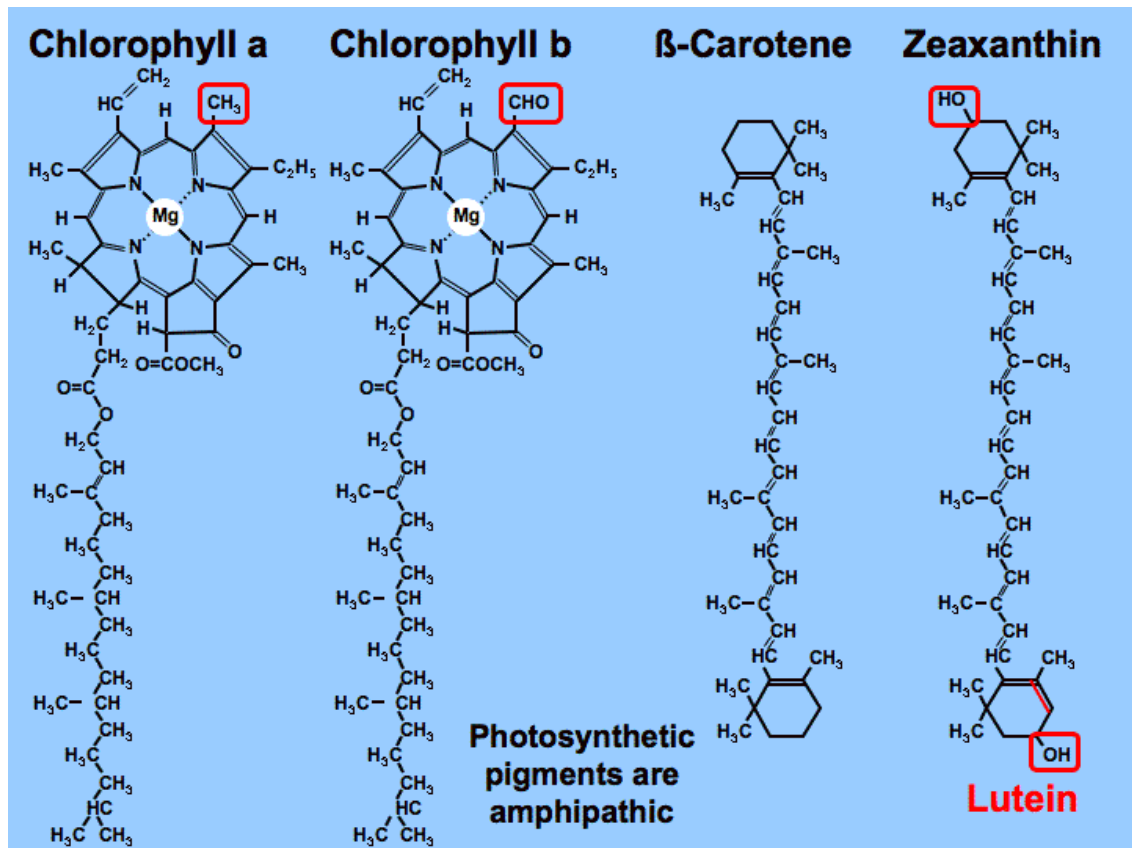


ΕΙΚΟΝΑ 4: Η ενέργεια ανά mole φωτονίων σε συνάρτηση με το μήκος κύματος

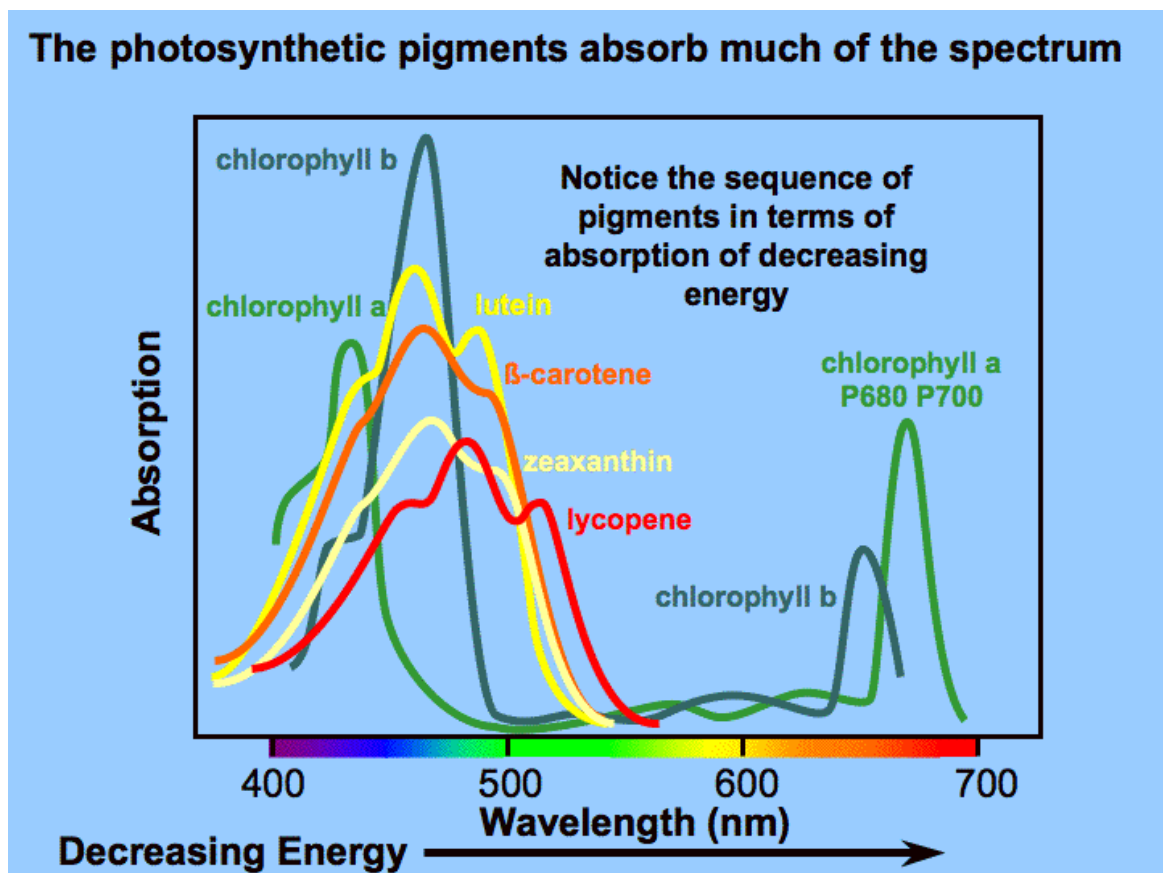
V. ΟΙ ΔΟΜΙΚΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΦΩΤΟΣ

Οι δομικές μονάδες των χρωστικών συλλογής φωτός μαζί με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες οργανώνονται σε **φωτοσυστήματα (PSI και PSII)**. Πρόκειται για συστήματα που ειδικεύονται στην απορρόφηση φωτονίων και στη μετατροπή μέρους της ενέργειάς τους σε χημική μορφή. Το πρώτο μέρος της διαδικασίας αυτής πραγματοποιείται στα **σύμπλοκα συλλογής φωτός**. Αυτά είναι πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα που περιέχουν πολλαπλά μόρια χρωστικών-κεραίες (εικόνα 5) καθώς και ένα ζευγάρι μορίων **χλωροφύλλης α** που δρα ως **κέντρο αντίδρασης (χλωροφύλλη P680 για το φωτοσύστημα II και χλωροφύλλη P700 για το φωτοσύστημα I)**, παγιδεύοντας τα ηλεκτρόνια που έχουν διεγερθεί από την απορρόφηση του φωτός.

Παρατηρώντας τα φάσματα απορρόφησης των χρωστικών αυτών (εικόνα 6) γίνεται εύκολα κατανοητό ότι οι χρωστικές αυτές συνεισφέρουν έμμεσα στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης με τη λογική ότι η φωτεινή ενέργεια που απορροφούν μπορεί να μεταφερθεί τελικά στις χλωροφύλλες **P680** και **P700**.

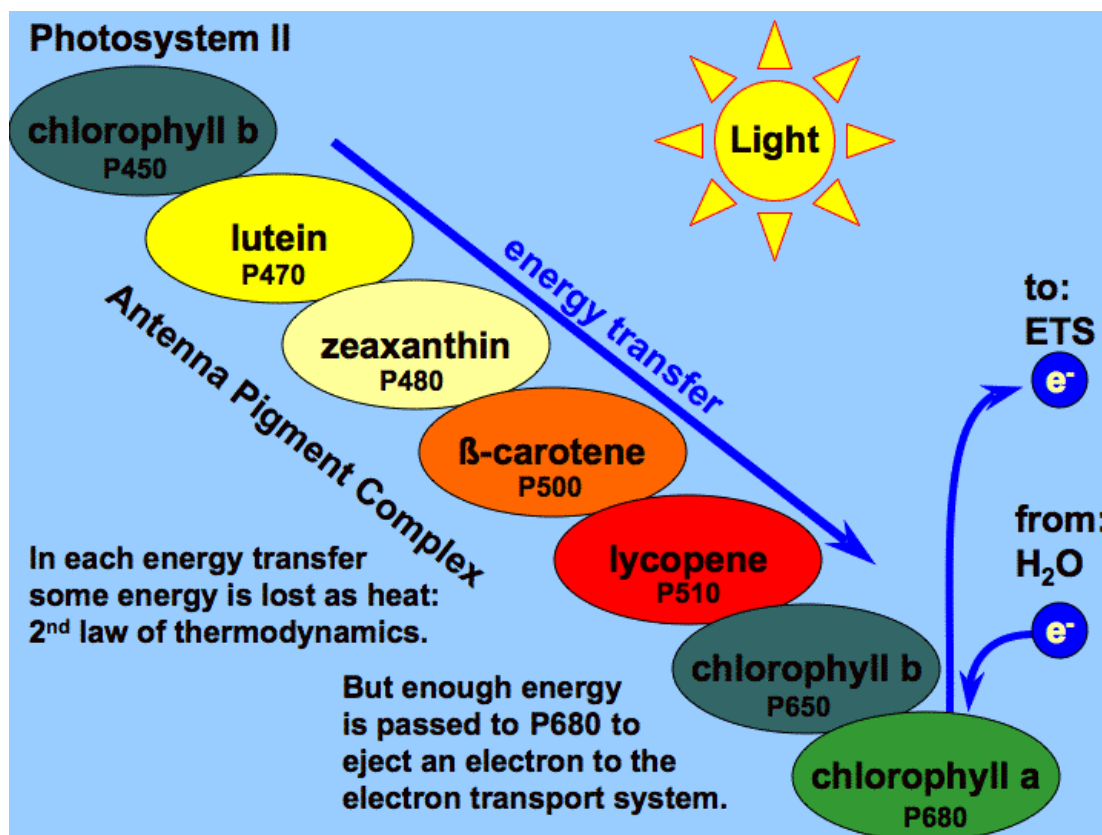


Εικόνα 5: Δομές κυριότερων φωτοσυνθετικών χρωστικών



Εικόνα 6: Φάσματα απορρόφησης κυριότερων φωτοσυνθετικών χρωστικών

Στο κυανό τμήμα του ορατού το φως έχει υψηλότερη ενέργεια από το φως στο τμήμα του ερυθρού (εικόνα 6). Επομένως, οι χρωστικές του συμπλόκου της κεραίας που απορροφούν ενέργεια σε μήκη κύματος χαμηλότερα από τα 680 και 700nm μπορούν να τη μεταφέρουν στις χλωροφύλλες **P680** και **P700** (εικόνα 7).

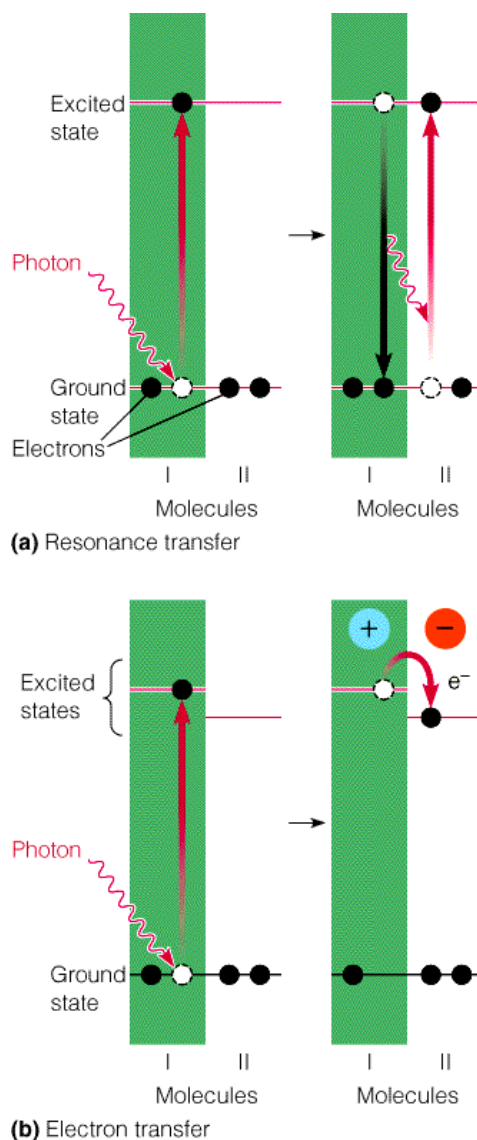


Εικόνα 7: Μεταφορά ενέργειας κατά τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης

Για την καλύτερη κατανόηση του συστήματος πρέπει να γνωρίζουμε τι μπορεί να συμβεί όταν ένα μόριο απορροφήσει ένα quantum ενέργειας. Είναι γνωστό ότι η απορρόφηση φωτονίων στο ορατό τμήμα του φάσματος προκαλεί διέγερση του μορίου από τη βασική σε μια υψηλότερης ενέργειας κατάσταση. Στην περίπτωση των φωτοσυνθετικών χρωστικών, το διεγερμένο ηλεκτρόνιο βρίσκεται σε ένα π τροχιακό των συζυγών διπλών δεσμών. Κατά την επιστροφή του μορίου στη βασική κατάσταση, η ενέργεια του μπορεί να ακολουθήσει δυο δρόμους: μετατροπή σε θερμότητα ή διοχέτευσή της σε ένα άλλο μόριο μέσω φθορισμού.

Όμως, στα φωτοσυστήματα έχουμε μόρια που απορροφούν σε γειτονικά μήκη κύματος πολύ κοντά πακεταρισμένα το ένα στο άλλο. Λόγω αυτής της εγγύτητας, δυο επιπλέον δυνατότητες διαμορφώνονται όσο αφορά την ενέργεια του διεγερμένου μορίου: Η ενέργεια ενεργοποίησης μπορεί να μεταφερθεί από το διεγερμένο μόριο

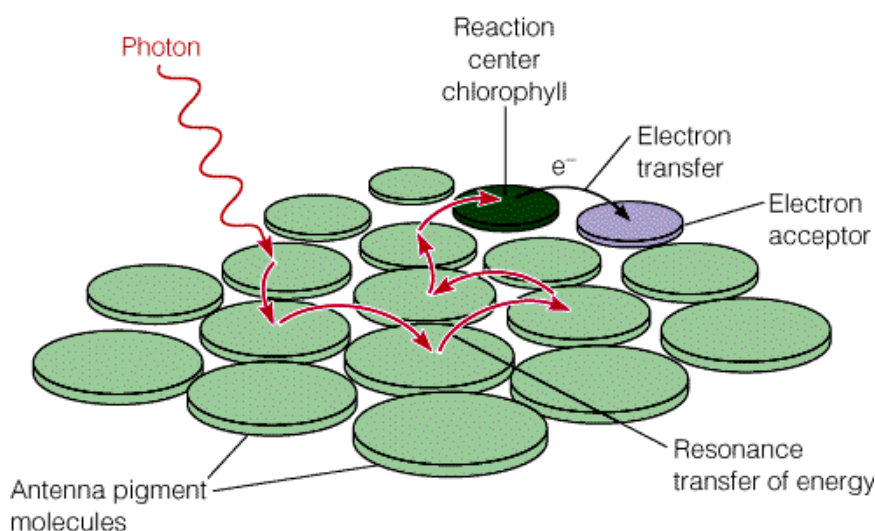
στο κοντινότερο μόριο με ταυτόσημη ενεργειακή κατάσταση-μια διαδικασία γνωστή ως *μεταφορά συντονισμού(I)* (εικόνα 8) ή να μεταφερθεί σε ένα κοντινό μόριο με ελαφρά χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση-μια διαδικασία γνωστή ως *ηλεκτρονική μεταφορά* (εικόνες 7, 8). Και τα δυο αυτά μονοπάτια είναι εξαιρετικά σημαντικά για τη φωτοσύνθεση.



ΕΙΚΟΝΑ 8. Οι δυο τρόποι ενεργειακής μεταφοράς μετά τη φωτοοξείδωση

Τα μόρια της κεραίας απορροφούν φωτόνια και η ενέργεια διοχετεύεται με μεταφορά συντονισμού σε σχετικά λίγα κέντρα αντίδρασης. Με άλλα λόγια, η ενέργεια ενός φωτονίου μπορεί να απορροφηθεί από οποιοδήποτε μόριο της κεραίας και στη συνέχεια να περιπλανηθεί τυχαία μέσα στο φωτοσύστημα. Τελικά (μέσα σε περίπου 10^{-10} sec το πολύ), η ενέργεια βρίσκει το δρόμο της προς ένα μόριο

χλωροφύλλης του κέντρου αντίδρασης (εικόνα 9). Το μόριο αυτό δε διαφέρει από τις άλλες χλωροφύλλες, όμως επειδή είναι σε ελαφρώς διαφορετικό περιβάλλον, η διεγερμένη ενεργειακή του κατάσταση είναι λίγο χαμηλότερη από αυτή των υπόλοιπων. Επομένως, λειτουργεί ως παγίδα για τα ενεργειακά κβάντα που απορροφούνται από οποιοδήποτε μόριο χρωστικής. Η διέγερση αυτού του συγκεκριμένου κέντρου αντίδρασης δίνει το έναυσμα για τις φωτεινές αντιδράσεις, αρχίζοντας μια σειρά ηλεκτρονιακών μεταφορών.



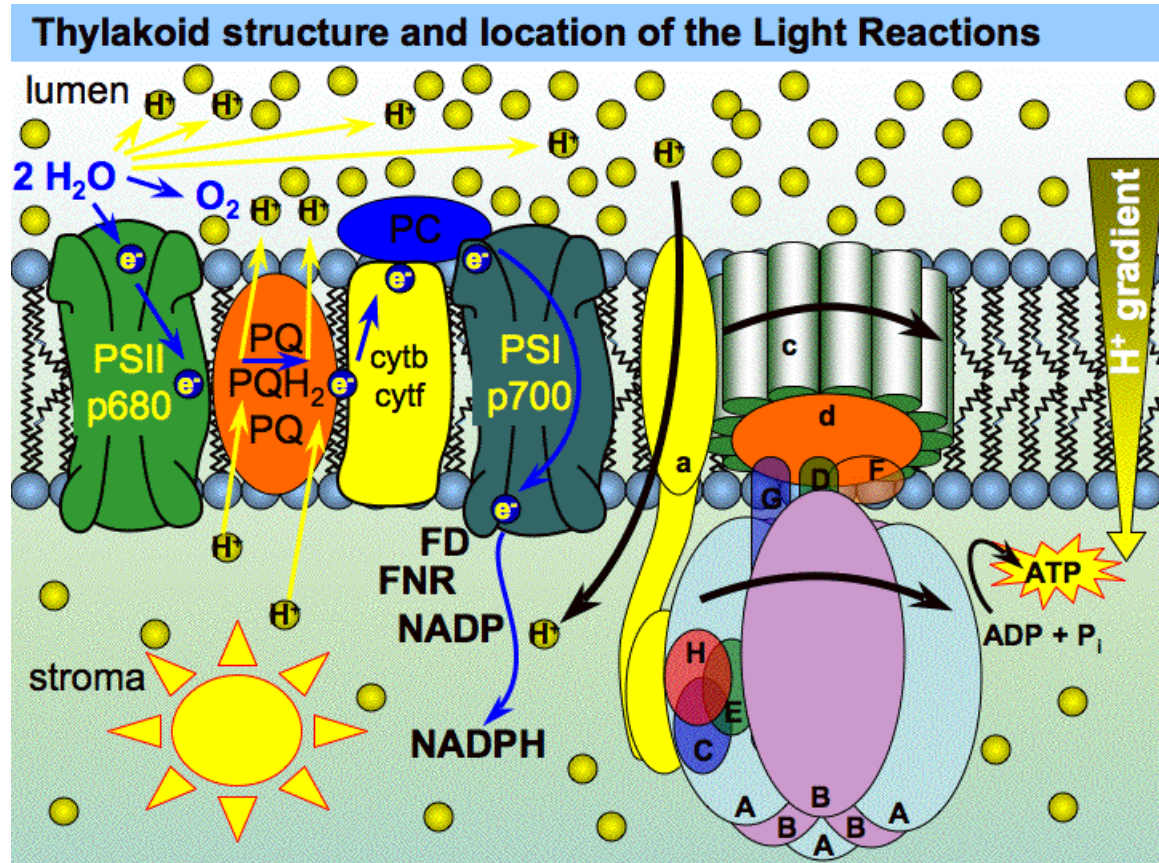
ΕΙΚΟΝΑ 9. Μεταφορά συντονισμού της ενέργειας στο κέντρο συλλογής φωτός

VI. ΦΩΤΟΧΗΜΕΙΑ ΣΕ ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΦΥΚΗ: ΔΥΟ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΣΕ ΣΕΙΡΑ

Το 1939, στο πανεπιστήμιο του Cambridge, ο καθηγητής Robert Hill παρατήρησε ότι οι χλωροπλάστες που είχε απομονώσει μπορούσαν να δράσουν αναγωγικά όταν ακτινοβολούνταν παρουσία διαφόρων δεκτών ηλεκτρονίων. Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τα πειράματα του Hill έδειξαν ότι οι χλωροπλάστες που ακτινοβολούνται με φως μπορούν να πραγματοποιήσουν μη ευνοούμενες θερμοδυναμικά αντιδράσεις και ότι μέσα στο σύστημα αυτό, το νερό μπορεί να οξειδωθεί σε O_2 χωρίς την ανάμειξη CO_2 . Τα πειράματα αυτά ήταν η πρώτη καθαρή ένδειξη ότι οι φωτεινές και οι σκοτεινές αντιδράσεις αποτελούν ξεχωριστές διαδικασίες και απέδειξαν ότι ο τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων στις *in vivo* φωτεινές αντιδράσεις είναι το $NADP^+$ το οποίο μετατρέπεται σε $NADPH$.

Επιπλέον μελέτες αποκάλυψαν ότι τα δυο αυτά είδη φωτοσυστημάτων παίρνουν μέρος στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης στα φυτά. Και τα δυο εντοπίζονται στη θυλακοειδή μεμβράνη των χλωροπλαστών (Εικόνα 10). Η

μεμβράνη έχει δυο όψεις, η μια είναι σε επαφή με το stroma των χλωροπλαστών ενώ η άλλη ερχεται σε επαφή με το lumen (το εσωτερικό της μεμβράνης των θυλακοειδών).



Εικόνα 10. Οργάνωση φωτεινών αντιδράσεων στη θυλακοειδή μεμβράνη

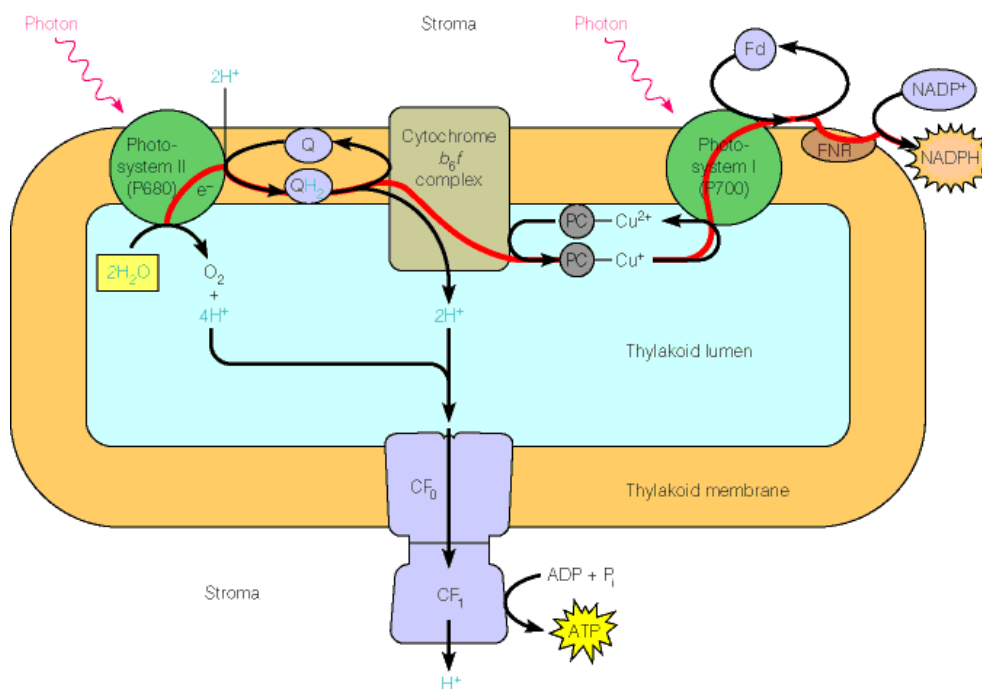
Όσον αφορά τα φωτοσυστήματα, το πρώτο παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 700nm και ονομάζεται φωτοσύστημα I (PSI), και το άλλο που απορροφά μόνο σε $\lambda=680\text{nm}$ ονομάζεται φωτοσύστημα II (PSII). Έχουν ονομαστεί σύμφωνα με τη σειρά που ανακαλύφθηκαν.

Κάθε φωτοσύστημα είναι ένα πολυπρωτεϊνικό μεμβρανικό σύμπλοκο το οποίο περιλαμβάνει σύμπλοκο συλλογής φωτός (Light Harvesting Complex-LHC), κέντρο αντίδρασης και παράγοντες μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Στα φύκη, τα κυανοβακτήρια και όλα τα ανώτερα φυτά τα δυο αυτά φωτοσυστήματα συνδέονται σε σειρά και πραγματοποιούν την αλληλουχία των φωτεινών αντιδράσεων (Εικόνα 11).

Σε καθένα από τα δυο φωτοσυστήματα το πρώτο βήμα είναι η φωτοδιέγερση ενός ηλεκτρονίου και η μεταφορά του από το κέντρο αντίδρασης (P_{680} ή P_{700}) σε μια

αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η πηγή των ηλεκτρονίων αυτών δεν είναι άλλη από τα μόρια νερού τα οποία σημειώνονται στο αριστερό κάτω μέρος των διαγραμμάτων α και β (εικόνα 12). Ο τελικός προορισμός των ηλεκτρονίων αυτών είναι το μόριο του NADP^+ στα δεξιά το οποίο τελικά ανάγεται σε NADPH .



ΕΙΚΟΝΑ 11. Οι φωτεινές αντιδράσεις όπως πραγματοποιούνται στα θυλακοειδή

Το σύμπλοκο συλλογής φωτός του PSII περιλαμβάνει όλες τις πρωτεΐνες που παίρνουν μέρος στη φωτόλυση, τις χρωστικές της κεραίας και του κέντρου αντίδρασης (Εικόνα 10), τις πρωτεΐνες-φορείς χρωστικών και τους πρώτους δέκτες ηλεκτρονίων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων του PSII. Η φωτόλυση πραγματοποιείται στη lumen πλευρά των θυλακοειδών διοχετεύοντας παράλληλα και πρωτόνια σε αυτήν.

Η πλαστοκινόνη είναι ένα μόριο που κινείται κατά πλάτος της μεμβράνης και μεταφέρει πρωτόνια από το stroma στο lumen και ηλεκτρόνια από το LHC-PSII στο σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων. Πρόκειται για κυτοχρώματα τα οποία περιέχουν σίδηρο συμπλοκοποιημένο με μόρια αίμης. Επιπλέον συνδέονται και με πρωτεΐνες και η λειτουργία τους εστιάζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων στην πλαστοκυανίνη. Η πλαστοκυανίνη εντοπίζεται στο lumen, είναι υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη και ουσιαστικά είναι ο μεσάζοντας για την μεταφορά των ηλεκτρονίων από τα

κυτοχρώματα στο LHC του PSI, χάρις ενός συμπλοκοποιημένου ιόντος χαλκού που διαθέτει (περισσότερες λεπτομέρειες στην ενότητα VII).

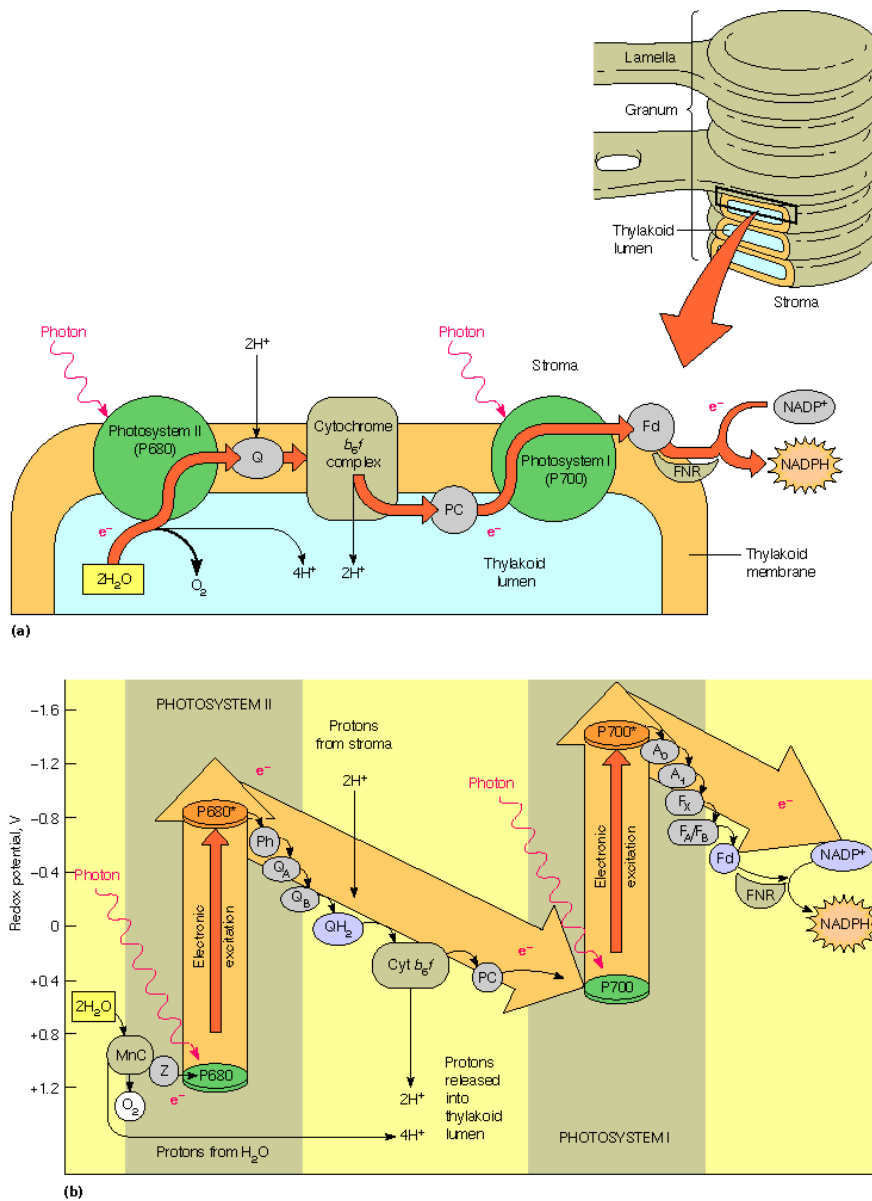
Το LHC του PSI περιλαμβάνει όλες τις χρωστικές της κεραίας και του κέντρου αντίδρασης (Εικόνα 10), τις πρωτεΐνες-φορείς χρωστικών και τους πρώτους δέκτες ηλεκτρονίων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων του PSI. Φως που απορροφάται στα 700nm παρέχει στα ηλεκτρόνια αρκετή ενέργεια ώστε να περάσουν στην φερεδοξίνη. Στην πλευρά του στρόματος (stroma) των θυλακοειδών βρίσκεται η φερεδοξίνη και οι φλαβοπρωτεΐνες που πραγματοποιούν τις αντιδράσεις τις NADP^+ αναγωγής (περισσότερες λεπτομέρειες στην ενότητα VIII).

Κατά τη διαδικασία της ηλεκτρονιακής μεταφοράς, πρωτόνια ελευθερώνονται στο lumen (εσωτερικό τμήμα) των θυλακοειδών παράγοντας μια διαβάθμιση pH κατά πλάτος της θυλακοειδούς μεμβράνης. Κάποια από τα πρωτόνια αυτά προέρχονται από το H_2O που διασπάται, ενώ άλλα προέρχονται από το stroma (εξωτερικό τμήμα) των θυλακοειδών.

Ένα μέρος της απορροφούμενης ηλιακής ενέργειας χρησιμοποιείται για τη διάσπαση του νερού και τη διοχέτευση των πρωτονίων στο lumen. Τα πρωτόνια αυτά επιστρέφουν στο stroma μέσω του πρωτεϊνικού συμπλόκου της ATP συνθάσης. Η διαδικασία αυτή απελευθερώνει ενέργεια η οποία παγιδεύεται σε ένα φωσφορικό δεσμό κατά τον σχηματισμό ενός μορίου ATP (στην πλευρά του στρόματος). Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως **φωτοφωσφορλίωση**.

Ο αριθμός των πρωτονίων δεν έχει εξακριβωθεί, αλλά υπολογίζεται ότι μεταφέρονται 8 με 12 πρωτόνια για κάθε μόριο οξυγόνου που απελευθερώνεται. Η διαφορά pH των δυο τμημάτων μπορεί να γίνει πολύ μεγάλη – μέχρι 3,5 μονάδες – όταν υγιείς χλωροπλάστες ακτινοβοληθούν με έντονο ηλιακό φως. Τα πρωτόνια αυτά μπορούν να επιστρέψουν στο stroma μόνο μέσω των μεμβρανικών συμπλόκων της ATP συνθάσης. Στους χλωροπλάστες, τα σύμπλοκα αυτά ονομάζονται CFo-CF_1 και παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με τα σύμπλοκα Fo-F_1 των μιτοχονδρίων. Η διαβάθμιση pH κατά πλάτος της μεμβράνης αντιστοιχεί σε ένα ΔG περίπου ίσο με -20kJ/mol για την άντληση ενός πρωτονίου. Έχει υπολογιστεί ότι ένα μόριο ATP παράγεται για κάθε τρία πρωτόνια που περνούν από το σύμπλοκο CFo-CF_1 , και αυτό είναι ένα θερμοδυναμικά αποδεκτό αποτέλεσμα. Επειδή δυο ή τρία H^+ αντλούνται ανά ηλεκτρόνιο, ένα μόριο ATP παράγεται για κάθε ηλεκτρόνιο που περνά από την αλυσίδα (εικόνα 12). Επομένως, τα προϊόντα των φωτεινών αντιδράσεων είναι ATP

και αναγωγική δύναμη σε μορφή NADPH. Οι δυο αυτές ενώσεις είναι ακριβώς ότι χρειάζεται για να προχωρήσουν οι διαδικασίες στις σκοτεινές αντιδράσεις.



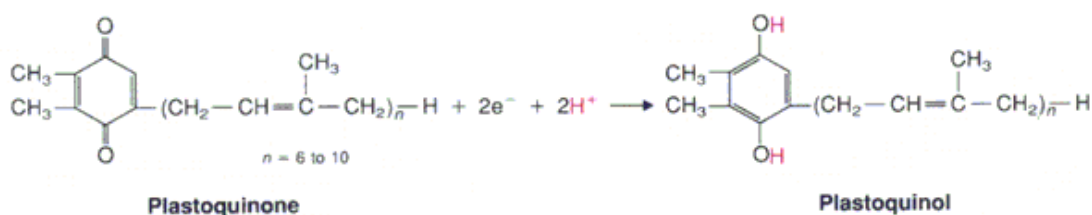
ΕΙΚΟΝΑ 12. Διάγραμμα χλωροπλάστη σε συνδυασμό με σχηματική παράσταση της φωτοσυνθετικής διαδικασίας

VII. ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑ ΙΙ: Η ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΤΟΥ ΝΕΡΟΥ

Σε καθένα από τα φωτοσυστήματα πραγματοποιείται μια σειρά οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Ο απλούστερος τρόπος να παρακολουθήσουμε τη σειρά των αντιδράσεων σε ένα φωτοσύστημα είναι να ξεκινήσουμε από την απορρόφηση ενός φωτονίου στο κέντρο συλλογής φωτός του φωτοσυστήματος ΙΙ. Το φωτόνιο αυτό διοχετεύεται στη χλωροφύλλη του κέντρου αντίδρασης η οποία

συμβολίζεται ως P₆₈₀ στην εικόνα 11. Η διέγερση του P₆₈₀ μεταφέρει το μόριο από τη βασική κατάσταση σε μια διεγερμένη στα -0,8 volt με αποτέλεσμα το P₆₈₀ να μετατρέπεται σε ισχυρό αναγωγικό, ικανό να μεταφέρει άμεσα ένα ηλεκτρόνιο σε ένα μόριο φαιοφυτίνης (Ph), που λειτουργεί ως ηλεκτρονιοαποδέκτης. Οι φαιοφυτίνες είναι μόρια με δομή ίδια με των χλωροφυλλών με τη διαφορά ότι αντί για το ιόν μαγνησίου έχουν δυο πρωτόνια. Στο στάδιο αυτό, το διεγερμένο ηλεκτρόνιο θεωρείται χαμηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού.

Το ηλεκτρόνιο μεταφέρεται στη συνέχεια, σε μια σειρά μορίων πλαστοκινόνης (Q_A και Q_B) τα οποία είναι συνδεδεμένα με πρωτεΐνες του PSII. Τελικά η πλαστοκινόνη Q_B δέχεται δυο ηλεκτρόνια και δυο πρωτόνια (που προέρχονται από το στρώμα). Η ανηγμένη πλαστοκινόνη, QH₂ (πλαστοκινόλη) απελευθερώνεται στη θυλακοειδή μεμβράνη, στην περιοχή των λιπιδίων. Η διαδικασία αυτή περιγράφεται με την παρακάτω αντίδραση:



Η πλαστοκινόλη, στη συνέχεια, αλληλεπιδρά με ένα μεμβρανικό σύμπλοκο κυτοχρωμάτων και πρωτεϊνών σιδήρου-θείου, το κυτόχρωμα b₆f. Το σύμπλοκο αυτό καταλύει τη μεταφορά των ηλεκτρονίων σε μια πρωτεΐνη χαλκού, την πλαστοκυανίνη (PC). Με τη διαδικασία αυτή το σύμπλοκο b₆f εξυπηρετεί δυο σκοπούς: Μεταφέρει ενεργοποιημένα ηλεκτρόνια από το φωτοσύστημα I στο φωτοσύστημα II και ταυτόχρονα διοχετεύει πρωτόνια από το stroma στο lumen των θυλακοειδών. Τα κύρια συστατικά του συμπλόκου αυτού είναι δυο κυτοχρώματα (f και b₆) και μια πρωτεΐνη σιδήρου-θείου (ISF). Η διάταξη της ηλεκτρονιακής μεταφοράς στο στάδιο αυτό φαίνεται να είναι η εξής:

Πλαστοκινόλη → κυτόχρωμα b₆ → ISF → κυτόχρωμα f → πλαστοκυανίνη

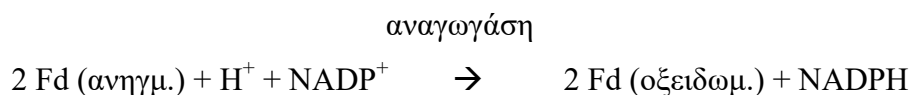
Καθώς η πλαστοκινόλη οξειδώνεται σε πλαστοκινόνη, τα δυο πρωτόνια που είχε πάρει από το stroma απελευθερώνονται στο lumen των θυλακοειδών. Η

πλαστοκυανίνη, μια πρωτεΐνη ελεύθερη στο lumen, μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο κέντρο αντίδρασης P₇₀₀. Με τη διαδικασία αυτή, ο χαλκός της πλαστοκυανίνης αρχικά ανάγεται σε Cu(I) και στη συνέχεια επαναοξειδώνεται σε Cu(II).

Οι διαδικασίες που έχουν περιγραφεί ως τώρα, έχουν στερήσει το κέντρο αντίδρασης P₆₈₀ από ηλεκτρόνια, με άλλα λόγια το έχουν μετατρέψει οξειδώνοντας το, σε ένα ισχυρό οξειδωτικό, P₆₈₀⁺. Τα ηλεκτρόνια που του λείπουν παρέχονται από το νερό (βλ. ενότητα VI), το οποίο παρουσία ενός ηλεκτρονιοαποδέκτη (P₆₈₀⁺) μπορεί να διασπαστεί απελευθερώνοντας ταυτόχρονα οξυγόνο.

VIII. ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑ I: ΠΑΡΑΓΩΓΗ NADPH

Το φωτοσύστημα I είναι ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που περιέχει τουλάχιστον 11 πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Επίσης περιέχει πολλά μόρια χλωροφύλλης-κεραίες και μια χλωροφύλλη που απορροφά γύρω στα 700nm - τη χλωροφύλλη του κέντρου αντίδρασης. Με διαδικασία παρόμοια με αυτήν που έχουμε ήδη περιγράψει ένα φωτόνιο που προκαλεί διέγερση στις χλωροφύλλες της κεραίας διοχετεύεται τελικά στη χλωροφύλλη του κέντρου αντίδρασης (η οποία συμβολίζεται ως P₇₀₀ στην εικόνα 11) προωθεί το μόριο από τη βασική κατάσταση σε μια διεγερμένη στα -1,3 volt. Το διεγερμένο ηλεκτρόνιο διοχετεύεται σε μια αλυσίδα μεταφοράς που περιλαμβάνει ένα αποδέκτη με δομή παρόμοια με τον χλωροφυλλών (A₀), ένα μόριο φυλλοκινόνης (A₁, ή αλλιώς βιταμίνη K₁) και μια σειρά τριών πρωτεϊνών σιδήρου-θείου (F_x, F_B και F_A). Τελικά το ηλεκτρόνιο μεταφέρεται σε μια άλλη πρωτεΐνη σιδήρου-θείου, την διαλυτή φερρεδοξίνη (Fd), η οποία βρίσκεται στο stroma. Το ένζυμο NADP⁺: οξειδοαναγωγάση της φερρεδοξίνης καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων στο NADP⁺, μετά την αναγωγή της φερρεδοξίνης από το φωτοσύστημα I:

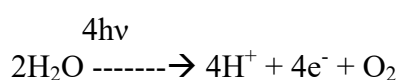


Κατά κάποιο τρόπο η φερρεδοξίνη, αντί το NADP⁺, μπορεί να θεωρηθεί ο άμεσος δέκτης των ηλεκτρονίων. Παρόλο που το μεγαλύτερο μέρος της φερρεδοξίνης χρησιμοποιείται για την αναγωγή του NADP⁺, ένα μέρος της χρησιμοποιείται σε άλλες αναγωγικές αντιδράσεις. Το NADPH που παράγεται από την οξείδωση της φερρεδοξίνης απελευθερώνεται στο stroma όπου και θα χρησιμοποιηθεί στις σκοτεινές αντιδράσεις

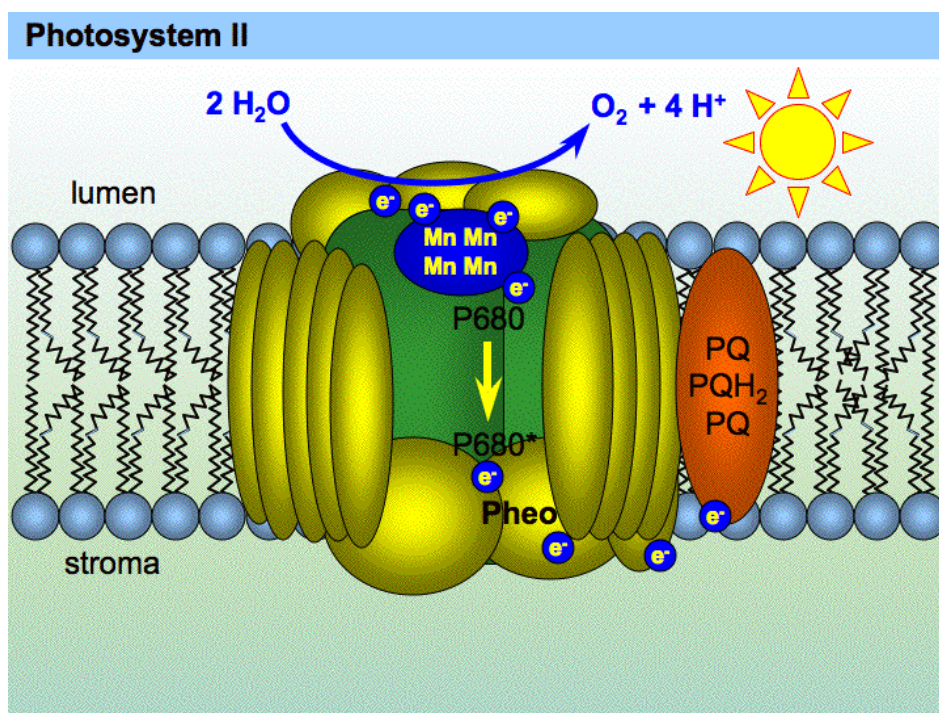
Τα ηλεκτρόνια που έχουν διατρέξει το φωτοσύστημα I προήλθαν από τα κέντρα αντίδρασης P₇₀₀. Τα οξειδωμένα κέντρα αντίδρασης (P₇₀₀⁺) που έχουν σχηματιστεί πρέπει να αναχθούν ώστε η φωτοσύνθεση να συνεχιστεί. Όταν η φωτοσύνθεση πραγματοποιείται μέσω δυο φωτοσυστημάτων τα ηλεκτρόνια αυτά παρέχονται από το φωτοσύστημα II μέσω της πλαστοκυανίνης.

ΙΧ. ΟΙ ΦΩΤΕΙΝΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ ΛΙΓΑ ΛΟΓΙΑ

Όπως φαίνεται στην εικόνα 11, τα ηλεκτρόνια αποσπώνται από το νερό και καταλήγουν στο NADPH. Η συνολική αντίδραση που πραγματοποιείται στο φωτοσύστημα II είναι η εξής:



Όπως βλέπετε η διαδικασία της φωτόλυσης απαιτεί ενέργεια προερχόμενη από 4 φωτόνια. Η διάσπαση του νερού γίνεται μέσω 4 ατόμων μαγγανίου τα οποία είναι συμπλοκοποιημένα με πρωτεΐνες του PSII (Εικόνα 13):



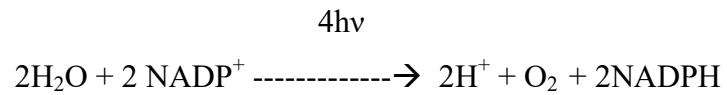
ΕΙΚΟΝΑ 13: Οξειδοαναγωγή στο φωτοσύστημα II

Η απώλεια ηλεκτρονίων από τα ιόντα μαγγανίου αντισταθμίζεται από ηλεκτρόνια που προέρχονται από τα μόρια του νερού το οποίο με τη σειρά του διασπάται παρέχοντας πρωτόνια και μόρια αέριου οξυγόνου.

Οι αντιδράσεις του φωτοσυστήματος I, αν γραφτούν για 4 ηλεκτρόνια και παραλείποντας τα ενδιάμεσα στάδια, γράφονται ως εξής:



Προσθέτοντας τις παραπάνω αντιδράσεις προκύπτει το σύνολο των φωτεινών αντιδράσεων:

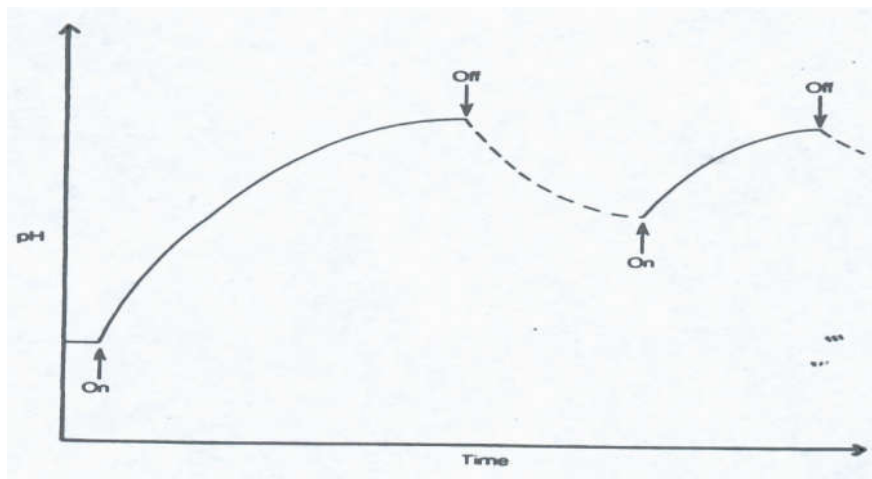


ΠΕΙΡΑΜΑ 1: ΦΩΤΟΕΠΑΓΩΜΕΝΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ ΣΕ MEMBRANES ΧΛΩΡΟΠΛΑΣΤΩΝ

1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Στη συγκεκριμένη πειραματική άσκηση θα απομονωθούν χλωροπλάστες έπειτα από προσεκτική εκχύλιση φύλλων σπανακιού, χρησιμοποιώντας ένα ρυθμιστικό διάλυμα Tricine, το οποίο περιέχει σακχαρόζη. Το παρασκεύασμα θα περιέχει τόσο ανέπαφους όσο και σπασμένους χλωροπλάστες, οι οποίοι (και οι δυο) περιέχουν τα φωτοσυνθετικά ένζυμα που είναι απαραίτητα για την φωτοφωσφορυλίωση. Το ολικό περιεχόμενο χλωροφύλλης των χλωροπλαστών θα προσδιορισθεί με ένα μίγμα νερού/ακετόνης και μέτρηση της απορρόφησης στα 645 και 663nm. Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης για την συγκεκριμένη παρασκευή χλωροπλαστών θά είναι περίπου 0,3 – 1,0 mg/ml.

Οι επαγόμενες από το φως αλλαγές του pH μετρώνται ελέγχοντας το pH ενός διαλύματος χλωροπλαστών που ακτινοβολείται. Εάν τα πρωτόνια προχωρούν προς το εσωτερικό των χλωροπλαστών τότε το pH του διαλύματος πρέπει να αυξάνεται.



ΕΙΚΟΝΑ 1: Επαγόμενες από το φως αλλαγές του pH διαλύματος χλωροπλαστών

Η διαδικασία μεταφοράς των πρωτονίων αναστέλλεται όταν σταματά η ακτινοβολία του δείγματος (διακεκομμένες γραμμές στην εικόνα 1). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι η παρουσία φωτοευαίσθητων οξειδοαναγωγικών χρωστικών ενεργοποιεί τη διαδικασία μεταφοράς πρωτονίων. Στο πείραμα αυτό θα χρησιμοποιηθεί ο οξειδοαναγωγικός παράγοντας methyl viologen.

Οι χλωροπλάστες που θα απομονωθούν από φύλλα σπανακιού θα χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη της πρωτονιακής μεταφοράς και της φωτοφωσφορυλίωσης. Οι χλωροπλάστες θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν μέσα σε μερικές ώρες (2 – 3 ώρες) διότι η βιολογική τους ενεργότητα ελαττώνεται με την πάροδο του χρόνου. Η πειραματική διάταξη για τη μέτρηση της πρωτονιακής μεταφοράς καθώς και τα διαλύματα που θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει να ετοιμαστούν πριν αρχίσει η παρασκευή των χλωροπλαστών.

Σε γενικές γραμμές το χρονοδιάγραμμα για το συγκεκριμένο πείραμα είναι το εξής:

- A. Παρασκευή χλωροπλαστών – 30 min.
- B. Προσδιορισμός συγκέντρωσης χλωροφύλλης – 15 min.
- Γ. Μετρήσεις πρωτονιακής μεταφοράς – 1 έως 2 ώρες

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

A. Παρασκευή χλωροπλαστών

Φρέσκα φύλλα σπανακιού, περίπου 100 g. Τα φύλλα θα πρέπει να πλυθούν καλά με κρύο νερό, να τοποθετηθούν σε πλαστικές σακούλες και να διατηρηθούν κρύα για αρκετές ώρες πριν χρησιμοποιηθούν.

Ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης: 0,02 M Tricine, pH 8, 0,01 M NaCl και 0,4 M σακχαρόζη. **Διατηρείται κρύο!**

Κοφτερό μαχαίρι

Μπλέντερ

Γάζα

Ψυχόμενη φυγόκεντρος

Διάλυμα εναιώρησης χλωροπλαστών: 0,4 M σακχαρόζη και 0,01 M NaCl

B. Προσδιορισμός χλωροφύλλης

Παρασκεύασμα χλωροπλαστών (βλέπε προηγούμενη ενότητα, A)

Διάλυμα 80% ακετόνης σε νερό

Γυάλινοι σωλήνες φυγοκέντρου

Ένα ζευγάρι γυάλινες κυψελίδες φασματοφωτομέτρου

Φασματοφωτόμετρο για μετρήσεις στα 645 και 663nm

Γ. Μετρήσεις μεταφοράς πρωτονίων

Πεχάμετρο (αν είναι δυνατόν συνδεδεμένο με καταγραφικό)

Λάμπα 500 W, με φίλτρο Corning 1-69 ή εναλλακτικά ένα διάλυμα το οποίο θα περιέχει μικρή ποσότητα CuSO_4 για την απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας

Μαγνητικός αναδευτήρας και μικρός μαγνήτης

Methyl viologen

Χρονόμετρο

Δοκιμαστικός σωλήνας, 2 x 20 cm

Διάλυμα 0,01 M K_2HPO_4

Διφωσφορική αδενοσίνη, 0,02 M

III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Παρασκευή χλωροπλάστων από σπανάκι

Οι χλωροπλάστες είναι οργανίδια ευαίσθητα και ασταθή. Το συγκεκριμένο στάδιο του πειράματος θα πρέπει να εκτελεστεί όσο πιο γρήγορα γίνεται και κάτω από χαμηλό φωτισμό. Διατηρείτε όλα τα διαλύματα κρύα (4°C).

- Αφαιρέστε τους μίσχους από 100 g φύλλων σπανακιού. Κόψτε τα φύλλα σε μικρά κομμάτια.
- Βάλτε αμέσως τα φύλλα σε ένα κρύο μπλέντερ το οποίο περιέχει 200ml κρύο ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης. Αλέστε τα φύλλα στην υψηλότερη ταχύτητα όχι πάνω από 5 δευτερόλεπτα.
- Σουρώστε το διάλυμα με τα αλεσμένα φύλλα χρησιμοποιώντας 8 στοιβάδες γάζας. Σφίξτε τη γάζα για να πάρετε όλο το υγρό.
- Φυγοκεντρίστε το υγρό, χρησιμοποιώντας κρύους φυγοκεντρικούς σωλήνες, στα 500xg για 2 min ώστε να αφαιρέσετε τα ολόκληρα κύτταρα.
- Μεταφέρετε το υπερκείμενο σε κρύους φυγοκεντρικούς σωλήνες και φυγοκεντρίστε στα 6000xg για περίπου 5 min.
- Απομακρύνετε προσεκτικά το υπερκείμενο και επαναδιασπείρετε το ίζημα, το οποίο περιέχει τους χλωροπλάστες, σε 50ml διαλύματος εναιώρησης.
- Φυγοκεντρίστε στα 8000xg για περίπου 10 min. Απομακρύνετε προσεκτικά το υπερκείμενο και επαναδιασπείρετε το ίζημα, το οποίο περιέχει τους χλωροπλάστες, σε 30ml διαλύματος εναιώρησης.

- Διατηρήστε το παρασκεύασμα των χλωροπλαστών σε πάγο μέχρι να το χρησιμοποιήσετε. Θα παραμείνει σταθερό για περίπου 2 – 4 ώρες.

B. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης χλωροφύλλης

- Εκχυλίστε τη χλωροφύλλη από τους χλωροπλάστες αναμειγνύοντας, σε ένα γυάλινο σωλήνα, 25ml του παρασκευάσματος των χλωροπλαστών (το οποίο έχετε προηγούμενα ανακατέψει καλά) με 5ml 80% ακετόνης σε νερό (φτιάξτε δυο δείγματα).

- Φιλτράρετε το μίγμα χρησιμοποιώντας χάρτινο φίλτρο και μικρό χωνάκι, και μετρήστε την απορρόφηση του διηθήματος στα 645 και 663nm χρησιμοποιώντας ως αναφορά 80% ακετόνη σε νερό.

- Υπολογίστε τη συγκέντρωση της χλωροφύλλης χρησιμοποιώντας την εξίσωση 1 (στις τιμές a και b χρησιμοποιήστε τον μέσο όρο των απορροφήσεων που μετρήσατε)

$$[\text{Chl}] (\text{mgr/ml}) = \frac{20a + 8b}{5} \quad (\text{Εξίσωση 1})$$

Όπου : a = Απορρόφηση της χλωροφύλλης στα 645nm

b = Απορρόφηση της χλωροφύλλης στα 663nm

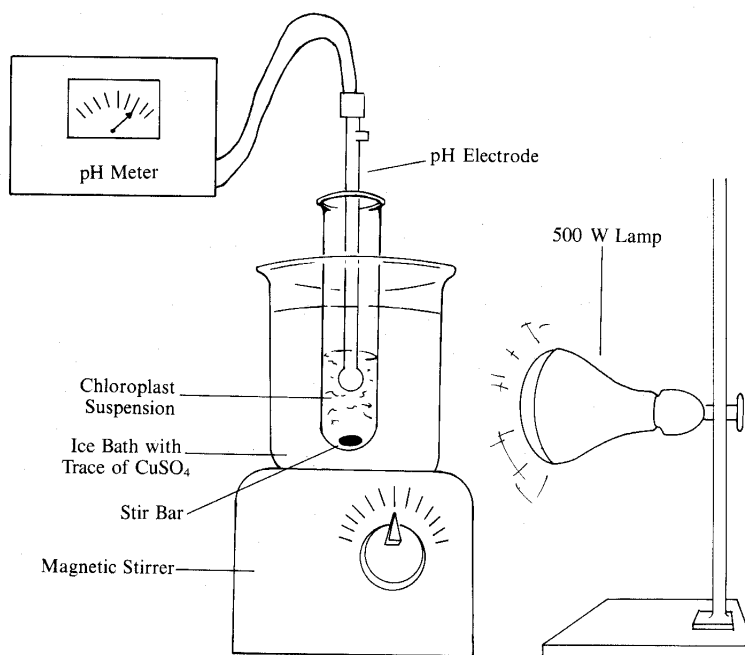
Γ. Μέτρηση πρωτονιακής μεταφοράς

!ΠΡΟΣΟΧΗ!

Επειδή το methyl viologen είναι ισχυρό δηλητήριο και ερεθίζει το δέρμα θα πρέπει να χρησιμοποιείται με μεγάλη προσοχή. **Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και μην αναπνέετε τη σκόνη.**

Η πειραματική διάταξη που θα χρησιμοποιηθεί παρουσιάζεται στην εικόνα 2. Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος διατηρήστε τη θερμοκρασία του υδατόλουτρου στους 10°C περίπου προσθέτοντας πάγο. Προσθέστε μέσα στο υδατόλουτρο μια μικρή ποσότητα διαλύματος CuSO_4 για να απορροφηθεί η υπέρυθη ακτινοβολία που εκπέμπει η λάμπα. Ο δοκιμαστικός σωλήνας στον οποίο εμβαπτίζεται το ηλεκτρόδιο του πεχαμέτρου θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλος ώστε να χωρά 10 – 15ml διαλύματος.

- Αραιώστε το διάλυμα των χλωροπλαστών με διάλυμα ελαιώρησης ώστε η τελική συγκέντρωση χλωροφύλλης να γίνει περίπου 300μg/ml. Ρυθμίστε το πεχάμετρο με το πρότυπο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7. Οι πειραματικές συνθήκες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν αναφέρονται παρακάτω. Κάθε συνθήκη θα πρέπει να δοκιμαστεί ξεχωριστά και να γίνει δύο φορές.



ΕΙΚΟΝΑ 2. Πειραματική διάταξη για την μέτρηση πρωτονιακής μεταφοράς

I. Χλωροπλάστες χωρίς οξειδοαναγωγικό παράγοντα

10ml διαλύματος χλωροπλαστών (περίπου 3 mg χλωροφύλλη)

1ml διάλυμα ελαιώρησης

II. Χλωροπλάστες με οξειδοαναγωγικό παράγοντα

10ml διαλύματος χλωροπλαστών (περίπου 3 mg χλωροφύλλη)

5mg methyl viologen

1ml διάλυμα ελαιώρησης

III. Χλωροπλάστες με οξειδοαναγωγικό παράγοντα, ADP και φωσφορικό

10ml διαλύματος χλωροπλαστών (περίπου 3 mg χλωροφύλλη)

5mg methyl viologen

0,5ml διαλύματος ADP (σε διάλυμα ελαιώρησης)

0,5ml διάλυμα φωσφορικού (το προσθέτουμε στο methyl viologen)

- Για την εκτέλεση κάθε πειράματος, παρασκευάστε το μίγμα της αντίδρασης όπως περιγράφεται παραπάνω.
- Ανακατέψτε καλά και μεταφέρετε στον σωλήνα αντίδρασης.
- Βάλτε ένα μικρό μαγνητικό αναδευτήρα και τοποθετήστε το ηλεκτρόδιο του πεχαμέτρου μέσα στο μίγμα της αντίδρασης. Βάλτε τον μαγνητικό αναδευτήρα να δουλεύει σε χαμηλή ταχύτητα.
- Καλύψτε πολύ καλά όλο το σύστημα με αλουμινόχαρτο και ρυθμίστε το pH του μίγματος (στο σκοτάδι!) στην περιοχή 6 έως 6,2 χρησιμοποιώντας οξύ ή βάση.
- Αφαιρέστε το αλουμινόχαρτο και αμέσως ανοίξτε την λάμπα. Αρχίστε να καταγράφετε την τιμή του pH κάθε 10 δευτερόλεπτα.
- Μετά από 60 δευτερόλεπτα σβήστε την λάμπα, περιμένετε 30 δευτερόλεπτα και ξανανοίξτε την λάμπα συνεχίζοντας να καταγράφετε την τιμή του pH για ακόμη 60 δευτερόλεπτα.
- Φτιάξτε το γράφημα pH συναρτήσει του χρόνου.

Οι πειραματικές συνθήκες 2 και 3 εξετάζονται με παρόμοιο τρόπο.

IV. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ον/μο:

A.M.

Θέση:

Ημ/νία:

A. Παρασκευή χλωροπλαστών από σπανάκι

- 1) Περιγράψτε την παρασκευή χλωροπλαστών από σπανάκι και προσπαθήστε να εξηγήσετε τι συμβαίνει σε κάθε βήμα.
- 2) Σημειώστε το χρώμα από κάθε υπερκείμενο και ίζημα.
- 3) Αναφέρετε για ποιο λόγο επιλέγετε ίζημα ή υπερκείμενο μετά από κάθε φυγοκέντριση.

B. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης χλωροφύλλης

- 1) Υπολογίστε τη συγκέντρωση της χλωροφύλλης χρησιμοποιώντας την εξίσωση 1.

$$[\text{Chl}] (\text{mgr/ml}) = \frac{20a + 8b}{5} =$$

Όπου :

a = Απορρόφηση της χλωροφύλλης στα 645nm

b = Απορρόφηση της χλωροφύλλης στα 663nm

- 2) Ποια είναι η συνολική απόδοση της χλωροφύλλης σε mg ;

Γ. Μέτρηση πρωτονιακής μεταφοράς

1. Συμπληρώστε τους χρόνους στους παρακάτω πίνακες (έναν για κάθε πειραματική διαδικασία).

I. Χλωροπλάστες χωρίς οξειδοαναγωγικό παράγοντα

10ml διαλύματος χλωροπλαστών (περίπου 3 mg χλωροφύλλη)

1ml διάλυμα εναιώρησης

ΧΡΟΝΟΣ (sec)	pH	
	Άμεσα	μετά από 30''
0		
10''		
20''		
30''		
40''		
50''		
60''		

II. Χλωροπλάστες με οξειδοαναγωγικό παράγοντα

10ml διαλύματος χλωροπλαστών (περίπου 3 mg χλωροφύλλη)

5mg methyl viologen

1ml διάλυμα εναιώρησης

ΧΡΟΝΟΣ (sec)	pH	
	Άμεσα	μετά από 30''
0		
10''		
20''		
30''		
40''		
50''		
60''		

III. Χλωροπλάστες με οξειδοαναγωγικό παράγοντα, ADP και φωσφορικό

10ml διαλύματος χλωροπλαστών (περίπου 3 mg χλωροφύλλη)

5mg methyl viologen

0,5ml διαλύματος ADP (σε διάλυμα εναιώρησης)

0,5ml διάλυμα φωσφορικού

ΧΡΟΝΟΣ (sec)	pH	
	Άμεσα	μετά από 30''
0		
10''		
20''		
30''		

40''	
50''	
60''	

2. Κάντε το διάγραμμα του pH (άξονας y) ως προς τον χρόνο (άξονας x) για κάθε πείραμα και επισυνάψτε τα (βλ. **ΕΙΚΟΝΑ 1**).

3. Συμπληρώστε τους παρακάτω πίνακες (έναν για τις τιμές του pH που καταγράφετε άμεσα και έναν για τις τιμές 30'' αργότερα):

1^ο λεπτό:

ΠΡΟΣΘΗΚΗ	ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΑΛΛΑΓΗΣ ΤΟΥ pH (sec/0,5 pH)	ΣΧΕΤΙΚΗ ΤΑΧΥΤΗΤΑ (ΔpH/sec)
Τίποτα		
+methyl viol.		
+m.v., ADP, Pi		

2^ο λεπτό:

ΠΡΟΣΘΗΚΗ	ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΑΛΛΑΓΗΣ ΤΟΥ pH (sec/0,5 pH)	ΣΧΕΤΙΚΗ ΤΑΧΥΤΗΤΑ (ΔpH/sec)
Τίποτα		
+methyl viol.		
+m.v., ADP, Pi		

4. Συγκρίνετε τις σχετικές ταχύτητες πρωτονιακής μεταφοράς για κάθε πειραματική συνθήκη και εξηγήστε οποιαδήποτε διαφορά. Επηρεάζει την ταχύτητα αλλαγής του pH, η προσθήκη φωτοευαίσθητων οξειδοαναγωγικών συμπαραγόντων; Ποια είναι η επίδραση της προσθήκης του ADP και των φωσφορικών στην ταχύτητα αλλαγής του pH;

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- D. Arnon, **Plant Physiol.** **24**, 1-15 (1949). Determination of chlorophyll content of chloroplasts.
- D. Arnon, **Trends Biochem. Sci.** **9**, 258-262 (1984). The Discovery of Photosynthetic Phosphorylation.
- R. Boyer, **Concepts in Biochemistry** (1999), Brooks/Cole (Pacific Grove, CA), pp. 528-549. Review of photosynthesis.
- R. Dilley, in **Methods in Enzymology, Vol. 24B**, A. San Pietro, Editor (1972), Academic Press (New York), pp. 68-74. Transport of H⁺, K⁺, and Mg²⁺ in isolated chloroplasts.
- Govindjee and W. Coleman, **Sci. Am.** **262**(2), 50-58 (1990). How plants make oxygen
- J. Ho and E. Po, **Biochem. Educ.** **24**, 179-180 (1996). Light-induced proton transfer through chloroplast membrane.
- A. Jagendorf and E. Uribe, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **55**, 170-177 (1966). ATP Formation Caused by Acid-Base Transition of Spinach Chloroplasts.
- J. Neumann and A. Jagendorf, **Arch. Biochem. Biophys.** **107**, 109-119 (1964). Light-Induced pH Changes Related to Phosphorylation by Chloroplasts.
- W. Nitschke and A. Rutherford, **Trends Biochem. Sci.** **16**, 241-245 (1991). Photosynthetic Reaction Centres: Variations on a Common Structural Theme.
- A.L. Lehninger, D. L. Nelson, and M. M. Cox, **Principles of Biochemistry**, Worth, 1993.
- E. Pennisi, (1996), **Science**, 273, Chemical Shackles for Genes?
- L. Roberts, (1990), **Science**, 249, New Scissors for Cutting Chromosomes.
- J. F. Robyt and B. J. White, **Biochemical Techniques**, Brooks Cole, 1990.
- L. Stryer, **Biochemistry**, 3rd ed., Freeman, 1998.
- Koning, Ross E. 1994, Light Reactions. *Plant Physiology Information Website*, http://plantphys.info/plant_physiology/lightrx.html (προσπέλαση 13/10/2017)

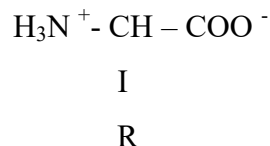
ΠΕΙΡΑΜΑ 2: ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ - Στοιχεία θεωρίας

I. ΑΜΙΝΟΞΕΑ

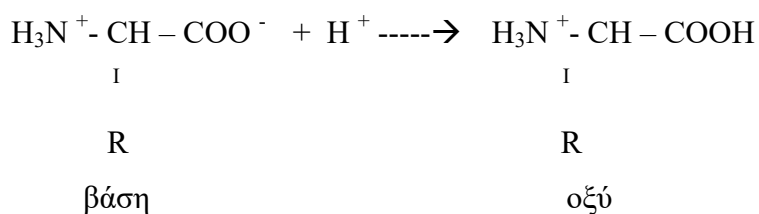
Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση αμινοξέων πολύ συχνά αποτελούν ενδιάμεσα στάδια στην έρευνα των βιοχημικών. Τα 20 αμινοξέα που υπάρχουν στις πρωτεΐνες έχουν μεν παρόμοιες δομές όμως η πολικότητα και τα ιονικά χαρακτηριστικά είναι μοναδικά για κάθε αμινοξύ. Στο πείραμα αυτό θα εφαρμοστεί ένας συνδυασμός χρωματογραφίας ανταλλαγής ιόντων και χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας για να διαχωριστεί ένα μίγμα αμινοξέων και να ταυτοποιηθούν τα αμινοξέα που το αποτελούν.

Τα αμινοξέα ως ασθενή οξέα και βάσεις

Τα αμινοξέα είναι ταυτόχρονα ασθενή οξέα και ασθενείς βάσεις γιατί έχουν μια τουλάχιστον αμινομάδα και καρβοξυλομάδα. Όταν διαλύονται στο νερό είναι κυρίως στην ιονισμένη τους μορφή:



Εάν στο στάδιο αυτό προσθέσουμε ένα οξύ, το αμινοξύ θα δεχτεί ένα πρωτόνιο δηλαδή θα συμπεριφερθεί ως βάση:



Εάν προσθέσουμε βάση το αμινοξύ θα δώσει ένα πρωτόνιο δηλαδή θα συμπεριφερθεί ως οξύ:



Εάν η ομάδα R είναι όξινη (π.χ. Glu, Asp), είναι φανερό ότι υπάρχει μια επιπλέον καρβοξυλική ομάδα που μπορεί να δώσει ένα πρωτόνιο. Εάν η ομάδα R είναι βασική (π.χ. Lys, Arg, His), τότε υπάρχει μια αμινομάδα που μπορεί να δεχτεί ένα πρωτόνιο. Δηλαδή ένα αμινοξύ μπορεί να συμπεριφέρεται σαν οποιοδήποτε οξύ ή βάση, με τη διαφορά ότι πρέπει να λαμβάνουμε υπόψη τη συμπεριφορά μέχρι και τριών ενεργών ομάδων. Ευτυχώς, σε συγκεκριμένο pH, μόνο μια απ' αυτές είναι πραγματικά σημαντική.

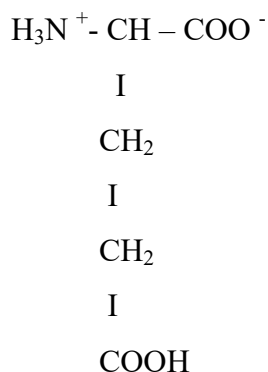
Έχοντας στη διάθεσή σας τον πίνακα των pKa (πίνακας 1) και την εξίσωση Henderson–Hasselbalch μπορείτε να κατανοήσετε προβλήματα που απαιτούν παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων αμινοξέων (παράδειγμα 1).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Ιδιότητες των πιο γνωστών αμινοξέων

Table 5.1 Properties of the Common Amino Acids					
Amino Acid	3-Letter Code	1-Letter Code	pK _a α-COOH	pK _a α-NH ₃ ⁺	pK _a Side Chain
Alanine	Ala	A	2.34	9.69	
Arginine	Arg	R	2.34	9.69	12.48
Asparagine	Asn	N	2.02	9.82	
Aspartic acid	Asp	D	2.09	9.82	3.86
Cysteine	Cys	C	1.71	10.78	8.33
Glutamine	Gln	Q	2.17	9.13	
Glutamic acid	Glu	E	2.19	9.67	4.25
Glycine	Gly	G	2.34	9.60	
Histidine	His	H	1.82	9.17	6.0
Isoleucine	Ile	I	2.36	9.68	
Leucine	Leu	L	2.36	9.68	
Lysine	Lys	K	2.18	8.95	10.53
Methionine	Met	M	2.28	9.21	
Phenylalanine	Phe	F	1.83	9.13	
Proline	Pro	P	1.99	10.60	
Serine	Ser	S	2.21	9.15	
Threonine	Thr	T	2.63	10.43	
Tryptophan	Trp	W	2.38	9.39	
Tyrosine	Tyr	Y	2.20	9.11	10.07
Valine	Val	V	2.32	9.62	

Παράδειγμα 1: Ποιές μορφές γλουταμικού οξέος θα υπάρχουν σε pH 4,3; Τα pKa για το γλουταμικό είναι 2,2, 4,3, και 9,7.

Το γλουταμικό είναι στην παρακάτω μορφή σε πολύ χαμηλό pH:



Χρειάζεται να λάβετε υπόψη σας μόνο την πλευρική καρβοξυλομάδα, αλλά για να κατανοήσετε το γιατί πρέπει πρώτα να προσδιορίσετε το % ποσοστό των λειτουργικών ομάδων στις A⁻ και HA μορφές:

a-COOH pka =2,2

$$\text{pH} = \text{pka} + \log \text{base/acid}$$

$$4,3 = 2,2 + \log \text{base/acid}$$

$$2,1 = \log \text{base/acid}$$

$$\text{antilog } 2,1 = \text{base/acid} = 126$$

Με άλλα λόγια, ο λόγος της COO⁻ μορφής προς την COOH μορφή είναι 126:1. Πρακτικά όλο το α- COOH είναι ιονισμένο.

a-amino pka = 9,7

$$4,3 = 9,7 + \log \text{base/acid}$$

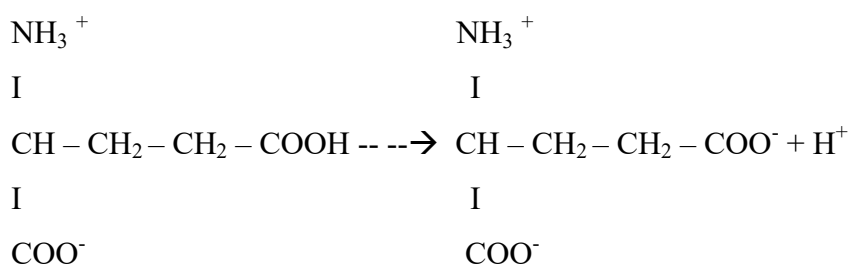
$$-5,4 = \log \text{base/acid}$$

$\text{antilog } -5,4 = \text{base/acid} = 3,9 \times 10^{-6}$, δηλαδή πρακτικά όλο είναι στην όξινη μορφή, NH₃⁺.

Δεν ήταν απαραίτητο να υπολογίσουμε το λόγο βάση/οξύ γι' αυτές τις δυο ομάδες γιατί το pH της άσκησης ήταν πολύ μακριά από τα pKa των ομάδων. Ένας γενικός κανόνας είναι ότι μπορούμε να μην λαμβάνουμε υπόψη τις ομάδες που το pKa τους είναι περίπου 2 μονάδες μακριά από το δεδομένο pH. Αυτό δε σημαίνει ότι η συγκεκριμένη ομάδα δεν είναι σημαντική, απλά έχει να κάνει με τη μορφή που έχει στις συγκεκριμένες συνθήκες.

γ-COOH pka = 4,3

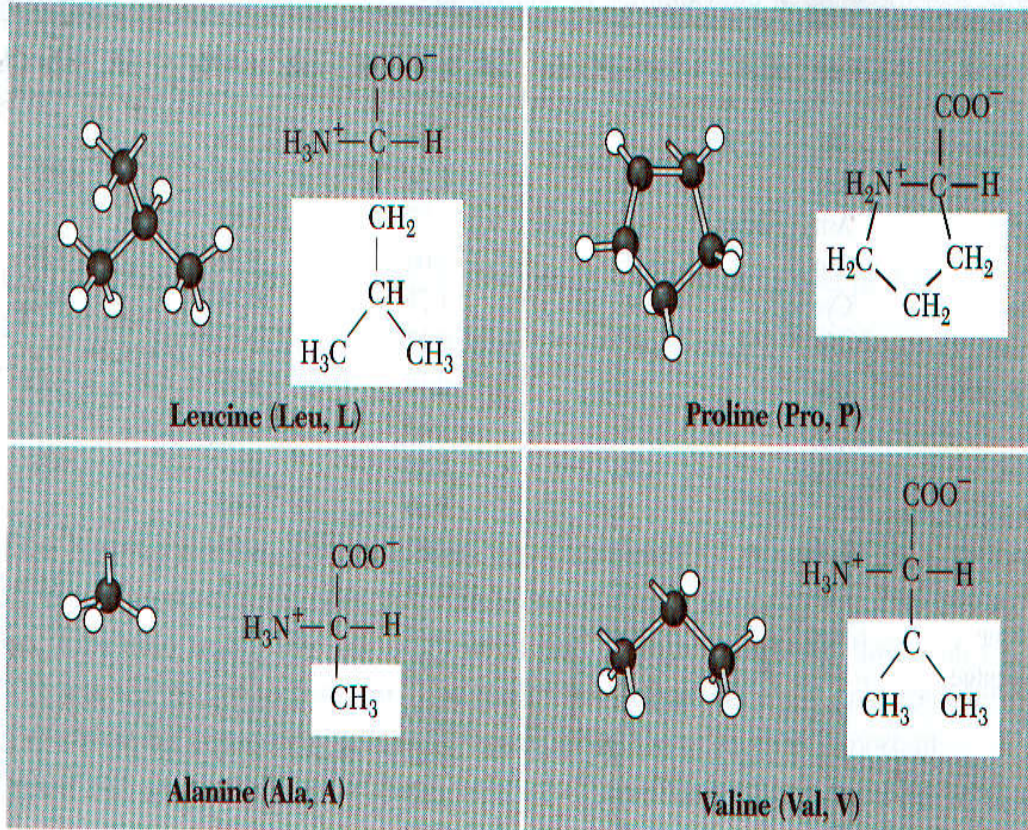
Είναι φανερό ότι σε pH = 4,3, οι μισές γ- COOH ομάδες είναι ιονισμένες αφού pH = pKa. Επομένως, σε pH = 4,3 υπάρχουν οι ακόλουθες μορφές γλουταμικού οξέος:



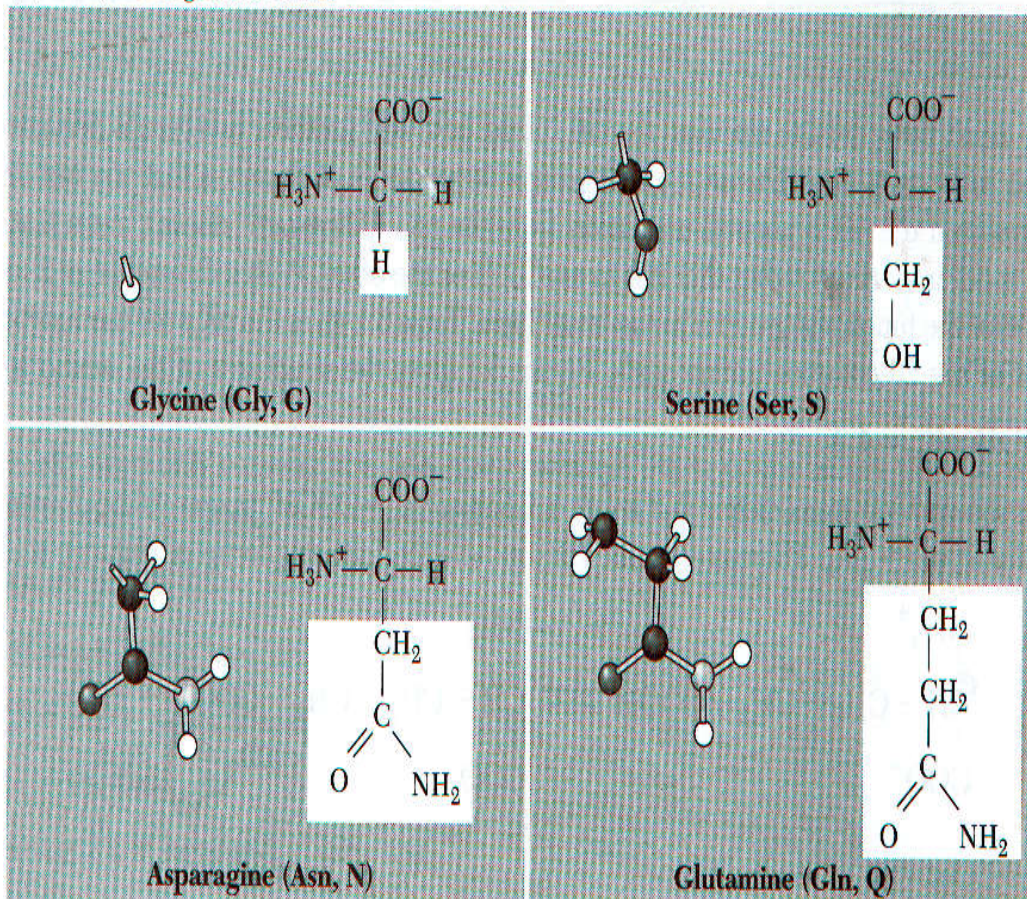
Στον πίνακα 2 δίνονται οι δομές των 20 πιο συνηθισμένων αμινοξέων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Δομές των πιο γνωστών αμινοξέων

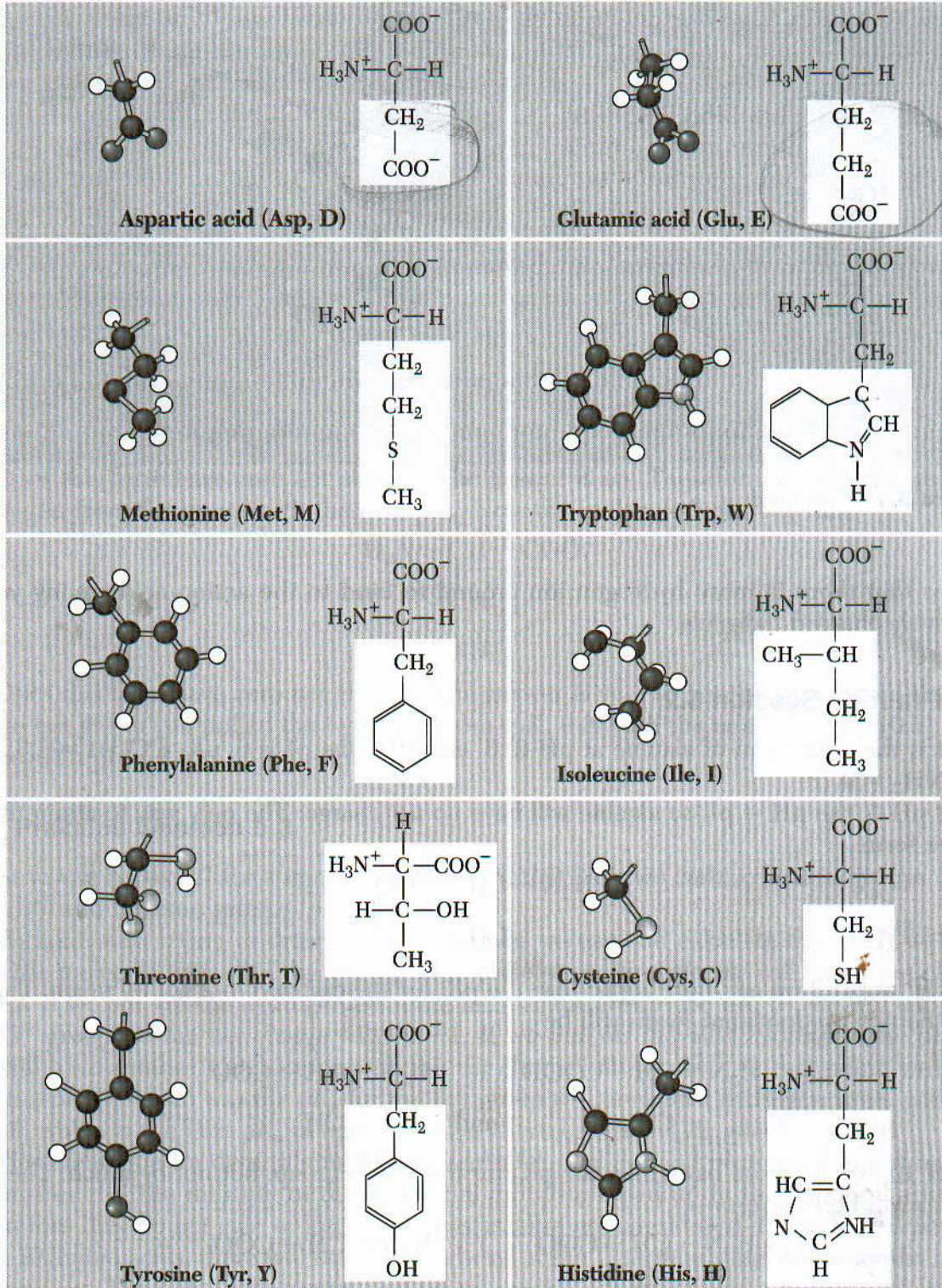
(a) Nonpolar side chains



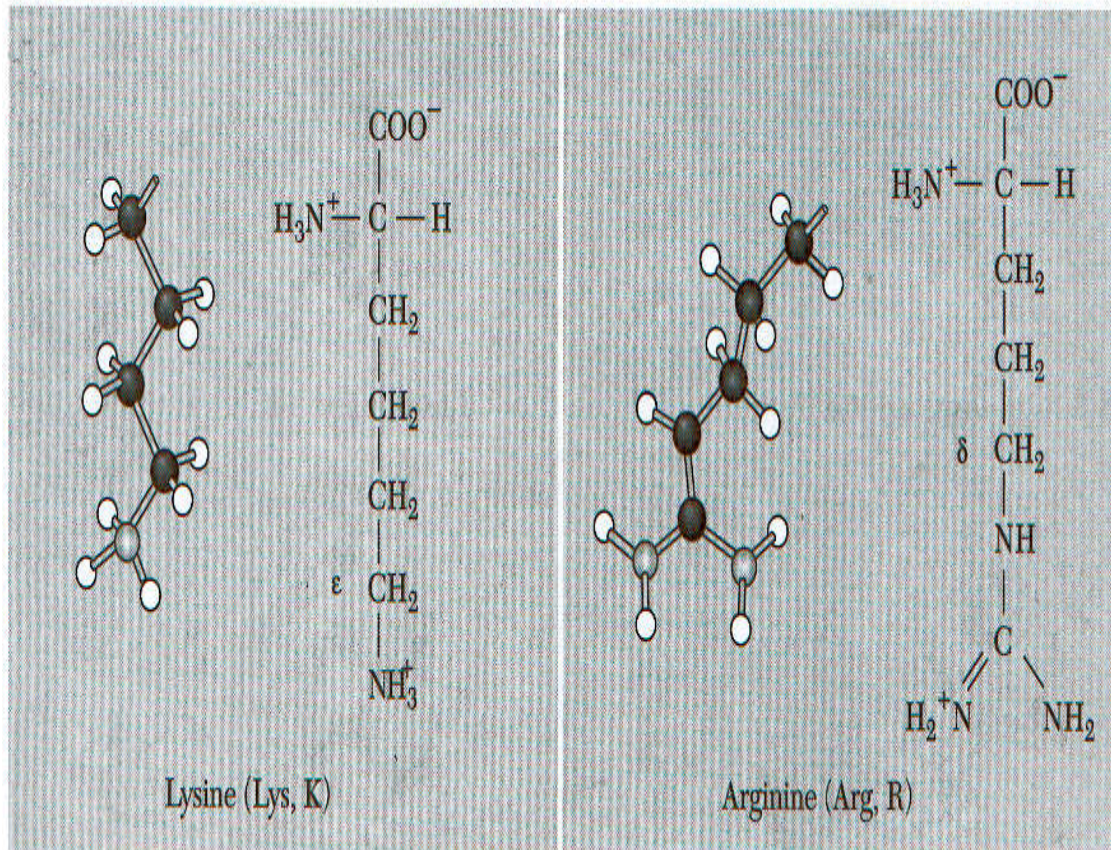
(b) Polar, uncharged side chains



(c) Acidic side chains



(d) Basic side chains

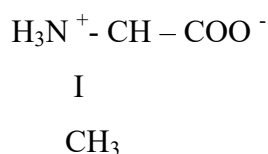


Ισοηλεκτρικό σημείο

Η εύρεση του ισοηλεκτρικού σημείου (pI) είναι σημαντική για τον χαρακτηρισμό ενός αμινοξέος. Πρόκειται για το pH στο οποίο το αμινοξύ έχει μηδενικό φορτίο και καθορίζεται από την επίδραση δύο ή τριών λειτουργικών μονάδων του αμινοξέος. Μια τιμή pH υψηλότερη από το pI υποδηλώνει την ύπαρξη ιόντων υδροξυλίου στο περιβάλλον του αμινοξέος. Όσο περισσότερα ιόντα υδροξυλίου υπάρχουν τόσο περισσότερα ιόντα υδρογόνου αποσπών από το αμινοξύ, αφήνοντας ένα αρνητικά φορτισμένο μόριο. Ανάλογα, μια τιμή pH χαμηλότερη από το pI σημαίνει ότι τα ιόντα του υδρογόνου αλληλεπιδρούν με το αμινοξύ οπότε αυτό αποκτά θετικό φορτίο.

Παράδειγμα 2. Ποια είναι η ιονική μορφή της αλανίνης σε pH 2, 6 και 10 εάν $pI=6$, $pK_aCOOH=2,3$ και $pK_aNH_3=9,7$;

Σε $pH=6=pI$ η αλανίνη δεν έχει φορτίο ή με άλλα λόγια το σύνολο των θετικών φορτίων είναι ίδιο με το σύνολο των αρνητικών φορτίων στο μόριο:



Σε pH 2 το περιβάλλον είναι πιο όξινο από το pK_a για το καρβοξύλιο αλλά όχι πολύ. Οπότε δυο είναι οι κύριες μορφές του μορίου στις συνθήκες αυτές:



Σε pH 10, το περιβάλλον είναι πιο βασικό από το pK_a για την αμινομάδα, αλλά όχι πολύ. Οπότε δυο είναι οι κύριες μορφές του μορίου στις συνθήκες αυτές:

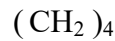


Προσδιορισμός του ισοηλεκτρικού σημείου

Υπάρχει ένας απλός τρόπος για να προσδιορίσουμε το ισοηλεκτρικό σημείο ενός αμινοξέος. Έχουμε στη διάθεσή μας την εξίσωση $pI = (pK_{a1} + pK_{a2})/2$ που όμως δε μας δίνει πληροφορίες για τα pK_a που πρέπει να χρησιμοποιήσουμε. Είναι γνωστό ότι, αρκετά αμινοξέα έχουν 3 pK_a οπότε πρέπει να έχουμε κάποιο κριτήριο για να επιλέξουμε αυτά που θα δώσουν το μέσο όρο. Ας εξετάσουμε τη λυσίνη που έχει τα ακόλουθα pK_a : 2,2 (καρβοξυλομάδα), 9,0 (α-αμινομάδα), και 10,5 (πλευρική αμινομάδα). Αρχίζουμε γράφοντας τον τύπο του αμινοξέος συμπεριλαμβάνοντας όλα τα υδρογόνα:



I



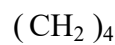
I



Απομακρύνουμε ένα υδρογόνο από την ομάδα με το χαμηλότερο pK_a και καταλήγουμε στην παρακάτω μορφή:



I



I



Εξετάζουμε εάν στο στάδιο αυτό έχουμε 0 φορτίο στο μόριο. Προφανώς όχι. Συνεχίζουμε απομακρύνοντας ένα υδρογόνο από την ομάδα με το επόμενο χαμηλότερο pK_a και καταλήγουμε στην παρακάτω μορφή:



I



I



Έχουμε 0 φορτίο στο μόριο; Η απάντηση είναι ναι. Για να προσδιορίσουμε το pI , παίρνουμε τον μέσο όρο των pK_a της τελευταίας ομάδας από την οποία απομακρύναμε το υδρογόνο ($\text{pK}_a = 9$) και της επόμενης ($\text{pK}_a = 10,5$). Το αποτέλεσμα είναι $\text{pI} = 9,8$.

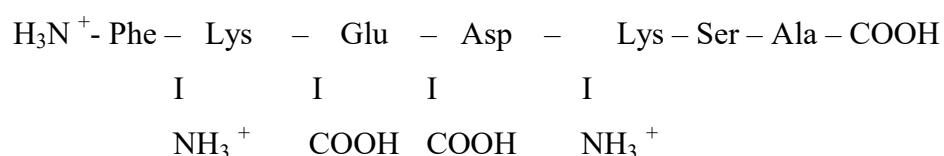
Η μέθοδος αυτή είναι επίσης αποτελεσματική για τον προσδιορισμό του pI πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Απλά πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι οι περισσότερες λειτουργικές μονάδες αλληλεπιδρούν για να σχηματίσουν τη ραχοκοκαλιά του πεπτιδίου. Επομένως, δεν λαμβάνονται υπόψη στους υπολογισμούς αφού ούτε παίρνουν ούτε δίνουν υδρογόνα. Εάν π.χ. έχουμε ένα πεπτίδιο με 10 αμινοξέα, θα υπάρχει ένα $\alpha\text{-COOH}$ στο καρβοξυτελικό άκρο και μία $\alpha\text{-NH}_3^+$ στο αμινοτελικό

άκρο. Οι υπόλοιπες λειτουργικές ομάδες που θα πρέπει να υπολογιστούν είναι οι πλευρικές καρβοξυλομάδες και αμινομάδες.

Παράδειγμα 3. Υπολογίστε το pI του παρακάτω αμινοξέος:

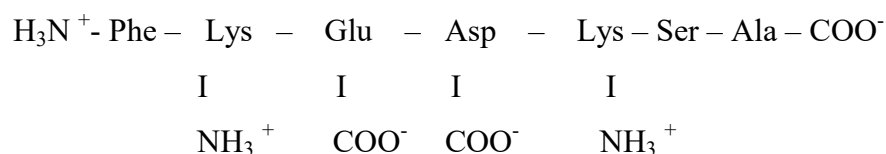


Το πρώτο πράγμα που πρέπει να κάνουμε είναι να ξαναγράψουμε το πεπτίδιο αυτό έτσι ώστε να φαίνονται καθαρά ποιες όξινες ή βασικές ομάδες υπάρχουν στο μόριο. Υπάρχει η α-αμινομάδα της Phe, η πλευρική αμινομάδα της Lys, η πλευρική καρβοξυλομάδα του Glu, η πλευρική καρβοξυλομάδα του Asp, άλλη μια πλευρική αμινομάδα στην δεύτερη Lys, τίποτα στη Ser, και η α- καρβοξυλομάδα της Ala:



Το επόμενο βήμα είναι να βρούμε από το ανάλογο πίνακα τα pKa για τις ομάδες που έχουμε σημειώσει. Οι τιμές (από αριστερά προς δεξιά) είναι: 9,13, 10,5, 4,3, 3,9, 10,5, και 2,3.

Στη συνέχεια αρχίζουμε να απομακρύνουμε υδρογόνα από τις διάφορες ομάδες αρχίζοντας από το χαμηλότερο pKa μέχρι να φτάσουμε στη μορφή στην οποία το μόριο έχει συνολικό φορτίο 0. Από την παραπάνω απεικόνιση του μορίου διαπιστώνουμε ότι υπάρχουν τρία θετικά φορτία. Οπότε μπορούμε να απομακρύνουμε υδρογόνα από τρεις ομάδες οι οποίες θα δίνουν αρνητικά φορτία, μέχρι να φτάσουμε στην ισοηλεκτρική μορφή. Όταν θα γίνει αυτό, το πεπτίδιο θα έχει την εξής μορφή:



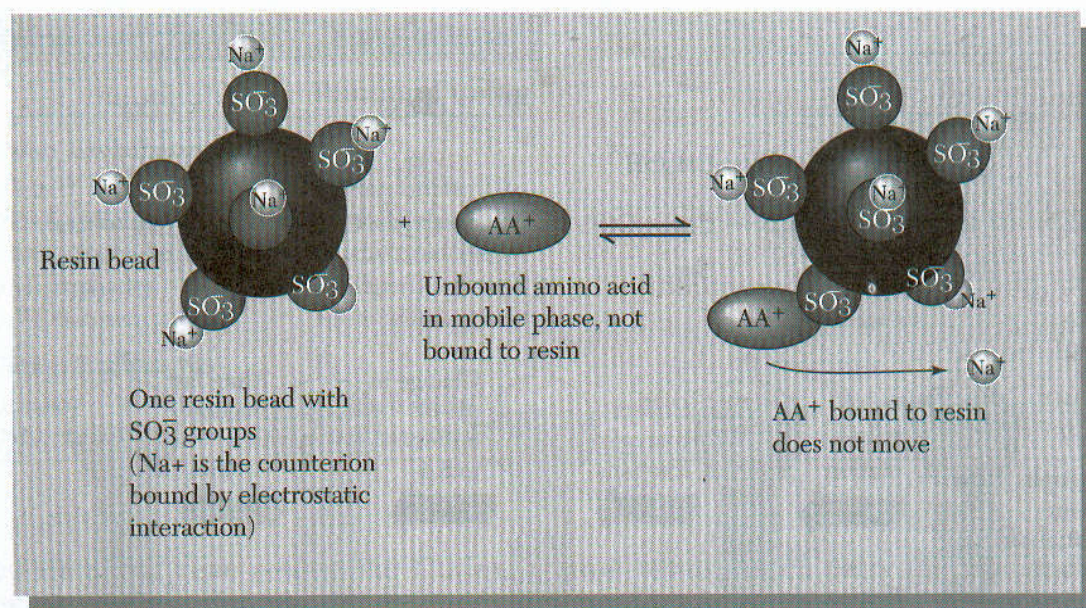
Για να προσδιορίσουμε το pI του πεπτιδίου πρέπει να υπολογίσουμε το μέσο όρο του pK_a της τελευταίας ομάδας από την οποία απομακρύνουμε υδρογόνο (πρόκειται γι' αυτή με το υψηλότερο pK_a απ' αυτές που αφαιρέσαμε υδρογόνο) με το pK_a της αμέσως επόμενης ομάδας (πρόκειται γι' αυτή με το χαμηλότερο pK_a απ' αυτές που δεν αφαιρέσαμε υδρογόνο).

Οπότε:

$$pI = (4,3 + 9,0) / 2 = 6,65$$

II. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΙΟΝΤΩΝ

Μια από τις πιο εύχρηστες και αποτελεσματικές μεθόδους για τον διαχωρισμό φορτισμένων ενώσεων είναι η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων. Η κολώνα γεμίζεται με μια ρητίνη η οποία περιέχει φορτισμένες ομάδες στην επιφάνειά της. Στο συγκεκριμένο πείραμα θα χρησιμοποιήσουμε έναν τύπο ρητίνης που ονομάζεται DOWEX™ 50 X8 (200-400 mesh) και περιέχει ομάδες σουλφονικού οξέος (Εικόνα 1).

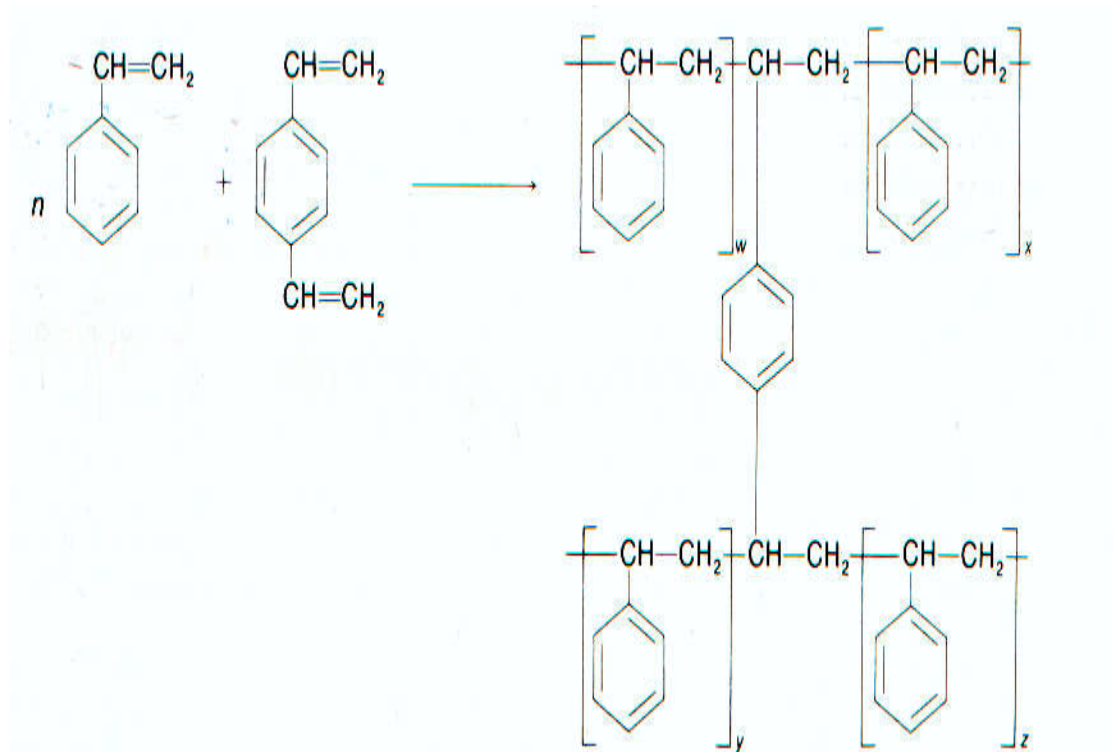


ΕΙΚΟΝΑ 1. Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων σε DOWEX.

Οι συγκεκριμένοι ιοντοανταλλάκτες αποτελούνται από πορώδη ελαστικά σωματίδια που περιέχουν ένα σκελετό συνθετικής ρητίνης, συνήθως πολυστυρολίου, από τον συμπολυμερισμό στυρολίου και διβινυλοβενζολίου (Εικόνα 2). Όπως φαίνεται, το διβινυλοβενζόλιο δημιουργεί μια διασταυρούμενη σύνδεση με τις ευθείες αλυσίδες του πολυστυρολίου. Αυτό επιτρέπει την παρασκευή εσωτερικώς

διασταυρωμένων τρισδιάστατων κόκκων των ρητινών. Αυτοί οι κόκκοι δημιουργούν και τη μήτρα για τη διαδικασία της ιοντοανταλλαγής.

Οι επιθυμητές ιοντικές ή οργανικές ομάδες προστίθενται σε αυτή την τρισδιάστατη μήτρα, με διαφοροποίηση των χημικών συστάσεων των αρχικών μονομερών. Για παράδειγμα μία ρητίνη που περιέχει ομάδες με ισχυρό όξινο χαρακτήρα ($-\text{SO}_3\text{H}$) μπορεί να παρασκευαστεί με τη χρήση του βινυλοβενζολικού σουλφονικού οξέος αντί για στυρόλιο ή με αντίδραση σουλφούρωσης του συμπολυμερούς στυρολίου –διβινυλοβενζολίου. Με όμοιο τρόπο μπορούμε να παρασκευάσουμε μια ρητίνη με ισχυρά βασικές ομάδες ($-\text{NR}_3^+$), ασθενή οξέα ($-\text{COOH}$) ή ασθενείς βάσεις ($-\text{NH}_3^+$) με μερική αντικατάσταση του στυρολίου από κατάλληλα υποκατεστημένο στυρόλιο.



ΕΙΚΟΝΑ 2. Συμπολυμερισμός στυρενίου και διβινυλοβενζολίου. Οι μονάδες στυρολίου είναι σε παρένθεση.

Οι ρητίνες αυτού του τύπου παρασκευάζονται με διασταύρωση ποικίλου βαθμού, η οποία εξαρτάται από τα ποσοστά του διβινυλοβενζολίου. Ο βαθμός της διασταύρωσης ή το αρχικό ποσοστό του διβινυλοβενζολίου, πάντοτε αναφέρεται με έναν αριθμό που ακολουθεί την ένδειξη της ρητίνης (π.χ. η ρητίνη DOWEX 50X8 περιέχει 8% διβινυλοβενζόλιο κατά το συμπολυμερισμό). Υψηλά ποσοστά

διασταύρωσης (π.χ. DOWEX 50X12) ευνοούν το σταθερό σχήμα (όχι έκταση ή συρρίκνωση του υποστρώματος) της ρητίνης. Αντίθετα, ο υψηλός βαθμός πλέγματος καθυστερεί την είσοδο των μορίων στις ρητίνες. Επιπλέον, ο υδρόφοβος χαρακτήρας των ρητινών πολυστυρολίου συχνά αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες. Γι' αυτό τον λόγο χρησιμοποιούνται κυρίως για το διαχωρισμό μικρών ιοντικών μορίων (π.χ. αμινοξέα, πεπτίδια, σάκχαρα).

Αρχικά η ρητίνη είναι σε όξινη ή H^+ μορφή οπότε αντιδρά με $NaOH$ με αποτέλεσμα τα υδρογόνα να απομακρύνονται και τη θέση τους παίρνουν τα ιόντα νατρίου. Στη μορφή αυτή η ρητίνη δρα ως ιοντοανταλλάκτης επειδή τα ιόντα νατρίου μπορούν να αντικατασταθούν από άλλα θετικά φορτισμένα μόρια. Με άλλα λόγια, ένα μόριο αμινοξέος που βρίσκεται σε pH χαμηλότερο από το pI του μπορεί να προσδεθεί σε μια από τις σουλφονυλικές ομάδες εκτοπίζοντας ένα ιόν Na . Επειδή ακριβώς ένα κατιόν προσδέεται αντικαθιστώντας ένα άλλο κατιόν, αυτός ο τύπος κολώνας είναι γνωστός ως κολώνα ανταλλαγής κατιόντων.

Με χρήση της τεχνικής αυτής μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μίγμα αμινοξέων όπως φαίνεται διαγραμματικά στην Εικόνα 3. Ας υποθέσουμε ότι έχουμε μια κολώνα με ρητίνη DOWEX ενεργοποιημένη με ιόντα Na , στην οποία διοχετεύουμε ένα μίγμα τριών αμινοξέων (His , Ser , και Asp). Το σύστημα είναι σε pH 3,25. Στο pH αυτό το ασπαρτικό οξύ βρίσκεται σε δυο μορφές: 80% των μορίων δεν έχει φορτίο ενώ το 20% είναι αρνητικά φορτισμένο. Αυτό σημαίνει ότι η πρόσδεση του ασπαρτικού οξέος στην κολώνα δεν ευνοείται οπότε αυτό εκλύεται γρήγορα. Η σερίνη ($pI=5,68$) έχει θετικό φορτίο στο pH αυτό οπότε προσδέεται στην κολώνα. Η ιστιδίνη ($pI=7,6$) είναι επίσης θετικά φορτισμένη οπότε παραμένει και αυτή στην κολώνα και εκλύεται τελευταία. Στην πραγματικότητα τα δυο αυτά αμινοξέα δεν απομακρύνονται αν δεν αντικαταστήσουμε το ρυθμιστικό διάλυμα με άλλα των οποίων το pH θα αυξάνεται βαθμιαία.

Συνοψίζοντας, μπορούμε να πούμε ότι:

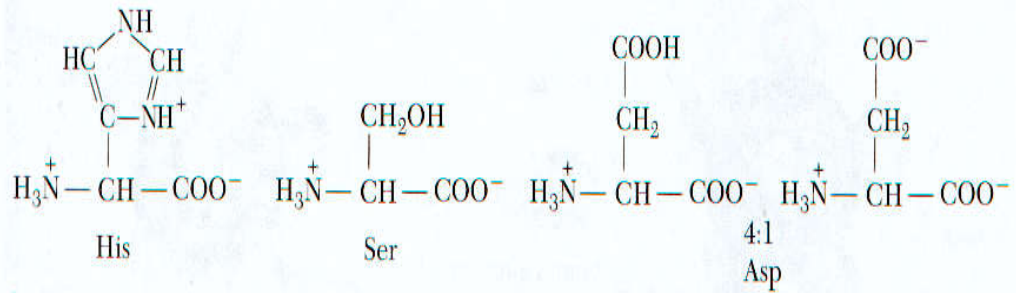
- Ο πιο συνηθισμένος τρόπος διαχωρισμού των αμινοξέων είναι η σταδιακή έκλυσή τους με ρυθμιστικά διαλύματα διαφορετικού pH . Εάν το pI του αμινοξέος και το pH του διαλύματος είναι γνωστά, μπορούμε να προβλέψουμε αν το αμινοξύ είναι θετικά ή αρνητικά φορτισμένο ή ηλεκτρικά ουδέτερο.

Συγκεκριμένα: **Εάν $pH > pI$, το μόριο είναι αρνητικό.**

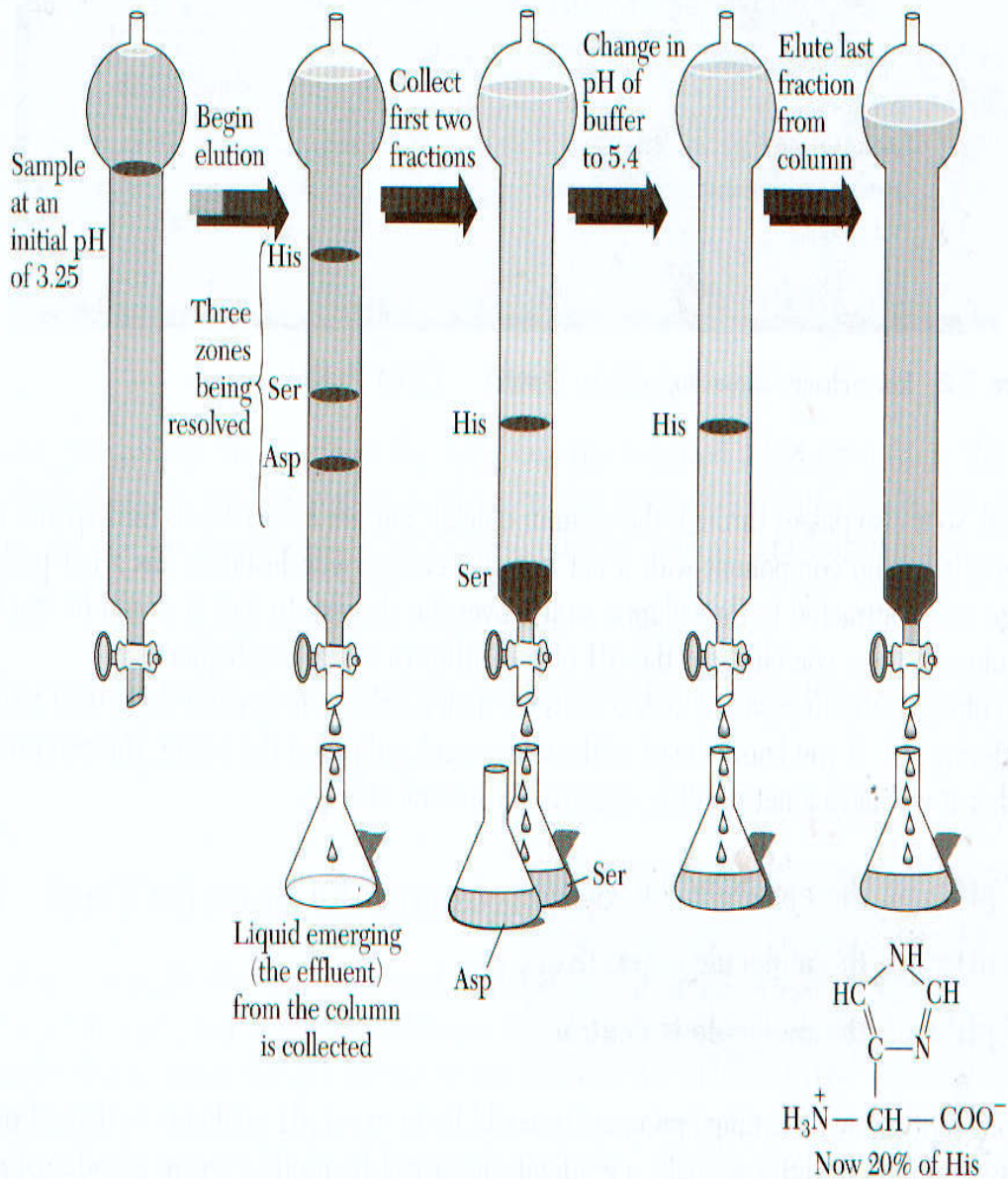
Εάν $pH < pI$, το μόριο είναι θετικό.

Εάν $pH = pI$, το μόριο είναι ουδέτερο.

- Ο πιο σωστός και ακριβής τρόπος για την έκλυση των αμινοξέων είναι με χρήση διαβάθμισης pH. Αντί να χρησιμοποιούμε μεμονωμένα ρυθμιστικά διαλύματα με διαφορετικά pH μπορούμε με τη χρήση μιας συγκεκριμένης συσκευής να παρασκευάσουμε ένα ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο το pH διαρκώς αυξάνεται. Με τον τρόπο αυτό, ακόμα και αμινοξέα με μικρή διαφορά στο pI τους μπορούν να διαχωριστούν. Είναι επίσης εφικτό να εκλουστούν αμινοξέα ή άλλα φορτισμένα μόρια με αύξηση του ηλεκτρικού φορτίου στο περιβάλλον της κολώνας. Για παράδειγμα, με προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης ιόντων Na^+ στην κολώνα, τα συνδεδεμένα αμινοξέα θα απομακρυνθούν επειδή τα ιόντα Na^+ συναγωνίζονται μ' αυτά για τις ίδιες θέσεις πρόσδεσης και λόγω πλήθους τα εκτοπίζουν.



(b)



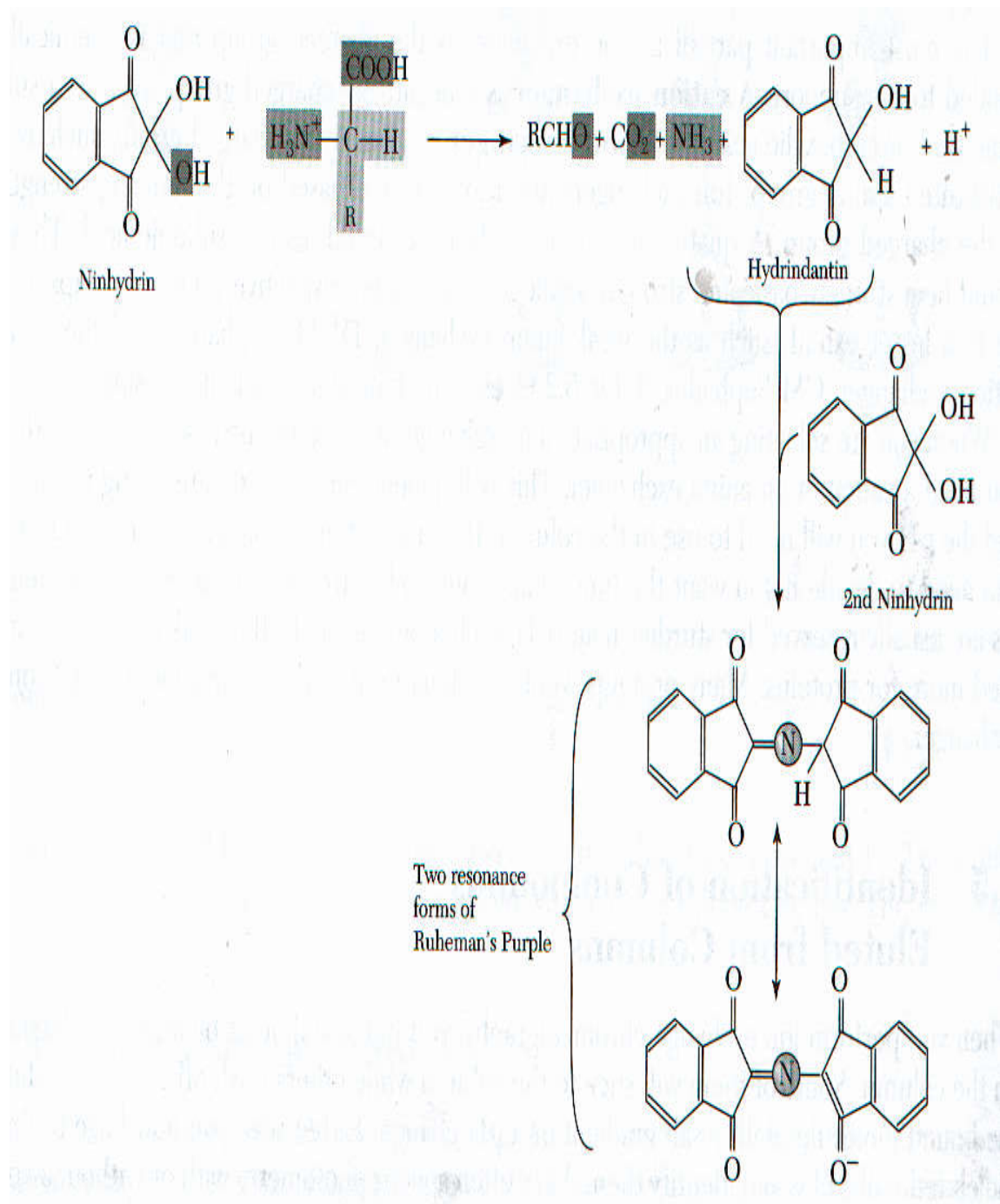
EIKONA 3. Διαχωρισμός αμινοξέων με χρήση κολώνας ανταλλαγής ιόντων.

Παράδειγμα 4: Εάν έχετε ένα μίγμα Phe pI 5,5, Thr pI 6,5, Asp pI 3, His pI 7,6, και Lys pI 9,8, σε pH 11, το φορτώνετε σε μια κολώνα ανιοντοανταλλαγής και στη συνέχεια το εκλούετε με μια διαβάθμιση ελαττούμενου pH , με ποια σειρά θα εκλουστούν τα αμινοξέα;

Σε pH 11, όλα τα αμινοξέα θα είναι αρνητικά φορτισμένα γιατί τα pI τους είναι μικρότερα από 11 οπότε θα αρχίσουν να εκλούνται με τη σειρά που το pH ταυτίζεται με το pI τους, δηλαδή Lys, His, Thr, Phe, Asp.

Ταυτοποίηση των ενώσεων που εκλούνται από τις κολώνες

Κατά τη διαδικασία της χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής τοποθετείται ένα μίγμα βιολογικών μορίων στην κολώνα. Κάποια μόρια εκλούνται άμεσα ενώ άλλα προσδένονται στην κολώνα, οπότε πρέπει να γίνει αλλαγή στο pH ή την αλατότητα για να εκλουστούν. Σε κάθε περίπτωση, τα μόρια αυτά πρέπει να ταυτοποιηθούν. Πολύ συχνά γίνεται χρήση της φασματοσκοπίας για να ελεγχθούν τα κλάσματα από την κολώνα και να διαπιστωθεί αν περιέχουν τα μόρια που μας ενδιαφέρουν. Συνήθως, ένα ανιχνευτής UV είναι συνδεδεμένος στην έξοδο της κολώνας και μετράει συνεχώς την απορρόφηση στα 280 nm ενώ η χρωματογραφία είναι σε εξέλιξη. Αν το εργαστήριο δεν διαθέτει ανιχνευτή, τα κλάσματα μεταφέρονται ένα ένα σε κυψελίδα χαλαζία και μετράται η απορρόφηση σε ένα φασματοφωτόμετρο UV. Με τον τρόπο αυτό μπορείτε να βρείτε σε ποια κλάσματα υπάρχει πρωτεΐνη (υψηλή απορρόφηση) αλλά δε γνωρίζετε αν το δείγμα σας είναι καθαρό ή περιέχει μίγμα πρωτεϊνών ούτε αν πρόκειται για την πρωτεΐνη που σας ενδιαφέρει. Όμως έτσι περιορίζετε κατά πολύ τον αριθμό των δειγμάτων που πρέπει να ελεγχθούν περαιτέρω. Αντί να πραγματοποιήσετε χρονοβόρους και ενδεχομένως ασύμφορους οικονομικά ελέγχους σε 200 δείγματα επικεντρώνετε την προσοχή σας σε 20-30 απ' αυτά. Εάν δεν υπάρχει διαθέσιμο φασματοφωτόμετρο UV τότε μπορεί να ελεγχθεί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε κλάσμα με χρήση χρωστικής και μέτρηση της απορρόφησης στο ορατό. Εάν όμως στη θέση του δείγματος έχουμε ένα μίγμα αμινοξέων τα πράγματα αλλάζουν. Τα αμινοξέα είναι άχρωμα και λίγα απ' αυτά μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά. Για την ανίχνευσή τους, χρησιμοποιούμε ένα διάλυμα νινυδρίνης το οποίο αντιδρά με το διάλυμα του αμινοξέος (Εικόνα 4). Το προϊόν της αντίδρασης έχει χρώμα μωβ για όλα τα αμινοξέα εκτός από την προλίνη.

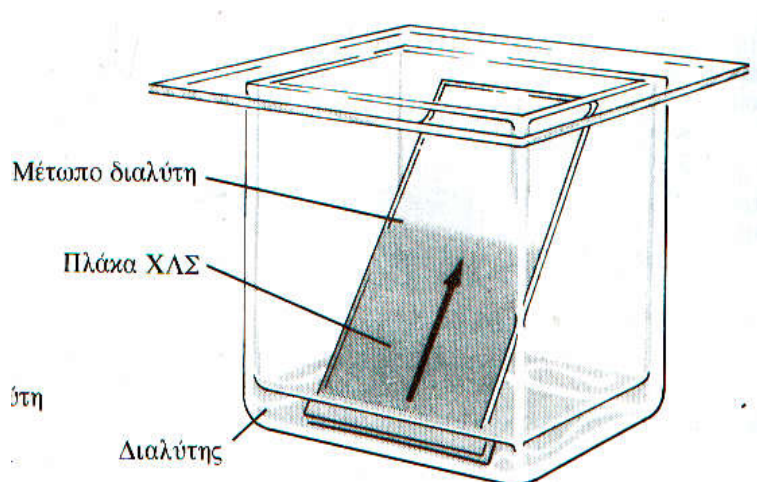


ΕΙΚΟΝΑ 4. Αντίδραση της νινδρίνης με αμινοξέα

III. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ (TLC)

Μια μέθοδος με την οποία γίνεται όχι μόνο ανίχνευση αλλά και ταυτοποίηση των αμινοξέων είναι η ανιούσα χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) (Εικόνα 5). Στη μέθοδο αυτή γίνεται χρήση μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Τα μόρια «επιλέγουν» κατά κάποιο τρόπο ποια από τις δύο θα ακολουθήσουν, ανάλογα με τη συγγένειά τους για τη μια ή την άλλη. Αυτό φυσικά έχει να κάνει με τη σύσταση και τις ιδιότητες της στατικής φάσης και με το είδος του ρυθμιστικού ή άλλου διαλύματος που αποτελεί την κινητή φάση. Κηλίδες από τα δείγματα των αγνώστων αμινοξέων τοποθετούνται πάνω στο χρωματογράμμα στο ίδιο ύψος με κηλίδες γνωστών αμινοξέων (μάρτυρες). Στη συνέχεια η άκρη του TLC (από την πλευρά των δειγμάτων) τοποθετείται σε ένα δοχείο με διαλύτη για να αναπτυχθεί και τα αμινοξέα κινούνται προς τα πάνω με διαφορετικές ταχύτητες που εξαρτώνται κυρίως από την πολικότητά τους. Πολύ συχνά η στατική φάση αποτελείται από Silica επικολλημένη πάνω σε γυάλινο τζάμι. Είναι ιδιαίτερα πολική, οπότε τα πολικά αμινοξέα έχουν την τάση να προσκολλώνται πάνω της, ενώ τα λιγότερο πολικά αμινοξέα παρασύρονται από την κινητή φάση η οποία είναι συνήθως λιγότερο πολική.

Η ποιότητα των αποτελεσμάτων εξαρτάται κυρίως από την τοποθέτηση των δειγμάτων στη ρητίνη. Οι κηλίδες πρέπει να είναι όσο το δυνατό πιο εντοπισμένες γιατί υπάρχει διάχυση κατά την ανάπτυξη του χρωματογράμματος. Επίσης η ποιότητα του υλικού της χρωματογραφικής πλάκας καθώς και ο τρόπος που τοποθετείται στο δοχείο με το διαλύτη παίζουν ρόλο στην επιτυχία ή όχι του πειράματος.



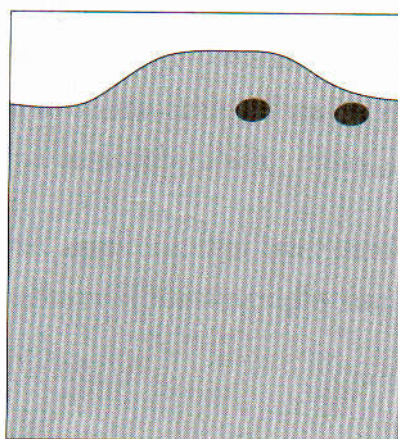
ΕΙΚΟΝΑ 5. Ανιούσα χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας.

Τιμές Rf

Έχετε αναρωτηθεί ποτέ γιατί μετράμε τους παράγοντες κατακράτησης, δηλαδή τα Rf, σε πολλά είδη χρωματογραφίας; Είτε θέλουμε να προσδιορίσουμε την τιμή Rf, όπως στο συγκεκριμένο πείραμα, είτε την τιμή Rm (σχετική κινητικότητα), όπως σε διάφορα είδη ηλεκτροφόρησης, αυτό που κάνουμε συνήθως είναι να διαιρέσουμε την απόσταση που διατρέχει κάθε ουσία από την αρχή ή γραμμή βάσης με το μέτωπο του διαλύτη. Υπάρχουν τουλάχιστον δύο λόγοι για να το κάνουμε αυτό.

1. Το μέτωπο του διαλύτη δεν είναι γραμμικό. Εάν για παράδειγμα το πλακίδιό σας φαίνεται όπως στην Εικόνα 6, είναι πιθανό οι δυο κηλίδες που έχουν διατρέξει την ίδια απόσταση να μην είναι η ίδια ουσία. Το μέτωπο του διαλύτη είναι διαφορετικό και ενώ οι δύο κηλίδες φαίνεται να ανήκουν στην ίδια ουσία, στην πραγματικότητα ο υπολογισμός του Rf για καθεμιά απ' αυτές θα μας δώσει διαφορετικό αριθμό.

2. Επαναληψιμότητα μεταξύ πειραμάτων. Όταν πραγματοποιήσετε το πείραμα αυτό στο εργαστήριο υπάρχει πιθανότητα να μετρήσετε τις ίδιες αποστάσεις όσον αφορά τις αποστάσεις που διέτρεξαν τα αμινοξέα και το μέτωπο του διαλύτη με τους υπόλοιπους συμφοιτητές σας. Αυτό περιμένετε αφού τα υλικά είναι ίδια για όλους όμως είναι εξίσου πιθανό για διάφορους λόγους οι τιμές σας να διαφέρουν. Παρόλα αυτά ο υπολογισμός των Rf πρέπει να δώσει τιμές πολύ κοντινές για όλες τις ομάδες.



ΕΙΚΟΝΑ 6. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με ανομοιόμορφο μέτωπο διαλύτη.

ΠΕΙΡΑΜΑ 2^ο: ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

I. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Στο πείραμα αυτό θα αναλύσετε ένα διάλυμα που περιέχει διάφορα αμινοξέα. Τα αμινοξέα θα διαχωριστούν με χρωματογραφία ανταλλαγής κατιόντων και θα ταυτοποιηθούν με TLC. Το πείραμα θα πραγματοποιηθεί σε δύο εργαστηριακές μέρες. Με δεδομένο ότι η ρητίνη θα σας δοθεί ενεργοποιημένη, το πρόγραμμα διαμορφώνεται ως εξής:

Ημέρα 1: Διαχωρισμός μίγματος αμινοξέων σε κολώνα DOWEX 50. Επιλογή κλασμάτων που δίνουν θετική αντίδραση νινυδρίνης.

Ημέρα 2: Ταυτοποίηση των αμινοξέων των κλασμάτων που έδωσαν θετική αντίδραση νινυδρίνης με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Τιτλοδότηση γλυκίνης.

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ-Ημέρα 1^η

A. Χρωματογραφία ανταλλαγής κατιόντων

Πλαστικές σύριγγες 25ml

Υαλοβάμβακας

Ρητίνη DOWEX 50X8 (200-400 mesh) σε 0,1 M κιτρικό Na, pH 3

Ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M κιτρικό Na, pH 3

Ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M κιτρικό Na, pH 6

Ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M ανθρακικό Na, pH 11

Άγνωστα διαλύματα αμινοξέων, 1% σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M κιτρικό Na, pH 3

Διάλυμα νινυδρίνης 0,3% σε n-βουτανόλη

Στυπόχαρτο 3x10 cm

Πιστολάκι μαλλιών

III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ-Ημέρα 1^η

a) Ετοιμασία της στήλης

1. Τοποθετήστε στο κάτω μέρος της πλαστικής σύριγγας ένα στρώμα υαλοβάμβακα και προσαρμόστε στο στόμιό της την ειδική στρόφιγγα. Προσθέστε το αιώρημα της ρητίνης (11 gr) μέσα στη σύριγγα.

2. Ανοίξτε την στρόφιγγα και με αργό ρυθμό αφήστε να περάσουν 5 όγκοι (τουλάχιστον 50 ml) ρυθμιστικού διαλύματος 0,1 M κιτρικού Na, pH 3, οπότε η στήλη είναι πλέον έτοιμη για τη χρωματογραφική ανάλυση των αμινοξέων.

β) Διαχωρισμός αμινοξέων

1. Ανοίξτε τη στρόφιγγα της κολώνας και απομακρύνετε το ρυθμιστικό διάλυμα μέχρι ο μηνίσκος του υγρού να ακουμπά σχεδόν στην επιφάνεια της ρητίνης.

Προσοχή!

Σε κανένα στάδιο της χρωματογραφίας δεν πρέπει να αφήσετε την κολώνα να στεγνώσει.

2. Προετοιμάστε περίπου 40 δοκιμαστικούς σωλήνες για τη συλλογή των κλασμάτων σημειώνοντας με μια γραμμή τη στάθμη του 1 ml.

3. Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα Pasteur προσθέστε 0,6 ml μίγμα αγνώστων αμινοξέων στην επιφάνεια της ρητίνης φροντίζοντας να τη διαταράξετε όσο το δυνατόν λιγότερο.

4. Ανοίξτε την στρόφιγγα και συλλέξτε το πρώτο κλάσμα.

5. Όταν ο μηνίσκος του υγρού έχει μόλις ακουμπήσει τη ρητίνη, κλείστε τη στρόφιγγα και προσθέστε 1 ml ρυθμιστικό κιτρικού pH 3. Συνεχίστε την έκλουση. Όταν συμπληρωθεί ο όγκος του 1 ml στον σωλήνα 1, προχωρήστε στο σωλήνα 2.

6. Μόλις το ρυθμιστικό φτάσει στην επιφάνεια της ρητίνης, προσθέστε προσεκτικά, 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος και συνεχίστε τη συλλογή κλασμάτων του 1 ml.

7. Για να διαπιστώσετε την παρουσία του αμινοξέος στο κλάσμα, τοποθετήστε μια σταγόνα δείγματος σε ένα κομμάτι στυπόχαρτο. Ψεκάστε το χαρτί με το διάλυμα νινυδρίνης (μέσα στην εστία και φορώντας γάντια) και στεγνώστε το με ένα πιστολάκι μαλλιών (στην χαμηλή ένταση). Κρατήστε τα χαρτάκια στα οποία η κηλίδες χρωματίζονται μωβ πιο έντονα (και φυσικά σημειώστε τα δείγματα στα οποία αντιστοιχούν).

8. Συνεχίστε τη συλλογή κλασμάτων στο ίδιο ρυθμιστικό μέχρι οι κηλίδες να μη δίνουν θετική αντίδραση (δηλαδή να παραμένουν άχρωμες). Εναλλακτικά, εάν έχετε συλλέξει 20 ml και δεν βλέπετε πουθενά μωβ χρώμα τότε δεν έχετε έκλουση αμινοξέος στο συγκεκριμένο pH.

9. Στραγγίξτε ή/και απομακρύνετε το ρυθμιστικό από την κολώνα και προσθέστε 1 ml κιτρικό pH 6. Επαναλάβετε τα στάδια 5-8 και με αυτό το ρυθμιστικό μέχρι να σταματήσει η έκλυση θετικών κλασμάτων.

10. Επαναλάβετε με ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικού Na pH 11.

11. **Ενεργοποίηση κολώνας:** Προσθέστε 15ml διάλυμα 0,1M NaOH και στη συνέχεια ξεπλύνετε με ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 0,1M κιτρικού Na ίση με το τριπλάσιο του όγκου της κολώνας.

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ-Ημέρα 2^η

B. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

Πλακίδια TLC, 7x10 cm

Διαλύτης προπανάλη/οξικό οξύ/νερό, 4/1/1 (Propanol/Acetic acid/Water, PAW)

Γυάλινο ποτήρι βρασμού 600 ml

Τριχοειδείς σωλήνες για την τοποθέτηση των κηλίδων στο πλακίδιο ή σύριγγες TLC

Πρότυπα διαλύματα αμινοξέων 1% w/v σε νερό.

Γ. Τιτλοδότηση γλυκίνης

Προχοΐδες 50ml

Διάλυμα γλυκίνης 0,4 M, 40ml

Διάλυμα NaOH 1 M

Πεχάμετρο

Μαγνητικός αναδευτήρας

III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ-Ημέρα 2^η

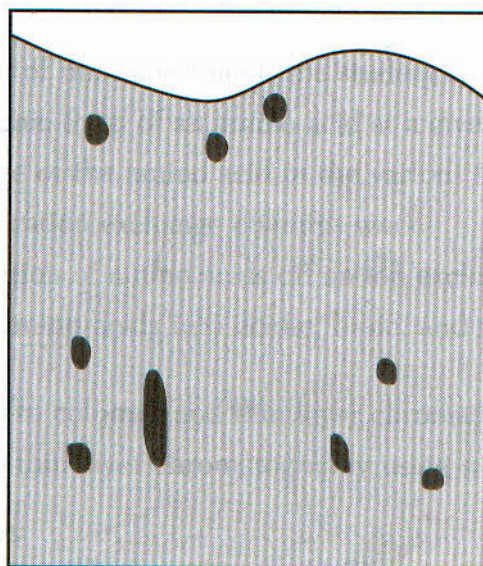
α) Διαχωρισμός και ταυτοποίηση αμινοξέων με χρήση TLC.

1. Φορέστε γάντια και παραλάβετε από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου ένα πλακίδιο TLC. ΜΗΝ ακουμπήσετε την επιφάνεια του πλακιδίου.

2. Φτιάξτε το περίγραμμα του πλακιδίου σε ένα χαρτί και τραβήξτε μια ευθεία γραμμή 1,5 cm από τη βάση του. Στη γραμμή αυτή σημειώστε τις θέσεις 6 κηλίδων (5 γνωστά αμινοξέα και το άγνωστο μίγμα). Όλα αυτά σχεδιάζονται στο χαρτί – Μη σημειώσετε τίποτα στο πλακίδιο.

3. Χρησιμοποιώντας τριχοειδείς σωλήνες, τοποθετήστε τις κηλίδες των αμινοξέων στο πλακίδιο, χρησιμοποιώντας ως οδηγό το σχεδιάγραμμα που έχετε φτιάξει στο χαρτί. Φροντίστε ώστε οι κηλίδες να είναι όσο το δυνατόν πιο μικρές (0,2 cm).

4. Αφού στεγνώσουν όλες οι κηλίδες, τοποθετήστε το πλακίδιο σε ένα ποτήρι ζέσεως στο οποίο έχετε ήδη βάλει 1 cm διαλύτη PAW στον πάτο. Να είστε πολύ προσεκτικοί όσον αφορά την τοποθέτηση του πλακιδίου. Σε καμιά περίπτωση ο διαλύτης δεν πρέπει να καλύπτει τη γραμμή των κηλίδων-δειγμάτων. Σκεπάστε το ποτήρι με αλουμινόχαρτο. Συνεχίστε με το β μέρος του πειράματος.
5. Όταν ο διαλύτης έχει καλύψει περίπου τα $\frac{3}{4}$ του πλακιδίου, σταματήστε τη διαδικασία και σημειώστε με ένα μολύβι το μέτωπο του διαλύτη.
6. Ψεκάστε το χρωματόγραμμα με το διάλυμα νινυδρίνης (με τις ίδιες προφυλάξεις όπως πριν) και στεγνώστε το προσεκτικά με το πιστολάκι μαλλιών. Πιθανόν να έχετε μια εικόνα όπως αυτή που ακολουθεί:



ΕΙΚΟΝΑ 7. Χρωματόγραμμα στο οποίο έχουν σημειωθεί το μέτωπο του διαλύτη και οι θέσεις των αμινοξέων.

β) Καμπύλη τιτλοδότησης γλυκίνης

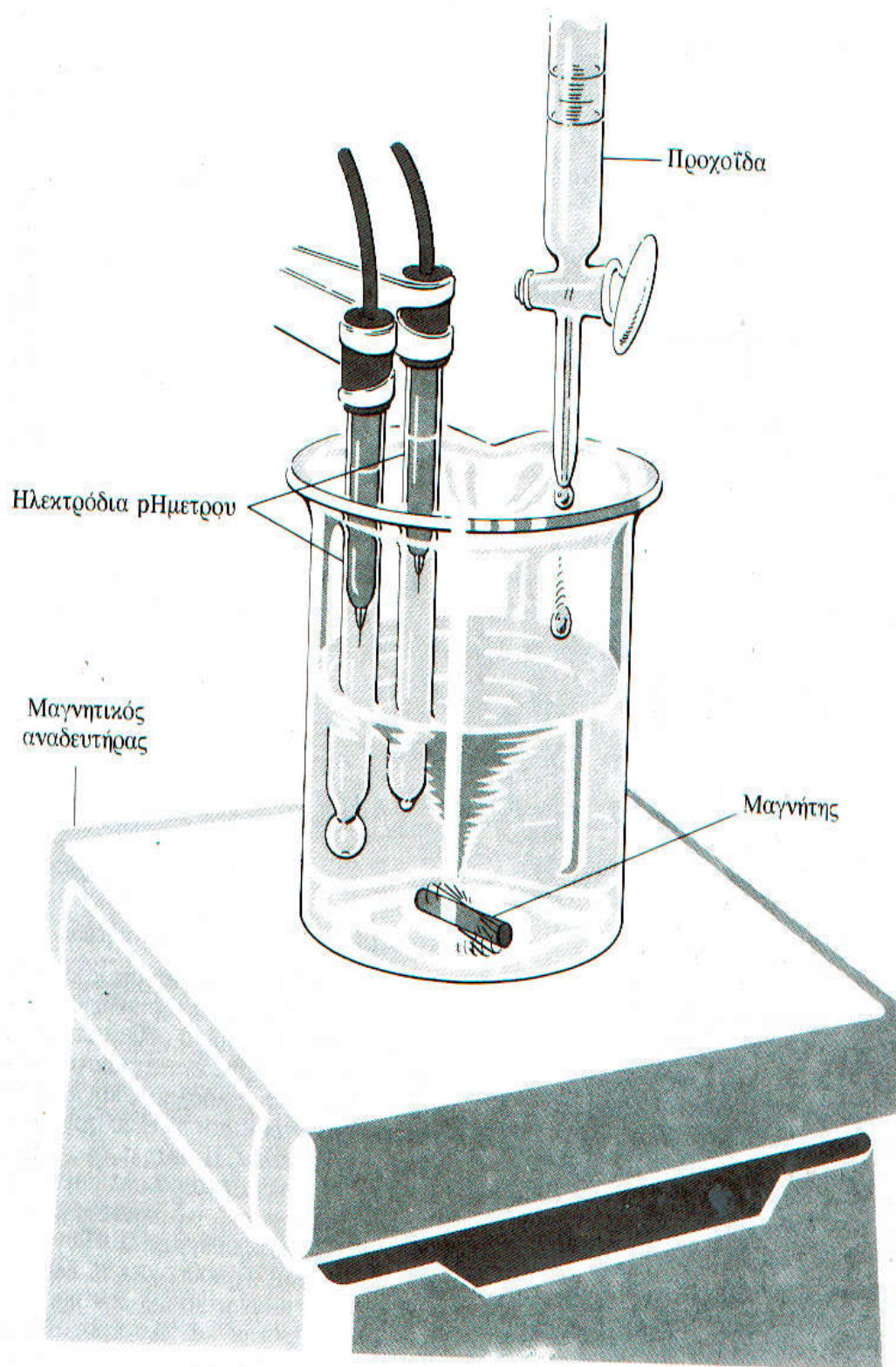
Όλα τα αμινοξέα είναι αμφολύτες, δηλαδή περιέχουν τουλάχιστον μια όξινη ομάδα (καρβοξύλιο) και μια βασική ομάδα (α-άμινο). Επομένως μπορούν να τιτλοδοτηθούν και με οξέα και με βάσεις (βλέπε εισαγωγή). Ορισμένα αμινοξέα περιέχουν και άλλες ομάδες που ιονίζονται εύκολα (άμινο-, καρβόξυλο-, p-υδροξυφαινυλο-, σουλφυδριλο-ιμιδάζολο-) και οι οποίες μπορούν επίσης να τιτλοδοτηθούν.

Η γλυκίνη είναι ένα α-αμινοξύ που ανήκει στην ομάδα των 20 πιο συνηθισμένων αμινοξέων (βλέπε πίνακα 2). Εάν παρασκευάσουμε ένα πολύ όξινο διάλυμα γλυκίνης (π.χ. pH 1,5) τότε και η αμινομάδα και η καρβοξυλομάδα του

μορίου θα είναι πρωτονιωμένες οπότε το μόριο θα έχει φορτίο +1. Εάν αυξήσουμε το pH (π.χ. με προσθήκη διαλύματος NaOH) θα έχουμε απομάκρυνση πρωτονίων, πρώτα από την καρβοξυλομάδα και στη συνέχεια από την αμινομάδα.

Επομένως, η τιτλοδότηση της γλυκίνης πραγματοποιείται σε δυο στάδια καθώς η περισσότερη όξινη καρβοξυλομάδα και η λιγότερη όξινη αμινομάδα χάνουν διαδοχικά τα πρωτόνια τους. Επιπλέον η κατάσταση του μορίου κοντά σε ουδέτερο pH παρουσιάζει ξεχωριστό ενδιαφέρον. Στην περιοχή αυτή, τα περισσότερα μόρια γλυκίνης βρίσκονται στη μορφή $\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COO}^-$, η οποία έχει φορτίο 0. Ένας αμφολύτης στην κατάσταση αυτή, με ίσο αριθμό θετικών και αρνητικών φορτίων, ονομάζεται zwitterion. Υπάρχει μόνο μια τιμή μέσα σε αυτή την περιοχή pH που ο μέσος όρος του φορτίου της γλυκίνης είναι 0. Σ' αυτή την τιμή pH, που όπως αναφέρθηκε προηγουμένως ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο (pI), τα περισσότερα μόρια της γλυκίνης είναι σε μορφή zwitterion μαζί με ένα μικρό αλλά ίσο μεταξύ τους αριθμό μορίων στις μορφές $\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COOH}$ και $\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$. Η διάταξη για την τιτλοδότηση της γλυκίνης φαίνεται στην Εικόνα 8.

1. Σε ένα ποτήρι ζέσεως των 100 ml, τοποθετήστε ένα μικρό μαγνητικό αναδευτήρα και μεταφέρετε 40 ml διάλυμα γλυκίνης 0,4 M.
2. Τοποθετήστε το ποτήρι πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα και στερεώστε το ηλεκτρόδιο του πεχαμέτρου σε τέτοια θέση ώστε το κατώτερο άκρο του να βρίσκεται λίγα χιλιοστά πάνω από το μαγνήτη. Με προσθήκη πυκνού HCl ρυθμίστε το pH στο 1,50.
3. Γεμίστε μια προχοΐδα με 1M NaOH και τοποθετήστε την σε τέτοια θέση, ώστε με το άνοιγμα της στρόφιγγας, η βάση να πέφτει σταγόνα σταγόνα μέσα στο διάλυμα της γλυκίνης που τιτλοδοτείται (Εικόνα 8).
4. Σημειώστε την τιμή του pH του διαλύματος πριν αρχίσει η τιτλοδότηση.
5. Ανοίξτε τη στρόφιγγα της προχοΐδας και κατά σταγόνες προσθέστε, υπό ανάδευση, 1 ml βάσης στο διάλυμά σας. Σημειώστε τη νέα τιμή pH, προσέχοντας ώστε την ώρα της μέτρησης το διάλυμα να βρίσκεται σε ηρεμία.
6. Συνεχίστε με αυτό τον τρόπο, ώσπου το pH να γίνει περίπου 12.



ΕΙΚΟΝΑ 8. Διάταξη για τιτλοδότηση γλυκίνης

IV. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Όν/μο:

A.M.

Θέση:

Ημ/νία:

Αριθμός αγνώστου μείγματος αμινοξέων:

Είδος χρωματογραφίας:

Υλικό χρωματογραφίας:

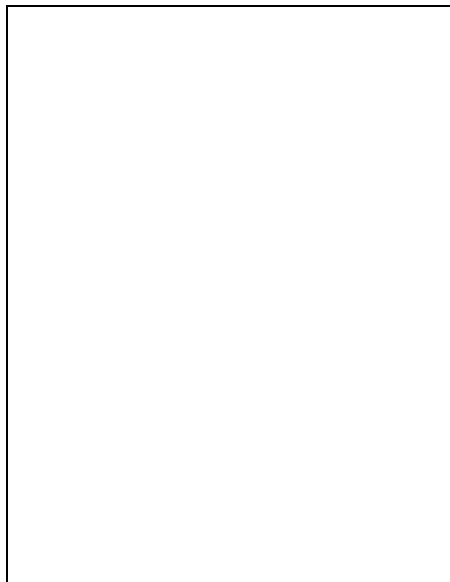
Ποια ρυθμιστικά διαλύματα χρησιμοποιήσατε στη συγκεκριμένη χρωματογραφία;

Για την παρασκευή των αγνώστων μειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αμινοξέα: ασπαρτικό οξύ, γλουταμικό οξύ, φαινυλαλανίνη, σερίνη, γλυκίνη, ιστιδίνη, λυσίνη. Θεωρητικά, σε ποιο pH θα περιμένατε να εκλουστούν τα αμινοξέα αυτά στις συνθήκες του πειράματός σας;

αμινοξύ	pH έκλυσης

Σε ποια από τα τρία ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήσατε, είχατε έκλυση αμινοξέων; Μόνο με δεδομένα από τη χρωματογραφία σας, μπορείτε να προσδιορίσετε ακριβώς ποια (τρία) αμινοξέα είχατε στο άγνωστο μείγμα;

Σχεδιάστε το πλακίδιό σας στο χαρτί και σημειώστε τις θέσεις των αμινοξέων έπειτα από την αντίδραση με τη νινυδρίνη. Υπολογίστε τα R_f για κάθε κηλίδα του χρωματογράμματός σας και σημειώστε και το χρώμα κάθε κηλίδας.



αμινοξύ	R_f
άγνωστο μείγμα	

Κατασκευάστε την καμπύλη τιτλοδοτήσης της γλυκίνης (pH vs mole προστιθέμενης βάσης /mole γλυκίνης) και σημειώστε τα pK_1 , pK_2 και pI της γλυκίνης και επισυνάψτε τη.

Σχεδιάστε τις τρεις πιθανές ιονικές μορφές της γλυκίνης και σημειώστε ποιες από αυτές υπερισχύουν σε pH 1, pH 6 και pH 11.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Braithwaite, A. And Smith, F. G. (1990) **Chromatografic Methods**, 4th ed., Chapman and Hall, London.

Touchstone, J. C. (1980), **Thin Layer Chromatography: Quantitative Environmental and Clinical Applications**. Wiley, New York.

ΠΕΙΡΑΜΑ 3: ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΔΥΟ ΔΙΑΣΤΑΣΕΙΣ - Στοιχεία θεωρίας

I. ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ

Η ισοηλεκτρική εστίαση (IsoElectric Focusing, IEF) είναι άλλη μια σημαντική εφαρμογή της ηλεκτροφόρησης για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών και εξετάζει την ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε συνάρτηση με το pH. Πρόκειται για μια εξαιρετικά ευαίσθητη αναλυτική μέθοδο, ιδιαίτερα χρήσιμη για τη μελέτη της μικροετερογένειας που τυχόν υπάρχει σε μια πρωτεΐνη.

Για παράδειγμα, μια πρωτεΐνη μπορεί να δίνει μια μπάντα σε πηκτή SDS αλλά τρεις μπάντες σε πηκτή IEF. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η πρωτεΐνη έχει μια, δυο ή τρεις φωσφορικές ομάδες στο μόριό της. Προφανώς δυο ή τρεις τέτοιες ομάδες δεν επηρεάζουν αξιοσημείωτα το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης αλλά μια έστω μικρή διαφορά στο φορτίο κάθε μορίου μπορεί να ανιχνευθεί με IEF. Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τον διαχωρισμό ισοενζύμων (διαφορετικές μορφές του ίδιου ενζύμου που διαφέρουν σε ένα ή δυο κατάλοιπα αμινοξέων).

Με δεδομένο ότι το επιφανειακό φορτίο μιας πρωτεΐνης εξαρτάται από το pH, μια πρωτεΐνη σε pH κάτω από το ισοηλεκτρικό της σημείο (pI, σημείο ηλεκτρικής ουδετερότητας) είναι φορτισμένη θετικά (-COOH και -NH₃⁺ μορφές στις όξινες και βασικές ομάδες των πλευρικών αμινοξικών αλυσίδων). Επομένως εάν βρίσκεται σε ένα μέσο με σταθερό pH, κινείται προς την αρνητικά φορτισμένη κάθοδο. Ανάλογα, σε pH πάνω από το ισοηλεκτρικό της σημείο, χάνει πρωτόνια οπότε φορτίζεται αρνητικά (-COO⁻ και -NH₂ μορφές στις όξινες και βασικές ομάδες των πλευρικών αμινοξικών αλυσίδων) και κινείται προς την άνοδο. Εάν το pH του μέσου ηλεκτροφόρησης ταυτίζεται με το pH του ισοηλεκτρικού σημείου της πρωτεΐνης, αυτή είναι ηλεκτρικά ουδέτερη οπότε μένει ακίνητη.

Θεωρητικά λοιπόν, είναι δυνατόν να διαχωριστεί ένα μίγμα πρωτεϊνών και να βρεθεί το pI μιας από αυτές εξετάζοντας την ηλεκτροφορητική κινητικότητά τους σε μια σειρά ξεχωριστών πειραμάτων στα οποία το pH του μέσου θα είναι διαφορετικό κάθε φορά. Το pH στο οποίο η πρωτεΐνη δεν θα μετακινείται καθόλου θα ταυτίζεται με το pI της. Όπως αντιλαμβάνεστε, μια τέτοια διαδικασία προσδιορισμού του pI είναι δαπανηρή και χρονοβόρα. Εναλλακτικά, με τη μέθοδο της ισοηλεκτρικής εστίασης μπορούμε να προσδιορίσουμε το pI κάνοντας μια ηλεκτροφόρηση σε ένα μέσο όπου υπάρχει σταδιακή μεταβολή (βαθμίδωση) του pH η οποία διαμορφώνεται

κατά μήκος μιας λεπτής (0,7mm) επίπεδης ή κυλινδρικού σχήματος (σκουλίκι) λωρίδας πηκτής.

Για την παρασκευή του μέσου ηλεκτροφόρησης και της βαθμίδωσης του pH χρησιμοποιείται συνήθως πηκτή ακρυλαμιδίου αν και η χρήση αγαρόζης δεν είναι ασυνήθιστη. Εφόσον οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται αποκλειστικά και μόνο βάσει του φορτίου τους η IEF πραγματοποιείται σε πηκτες χαμηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο (4%) ενώ για τη μελέτη πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους χρησιμοποιούνται πηκτές αγαρόζης για την αποφυγή φαινομένων μοριακού κοσκινίσματος.

Η ισοηλεκτρική εστίαση είναι εξαιρετικά ευαίσθητη όσον αφορά τις διακυμάνσεις φορτίου οπότε για να υπάρχει επαναληψιμότητα στα πειράματα απαιτείται προσοχή στον χειρισμό των πρωτεϊνών ώστε να αποφεύγονται τυχόν τροποποιήσεις της χημικής σύστασης ή της δομής τους κατά την παρασκευή του δείγματος. Επίσης, αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών με λιπίδια ή άλλες πρωτεΐνες ενδέχεται να προκαλέσουν αλλαγές στο φορτίο και κατά συνέπεια απρόβλεπτες ισοηλεκτρικές κινητικότητες ή παραμορφώσεις στις μπάντες. Για τον λόγο αυτό, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε αποδιατακτική πηκτή ουρίας ενώ επιπλέον βελτίωση του διαχωρισμού επιτυγχάνεται με χρήση μη ιονικών (γιατί;) απορρυπαντικών.

Η διαβάθμιση του pH επιτυγχάνεται στην πηκτή με ηλεκτροφόρηση συνθετικών πολυηλεκτρολυτών που ονομάζονται αμφολύτες. Πρόκειται για πολυμερή χαμηλού μοριακού βάρους (MB=5000) που περιέχουν τυχαίες κατανομές ασθενών οξέων και βάσεων (καρβοξύλια, ιμιδαζόλια, αμίνες, κ.λ.π.) με αποτέλεσμα το καθένα από αυτά να έχει διαφορετικό pKa. Αυτό το σύστημα προστίθεται στο μέσο της ηλεκτροφόρησης και συνδέεται με τα ηλεκτρόδια αραιού οξέος και βάσης (αραιό διάλυμα H_3PO_4 στο δοχείο της ανόδου και αραιό διάλυμα NaOH στο δοχείο της καθόδου). Στη συνέχεια εφαρμόζεται ένα δυναμικό που προκαλεί τη ροή ρεύματος. Απουσία ρυθμιστικών διαλυμάτων και προστιθέμενων αλάτων, οι αμφολύτες είναι η κύρια πηγή ιόντων στο σύστημα οπότε μετατοπίζονται σύμφωνα με την κατανομή των φορτίων τους. Δηλαδή αυτοί με χαμηλότερα ισοηλεκτρικά σημεία (δηλαδή περισσότερα καρβοξύλια), μετατοπίζονται προς το όξινο ηλεκτρόδιο ενώ αυτοί με τα υψηλότερα ισοηλεκτρικά σημεία (πιο πολλές αμίνες), πηγαίνουν προς το αλκαλικό ηλεκτρόδιο. Αυτό δημιουργεί μια βαθμίδωση pH μορίων αμφολύτη

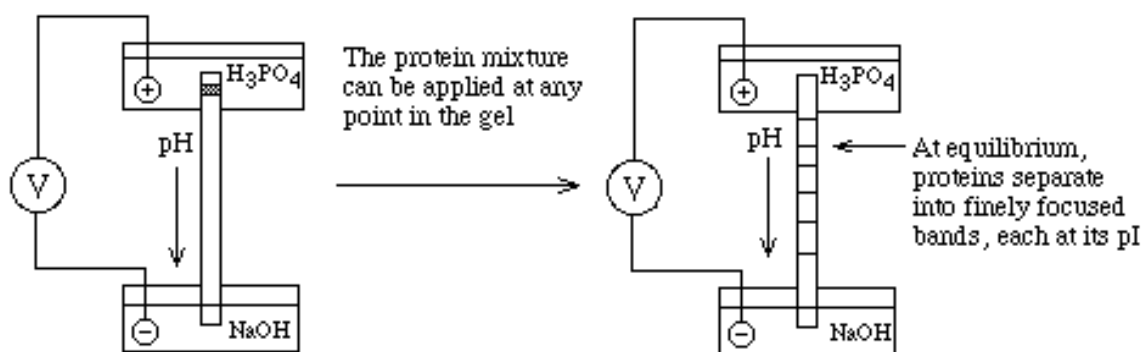
που έχουν μετατοπιστεί σε περιοχές pH ίσες με τα pKa τους, ρυθμίζοντας παράλληλα το διάλυμα της πηκτής (Εικόνα 1).

Για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με IEF απαιτούνται μικρές ποσότητες δειγμάτων (10 έως 50 µg).

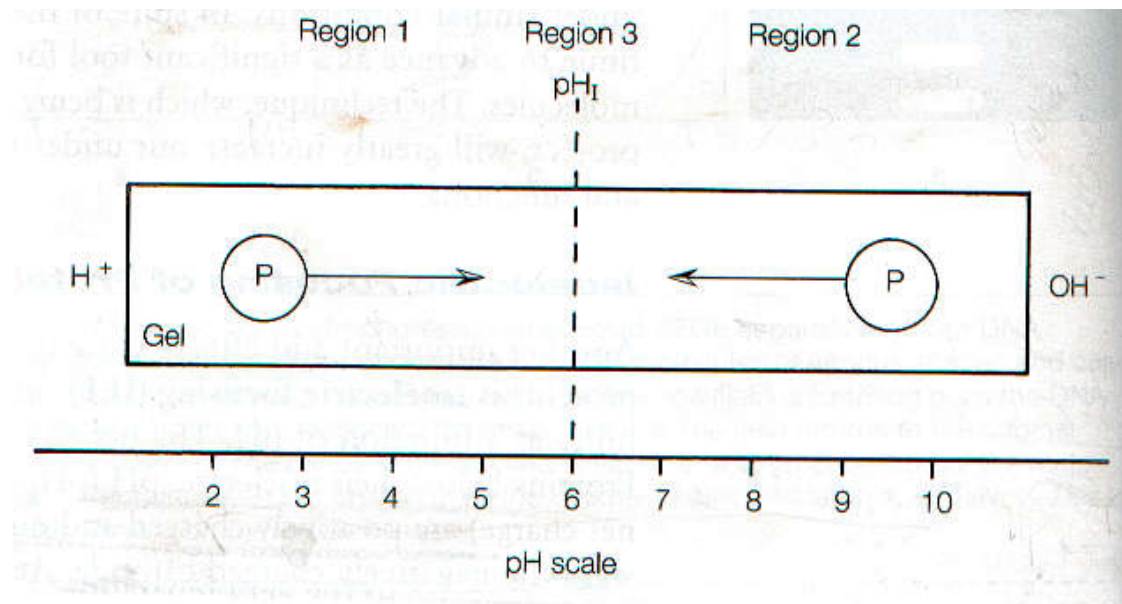
Το πρωτεϊνικό δείγμα φορτώνεται στην πηκτή με δύο τρόπους:

- i. Ένα αφαιλατωμένο και σχετικά πυκνό πρωτεϊνικό δείγμα τοποθετείται στην κορυφή της πηκτής όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενα πειράματα.
- ii. Η πρωτεΐνη προστίθεται απ' ευθείας στο διάλυμα της πηκτής με αποτέλεσμα να υπάρχει ομοιόμορφη κατανομή του δείγματος στο μέσο.

Σε κάθε περίπτωση, οι πρωτεΐνες λόγω του μεγέθους τους μετακινούνται πιο αργά από τα μόρια των αμφολυτών οπότε η διαβάθμιση του pH ολοκληρώνεται έγκαιρα σε κάθε περίπτωση (Εικόνες 1 και 2).



ΕΙΚΟΝΑ 1. IEF βαθμίδωση pH
(η διάταξη που θα χρησιμοποιήσετε έχει αντίθετα τις πολικότητες)



ΕΙΚΟΝΑ 2. IEF βαθμίδωση pH

Στην Εικόνα 2 φαίνεται σχηματικά η μορφή και η λειτουργία μιας IEF βαθμίδωσης pH όπως αυτή διαμορφώνεται στο εσωτερικό της πηκτής. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, μικρή συγκέντρωση οξέος, τοποθετείται στην άνοδο ενώ μικρή συγκέντρωση βάσης, τοποθετείται στην κάθοδο. Μεταξύ των ηλεκτροδίων τοποθετείται η πηκτή στην οποία το pH βαθμιαία μεταβάλλεται από 2 έως 10. Η βαθμίδωση του pH είτε διαμορφώνεται πριν την ηλεκτροφόρηση, είτε κατά τη διάρκεια αυτής (όπως στο συγκεκριμένο πείραμα). Επίσης η βαθμίδωση μπορεί να είναι ευρεία (pH 2-10) για το διαχωρισμό μίγματος πρωτεϊνών με διάφορες τιμές pI ή πιο περιορισμένη (π.χ. pH 7-8) για τον καθορισμό του pI μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Το P στην Εικόνα 1 συμβολίζει διαφορετικά μόρια μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης που βρίσκονται σε διάφορες περιοχές της πηκτής.

Αν υποθέσουμε ότι το pH στην περιοχή 1 είναι χαμηλότερο από το pI της πρωτεΐνης ενώ το pH στην περιοχή 2 μεγαλύτερο, τότε τα μόρια P στην περιοχή 1 θα είναι θετικά φορτισμένα και με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου θα κινηθούν προς την κάθοδο. Καθώς η P μετακινείται, θα έρθει σε επαφή με ένα διαρκώς αυξανόμενο pH που θα επηρεάσει το φορτίο των μορίων της. Συγκεκριμένα, τα μόρια της P βαθμιαία θα αποπρωτονιούνται μέχρι η πρωτεΐνη να μην έχει καθόλου φορτίο. Όταν συμβεί αυτό η πρωτεΐνη θα μείνει ακίνητη και το pH στην περιοχή αυτή του μέσου (περιοχή 3) θα ταυτίζεται με το ισοηλεκτρικό της σημείο. Παρόμοια είναι και η συμπεριφορά των μορίων P στην περιοχή 2 μόνο που επειδή είναι φορτισμένα

αρνητικά θα μετακινηθούν προς την άνοδο. Καθώς μετακινούνται σε βαθμιαία ελαττούμενο pH το φορτίο τους σταδιακά θα ελαττώνεται για να μηδενιστεί φτάνοντας στην περιοχή 3 όπου τα μόρια ακινητοποιούνται. Είναι φανερό λοιπόν ότι παρόλο που τα μόρια P βρίσκονται σε διαφορετικά σημεία του μέσου, μετακινούνται προς την περιοχή pH που αντιστοιχεί στο ισοηλεκτρικό τους σημείο και τελικά ακινητοποιούνται δηλαδή εστιάζονται σε ένα πολύ εντοπισμένο σημείο του μέσου.

Έχει διαπιστωθεί ότι η ποιότητα της εστίασης βελτιώνεται πολύ όταν εφαρμόζεται υψηλή τάσης στην πηκτή (200V) για σχετικά μεγάλο χρόνο (3 ώρες). Αυτό είναι εφικτό μόνο εάν εφαρμόζεται ψύξη στην πηκτή. Με άλλα λόγια είναι απαραίτητο να υπάρχει αποτελεσματική μεταφορά θερμότητας μεταξύ της πηκτής και του υγρού που την περιβάλλει. Στο συγκεκριμένο πείραμα επιλέξαμε τη χρήση **πηκτής σε λωρίδες (slab gels)** αντί τα «σκουλήκια» (tube gels) που χρησιμοποιούνται συνήθως, για να επωφεληθούμε από το μεγάλο βαθμό μεταφοράς θερμότητας της **πρώτης**. Επιπλέον, η ηλεκτροφόρηση θα πραγματοποιηθεί σε ψυκτικό θάλαμο (8° C).

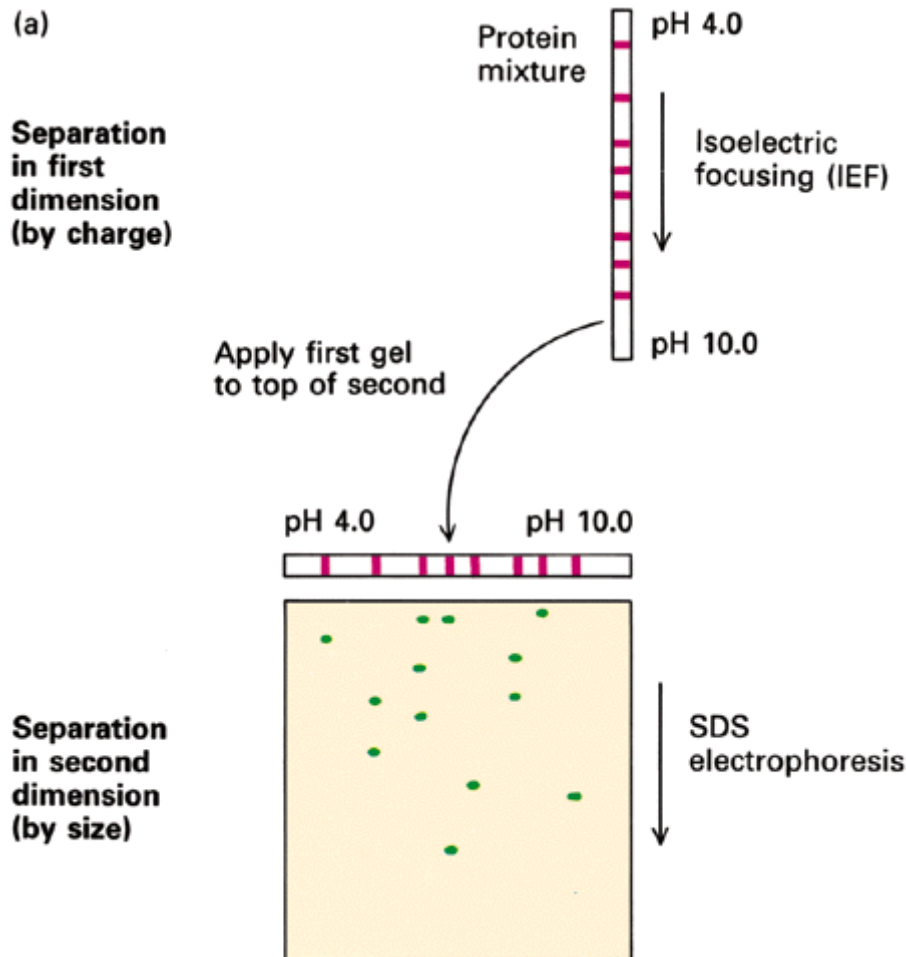
Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, η πηκτή πρέπει να βαφτεί ώστε να είναι ορατές οι θέσεις των πρωτεϊνών. Εάν αυτό γίνει άμεσα, θα βαφτούν και οι αμφολύτες οπότε όλη η πηκτή θα είναι μπλε. Για να μη συμβεί αυτό, η πηκτή πλένεται αρχικά με διάλυμα 10% τριχλωροοξικού οξέος (TCA) και στη συνέχεια με διάλυμα 1% TCA ώστε να απομακρυνθούν τα μόρια των αμφολυτών.

Το pI μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης μπορεί να διαπιστωθεί από τη θέση της στην πηκτή αν μετρηθεί παράλληλα το pH στη συγκεκριμένη θέση. Εναλλακτικά εάν υπάρχει δυνατότητα αγοράς μείγματος πρωτεϊνών με γνωστά pI (marker), τότε τοποθετείται στην πηκτή παράλληλα με το δείγμα. Μετά το βάψιμο της πηκτής, μετράται η απόσταση κάθε πρωτεϊνικής μπάνας του marker από το ένα ηλεκτρόδιο και κατασκευάζεται το διάγραμμα: απόσταση πρωτεΐνης Vs. pI. Με χρήση αυτού ως καμπύλη αναφοράς καθορίζεται το άγνωστο pI μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης από την θέση της στην πηκτή.

II. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΔΥΟ ΔΙΑΣΤΑΣΕΙΣ (2-D)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με IEF (1^η διάσταση) στηρίζεται στη διαφορά φορτίου τους, ενώ η SDS-PAGE (2^η διάσταση) διαχωρίζει τα μόρια με βάση το μέγεθος τους. Μετά την ολοκλήρωση της IEF, η λωρίδα της πηκτής επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο μεταξύ άλλων περιέχει SDS (το οποίο προσδένεται στις

μετουσιωμένες πρωτεΐνες) και στη συνέχεια τοποθετείται πάνω από μια πηκτή ακρυλαμιδίου. Πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση οπότε οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στην IEF λωρίδα απομακρύνονται από αυτή, εισέρχονται στην πηκτή SDS και διαχωρίζονται εκ νέου βάσει του μοριακού τους βάρους αυτή τη φορά (Εικόνα 3):

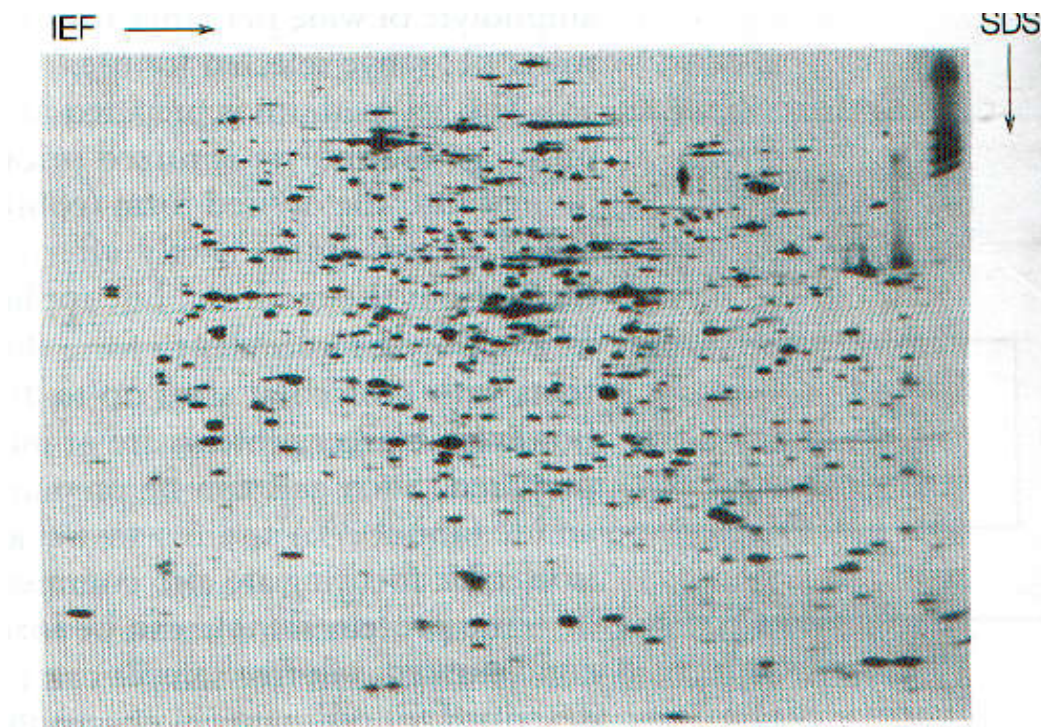


Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της ηλεκτροφόρησης σε δύο διαστάσεις

Όπως θα πρέπει να έχετε ήδη καταλάβει, η ηλεκτροφόρηση στη δεύτερη διάσταση είναι απλά μια ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS – πολυακρυλαμιδίου. Ο συνδυασμός των δύο αυτών μεθόδων έχει εντυπωσιακά αποτελέσματα στον διαχωρισμό πολύπλοκων πρωτεϊνικών δειγμάτων.

Ένα τέτοιο πείραμα δημοσιεύτηκε πρώτη φορά το 1975 και από τότε έχει γίνει ρουτίνα σε πολλά βιοχημικά εργαστήρια. Στην Εικόνα 4 φαίνονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης του συνόλου των πρωτεϊνών της *E. Coli* από τον O' Farrell. Το δείγμα διαχωρίστηκε πρώτα σε μια διάσταση με IEF. Στη συνέχεια, το δείγμα (μαζί με την πηκτή) τοποθετήθηκε σε ένα κομμάτι SDS-PAGE και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση

στη δεύτερη διάσταση. Τουλάχιστον 1000 διαφορετικές πρωτεϊνικές μπάντες εμφανίστηκαν μετά τη χρώση.



ΕΙΚΟΝΑ 4. SDS-PAGE/ IEF πηκτή του συνόλου των πρωτεϊνών της E. Coli.
(φωτ. Dr. P. O' Farrell)

Πείραμα 3^ο : ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΔΥΟ ΔΙΑΣΤΑΣΕΙΣ

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Η τεχνική αυτή είναι ένα πολύτιμο εργαλείο στην αναπτυξιακή βιοχημεία, όπου αύξηση ή ελάττωση στην ένταση της μπάντας μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης δίνει πληροφορίες για τον μηχανισμό της κυτταρικής ανάπτυξης. Επιπλέον, όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, η ηλεκτροφόρηση σε δύο διαστάσεις χρησιμοποιείται για την ανάλυση σύνθετων πρωτεϊνικών μιγμάτων και είναι μια αξιόπιστη μέθοδος για να διαπιστωθεί αν μια πρωτεΐνη είναι καθαρή ή όχι. Στο συγκεκριμένο πείραμα, θα γίνει IEF μείγματος πρωτεϊνών α-λακταλβουμίνης και οβαλβουμίνης και περαιτέρω διαχωρισμός τους με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση. Το πείραμα θα πραγματοποιηθεί σε δύο εργαστηριακές ημέρες και το πρόγραμμα διαμορφώνεται ως εξής:

Ημέρα 1^η :

- IEF του πρωτεϊνικού μίγματος. Τοποθέτηση της πηκτής στο ψυγείο όταν ολοκληρωθεί η εστίαση.

I. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

A. Ισοηλεκτρική εστίαση

Mini σύστημα ηλεκτροφόρησης

Τροφοδοτικό (200V, 500mA)

Σύριγγες Hamilton 50μl

Δοχεία για βάνιμο και αποχρωματισμό

Διάλυμα A: 30% (w/v) ακρυλαμίδιο, 1% (w/v) bis-ακρυλαμίδιο

Διάλυμα 1 M φωσφορικό οξύ

Διάλυμα 1 M NaOH

Διάλυμα αμφολυτών pH 3,5-10

Διάλυμα αμφολυτών pH 4-6

Ουρία

Διάλυμα 10% υπερθειικό αμμώνιο (APS)

TEMED

Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων (sample buffer) 2X, για διαβάθμιση pH 4-6:

(Για την παρασκευή 5 ml:

2,4 gr ουρία (8M)

20 ml διάλυμα αμφολυτών, pH 3,5-10

100 ml διάλυμα αμφολυτών, pH 4-6

500 ml 20% Triton X-100 (2%)

50 ml 2-μερκαπτοαιθανόλη (1%)

1,7 ml απιονισμένο νερό

200 ml 1% μπλε της βρωμοφαινόλης

Μπορεί να φυλαχθεί σε κλάσματα 500 ml στους -20 °C).

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A.Ισοηλεκτρική εστίαση

Διάλυμα πηκτής IEF:

5,4 ml νερό

2 ml διάλυμα A

48 ml διάλυμα αμφολυτών, pH 3,5-10

240 ml διάλυμα αμφολυτών, pH 4-6

6 gr ουρία

50 ml 10% APS

30 ml TEMED

1. Καθαρίστε και συναρμολογήστε τα τζαμάκια της συσκευής ηλεκτροφόρησης.
2. Σε μια γυάλινη κωνική φιάλη 100 ml τοποθετήστε μια μαγνητική ράβδο και προσθέστε το νερό, το διάλυμα A και την ουρία. Αναδεύστε μέχρι η ουρία να διαλυθεί. Προσθέστε τους αμφολύτες και αναδεύστε ήπια. Στην συνέχεια προσθέστε APS και TEMED, αναδεύστε και όσο μπορείτε πιο γρήγορα, τοποθετήστε το διάλυμα στα τζαμάκια χρησιμοποιώντας μια πιπέτα Pasteur.
3. Τοποθετήστε το κτένι δειγμάτων (5 θέσεις), ανάμεσα στα τζάμια με προσοχή ώστε να μην παγιδευτούν φυσαλίδες αέρα κάτω από τις θέσεις.
4. Περιμένετε μέχρι να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός (περίπου μία ώρα).
5. Αφαιρέστε το κτένι. Μεταφέρετε τη συσκευή και το τροφοδοτικό στον ψυκτικό θάλαμο (cold room, 8-10° C). Για να εξασφαλίσετε ότι δεν θα

υπάρχει διαρροή υγρού από την άνοδο, βάλτε ένα στρώμα λίπους (ή βαζελίνης) στο τζαμάκι που εφάπτεται με τη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Προετοιμασία δειγμάτων:

1. Αναμείξτε το πρωτεϊνικό δείγμα με ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος δειγμάτων 2X. Ενδεικτικά, για το συγκεκριμένο πείραμα οι αναλογίες διαμορφώνονται ως εξής:

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	α- λακταλβουμίνη (2 mg/ml)	Οβαλβουμίνη (2 mg/ml)	Ρυθμιστικό δειγμάτων 2X	Ποσότητα /πηγαδάκι
Δείγμα για χρώση	10 μl	10 μl	20 μl	20 μl
Δείγμα για έλεγχο IEF	10 μl	10 μl	20 μl	20 μl
Δείγμα για ηλεκτροφόρηση	10 μl	10 μl	20 μl	40 μl

Ηλεκτροφόρηση

1. Προσθέστε 20 mM NaOH (το οποίο έχετε παρασκευάσει φρέσκο με αραιώση από το 1 M), στο πάνω μέρος της συσκευής.
2. Προσθέστε 10 mM φωσφορικό οξύ (το οποίο έχετε παρασκευάσει φρέσκο με αραιώση από το 1 M), στο κάτω μέρος της συσκευής.
3. Τοποθετήστε την ανάλογη ποσότητα πρωτεϊνικού δείγματος σε κάθε πηγαδάκι.
4. Προσαρμόστε το κάλυμμα με τα ηλεκτρόδια στη συσκευή.
5. Εφαρμόστε 150 V για 30 λεπτά.
6. Στη συνέχεια αυξήστε την τάση στα 200 V για 2,5 ώρες. Η ένταση θα είναι αρχικά 9-10 mA και θα ελαττώνεται βαθμιαία κατά τη διάρκεια της εστίασης.

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία, ΚΛΕΙΣΤΕ το τροφοδοτικό και αφαιρέστε τα τζάμια με την πηκτή από τη συσκευή. Τυλίξτε το σύστημα με ένα βρεγμένο χαρτί και στη συνέχεια, κλείστε το σε μια νάιλον σακούλα. Τοποθετήστε το στο ψυγείο σε οριζόντια θέση μέχρι την επόμενη εργαστηριακή μέρα.

Ημέρα 2:

- Αποτελέσματα IEF: Έλεγχος της διαβάθμισης του pH (1 λωρίδα).
- Σταθεροποίηση και βάψιμο της πηκτής (1 λωρίδα).
- Προετοιμασία για τη δεύτερη διάσταση: Εξισορρόπηση της πηκτής σε διάλυμα SDS (1 λωρίδα). Πλύσιμο της πηκτής. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

I. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

10% τριγλωροοξικό οξύ (TCA)

1% τριγλωροοξικό οξύ

10 mM KCl

Διαλύματα για βάψιμο και αποχρωματισμό της πηκτής (όπως στο πείραμα 1)

B. SDS-PAGE ηλεκτοφόρηση (2^η διάσταση)

Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης (100 ml):

5 ml 2-μερκαπτοαιθανόλη (5%)

6,25 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8) (62,5 mM)

11,5 ml 20% SDS (2,3%)

10 ml γλυκερόλη (10%)

Απιονισμένο νερό μέχρι τα 100ml

Διαλύματα για την πηκτή ακρυλαμιδίου και την ηλεκτροφόρηση ίδια με αυτά στο πείραμα των εργαστηρίων βιοχημείας).

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Κάθε ομάδα διαθέτει 5 λωρίδες και θα χρειαστείτε τουλάχιστον 3. Να είστε προσεκτικοί στο χειρισμό τους.

- Χωρίστε την πηκτή σε κάθετες λωρίδες με πλάτος 1 cm, φροντίζοντας σε κάθε λωρίδα να αντιστοιχούν τα δείγματα από ένα πηγαδάκι
- Μία λωρίδα θα χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της διαβάθμισης του pH.
- Μία λωρίδα θα τοποθετηθεί στο διάλυμα βαφής Coomassie Brilliant Blue.
(Η πρώτη θα σας δώσει πληροφορίες για τις διάφορες τιμές του pH κατά μήκος της μεμβράνης ενώ η δεύτερη θα σας δείξει τη θέση των πρωτεϊνών).
- Μια επιπλέον λωρίδα θα χρησιμοποιηθεί για την SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση.

Έλεγχος της διαβάθμισης pH

1. Τοποθετήστε από 1 ml διαλύματος 10 mM KCl σε 5 αριθμημένα σωληνάκια eppendorf.
2. Κόψτε την λωρίδα της πηκτής σε 5 ίσα τμήματα και τοποθετήστε τα με τη σειρά μέσα στα σωληνάκια.
3. Επώαστε τα δείγματα, υπό ανάδευση, για μία ώρα περίπου.
4. Διαβάστε και σημειώστε το pH του διαλύματος χρησιμοποιώντας πεχαμετρικό χαρτί.

Σταθεροποίηση και βάνιμο της πηκτής

1. Τοποθετήστε τη λωρίδα της πηκτής σε διάλυμα 10% TCA. Αναδεύστε για 10 λεπτά.
2. Αντικαταστήστε το διάλυμα με 1% TCA και επαναλάβετε τη διαδικασία για 2 ώρες τουλάχιστον. Έτσι απομακρύνονται οι αμφολύτες από την πηκτή.
3. Τοποθετήστε την πηκτή σε διάλυμα χρωστικής αναδεύοντας ήπια για 15 λεπτά.
4. Αντικαταστήστε τη χρωστική με διάλυμα αποχρωματισμού και συνεχίστε την ανάδευση μέχρι οι μπάντες των πρωτεϊνών να διακρίνονται καθαρά στην πηκτή.

SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση (2^η διάσταση)

1. Τοποθετήστε την λωρίδα της πηκτής (με τη μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος) σε ένα κλειστό δοχείο με το ρυθμιστικό εξισορρόπησης και αναδεύστε ήπια για 40 λεπτά.
2. Στη συνέχεια τοποθετήστε την πηκτή σε ΚΑΘΑΡΟ δοχείο με αποιονισμένο νερό. Κάνετε διαδοχικά ξεπλύματα ώστε να απομακρύνεται (όσο γίνεται) το μη ειδικά προσδεδεμένο απορρυπαντικό.
3. Καθαρίστε τα τζαμάκια της συσκευής και «κολλήστε» την πηκτή στο πάνω μέρος, στο τζάμι με την εγκοπή. Αφαιρέστε όσο μπορείτε, με στυπόχαρτο, την υγρασία γύρω από την πηκτη.
4. Συνεχίστε κανονικά τη συναρμολόγηση της συσκευής. Η πηκτή (συνήθως) δε μετακινείται από τη θέση της.

5. Το διάλυμα της πηκτής, καθώς και όλα τα διαλύματα που θα χρησιμοποιήσετε από δω και πέρα ταυτίζονται με αυτά που είχατε στο πείραμα 1 (**φροντίστε να έχετε το πρωτόκολλο μαζί σας**).
6. Προσθέστε το διάλυμα διαχωρισμού από την άκρη της συσκευής ώστε να μην ακουμπήσετε τη λωρίδα που έχετε τοποθετήσει ανάμεσα στα τζαμάκια, μέχρι 2 mm κάτω από τη βάση της λωρίδας. ΜΗΝ προσθέσετε αιθανόλη.
7. Όταν ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, αφαιρέστε προσεκτικά το νερό και προσθέστε ξανά διάλυμα διαχωρισμού μέχρι το χείλος της συσκευής. **ΠΡΟΣΟΧΗ:** Εάν κατά την προσθήκη του διαλύματος παγιδευτούν φυσαλίδες κάτω από τη λωρίδα της πηκτής, αφαιρέστε τις προσεκτικά.
8. Αρχίστε τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης και προχωρήστε όπως στο πείραμα 1. Εάν δεν έχετε δείγμα-μάρτυρα (marker) για να παρακολουθείτε την πορεία των πρωτεϊνών, διακόψτε την παροχή ρεύματος μετά από 60 λεπτά.
9. Τοποθετήστε την πηκτή σε διάλυμα βαφής και στη συνέχεια σε διάλυμα αποχρωματισμού.

III. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Όν/μο:

Α.Μ.:

Θέση:

Ημ/νία:

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Θέσεις στην πηκτή	Όγκος δείγματος ανά θέση

- Σχεδιάστε τη λωρίδα της πηκτής IEF που βάψατε και δίπλα ακριβώς συναρμολογήστε αυτήν στην οποία μετρήσατε τα ρΗ. Σημειώστε σε ποιο ρΗ βρίσκονται οι πρωτεΐνες και δώστε μια απάντηση για τις τιμές ρI τους όπως προκύπτουν από τα αποτελέσματά σας.

- Σχεδιάστε την πηκτή που πήρατε από την ηλεκτροφόρηση στη δεύτερη διάσταση. Σημειώστε τις θέσεις των πρωτεϊνών που προέρχονται από την πηκτή IEF και αυτές από τις πρωτεΐνες του δείγματος-μάρτυρα (αν υπάρχει). Τι παρατηρείτε;

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Bioseparations: Principles and Techniques by B. Sivasankar

Der Lan, B. And A. Chrambach, 1981, pp. 157-188, **Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach**, Hames, and D. Rickwood, eds, 290 pages, IRL Press, Oxford and Washington, D.C.

Giulian, G. G., R. L. Moss and M. Greaser, 1984, **Anal. Biochem.**, 421-436, "Analytical Isoelectric Focusing Using a High Voltage Vertical Slab Polyacrylamide Gel System".

O' Farrell, P. H., 1975, **J. Biol. Chem.** **250**: 4007-40021, High Resolution Two-Dimensional Gel Electrophoresis.

Pollard, J. W., 1984, pp. 81-96, Two dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins, pp. 81-96 **in Methods in Molecular Biology**, Vol. 1, Proteins, J. M. Walker, ed. 365 pages, Humana Press, Clifton, New Jersey.

Robertson, E. F., H. K. Dannelly, P. J. Malloy and H. C. Reeves, **Anal. Biochem.**, **167**, pp. 290-294, "Rapid Isoelectric Focusing in a Vertical Polyacrylamide Minigel System"

ΠΕΙΡΑΜΑ 4α: ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ C ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕΣΩ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ ΜΕ DCIP – Στοιχεία θεωρίας

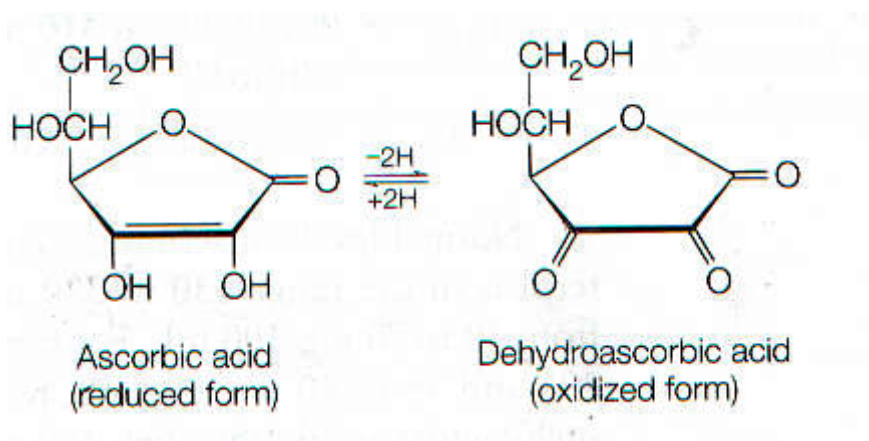
Η απουσία της βιταμίνης C από το διαιτολόγιο των ανθρώπων οδηγεί στην εμφάνιση σκορβούτου. Η διατροφική αυτή ασθένεια, ήταν ίσως από τις πρώτες που μελετήθηκαν και ήταν εξαιρετικά διαδεδομένη στην Ευρώπη του 15^{ου} και 16^{ου} αιώνα. Στη σημερινή εποχή εκδηλώνεται σπάνια-μάλιστα η βιταμίνη C είναι γνωστή και ως ασκορβικό οξύ (α στερητικό + σκορβούτο). Η λήψη της βιταμίνης είναι επαρκής αφού υπάρχει σε μεγάλη ποικιλία ευρέως διαδεδομένων τροφών, πράγμα όμως που δεν είναι αυτονόητο για τους πληθυσμούς με χαμηλό βιοτικό επίπεδο.

Το ασκορβικό οξύ είναι ευρύτατα διαδεδομένο στη φύση αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βρίσκεται στα εσπεριδοειδή και στα πράσινα φυτά όπως οι πιπεριές και το σπανάκι. Η βιταμίνη C παράγεται από όλους τους φυτικούς και ζωϊκούς οργανισμούς με εξαίρεση τον άνθρωπο, τα ινδικά χοιρίδια και κάποια άλλα είδη. Στην περίπτωση αυτή είναι απαραίτητο να αποτελεί μέρος της διαίτας που ακολουθούν οι οργανισμοί αυτοί. Η συνιστώμενη ημερήσια δόση της βιταμίνης C για έναν ενήλικα είναι περίπου 70 mg. Ορισμένοι επιστήμονες, ιατροί και διαιτολόγοι συνιστούν δόσεις από 1 έως 3 γραμμάρια ημερησίως για την αντιμετώπιση καταστάσεων όπως το κοινό κρυολόγημα.

Ο ρόλος του ασκορβικού οξέος στη μεταβολική διαδικασία δεν έχει γίνει απόλυτα κατανοητός. Υπάρχουν ενδείξεις ότι παίρνει μέρος στις αντιδράσεις υδροξυλίωσης της τυροσίνης, της προλίνης και κάποιων στεροειδών ορμονών. Ο μηχανισμός σε αυτές τις μεταβολικές διαδικασίες φαίνεται να σχετίζεται με την ικανότητα της βιταμίνης C να δρα ως αναγωγικός παράγοντας. Εκτός από τη δράση της στην παρεμπόδιση εκδήλωσης σκορβούτου, η βιταμίνη C έχει σημαντικό ρόλο στην εύρυθμη λειτουργία του εγκεφάλου και του νευρικού συστήματος. Επίσης συμβάλλει στην αποτελεσματική κατανομή του σιδήρου στον οργανισμό εμποδίζοντας την εμφάνιση αναιμίας, και καταπραΰνει τις αλλεργίες θωρακίζοντας το ανοσοποιητικό σύστημα.

Όσον αφορά τις χημικές του ιδιότητες, το ασκορβικό οξύ είναι ένας υδατοδιαλυτός, ελαφρά όξινος υδατάνθρακας. Αποτελεί έναν μάλλον ισχυρό αναγωγικό παράγοντα. Οι βιοχημικές και φυσιολογικές λειτουργίες του οφείλονται

στις αναγωγικές του ιδιότητες-λειτουργεί ως φορέας ηλεκτρονίων. Απώλεια ενός ηλεκτρονίου από το μόριο της βιταμίνης λόγω αλληλεπίδρασης του με οξυγόνο ή μεταλλικά ιόντα παράγει semihydro-L-ascorbate, μία δραστική ελεύθερη ρίζα που μπορεί να αναχθεί από διάφορα ένζυμα και να δώσει ξανά L-ascorbic acid, στα φυτά και τα ζώα. Επιπλέον, μια άλλη χαρακτηριστική αντίδραση για το ασκορβικό οξύ είναι η οξειδωσή του σε dehydro-L-ascorbic acid δίνοντας έτσι ένα αποτελεσματικό οξειδοαναγωγικό σύστημα (Εικόνα 1):

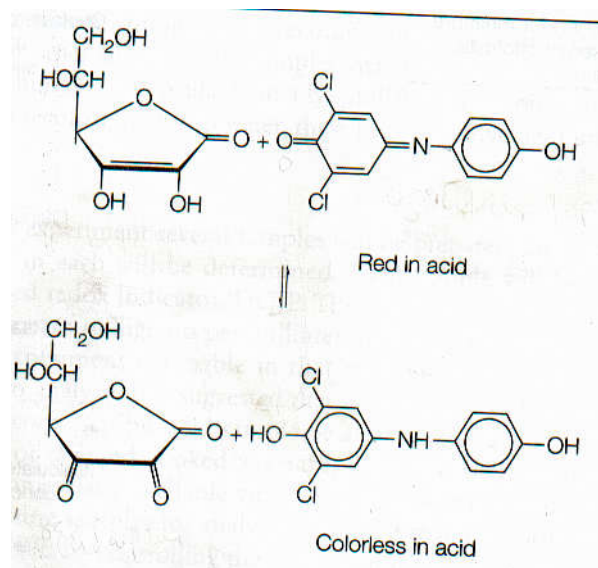


ΕΙΚΟΝΑ 1. Οξειδωτικές καταστάσεις ασκορβικού οξέος

Οι δυο αυτές μορφές (οξειδωμένη-ανηγμένη) είναι βιολογικά ενεργές. Το ασκορβικό οξύ (ανηγμένη μορφή) είναι σχετικά σταθερό στη θέρμανση ενώ το αφυδρογονωμένο ασκορβικό (οξειδωμένη μορφή) είναι ασταθές και ο δακτύλιός του υδρολύεται εύκολα σε δικετογουλονικό οξύ, το οποίο δεν έχει αντισκορβουτικές ιδιότητες. Όταν φρούτα, λαχανικά και άλλες τροφές υποβάλλονται σε θερμική κατεργασία (π.χ. βράσιμο, μαγείρεμα κ.τ.λ.) λαμβάνει χώρα μερική ή ολική απώλεια της βιταμίνης C λόγω μετατροπής της σε δικετογουλονικό οξύ.

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας της βιταμίνης C στις τροφές και τα βιολογικά υγρά (αίμα, ούρα) έχουν αναπτυχθεί ειδικές τεχνικές. Μία από αυτές είναι η τιτλοδότηση με τον οξειδοαναγωγικό δείκτη 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP) σε όξινο διάλυμα. Η μέθοδος αυτή θα χρησιμοποιηθεί και στο συγκεκριμένο πείραμα επειδή είναι σχετικά απλή, ακριβής, γρήγορη, και μπορεί να εφαρμοστεί σε διαφορετικούς τύπους δειγμάτων. Η αντίδραση του DCIP με το ασκορβικό οξύ φαίνεται στην Εικόνα 2. Το ασκορβικό οξύ ανάγει τη χρωστική-δείκτη από την οξειδωμένη μορφή (κόκκινο χρώμα σε όξινο περιβάλλον) στην ανηγμένη μορφή

(άχρωμη σε όξινο περιβάλλον). Η διαδικασία είναι απλή και αρχίζει με τη διαλυτοποίηση του δείγματος σε μεταφωσφορικό οξύ. Ένα κλάσμα του διαλύματος αυτού τιτλοδοτείται με ένα διάλυμα DCIP. Παρόλο που το διάλυμα του δείκτη είναι μπλε γίνεται ανοικτό κόκκινο σε όξινο περιβάλλον. Μόλις έρθει σε επαφή με το ασκορβικό οξύ του προς τιτλοδότηση διαλύματος γίνεται άχρωμο. Η τιτλοδότηση συνεχίζεται μέχρι να αντιδράσει όλο το ασκορβικό οξύ και το διάλυμα να αποκτήσει ένα σταθερό, ροζ χρώμα (λόγω μικρής περίσσειας χρωστικής).



ΕΙΚΟΝΑ 2. Αντίδραση της οξειδοαναγωγικής χρωστικής DCIP με τη βιταμίνη C.

Πείραμα 4α: ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ C ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕΣΩ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ ΜΕ DCIP

Στο πείραμα αυτό θα γίνει προσδιορισμός του ποσού της βιταμίνης C σε διάφορα δείγματα όπως άγνωστο δείγμα ασκορβικού οξέος, φρέσκος και εμπορικός χυμός πορτοκαλιού κ.τ.λ. Η περιεκτικότητα σε ασκορβικό οξύ θα μετρηθεί σε mg/ml δείγματος.

I. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Φυσικοί (φρεσκοστυμμένοι) και εμπορικοί χυμοί εσπεριδοειδών (πορτοκάλι, λεμόνι, φυσικός, μανταρίνι, λάιμ), τοποθετημένοι σε πάγο
- Ταμπλέτες βιταμίνης C
- Διάλυμα μεταφωσφορικού οξέος 5% σε νερό
- Πρότυπο διάλυμα ασκορβικού οξέος, 4,0 mg/ml σε μεταφωσφορικό οξύ (τοποθετημένο σε πάγο και σκοτάδι)
- Άγνωστο διάλυμα ασκορβικού οξέος σε μεταφωσφορικό οξύ (τοποθετημένο σε πάγο και σκοτάδι)
- Διάλυμα DCIP 0,08 gr/100 ml
- Γυάλινη προχοΐδα 50 ml
- Μαχαίρι
- Χάρτινο φίλτρο
- Γυάλινο χωνί

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Μέτρηση βιταμίνης C σε τυφλό, πρότυπο και άγνωστο δείγμα

1. Γεμίστε μια προχοΐδα με διάλυμα DCIP. Ο μηνίσκος του διαλύματος πρέπει να ακουμπάει στην γραμμή του μηδενός της προχοΐδας όταν αυτή είναι εντελώς γεμάτη.
2. Χρησιμοποιώντας ένα σιφώνιο μεταφέρετε 1 ml απιονισμένου νερού και 9 ml διαλύματος μεταφωσφορικού οξέος σε μία κωνική φιάλη 50 ml. Σημειώστε την αρχική ένδειξη της προχοΐδας και ανοίξτε την στρόφιγγα ώστε να έχετε μια **πολύ αργή ροή** του διαλύματος (σταγόνα-σταγόνα).

3. Σταματήστε όταν το διάλυμα στην κωνική φιάλη αποκτήσει ένα σταθερό ροζ χρώμα και σημειώστε την ένδειξη της προχοΐδας. Επαναλάβετε την προηγούμενη διαδικασία δύο φορές ακόμα και βρείτε το μέσο όρο των μετρήσεων. Η διαδικασία αυτή είναι ανάλογη με τη χρήση τυφλού δείγματος στη φασματοσκοπία.
4. Η ίδια σειρά βημάτων ακολουθείται για τον υπολογισμό της ποσότητας ασκορβικού οξέος σε πρότυπο διάλυμα (4,0 mg/ml) και διάλυμα με άγνωστη ποσότητα βιταμίνης με τη διαφορά ότι στην κωνική φιάλη τοποθετείτε 1 ml του αντίστοιχου διαλύματος αντί 1 ml νερού.

Μέτρηση βιταμίνης C σε φυσικό και εμπορικό χυμό πορτοκαλιού

1. Κόψτε ένα πορτοκάλι στη μέση, στύψτε το και σουρώστε το χυμό σε 4 φύλλα γάζας.
2. Αναμείξτε 10 ml από το χυμό αυτό με 40 ml διαλύματος μεταφωσφορικού οξέος και φιλτράρετε το διάλυμα περνώντας το από ένα χωνί διηθητικού χαρτιού.
3. Μεταφέρετε 10 ml από το διάλυμα αυτό σε μια κωνική φιάλη 50 ml και προχωρήστε στην τιτλοδότηση όπως παραπάνω.
4. Στην περίπτωση του εμπορικού χυμού, ανακινήστε καλά τη συσκευασία και επαναλάβετε την παραπάνω διαδικασία.

III. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ον/μο:

A.M.

Ημέρα/Θέση:

Ημ/νία:

Για κάθε τιτλοδότηση που κάνατε συμπληρώστε τον παρακάτω πίνακα:

-Δείγμα ασκορβικού οξέος με συγκέντρωση C= mg/ml

Μετρήσεις #	Αρχική ένδειξη προχοΐδας	Τελική ένδειξη προχοΐδας	ml DCIP που καταναλώθηκαν
1			
2			
3			
M.O.	-	-	

-Δείγμα ασκορβικού οξέος με άγνωστη συγκέντρωση C= mg/ml *

Μετρήσεις #	Αρχική ένδειξη προχοΐδας	Τελική ένδειξη προχοΐδας	ml DCIP που καταναλώθηκαν
1			
2			
3			
M.O.	-	-	

-Δείγμα φυσικού χυμού με συγκέντρωση C= mg/ml *

Μετρήσεις #	Αρχική ένδειξη προχοΐδας	Τελική ένδειξη προχοΐδας	ml DCIP που καταναλώθηκαν
1			
2			
3			
M.O.	-	-	

-Δείγμα εμπορικού χυμού με συγκέντρωση C= mg/ml *

Μετρήσεις #	Αρχική ένδειξη προχοΐδας	Τελική ένδειξη προχοΐδας	ml DCIP που καταναλώθηκαν
1			
2			
3			
M.O.	-	-	

*Υπολογισμός συγκέντρωσης ασκορβικού οξέος στα δείγματα:

1. Διαιρέστε τα 4,0 mg (την ποσότητα του ασκορβικού οξέος στο πρότυπο διάλυμα) με τον αριθμό των ml της χρωστικής DCIP που καταναλώθηκαν για να προσδιορίσετε την ποσότητα του ασκορβικού οξέος που είναι ισοδύναμο με 1 ml χρωστικής:

$$\frac{\text{Ασκορβικό οξύ (mg)}}{1,0 \text{ ml χρωστικής}} = \frac{4,0 \text{ mg ασκορβικό οξύ}}{\text{ml χρωστικής που καταναλώθηκαν}}$$

2. Πολλαπλασιάστε τον μέσο όρο (μ.ο.) της ποσότητας (ml) της χρωστικής που καταναλώθηκε με την ποσότητα του ασκορβικού οξέος που είναι ισοδύναμο με 1 ml χρωστικής για να βρείτε τον μ.ο. του ασκορβικού οξέος σε ένα κλάσμα του δείγματος:

mg ασκορβικού οξέος/κλάσμα =

$$\text{ποσότητα χρωστικής που καταναλώθηκε (ml) x } \frac{\text{Ασκορβικό οξύ (mg)}}{1,0 \text{ ml χρωστικής}}$$

Υπολογίστε τη συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος στο άγνωστο δείγμα σε mg/ml και στους χυμούς (φυσικό και εμπορικό) σε mg/100ml.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

R. Boyer, **Concepts in Biochemistry** (1999), Brooks/Cole (Pacific Grove, CA), pp. 123, 181 vitamin C; pp. 251-252.

T. Devlin, Editor, **Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations**, 4th ed. (1997), John Wiley & Sons (New York), pp. 1127, 1098. Vitamin C and cholesterol.

R. Garrett and C. Grisham, **Biochemistry**, 3rd ed. (2005), W. B. Saunders (Orlando, FL), pp. 566-568;. An introduction to vitamin C.

B. Halliwell, **Trends Biochem. Sci.** 24, pp. 255-259 (1999). "Vitam C: Poison, Prophylactic or Panacea?"

S. Margolis and R. Schapira, **J. Chromatogr.** 690, 25-33 (1996). "The Measurement of L-Ascorbic Acid and D-Ascorbic Acid in Biological Samples."

C. Mathews, K. van Holde, and K. Ahern, **Biochemistry**, 3rd ed. (2000), Benjamin/Cummings (San Francisco), pp. 554-555; 323-324. An introduction to vitamin C and cholesterol.

L. Stryer, **Biochemistry**, 4th ed. (1995), W. H. Freeman (new York), pp. 267; 455, 691-702. Introduction to vitamin C and cholesterol.

D. Voet, J. Voet, and C. Pratt, **Fundamentals of Biochemistry** (1999), John Wiley & Sons (New York), pp. 135; 228-229;260-264. Introduction to vitamin C and cholesterol.


ΠΕΙΡΑΜΑ 4β: ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ Ι ΚΑΙ ΙΙ - Στοιχεία θεωρίας

I. ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΑΝΑΓΩΓΗΣ (ή ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΗΣ)

Η ροή ηλεκτρονίων μεταξύ δυο μορίων εξαρτάται από τη σχετική συγγένειά τους για πρόσληψη ηλεκτρονίων. Με άλλα λόγια το δυναμικό αναγωγής είναι το μέτρο της συγγένειας ενός μορίου για ηλεκτρόνια. Είναι λογικό να υποθέσουμε ότι ένα ηλεκτρόνιο θα μετακινηθεί από ένα μόριο-δότη σε ένα μόριο-δέκτη το οποίο θα έχει υψηλότερο δυναμικό αναγωγής από τον δότη. Επομένως η κατεύθυνση της ηλεκτρονιακής ροής μπορεί να προβλεφθεί συγκρίνοντας τα δυναμικά αναγωγής των μορίων-φορέων:

Determining the sequence of e- flow

e- acceptor	e- donor	E° (V)
2H ⁺	H ₂	-0.414
NAD ⁺	NADH	-0.320
Ubiquinone	Ubiquinol	0.045
Cyt b (Fe ³⁺)	Cyt b (Fe ²⁺)	0.077
Cyt c ₁ (Fe ³⁺)	Cyt c ₁ (Fe ²⁺)	0.220
Cyt c (Fe ³⁺)	Cyt c (Fe ²⁺)	0.254
Cyt a (Fe ³⁺)	Cyt a (Fe ²⁺)	0.290
Cyt a ₃ (Fe ³⁺)	Cyt a ₃ (Fe ²⁺)	0.550
½ O ₂	H ₂ O	0.816



e- spontaneously flow from low E to high E

Το πρότυπο δυναμικό αναγωγής E⁰ μετράται κάτω από πρότυπες συνθήκες-δηλαδή pH 7, θερμοκρασία 25 °C, και συγκέντρωση C ίση με 1 mole/L. Η κατεύθυνση μιας αυθόρμητης ροής ηλεκτρονίων εξαρτάται από τη διαφορά των δυναμικών αναγωγής μεταξύ δυο μορίων. Αυτή η έννοια του αυθόρμητου παραπέμπει στην αντίστοιχη μιας βιοχημικής αντίδρασης, η οποία καθορίζεται από την αλλαγή στην ελεύθερη ενέργεια, ΔG. Για την ακρίβεια, η μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ δυο μορίων σε μια βιοχημική αντίδραση είναι μια οξειδοαναγωγή. Επομένως μετρώντας το ΔG προσδιορίζεται αν είναι ή όχι αυθόρμητη η αντίδραση. Πρακτικά, το ΔE⁰, το οποίο

είναι η αλλαγή του πρότυπου δυναμικού αναγωγής κατά τη διάρκεια μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ δυο μορίων, είναι ανάλογο του ΔG^0 (μεταβολή πρότυπης ελεύθερης ενέργειας):

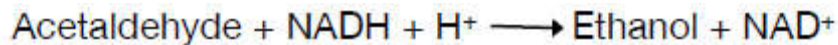
$$\Delta G = -n F \Delta E$$

$$\Delta G^{\circ} = -n F \Delta E^{\circ} \quad \text{at standard conditions}$$

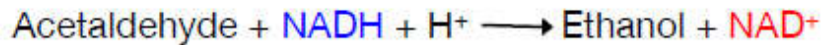
$n = \#$ of e- transferred
 $F =$ Faraday constant

Φυσικά γνωρίζετε ότι μια αντίδραση είναι αυθόρμητη όταν το ΔG είναι αρνητικό οπότε όταν γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίων στην οποία το ΔE είναι θετικό τότε η αντίδραση αυτή είναι αυθόρμητη.

Ας πάρουμε το παράδειγμα μιας οξειδοαναγωγικής αντίδρασης που πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης:



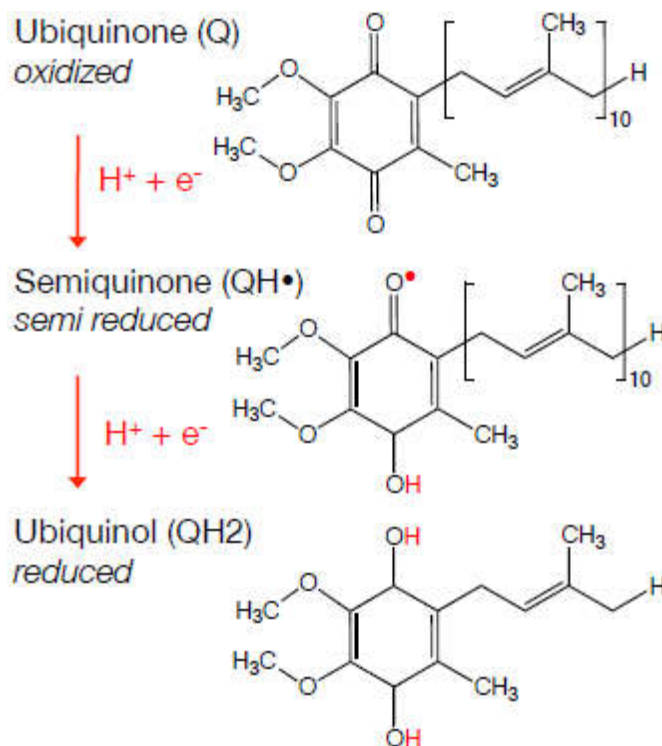
Πρόκειται για τη δεύτερη αντίδραση στο μονοπάτι της ζύμωσης και θα προσπαθήσουμε να υπολογίσουμε τη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας σε πρότυπες συνθήκες, ΔG^0 . Μπορούμε να γράψουμε την παραπάνω αντίδραση ως άθροισμα δυο ημιαντιδράσεων. Η πρώτη ημιαντίδραση αφορά την αναγωγή της ακεταλδεΐδης η οποία αντιδρά με δυο πρωτόνια και δυο ηλεκτρόνια σχηματίζοντας αιθανόλη ενώ στην δεύτερη το NAD^+ αντιδρά με δυο πρωτόνια και δυο ηλεκτρόνια δίνοντας NADH και πρωτόνιο.



Για να μετρήσουμε το $\Delta G = -n F \Delta E = -23,7 \text{ kJ/mol}$ χρειαζόμαστε και τις δυο αντιδράσεις οι οποίες γράφονται ως αναγωγές. Εξ ορισμού $\Delta E^0 = E^0$ ηλεκτρονιοδέκτη – E^0 ηλεκτρονιοδότη. Επομένως η αντίδραση είναι αυθόρμητη.

Τα μόρια-φορείς ηλεκτρονίων στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στους χλωροπλάστες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες. Τα περισσότερα από αυτά βρίσκονται προσδεδεμένα σε μεμβράνες και μπορούν να μεταφέρουν ένα ή δυο ηλεκτρόνια ταυτόχρονα.

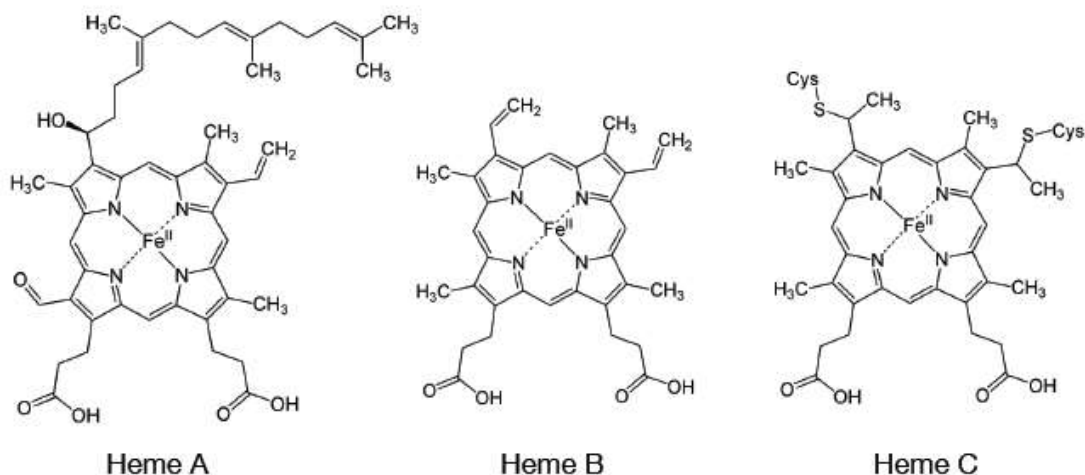
Στην πρώτη κατηγορία είναι η ουβικινόνη ή συνένζυμο Q.



Πρόκειται για μια δομή p-βενζοκινόνης που εξαιτίας της ισοπρενοειδούς αλυσίδας που διαθέτει είναι ιδιαίτερα υδρόφοβη. Δέχεται αρχικά ένα ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο σχηματίζοντας ημικινόνη QH και στη συνέχεια πολύ γρήγορα ένα δεύτερο ηλεκτρόνιο (και πρωτόνιο) οπότε προκύπτει το πλήρως ανηγμένο συνένζυμο QH₂, το οποίο ονομάζεται και ουβικινόλη.

Στη δεύτερη κατηγορία μορίων-φορέων ηλεκτρονίων ανήκει μια κατηγορία πρωτεϊνών που ονομάζονται κυτοχρώματα τα οποία με τη σειρά τους χωρίζονται σε τρεις τύπους (κυτόχρωμα A, B ή C) ανάλογα με τη μορφή της αίμης που υπάρχει στις πρωτεΐνες αυτές:

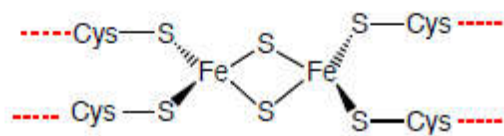
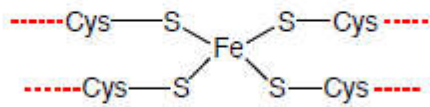
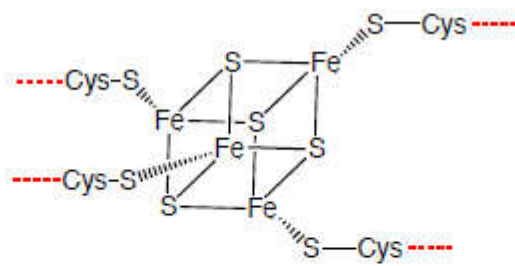
Cytochromes with characteristic hemes



Τα κυτοχρώματα A και B είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες ενώ το κυτόχρωμα C είναι περιφερειακή μεμβρανική πρωτεΐνη.

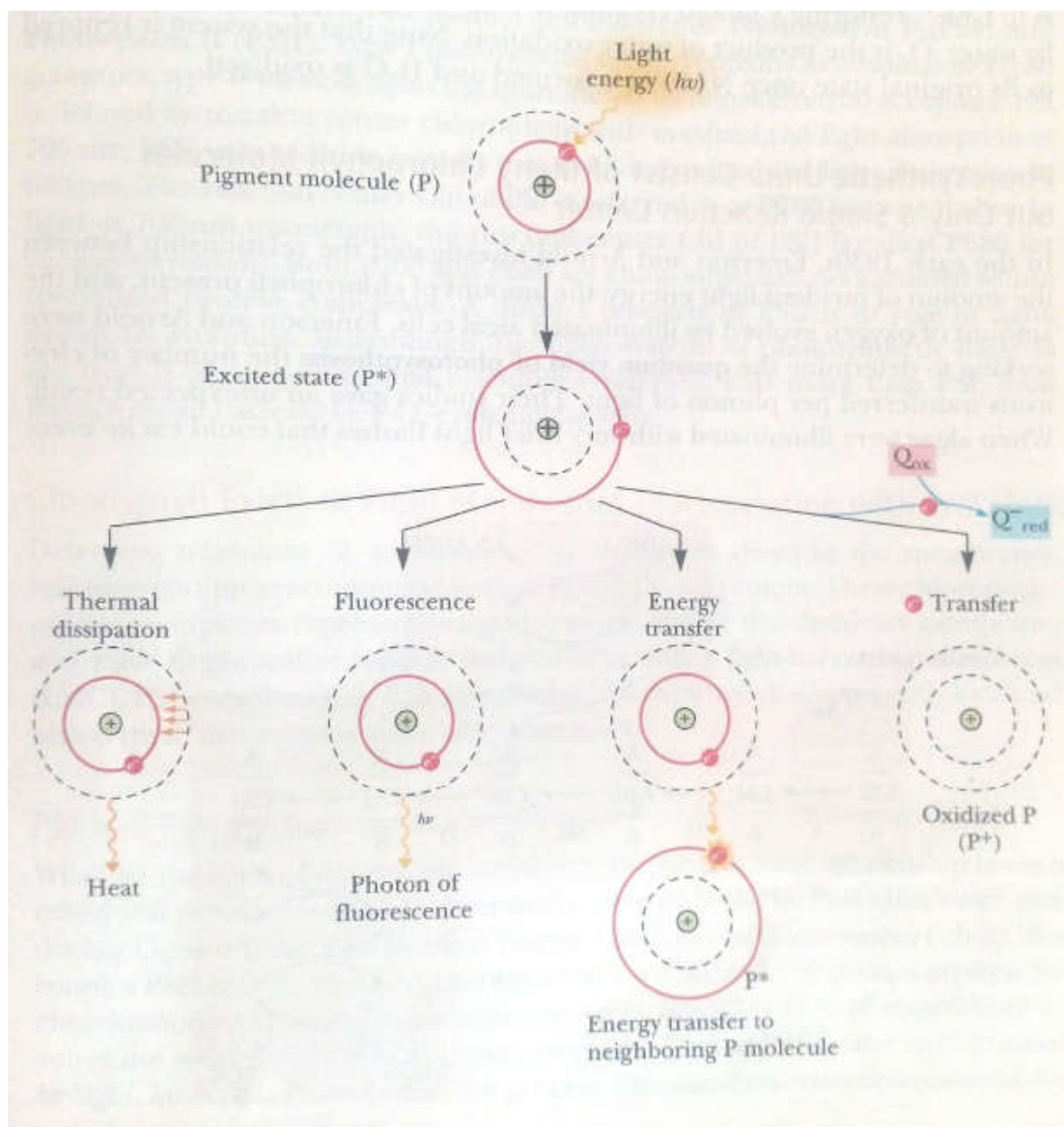
Τέλος, στην τρίτη κατηγορία μορίων-φορέων ηλεκτρονίων ανήκουν τα κέντρα σιδήρου-θείου τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικά είδη πρωτεϊνών. Τα άτομα του θείου μπορεί να είναι είτε ελεύθερα ή να ανήκουν σε πλευρικές αλυσίδες καταλοίπων κυστεΐνης. Τα κέντρα αυτά μπορεί να σχηματίζουν δομές σχετικά περίπλοκες (με 4 άτομα σιδήρου) ή πιο απλές (1 ή 2 άτομα σιδήρου):

Iron-sulfur centers



II. ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ - ΦΩΤΕΙΝΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

Γνωρίζετε ότι η φωτεινή ενέργεια απορροφάται από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές. Κάθε φωτόνιο αντιπροσωπεύει ένα quantum φωτεινής ενέργειας. Όταν αυτό απορροφηθεί από το μόριο της χρωστικής, στη συνέχεια, μπορεί να ακολουθήσει τέσσερα πιθανά μονοπάτια (Εικόνα 1):



ΕΙΚΟΝΑ 1. Πιθανά μονοπάτια που ακολουθεί ένα quantum φωτεινής ενέργειας που απορροφάται από ένα μόριο χρωστικής.

- 1.Απώλεια ενέργειας με τη μορφή θερμότητας.** Η ενέργεια μπορεί να διαχυθεί ως θερμότητα μέσω ανακατανομής της σε ατομικές δονήσεις στο μόριο της χρωστικής.
- 2.Απώλεια ενέργειας με τη μορφή φωτός.** Η ενέργεια του διεγερμένου ηλεκτρονίου επανεμφανίζεται ως φθορισμός (εκπομπή φωτός). Ένα φωτόνιο ‘φθορισμού’

εκπέμπεται καθώς το ηλεκτρόνιο επιστρέφει στη βασική κατάσταση. Το φωτόνιο ‘φθορισμού’ είναι σε μεγαλύτερο μήκος κύματος άρα έχει μικρότερη ενέργεια από το αντίστοιχο της διεγερμένης κατάστασης.

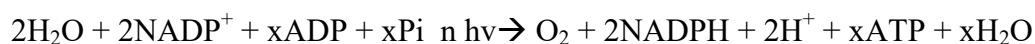
3. Μεταφορά ενέργειας λόγω συντονισμού. Η ενέργεια ενεργοποίησης του ηλεκτρονίου σε ένα μόριο χρωστικής μπορεί να μεταφερθεί στο κοντινότερο γειτονικό μόριο εάν η διαφορά των ενεργειακών επιπέδων μεταξύ τους αντιστοιχεί στο quantum της ενέργειας ενεργοποίησης. Στη διαδικασία αυτή, η μεταφερόμενη ενέργεια διεγείρει ένα ηλεκτρόνιο του μορίου-δέκτη σε τροχιακό υψηλότερης ενεργειακής κατάστασης. Ταυτόχρονα το διεγερμένο ηλεκτρόνιο του μορίου-δότη επιστέφει στη βασική κατάσταση. Μέσω του μηχανισμού αυτού (Forster Resonance Energy Transfer) τα quanta φωτός που περιπλανιούνται στα διάφορα μόρια χρωστικών καταλήγουν σε συγκεκριμένες φωτοχημικά ενεργές περιοχές (χλωροφύλλες P680 και P700).

4. Μεταγωγή (transduction) ενέργειας. Η ενέργεια ενεργοποίησης προκαλεί τη διέγερση του ηλεκτρονίου και τη μεταφορά του σε τροχιακό υψηλότερης ενέργειας. Το γεγονός αυτό αλλάζει δραματικά το πρότυπο δυναμικό οξειδοαναγωγής, E^0 του μορίου, με αποτέλεσμα η χρωστική να μετατρέπεται σε ένα πολύ αποτελεσματικό δότη ηλεκτρονίων. Με άλλα λόγια, τα διεγερμένα μόρια χρωστικών διαθέτοντας ένα ηλεκτρόνιο σε υψηλό ενεργειακό επίπεδο μετατρέπονται σε αναγωγικούς παράγοντες. Όταν οι συγκεκριμένος δότης ηλεκτρονίων αντιδράσει με ένα μόριο-δέκτη ηλεκτρονίων που βρίσκεται στη “σωστή” απόσταση, αρχίζει η διαδικασία μετασχηματισμού (ή μεταγωγή) της φωτεινής ενέργειας (φωτόνια) σε χημική ενέργεια (αναγωγική ικανότητα, έναρξη αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίων). Η μετατροπή της φωτεινής ενέργειας σε χημική είναι η ουσία της φωτοσύνθεσης.

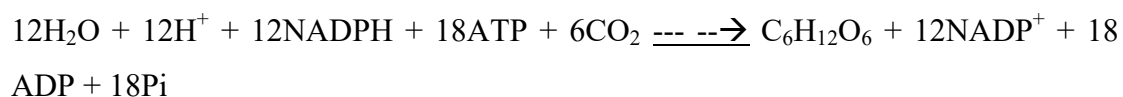
Αν ένα διάλυμα χλωροπλαστών ακτινοβοληθεί απουσία CO_2 , εκλύεται οξυγόνο. Εάν στη συνέχεια οι χλωροπλάστες τοποθετηθούν στο σκοτάδι παρουσία CO_2 θα παρατηρηθεί σύνθεση υδατανθράκων (εξόζες). Επομένως η έκλυση O_2 μπορεί να διαχωριστεί προσωρινά από τη σύνθεση υδατανθράκων και εξαρτάται από την παρουσία φωτός. Οι φωτεινές αντιδράσεις (όπου η παραγωγή O_2 είναι μόνο ένα μέρος τους) πραγματοποιούνται στις θυλακοειδείς μεμβράνες των χλωροπλαστών. Οι αντιδράσεις που είναι ανεξάρτητες από το φως και γι’ αυτό και μόνο λέγονται σκοτεινές γίνονται στο stroma όπου γίνεται μετατροπή CO_2 σε υδατάνθρακες. Μια ακριβής αλλά πολύ περιληπτική περιγραφή της φωτοσύνθεσης έχει ως εξής:

Ηλεκτρομαγνητική ενέργεια (φως) μετασχηματίζεται από ένα συγκεκριμένο φωτοχημικό σύστημα που υπάρχει στις θυλακοειδείς μεμβράνες σε **χημική** στη μορφή αναγωγικών ισοδυνάμων (NADPH) και ενώσεων υψηλής ενέργειας (ATP). Το NADPH και το ATP χρησιμοποιούνται για να παρέχουν ενέργεια στην ενδεργονική διαδικασία παραγωγής εξοζών από CO₂ σε μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων που πραγματοποιούνται στο stroma.

Στα πράσινα φυτά, το νερό είναι ο τελικός δότης ηλεκτρονίων για τη φωτοσυνθετική παραγωγή αναγωγικών ισοδυνάμων (Εξίσωση 1):

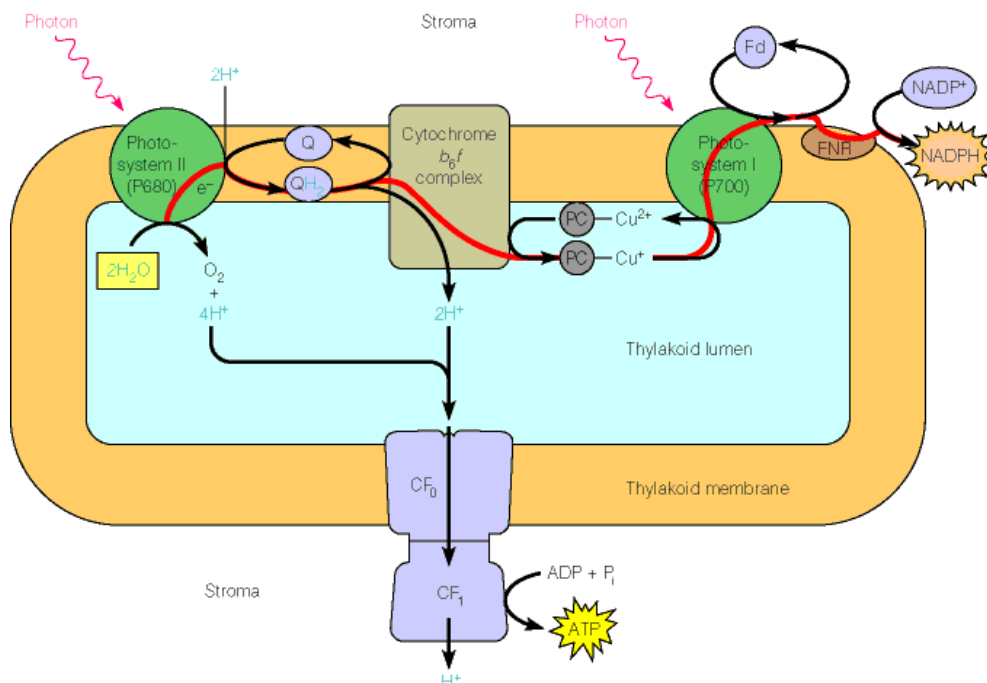


Η παραπάνω αντίδραση περιγράφει τη διαδικασία (στις φωτεινές αντιδράσεις), όπου το $n h\nu$ συμβολίζει τη φωτεινή ενέργεια (n είναι ο αριθμός των φωτονίων που απαιτούνται). Η φωτεινή ενέργεια είναι απαραίτητη αφού η αναγωγή του NADP⁺ από το H₂O είναι μια θερμοδυναμικά μη επιτρεπτή αντίδραση ($\Delta E^{0'} = -1,136 \text{ V}$, $\Delta G^{0'} = +219 \text{ KJ/mole NADP}^+$). Επομένως η ενέργεια που παρέχεται από το φως, $nh\nu$, πρέπει να είναι μεγαλύτερη από $219 \text{ KJ/mole NADP}^+$. Η στοιχειομετρία παραγωγής του ATP εξαρτάται από τον ακριβή μηχανισμό φωτοφωσφορυλίωσης του κυττάρου τη συγκεκριμένη στιγμή. Αντίθετα, η στοιχειομετρία του μεταβολικού μονοπατιού της μετατροπής του CO₂ είναι απολύτως καθορισμένη (εξίσωση 2):



Ποιος είναι ο ρόλος των δυο φωτοσυστημάτων, και ποια η σχέση μεταξύ τους; Το PS I παρέχει αναγωγικά ισοδύναμα με τη μορφή του NADPH. Το PS II διασπά το H₂O οπότε παράγεται O₂ ενώ τα ηλεκτρόνια που απελευθερώνονται διοχετεύονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων που συνδέει το PS II με το PS I. Η ροή ηλεκτρονίων μεταξύ PS II και PS I οδηγεί στην άντληση πρωτονίων στο εσωτερικό των θυλακοειδών και στη σύνθεση ATP (εξίσωση 2). Το πρότυπο δυναμικό οξειδοαναγωγής για το ζεύγος NADP⁺ / NADPH είναι $-0,32\text{V}$. Επομένως ένα ισχυρό αναγωγικό με $E^{0'}$ 'πιο αρνητικό' από $-0,32\text{V}$ απαιτείται για την αναγωγή του NADP⁺ κάτω από πρότυπες συνθήκες. Με το ίδιο σκεπτικό, ένα πολύ ισχυρό οξειδωτικό απαιτείται για την οξείδωση του H₂O σε O₂ αφού $E^{0'}(1/2 \text{ O}_2/$

H_2O)=+0,82V. Στη φύση επιτυγχάνεται διαχωρισμός των οξειδωτικών και αναγωγικών διαδικασιών που περιγράφονται στην εξίσωση 2 αφού η αναγωγή του $NADP^+$ πραγματοποιείται στο PSI και η οξείδωση του νερού στο PSII. Τα δυο φωτοσυστήματα συνδέονται μέσω μιας αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων έτσι ώστε το ασθενές αναγωγικό που παράγεται στο PSII να μπορεί να παρέχει το ηλεκτρόνιο που απαιτείται για να αναχθεί το ασθενές οξειδωτικό (P700) στην πλευρά του PSI. Έτσι ηλεκτρόνια ‘ρέουν’ από το H_2O προς το $NADP^+$, οδηγούμενα από τη φωτεινή ενέργεια που απορροφάται στα κέντρα αντίδρασης. Το οξυγόνο είναι παραπροϊόν της φωτόλυσης του νερού. Η ροή των ηλεκτρονίων συνοδεύεται από τη δημιουργία διαβάθμισης πρωτονίων και την παραγωγή ATP λόγω φωσφορυλίωσης (στην πραγματικότητα φωτοφωσφορυλίωση) του ADP (Εικόνα 2):

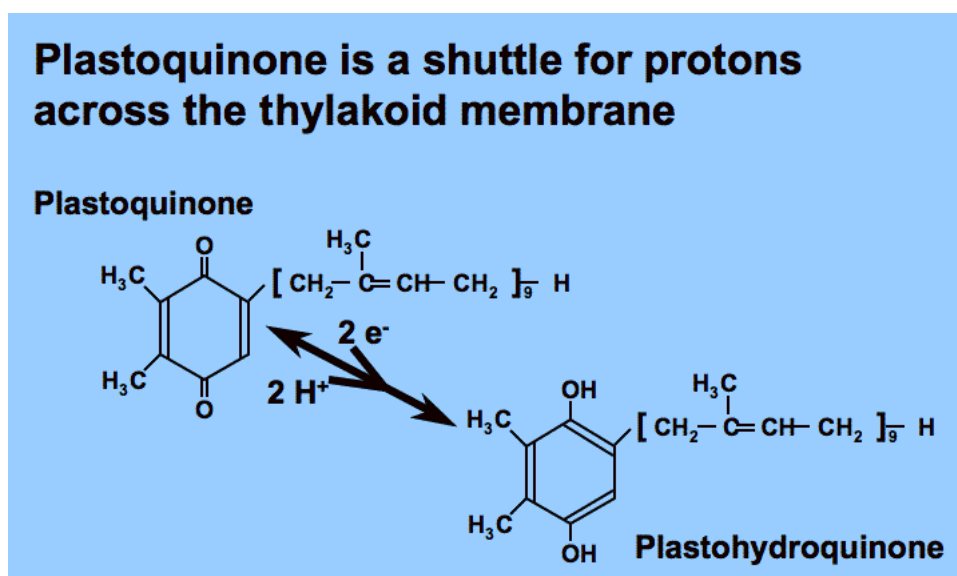


ΕΙΚΟΝΑ 2. Οι φωτεινές αντιδράσεις όπως πραγματοποιούνται στα θυλακοειδή

Το φωτοσύστημα II αποτελείται από ένα φωτοσυλλεκτικό σύμπλοκο, ένα πυρήνα με ένα κέντρο αντίδρασης και ένα σύμπλοκο το οποίο είναι υπεύθυνο για την έκλυση οξυγόνου. Το φωτοσυλλεκτικό σύμπλοκο (Light-Harvesting Complex, LHC II) περιέχει περίπου 200 μόρια χλωροφύλλης a και b δεσμευμένα πάνω σε αρκετές πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Η ενέργεια από τη διέγερση των ηλεκτρονίων διοχετεύεται από αυτές τις χλωροφύλλες-κεραίες σε μια χλωροφύλλη του κέντρου αντίδρασης η οποία ονομάζεται P680 (όπου P σημαίνει pigment δηλαδή χρωστική), και το 680 είναι το μήκος κύματος (nm) όπου η συγκεκριμένη χλωροφύλλη παρουσιάζει μέγιστο

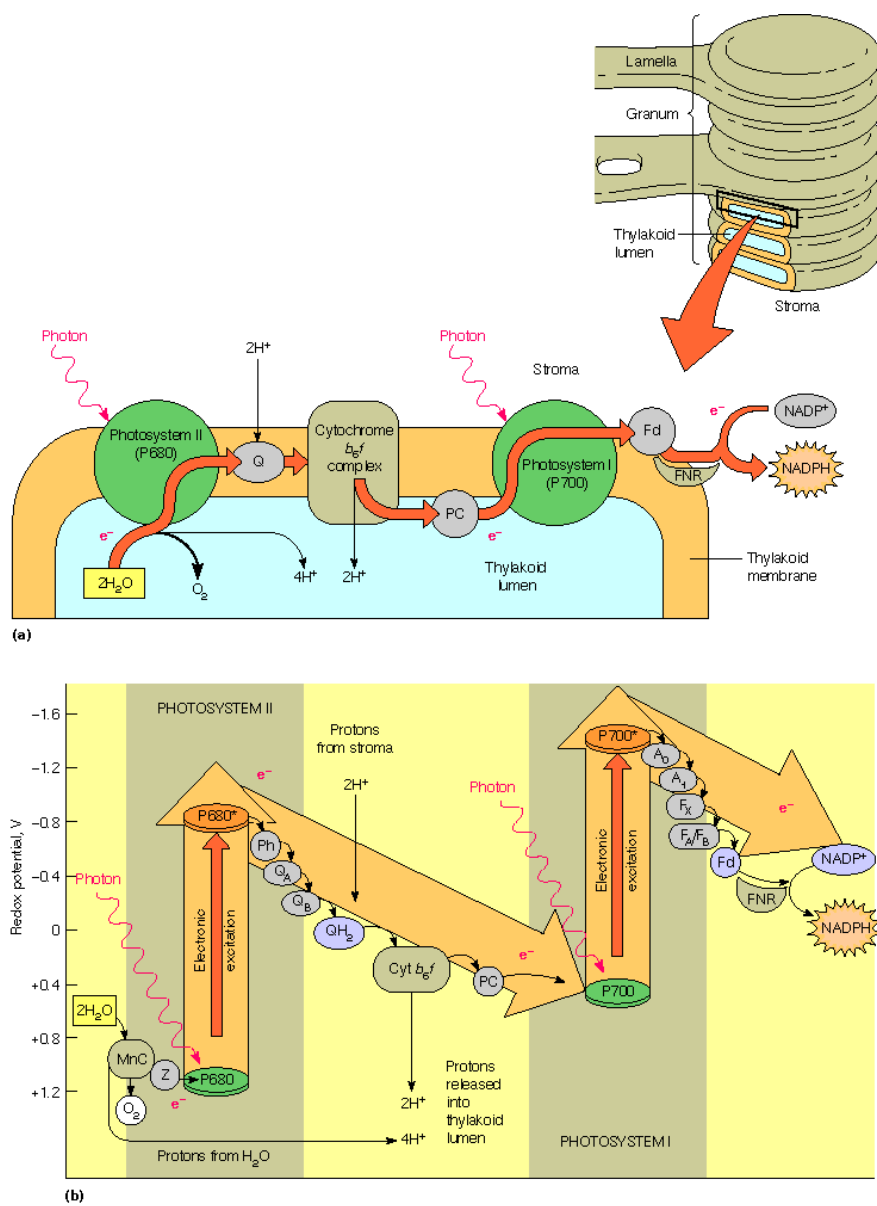
απορρόφησης. Η διεγερμένη κατάσταση P680* αυτού του κέντρου αντίδρασης είναι πολύ πιο ισχυρή αναγωγική ένωση απ' ό,τι η θεμελιώδης κατάσταση. Σε διάστημα picoseconds από τη διέγερση της χλωροφύλλης, έχει γίνει μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από την P680* σε δεσμευμένη φαιοφυτίνη (Ph), μια πορφυρίνη ταυτόσημης δομής με τη χλωροφύλλη α χωρίς όμως μαγνήσιο. Το κέντρο αντίδρασης μετατρέπεται σε μια κατιονική ρίζα, την P680⁺. Το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας του απορροφημένου φωτονίου έχει διατηρηθεί σε αυτό τον διαχωρισμό ηλεκτρικών φορτίων.

Στη συνέχεια το ηλεκτρόνιο μεταβαίνει από την ανηγμένη φαιοφυτίνη σε μια πλαστοκινόνη συνδεδεμένη με μια πρωτεΐνη σε θέση που ονομάζεται Q_A και τελικά σε μια δεύτερη πλαστοκινόνη σε θέση που ονομάζεται Q_B. Η πλαστοκινόνη Q_A δέχεται εναλλάξ ένα ηλεκτρόνιο από την ανηγμένη φαιοφυτίνη, το οποίο και δίνει στη συνέχεια στην Q_B. Η Q_A και η ελεύθερη ρίζα της παραμένουν συνδεδεμένες με την πρωτεΐνη καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου. Αντίθετα η Q_B μετά την αποδοχή ενός ηλεκτρονίου παραμένει συνδεδεμένη με μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 32 kDa, απελευθερώνεται όμως στην υδρόφοβη περιοχή της μεμβράνης με την αποδοχή και δεύτερου ηλεκτρονίου. Σ' αυτό το σημείο η ενέργεια δυο φωτονίων έχει αποθηκευτεί με σιγουριά στο αναγωγικό δυναμικό της QH₂ (Εικόνα 3). Στη συνέχεια η QH₂ τροφοδοτεί τα ηλεκτρόνιά της σε μια αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων η οποία αντλεί πρωτόνια και είναι συνδεδεμένη με το PS I.



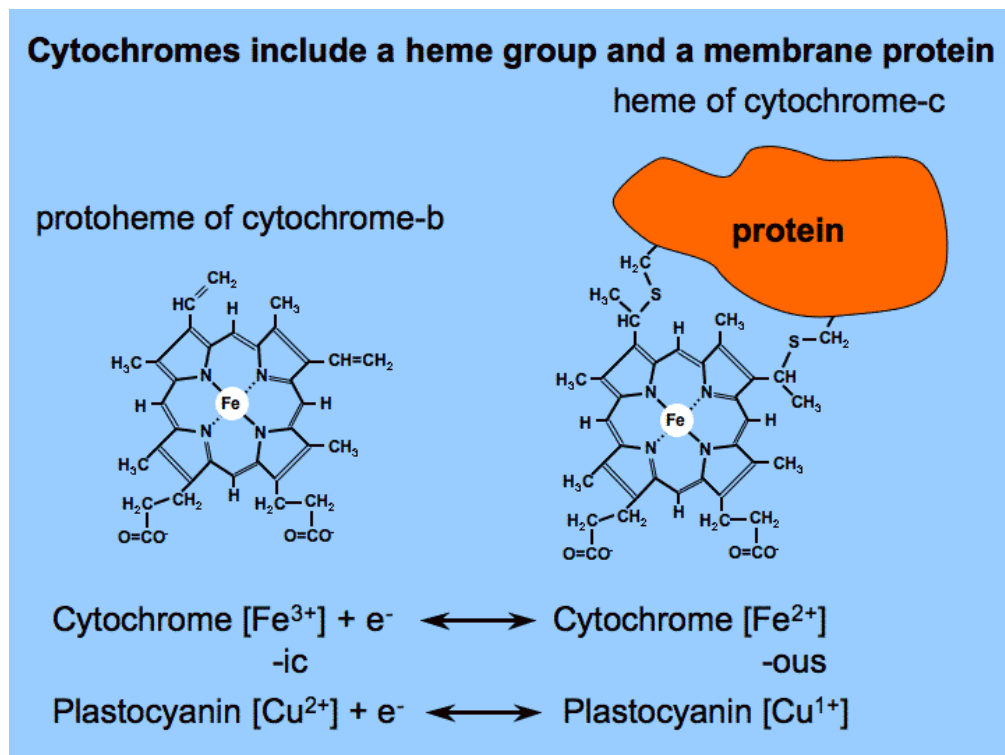
ΕΙΚΟΝΑ 3. Αναγωγή της πλαστοκινόνης

Επιπλέον το κατιόν $P680^+$ (PSII) είναι μια ισχυρά οξειδωτική ουσία η οποία μέσω μιας ενδιάμεσης ένωσης που ονομάζεται Z, εξάγει ηλεκτρόνια από το νερό, προκαλώντας έτσι την παραγωγή O_2 . Οι ενεργειακές σχέσεις και η πορεία των ηλεκτρονίων από το H_2O στην QH_2 απεικονίζονται πολύ απλά χρησιμοποιώντας τα πρότυπα οξειδοαναγωγικά δυναμικά των εν λόγω ουσιών (Εικόνα 4). Η QH_2 έχει χαμηλότερο δυναμικό (0,1V) από το H_2O (0,82V), πράγμα που σημαίνει ότι η QH_2 είναι ισχυρότερο αναγωγικό μέσο. Αυτή η ενεργειακά μη επιτρεπτή μεταφορά ηλεκτρονίων επιτυγχάνεται με τη χρήση της ενέργειας των φωτονίων τα οποία απορροφώνται από το PS II.



ΕΙΚΟΝΑ 4: Σχήμα Z της φωτοσύνθεσης

Το επόμενο συγκρότημα που λαμβάνει μέρος στη φωτοσύνθεση είναι το σύμπλοκο κυτοχρωμάτων bf (Εικόνα 5). Τα ηλεκτρόνια από το PS II περνώντας μέσα από αυτό το σύμπλοκο φτάνουν στο φωτοσύστημα I (PS I). Το κυτόχρωμα bf καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από την πλαστοκινόλη (QH₂) στην πλαστοκυανίνη (PC) και παράλληλα αντλεί πρωτόνια δια μέσου της μεμβράνης των θυλακοειδών. Το σύμπλοκο κυτοχρωμάτων bf περιέχει 4 υπομονάδες: ένα κυτόχρωμα f μοριακού βάρους 34 kDa, ένα **κυτόχρωμα b563 με δυο μόρια αίμης, μια πρωτεΐνη Fe-S** μοριακού βάρους 20 kDa και μια πολυπεπτιδική αλυσίδα 17 kDa. Το κέντρο Fe-S συμμετέχει άμεσα στην αναγωγή της πλαστοκυανίνης, όπως και στην αναγωγή του κυτοχρώματος c. Αυτό που γίνεται αντιληπτό παρατηρώντας την εικόνα 5 είναι πως τα ιόντα σιδήρου μπορεί να βρίσκονται ως Fe²⁺ ή Fe³⁺. Το ιόν είναι σταθερό και στις δυο περιπτώσεις, οπότε το άτομο του σιδήρου δίνει τη δυνατότητα στην αίμη των κυτοχρωμάτων να 'κρατά' προσωρινά το ηλεκτρόνιο και τελικά να το μεταφέρει στο επόμενο μόριο της αλυσίδας μεταφοράς. Το κυτόχρωμα b έχει επομένως το ρόλο της συσκευής ανακύκλωσης η οποία επιτρέπει σε ένα φορέα δυο ηλεκτρονίων (πλαστοκινόλη) να αλληλεπιδρά με ένα φορέα ενός ηλεκτρονίου (το κέντρο Fe-S). Αυτές οι μεταφορές ηλεκτρονίων κινητοποιούν την άντληση πρωτονίων από το στρώμα προς τον εσωτερικό χώρο των θυλακοειδών (lumen).



ΕΙΚΟΝΑ 5. Σύμπλοκο κυτοχρωμάτων bf

Τα ηλεκτρόνια στη συνέχεια ρέουν από το κέντρο Fe-S του συμπλόκου κυτοχρώματος bf προς την πλαστοκυανίνη (PC), μια υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη μοριακού βάρους 11 kDa που βρίσκεται στο lumen του θυλακοειδούς. Αυτή η σφαιρική πρωτεΐνη είναι συμπλοκοποιημένη με ένα ιόν χαλκού. Λόγω των δυο αριθμών οξειδωσης του, μπορεί να δέχεται e⁻ (από το σύμπλοκο κυτοχρωμάτων) και να δίνει e⁻ (στο κέντρο αντίδρασης του PS I).

Οι μέχρι τώρα δράσεις του φωτοσυστήματος II και του συμπλόκου κυτοχρωμάτων bf είχαν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας βαθμίδωσης πρωτονίων μεταξύ των δυο πλευρών της μεμβράνης των θυλακοειδών και την αναγωγή της πλαστοκυανίνης. Το επόμενο στάδιο της φωτοσύνθεσης πραγματοποιείται μέσω του PS I, ενός διαμεμβρανικού συμπλόκου αποτελούμενου από τουλάχιστον 13 πολυπεπτιδικές αλυσίδες (συνολικό μοριακό βάρος >800kDa). Το φως διοχετεύεται μέσω μιας βοηθητικής πρωτεϊνικής κεραίας (LHC I) η οποία περιέχει 70 μόρια χλωροφυλλών a και b, και μιας κύριας κεραίας με 130 μόρια χλωροφύλλης a προς τη χρωστική P700 η οποία είναι το κέντρο αντίδρασης. Όπως αναφέρθηκε και για το PS II, η πρωταρχική αντίδραση στο κέντρο αντίδρασης είναι ο φωτοεπαγώμενος διαχωρισμός ηλεκτρικού φορτίου. Η διεγερμένη χλωροφύλλη του κέντρου αντίδρασης, P700*, δίνει ένα ηλεκτρόνιο σε μια χλωροφύλλη-δέκτη η οποία ονομάζεται A₀, ώστε να σχηματιστούν A₀⁻ και P700⁺. Η A₀⁻ είναι ένα πολύ ισχυρό αναγωγικό μέσο (E^{0'} = -1,1V), στην πραγματικότητα το πιο ισχυρό αναγωγικό βιομόριο που γνωρίζουμε. Εν τω μεταξύ, η P700⁺ έχει δεχθεί ένα ηλεκτρόνιο από την ανηγμένη PC και έχει επιστρέψει στη μορφή P700 ώστε να μπορέσει να διεγερθεί και πάλι.

Το υψηλού δυναμικού ηλεκτρόνιο της A₀⁻ μεταφέρεται στην A₁ και στη συνέχεια σε μια σειρά από κέντρα Fe-S μέσα στο PS I. Το τελικό βήμα είναι η αναγωγή της **φερρεδοξίνης** μιας υδατοδιαλυτής πρωτεΐνης μοριακού βάρους 12 kDa, η οποία περιέχει ένα κέντρο **2Fe-2S**. Αυτή η αντίδραση γίνεται στη στρωματική πλευρά της μεμβράνης των θυλακοειδών. Τα ηλεκτρόνια υψηλού δυναμικού δυο μορίων της φερρεδοξίνης μεταφέρονται στη συνέχεια στο NADP⁺ για την παραγωγή NADPH. Αυτή η αντίδραση καταλύεται από την **φερρεδοξίνο-αναγωγάση του NADP⁺**, μια φλαβοπρωτεΐνη (Fp) με μια **προσθετική ομάδα FAD**. Η μορφή **ημικινόνης της δεσμευόμενης FAD** είναι το ενδιάμεσο κατά την εισροή δυο

ηλεκτρονίων από δυο μόρια ανηγμένης φερρεδοξίνης σε ένα μόριο NADP^+ . Αυτή η αντίδραση γίνεται στη στρωματική πλευρά της μεμβράνης. Άρα η πρόσληψη ενός πρωτονίου κατά την αναγωγή του NADP^+ συνεισφέρει επιπροσθέτως στο σχηματισμό μιας βαθμίδωσης πρωτονίων μεταξύ των δυο πλευρών της μεμβράνης, με όξινη την εσωτερική πλευρά.

Με λίγα λόγια, το φως προκαλεί τη ροή ηλεκτρονίων από το H_2O προς το NADP^+ και στην πορεία οδηγεί στη δημιουργία μιας πρωτονιοκίνητης δύναμης (Εικόνα 4). Αυτή η πορεία ονομάζεται σχήμα Z της φωτοσύνθεσης επειδή το οξειδοαναγωγικό διάγραμμα από την P680 μέχρι την P700* μοιάζει με Z.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΗΣ

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην άσκηση αυτή παρουσιάζονται απλές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις οι οποίες αποτελούν μοντέλα για τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής που πραγματοποιούνται στα βιολογικά συστήματα και στις φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης ειδικότερα.

Τα συστήματα σιδηρο (II) κυανιούχου καλίου/σιδηρι(III) κυανιούχου καλίου και βενζοκινόνης/υδροκινόνης αποτελούν μοντέλα για τις αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στο κυτόχρωμα και την πλαστοκινόνη αντίστοιχα.

Ο απαιτούμενος χρόνος για την εκτέλεση του πειράματος είναι περίπου 30 λεπτά.

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Διάλυμα $K_3Fe(CN)_6$ (potassium ferricyanide), 0,1M
- Διάλυμα $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ (potassium ferrocyanide), 0,1M
- Διάλυματα βενζοκινόνης 0,1M και 0,02M (παρασκευάζονται την ίδια μέρα)
- Διάλυμα υδροκινόνης, 0,5M (παρασκευάζεται την ίδια μέρα)
- 5% NaClO (sodium hypochlorite, κοινή χλωρίνη)
- 5% διάλυμα ασκορβικού οξέος (παρασκευάζεται την ίδια μέρα, διατηρείται σε πάγο + σκοτάδι).
- 3% διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου
- 0,01M διάλυμα KI
- 0,01M διάλυμα $AgNO_3$
- 0,02% διάλυμα αμύλου
- πυκνό θειικό οξύ, 95%
- δοκιμαστικοί σωλήνες και στατώ
- πιπέτες Pasteur και πουάρ

ΠΡΟΣΟΧΗ! Η υδροκινόνη και η βενζοκινόνη είναι ουσίες εξαιρετικά επικίνδυνες. Φοράτε πάντα γυαλιά ασφαλείας, ποδιά και γάντια και χειριστείτε με πολύ προσοχή τα διαλύματά τους.

III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Αριθμήστε 3 δοκιμαστικούς σωλήνες από 1 έως 3.
- Με μια πιπέτα Pasteur, προσθέστε 15 σταγόνες διαλύματος $K_3Fe(CN)_6$ (potassium ferricyanide), 0,1M σε κάθε σωλήνα.
- Προσθέστε:
 - 4 σταγόνες διαλύματος 5% NaClO στο σωλήνα 1
 - 4 σταγόνες διαλύματος 3% υπεροξειδίου του υδρογόνου στο σωλήνα 2
 - 4 σταγόνες διαλύματος 5% ασκορβικού οξέος στο σωλήνα 3
- Επαναλάβετε την ίδια διαδικασία, βάζοντας στους δοκιμαστικούς σωλήνες 15 σταγόνες διαλύματος $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ (potassium ferrocyanide), 0,1M.
- Μην ξεχνάτε να σημειώνετε τις παρατηρήσεις σας έπειτα από κάθε προσθήκη!

Επιπλέον:

- Τοποθετήστε 15 σταγόνες διαλύματος p-βενζοκινόνης **0,1M**, σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα.
- Προσθέστε αρχικά 1 σταγόνα και στη συνέχεια περισσότερες σταγόνες διαλύματος ασκορβικού οξέος 5%. Τι παρατηρείτε έπειτα από κάθε προσθήκη;

- Τοποθετήστε 15 σταγόνες διαλύματος υδροκινόνης **0,5M**, σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα.
- Προσθέστε αρχικά 1 σταγόνα και στη συνέχεια περισσότερες σταγόνες διαλύματος ασκορβικού οξέος 5%. Τι παρατηρείτε έπειτα από κάθε προσθήκη;

- Προσθέστε 1ml διαλύματος p-βενζοκινόνης **0,02M**, σε 12ml διαλύματος KI. Τι παρατηρείτε; Στη συνέχεια, πάρτε 1ml από το διάλυμα της αντίδρασης και προσθέστε το σε 20ml διαλύματος αμύλου. Τι συμπέρασμα βγάξετε για τα προϊόντα της προηγούμενης αντίδρασης;

- Τοποθετήστε 10ml διαλύματος υδροκινόνης 0,5M, σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα. Προσθέστε αρχικά 0,5ml διαλύματος $AgNO_3$. Τι παρατηρείτε; Το αποτέλεσμα είναι αυτό που περιμένατε θεωρητικά; Εξηγήστε.

IV. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ον/μο:

A.M.

Ημέρα/Θέση:

Ημ/νία:

- Προσδιορίστε τον αριθμό οξείδωσης στο άτομο του σιδήρου στα διαλύματα $K_3Fe(CN)_6$ και $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Με βάση αυτό (και τυχόν χρωματικές αλλαγές που έχετε καταγράψει), αποφασίστε εάν οι ενώσεις $NaClO$, υπεροξείδιο του υδρογόνου και ασκορβικό οξύ δρουν ως οξειδωτικοί ή αναγωγικοί παράγοντες στις παραπάνω αντιδράσεις.

- Γράψτε τις αντιδράσεις της p-βενζοκινόνης και της υδροκινόνης με το ασκορβικό οξύ. Με βάση τις χρωματικές αλλαγές που παρατηρήσατε, σημειώστε την κατεύθυνση της ροής των ηλεκτρονίων (όπου πραγματοποιείται αντίδραση).

- Γράψτε την αντίδραση της p-βενζοκινόνης με το διάλυμα ιωδιούχου καλίου. Το χρώμα που προκύπτει μετά την αντίδρασή τους είναι αυτό που περιμένατε; Μπορείτε να δώσετε μια εξήγηση με βάση τα αποτελέσματα που παίρνετε από την αντίδραση του προϊόντος με το διάλυμα αμύλου;

- Γράψτε την αντίδραση της υδροκινόνης με το διάλυμα $AgNO_3$. Με βάση τις χρωματικές αλλαγές που παρατηρήσατε, σημειώστε την κατεύθυνση της ροής των ηλεκτρονίων στην αντίδραση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Koning, Ross E. 1994. Light Reactions. *Plant Physiology Information*
http://plantphys.info/plant_physiology/lightrxn.shtml (προσπέλαση 7-5-2017).
- D. Arnon, **Plant Physiol.** **24**, 1-15 (1949). Determination of chlorophyll content of chloroplasts.
- D. Arnon, **Trends Biochem. Sci.** **9**, 258-262 (1984). “The Discovery of Photosynthetic Phosphorylation.”
- R. Boyer, **Concepts in Biochemistry** (1999), Brooks/Cole (Pacific Grove, CA), pp. 528-549. Review of photosynthesis.
- R. Dilley, in **Methods in Enzymology**, Vol. **24B**, A. San Pietro, Editor (1972), Academic Press (New York), pp. 68-74. Transport of H⁺, K⁺, and Mg²⁺ in isolated chloroplasts.
- Govindjee and W. Coleman, **Sci. Am.** **262**(2), 50-58 (1990). How plants make oxygen
- J. Ho and E. Po, **Biochem. Educ.** **24**, 179-180 (1996). Light-induced proton transfer through chloroplast membrane.
- A. Jagendorf and E. Uribe, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **55**, 170-177 (1966). “ATP Formation Caused by Acid-Base Transition of Spinach Chloroplasts.”
- J. Neumann and A. Jagendorf, **Arch. Biochem. Biophys.** **107**, 109-119 (1964). “Light-Induced pH Changes Related to Phosphorylation by Chloroplasts.”
- W. Nitschke and A. Rutherford, **Trends Biochem. Sci.** **16**, 241-245 (1991). “Photosynthetic Reaction Centres: Variations on a Common Structural Theme.”
- A.L. Lehninger, D. L. Nelson, and M. M. Cox, **Principles of Biochemistry**, Worth, 1993.
- E. Pennisi, (1996), **Science**, 273, Chemical Shackles for Genes?
- L. Roberts, (1990), **Science**, 249, New Scissors for Cutting Chromosomes.
- J. F. Robyt and B. J. White, **Biochemical Techniques**, Brooks Cole, 1990.
- L. Stryer, **Biochemistry**, 3rd ed., Freeman, 1998.

ΠΕΙΡΑΜΑ 5: ΠΟΙΟΤΙΚΗ, ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ - Στοιχεία θεωρίας

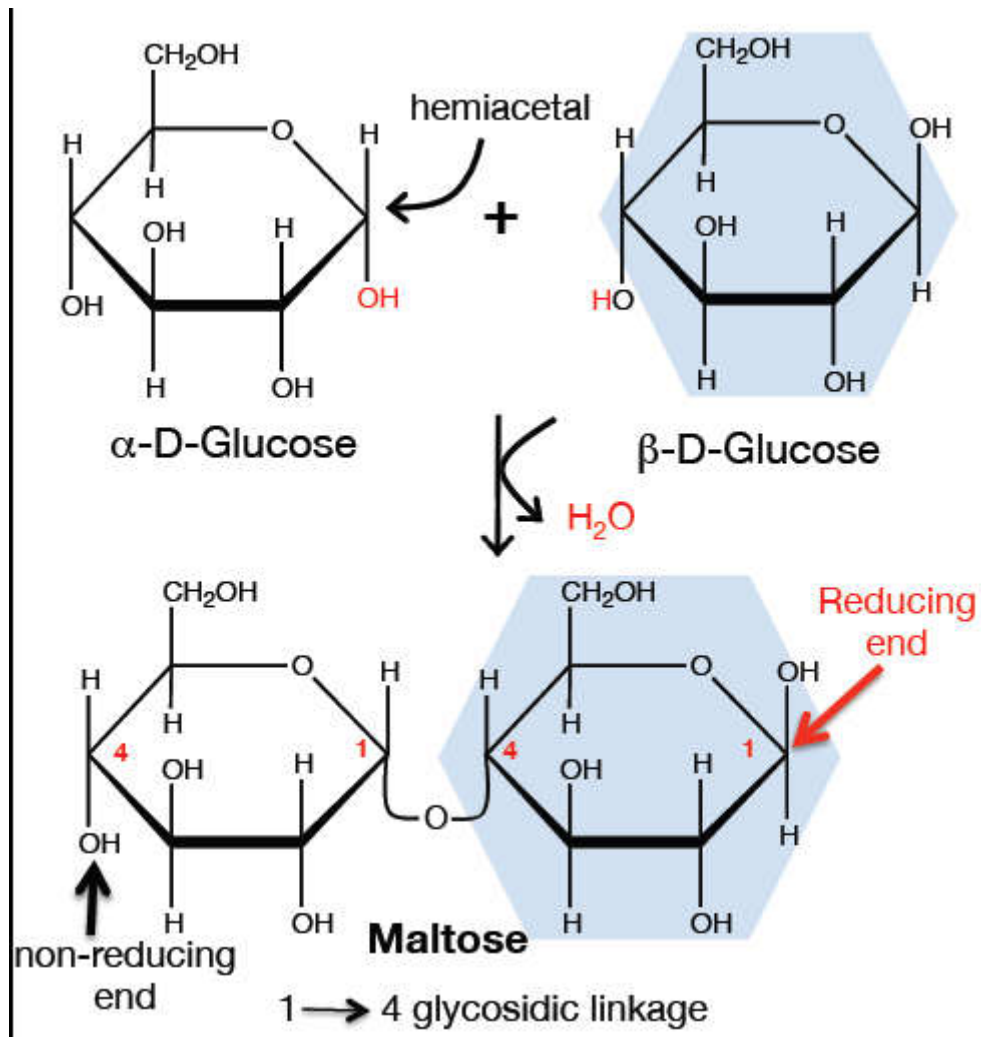
Οι υδατάνθρακες αποτελούν τη μεγαλύτερη τάξη οργανικών μορίων (πολυϋδρόξυαλδεύδες ή πολυϋδρόξυκετόνες) που βρίσκονται στη φύση. Η λέξη υδατάνθρακας περιγράφει ουσιαστικά το μοριακό τύπο των ενώσεων αυτών, $(\text{CH}_2\text{O})_n$ ή $\text{C}_n(\text{H}_2\text{O})_n$, όπου $n \geq 3$ και πρόκειται για μια 'ευέλικτη' κατηγορία μορίων. Συγκεκριμένα, όταν ηλιακή ενέργεια δεσμεύεται από τα πράσινα φυτά κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης, αποθηκεύεται σε αυτά με τη μορφή υδατανθράκων. Επιπλέον οι υδατάνθρακες (ή σάκχαρα) αποτελούν τα μεταβολικά πρόδρομα ουσιαστικά όλων των βιομορίων. Η διάσπασή τους παρέχει την ενέργεια για την επιβίωση των ζωικών οργανισμών. Εκτός αυτού, συνδέονται ομοιοπολικά με πολλά άλλα μόρια. Λιπίδια συνδεδεμένα με υδατάνθρακες ονομάζονται γλυκολιπίδια και πρωτεΐνες ομοιοπολικά συνδεδεμένες με υδατάνθρακες ονομάζονται γλυκοπρωτεΐνες. Αυτές οι δυο τάξεις βιομορίων αποτελούν συστατικά των βιολογικών μεμβρανών, του κυτταρικού τοιχώματος και των εξωκυτταρικών δομών σε φυτά, ζώα και βακτήρια. Εκτός από τον δομικό τους ρόλο, συμμετέχουν επίσης στις διαδικασίες αναγνώρισης μεταξύ κυτταρικών τύπων ή αναγνώρισης κυτταρικών δομών από άλλα μόρια.

Οι υδατάνθρακες διακρίνονται σε:

- α. Μονοσακχαρίτες (απλά σάκχαρα) όπως οι εξόζες γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη, μαννόζη και οι πεντόζες ριβόζη και δεοξυριβόζη.
- β. Ολιγοσακχαρίτες (που αποτελούνται από ένα μικρό αριθμό μονοσακχαριτικών μονάδων) όπως οι δισακχαρίτες σακχαρόζη, λακτόζη, μαλτόζη.
- γ. Πολυσακχαρίτες (αποτελούνται από περισσότερες των 10 μονοσακχαριτικές μονάδες) όπως το άμυλο, η κυτταρίνη και το γλυκογόνο.

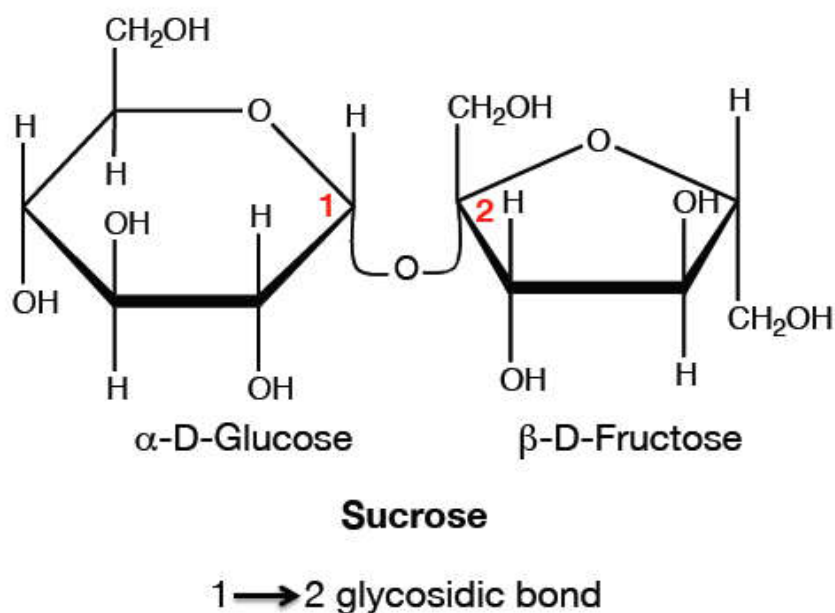
Οι δισακχαρίτες είναι οι απλούστεροι ολιγοσακχαρίτες. Αποτελούνται από δυο κατάλοιπα (μονοσακχαριτικές μονάδες) συνδεδεμένα μεταξύ τους με γλυκοζιτικό δεσμό. Οι πιο συνηθισμένοι είναι η σακχαρόζη, η γλυκόζη, η μαλτόζη και η λακτόζη που βρίσκονται στη φύση σε αφθονία. Καθεμία είναι μια μικτή ακετάλη, όπου το ένα υδροξύλιο παρέχεται ενδομοριακά και η δεύτερη υδροξυλομάδα από τον άλλο μονοσακχαρίτη (Εικόνα 1). Οι δομές αυτές (εκτός από τη σακχαρόζη) διαθέτουν ένα

μη-υποκατεστημένο ανωμερές άτομο άνθρακα, γεγονός που τις καθιστά αναγωγικά σάκχαρα (Εικόνα 1)



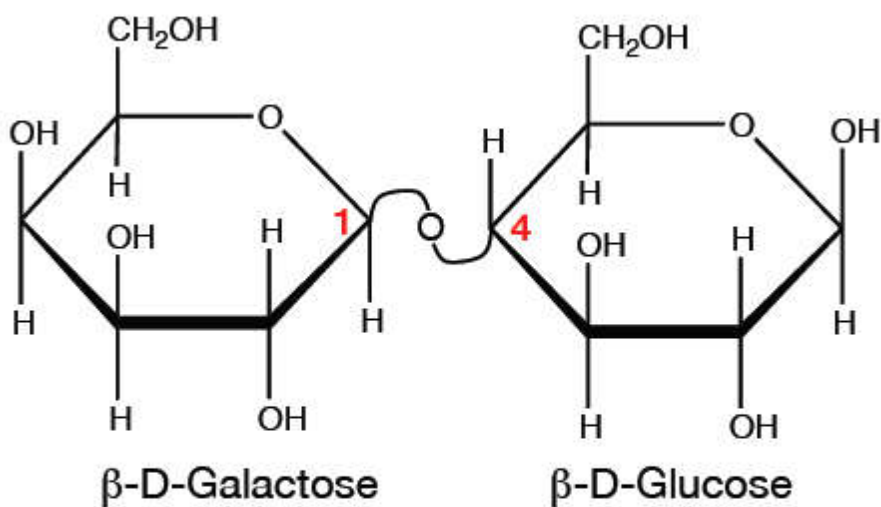
ΕΙΚΟΝΑ 1. Παράδειγμα σχηματισμού αναγωγικού δισακχαρίτη (μαλτόζη)

Ο ανωμερής άνθρακας (C_1) αποτελεί το αναγωγικό άκρο, ενώ στην απέναντι πλευρά του μορίου βρίσκεται το μη αναγωγικό άκρο (C_4). Στην περίπτωση της σακχαρόζης, και οι δυο ανωμερείς άνθρακες είναι υποκατεστημένοι, οπότε δε μπορούν να μετατραπούν σε δομή αλδεΐδης και συνεπώς δεν μπορούν να πάρουν μέρος σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Επομένως η σακχαρόζη δεν ανήκει στα αναγωγικά σάκχαρα (Εικόνα 2):



ΕΙΚΟΝΑ 2. Παράδειγμα δομής μη αναγωγικού δισακχαρίτη (Σακχαρόζη)

Η β-D-λακτόζη (O-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ-(1→4)-D-γλυκοπυρανόζη) (Εικόνα 3) είναι ο κύριος υδατάνθρακας στο γάλα και έχει μεγάλο διατροφικό ρόλο στην ανάπτυξη των θηλαστικών κατά τα πρώιμα στάδια της ζωής τους. Σχηματίζεται από D-γαλακτόζη και D-γλυκόζη μέσω β(1→4) δεσμού και είναι αναγωγικό σάκχαρο. Πρόκειται ίσως για παραξενιά της φύσης αλλά η λακτόζη δεν απορροφάται απευθείας από τον οργανισμό. Πρέπει πρώτα να διασπαστεί σε γαλακτόζη και γλυκόζη από το ένζυμο λακτάση, το οποίο βρίσκεται στο έντερο των νεαρών θηλαστικών αλλά παράγεται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις στα ενήλικα θηλαστικά. Συνήθως αυτό δεν αποτελεί πρόβλημα όσον αφορά στην κατανάλωση γάλακτος. Σε κάποιες περιπτώσεις όμως η λακτόζη δεν είναι ανεκτή από τον οργανισμό και τα συγκεκριμένα άτομα υποφέρουν από πόνο στην κοιλιακή χώρα και διάρροια όταν καταναλώνουν γάλα.



Lactose

1 → 4 glycosidic bond

ΕΙΚΟΝΑ 3. Παράδειγμα δομής, αναγωγικού δισακχαρίτη (λακτόζη)

Η σακχαρόζη (ζάχαρη) αντίθετα (Εικόνα 2) είναι ευρύτατα αποδεκτή και δεν προκαλεί συμπτώματα δυσανεξίας. Παράγεται από πολλά ανώτερα φυτά (προϊόν φωτοσύνθεσης) και αποτελείται από φρουκτόζη και γλυκόζη. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δεν είναι αναγωγικό ζάχαρο και όπως η λακτόζη, δεν απορροφάται απευθείας από τον οργανισμό αλλά αφού υποστεί υδρόλυση από το ένζυμο σακχαράση (sucrase).

Η ανίχνευση, ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των διαφόρων σακχάρων στα βιολογικά υγρά αποτελεί βασικό στοιχείο στην προσπάθεια διάγνωσης διαφόρων παθολογικών καταστάσεων. Στο αίμα το κύριο σάκχαρο είναι η γλυκόζη (Πίνακας 1), η συγκέντρωση της οποίας αυξάνεται σε ορισμένες περιπτώσεις διαταραχών του μεταβολισμού (π.χ. γαλακτοζαιμία). Η εμφάνιση σακχάρου στα ούρα είναι ενδεικτική ανωμαλίας στον οργανισμό,

π.χ. D-γλυκόζη → διαβήτης, D-γαλακτόζη → γαλακτοζαιμία,

D-φρουκτόζη → φρουκτοζουρία, L-ξυλουλόζη → πεντοζουρία κ.λ.π.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

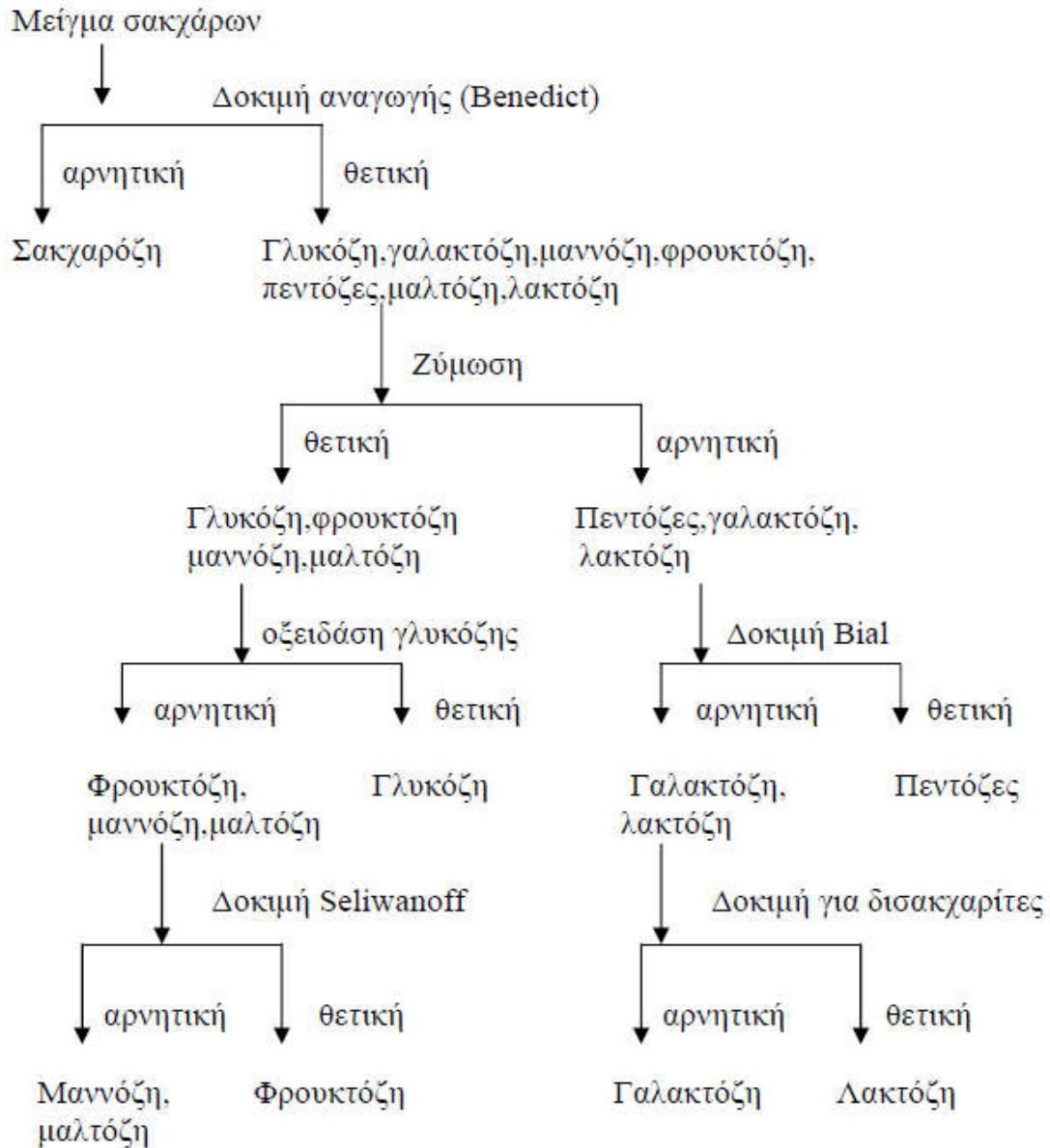
ΕΙΔΟΣ ΣΑΚΧΑΡΟΥ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΤΟ ΑΙΜΑ (mg/100ml)
Γαλακτόζη	<5
Γλυκόζη	65-95
Λακτόζη	<0,5
Πεντόζες	2-4
Φρουκτόζη	<7,5

Αν γνωρίζουμε ότι ένα διάλυμα ουσιών περιέχει υδατάνθρακες (π.χ. δίνει θετική την αντίδραση Molisch ή Anthrone) τότε κάνουμε την δοκιμή ανίχνευσης αναγωγικών σακχάρων (αντίδραση Fehling, αντίδραση **Benedict**, αντίδραση πικρικού οξέος) που βασίζεται στην ύπαρξη ενός ελεύθερου 'ανωμερούς' ατόμου άνθρακα, π.χ. ο C₁ της γλυκόζης. Εάν διαπιστώσουμε την ύπαρξη αναγωγικών σακχάρων, μπορούμε να προχωρήσουμε και στην ποσοτικοποίησή τους (**μέθοδος DNSA** ή δινιτροσαλικυλικού οξέος). Περαιτέρω διαχωρισμός των σακχάρων (Πίνακας 2) βασίζεται σε μεθόδους όπως η ζύμωση (απελευθέρωση CO₂ μετά από επώαση με κοινή ζύμη), η αντίδραση Bial (ειδική για πεντόζες), η αντίδραση ιωδίου (διαχωρισμός πολυσακχαριτών από μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες) η αντίδραση Seliwanoff (ειδική για κετοεξόζες) κ.λ.π.

Πέρα από τον μικρό αριθμό αντιδράσεων που επιτρέπουν την ταυτοποίηση συγκεκριμένων σακχάρων, ταυτοποίηση μπορεί να γίνει με βάση τις οπτικές ιδιότητες του σακχάρου (πολωσιμετρία) ή με **χρωματογραφία (χάρτου ή HPLC)**.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

Παράδειγμα μεθόδου διαχωρισμού και ανίχνευσης σακχάρων

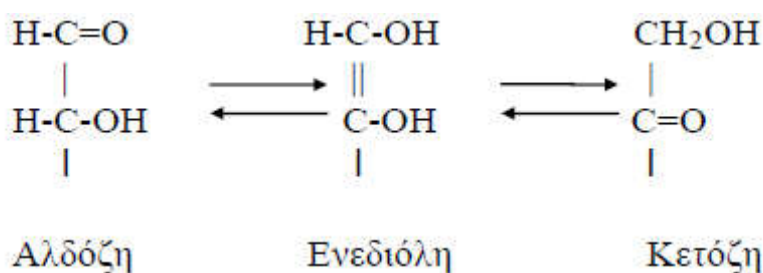


Πείραμα 5α: Ανίχνευση υδατανθράκων με δοκιμή αναγωγής

I. ΓΕΝΙΚΑ

Στόχος του πειράματος είναι η κατανόηση ενός από τους τρόπους με τους οποίους μπορούμε να διαπιστώσουμε εάν ένα δείγμα (π.χ. μια ποσότητα τροφής) περιέχει (ή όχι) σάκχαρα.

Συγκεκριμένα, αλδόζες και κετόζες, χάρη στο ελεύθερο ανωμερές άτομο C που περιέχουν, όταν θερμανθούν με αραιές βάσεις δίνουν ενεδιόλες (ταυτομέρια ενόλης-κετόνης) που αντιδρούν με ιόντα μετάλλου και τα ανάγουν.



Στο συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο Benedict, που περιέχει ιόντα Cu συμπλεγμένα σε αλκαλικό διάλυμα με κιτρικά ιόντα (εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί το αντιδραστήριο Fehling που περιέχει κιτρικά ιόντα). Όλοι οι μονοσακχαρίτες και οι ολιγοσακχαρίτες με ημιακεταλική υδροξυλομάδα (Εικόνα 1) ανάγουν τον Cu^{2+} (CuSO_4) σε Cu^{1+} (Cu_2O). Το υποξείδιο του χαλκού είναι ίζημα με χαρακτηριστικό κεραμόχροο χρώμα. Τα ούρα δίνουν θετική αντίδραση όταν η συγκέντρωση των αναγωγικών ουσιών είναι σε επίπεδο 50-80mg/100ml ούρων. Πρέπει να ληφθεί υπόψη όμως ότι εκτός από τα σάκχαρα στα βιολογικά υγρά αναγωγικές ιδιότητες έχουν και άλλες ουσίες, όπως η γλουταθειόνη, το ασκορβικό και το ουρικό οξύ κ.α.

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

-Αντιδραστήριο Benedict

100gr Na_2CO_3 (anhydrous)

173gr κιτρικό Na

17,3gr $\text{Cu(II)SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Διάλυση σε απιοντισμένο H_2O μέχρι ο όγκος του διαλύματος να είναι 1Lt.

(Το Na_2CO_3 παρέχει τις αλκαλικές συνθήκες που είναι απαραίτητες για την αντίδραση οξειδοαναγωγής ενώ το κιτρικό νάτριο δημιουργεί σύμπλοκα με τα ιόντα Cu(II) ώστε αυτά να μη μετατραπούν σε ιόντα Cu(I) κατά την διάρκεια της αποθήκευσης του διαλύματος).

-διάλυμα γλυκόζης 1% w/v

-διάλυμα φρουκτόζης 1% w/v

- διάλυμα ζάχαρης 1% w/v

-μικρή ποσότητα από τροφές (γάλα, χυμός, πατατάκια, μπισκότα κ.α.)

-δοκιμαστικοί σωλήνες

-θερμαντική πλάκα

-υδατόλουτρο

III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

-Δείγματα τροφών σε υγρή μορφή δεν χρειάζεται να υποστούν περεταίρω κατεργασία πριν τη δοκιμασία Benedict. Παρόλα αυτά, αν είναι παχύρευστα ή σε μεγάλη συγκέντρωση μπορούμε να τα αραιώσουμε με απιονισμένο νερό.

-Αν πρόκειται για στερεά δείγματα εργαζόμαστε ως εξής: Τρίβουμε στο γουδί μια μικρή ποσότητα τροφής με μια ποσότητα απιονισμένου νερού αρκετή ώστε όταν κατακαθίσει το στερεό να πάρουμε τουλάχιστον 1-1,5ml αιωρήματος το οποίο και θα χρησιμοποιήσουμε στη συνέχεια του πειράματος.

-Προσθέστε 1ml από κάθε διάλυμα 1% w/v που θα σας δοθεί σε (χωριστούς) δοκιμαστικούς σωλήνες. Ετοιμάστε αντίστοιχους σωλήνες με τα δείγματα τροφών που έχετε.

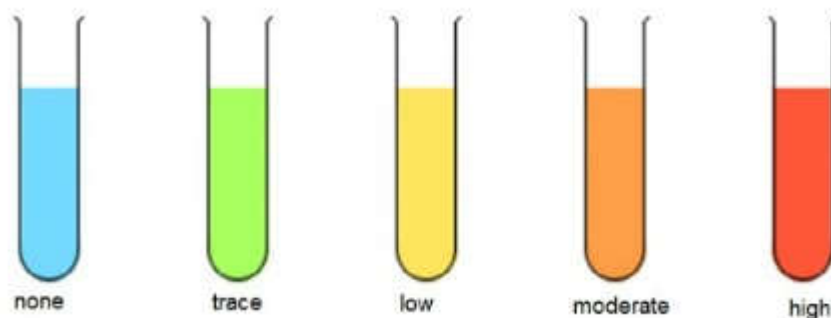
-Προσθέστε 2ml διάλυμα Benedict σε κάθε σωλήνα και ανακατέψτε το περιεχόμενο ή τοποθετήστε για λίγο τους σωλήνες στο vortex.

-**Έχετε υπόψη σας** ότι πρέπει να υπάρχει και ένα δείγμα-μάρτυρας (control) για να ελέγξετε την αξιοπιστία της μεθόδου. Πώς θα το παρασκευάσετε;

-Τοποθετήστε τους σωλήνες σε υδατόλουτρο με νερό που βράζει για 5-10 λεπτά ή μέχρι που να μην παρατηρείτε αλλαγή στα χρώματα των δειγμάτων.

-Καταγράψτε τις μεταβολές στο χρώμα των δειγμάτων (όπου αυτή πραγματοποιήθηκε).

IV. ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ-ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ



ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ	ΕΡΜΗΝΕΙΑ
Δεν υπάρχει αλλαγή στο χρώμα (μπλε)	Δεν υπάρχουν αναγωγικά σάκχαρα
Πράσινο	Ίχνη αναγωγικών σακχάρων στο δείγμα (0,1-0,5%)
Κίτρινο	Μικρή ποσότητα αναγωγικών σακχάρων (0,5-1%)
Πορτοκαλί	Μέτρια ποσότητα αναγωγικών σακχάρων (1-1,5%)
Κόκκινο-κεραμιδί	Μεγάλη ποσότητα αναγωγικών σακχάρων (2% και άνω)

V. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Όν/μο:

A.M.

Ημέρα/Θέση:

Ημ/νία:

1. Συμπληρώστε τον πίνακα με τις παρατηρήσεις σας από το πείραμα:

Δείγματα (δοκιμασία Benedict)	Παρατηρήσεις
διάλυμα γλυκόζης 1% w/v	
διάλυμα φρουκτόζης 1% w/v	
διάλυμα ζάχαρης 1% w/v	

2. Δικαιολογήστε τα αποτελέσματά σας. Γράψτε τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν για ένα σάκχαρο του οποίου το δείγμα έδωσε θετική αντίδραση.

Πείραμα 5β: Ποσοτικός προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων (κυρίως λακτόζης) στο αγελαδινό γάλα με χρήση της μεθόδου DNSA (δινιτροσαλικυλικού οξέος)

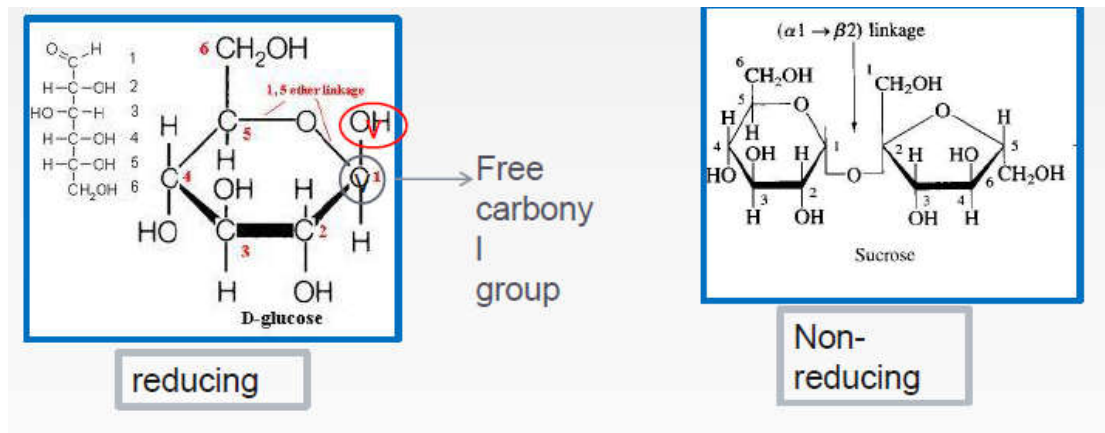
I. ΓΕΝΙΚΑ

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης σακχάρων σε δείγματα τροφών είναι ιδιαίτερα σημαντικός κυρίως στη βιομηχανία τροφίμων όπου οι έλεγχοι ποιότητας των προϊόντων είναι υπόθεση ρουτίνας. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για τον προσδιορισμό συγκέντρωσης των υδατανθράκων, όπως η μέθοδος phenol-sulfuric acid, η μέθοδος Somogyi-Nelson, η μέθοδος DNSA κ.α.

Τα κύρια συστατικά του γάλακτος είναι λίπη, πρωτεΐνες και ολιγοσακχαρίτες. Η σύσταση του γάλακτος ποικίλει από οργανισμό σε οργανισμό. Υπάρχουν διακυμάνσεις ακόμα και στο ίδιο άτομο ανάλογα με την εποχή, την ώρα συλλογής κ.λ.π. Ο κύριος υδατάνθρακας στο γάλα είναι η λακτόζη και αποτελεί το συστατικό σε μεγαλύτερη αναλογία στο γάλα (ιδιαίτερα το μητρικό) μετά το νερό. Άλλα ελεύθερα σάκχαρα (σε μικρές συγκεντρώσεις) που αποτελούν μέρος της σύστασής του είναι η γλυκόζη, η γαλακτόζη κ.α. Η λακτόζη είναι ένας δισακχαρίτης που προέρχεται από γαλακτόζη και γλυκόζη (Εικόνα 3) και πρόκειται για αναγωγικό σάκχαρο (γιατί;)

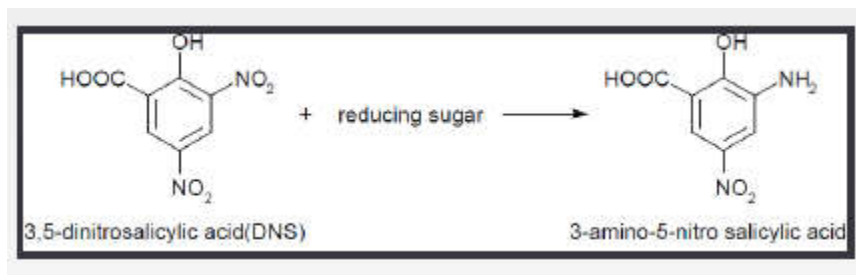
Ο προσδιορισμός της λακτόζης στα γαλακτοκομικά προϊόντα έχει ιδιαίτερη σημασία γιατί καθώς είναι ο κύριος υδατάνθρακας στο γάλα, η μέτρηση της συγκέντρωσής της είναι βασικός δείκτης του ελέγχου ποιότητας και ανίχνευσης τυχόν αλλοιώσεων στα προϊόντα αυτά. Οι μέθοδοι ποσοτικοποίησης της λακτόζης που προαναφέρθηκαν ανιχνεύουν αναγωγικά σάκχαρα γενικά, γεγονός που παρέχει ουσιαστικά μια εκτίμηση για την ποσότητα της λακτόζης στο δείγμα μιας και στο γάλα υπάρχουν και άλλα αναγωγικά σάκχαρα (αν και σε πολύ μικρότερο ποσοστό).

Στο συγκεκριμένο πείραμα θα εφαρμοστεί η μέθοδος DNSA η οποία ανιχνεύει ελεύθερες καρβονυλομάδες που βρίσκονται π.χ. σε αναγωγικά σάκχαρα (Εικόνα 4).



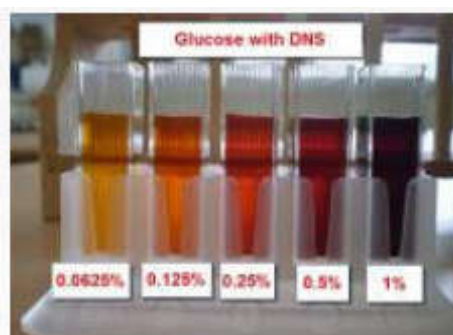
ΕΙΚΟΝΑ 4. Αναγωγικά και μη αναγωγικά 'σακχαρα

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την οξείδωση της αλδεϋδομάδας που υπάρχει π.χ. στην γλυκόζη ή της κετονομάδας στη φρουκτόζη. Ταυτόχρονα, το 3,5 δινιτροσαλικυλικό οξύ (DNSA) ανάγεται (σε αλκαλικές συνθήκες) σε 3-άμινο,5-νιτροσαλικυλικό οξύ που έχει πορτοκαλί χρώμα με $\lambda_{max}=540nm$ (Εικόνα 5):



ΕΙΚΟΝΑ 5. Αναγωγή του 3,5 δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNSA)

Προφανώς, η ένταση του χρώματος αποτελεί δείκτη της περιεκτικότητας του δείγματος σε αναγωγικά σάκχαρα (Εικόνα 6):



ΕΙΚΟΝΑ 6.

Η παραπάνω αντίδραση δείχνει ότι ένα mole σακχάρου αντιδρά με ένα mole 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος. Στην πραγματικότητα όμως μάλλον πραγματοποιούνται και επιπλέον αντιδράσεις, οπότε η στοιχειομετρία της αντίδρασης δεν είναι τόσο ξεκάθαρη. Το είδος των παράπλευρων αντιδράσεων εξαρτάται από το είδος των ουσιών που συμμετέχουν. Διαφορετικά αναγωγικά σάκχαρα για παράδειγμα, κατά κανόνα δίνουν είτε διαφορετικές αποχρώσεις ή/και εντάσεις στο πορτοκαλί. Οπότε θεωρητικά, η μέθοδος μπορεί να βαθμονομηθεί για κάθε σάκχαρο ξεχωριστά.

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

-Αντιδραστήριο DNSA:

2,5gr 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ

0,5gr phenol

0,125gr sodium sulfite

2,5gr NaOH

Προσθέτω απιονισμένο H₂O μέχρι 250ml

(Η φαινόλη-μέχρι 2gr/ml, ενισχύει την ένταση του χρώματος. Αλλάζει την κλίση στην καμπύλη αναφοράς -απορρόφηση Vs συγκέντρωση γλυκόζης- αλλά δεν επηρεάζει τη γραμμικότητα.

Το θειώδες νάτριο δεν είναι απαραίτητο για την πραγματοποίηση της αντίδρασης αλλά προστίθεται για να απομακρύνει το διαλυτοποιημένο οξυγόνο που υπάρχει στο δείγμα και επηρεάζει την διαδικασία της οξειδωσης).

-Potassium sodium tartrate **anhydrous** 40% σε απιονισμένο H₂O (Rochelle salt)

(Απαραίτητο για τη σταθεροποίηση του χρώματος στο προϊόν)

-Διάλυμα γλυκόζης 1mg/ml σε απιονισμένο H₂O (standard solution).

-Διάλυμα γλυκόζης άγνωστης συγκέντρωσης

- Αγελαδινό γάλα σε σκόνη με 0% λιπαρά

- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες 15x150mm

- Πιπέτες ακριβείας

- Συσκευή vortex

- Θερμαντική πλάκα και υδατόλουτρο στους 100° C

- Υδατόλουτρο σε θερμοκρασία δωματίου

- Φασματοφωτόμετρο ορατού

III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Παρασκευάστε τα διαλύματα των αντιδράσεων τοποθετώντας τα συστατικά στους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες (ένας για κάθε αντίδραση), σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Αριθμός δειγματος	Διάλυμα γλυκόζης (1mg/ml)-ml	Δείγμα-ml	Νερό-ml
τυφλό	-	-	1
1	0,1	-	0,9
2	0,2	-	0,8
3	0,3	-	0,7
4	0,4	-	0,6
5	0,5	-	0,5
6	0,6	-	0,4
7	0,7	-	0,3
8	0,8	-	0,2
9	0,9	-	0,1
10	1	-	-
Άγνωστο γλυκόζης	-	0,3	0,7
Γάλα 0%	-	0,1 -0,2-...	0,9-0,8-...

Όπως είναι προφανές τα 10 πρώτα δείγματα χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς. Δεν είναι απαραίτητο να κάνετε και τις 10 αντιδράσεις –και αυτές που σημειώνονται με έντονη γραφή αρκούν.

2. Προσθέστε **3ml διαλύματος DNSA** σε όλους τους σωλήνες και ολοκληρώστε την ανάμιξη στη συσκευή vortex.

3. Καλύψτε τους σωλήνες με αλουμινόχαρτο και τοποθετήστε τους σε υδατόλουτρο που βράζει για 10 περίπου λεπτά (αν δεν έχετε σημειώσει τις αντιδράσεις στους σωλήνες με χαρτοταινία+στυλό, μετά τη θέρμανση σας περιμένει μια –όχι και τόσο-ευχάριστη έκπληξη).

4. Αφήστε λίγη ώρα τους σωλήνες σε θερμοκρασία δωματίου να κρυώσουν, και στη συνέχεια προσθέστε στον καθένα από **1ml διαλύματος potassium sodium tartrate 40%** και ολοκληρώστε την ανάμιξη στη συσκευή vortex.

5. Τοποθετήστε τους σωλήνες σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας δωματίου και όταν κρυώσουν μετρήστε την απορρόφηση στα 540nm.

IV. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ον/μο:

A.M.

Ημέρα/Θέση:

Ημ/νία:

1. Στην εικόνα 5 σας δίνεται η αναγωγή του δινιτροσαλικυλικού οξέος. Συμπληρώστε και την οξειδωση της γλυκόζης ή/και της λακτόζης.

2. Συμπληρώστε τον παρακάτω πίνακα:

Αριθμός δειγματος	Απορρόφηση, A_{540}	Συγκέντρωση αναγωγικού σακχαρου (mgr/ml)
τυφλό		-
1		0,1
2		0,2
3		0,3
4		0,4
5		0,5
6		0,6
7		0,7
8		0,8
9		0,9
10		1
Άγνωστο γλυκόζης		
Δείγμα 1		
Δείγμα 2		
Δείγμα 3		

3. Σχεδιάστε την καμπύλη αναφοράς στο διάγραμμα: Απορρόφηση, A_{540} Vs συγκέντρωση αναγωγικού σακχαρου (mgr/ml). Από τις απορροφήσεις των αγνώστων δειγμάτων και λαμβάνοντας υπόψη τις αραιώσεις που έχετε κάνει, βρείτε τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε 1 ml δείγματος.

Συγκέντρωση αγνώστου δείγματος γλυκόζης (mg/ml):

Συγκέντρωση λακτόζης στο δείγμα γάλακτος (mg/ml):

Πείραμα 5γ: Ανίχνευση σακχάρων με χρωματογραφία χάρτου

I. ΥΛΙΚΑ και ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Πρότυπα διαλύματα γνωστών σακχάρων π.χ.
διάλυμα γλυκόζης 1% w/v*
- διάλυμα φρουκτόζης 1% w/v*
- διάλυμα ζάχαρης 1% w/v*
- Διάλυμα σακχάρων με άγνωστη σύσταση*
- Διαλύτης ανάπτυξης: ισοπροπανόλη:οξικό οξύ:νερό σε αναλογία 3:1:1
- Διαλύτης εμφάνισης: 2%NaIO₄ και 1%KMnO₄ – 2% Na₂CO₃ σε αναλογία 4:1
- Ποτήρι ζέσεως 1000ml
- Σύριγγες TLC
- Χαρτί Whatman N° 1
- Πιστολάκι μαλλιών
- * ως διαλύτης χρησιμοποιείται ο διαλύτης ανάπτυξης

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Τοποθετήστε σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως 1000ml όσο διαλύτη ανάπτυξης χρειάζεται ώστε το ύψος του υγρού στο δοχείο να είναι περίπου 1cm.
2. Σε ένα κομμάτι χαρτιού Whatman με διαστάσεις 15x30cm χαράζετε με μολύβι μια (πολύ) ελαφριά γραμμή που να απέχει 2,5cm περίπου από την άκρη κατά μήκος της μεγαλύτερης πλευράς.
3. Με τη βοήθεια της σύριγγας τοποθετήστε σταγόνες από κάθε δείγμα (πρώτα τα γνωστά και τελευταίο το άγνωστο) σε απόσταση περίπου 2cm το ένα από το άλλο. Προσπαθήστε ώστε το μέγεθος των κηλίδων να μην ξεπερνά τα 5mm. Στεγνώστε τις κηλίδες με πιστολάκι.
4. Δώστε στο χαρτί κυλινδρικό σχήμα (συνδέοντας τα άκρα των 15cm με μια καρφίτσα) και τοποθετήστε το στο δοχείο χρωματογραφίας. Προσέξτε ώστε η γραμμή των δειγμάτων να είναι (αρχικά) πάνω από τη στάθμη του διαλύτη χρωματογραφίας. Σκεπάστε το δοχείο και αφήστε το σε ηρεμία.
5. Η χρωματογραφία έχει ολοκληρωθεί όταν το μέτωπο του διαλύτη έχει πλησιάσει αρκετά την πάνω άκρη του χαρτιού και φαίνεται να μην προχωρά άλλο. Στο στάδιο αυτό βγάλτε το χαρτί από το δοχείο, σημειώστε το μέτωπο του διαλύτη και αφήστε το χαρτί να στεγνώσει στον απαγωγό.

6. Στη συνέχεια ψεκάστε το χαρτί με το διάλυμα εμφάνισης και σημειώστε με μολύβι τις θέσεις των κηλίδων που θα εμφανιστούν και μετρήστε με χάρακα την απόσταση μετακίνησης κάθε σακχάρου από το αρχικό σημείο εναπόθεσής του.

III. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ον/μο:

A.M.

Ημέρα/Θέση:

Ημ/νία:

1. Βρείτε το Rf των έγχρωμων κηλίδων που αντιπροσωπεύουν τους μάρτυρες (διαλύματα σακχάρων με γνωστή σύσταση) και συγκρίνετέ το με τα Rf των σακχάρων στο άγνωστο δείγμα..

2. Αναφέρετε το/τα σάκχαρο/α που υπάρχουν στο άγνωστο δείγμα σας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Carbohydrates and the Glycoconjugates of cell surfaces Garrett & Grisham Biochemistry, 3rd Edition, pg 203.

Εργαστηριακές ασκήσεις Ιατρικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής

National Institutes of Health, Testing for Lipids, Proteins and Carbohydrates- Benedict's solution

Fayetteville State University- Biological Molecules: Carbohydrates, Lipids, Proteins
Harper College- Benedict's Test

National Biochemicals Corp.- BENEDICT'S SOLUTION (MB4755)

Maness N. **Methods Mol. Biol.** **2010**, 639:341-70, *Extraction and analysis of soluble carbohydrates*, doi: 10.1007/978-1-60761-702-0_22

Alexander V. Gusakov, Elena G. Kondratyeva, and Arkady P. Sinitsyn, **Int J Anal Chem.** **2011** Article ID 283658, Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities

Meurant G. Handbook of Milk Composition. Academic Press, 1995.

Leo M.L. Nollet, Toldra F. **Handbook of Dairy Foods Analysis**. CRC Press, 2009

Allan C. Somersall. **The healing Power of 8 Sugars: An Amazing Breakthrough in Nutrition, Sciences and Medicine**. Natural Wellness Group, 2005

Biochemistry of Nutrition 445-practical note King Saud University–College of Science – Biochemistry Department

Benedict's test (Προσπέλαση 20/11/2017):

<https://www.youtube.com/watch?v=sLP8dcnWnJg>

<https://www.youtube.com/watch?v=TDFbtEwbmz0>

<https://www.slideshare.net/abiramprince/carbohydrates-13084756>

<http://faculty.mansfield.edu/bganong/home.html>

Πείραμα 6: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ - Στοιχεία θεωρίας

I. ΓΕΝΙΚΑ

Τα ένζυμα είναι πολύτιμα και πολύμορφα εμπορικά αντιδραστήρια για τους ακόλουθους λόγους:

- I. Παρουσιάζουν υψηλή καταλυτική δράση.
- II. Καταλύουν ένα μεγάλο φάσμα αντιδράσεων.
- III. Παρουσιάζουν στερεοειδικότητα.
- IV. Λειτουργούν κάτω από ήπιες συνθήκες.
- V. Παράλληλες αντιδράσεις και παραπροϊόντα είναι σχεδόν ανύπαρκτα.

Εκτός από τα παραπάνω πλεονεκτήματα που έχουν τα ένζυμα ως καταλύτες, παρουσιάζουν και μειονεκτήματα:

- I. Υπάρχουν συνήθως σε μικρές ποσότητες.
- II. Είναι ευαίσθητα και μη σταθερά μόρια.
- III. Η τιμή τους στο εμπόριο είναι πολύ υψηλή.

II. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΕΝΖΥΜΑ

Είναι προφανές πως η εμπορική χρήση των ενζύμων είναι πρακτική μόνο εάν μπορούν να βρεθούν μέθοδοι οι οποίες όχι μόνο να αυξάνουν τη σταθερότητά τους αλλά και να μπορούν τα ένζυμα μετά το τέλος της επιθυμητής διαδικασίας να ανακτηθούν και να ξαναχρησιμοποιηθούν. Δηλαδή τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται σε εμπορικές διεργασίες πρέπει να μπορούν να ανακυκλωθούν. Μια από τις καλύτερες μεθόδους για τη διασφάλιση της επανάκτησης του ενζύμου σε ενεργή μορφή, μετά το τέλος ενός κύκλου αντίδρασης, είναι η ακινητοποίησή του σε ένα σταθερό μέσο. Ως ακινητοποίηση του καταλύτη (ενζύμου) ορίζεται η διαδικασία που μειώνει τη μετακίνηση και την ελεύθερη διάχυσή του και συνήθως περιλαμβάνει την πρόσδεση του ενζύμου επάνω σε ένα αδρανές, μη υδατοδιαλυτό υλικό ή την παγίδευσή του μέσα σε μια μη υδατοδιαλυτή, μήτρα ή μικροσφαιρίδιο.

Στην περίπτωση αυτή, η επανάκτηση και επαναχρησιμοποίηση του ενζύμου συνοδεύεται από τα ακόλουθα πλεονεκτήματα:

(α) Υπάρχει σε μη διαλυτή μορφή οπότε μπορεί να αποχωριστεί εύκολα από την αντίδραση χωρίς να μολυνθούν τα προϊόντα.

(β) Ένα ακινητοποιημένο ένζυμο είναι συνήθως πιο σταθερό στην αύξηση της θερμοκρασίας, στην αλλαγή του pH, στους οργανικούς διαλύτες και άλλες δυσμενείς συνθήκες αντίδρασης ως σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο.

(γ) Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνεχή μορφή, π.χ. ως ένας βιοαντιδραστήρας στήλης και

(δ) Το τέλος της αντίδρασης μπορεί να διαπιστωθεί πολύ εύκολα κατόπιν απομάκρυνσης του ενζύμου από το διάλυμα.

Τα ακινητοποιημένα ένζυμα διαδραματίζουν επίσης σπουδαίο ρόλο στη βασική βιοχημική έρευνα, στην αναλυτική χημεία και στη βιοτεχνολογία. Η χρήση ακινητοποιημένων ενζύμων στη βιοτεχνολογία εξαπλώνεται δυναμικά και μάλιστα σε αρκετά πεδία όπως η χημική βιομηχανία, η φαρμακοβιομηχανία, η χημεία τροφίμων, η ιατρική, η διαχείριση αποβλήτων, η κλινική χημεία, και η γεωργία. Ποιο συγκεκριμένες εφαρμογές αποτελούν η παρασκευή κρασιών και τυριών, η παραγωγή αλκοόλης για καύσιμο, η επεξεργασία των υγρών αποβλήτων, η μέτρηση της γλυκόζης και άλλων συστατικών στα βιολογικά υγρά και η αντικατάσταση ενζύμων σε άτομα με γενετικές δυσλειτουργίες.

Ταυτόχρονα δεν πρέπει να παραβλέπεται το γεγονός ότι πολλά ένζυμα στο φυσικό τους περιβάλλον δεν είναι ελεύθερα αλλά είναι ακινητοποιημένα στα κύτταρα, τους ιστούς και τις μεμβράνες. Ακόμα κι αν πρόκειται για κυτταροπλασματικά ένζυμα, αρκετά από αυτά είναι προσδεμένα σε άκαμπτες μήτρες ζελατινοειδούς μορφής ή στον κυτταροσκελετό. Συνεπώς η μελέτη ακινητοποιημένων ενζύμων μας προσφέρει επιπλέον πληροφορίες για τον τρόπο λειτουργίας των ενζύμων στους ζωντανούς οργανισμούς.

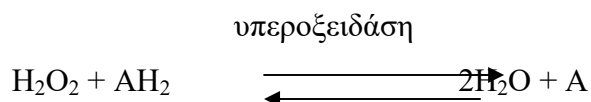
III. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΕΝΖΥΜΩΝ

Για την ακινητοποίηση των ενζύμων έχουν αναπτυχθεί τέσσερις μέθοδοι:

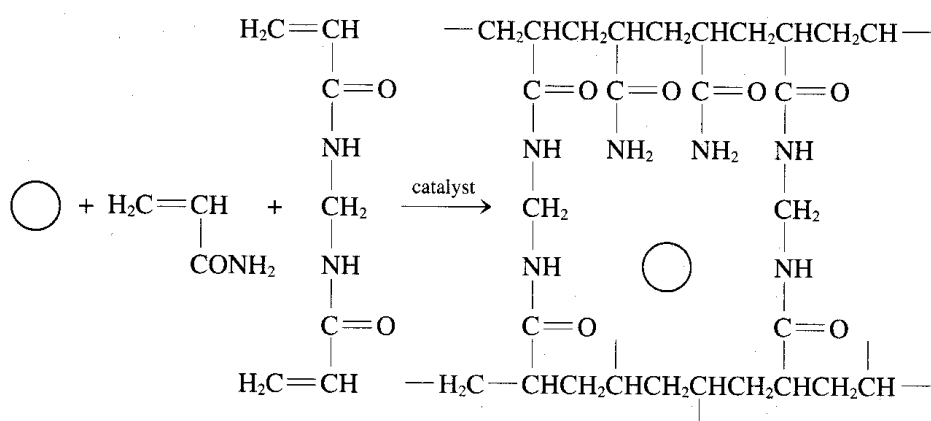
- (α) Φυσική προσρόφηση επάνω σε αδρανή, μη διαλυτά στερεά υλικά, όπως τα πολυμερή.
- (β) Χημική ομοιοπολική σύνδεση σε αδιάλυτο πολυμερικό υλικό.
- (γ) Παγίδευση σε μεμβρανικές μικροσφαίρες όπως τα λιποσώματα και
- (δ) Παγίδευση μέσα σε μια ζελατινοειδή μήτρα.

Ποια μέθοδος θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το ένζυμο που χρησιμοποιείται, η διαδικασία που θα ακολουθηθεί και οι συνθήκες

αντίδρασης. Στο πείραμα αυτό η υπεροξειδάση από horseradish (δότης H₂O₂, οξειδοαναγωγάση) θα εγκλεισθεί μέσα σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Αυτή η μέθοδος εγκλεισμού επιλέχθηκε επειδή είναι γρήγορη, σχετικά οικονομική και επιτρέπει τη μελέτη των κινητικών χαρακτηριστικών του ακινητοποιημένου ενζύμου. Η υπεροξειδάση καταλύει την αναγωγική διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) από έναν δότη ηλεκτρονίων (AH₂):



Η αναγωγική διάσπαση του H₂O₂ με δότη ηλεκτρονίων το AH₂ από ακινητοποιημένη υπεροξειδάση έχει μεγάλο εμπορικό ενδιαφέρον. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μήτρα για την παγίδευση των ενζύμων είναι το πολυακρυλαμίδιο. Όταν το ακρυλαμίδιο και το μεθυλενοδιακρυλαμίδιο (αντιδραστήριο για τις διασυνδέσεις) πολυμεριστούν, σχηματίζεται ένα πολυμερές με διάφορες διασυνδέσεις (βλ. Εργαστήρια Βιοχημείας, πείραμα 1^ο, μέρος 4^ο). Η αναλογία ακρυλαμιδίου και μεθυλενοδιακρυλαμιδίου είναι αυτή που καθορίζει τον αριθμό των διασυνδέσεων δίνοντας τη δυνατότητα σε μεγάλα ενζυμικά μόρια να εγκλεισθούν μέσα στο πολυμερές. Από την άλλη πλευρά μικρά μόρια (υπόστρωμα και προϊόντα) μπορούν να διαχέονται εύκολα μέσα σ' αυτό. Ένα άλλο προτέρημα του πολυακρυλαμιδίου είναι ότι δεν έχει φορτίο με αποτέλεσμα φορτισμένα αντιδραστήρια και προϊόντα να μην κατακρατούνται μέσα στο πολυμερές (εικόνα 1). Για τον εγκλεισμό του ενζύμου αναμειγνύονται το διάλυμα του ενζύμου με μονομερές ακρυλαμίδιο, μεθυλενοδιακρυλαμίδιο και έναν καταλύτη για να αρχίσει ο πολυμερισμός. Σε λίγα λεπτά, μια μάζα πηκτής έχει δημιουργηθεί. Το πλύσιμό της είναι απαραίτητο για την απομάκρυνση του μη παγιδευμένου ενζύμου. Η πηκτή περιέχει το εγκλεισμένο

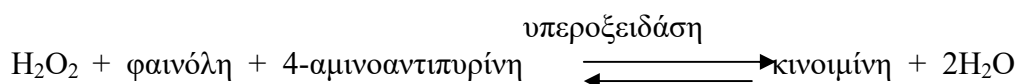


ένζυμο και είναι έτοιμη για περαιτέρω χρήση.

ΕΙΚΟΝΑ 1. Σχηματική αναπαράσταση της παγίδευσης ενός μορίου ενζύμου (O) σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου.

IV: ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ

Πριν το ακινητοποιημένο ένζυμο χρησιμοποιηθεί για οποιαδήποτε βιομηχανική διαδικασία είναι απαραίτητος ο χαρακτηρισμός των καταλυτικών και κινητικών ιδιοτήτων του. Για τον λόγο αυτό είναι αναγκαία η ανάπτυξη μιας ποσοτικής μεθόδου για τη μελέτη της ενεργότητας, των κινητικών παραμέτρων και της σταθερότητας του ενζύμου. Σε μια συζευγμένη αντίδραση το H₂O₂ αντιδρά γρήγορα παρουσία υπεροξειδάσης με φαινόλη και 4-αμινοαντιπυρίνη (δότης ηλεκτρονίων) δημιουργώντας κινιοΐμίνη (μια χρωστική ουσία με μέγιστο απορρόφησης στα 510nm).



Το ποσό της υπεροξειδάσης επηρεάζει το ποσό του προϊόντος που δημιουργείται. Πράγματι, υπάρχει μια άμεση γραμμική σχέση μεταξύ της ποσότητας της υπεροξειδάσης στην πηκτή ή στο διάλυμα με την ένταση του δημιουργούμενου χρώματος. Η ένταση του χρώματος (απορρόφηση) μπορεί να μετρηθεί σε ένα φασματοφωτόμετρο. Παράλληλα, η μεθοδολογία αυτή επιτρέπει τη μέτρηση της ταχύτητας της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο, κάτι που επιτρέπει τον υπολογισμό σπουδαίων κινητικών συντελεστών όπως η ενζυμική ενεργότητα, η σταθερά Michaelis (K_m) και η μέγιστη ταχύτητα (V_{max}). Ένζυμα που έχουν προσδεθεί επάνω σε μήτρα δε συμπεριφέρονται κινητικά όπως στην ελεύθερη μορφή τους στο διάλυμα, για τους εξής λόγους:

- (α) Η πρόσδεση του ενζύμου μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσής του.
- (β) Το χημικό περιβάλλον γύρω από το ένζυμο πιθανώς να είναι διαφορετικό στην προσδεμένη μορφή από ότι στην ελεύθερη.
- (γ) Η ταχύτητα της αντίδρασης πιθανώς να επηρεάζεται πάρα πολύ από τη δυνατότητα διάχυσης των μορίων του υποστρώματος μέσα στην πηκτή.

Η σταθερότητα ενός ενζύμου αλλάζει πολλές φορές με την πρόσδεσή του στη μήτρα. Σε ορισμένες περιπτώσεις αυξάνει λόγω επίδρασης του περιβάλλοντος υλικού της μήτρας ή μειώνεται λόγω του αποδιατακτικού χαρακτήρα του μικροπεριβάλλοντος στο εσωτερικό της μήτρας. Είναι πολύ δύσκολο να ξέρει κανείς αν μία πρωτεΐνη θα σταθεροποιηθεί ή θα αποδιαταχθεί μετά την πρόσδεσή της στη μήτρα και γι' αυτόν τον λόγο πρέπει να βρεθούν οι ιδανικές συνθήκες.

Πείραμα 6: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

I. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Σε αυτό το πείραμα θα μετρήσουμε και θα συγκρίνουμε τη θερμική σταθερότητα του ελεύθερου και του προσδεμένου ενζύμου. Συγκεκριμένα, η υπεροξειδάση θα παγιδευτεί σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και θα μελετηθεί η ενεργότητα και η θερμική σταθερότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου. Για την παρασκευή του ακινητοποιημένου ενζύμου απαιτούνται περίπου 45 λεπτά, για τη μέτρηση της ενεργότητας της ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης απαιτείται περίπου μία ώρα ενώ για τη μελέτη της θερμικής σταθερότητας απαιτείται επίσης μία ώρα.

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

-Ρυθμιστικό διά/μα φωσφορικού καλίου 0,2 M , pH = 7,0

-Πλαστικά δοχεία με καπάκι, όγκου 20ml

-Αντιδραστήρια για την προετοιμασία του gel:

A. 30% ακρυλαμίδιο και 0,8% bis-ακρυλαμίδιο σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου 0,2 M, pH = 7,0

B. 10% υπερθειικό αμμώνιο σε ρυθμιστικό διά/μα φωσφορικού καλίου 0,2 M , pH = 7,0 **(παρασκευάζεται λίγο πριν χρησιμοποιηθεί)**

C. N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)

-Αντλία νερού

-Δια/μα υπεροξειδάσης 0,1mg/ml σε H₂O

-Φωτόμετρο και κυψελίδες

-Φυγόκεντρος

-Φαινολικό διάλυμα 4-αμινοαντιπυριδίνης : Παρασκευάζεται διαλύοντας 810mg φαινόλης σε 40ml H₂O και προστίθενται 25mg 4-αμινοαντιπυριδίνης. Προστίθεται H₂O μέχρι τελικό όγκο 50ml.

-Δια/μα H₂O₂ 0,0017 M : Παρασκευάζεται με ανάμειξη 1ml από διάλυμα 30% H₂O₂ με 99ml H₂O. Πραγματοποιείται αραίωση 1ml του διαλύματος με 49ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου 0,2M , pH = 7,0 **(παρασκευάζεται λίγο πριν χρησιμοποιηθεί)**.

-Σύριγγα 5ml με 0,8 μm φίλτρο (χρησιμοποιήστε χάρτινο φίλτρο που προσαρμόζεται στην συναρμολογούμενη συσκευή).

ΠΡΟΣΟΧΗ : Η φαινόλη είναι δηλητήριο. Δεν πρέπει να εισπνέεται, να πίνεται ή να απορροφάται από το δέρμα. Διαλύματα που περιέχουν φαινόλη πρέπει είτε να βρίσκονται μέσα στην απαγωγό εστία, είτε εάν πρέπει να μεταφερθούν εκτός, να είναι σε δοχεία που κλείνουν ερμητικά.

Το ακρυλαμίδιο στη μη πολυμερισμένη μορφή, ερεθίζει το δέρμα και είναι ενδεχομένως μια νευροτοξίνη. Απαιτείται η χρήση γαντιών όταν ζυγίζεται το στερεό ακρυλαμίδιο. Η παρασκευή όλων των διαλυμάτων ακρυλαμιδίου πρέπει να πραγματοποιείται στην απαγωγό εστία.

III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Παρασκευή ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης

-Σε ένα φιαλίδιο των 20 ml αναμιγνύονται τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

4,25 ml ρυθμιστικό διά/μα φωσφορικού καλίου 0.2 M , pH = 7,0

1,8 ml από το stock διάλυμα ακρυλαμιδίου (διάλυμα A)

80 μl από το διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (διάλυμα B). Ανακατέψτε και προσθέστε

1ml από το διάλυμα της υπεροξειδάσης (0,1mg/ ml).

10 μl TEMED.

-Πραγματοποιείται ελαφρά ανάδευση σε Vortex. Το διάλυμα θολώνει μέσα σε λίγα λεπτά ενώ ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε 20'-30'.

-Με μία σπάτουλα, η πηκτή μεταφέρεται σε ένα σύστημα φιλτραρίσματος υπό κενό για να απομακρυνθεί ο διαλύτης.

Η πηκτή μεταφέρεται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 10ml H₂O για να πλυθεί. Η πηκτή σπάζεται με την βοήθεια πιπέτας Pasteur.

Το μείγμα της πηκτής φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε 160g και στη συνέχεια για 5 λεπτά σε 220g (έπειτα από κάθε φυγοκέντριση το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθενται άλλα 10ml H₂O στην πηκτή).

- Στη συνέχεια, η πηκτή στεγνώνεται στο σύστημα φιλτραρίσματος για λίγα λεπτά (1 λεπτό αρκεί) και ζυγίζεται. Η απόδοση πρέπει να είναι 4-5 gr (ή και παραπάνω) ημιστεγνής πηκτής.

B. Μέτρηση της ενεργότητας της ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης

Οι μετρήσεις για την ενεργότητα της υπεροξειδάσης γίνονται ανά 3 λεπτά.

- Τρεις σωλήνες με βιδωτό πώμα (τύπου FALCON), όγκου 50ml αριθμούνται από το 1-3.

-Ζυγίζονται 0,05gr της πηκτής που περιέχει την υπεροξειδάση και τοποθετούνται στον σωλήνα 1.

-Στη συνέχεια προστίθενται στο σωλήνα 2,5ml φαινολικού διαλύματος 4-αμινοαντιπυρίνης και αναδεύονται καλά.

-Επιπλέον προστίθενται 2,5ml διαλύματος H_2O_2 υπό γρήγορη ανάδευση και σημειώνεται ο χρόνος. Το διάλυμα αναδεύεται συνεχώς για 3 λεπτά και ακολούθως τοποθετείται σε μια σύριγγα με το σύστημα φιλτραρίσματος. Χρησιμοποιώντας το έμβολο το διάλυμα φιλτράρεται και τοποθετείται σε μια γυάλινη κυψελίδα. Μετράται η απορρόφηση στα 510nm και σημειώνεται.

-Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τους σωλήνες 2,3 βάζοντας 0,1gr πηκτής και για το σωλήνα 2 και 0,2gr πηκτής για το σωλήνα 3.

(Εννοείται πως πριν από κάθε μέτρηση, έχετε μηδενίσει το φασματοφωτόμετρο με τυφλό δείγμα. Πώς το παρασκευάζετε);

Γ. Θερμική σταθερότητα της ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης

Με αυτό το πείραμα θα μελετηθεί η σταθερότητα της ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης σε σχέση με την ελεύθερη, με αύξηση της θερμοκρασίας.

Μέτρηση ελεύθερου ενζύμου

-Αραιώνεται 1 ml διαλύματος υπεροξειδάσης με 299ml H_2O (η αραιώση αυτή προσαρμόζεται κάθε φορά ανάλογα με την ενεργότητα του ενζύμου που χρησιμοποιείται κάθε φορά).

-Τοποθετείται από 1ml διαλύματος (αραιωμένου) ενζύμου σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες. Ο ένας τοποθετείται για 4 λεπτά σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 60 °C, ενώ ο άλλος αφήνεται για το ίδιο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου*.

-Στη συνέχεια ο πρώτος σωλήνας ψύχεται έτσι, ώστε να αποκτήσει τη θερμοκρασία του δευτέρου (θερμοκρασία δωματίου).

-Προστίθενται, σε κάθε σωλήνα, από 2ml φαινολικού διαλύματος 4-αμινοαντιπυρίνης και 2ml διαλύματος H_2O_2 και αναδεύονται.

-Κατόπιν αφήνονται για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μετράται η απορρόφηση στα 510nm. Οι τιμές για κάθε σωλήνα σημειώνονται.

*Είναι προτιμότερο, να μετρήσετε το δείγμα αυτό αμέσως μετά την παρασκευή του.

Ακίνητοποιημένη υπεροξειδάση

-Ζυγίζονται 0,1gr πηκτής που περιέχει υπεροξειδάση και τοποθετούνται σε δύο σωλήνες που περιέχουν 0,5ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου. Ο ένας τοποθετείται για 4 λεπτά σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 60 °C, ενώ ο άλλος αφήνεται για τον ίδιο χρόνο σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια ο πρώτος σωλήνας ψύχεται έτσι, ώστε να αποκτήσει την θερμοκρασία του δευτέρου (θερμοκρασία δωματίου).

-Προστίθενται, σε κάθε σωλήνα, από 2,25ml φαινολικού διαλύματος 4-αμινοαντιπυρίνης και 2,25ml διαλύματος H₂O₂ και αναδεύονται για 3 λεπτά.

-Απομακρύνεται η πηκτή με τη βοήθεια μιας σύριγγας και ενός φίλτρου και μετράται η απορρόφηση στα 510nm. Οι τιμές για κάθε σωλήνα σημειώνονται.

IV. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ον/μο:

A.M.

Θέση:

Ημ/νία:

A. Παρασκευή ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης

Περιγράψτε εν συντομία τη διαδικασία παρασκευής της ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης. Πόσα γραμμάρια ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης παρασκευάσατε;

B. Μέτρηση της ενεργότητας της ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης

Η ενεργότητα της ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης μπορεί να υπολογιστεί από τη μεταβολή στην απορρόφηση για κάθε μίγμα αντίδρασης. Η μεταβολή στην απορρόφηση υπολογίζεται ως εξής : $\Delta A = A_{3\text{min}} - A_{0\text{min}}$ (τυφλό)

Όπου ΔA = είναι η ολική αλλαγή στην απορρόφηση

$A_{3\text{min}}$ = η απορρόφηση στα 510nm των δοκιμαστικών 1, 2 και 3 στα 3 min

$A_{0\text{min}} = 0$ (τυφλό)

Υπολογίστε τον λόγο $\Delta A/\text{min}$ για κάθε μία περίπτωση (0,05g, 0,1g και 0,2g της πηκτής).

Συγκεντρώστε τα δεδομένα και τα αποτελέσματά σας στον παρακάτω πίνακα:

# αντίδρασης	1	2	3
gr πηκτής			
φαινολικό διάλυμα 4-αμινοαντιπυρίνης			
H ₂ O ₂			
A _{0min}			
A _{3min}			
ΔA			
$\Delta A/\text{min}$			

Κάντε το γράφημα $\Delta A/\text{min}$ (y άξονας) προς mg της πηκτής (x άξονας). Περιγράψτε και εξηγήστε το σχήμα του γραφήματος.

Χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση υπολογίστε τις μονάδες ενεργότητας/mg της πηκτής:

$\Delta A/\text{min}$

$$\text{Μονάδες ενεργότητας} = \frac{\text{---}}{6,58 \times \text{mg της πηκτής}}$$

Επαναλάβετε τον υπολογισμό και για τις τρεις ποσότητες πηκτής (0,05, 0,1 και 0,2g). Συγκρίνετε τα αποτελέσματα.

Γ. Θερμική σταθερότητα της ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης

Καθορίστε την ταχύτητα αντίδρασης ($\Delta A/\text{min}$) για κάθε μία από τις τέσσερις περιπτώσεις. Υποθέστε ότι $A_{0\text{min}} = 0$ για κάθε περίπτωση.

ΔA_1 = μεταβολή της απορρόφησης για την ελεύθερη υπεροξειδάση σε θερμοκρασία δωματίου

ΔA_2 = μεταβολή της απορρόφησης για την ελεύθερη υπεροξειδάση στους 60 °C

ΔA_3 = μεταβολή της απορρόφησης για την ακινητοποιημένη υπεροξειδάση σε θερμοκρασία δωματίου

ΔA_4 = μεταβολή της απορρόφησης για την ακινητοποιημένη υπεροξειδάση στους 60 °C

Υπολογίστε την % εναπομείνουσα ενεργότητα μετά τη θέρμανση για την ελεύθερη και την ακινητοποιημένη υπεροξειδάση :

$$\% \text{ εναπομείνουσα ενεργότητα}_{\text{ελεύθερου}} = \frac{\Delta A_2}{\Delta A_1} \times 100$$

$$\% \text{ εναπομείνουσα ενεργότητα}_{\text{ακιν/μένου}} = \frac{\Delta A_2}{\Delta A_1} \times 100$$

Συγκρίνετε τα αποτελέσματα. Το ελεύθερο ή το ακινητοποιημένο ένζυμο είναι πιο σταθερό στη θέρμανση;

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

M. Allison and C. Bering, **J. Chem. Educ.** **75**, 1278-1280 (1998). Immobilization of lactase.

G. Bickerstaff, Editor, **Immobilization of Enzymes and Cells** (1997), Humana (Totowa, NJ). A complete book on enzyme immobilization.

R. Boyer and J. McArthur, **Biotech. Educ.** **2**, 17-20 (1991). "Activity and Thermal Stability of an Immobilized enzyme".

M. Busto, **Biochem. Educ.** **26**, 304-308 (1998). Immobilization of β -glucosidase.

K. Mosbach, Editor, **Methods in Enzymology**, Vol. 137 (1998), Academic Press (San Diego). An entire volume on immobilized enzymes and cells.

C. Worthington, Editor, **Worthington enzyme manual** (1998), Worthington Biochemical Corporation (Freehold, NJ 07728), pp. 254-260. A book that provides data on many enzymes including peroxidase.