

# ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ II

Φροντιστήριο

7/11/2011

## ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

M. Μαυρή

# Πρωτεΐνες

- Ευθύγραμμο πολυμερές που αποτελείται από συνδυασμό 20 αμινοξέων.

Ρόλος  
πρωτεϊνών:

1. Ενζυμική κατάλυση-Ρύθμιση μεταβολισμού
2. Μεταφορά και αποθήκευση
3. Κίνηση
4. Μηχανική στήριξη
5. Ανοσολογική προφύλαξη
6. Δημιουργία και μεταφορά νευρικών ώσεων
7. Ρύθμιση ομοιόστασης, ανάπτυξης και διαφοροποίησης
8. Μεταγωγή σήματος

# Τα 4 επίπεδα αρχιτεκτονικής των πρωτεϊνών

Πρωτοταγής δομή:

Η αλληλουχία των αμινοξέων που συνδέονται με πεπτιδικούς δεσμούς για να δημιουργήσουν την πρωτεϊνική αλυσίδα.

Δευτεροταγής δομή:

Κανονικές δομές που απαντώνται συχνά στις πρωτεΐνες και οφείλονται σε δεσμούς υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ του οξυγόνου ενός καρβοξυλίου και του υδρογόνου μίας αμινομάδας.

Τριτοταγής δομή:

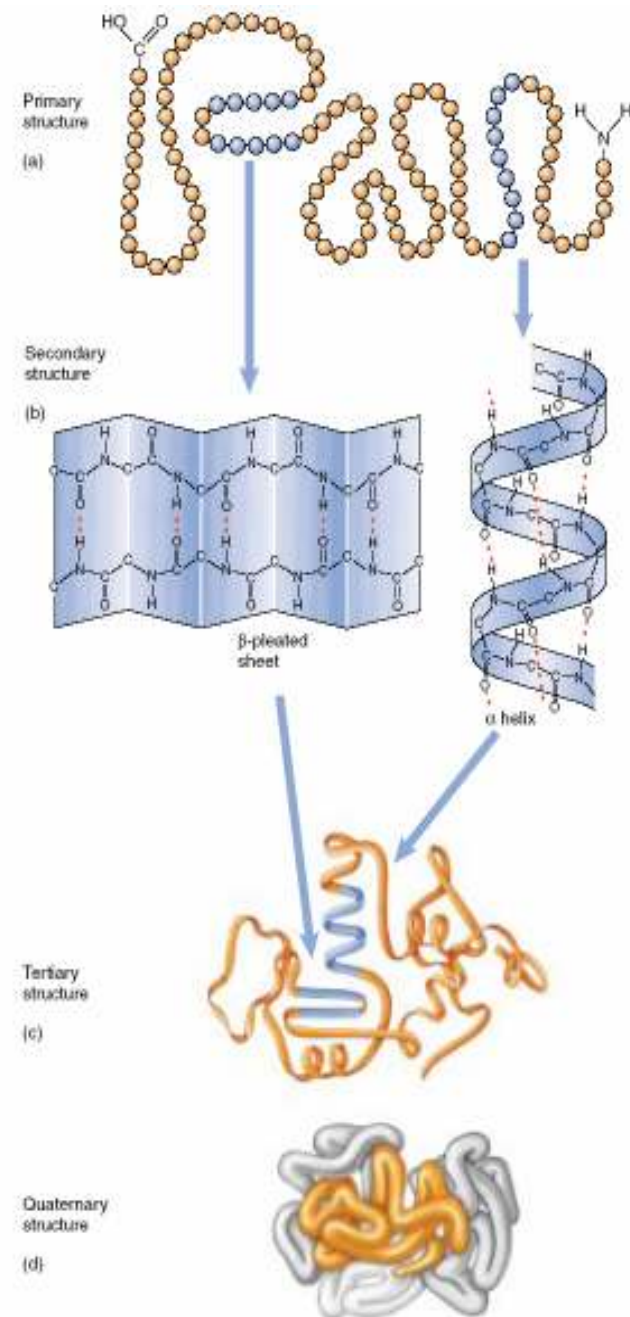
Είναι η τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης. Οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων.

- ❖ Δισουλφιδικοί δεσμοί
- ❖ Δεσμοί υδρογόνου
- ❖ Υδρόφιλες και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις
- ❖ Ιοντικές έλξεις και απώσεις
- ❖ Κατάλοιπα προλίνης και υδροξυπρολίνης

Τεταρτοταγής δομή:

Η σχέση στο χώρο των διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων ή υπομονάδων μίας πρωτεΐνης. Οφείλονται σε μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις.

# Τα 4 επίπεδα αρχιτεκτονικής των πρωτεϊνών



# Μελέτη πρωτεϊνών

- Προσδιορισμός αλληλουχίας των αμινοξέων (αποικοδόμηση κατά Edman, NMR)
- Τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA
- Μονοκλωνικά αντισώματα
- Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ – ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής σε ατομικό επίπεδο
- Πρωτεομική

## Απομόνωση πρωτεϊνών

### Δυσκολίες

- Υπάρχει τεράστιος αριθμός πρωτεϊνών σε μία πηγή.
- Οι πρωτεΐνες είναι ευαίσθητες στις χημικές διεργασίες με αποτέλεσμα να μην αποκτώ εύκολα αρκετή ποσότητα λειτουργικής πρωτεΐνης για μελέτη.

### Τι εκμεταλλεύομαι;

- Μέγεθος
- Φορτίο
- Διαλυτότητα
- Προσροφητικές ικανότητες
- Ειδική σύνδεση με μόρια

# Απομόνωση πρωτεϊνών

## Πορεία

- ✓ Επιλέγω την πηγή (την πλουσιότερη ή αν μελετώ ένζυμο αυτή με τη μεγαλύτερη δραστικότητα)
- ✓ Εκχυλίζω την πρωτεΐνη
- ✓ Διαχωρίζω τις πρωτεΐνες του παρασκευάσματος
- ✓ Ελέγχω αν η πρωτεΐνη είναι παρούσα καθώς και την απόδοση μετά από κάθε στάδιο

## Εκχύλιση πρωτεΐνης

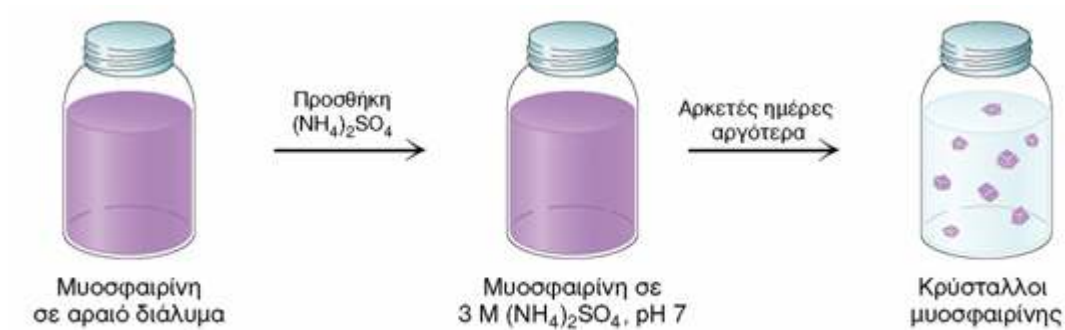
- ✓ Τεμαχισμός ιστού (πέψη με κολλαγονάση) και ομογενοποίηση κυττάρων
- ✓ Εκχύλιση με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα
- ✓ Χρήση απορρυπαντικού
- ✓ Κλασμάτωση (απομόνωση πρωτεϊνών συγκεκριμένων οργανιδίων)

# Διαχωρισμός πρωτεϊνών

Διαχωρισμός βάσει μεγέθους, φορτίου, διαλυτότητας, ειδικής σύνδεσης με μόρια

- ❖ Διαλυτότητα (πχ προσθήκη οργανικών διαλυτών σε υδατικό διάλυμα)
- ❖ Μεταβολή του pH
- ❖ Προσρόφηση από ουσίες (πχ ενεργός άνθρακας, αλουμίνα)
- ❖ Καθίζηση με άλατα (salting out)
- ❖ Χρωματογραφία

# Καθίζηση με άλατα (salting out)



Το θειικό αμμώνιο είναι ένα από τα άλατα που χρησιμοποιούνται συνηθέστερα για την καθίζηση των πρωτεϊνών



# Χρωματογραφία στήλης

Βασίζεται στη διαφορετική **κατανομή** πρωτεϊνών μεταξύ κινητής και στατικής φάσης.

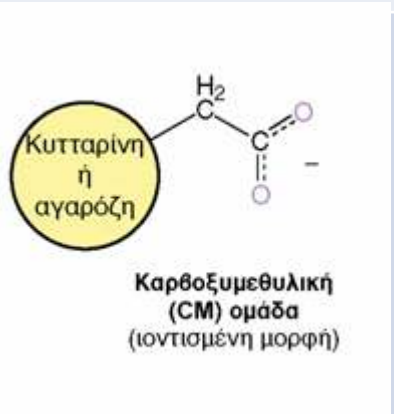
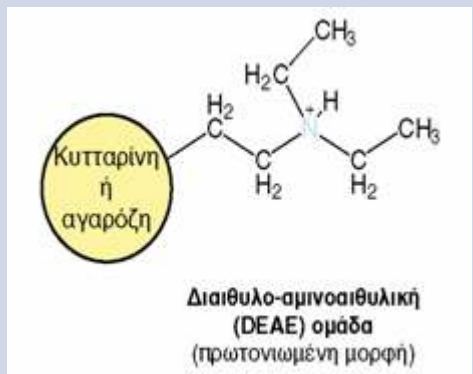
Στην υγρή χρωματογραφία η κινητή φάση είναι **υγρή**.

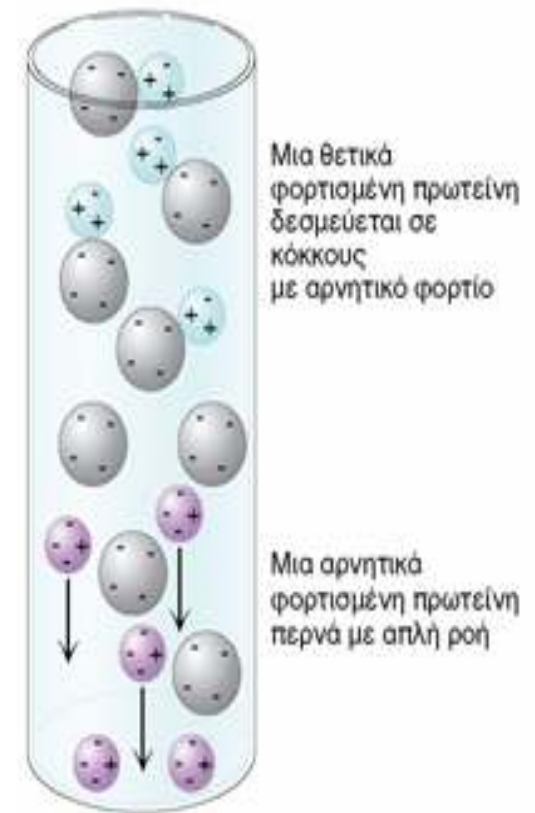
Η διαφορετική κατανομή πρωτεϊνών μεταξύ των δύο φάσεων οφείλεται στο διαφορετικό **μέγεθος**, το διαφορετικό **φορτίο**, τη διαφορετική **συγγένεια** των πρωτεϊνών με άλλα μόρια.

# 1.Χρωματογραφία ιονανταλλαγής

## Διαχωρισμός με βάση το φορτίο

Υλικό πλήρωσης: κυτταρίνη ή αγαρόζη όπου έχουν προστεθεί ομάδες θετικά ή αρνητικά φορτισμένες.

Κατιονανταλλαγή	Ανιονανταλλαγή
Σουλφοαιθυλομαδα ( $-O-CH_2-CH_2-SO_3^-$ )	Διαιθυλοαμινοαιθυλική ομάδα ( $-O-CH_2-CH_2-^+NH-(CH_2-CH_3)_2$ )
Καρβοξυλομάδα ( $-COO^-$ )	
 <p>Καρβοξυμεθυλική (CM) ομάδα (ιοντισμένη μορφή)</p>	 <p>Διαιθυλο-αμινοαιθυλική (DEAE) ομάδα (πρωτονιωμένη μορφή)</p>



## 2. Χρωματογραφία συγγένειας

Διαχωρισμός με βάση την ειδική σύνδεση με κάποια μόρια

- Ορμόνη - υποδοχέας
- Ένζυμο – υπόστρωμα
- Αντιγόνο - αντίσωμα

Στη στήλη συνδέεται ομοιοπολικά χημική ομάδα X που συνδέεται ειδικά με την πρωτεΐνη

Διάλυμα πρωτεϊνών στη στήλη

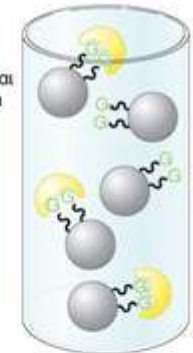


Έκλυση αδέσμευτων πρωτεϊνών με ρυθμιστικό διάλυμα



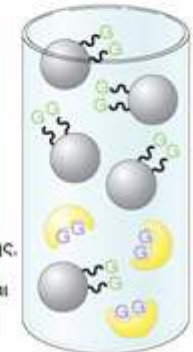
Έκλυση δεσμευμένης πρωτεΐνης με διάλυμα που περιέχει σε διαλυτή μορφή την ένωση X ή με παράγοντες που επηρεάζουν την ισχύ της σύνδεσης της πρωτεΐνης με την ένωση X (π.χ. αλλαγή pH)

Μια πρωτεΐνη που δεσμεύει γλυκόζη συνδέεται στην ομοιοπολικά συνδεδεμένη γλυκόζη (G) των κόκκων



Προσθήκη γλυκόζης (G)

Προσθέτοντας διάλυμα γλυκόζης, η πρωτεΐνη απελευθερώνεται από τη στερεά φάση

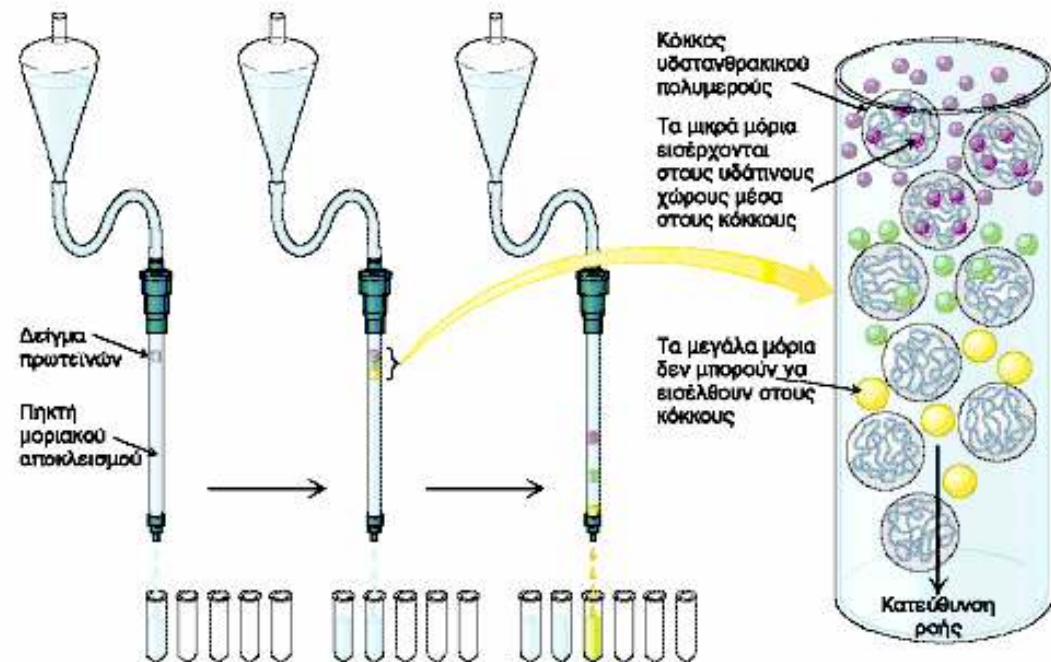


# 3. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

## Διαχωρισμός με βάση το μέγεθος

Υλικό πλήρωσης: Πορώδη υλικά από πολυμερή αδιάλυτα στο νερό που όμως μπορούν και συγκρατούν μεγάλες ποσότητες νερού (ενυδατωμένοι κόκκοι)

Δεξτράνη (Sephadex G-100)  
Αγαρόζη (Sepharose)  
Πολυακρυλαμίδιο



# 3. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

$$V_t = V_o + V_i + V_g$$

$V_o$ : όγκος υγρού έξω από τους κόκκους

$V_i$ : όγκος υγρού μέσα στους κόκκους

$V_g$ : όγκος των κόκκων

$$V_e = V_o + K_d V_i$$

$V_e$ : όγκος έκλουσης πρωτεΐνης από τη στήλη

$K_d$ : συντελεστής κατανομής

Όσο μεγαλύτερο το MB τόσο μικρότερο το  $K_d$

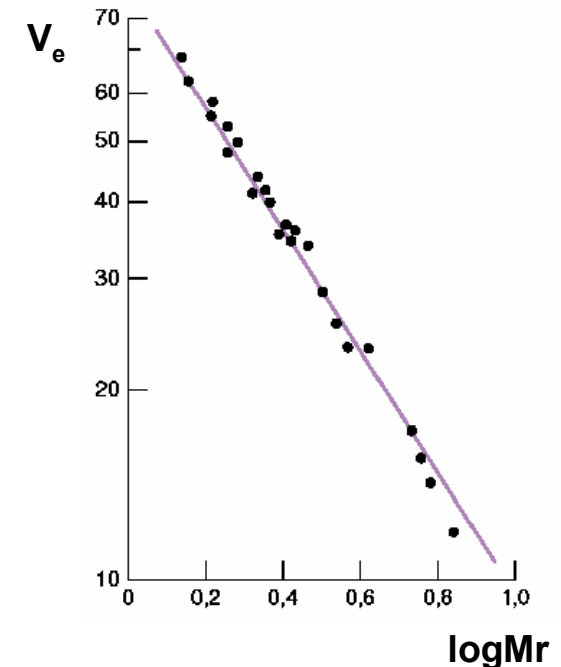
Αν  $K_d=0$ ,  $V_e=V_o$ , η πρωτεΐνη δε μπαίνει στους πόρους και εκλύεται αμέσως

Αν  $K_d=1$ ,  $V_e=V_o + V_i$ , η πρωτεΐνη εισχωρεί σε όλους τους πόρους

Αν  $K_d>1$ , η πρωτεΐνη αντιδρά με το υλικό της στήλης και δεν εκλύεται

$K_d = 0.8$ , βέλτιστο

Ο όγκος έκλουσης  $V_e$  είναι αντιστρόφως ανάλογος του λογαρίθμου της σχετικής μοριακής μάζας της πρωτεΐνης



### 3. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

**Sephadex:** Πολυμερές της δεξτράνης στο οποίο έχουν δημιουργηθεί γέφυρες γλυκερόλης ύστερα από επίδραση επιχλωριδίνης.

Όσο περισσότερες είναι η γέφυρες τόσο μικρότεροι είναι οι πόροι



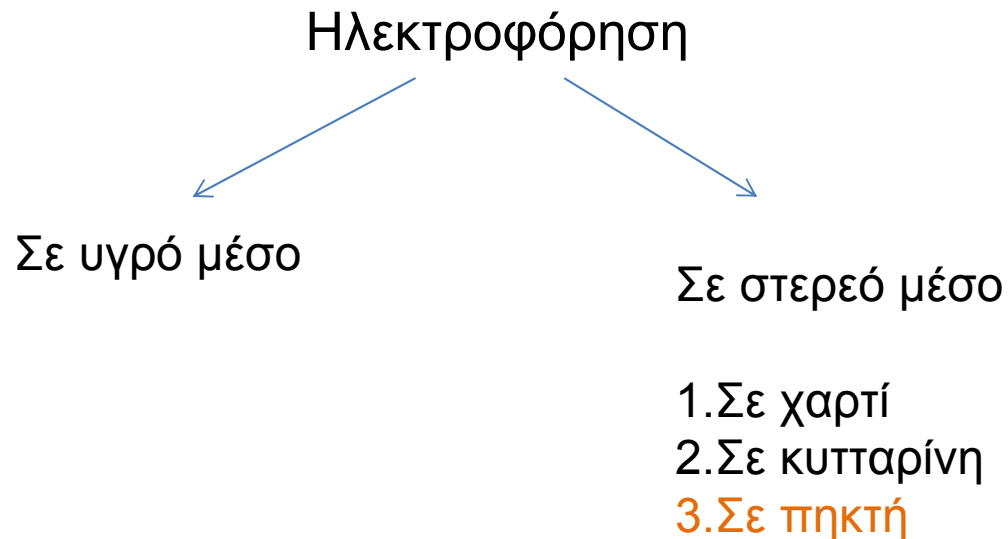
Έχω πολλά είδη Sephadex (πχ Sephadex G 50 ή 100 ή 200)

**Στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης τα μεγάλα μόρια δεν εισέρχονται στους πόρους και εκλούνται πρώτα, ενώ τα μικρότερα εισέρχονται στους πόρους σε διαφορετικό ποσοστό και εκλούνται ανάλογα με το μέγεθός τους (τα πιο μικρά μόρια εισέρχονται όλα σε όλους τους πόρους και εκλούνται τελευταία)**

# Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Στηρίζεται στην κίνηση φορτισμένων σωματιδίων  
υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου

$$\text{κινητικότητα του μορίου} = \frac{(\text{εφαρμοζόμενη τάση}) \times (\text{καθαρό φορτίο του μορίου})}{\text{τριβή του μορίου}}$$

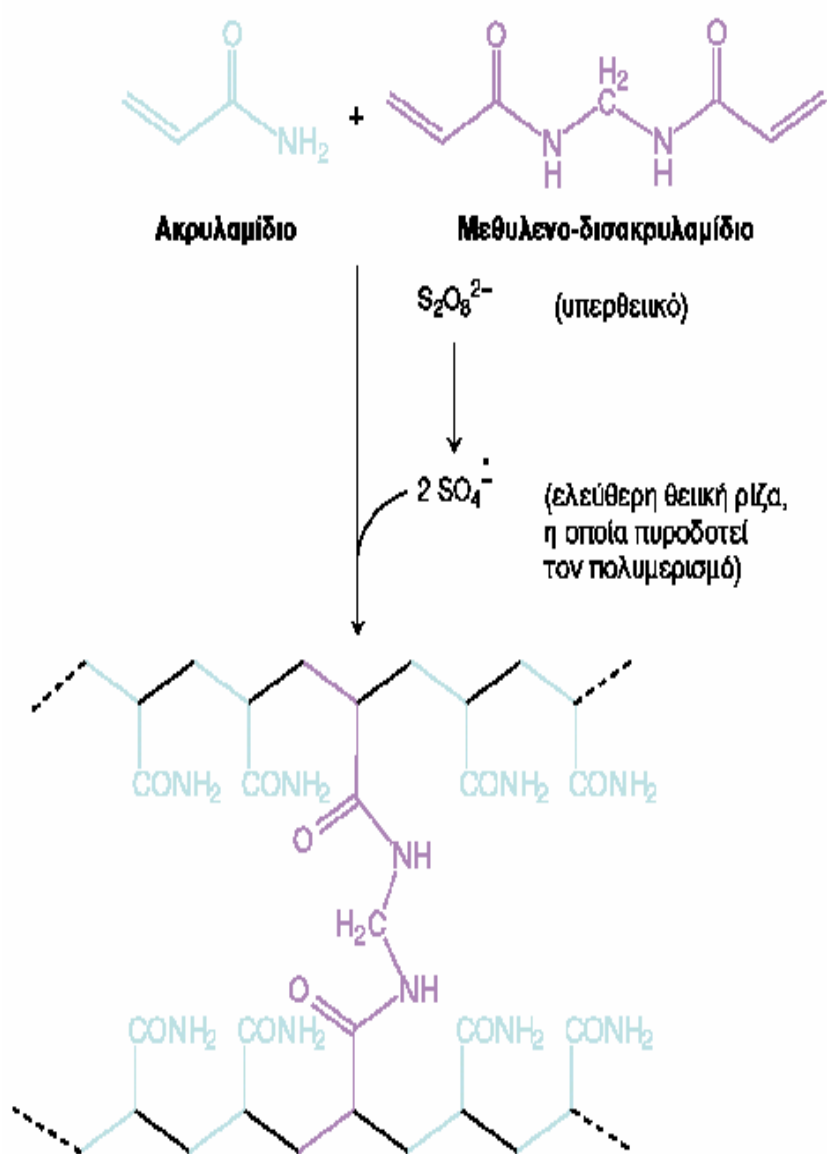


**Πλεονεκτήματα** ηλεκτροφόρησης σε **πηκτή**:

- Απόσβεση των αυξήσεων θερμοκρασίας
- Μοριακό κοσκίνισμα

Πειραματική  
Βιοχημεία  
σελ. 40-51

# Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών



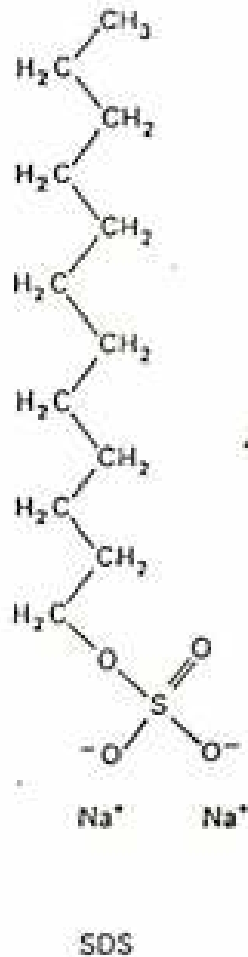
**Απαρχητής:** χημική ουσία που παρέχει ελεύθερες ρίζες π.χ. **υπερθειικό αμμώνιο**

**Καταλύτης:** καταλύει την αντίδραση σχηματισμού ελευθέρων ριζών **TEMED (N, N τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη)**

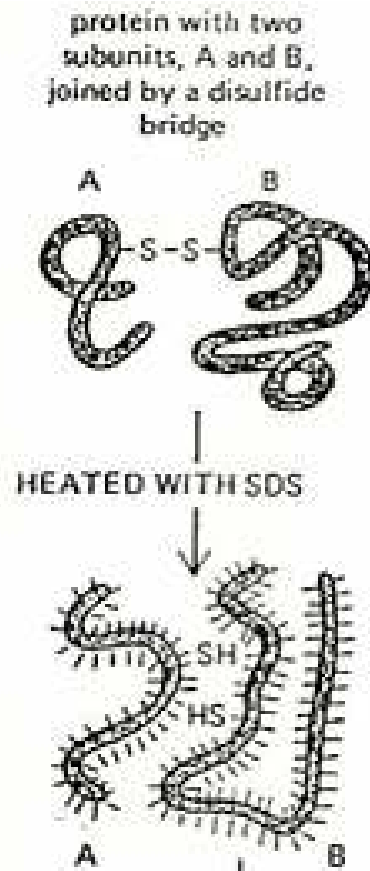
Το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί αλλάζοντας τη συγκέντρωση του ενεργοποιημένου μονομερούς και του διασυνδέτη.



# Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών



Δωδεκακυλοθειϊκό  
Νάτριο (SDS)

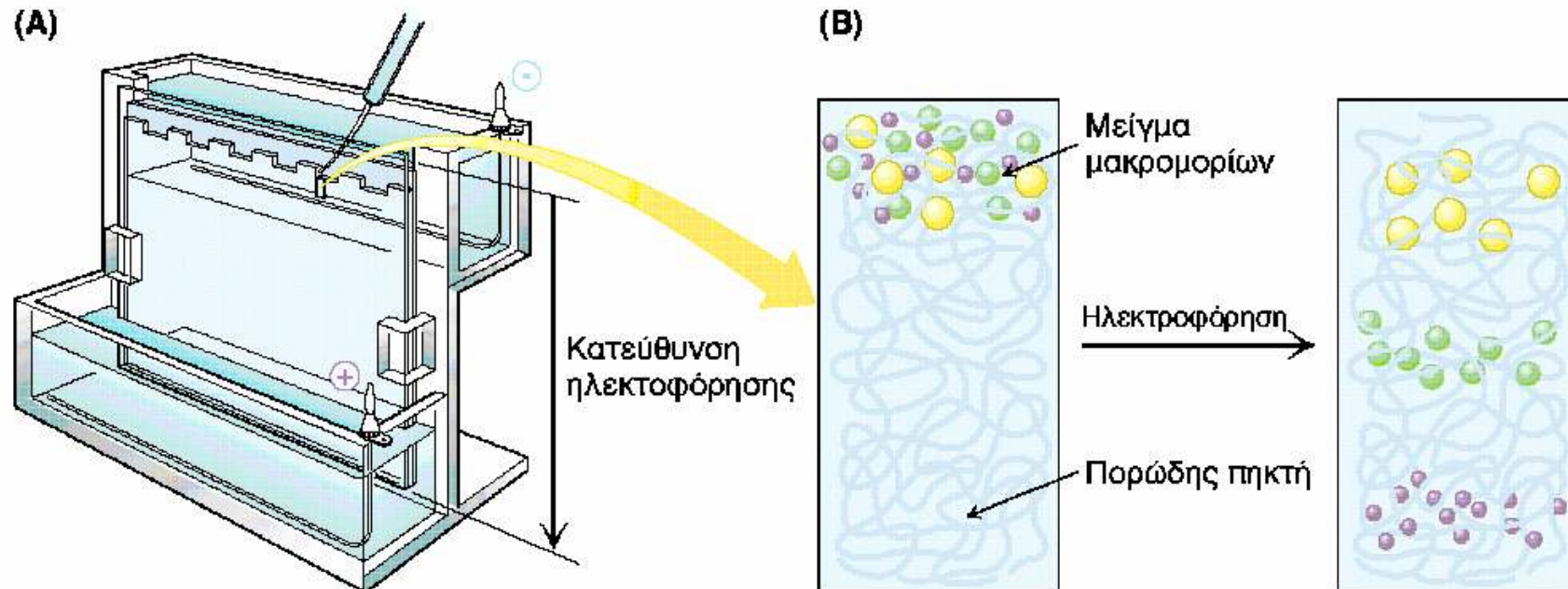


Το **SDS** καταστρέφει όλες σχεδόν τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις στην τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών και αποκτούν μεγάλο αρνητικό φορτίο (1 μόριο SDS/2 αμινοξέα)

Η **μερκαπτοαιθανόλη** ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς

# Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

## SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)



Οι πρωτεΐνες κινούνται μέσω της πηκτής προς την άνοδο και η απόσταση που διανύουν ανά μονάδα χρόνου είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους, επομένως οι μικρότερες μετακινούνται ταχύτερα.

# Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

## SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Διαχωρισμός πρωτεϊνών  
**ασυνεχούς πηκτής**

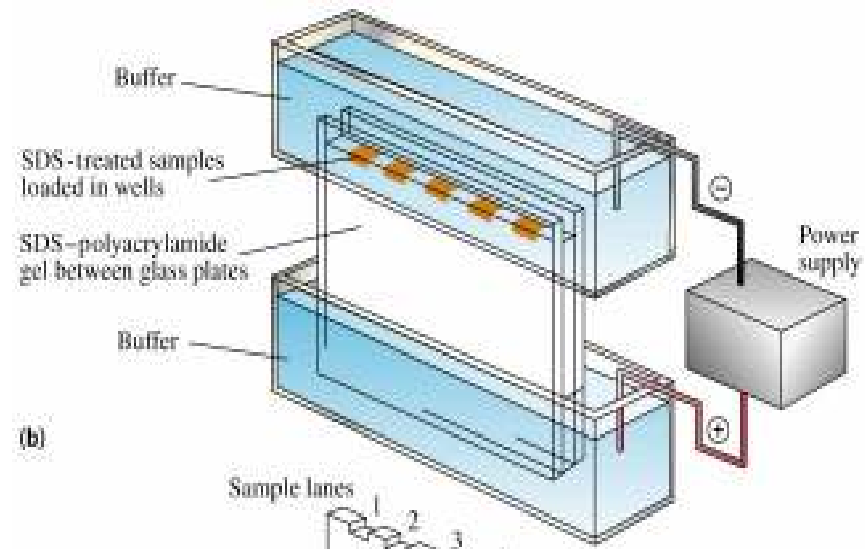
**Πηκτή επιστοίβασης (stacking gel):** 4% ακρυλαμίδιο/pH=6.8. Έχει μεγάλο μέγεθος πόρων και συσσωρεύει τις πρωτεΐνες σε μια στενή περιοχή

**Πηκτή διαχωρισμού (separating gel):** 12% ακρυλαμίδιο/pH=8.8.

**Running buffer → περιέχει γλυκίνη**

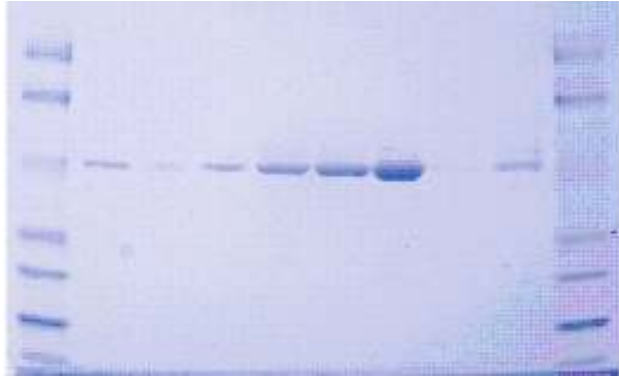
✚ **Πηκτή επιστοίβασης:** Η γλυκίνη έχει μικρό αρνητικό φορτίο, βοηθάει την συσσώρευση των πρωτεϊνών σε λεπτή ζώνη

✚ **Πηκτή διαχωρισμού:** Η γλυκίνη αποκτά μεγαλύτερο αρνητικό φορτίο και προπορεύεται των πρωτεϊνών οι οποίες υστερούν λόγω τριβών



# Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

## SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

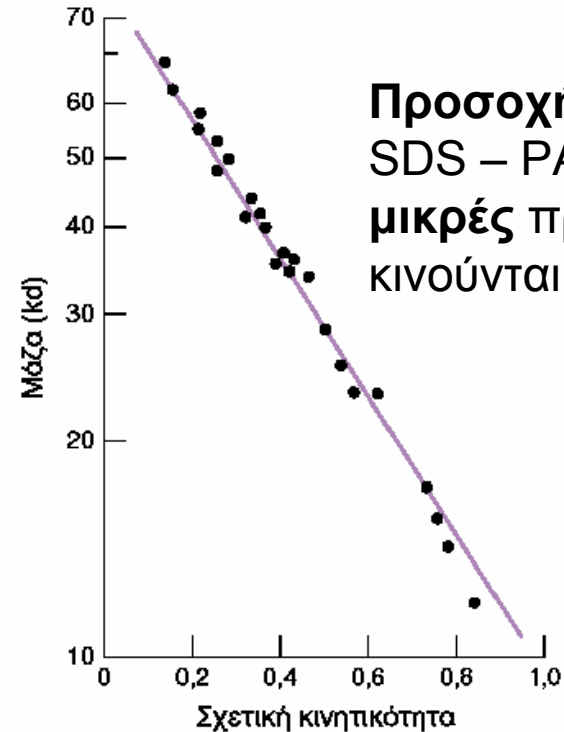


Οι πρωτεΐνες που διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση μπορούν να εμφανιστούν

a) με χρώση Coomassie brilliant blue (1 $\mu$ g)

b) με χρώση Ag (0,2 $\mu$ g)

c) με φιλμ ακτινογραφίας σε περίπτωση ραδιενεργής επισήμανσης

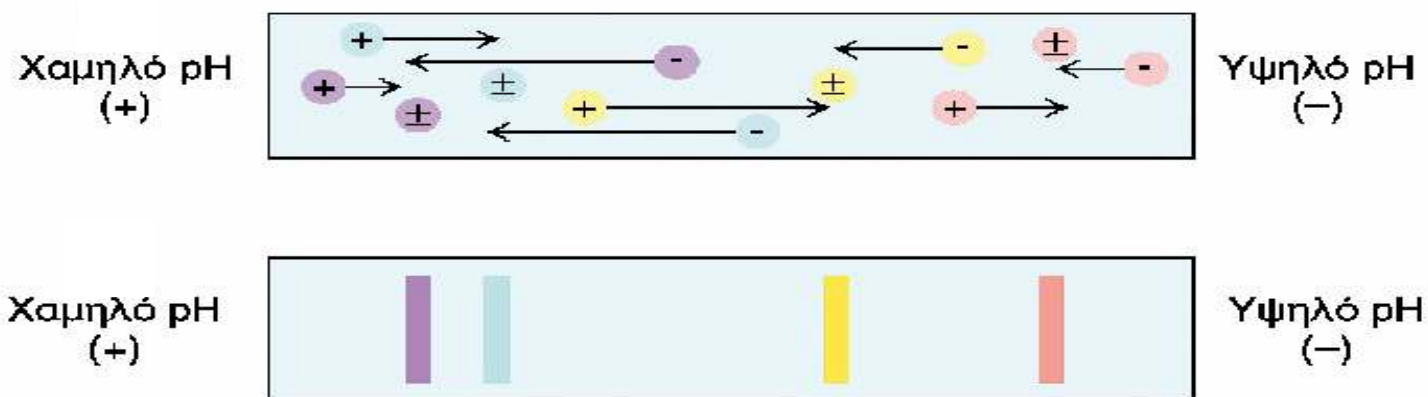


Η κινητικότητα πολλών πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-PAGE είναι αντιστρόφως ανάλογη προς το λογάριθμο της μάζας τους

**Η SDS-PAGE δεν είναι κατάλληλη για καθαρισμό πρωτεϊνών παρά μόνο για ποιοτικό προσδιορισμό και εύρεση M.B. αυτών.**

# Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

## Ισοηλεκτρικός Εστιασμός



Δημιουργία στην πηκτή μιας βαθμίδωσης pH ηλεκτροφορώντας ένα μίγμα ηλεκτρολυτών

Μετά την τοποθέτηση του δείγματος των πρωτεϊνών, το ηλεκτρικό ρεύμα θα οδηγήσει τις πρωτεΐνες στο ισοηλεκτρικό τους σημείο

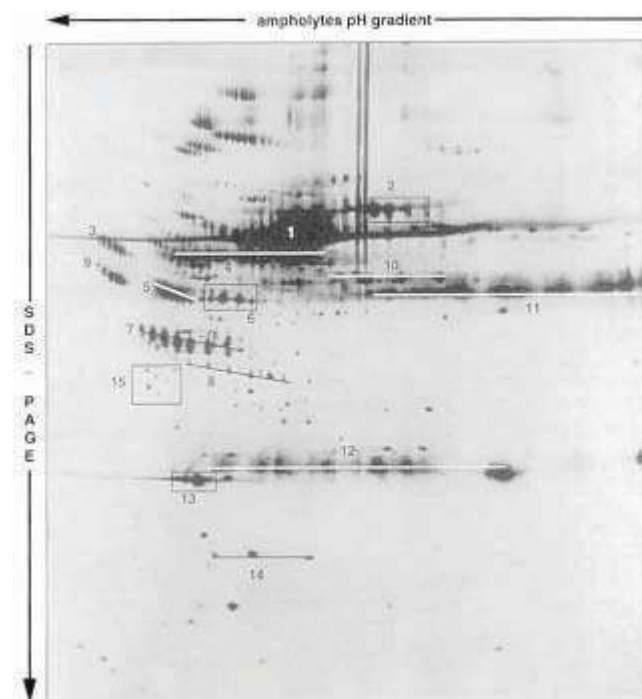
Οι πρωτεΐνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε άλλα πειράματα αν κόψουμε τις αντίστοιχες ζώνες

# Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

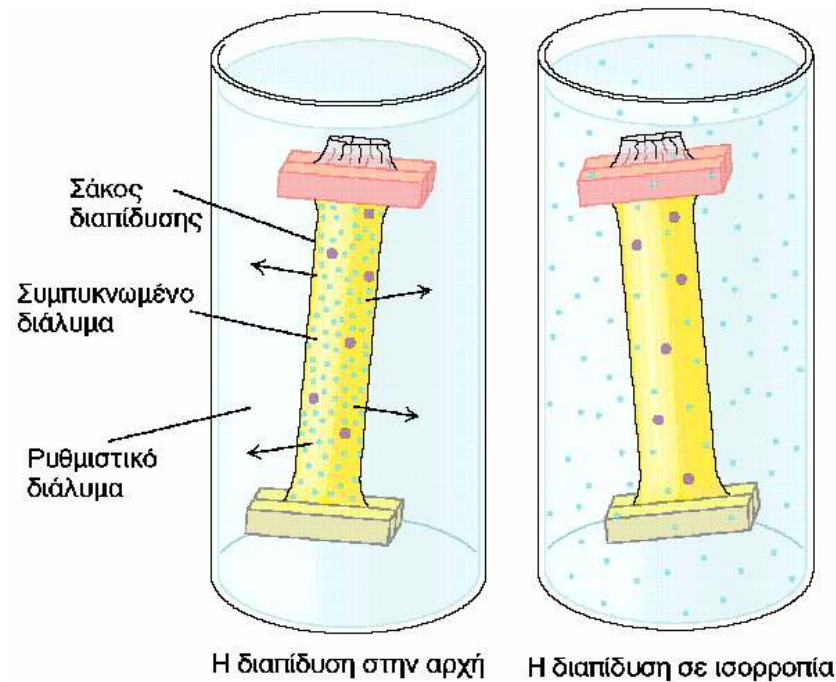
## Ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων

Πρόκειται για συνδυασμό του ισοηλεκτρικού εστιασμού με την ηλεκτροφόρηση SDS – PAGE.

Η μέθοδος επιτυγχάνει διαχωρισμούς υψηλής διακριτικής ικανότητας και αποτελεί ένα από τα πρώτα πειραματικά βήματα που θα καταλήξουν στην **πρωτεομική**, δηλαδή τη μελέτη του συνόλου των πρωτεϊνών ενός οργανισμού



## Διαπίδυση: Μέθοδος διαχωρισμού μίας πρωτεΐνης από μικρότερα μόρια



Υπάρχει κίνδυνος να απομακρυνθούν με αυτό τον τρόπο απαραίτητοι συμπαράγοντες για τη δραστηριότητα του ενζύμου

**Φυγοκέντρηση Πρωτεϊνών:** προσδιορισμός  $M_r$  των πρωτεϊνών αφού η ταχύτητα καθίζησης είναι ανάλογη της μάζας

$$M_r = \frac{RTS}{D(1-V_p)} \text{ όπου}$$

R: παγκόσμια σταθερά των αερίων

T: απόλυτη θερμοκρασία

S: σταθερά καθίζησης

D: σταθερά διάχυσης

$V_p$ : μερικός ειδικός όγκος των σωματιδίων

Πειραματική  
Βιοχημεία  
σελ. 52-55

# Ποσοτικός Προσδιορισμός Πρωτεϊνών

Συχνά στηρίζεται σε αντιδράσεις ομάδων αμινοξέων

Απαραίτητος ο προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης ώστε

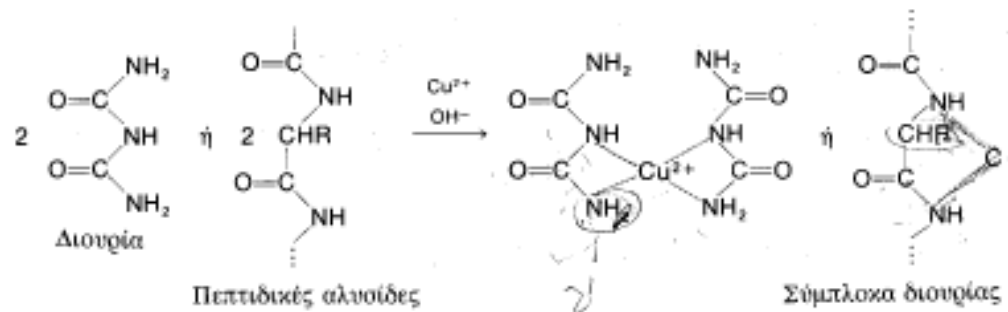
A) σε κάθε στάδιο καθαρισμού να είναι γνωστό το ποσό ολικής πρωτεΐνης (έλεγχος μεθόδου)

B) να είναι γνωστό το ποσοστό της προς απομόνωση πρωτεΐνης

Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται στη Βιοχημεία είναι:

✚ Φασματοφωτομετρικά: Λόγω της απορρόφησης των αρωματικών δακτυλίων της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης στα 280nm

✚ Προσδιορισμός διουρίας (πεπτιδικοί δεσμοί αντιδρούν με  $\text{Cu}^{2+}$ ) (1-20mg πρωτεΐνης)



✚ Lowry: αντίδραση διουρίας αλλά πιο ευαίσθητη (5μg πρωτεΐνης).

✚ Bradford

Πειραματική  
Βιοχημεία  
σελ. 70-71



# Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry.

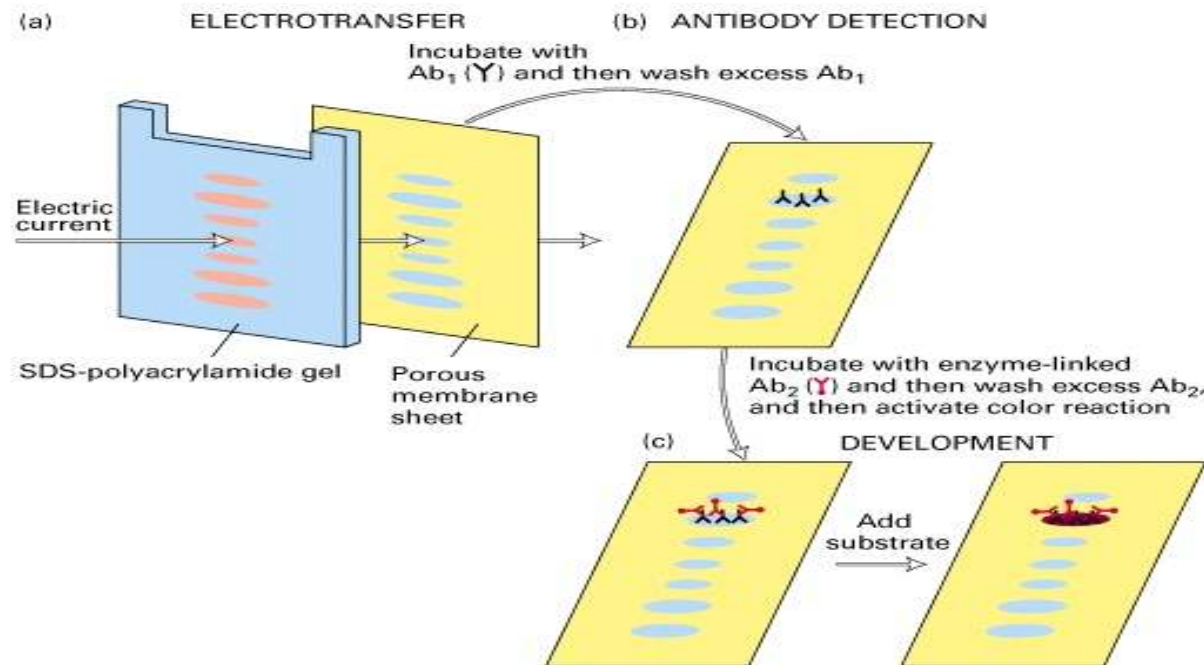
## Αρχή της μεθόδου:

- Ο  $\text{Cu}^{2+}$  σχηματίζει σύμπλοκο με τους πεπτιδικούς δεσμούς σε αλκαλικό περιβάλλον και ανάγεται μερικώς σε  $\text{Cu}^+$ .
- Το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu περιέχει φωσφομολυβδαινικό – βολφραμικό οξύ. Ο  $\text{Cu}^+$ , η τυροσίνη, η θρυπτοφάνη (η κυστεΐνη, η ιστιδίνη) ανάγουν τα μολυβδαινικά και τα βολφραμικά.
- Οι ανηγμένες μορφές εμφανίζουν μπλε χρώμα. Φωτομετρείται ο συνδυασμός του χρώματος του συμπλόκου χαλκού –πεπτιδικών δεσμών και των ανηγμένων μολυβδαινικών και βολφραμικών.
- Γίνεται σύγκριση με πρότυπη καμπύλη αναφοράς διαλυμάτων BSA που έχουν υποστεί την ίδια κατεργασία.

# Σύγχρονες μέθοδοι μελέτης και απομόνωσης πρωτεϊνών

- ✚ Μέθοδοι **μοριακής βιολογίας** (εύρεση γονιδίου, υπερέκφραση πρωτεΐνης, κλωνοποίηση)
- ✚ Τεχνολογία πολυκλωνικών-μονοκλωνικών **αντισωμάτων**

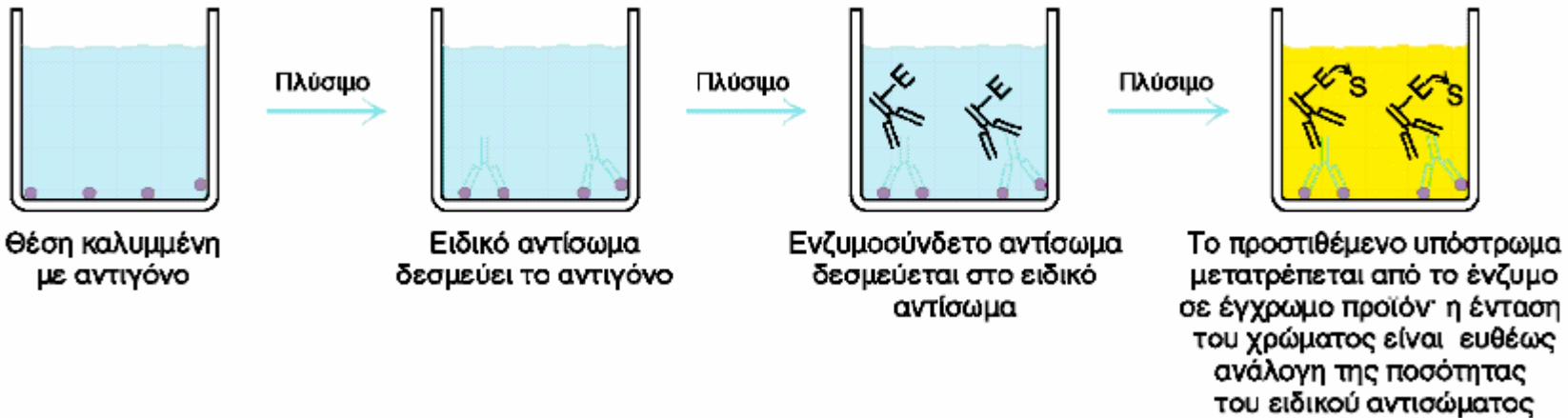
## ✚ **Ανοσοαποτύπωση** Πρωτεϊνών (Western Blotting)



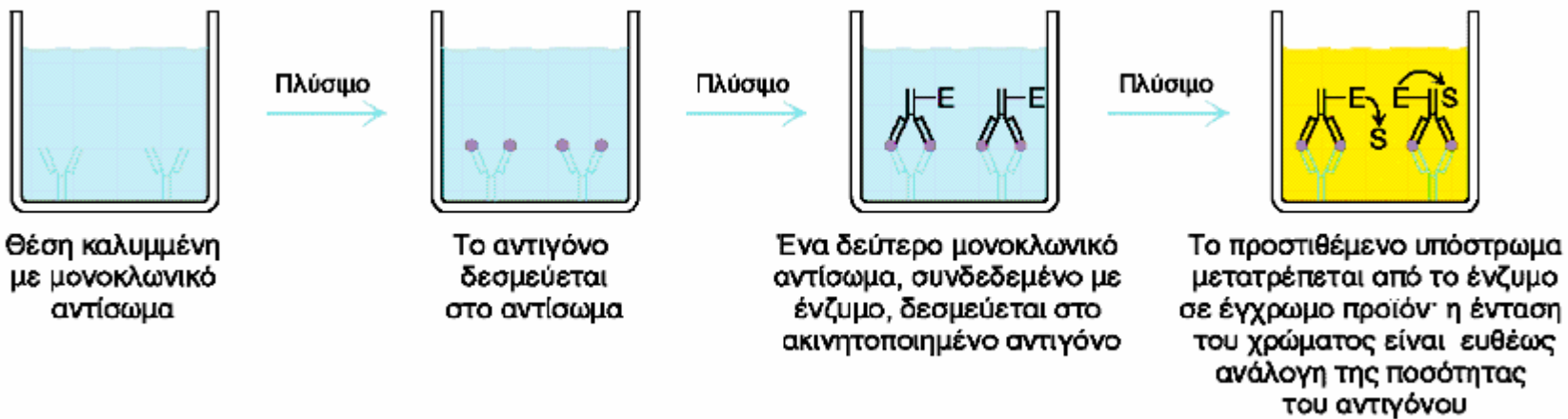
# Σύγχρονες μέθοδοι μελέτης και απομόνωσης πρωτεϊνών

## 🌸 Αντίσωμα ενζυμοσύνδετο (ELISA)

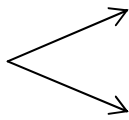
(A) Εμμεση ELISA



(B) Διπλή ELISA



# Ενζυμολογία

Δραστικότητα Ενζύμου  
(ολική δραστικότητα)   $\mu\text{mol}$  αλλοιωθέντος υποστρώματος/ min  
 $\mu\text{mol}$  παραγόμενου προϊόντος/ min

Ειδική δραστικότητα Ενζύμου = δραστικότητα/ mg πρωτεΐνης

% Απόδοση σταδίου = (δραστικότητα κλάσματος/ δραστικότητα αρχικού)  $\times$  100

\* Η δραστικότητα του ομογενοποιηήματος θεωρείται 100

Βαθμός καθαρισμού = Ειδ. δραστικότητα κλάσματος/ Ειδ. δραστικότητα αρχικού

1u = 1  $\mu\text{mol}$ / min  
(nmol/ min)  
(pmol/ min)

Δημόπουλος –  
Αντωνοπούλου  
σελ. 93-132

# Η κινητική Michaelis - Menten

Η ταχύτητα της αντίδρασης εξαρτάται από τη συγκέντρωση του υποστρώματος

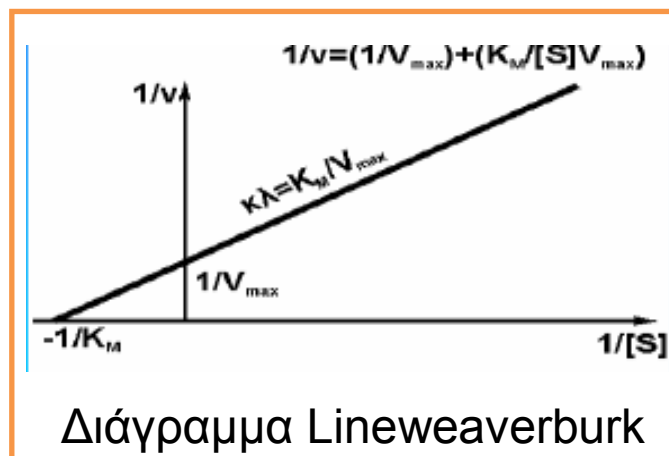
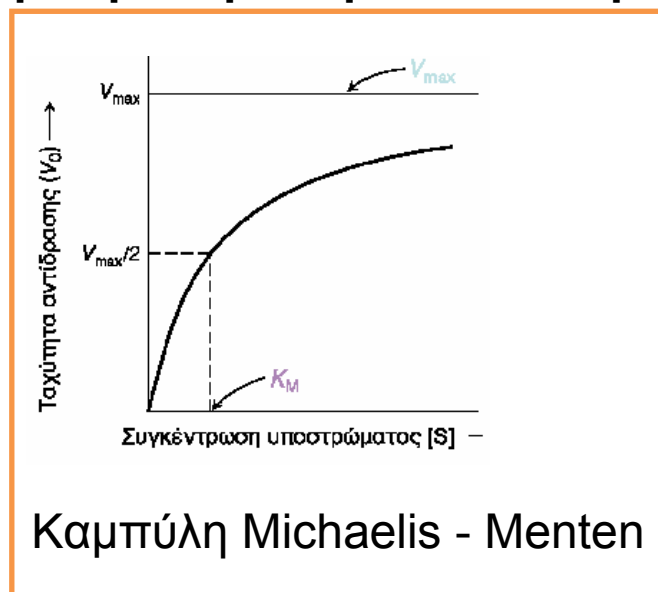
$$V = V_{\max} [S] / ([S] + K_M)$$

(Εξίσωση Michaelis Menten)

$V_{\max}$ : μέτρο του ρυθμού μετατροπής του υποστρώματος

$K_M$  (σταθερά M.M) : αποτελεί μέτρο της συγγένειας ενζύμου-υποστρώματος.

Εξαρτάται από το υπόστρωμα, από το pH και την ιοντική ισχύ



# Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων

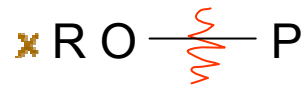
<p><b>Competitive</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>↗ Ανταγωνιστική (ΚΑΔ)</li> <li>↘ Συναγωνιστική (Stryer+ Clark)</li> </ul>	<p><math>K_M \uparrow</math>  <math>V_{max}</math> σταθ</p>	
<p><b>Non Competitive</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>↗ Μη Ανταγωνιστική (ΚΑΔ)</li> <li>↘ Μη Συναγωνιστική (Stryer+ Clark)</li> </ul>	<p><math>K_M</math> σταθ  <math>V_{max} \uparrow</math></p>	
<p><b>Uncompetitive</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>↗ Συναγωνιστική (ΚΑΔ)</li> <li>↘ Ασυναγωνιστική (Stryer+ Clark)</li> </ul>	<p><math>K_M \downarrow</math>  <math>V_{max} \downarrow</math></p>	
<p><b>Μικτή</b></p>	<p><math>K_M \uparrow</math>  <math>V_{max} \downarrow</math></p>	

# Φωσφατάσες

Ένζυμα που υδρολύουν ορθο-φωσφορικούς μονοεστέρες

Βρίσκονται παντού (ζωικά, φυτικά κύτταρα και σε βακτήρια)

✘ Όξινες φωσφατάσες  
(βέλτιστο pH 4-6)

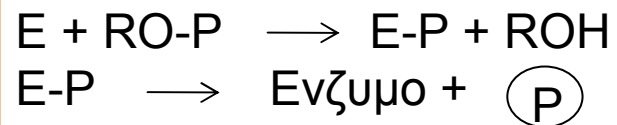


✘ Βρίσκονται στο ήπαρ, σπλήνα, ερυθρά, αιμοπετάλια και προστάτη

✘ Αλκαλικές φωσφατάσες  
(βέλτιστο pH 8-9)



✘ Βρίσκονται στο επιθήλιο του εντέρου

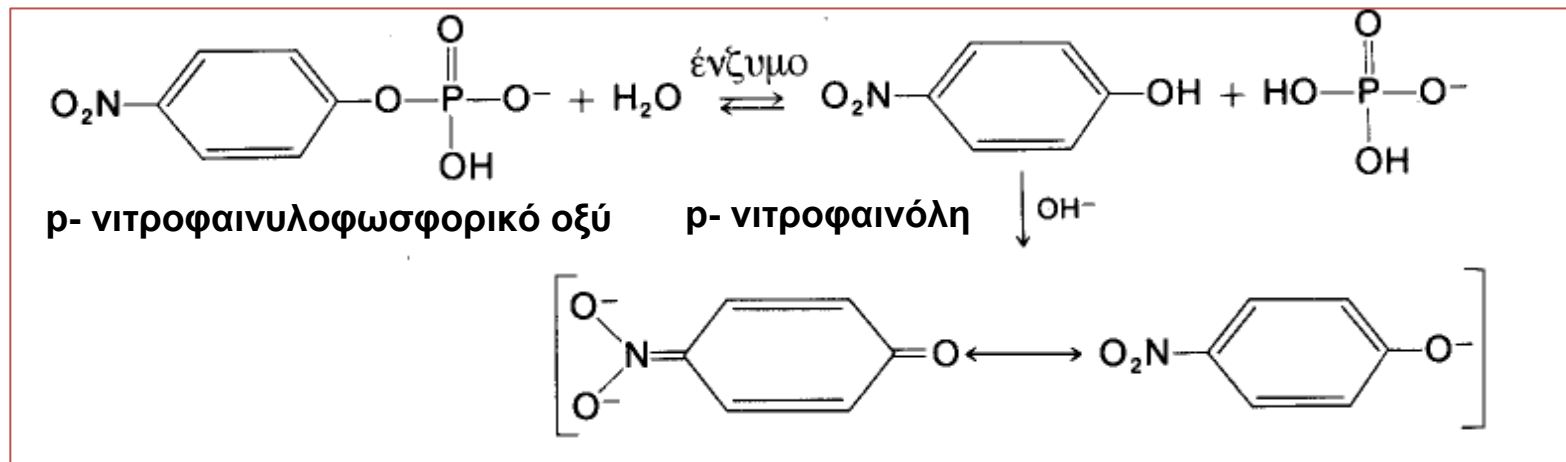


# Τι κάνω στο εργαστήριο;

## Μελέτη των φωσφατάσων της *T.pyriformis*

Η *Tetrahymena pyriformis* έχει 17 διαφορετικές όξινης φωσφατάσες. Εντοπίζονται στα λυσοσώματα και αποτελούν **οδηγά ένζυμα** λυσοσωμάτων

### Προσδιορισμός δραστηριότητας όξινης φωσφατάσης



Απορροφά στα 405nm

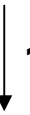


# Τι κάνω στο εργαστήριο;

Έκπλυση κυττάρων *T. pyriformis*



Ομογενοποίηση *T. pyriformis*



1000×g/10min

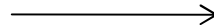


Πυρήνες,  
κύτταρα που δεν  
έχουν σπάσει,  
μεγάλα τμήματα  
κυττάρων

15000×g/20min

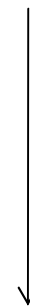


Μιτοχόνδρια,  
υπολείμματα μεμβρανών



Κυτταρόπλασμα  
(λυσosώματα)

Προσθήκη Triton×100



Κλασμάτωση - καθαρισμός με  
χρωματογραφία μοριακής  
διήθησης

# Τι κάνω στο εργαστήριο;

## Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

- ✚ Χρήση Sephadex G-100 (M.W των όξινων φωσφατασών 85-110.000)
- ✚ Ενουδάτωση του Sephadex G-100 με ήπιο βρασμό σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών- αιθυλενοδιαμίνης ώστε
  - ✘ να έχουμε βέλτιστο pH/ιοντική ισχύ και να αποφευχθεί η μετουσίωση του ενζύμου)
  - ✘ απαέρωση πηκτής ώστε να μην εγκλειστούν φυσαλίδες
  - ✘ αποστείρωση υλικού προς αποφυγή βακτηριακής διάσπασης του ενζύμου
- ✚ Προσεκτική τοποθέτηση της πηκτής (αφού ψυχθεί σε RT) στη στήλη ώστε να είναι ομοιογενής
- ✚ Προσθήκη στη στήλη κατάλληλου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος ώστε να «πακεταριστεί», να αποκτήσει δηλ. σταθερό ύψος
- ✚ Προσθήκη κυανού της δεξτράνης ώστε να ελεγχθεί το «πακετάρισμα» και η ομοιογένεια της στήλης (υπολογισμός νεκρού όγκου,  $V_0$ )
- ✚ Τοποθέτηση στη στήλη του υπερκείμενου της φυγοκέντρησης των 15.000g του ομογενοποιημένου της *T. Pyriformis*.
- ✚ το έκλουσμα της στήλης διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους (280nm) έτσι ώστε να ανιχνεύεται η έξοδος πρωτεΐνης και να συλλέγονται τα κλάσματα σε χωριστούς υποδοχείς

# Τι κάνω στο εργαστήριο;

✚ Πραγματοποιούνται **ενζυμικοί προσδιορισμοί** στο αρχικό ομογενοποίημα της *T.pyriformis*, στο υπερκείμενο των 15.000g και στα διάφορα κλάσματα της στήλης (παρουσία και απουσία αναστολέων)

✚ Στα ίδια δείγματα πραγματοποιείται προσδιορισμός πρωτεΐνης κατά **Lowry** ώστε να υπολογιστεί η ειδική δραστητικότητα και ο βαθμός καθαρισμού