



**Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Τμήμα Ιατρικής  
Εργαστήριο Βιοχημείας**



## **ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΙΙ**

- Ωρολόγιο Πρόγραμμα
- Αναλυτικό Διάγραμμα Μελέτης
- Οδηγός Εργαστηριακών Ασκήσεων

**Σοφία Μπονάνου-Τζεδάκη, Γεώργιος Σίμος, Παναγιώτης Λιάκος, Ελένη Γεωργάτσου**

**Λάρισα 2012**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|  | <b>Σελίδες</b> |
|--|----------------|
| Πληροφορίες  | 1              |
| Ωρολόγιο Πρόγραμμα   | 3              |
| Διάγραμμα Μελέτης  | 5              |
| Κανόνες Ασφάλειας Εργαστηρίου  | 18             |
| <b>Άσκηση 1η</b><br>Απομόνωση DNA  | 19             |
| <b>Άσκηση 2<sup>η</sup></b><br>Ποσοτικός και Ποιοτικός Προσδιορισμός DNA | 22             |
| <b>Άσκηση 3η</b><br>Πρωτεΐνες Πλάσματος : Προσδιορισμός                  | 29             |
| <b>Άσκηση 4η</b><br>Προσδιορισμός χολερυθρίνης ορού                      | 38             |
| <b>Άσκηση 5η</b><br>Προσδιορισμός τρανσαμινασών –ουρίας στον ορό αίματος | 43             |
| Ευχαριστίες  | 51             |

## ΠΑΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

### ΓΙΑ ΤΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΙΙ

Η διδασκαλία των μαθημάτων Βιοχημείας Ι και ΙΙ συνίσταται σε διαλέξεις και εργαστηριακές ασκήσεις. Οι **διαλέξεις** αναπτύσσουν την ύλη που περιγράφεται γενικά στον οδηγό σπουδών και με λεπτομέρεια στην **Αναλυτική Ύλη** που επισυνάπτεται σε αυτό το Φυλλάδιο μαζί με το **Πρόγραμμα των διαλέξεων**.

Οι **εργαστηριακές ασκήσεις** αποτελούν την πρακτική άσκηση των φοιτητών και είναι απαραίτητο συμπλήρωμα των διαλέξεων. Σκοπός τους είναι να σας εξοικειώσουν με την χρήση διαφόρων τεχνικών, την λειτουργία διαφόρων οργάνων και την διεξαγωγή διαφόρων δοκιμασιών που χρησιμοποιούνται συχνά στην Βιοχημεία, καθώς και στο να σας βοηθήσουν να κατανοήσετε μερικές έννοιες που δεν γίνονται σαφώς αντιληπτές θεωρητικά.

Τις ασκήσεις θα τις κάνετε σε ομάδες **τριών** φοιτητών. Οι ομάδες σχηματίζονται στην αρχή του εξαμήνου και παραμένετε στην ίδια ομάδα όλο το εξάμηνο. Η **συμμετοχή στις ασκήσεις** καθώς και η **γραπτή αναφορά** των αποτελεσμάτων των ασκήσεων, η οποία γίνεται από τους φοιτητές στην διάρκεια των εργαστηρίων στο φυλλάδιο του εργαστηρίου, είναι **υποχρεωτική**.

Οι φοιτητές πρέπει να προσέρχονται στα εργαστήρια κατάλληλα προετοιμασμένοι (έχοντας διαβάσει το Φυλλάδιο) και εξοπλισμένοι (μολύβια, χάρακες, κομπιουτεράκια κλπ) για να εκτελέσουν σωστά τα πειράματα και να επεξεργαστούν τα αποτελέσματα συμπληρώνοντας με επιτυχία την αναφορά των αποτελεσμάτων. Η αναφορά περιλαμβάνει τις μετρήσεις (παρουσιασμένες σε πίνακες, σχεδιαγράμματα κ.λ.π.), και τα συμπεράσματα που βγάζετε (π.χ. αν πήρατε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, αν όχι γιατί όχι, πηγές πιθανών λαθών στα πειράματα κ.λ.π) όπως ζητά κάθε άσκηση. Στο τέλος κάθε άσκησης, η γραπτή αναφορά ελέγχεται από τους διδάσκοντες και **υπογράφεται**, εφόσον έχει συμπληρωθεί σωστά. Η επιτυχής συμμετοχή στην άσκηση πιστοποιείται από την υπογραφή του διδάσκοντος στη γραπτή αναφορά των αποτελεσμάτων.

Στο **τέλος του εξαμήνου** (πριν από την εξεταστική περίοδο) οι φοιτητές εξετάζονται γραπτά στο περιεχόμενο των Εργαστηρίων. Στις **εξετάσεις του Εργαστηρίου** εξεταστέα ύλη είναι η θεωρία, η μεθοδολογία και οι τρόποι επεξεργασίας αποτελεσμάτων που περιλαμβάνονται στο Φυλλάδιο ή αναπτύσσονται από τους διδάσκοντες κατά την διάρκεια των εργαστηρίων. Δικαίωμα συμμετοχής στις εξετάσεις του Εργαστηρίου έχουν μόνον όσοι συμμετείχαν με επιτυχία στις εργαστηριακές ασκήσεις.

Οι **εξετάσεις του μαθήματος** είναι γραπτές, διάρκειας 3 ωρών, και αποτελούνται από θέματα προς ανάπτυξη ή πολλαπλής επιλογής. Εξεταστέα ύλη αποτελεί η Αναλυτική Ύλη που επισυνάπτεται σε αυτό το Φυλλάδιο. Δικαίωμα συμμετοχής σε αυτές τις εξετάσεις έχουν μόνον όσοι φοιτητές πέρασαν τις εξετάσεις του Εργαστηρίου. Ο **τελικός βαθμός του μαθήματος** υπολογίζεται κατά **80%** από τον βαθμό των γραπτών

εξετάσεων του μαθήματος και κατά **20%** από τον βαθμό των γραπτών εξετάσεων του Εργαστηρίου.

Το παρόν φυλλάδιο συνέγραψε η πρώην Διευθύντρια του Εργαστηρίου Βιοχημείας και πρώην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας Σοφία Μπονάνου-Τζεδάκη. Στη συγγραφή συμμετείχαν με παρεμβάσεις, διορθώσεις και αναβαθμίσεις κατά τη διάρκεια των χρόνων τα μέλη ΔΕΠ του Εργαστηρίου Βιοχημείας, Ελένη Γεωργιάτσου, Παναγιώτης Λιάκος και Γεώργιος Σίμος.

Για την τεχνική περαίωση των ασκήσεων καθώς και την αναβάθμιση και επικαιροποίησή τους εργάστηκαν κατά τη διάρκεια των χρόνων οι: Ευάγγελος Κωλέττας (συμβ. Π.Δ. 407/80), Δέσποινα Κοκκιούμη (ΕΔΤΠ), Μαρία Νέτσικα (ΕΔΤΠ), Νικόλαος Στακιάς (ΕΔΤΠ), Δημήτριος Μπούτος (ΕΤΕΠ) και Εμμανουήλ Βενιέρης (ΕΤΕΠ) υπό την επίβλεψη των αντίστοιχων μελών ΔΕΠ.

Για την άρτια και εύρυθμη διεξαγωγή των Φοιτητικών Εργαστηρίων εργάστηκαν όλοι οι παραπάνω, σε συνεργασία με τους συμβασιούχους Π.Δ. 407/80 Κυριακή Γεροζήση, Θάλεια Μπέη, Ανάργυρο Μουλά, Γεωργία Χαχάμη και Αγγελική Λυμπεροπούλου υπό την επίβλεψη των εκάστοτε υπευθύνων του μαθήματος μελών ΔΕΠ.

**Το ακαδημαϊκό έτος 2012-2013 τα Φοιτητικά Εργαστήρια θα διεξαχθούν από τους Εμμανουήλ Βενιέρη και Δημήτριο Μπούτο και από τα μέλη ΔΕΠ του Εργαστηρίου Βιοχημείας.**

**Την έκδοση του Φυλλαδίου 2012 επιμελήθηκε η υπεύθυνη του μαθήματος Ελένη Γεωργιάτσου, με τη γραμματειακή υποστήριξη της Ευαγγελίας Νούσιου.**

## ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΙΙ

Πρόγραμμα Διδασκαλίας  
Χειμερινού Εξαμήνου  
Ακαδ. Έτους 2012-2013

### Τα Φροντιστήρια και τα Εργαστήρια είναι υποχρεωτικά

| Ημερομηνία | Ωρα   | Θέμα  |   |            |
|------------|-------|-------|---|------------|
| Τετάρτη    | 3/10  | 9-11  | Ροή της γενετικής πληροφορίας   | MA2        |
| Πέμπτη     | 4/10  | 13-15 | Εξερευνώντας την εξέλιξη  | MA2        |
| Παρασκ.    | 5/10  | 11-13 | DNA: αντιγραφή, επιδιόρθωση & ανασυνδυασμός                             | MA2        |
| Τετάρτη    | 10/10 | 9-11  | <b>Εργαστήριο 1: DNA: απομόνωση</b> (Ομάδα Α)                           | Εργ. Βιοχ  |
| Πέμπτη     | 11/10 | 13-16 | <b>Εργαστήριο 1</b> (Ομάδα Β)   | Εργ. Βιοχ. |
| Παρασκ.    | 12/10 | 11-13 | RNA: δομή, σύνθεση & μάτισμα  | MA2        |
| Τετάρτη    | 17/10 | 9-11  | <b>Εργαστήριο 2: DNA: προσδιορισμός και ηλεκτροφόρηση</b><br>(Ομάδα Α)  | Εργ. Βιοχ  |
| Πέμπτη     | 18/10 | 13-16 | <b>Εργαστήριο 2</b> (Ομάδα Β)   | Εργ. Βιοχ. |
| Παρασκ.    | 19/10 | 11-13 | Σύνθεση πρωτεϊνών   | MA2        |
| Τετάρτη    | 24/10 | 9-11  | Ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης στους προκαρυωτικούς οργανισμούς            | MA2        |
| Πέμπτη     | 25/10 | 13-15 | Ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς             | MA2        |
| Παρασκ.    | 26/10 | 11-13 | Ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς             | MA2        |
| Τετάρτη    | 31/10 | 9-11  | <b>Φροντιστήριο σύνοψης μαθημάτων μοριακής βιολογίας</b><br>(Ομάδα Α+Β) | MA2        |
| Πέμπτη     | 1/11  | 13-15 | Ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος   | MA2        |
| Παρασκ.    | 2/11  | 11-13 | Ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος   | MA2        |
| Τετάρτη    | 7/11  | 9-11  | Βιοχημική ενδοκρινολογία  | MA2        |
| Πέμπτη     | 8/11  | 13-15 | — (Συνέδριο EEBMB)  |            |
| Παρασκ.    | 9/11  | 11-13 | — (Συνέδριο EEBMB)  |            |
| Τετάρτη    | 14/11 | 9-11  | Υπενθύμιση μεταβολικών οδών-βιταμίνες                                   | MA2        |
| Πέμπτη     | 15/11 | 13-15 | Ορμονική ρύθμιση του μεταβολισμού                                       | MA2        |
| Παρασκ.    | 16/11 | 11-13 | Λειτουργίες του ήπατος  | MA2        |
| Τετάρτη    | 21/11 | 9-11  | Βιοχημεία του αίματος Ι   | MA2        |
| Πέμπτη     | 22/11 | 13-15 | Βιοχημεία του αίματος ΙΙ  | MA2        |
| Παρασκ.    | 23/11 | 11-13 | <b>Φροντιστήριο σύνοψης κυτταρικής επικοινωνίας</b> (Ομάδα Α+Β)         | MA2        |

|                               |       |       |   |            |
|-------------------------------|-------|-------|---|------------|
| Τετάρτη                       | 28/11 | 9-11  | <b>Εργαστήριο 3: πρωτεΐνες πλάσματος: προσδ.</b> (Ομάδα Α)          | Εργ. Βιοχ  |
| Πέμπτη                        | 29/11 | 13-16 | <b>Εργαστήριο 3</b> (Ομάδα Β)                                       | Εργ. Βιοχ  |
| Παρασκ.                       | 30/11 | 11-13 | Λειτουργίες του λιπώδους ιστού                                      | MA2        |
| Τετάρτη                       | 5/12  | 9-11  | <b>Εργαστήριο 4: προσδ. Χολερυθρίνης ορού</b> (Ομάδα Α)             | Εργ. Βιοχ  |
| Πέμπτη                        | 6/12  | 13-16 | <b>Εργαστήριο 4</b> (Ομάδα Β)                                       | Εργ. Βιοχ  |
| Παρασκ.                       | 7/12  | 11-13 | Διατροφή και μεταβολισμός Ι   | MA2        |
| Τετάρτη                       | 12/12 | 9-11  | <b>Εργαστήριο 5: προσδ. τρανσαμινασών –ουρίας ορού</b><br>(Ομάδα Α) | Εργ. Βιοχ. |
| Πέμπτη                        | 13/12 | 13-16 | <b>Εργαστήριο 5:</b> (Ομάδα Β)                                      | Εργ. Βιοχ  |
| Παρασκ.                       | 14/12 | 11-13 | Διατροφή και μεταβολισμός ΙΙ  | MA2        |
| Τετάρτη                       | 19/12 | 9-11  | Λειτουργίες του μυός  | MA2        |
| Πέμπτη                        | 20/12 | 13-15 | Βιοχημεία της άσκησης Ι   | MA2.       |
| Παρασκ.                       | 21/12 | 11-13 | Βιοχημεία της άσκησης ΙΙ  | MA2        |
| <b>ΔΙΑΚΟΠΕΣ ΧΡΙΣΤΟΥΓΕΝΝΩΝ</b> |       |       |   |            |
| Τετάρτη                       | 9/1   | 9-11  | Βιοχημεία των αισθητηρίων οργάνων                                   | MA2        |
| Πέμπτη                        | 10/1  | 13-15 | <b>Φροντιστήριο σύννοψης βιοχημείας συστημάτων</b><br>(Ομάδα Α+Β)   | MA2        |
| Παρασκ.                       | 11/1  | 11-13 | Επανάληψη ύλης θεωρίας  | MA2        |
| Τετάρτη                       | 16/1  | 9-11  | <b>Φροντιστήριο: Επανάληψη Εργαστηρίων</b>                          | MA2        |
| Πέμπτη                        | 17/1  | 13-15 | <b>Εξετάσεις Εργαστηρίων</b>  | MA2        |
| Παρασκ                        | 18/1  | 11-13 |   |            |

**Σημείωση:** εφ' όσον κάτω από οποιαδήποτε συγκυρία χαθούν ώρες θεωρίας, αυτές, με βάση το ωρολόγιο πρόγραμμα, θα αντικαθίστανται τις Πέμπτες ώρα 13-14, και τα Εργαστήρια θα ξεκινάνε στις 14.00, μετά από σχετική ανακοίνωση του Εργαστηρίου.

**BIOΧΗΜΕΙΑ II**  
**Γ' ΕΞΑΜΗΝΟ**

**Διάγραμμα Μελέτης- Αναλυτική ύλη μαθήματος – Οδηγός**

**2012-2013**

## **BIOΧΗΜΕΙΑ ΙΙ 2012**

### **Σκοποί του μαθήματος**

Η ολοκλήρωση του μεταβολισμού και η κατανόηση της ρύθμισης των βιοχημικών λειτουργιών του ανθρώπινου οργανισμού σε μοριακό, κυτταρικό και συστημικό επίπεδο με την μελέτη :

- των μηχανισμών της διατήρησης, της μεταβίβασης και της έκφρασης της γενετικής πληροφορίας
  
- του μηχανισμού δράσης των ορμονών και του ρόλου τους στην ομοιοστασία του οργανισμού
- της βιοχημικής ιδιαιτερότητας διαφόρων ιστών και συστημάτων
- βιοχημικών θεμάτων ειδικής σημασίας (διατροφή, άσκηση)



## **ΥΛΗ ΘΕΩΡΙΑΣ ΤΟΥ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ**

### **Ροή των γενετικών πληροφοριών**

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει

- το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας
- το μοντέλο διπλής έλικας και τα είδη διπλής έλικας DNA
- τις ιδιότητες του DNA σε διάλυμα
- τις ανώτερες δομές του δίκλωνου DNA
- την οργάνωση των γονιδίων στο χρωμόσωμα
- τη δομή, τα είδη και το βιολογικό ρόλο του RNA
- το γενετικό κώδικα: ιδιότητες, ιστορικό αποκρυπτογράφησης

### **Εξερευνώντας την εξέλιξη**

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει

- την έννοια της ομολογίας μεταξύ δύο μορίων
- την έννοια της αντιστοίχισης αλληλουχιών και τη χρησιμότητά της
- τη σχέση τρισδιάστατης δομής και εκμαγείων αλληλουχιών
- τις έννοιες της αποκλίνουσας και συγκλίνουσας εξέλιξης
- για τα εξελικτικά δένδρα
- για τις πειραματικές μεθόδους εξερεύνησης της εξέλιξης

### **Αντιγραφή, ανασυνδυασμός και επιδιόρθωση DNA**

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει

- γενικά για τον μηχανισμό της αντιγραφής
- τις ιδιότητες και λειτουργίες των DNA πολυμερασών
- για την υπερελίκωση και τις τοποϊσομεράσες
- την έναρξη αντιγραφής, σύνθεση RNA εκκινητή, σύνθεση DNA, τερματισμό
- τις διαφορές μεταξύ προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών
- για τα τελομερή και την τελομεράση
- γενικά για την επιδιόρθωση
- τους τρόπους πρόκλησης μεταλλάξεων
- τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς

- το τεστ Ames
- για ασθένειες που προκύπτουν λόγω δυσλειτουργίας επιδιορθωτικών μηχανισμών

## **Σύνθεση και ωρίμανση RNA**

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει

- γενικά για το μηχανισμό της μεταγραφής
- για την έννοια του προαγωγέα, τον ρόλο του παράγοντα σ
- για τα ένζυμα που συμμετέχουν στη μεταγραφή
- πώς γίνεται η έναρξη, η επιμήκυνση, και ο τερματισμός σύνθεσης του RNA
- για τις διαφορές της μεταγραφής ανάμεσα σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς
- για τα αντιβιοτικά αναστολείς της μεταγραφής
- για τις ευκαρυωτικές RNA πολυμεράσες
- τα χαρακτηριστικά των ευκαρυωτικών προαγωγέων, ενισχυτών και για το γενικό σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής
- γενικά για την ωρίμανση του προ-mRNA
- για το μάτισμα: μηχανισμός, μικρά πυρηνικά RNA

## **Βιοσύνθεση Πρωτεϊνών**

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει

- τις γενικές αρχές της μετάφρασης του mRNA
- τη δομή και λειτουργία των κυριότερων συστατικών της μετάφρασης
- τον μηχανισμό έναρξης, επιμήκυνσης και τερματισμού της σύνθεσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας: τον ρόλο των μεταφραστικών παραγόντων, την υπόθεση της ταλάντευσης (Wobble), την κατάλυση σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού
- για την πιστότητα και το κόστος της πρωτεϊνοσύνθεσης
- τη σύγκριση της πρωτεϊνοσύνθεσης ανάμεσα στους προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς
- για τους αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης και τη δράση τους ως αντιβιοτικά

## Έλεγχος γονιδιακής έκφρασης

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει

- την έννοια του οπερονίου στους προκαρυωτικούς οργανισμούς
- την ρύθμιση του οπερονίου της λακτόζης
- τη γενική ρύθμιση οπερονίων καταβολιτών μέσω πρωτεΐνης CAP
- τη ρύθμιση οπερονίων μέσω εξασθένησης
- τη δομή της χρωματίνης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς
- τις τροποποιήσεις των ιστονών και την επαναδιαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων
- τους μεταγραφικούς παράγοντες: δομικά χαρακτηριστικά, πρόσδεση στο DNA, διμερισμός, μεταγραφική ενεργοποίηση και καταστολή
- τη ρύθμιση της ενεργότητας των μεταγραφικών παραγόντων
- το εναλλακτικό μάτισμα
- τη ρύθμιση της έναρξης της μετάφρασης
- το παράδειγμα της δράσης των πυρηνικών υποδοχέων και το παράδειγμα της ρύθμισης της ομοιοστασίας του σιδήρου

## Ενδοκυττάρια σηματοδότηση

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει

- το τριαδικό σύστημα μεταγωγής μηνύματος ορμονών με μεμβρανικούς υποδοχείς συζευγμένους με πρωτεΐνες G. και το μηχανισμό δράσης της τοξίνης της χολέρας.
- τους δευτέρους αγγελιοφόρους: χαρακτηριστικά, ποιοι είναι, πώς παράγονται, πώς δρουν, πώς αποικοδομούνται.
- τη δράση της αδενυλικής κυκλάσης: κυκλικό AMP, ενεργοποίηση της PKA.
- για τη δράση της φωσφολιπάσης Cβ: IP<sub>3</sub> και διακυλογλυκερόλη, Ca<sup>2+</sup> και καλμοδουλίνη, ενεργοποίηση της PKC.
- παραδείγματα υποδοχέων ορμονών / αυξητικών παραγόντων που έχουν ενεργότητα κινάσης τυροσίνης.
- τη συνοπτική περιγραφή της μεταγωγής σήματος του EGF και του μονοπατιού των ras-MAP κινασών καθώς και το συσχετισμό μεταξύ των μονοπατιών μεταγωγής σήματος και καρκίνου
- τους υποδοχείς που δρουν μέσω JAKs-STATs : αυξητική ορμόνη, αντιτερφερόνη

## **Βιοχημική Ενδοκρινολογία**

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει καλά:

- τις πεπτιδο-ορμόνες και τις στεροειδείς ορμόνες: χαρακτηριστικά δομής, σύνθεσης, ωρίμανσης και μεταφοράς ορισμένων υποθαλαμικών ορμονών.
- τις ορμόνες υποθαλάμου, υπόφυσης, ενδοκρινών αδένων : ρύθμιση του κυκλώματος μέσω ανάδρομης τροφοδότησης.
- τη ρύθμιση της έκκρισης στεροειδών ορμονών: Δράση ACTH στην παραγωγή κορτιζόλης από φλοιό επινεφριδίων, δράση FSH και LH στην παραγωγή τεστοστερόνης, οιστραδιόλης και προγεστερόνης από γονάδες, πολλαπλή ρύθμιση έκκρισης αλδοστερόνης από φλοιό επινεφριδίων.
- τις κλινικές επιπτώσεις στο συνδρόμου Cushing, της ασθένειας Addison και Graves.
- τις διαταραχές σύνθεσης στεροειδών ορμονών λόγω κληρονομικής έλλειψης ενζύμων. Ανεπάρκεια 21<sup>α</sup>-υδροξυλάσης. Κλινικές επιπτώσεις
- την οικογένεια των υποδοχέων στεροειδών ορμονών: δομή και λειτουργία (συνενεργοποιητές μεταγραφής)

## **Υπενθύμιση μεταβολικών οδών- Βιταμίνες**

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει

- τις κύριες μεταβολικές οδούς που λειτουργούν στον άνθρωπο, τις μεταξύ τους σχέσεις και τις βασικές ρυθμίσεις τους
- την έννοια και τη σημασία των βιταμινών
- όλες τις βιταμίνες, υδατοδιαλυτές και λιποδιαλυτές, καθώς και τη χαρακτηριστική συμμετοχή τους στη λειτουργία του οργανισμού

## **Ορμονική ρύθμιση του μεταβολισμού**

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει

- για τη σύνθεση, ωρίμανση και έκκριση της παγκρεατικής ορμόνης ινσουλίνης
- για τις κύριες δράσεις της ινσουλίνης στο μεταβολισμό σακχάρων, λιπιδίων, πρωτεϊνών
- για τον υποδοχέα ινσουλίνης: δομή, ενεργοποίηση, μεταγωγή σήματος.
- για τον ινσουλινοεξαρτώμενο και μη ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη
- για την παγκρεατική ορμόνη γλυκαγόνη: δομή και δράση

- για τη δράση της επινεφρίνης
- για τη λεπτίνη: που παράγεται, που δρά, πως επηρεάζει το ισοζύγιο καυσίμων και ενέργειας του οργανισμού

## **Βιοχημεία του ήπατος**

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει

- για τις λειτουργίες του ήπατος ως κεντρικό μεταβολικό όργανο και την επικοινωνία του με άλλους ιστούς
- για τις λειτουργίες του ήπατος ως μεταβολικό όργανο των αμινοξέων και των πρωτεϊνών
- για τις λειτουργίες του ήπατος ως μεταβολικό όργανο του αζώτου και της ουρίας
- για τις λειτουργίες του ήπατος ως μεταβολικό όργανο των λιπαρών οξέων
- για τις λειτουργίες του ήπατος στη σύνθεση και αποικοδόμηση του γλυκογόνου καθώς και στη διατήρηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα
- για τις λειτουργίες του ήπατος στο μεταβολισμό της αίμης
- για τις λειτουργίες του ήπατος ως όργανο αποτοξίνωσης

## **Βιοχημεία αίματος**

### **A. Βιοχημεία Πρωτεϊνών Πλάσματος**

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει

- τη σύσταση του πλάσματος και την διαφορά του από τον ορό.
- τις λειτουργίες και την ηλεκτροφορητική κατάταξη των πρωτεϊνών του πλάσματος και τουλάχιστον μια πρωτεΐνη που περιέχεται σε κάθε κλάσμα.
- τη φύση και βιολογικό ρόλο της λευκωματίνης, α1-αντιθρυψίνης, σερουλοπλασμίνης, τρανσφερίνης και γ-σφαιρινών και τις κλινικές επιπτώσεις διαταραχών των επιπέδων ή ενεργότητας των πρωτεϊνών αυτών.
- ότι χαρακτηριστικές αλλαγές στα πρότυπα ηλεκτοφορητικού διαχωρισμού των πρωτεϊνών του πλάσματος είναι ενδεικτικές παθολογικών καταστάσεων.
- τα ένζυμα που περιέχονται φυσιολογικά στο πλάσμα και τη διαγνωστική αξία ενζύμων ιστικής προέλευσης (τρανσαμινασών, LDH, CPK) και των ισοενζύμων τους.
- τις πρωτεΐνες οξείας φάσης και τη C-αντιδρώσα πρωτεΐνη

### **B. Βιοχημεία Αιμόστασης**

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει

- το ρόλο των αιμοπεταλίων στην πήξη του αίματος και ποιές ουσίες προάγουν την ενεργοποίηση και συγκόλλησή τους.
- το ρόλο της φωσφολιπάσης A2, κυκλοξυγονάσης και συνθάσης της θρομβοξάνης στην πήξη του αίματος και το μηχανισμό δράσης της ασπιρίνης.
- τη φύση των παραγόντων πήξεως του αίματος..
- τη δομή του ινωδογόνου και τα στάδια πολυμερισμού του σε θρόμβο διασυνδεδεμένου ινώδους (δράση θρομβίνης, τρανσγλουταμινάσης).
- για τον περιορισμό της πήξεως: αντιθρομβίνη III και ο ρόλος της ηπαρίνης
- για το μηχανισμό της ινωδόλυσης: ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου και πλασμίνη.
- για τις διαταραχές πήξεως λόγω γενετικής έλλειψης παραγόντων (αιμοφιλίες) και για τη θεραπευτική χορήγηση ανασυνδυσασμένων παραγόντων.

### **Λειτουργίες του λιπώδους ιστού**

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει

- για τα είδη, την κατανομή, τη μορφολογία του λιπώδους ιστού
- για τις ιδιότητες του λευκού και φαιού λιπώδους ιστού
- για τις λειτουργίες του λιπώδους ιστού ως αποθηκευτικό όργανο
- για τις λειτουργίες του λιπώδους ιστού ως ενδοκρινές όργανο
- για τη συσχέτιση των λειτουργιών του λιπώδους ιστού με άλλα όργανα
- για το λιπώδη ιστό σε σχέση με τη φλεγμονή
- για το λιπώδη ιστό σε σχέση με την παχυσαρκία

### **Διατροφή και μεταβολισμός**

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει

- για τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία και τη σημασία τους στη διατροφή
- για τα απαραίτητα λιπαρά οξέα και αμινοξέα και τη σημασία τους στη διατροφή
- για τη σημασία των μακροθρεπτικών συστατικών στη διατροφή: πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη
- για τη ρύθμιση της πρόσληψης της τροφής
- για τη σύσταση των διαφόρων συστατικών στην καθημερινή διατροφή (δίαιτες)
- για την υπερκατανάλωση τροφής και τον υποσιτισμό (παχυσαρκία, κακή διατροφή)

- για ειδικές καταστάσεις διατροφής (παιδιά, εγκυμοσύνη, ηλικιωμένοι)
- για παθολογικές καταστάσεις διατροφής

### **Λειτουργίες του μυός**

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει

- για τα είδη, τη δομή και μορφολογία του μυός
- για τις πρωτεΐνες του μυός
- για τη βιοχημεία της μυϊκής συστολής
- για τους διαφορετικούς τύπους μυϊκών ινών
- για τον έλεγχο της μυϊκής λειτουργίας
- για τη σύζευξη διέγερσης-συστολής
- για τα καύσιμα και το οξυγόνο που χρησιμοποιούνται από τους μυς

### **Βιοχημεία της άσκησης**

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει

- για τις ενεργειακές ανάγκες των μυών κατά την άσκηση
- για το μεταβολισμό των διαφόρων ενεργειακών πηγών κατά την άσκηση
- για τις μετατροπές των μυϊκών ινών κατά την άσκηση
- για την χρήση των ενεργειακών πηγών κατά την άσκηση
- για τις προσαρμογές της χρήσης ενεργειακών πηγών σε διάφορες συνθήκες άσκησης
- για την επίδραση της διατροφής στην επιλογή ενεργειακών πηγών κατά την άσκηση
- για τον κάματο (περιφερειακό και κεντρικό)
- για τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της φυσικής άσκησης
- για τη βιοχημική αξιολόγηση των ασκουμένων

## **Βιοχημεία αισθητηρίων οργάνων**

Ο φοιτητής που θα επιτύχει στο μάθημα θα πρέπει να γνωρίζει

- τους νικοτινικούς και μουσκαρινικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης: δομή, ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά και τρόπος δράσης.
- τη βιοχημική βάση της όρασης. Λειτουργία ραβδίων, κωνίων και διαφορές.
- τη σχέση δομής και λειτουργίας της ροδοψίνης, τη μετατροπή των φωτονίων σε νευρικό σήμα και τη προσαρμογή των ραβδίων στο φως
- τη γενετική βάση της έγχρωμης όρασης και του δαλτωνισμού
- για την βιοχημική βάση της όσφρησης και τη μεταγωγή σήματος οσμογόνου
- για την βιοχημική βάση της γεύσης και τους υποδοχείς των γευστικών μορίων
- για την βιοχημική βάση της ακοής.
- για την βιοχημική βάση της αφής.



## Δεξιότητες στα Εργαστήρια του μαθήματος Βιοχημεία II

### Γενικές δεξιότητες

Οι δεξιότητες αποκτώνται κατά την υποχρεωτική παρακολούθηση των εργαστηριακών ασκήσεων και φροντιστηρίων. Ο φοιτητής που θα ολοκληρώσει με επιτυχία τα παραπάνω θα πρέπει να έχει αποκτήσει

- την ικανότητα να παρατηρεί φαινόμενα στο εργαστήριο, να καταγράφει και να αναλύει δεδομένα
- την ικανότητα να βγάζει συμπεράσματα από δεδομένα
- την ικανότητα να λύνει προβλήματα
- την ικανότητα να κατασκευάζει γραφικές παραστάσεις από δεδομένα
- την ικανότητα να εξάγει πληροφορίες από γραφικές παραστάσεις
- την ικανότητα να χειρίζεται τον βασικό εξοπλισμό εργαστηρίου Κλινικής Χημείας και Βιοχημείας
- την ικανότητα να εργάζεται αποτελεσματικά σε μια ομάδα
- την ικανότητα να εργάζεται με ασφάλεια σε εργαστηριακό περιβάλλον
- την ικανότητα να ακολουθεί οδηγίες
- την ικανότητα να αντιλαμβάνεται τα εργαστηριακά λάθη και να αναγνωρίζει τις πηγές τους

### Ειδικές δεξιότητες

Ο φοιτητής θα πρέπει να είναι σε θέση να

- παρασκευάσει γενωμικό DNA από ήπαρ με τη μέθοδο της εκχύλισης με υψηλή συγκέντρωση άλατος.
- προσδιορίσει ποσοτικά DNA με τη μέθοδο της διφαινυλαμίνης και φασματοσκοπικά.
- κατασκευάσει πηκτή αγαρόζης και να διαχωρίσει ηλεκτροφορητικά DNA με βάση το μοριακό του βάρος.
- κρίνει την ποιότητα του DNA που παρασκεύασε
- διαχωρίσει τις λευκωματίνες από τις σφαιρίνες του ορού βάσει της διαφορετικής τους διαλυτότητας σε άλατα
- προσδιορίσει τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο της διουρίας
- προσδιορίσει τη συγκέντρωση της λευκωματίνης με τη μέθοδο της BCG.
- προσδιορίσει την συγκέντρωση άμεσης και έμμεσης χολερυθρίνης σε δείγμα ορού με τη μέθοδο Jendrassik και Grof
- προσδιορίσει τα επίπεδα τρανσαμινασών και ουρίας στον ορό του αίματος

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Α. ΘΕΩΡΙΑΣ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ

***Berg, Tymoczko & Stryer: ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ Τόμοι Ι και ΙΙ (Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης)***

***John W Baynes & Marek H Dominiczak ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ (Επιστημονικές εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε.)***

Επιπλέον, για ορισμένα κεφάλαια-θέματα, είναι πολύ χρήσιμα τα εξής βιβλία στα Ελληνικά:

- 1) *Marks, Marks & Smith: Ιατρική Βιοχημεία – Κλινική Προσέγγιση (Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη)*
- 2) *Koolman & Rohm: Εγχειρίδιο Βιοχημείας (Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσα)*
- 3) *Τρακατέλλης: Βιοχημεία, Τόμος Α, μέρος 2 (3β) και τόμος Β, μέρος 1 (Εκδόσεις Κυριακίδη)*
- 4) *Γεωργάτσος: Ο έλεγχος του μεταβολισμού στο μοριακό επίπεδο (Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη)*
- 5) *Karlson: Βιοχημεία (Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσα)*
- 6) *Karlson, Gerok and Gross: Κλινική Παθολογική Βιοχημεία (Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσα)*
- 7) *Marshall and Bangert : Κλινική Χημεία (Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε. 2011)*

Και τα εξής συγγράμματα στα Αγγλικά:

- 1) *Nelson & Cox : Lehninger Principles of Biochemistry, 4<sup>th</sup> edition (Εκδόσεις Freeman)*
- 2) *Lodish et al: Molecular Cell Biology, 4<sup>th</sup> / 5<sup>th</sup> edition (Εκδόσεις Freeman)*
- 3) *Alberts et al: The Molecular Biology of the Cell, 4<sup>th</sup> edition (Εκδόσεις Garland Science)*
- 4) *Devlin: Biochemistry with Clinical Correlations, last edition (Εκδόσεις Wiley-Liss)*
- 5) *Voet, Voet & Pratt: Fundamentals of Biochemistry. Life at the molecular level, 2<sup>nd</sup> edition (Εκδόσεις Wiley)*
- 6) *Garrett & Grisham: Biochemistry, 3<sup>rd</sup> edition, ISE (Εκδόσεις Thomson.Brooks/Cole)*
- 7) *Elliott & Elliott: Biochemistry and Molecular Biology, 2<sup>nd</sup> edition (Oxford University Press)*
- 8) *Thomas, Christodoulou & Gillham: Wills' Biochemical Basis of Medicine (Εκδόσεις Butterworth-Heinemann)*
- 9) *Lewin: Genes VIII, IΕ (Εκδόσεις Pearson-Prentice Hall)*
- 10) *Reed: Essential physiological Biochemistry. An organ based approach (Εκδόσεις Wiley-Blackell 2009)*
- 11) *Newsholme and Leech: Functional Biochemistry in Health and Disease (Εκδόσεις Wiley-Blackell 2009)*

## **B. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ**

Αρχές Κλινικής Χημείας

Ι.Γ. Γεωργιάτσου – Π.

Εκδόσεις Megatype, (Τελευταία Έκδοση)

Ενζυμολογία

Ι. Γ. Γεωργιάτσου, Τ. Α. Γουψάνη, Δ.Α. Κυριακίδη

Εκδόσεις ΖΗΤΗ 2001

Ιατρική Βιοχημεία (2η έκδοση)

Α. Αρσένη, Β. Δεληγιάννη και Ζ. Ζουλλιέν

Ιατρικές Εκδόσεις Ζήτα, 1991

Πειραματική Βιοχημεία

J. M. Clark, Jr & R. L. Switzer

Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1992

Analytical Biochemistry (2nd edition)

D. J. Holme & Hazel Peck

Longman Scientific & Technical 1993

Basic Biochemical Methods (2nd edition)

R. R. Alexander & J. M. Griffiths

Wiley-Liss, 1993

Clinical Chemistry - Concepts and Applications

S. C. Anderson & S. Cockayne

W. Saunders Co, 1993

Clinical Chemistry - Illustrated Textbook

W. J. Marshall & S. K. Bangert

Elsevier Limited 2008

Experimental Biochemistry

R. L. Dryer & F. G. Lata

Oxford University Press, 1989

Practical Biochemistry - An Introduction to (3rd edition)

D. T. Plummer , McGraw-Hill, 1978

Principles and Techniques of Practical Biochemistry (3rd edition)

U. Wilson & K. H. Goulding,

Edward Arnold, 1986

Textbook of Clinical Chemistry (3rd edition)

N. W. Tietz (editor)

W. B. Saunders Co, 1999

## ΚΑΝΟΝΕΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Για την **ασφάλεια** όλων πρέπει να ακολουθούνται πάντα οι κάτωθι κανόνες:

- 1) **Κανείς** δεν πρέπει να εργάζεται μόνος του στο εργαστήριο χωρίς την παρουσία κάποιου μέλους του προσωπικού.
- 2) Αφήστε εξωτερικά ενδύματα και **ογκώδη αντικείμενα** (π.χ. σάκους) **έξω** από το εργαστήριο ή σε ειδικό χώρο του εργαστηρίου. Σκόρπια πράγματα σε πάγκους και πατώματα μπορεί να προκαλέσουν ατύχημα και υπάρχει κίνδυνος να καταστραφούν και τα ίδια.
- 3) Φοράτε πάντα **ποδιά** μόλις μπειτε στο εργαστήριο.
- 4) **Απαγορεύεται να καπνίζετε**, να τρώτε ή να πίνετε στο εργαστήριο.
- 5) **Διαβάστε το φυλλάδιο που περιγράφει την άσκηση πριν μπειτε στο εργαστήριο** και ακολουθήστε προσεκτικά τις οδηγίες που σας δίνονται για την εκτέλεση κάθε άσκησης. Επειδή συχνά δίνονται επιπλέον προφορικές εξηγήσεις στην αρχή του εργαστηρίου, είναι απαραίτητο να προσέρχεστε εγκαίρως. Αργοπορημένοι φοιτητές δεν θα γίνονται δεκτοί.

Γενική αρχή κάθε πειραματικής δουλειάς: Σκεφθείτε και προγραμματίσετε πριν ενεργήσετε.

- 6) **Μη ρουφάτε** τοξικά αντιδραστήρια με το στόμα - χρησιμοποιείτε τις ri-pumps ή ροίτε που σας δίνονται για χρήση με τα σιφώνια. Αν δεν ξέρετε αν κάτι είναι τοξικό ρωτήστε. Ακόμα καλύτερα: Μη ρουφάτε τίποτα με το στόμα.
- 7) Χρησιμοποιείτε την **απαγωγό εστία** και φορέστε γυαλιά ασφαλείας κάθε φορά που χειρίζεστε πολύ καυστικά αντιδραστήρια, π.χ. πυκνά οξέα ή βάσεις, διαλύματα με αποπνικτικούς ατμούς κ.λ.π.
- 8) **Στρέψτε το στόμιο σωλήνων** που θερμαίνονται **μακριά** από σας και άλλα πρόσωπα. Προσοχή πώς πιάνετε θερμά γυαλικά. Μη φέρετε ποτέ εύφλεκτα υλικά (π.χ. αιθανόλη, αιθέρα) κοντά σε γυμνή φλόγα.
- 9) **Αν χύσετε** κάτι σκουπίστε το αμέσως με χαρτοπετσέτα - βρεγμένοι πάγκοι και πατώματα είναι επικίνδυνα. Αν χύσετε κάτι τοξικό αναφέρετέ το αμέσως στον υπεύθυνο του εργαστηρίου.
- 10) **Προσοχή στην χρήση βιολογικών υγρών**, (αίμα, οροί, κ.λ.π.)-μη ρουφάτε τίποτα με το στόμα, φοράτε γάντια και τοποθετείστε τα μεν αναλώσιμα (π.χ. χαρτικά, πλαστικά) που ήρθαν σε επαφή μαζί τους σε ειδικό σάκο απορριμμάτων, τα δε γυαλικά σε ειδικό δοχείο με απολυμαντικό.
- 11) **Εξουκειωθείτε με την 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.
- 12) Βεβαιωθείτε ότι ξέρετε πού βρίσκονται στο εργαστήριο και πώς χρησιμοποιούνται ο **πυροσβεστήρας, το κουτί πρώτων βοηθειών και τα δοχεία για πλύσιμο ματιών**. Γρήγορη αντιμετώπιση ενός μικρού ατυχήματος μπορεί να εμποδίσει την δημιουργία ενός μεγάλου.
- 13) **Στο τέλος** κάθε άσκησης **αφήστε τον πάγκο σας καθαρό και τακτικό**. Ξεπλύνετε όλα τα βρώμικα γυαλικά και τοποθετείστε τα στα δοχεία για πλύσιμο και ακολουθήστε ό,τι οδηγίες σας δοθούν σχετικά με τα αντιδραστήρια.

# ΑΣΚΗΣΗ 1<sup>η</sup>

## ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

### Θεωρητικό μέρος

Το DNA (δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ) είναι ο φορέας της γενετικής πληροφορίας των ζωντανών οργανισμών. Τα μόρια του DNA είναι πολυμερή νουκλεοτιδίων πουρίνης και πυριμινίδης που συνδέονται μεταξύ τους με 3',5'-φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Η διπλή έλικα του DNA αποτελείται από δύο αλυσίδες πολυνουκλεοτιδίων που συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου οι οποίοι σχηματίζονται ανάμεσα στα ζεύγη αζωτούχων βάσεων αδενίνης-θυμίνης (A-T) και γουανίνης-κυτοσίνης (G-C).

Η **απομόνωση του DNA** σε φυσική κατάσταση είναι αρκετά δύσκολη διότι το μεγάλο μοριακό του βάρος και η διαμόρφωσή του (ιδιαίτερα ασύμμετρο μόριο) το καθιστούν ευαίσθητο σε μηχανικές διασπάσεις της διπλής έλικας (λόγω τριβής, ελκυσμού κ.λ.π), σε μετουσίωση (με θέρμανση  $>80^{\circ}\text{C}$ , ή με χρήση υψηλού ή χαμηλού pH ( $>10$  ή  $<3$ )), ή σε διάτμηση των φωσφοδιεστερικών δεσμών (με ένζυμο όπως η δεοξυριβονουκλεάση (DNάση) –που ευρίσκεται ενδογενώς στα κύτταρα) ή όξινο περιβάλλον (pH  $<2$ ). Γι' αυτό η απομόνωση του DNA γίνεται με όσο πιο ήπιες συνθήκες είναι δυνατόν και αποτελείται από τα εξής απαραίτητα βήματα:

- α) Λύση κυττάρων και απελευθέρωση του DNA από τις κυτταρικές μεμβράνες
- β) Διάσταση του DNA από τις πρωτεΐνες με τις οποίες είναι συνδεδεμένο
- γ) Διαχωρισμός του DNA από άλλα μακρομόρια (πρωτεΐνες, RNA, υδατάνθρακες).

Συνήθως οι κυτταρικές μεμβράνες διασπώνται με ισχυρό απορρυπαντικό π.χ. SDS (δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο), τα σύμπλοκα DNA-πρωτεϊνών αποδιατάσσονται με υψηλή συγκέντρωση άλατος και οι ίνες του DNA καταβυθίζονται επιλεκτικά από την υδατική φάση όπου βρίσκονται διαλυμένες μαζί με RNA και πρωτεΐνες με την προσθήκη πολικού διαλύτη (αιθυλικής αλκοόλης). Κατά την διαδικασία μιας τέτοιας απομόνωσης του DNA η δράση της κυτταρικής DNάσης αναστέλλεται με τη χρήση του SDS που μετουσιώνει το ένζυμο και με την παρουσία του EDTA, μιας χημικής ένωσης που συνδέει δισθενή ιόντα, όπως  $\text{Mg}^{2+}$ , που απαιτούνται για την ενζυμική ενεργότητα της DNάσης.

### Πρακτικό μέρος

#### Υλικά / ομάδα:

- 10g Ηπαρ μόσχου
  - 1 Ψαλίδι ή Ξυράφι
  - 1 Ποτήρι 100ml
  - 1 Επιτραπέζια φυγόκεντρος με 4-6 πλαστικούς σωλήνες
  - 1 Γυάλινη ράβδος
  - 1 Ογκομετρικός κύλινδρος 100ml
  - 1 Κωνική φιάλη 25 ή 50ml
  - 150ml IX διάλυμα φυσιολ. ορού-κιτρικού (σε φιάλη) (IX SSC)
  - 35ml 0,IX διάλυμα » » » (0,IXSSC)
  - 35ml διάλυμα 2,6M NaCl
  - 1 Μαρκαδόρος
- } 4°C

pi-pumps για μικρά και μεγάλα σιφώνια

3 σιφώνια των 1ml

1 » » 2ml

2 » » 5ml

3 » » 10ml

1 δοχείο με πάγο

6 Pasteur πλαστικά

### Για όλη την τάξη:

1 Ομογενοποιητής (Blender)

50ml 3M οξικό νάτριο - 1mM EDTA, pH 7,0

200ml Ισοπροπανόλη

200ml 70% Αιθανόλη

1,5 L 95% Αιθανόλη

1 Αναδευτήρας (Vortex)

4°C

Στη σημερινή άσκηση θα ακολουθήσουμε μια απλή μέθοδο παρασκευής DNA. Όλες οι διαδικασίες επεξεργασίας των δειγμάτων εκτελούνται πάνω σε πάγο, εφόσον είναι δυνατόν.

## ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΗΠΑΡ ΜΟΣΧΟΥ

1. Ζυγίστε 10g μοσχαρίσιο συκώτι σ' ένα ποτήρι. Κόψτε το σε μικρά κομματάκια και ομογενοποιείτε με 40ml κρύου IX SSC (ρυθμιστικού διαλύματος φυσιολογικού ορού-κιτρικού: 0,15M NaCl, 0,015M κιτρικού νατρίου, pH 7,0) στον ομογενοποιητή για 1-2 min.
2. Μοιράστε το ομογενοποίημα σε 4 σωλήνες φυγοκέντρου 10ml/σωλήνα και φυγοκεντρήστε στην επιτραπέζια φυγόκεντρο για 5 min στις 4000 rpm.
3. Προσεκτικά χύστε το υπερκείμενο και διαλύστε το ίζημα (που περιέχει θραύσματα κυττάρων και πυρήνες) πάλι σε 6ml/σωλήνα IX SSC. Φυγοκεντρήστε ξανά για 5 min και πετάξτε πάλι το υπερκείμενο.
4. Προσθέστε 6ml/σωλήνα 2,6M NaCl στο ίζημα και διαλύστε το αναδεύοντας με μια γυάλινη ράβδο για 5 min. (Η υψηλή συγκέντρωση άλατος διασπά τους ηλεκτροστατικούς δεσμούς ανάμεσα στο DNA και τις πρωτεΐνες και έτσι το DNA διαλύεται). Φυγοκεντρήστε για 5 min.
5. Μεταφέρατε προσεκτικά το υπερκείμενο των τεσσάρων σωλήνων σε ένα ογκομετρικό κύλινδρο των 100ml και επιστοιβάξτε, **πολύ προσεκτικά**, τον διπλάσιο όγκο ψυχρής αιθανόλης. Το άσπρο ίζημα που σχηματίζεται ανάμεσα στις δύο υγρές φάσεις είναι το DNA.
6. Για να απομονώσετε το DNA αναδεύστε το αργά με την άκρη μιας γυάλινης ράβδου. Το DNA σχηματίζει ένα "κουβάρι", που μοιάζει να αποτελείται από μακριές "ίνες ζελατινής", στα τοιχώματα της ράβδου. Απομακρύνετε την περίσσεια αλκοόλης πιέζοντας ελαφρά την ράβδο στα τοιχώματα του κυλίνδρου, ώσπου να μην φεύγουν άλλες σταγόνες υγρού από το DNA (η ύπαρξη αλκοόλης εμποδίζει την επαναδιάλυση του DNA).
7. Μεταφέρατε το ίζημα σε κωνική φιάλη που περιέχει 9ml 0,IX SSC (0,015M NaCl - 0,0015M κιτρικό νάτριο, pH 7,0) και αναδεύστε προσεκτικά ώσπου να απομακρυνθεί το DNA από τη γυάλινη ράβδο και να διαλυθεί εντελώς (ελαφριά θέρμανση του διαλύματος βοηθά στην επαναδιάλυση).

8. Μεταφέρατε το διάλυμα σας σε δύο σωλήνες και προσθέστε στον καθένα 0,5ml οξικό νάτριο και 2,7ml ισοπροπανόλης.
9. Ανακατέψτε και φυγοκεντρήστε στις 4000 rpm για 10min.
10. Αποχύστε προσεκτικά το υπερκείμενο, προσθέστε σε κάθε σωλήνα 5ml 70% αιθανόλη, ανακινείστε και φυγοκεντρείστε για 3min στις 4000rpm. Αποχύστε και πάλι το υπερκείμενο.
11. **Απομακρύνετε με προσοχή όσο το δυνατόν περισσότερη αιθανόλη από το ίζημα.** (Για να μην παρεμποδιστεί η επαναδιάλυση).
12. Προσθέστε 1ml 0,1X SSC σε κάθε σωλήνα και διαλύστε το DNA σας. Ενώστε τα διαλύματά σας σε ένα σωλήνα (τελικός όγκος 2ml).

## ΑΣΚΗΣΗ 2<sup>η</sup>

### ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ DNA

#### Θεωρητικό μέρος

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του DNA βασίζεται στην φασματομετρική μέτρηση του σκούρου γαλάζιου προϊόντος ( $\lambda_{\max}=595\text{nm}$ ) που σχηματίζεται σε όξινο περιβάλλον κατά την αντίδραση της 2-δεοξυριβόζης, που ελευθερώνεται κατά την υδρόλυση των πουρινικών νουκλεοτιδίων του DNA, με την διφαινυλαμίνη. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται με την χρήση πρότυπης καμπύλης.

Το DNA χαρακτηρίζεται από της μεταβολές διαφόρων φυσικών ιδιοτήτων του, όπως η ελάττωση του ιξώδους ή η αύξηση της απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας, που παρατηρείται όταν θερμαίνεται σε θερμοκρασία  $>70^{\circ}\text{C}$ , ή υδρολύεται με το ένζυμο DNάση, ή μετουσιώνεται με άλλα μέσα, π.χ. pH 2 ή 12. Οι **αζωτούχες βάσεις του DNA απορροφούν στο υπεριώδες** και η κάθε μία έχει το δικό της φάσμα απορρόφησης το οποίο εξαρτάται από το pH. Το άθροισμα των φασμάτων των βάσεων που βρίσκονται σε ένα νουκλεϊνικό οξύ έχει  $\lambda_{\max}$  στα 260nm και λόγο  $A_{260}/A_{280}$  2:1. Γενικά δεχόμαστε ότι ένα ουδέτερο διάλυμα νουκλεϊνικού οξέος συγκέντρωσης 1mg / ml που δεν παρουσιάζει δευτεροταγή δομή έχει  $A_{260}=20$  σε κυψελίδα πάχους 1cm. Οτιδήποτε αποδιατάσσει τη δευτεροταγή δομή του DNA έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της απορροφητικότητάς του στα 260nm (υπερχρωμικό φαινόμενο). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στη ρήξη των δεσμών υδρογόνου και στην απώλεια των αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαδοχικών αζωτούχων βάσεων που σταθεροποιούν την διπλή έλικα. Το μέσο διάστημα της σχετικής αύξησης στην  $A_{260}$  που παρατηρείται π.χ. με την αύξηση της θερμοκρασίας χαρακτηρίζεται ως σημείο τήξεως ( $T_m$ ) του DNA. Διάφορα DNA έχουν ένα χαρακτηριστικό  $T_m$  που εξαρτάται από την περιεκτικότητά τους σε ζεύγη βάσεων G-C. Όταν ένα διάλυμα DNA που έχει μετουσιωθεί με θέρμανση, αφηθεί να κρυώσει σιγά-σιγά η  $A_{260}$  που εμφανίζει ελαττώνεται (υποχρωμικό φαινόμενο). Αυτό οφείλεται στην επανασύνδεση μονόκλωνων μορίων νουκλεϊνικών οξέων σε δίκλιωνα (που επιτυγχάνεται με την επαναφορά κατάλληλων συνθηκών θερμοκρασίας, pH, ιοντικής ισχύος κ.λ.π.) και η ταχύτητα με την οποία συμβαίνει χρησιμοποιείται στην υβριδοποίηση για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης συμπληρωματικών προς το μονόκλωνο μόριο αλληλουχιών βάσεων σε άλλα νουκλεϊνικά οξέα.

**Έτσι, η απορρόφηση ενός διαλύματος δίκλωνου DNA υπολογίζεται ως  $A_{260}=20$  όταν αυτό είναι σε συγκέντρωση 1mg/ml.**

Μια πολύ συχνή μέθοδος ποιοτικής (αλλά και ποσοτικής) ανάλυσης του DNA είναι η **ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης**, όπου γραμμικά μόρια DNA κινούνται προς την άνοδο (λόγω των αρνητικών φορτίων των φωσφορικών ομάδων του μορίου) με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το βάρος τους (ένα θραύσμα DNA μεγέθους 100 ζευγών βάσεων (bp) θα κινηθεί ταχύτερα από ένα μεγέθους 500bp).

Θραύσματα διαφόρων μεγεθών μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με το μέγεθος των “οπών” του πολυμερούς που εξαρτάται από το ποσοστό αγαρόζης:



## Εύρος διαχωρισμού σε πηκτές διαφόρων περιεκτικότητας σε αγαρόζη

| Ποσό αγαρόζης στην πηκτή (%w/v) | Αποτελεσματικό εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA (kb*) |
|---------------------------------|---|
| 0.3                             | 5-60  |
| 0.6                             | 1-20  |
| 0.7                             | 0.8-10  |
| 0.9                             | 0.5-7   |
| 1.2                             | 0.4-6   |
| 1.5                             | 0.2-3   |
| 2.0                             | 0.1-2   |

\*1kb = 1.000bp

Όταν ένα μόριο είναι κυκλικό (π.χ. πλασμίδιο) τότε εκτός από το βάρος του παίζει ρόλο και η διαμόρφωσή του. Κάτω από τυπικές συνθήκες (πλασμίδιο 3.000 – 10.000bp – αγαρόζη 1%) η υπερελικωμένη μορφή κινείται ταχύτερα από την χαλαρή γιατί είναι πιο συμπίεσμένη και περνά πιο εύκολα μέσα από τα κενά του πολυμερούς. Σε υψηλότερα ποσοστά αγαρόζης (2%) συμβαίνει το αντίθετο γιατί τα κενά είναι πολύ μικρότερα και η χαλαρή μορφή ως πιο ευέλικτη μπορεί να κινηθεί ταχύτερα.

Το DNA γίνεται ορατό μέσα στην πηκτή με τη βοήθεια του **Βρωμιούχου Αιθιδίου**. Αυτή η ένωση εισχωρεί ανάμεσα της βάσεις του DNA (γι'αυτό και είναι καρκινογόνος) και φθορίζει όταν ακτινοβοληθεί με υπεριώδες. Όταν το βρωμιούχο αιθίδιο βρίσκεται σε περίσσεια η ένταση του φθορισμού του θραύσματος DNA είναι ανάλογη με τον αριθμό των βάσεων του (δηλ. με το βάρος του).

Τα μεγέθη (σε bp) των ηλεκτροφορούμενων θραυσμάτων DNA υπολογίζονται με τη βοήθεια **μαρτύρων μοριακών βαρών** που συν-ηλεκτροφορούνται με τα δείγματα και έχουν γνωστά μεγέθη.

### Πρακτικό μέρος

#### 1) ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA

##### α) Με την μέθοδο της διφαινυλαμίνης

##### Αντιδραστήρια

- 0,1X SSC (0,015M NaCl - 0,0015M κίτρικό νάτριο, pH 7,0).
- Αντιδραστήριο διφαινυλαμίνης (2g διφαινυλαμίνης διαλύονται σε 200 ml οξικού οξέος και προστίθενται 5 ml πυκνού θεικού οξέος. Παρασκευάζεται πριν από τη χρήση. (ΠΡΟΣΟΧΗ! ΠΟΛΥ ΚΑΥΣΤΙΚΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ).
- Διάλυμα DNA που παρασκευάσατε.

Σε τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες (1=τυφλό, 2 και 3=δείγματα) προσθέσατε τα κάτωθι:

| Αντιδραστήριο (ml)           | σωλ. 1 | σωλ. 2 | σωλ. 3 |
|------------------------------|--------|--------|--------|
| 0,1X SSC                     | 1,0    | 0,5    | –      |
| Διάλυμα DNA                  | –      | 0,5    | 1,0    |
| Αντιδραστήριο διφαινυλαμίνης | 3,0    | 3,0    | 3,0    |

Αναμείξτε καλά και τοποθετείστε τους σωλήνες σε βραστό νερό για 10 min. Ψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου, μεταφέρατε σε κυψελίδες φωτομέτρου και μετρήστε την απορροφητικότητα στα 595nm.

Από την πρότυπη καμπύλη  $A_{595} / C_{DNA}(\mu\text{g/ml})$  που σας έχει δοθεί είναι δυνατόν να υπολογίσετε τη συγκέντρωση του διαλύματός σας. **Προσοχή!** Οι τιμές που αντιστοιχούν στην απορρόφηση σε DNA αναφέρονται στο αρχικό διάλυμα DNA που μετράται και όχι στο κατεργασμένο με το αντιδραστήριο της διφαινυλαμίνης.

### **β) Φασματοσκοπικά**

Αραιώστε 100μl από το διάλυμα DNA που παρασκευάσατε σε τελικό όγκο 1ml 0,1X SSC (100μl DNA+900μl H<sub>2</sub>O) και μετρήστε την απορρόφηση του αραιωμένου δείγματος στα 260 και 280nm στο φασματοφωτόμετρο υπεριώδους που βρίσκεται στο ερευνητικό εργαστήριο, χρησιμοποιώντας το διάλυμα 0,1X SSC ως τυφλό. Από τις τιμές που θα πάρετε και δεδομένων των στοιχείων που αναφέρονται στην εισαγωγή μπορείτε να υπολογίσετε τη συγκέντρωση του διαλύματός σας.

## **2) ΥΠΟΒΡΥΧΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ**

### **Κατασκευή της πηκτής**

Θα κατασκευαστεί πηκτή αγαρόζης 1% σε ρυθμιστικό διάλυμα 1XTAE (40mM Tris – οξικό pH 7.7, 1mM EDTA). Μία τυπική συσκευή ηλεκτροφόρησης για πηκτές αγαρόζης περιλαμβάνει οριζόντια τράπεζα μεταξύ δύο δεξαμενών για το ρυθμιστικό διάλυμα με ηλεκτρόδια από πλατίνα, και «χτενάκια» που χρησιμεύουν για την δημιουργία των εγκοπών όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματα.

Η αγαρόζη ζυγίζεται και τοποθετείται στον κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος. Το μίγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων ή θερμαντική πλάκα μέχρι πλήρους τήξης της αγαρόζης, και αφού προστεθεί το βρωμιούχο αιθίδιο (0.5μg/ml), αποχύεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Όταν η πηκτή ψυχθεί και στερεοποιηθεί, σκεπάζεται με ρυθμιστικό διάλυμα (~5mm).

### **Προπαρασκευασία των δειγμάτων DNA**

Το DNA που θα ηλεκτροφορηθεί, αναμιγνύεται με μια χρωστική που περιέχει κυανούν της βρωμοφαινόλης και κυανόλη του ξυλενίου προκειμένου η ηλεκτροφόρηση να παρακολουθείται στο ορατό φως, καθώς και 30% γλυκερόλη προκειμένου το δείγμα να βυθίζεται στον πυθμένα της εγκοπής της πηκτής. Αραιώστε την κατάλληλη ποσότητα του DNA μόσχου που παρασκευάσατε (λεπτομέρειες θα σας δοθούν στο εργαστήριο) σε όγκο 25μl και προσθέστε 5 μl χρωστικής.

### **Ηλεκτροφόρηση**

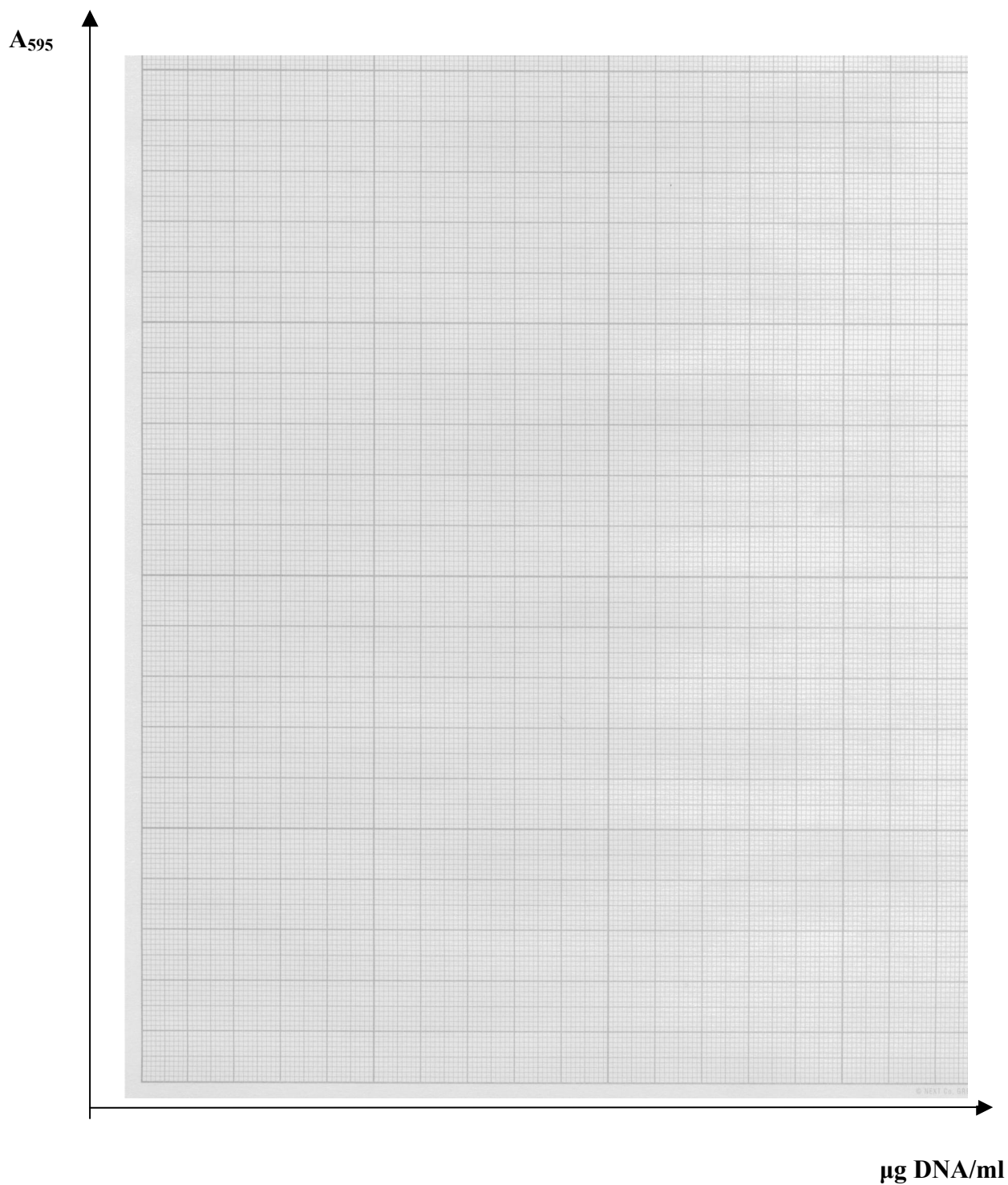
Τοποθετείστε τα δείγματα που ετοιμάσατε καθώς και αυτά που θα σας δοθούν από τους διδάσκοντες στις εγκοπές της πηκτής κάτω από το ρυθμιστικό διάλυμα και ηλεκτροφορέιστε στα 100 Volt για τουλάχιστον 1 ώρα. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης εκθέστε την πηκτή σε υπεριώδη ακτινοβολία χρησιμοποιώντας την λάμπα υπεριώδους και φωτογραφείστε την προκειμένου να αποτυπώσετε τα αποτελέσματά σας.

## ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ 1 ΚΑΙ 2

### 1. Προσδιορισμός της Συγκέντρωσης του DNA

#### α) Μέθοδος Διφαινυλαμίνης

ι) Πρότυπη καμπύλη DNA που δόθηκε.



Υπολογισμός ποσότητας DNA που παρασκευάσατε.

| Αριθμός Σωλήνα | Περιεχόμενο (mL διαλύματος DNA στην αντίδραση διφαινυλαμίνης) | $A_{595}$ | Συγκέντρωση DNA στο αρχικό διάλυμα (μg/ml) | Συνολική ποσότητα DNA που παρασκευάστηκε (μg) |
|----------------|---|-----------|--|---|
| 2              |   |           |  |   |
| 3              |   |           |  |   |

Εξηγείστε τους υπολογισμούς σας.

**β) Φασματοσκοπικά**

Αραίωση διαλύματος DNA που παρασκευάσατε: 100μl DNA σε 1ml H<sub>2</sub>O (1:10)

| $A_{260}$ | $A_{280}$ | $A_{260}/A_{280}$ | Συγκέντρωση DNA στο αραιωμένο διάλυμα (μg/ml) | Συγκέντρωση DNA στο αρχικό διάλυμα (μg/ml) | Συνολική ποσότητα DNA που παρασκευάστηκε |
|-----------|-----------|-------------------|---|--|--|
|           |           |                   |   |  |  |

Εξηγείστε τους υπολογισμούς σας.

**Σχολιάστε τις τιμές συγκέντρωσης του DNA που λάβατε με τις δυο μεθόδους (διαφαινουλαμίνης και φασματοσκοπική)**

## **2. Αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης DNA**

Κολλήστε εδώ την εικόνα της ηλεκτροφόρησής σας

Από τη σχέση απορρόφησης του DNA σας  $A_{260}/A_{280}$  και την εμφάνισή του στην ηλεκτροφόρηση σχολιάστε την ποιότητά του.

## ΑΣΚΗΣΗ 3<sup>η</sup>

### **ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ**

**Σκοπός** της σημερινής άσκησης είναι:

- 1) να διαχωρίσουμε τις πρωτεΐνες δειγμάτων ορού αίματος σε λευκωματίνες και σφαιρίνες με την μέθοδο της εξαλατώσεως
- 2) να προσδιορίσουμε την συγκέντρωση του κάθε κλάσματος καθώς και των ολικών πρωτεϊνών με την μέθοδο της διουρίας.

### **Πρακτικό Μέρος**

#### **Υλικά / ομάδα:**

- 1 Επιτραπέζια φυγόκεντρος με 2 κωνικούς σωλήνες φυγόκεντρο
- 1 Φωτόμετρο με 10 κυβελίδες και 10 δοκιμαστικούς σωλήνες
- 1 Στατό με 2 πλαστικούς σωλήνες αιμολύσεως, Μικροπιπέτα + πλαστικές μύτες
- Πλαστικά γάντια, 2 Σιφόνια των 5ml, 2 Σιφόνια των 2ml , 3 Σιφόνια των 1ml και Pi-pumps για μικρά και μεγάλα σιφόνια
- 30ml 24% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 30ml 0,9% NaCl
- 30ml αντιδραστήριο διουρίας (8g NaOH, 15g τρυγικό καλιο-νάτριο, 5g CuSO<sub>4</sub>, 5g KI και H<sub>2</sub>O έως 1L).
- 15ml αντιδραστήριο BCG (πράσινο της βρωμοκρεζόλης)
- 2 Οροί αίματος

Για όλη την τάξη :

Διαιθλαιθέρας

Αναδευτήρας (Vortex)

### **1) ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΣΕ ΛΕΥΚΩΜΑΤΙΝΕΣ ΚΑΙ ΣΦΑΙΡΙΝΕΣ**

#### **Μέθοδος**

Θα χρησιμοποιήσουμε την μέθοδο της εξαλατώσεως που βασίζεται στη διαφορά στην διαλυτότητα των λευκωματινών και σφαιρινών σε διάλυμα 24% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Σ' αυτήν την συγκέντρωση του άλατος οι σφαιρίνες καθιζάνουν ενώ οι λευκωματίνες παραμένουν στο υδατικό διάλυμα. Για την επιτυχή διεξαγωγή του πειράματος είναι απαραίτητο το διάλυμα του θειικού νατρίου να είναι θερμό και να γίνει καλά η ανάμειξη των αντιδραστηρίων.

Θα σας δοθούν 2 οροί. Για κάθε ορό που θα εξετάσουμε προσθέτουμε σε σωλήνα φυγόκεντρο τα αντιδραστήρια με την εξής σειρά:

1) 5ml 24%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$

2) 0,25ml ορός αίματος

Ανακινούμε **πολύ καλά** και μετά προσθέτουμε:

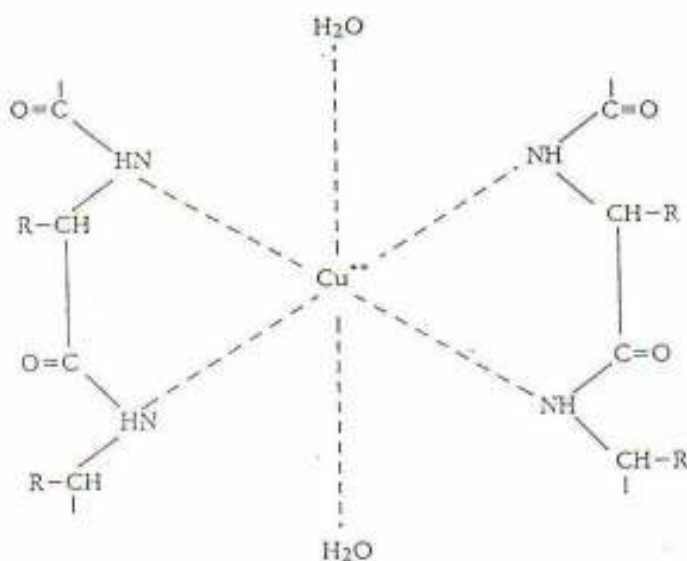
3) 2ml διαιθυλαιθέρα

Αναδεύουμε πάλι **πολύ καλά** και φυγοκεντρούμε σε 2500 rpm (στροφές ανά λεπτό) για 10 min. Η λευκή στοιβάδα που εμφανίζεται στο τέλος της φυγοκέντρωσης ανάμεσα στις δύο φάσεις (την υδατική και του αιθέρα) οφείλεται στις σφαιρίνες που έχουν καθιζάνει. Φυλάγουμε τον σωλήνα για να μεταχειριστούμε την υδατική στοιβάδα (την στοιβάδα υποκείμενη των σφαιρινών) για τον ποσοτικό προσδιορισμό των λευκωματινών, όπως εξηγείται στο 2(β)ι.

## 2) ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΟΡΟΥ

### Μέθοδος

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών θα γίνει με τη μέθοδο της διουρίας (Biuret). Η μέθοδος βασίζεται στο ότι σε αλκαλικό περιβάλλον η διουρία αντιδρά με ιόντα  $\text{Cu}^{2+}$  δίνοντας έγχρωμα παράγωγα. Οι ενώσεις που περιέχουν τουλάχιστον δύο πεπτιδικούς δεσμούς (π.χ. πεπτίδια, πρωτεΐνες) δίνουν θετική την αντίδραση σχηματίζοντας κυανοϊώδη έγχρωμα παράγωγα.



### α) Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών του ορού

Για τον προσδιορισμό των ολικών πρωτεϊνών χρειάζεται να προηγηθεί αραιώση του ορού. Για κάθε δείγμα ορού που θα εξετάσουμε βάζουμε σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα:

5ml 0,9%  $\text{NaCl}$  } (αραιωμένος ορός)  
0,25ml ορός αίματος }

Κατόπιν τοποθετούμε σε 3 δοκιμαστικούς σωλήνες:



| Αντιδραστήριο               | σωλ. 1  | σωλ. 2     | σωλ. 3     |
|-----------------------------|---------|------------|------------|
|                             | (Τυφλό) | (δείγμα 1) | (δείγμα 2) |
| 0,9% NaCl (ml)              | 2       | -          | -          |
| Αραιωμένος ορός (ml)        | -       | 2          | 2          |
| Αντιδραστήριο διουρίας (ml) | 2       | 2          | 2          |

Ανακινούμε το περιεχόμενο των σωλήνων και αφήνουμε σε ηρεμία για 30 min. Μεταφέρουμε σε κυψελίδες και φωτομετρούμε στα 540nm ( $\lambda_{max}$ ) έναντι του τυφλού. Υπολογίζουμε την συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών, σε g/100ml ορού, από την πρότυπη καμπύλη που μας δίνεται. (**Σημείωση:** Λάβετε υπόψη την αραιώση του ορού). Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε λευκωματίνη βοός (1, 2, 6, 10, 15 και 20mg / 2ml δείγματος / 4ml περιεχόμενου σωλήνα).

## β) Προσδιορισμός λευκωματινών ορού

### (i) Με τη μέθοδο της διουρίας

Για να λάβουμε τις λευκωματίνες που περιέχονται στην υποκείμενη στοιβάδα που λάβαμε κατά τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών του ορού, κρατάμε κάθε έναν από τους δύο σωλήνες φυγοκέντρωσης σε γωνία 15° ώστε να απομακρυνθεί η στοιβάδα των σφαιρινών από το τοίχωμα του σωλήνα. Βάζουμε την πιπέτα παράλληλα με το τοίχωμα του σωλήνα στον πυθμένα και αφαιρούμε **προσεκτικά** 2ml. Σκουπίζουμε καλά τα εξωτερικά τοιχώματα της πιπέτας όταν την βγάζουμε από τον σωλήνα, τοποθετούμε τα 2ml κάθε δείγματος σε έναν καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα αντίστοιχα και προσθέτουμε 2ml αντιδραστήριο διουρίας. (Για το Τυφλό χρησιμοποιούμε 2ml 24% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> στο οποίο προσθέτουμε και 2ml αντιδραστήριο διουρίας). Ανακινούμε το περιεχόμενο των σωλήνων και αφήνουμε σε ηρεμία 30 min. Φωτομετρούμε στα 540nm έναντι του τυφλού και υπολογίζουμε την συγκέντρωση των λευκωματινών (g/dL) από την πρότυπη καμπύλη.

| Αντιδραστήριο              | σωλ. 1  | σωλ. 2     | σωλ. 3     |
|----------------------------|---------|------------|------------|
|                            | (Τυφλό) | (Δείγμα 1) | (Δείγμα 2) |
| NaSO <sub>4</sub> 24% (ml) | 2       | -          | -          |
| Υποκείμενη Στοιβάδα (ml)   | -       | 2          | 2          |
| Αντιδρ. Διουρίας (ml)      | 2       | 2          | 2          |

## (ii) Με τη μέθοδο BCG

Η λευκωματίνη προσδιορίζεται συχνά εργαστηριακά κατευθείαν στον ορό με την μέθοδο BCG (πράσινο της βρωμοκρεσόλης) όπου, σε ελαφρά όξινο περιβάλλον, η λευκωματίνη δημιουργεί σύμπλοκο με τον δείκτη, του οποίου το χρώμα αλλάζει από «κίτρινο-πράσινο» σε «πράσινο-μπλέ» (ενώ οι σφαιρίνες δεν αντιδρούν). Για να επαναλάβετε τον προσδιορισμό της λευκωματίνης στα δύο δείγματα ορού που σας δόθηκαν τοποθετείστε σε 4 απολύτως καθαρούς δοκιμαστικούς σωλήνες τα εξής:

| Αντιδραστήριο                      | σωλ. 1  | σωλ. 2    | σωλ. 3     | Σωλ. 4     |
|------------------------------------|---------|-----------|------------|------------|
|                                    | (Τυφλό) | (Πρότυπο) | (δείγμα 1) | (Δείγμα 2) |
| Πρότυπο λευκωματίνης<br>5g/dL (ml) | –       | 0,02      | –          | –          |
| Ορός (μη αραιωμένος)<br>(ml)       | –       | –         | 0,02       | 0,02       |
| Αντιδραστήριο BCG (ml)             | 3,0     | 3,0       | 3,0        | 3,0        |

Ανακινείστε το περιεχόμενο των σωλήνων και επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου 1 λεπτό. (Το χρώμα παραμένει σταθερό για 5 λεπτά). Φωτομετρήστε στα 640 nm έναντι του τυφλού.

Η συγκέντρωση της λευκωματίνης στον ορό υπολογίζεται από τον τύπο:

$$C = 5 \times \frac{A \text{ δείγμα}}{A \text{ πρότυπο}} \quad (\text{g/dL})$$

Η αντίδραση είναι γραμμική μέχρι 7g/dL. Για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αραιώστε τον ορό 1:1 με 0.9% NaCl και επαναλάβετε τον προσδιορισμό.

### γ) Προσδιορισμός σφαιρινών ορού

Το ποσό των σφαιρινών σε κάθε δείγμα ορού υπολογίζεται έμμεσα με αφαίρεση του ποσού των λευκωματινών από το ποσό των ολικών πρωτεϊνών.

$$\text{Σφαιρίνες (g/dL)} = \text{Ολικές πρωτεΐνες (g/dL)} - \text{Λευκωματίνες (g/dL)}$$

## ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΣΚΗΣΗΣ 3

### 1) Διαχωρισμός των πρωτεϊνών του ορού σε λευκοματίνες και σφαιρίνες

Σωλήνας πριν τη  
φυγοκέντρωση

Μέθοδος

Σωλήνας μετά  
τη φυγοκέντρωση

Δείξτε σχηματικά το περιεχόμενο του σωλήνα, πως το επεξεργαστήκατε και το διαχωρισμό που λάβατε μετά τη φυγοκέντρωση. Σχολιάστε τυχόν προβλήματα που παρουσιάστηκαν.

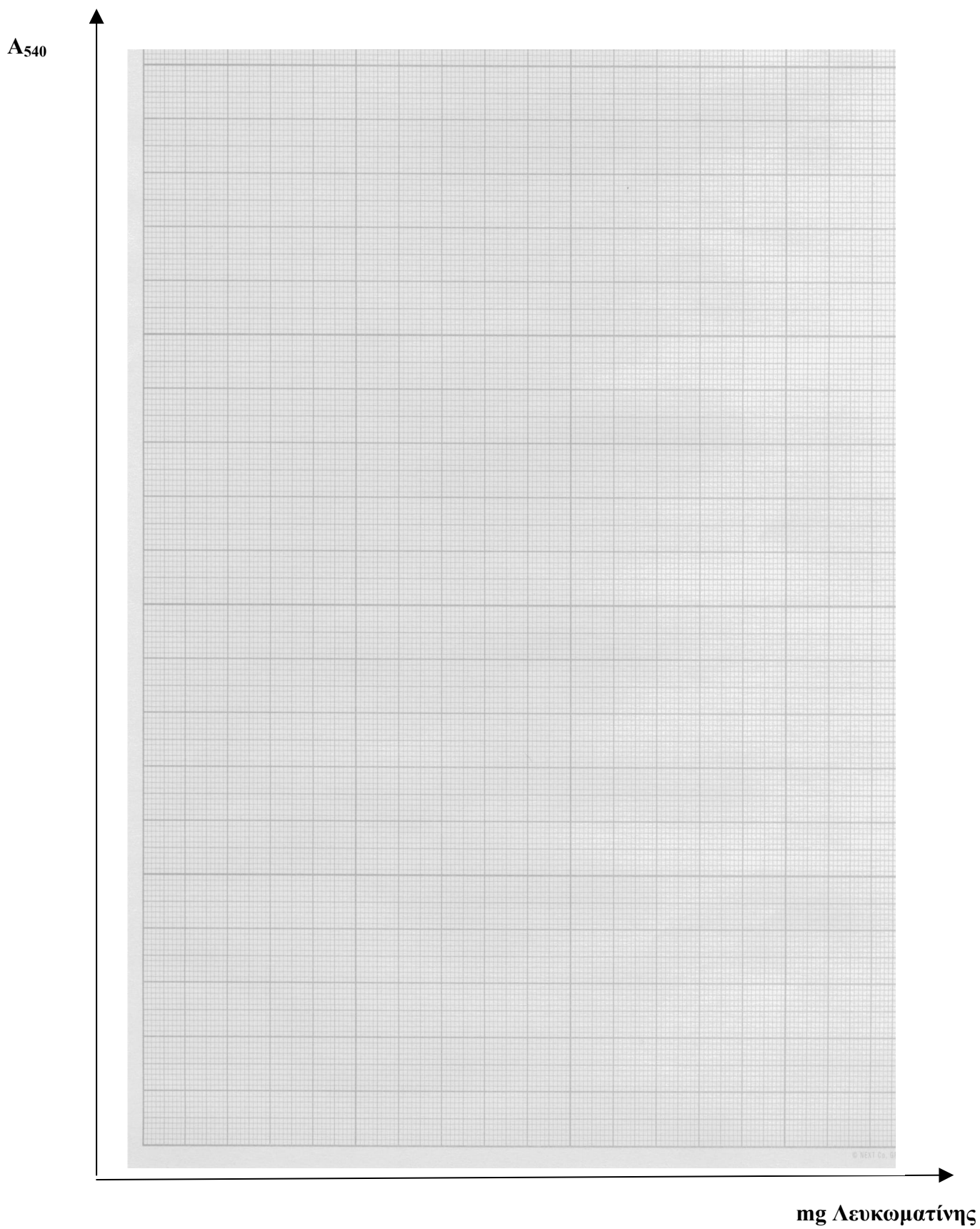
2) Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών του ορού με τη μέθοδο της Διουρίας

i) Πρότυπη καμπύλη Λευκοματίνης

Πίνακας τιμών που σας δόθηκε

| Σωλήνες |                                |                  |
|---------|--------------------------------|------------------|
| Αριθμός | Περιεχόμενο<br>mg Λευκοματίνης | A <sub>540</sub> |
| 1       | 1                              |                  |
| 2       | 2                              |                  |
| 3       | 6                              |                  |
| 4       | 10                             |                  |
| 5       | 15                             |                  |
| 6       | 20                             |                  |

Επισυνάψτε το διάγραμμα που κατασκευάσατε.



ii) Πίνακας αποτελεσμάτων ολικής πρωτεΐνης και λευκωματίνης ορού που λάβατε

| Σωλήνες     |                              |   |                 |
|-------------|------------------------------|---|-----------------|
| Περιεχόμενο |                              |   |                 |
| Αριθμός     | Δείγμα (2ml)                 | + | Διουρία (2ml)   |
|             |                              |   | $A_{540}$       |
|             |                              |   | mg<br>Πρωτεΐνης |
| 1           | Τυφλό                        |   |                 |
| 2           | Ορός α (αραίωση 1: )         |   |                 |
| 3           | Ορός β (αραίωση 1: )         |   |                 |
| 4           | Τυφλό                        |   |                 |
| 5           | Λευκωματίνες α (αραίωση 1: ) |   |                 |
| 6           | Λευκωματίνες β (αραίωση 1: ) |   |                 |

Την ποσότητα ολικών πρωτεϊνών και λευκωματινών ορού που περιέχονται σε κάθε σωλήνα την υπολογίζουμε από την πρότυπη καμπύλη.

Λαμβάνοντας υπόψη την αραίωση των δειγμάτων και ότι χρησιμοποιήσατε 2 ml δείγματος υπολογίστε τη συγκέντρωση

iii) Συγκέντρωση Πρωτεϊνών Ορού

|                  | Δείγμα | mg/ml | g/100ml |
|------------------|--------|-------|---------|
| Ολικές Πρωτεΐνες | α      |       |         |
|                  | β      |       |         |
| Λευκωματίνες     | α      |       |         |
|                  | β      |       |         |
| Σφαιρίνες        | α      |       |         |
|                  | β      |       |         |

Σχολιάστε τα αποτελέσματά σας.

iv) Προσδιορισμός Λευκωματινών ορού με τη μέθοδο BCG

| Σωλήνες     |                        |   |                            |                  |      |
|-------------|------------------------|---|----------------------------|------------------|------|
| Περιεχόμενο |                        |   |                            |                  |      |
| Αριθμός     | Δείγμα (20μl)          | + | Αντιδραστήριο BCG (3.0 ml) | A <sub>640</sub> | g/dL |
| 1           | Πρότυπο Λευκωματίνης   |   | ↓                          |                  |      |
| 2           | Ορός α (μη αραιωμένος) |   | ↓                          |                  |      |
| 3           | Ορός β (μη αραιωμένος) |   |                            |                  |      |

Σχολιάστε το πείραμα και τα αποτελέσματα που πήρατε.

Διαφέρουν οι τιμές λευκωματικών που βρήκατε από τις δύο μεθόδους διουρίας και BCG;

## ΑΣΚΗΣΗ 4<sup>η</sup>

### ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΟΛΕΡΥΘΡΙΝΗΣ ΟΡΟΥ

#### Εισαγωγή

Η χολερυθρίνη είναι το τελικό προϊόν του καταβολισμού της αίμης, μετά την αποβολή του σιδήρου και την σχάση του πρωτοπορφυρινικού δακτυλίου. Περίπου 80% της χολερυθρίνης που σχηματίζεται κάθε ημέρα (400-500 $\mu$ mol, 240-300mg) προκύπτει από την καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων στα κύτταρα του ενδοθηλιακού συστήματος (από 1g αιμοσφαιρίνης παράγονται περίπου 35mg χολερυθρίνης). Η χολερυθρίνη μεταβολίζεται στο ήπαρ αλλά επειδή είναι λιποδιαλυτή (υδρόφοβη) ένωση για να μεταφερθεί στο πλάσμα συνδέεται με την λευκωματίνη. Η μορφή αυτή της χολερυθρίνης ονομάζεται **προηπατική ή ελεύθερη (ασύζευκτη) ή έμμεση χολερυθρίνη** (επειδή δίνει έμμεσα την αντίδραση προσδιορισμού). Στο ήπαρ η χολερυθρίνη αποχωρίζεται από την λευκωματίνη και γίνεται υδατοδιαλυτή (υδρόφιλη) με την δράση του ενζύμου χολερυθρινο-UDP-γλυκουρονυλο-τρανσφεράση, το οποίο την μετατρέπει σε προϊόντα συζευγμένα με υδατάνθρακες (μονο- και διγλυκουρονίδια της χολερυθρίνης). Η μορφή αυτή της χολερυθρίνης ονομάζεται **μεταηπατική ή συζευγμένη ή άμεση χολερυθρίνη** (επειδή δίνει άμεσα την αντίδραση προσδιορισμού). Οι γλυκουρονικοί εστέρες της χολερυθρίνης απεκκρίνονται στη χολή και από κει στο έντερο, όπου μεταβολίζονται από βακτηριακά ένζυμα σε μια ποικιλία προϊόντων (ουροχολινογόνο, κοπροχολινογόνο κ.α.) στην οξειδωμένη μορφή των οποίων οφείλεται το χρώμα των κοπράνων. Ένα πολύ μικρό ποσό ουροχολινογόνου επιστρέφει στην γενική κυκλοφορία και αποβάλλεται με τα ούρα.

Η χολερυθρίνη προσδιορίζεται στον ορό του αίματος με το διαζωταντιδραστήριο του Ehrlich και βρίσκεται κυρίως στην ασύζευκτη ή έμμεση μορφή της. Πρακτικά προσδιορίζονται η ολική και η άμεση χολερυθρίνη και η συγκέντρωσή της έμμεσης προκύπτει υπολογιστικά:

$$\text{ΟΛΙΚΗ ΧΟΛΕΡΥΘΡΙΝΗ} = \text{ΑΜΕΣΗ} + \text{ΕΜΜΕΣΗ ΧΟΛΕΡΥΘΡΙΝΗ}$$

**Η μέτρηση της χολερυθρίνης είναι χρήσιμη στην ανακάλυψη αιμολυτικής αναιμίας και στην διάγνωση ηπατικών παθήσεων.** Αύξηση της έμμεσης χολερυθρίνης παρατηρείται όταν υπάρχει υπερβολική καταστροφή ερυθροκυττάρων (π.χ. οξεία αιμόλυση), αύξηση της άμεσης χολερυθρίνης όταν εμποδίζεται η αποχέτευσή της από το ήπαρ στο έντερο (π.χ. χολόσταση) και αύξηση και των δύο μορφών χολερυθρίνης όταν υπάρχει ηπατοκυτταρική βλάβη, οπότε ελαττώνεται η ικανότητα του ήπατος να συνδέει την χολερυθρίνη και να απεκκρίνει την συνδεμένη χολερυθρίνη στην χολή. Ίκτερος, δηλαδή κίτρινη χρώση του δέρματος και του σκληρού χιτώνα του οφθαλμού που οφείλεται στη εναπόθεση χολερυθρίνης στους ιστούς, παρατηρείται κατά την υπερχολερυθραιμία και όταν η συγκέντρωση χολερυθρίνης στον ορό ξεπερνά τα 3 mg/dl (50  $\mu$ mol/l). Ανάλογα με τις αιτίες που αναφέρθηκαν παραπάνω ο ίκτερος χαρακτηρίζεται σαν αιμολυτικός, αποφρακτικός (χολοστατικός) ή ηπατοκυτταρικός, αντίστοιχα.

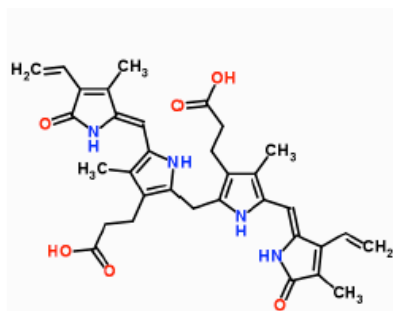
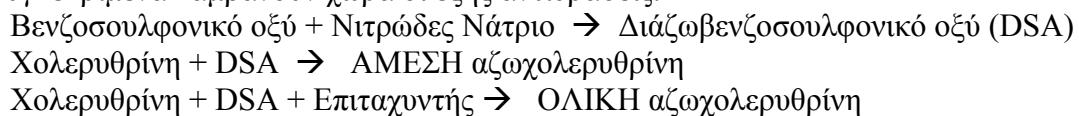
Τα νεογνά έχουν αυξημένα επίπεδα ασύζευκτης χολερυθρίνης στον ορό λόγω της αιμόλυσης μεγάλου αριθμού ερυθροκυττάρων τις πρώτες μέρες ζωής αλλά και λόγω «ανωριμότητας» του ήπατος, δηλαδή μη πλήρους ανάπτυξης ακόμα της ικανότητάς του για σύζευξη – απέκκριση χολερυθρίνης. Ως αποτέλεσμα περίπου 50% των νεογνών εμφανίζουν ένα «φυσιολογικό» ίκτερο τις πρώτες 5 μέρες της ζωής τους



που ονομάζεται νεογνικός ίκτερος. Συνήθως η χολερυθριναιμία κορυφώνεται την 5<sup>η</sup> ημέρα, κυμαίνεται γύρω από τα επίπεδα των 5-6 mg/dl και εξαφανίζεται αυτόματα 10-14 ημέρες μετά τη γέννηση. Είναι δυνατόν, ειδικά αν υπάρχουν επιπλέον λόγοι για αυξημένη αιμόλυση (λόγω έκθεσης σε φάρμακα ή κάποιων συγγενών ανωμαλιών) μερικά νεογνά να εμφανίσουν ιδιαίτερα υψηλή χολερυθριναιμία που ξεπερνά τα 20 mg/dl. Το επίπεδο αυτό θεωρείται ως το υψηλότερο όριο ασφάλειας πάνω από το οποίο ο κίνδυνος πρόκλησης «πυρηνικού ίκτερου» (kern-icterus) και επομένως εγκεφαλοπάθειας από χολερυθρίνη είναι μεγάλος. Αυτό γιατί στα επίπεδα αυτά της χολερυθρίνης η δεσμευτική ικανότητα της λευκοματίνης για την ουσία αυτή ξεπερνιέται με αποτέλεσμα η «ελεύθερη» ασύζευκτη χολερυθρίνη που είναι υδρόφοβη ουσία να περνά μέσα στα κύτταρα του εγκεφάλου και να προκαλεί στα μιτοχόνδρια αποσύζευξη μεταφοράς ηλεκτρονίων – οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Ελάττωση της χολερυθριναιμίας μπορεί να επιτευχθεί με φωτοθεραπεία, δηλαδή με έκθεση του νεογνού σε κυανό φως (το οποίο προκαλεί τη διάσπαση της χολερυθρίνης σε πολικές υδατοδιαλυτές ενώσεις που γρήγορα αποβάλλονται) ή με αφαιμαξο-μετάγγιση.

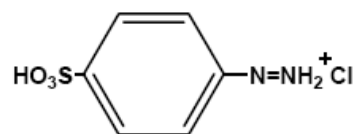
### Χρωματομετρικός προσδιορισμός χολερυθρίνης (μέθοδος JENDRASSIK και GROF)

**Αρχή:** Η χολερυθρίνη αντιδρά με διάζωβενζοσουλφονικό οξύ με την δημιουργία κόκκινου αζωχρώματος (αζωχολερυθρίνης). Η **άμεση (συζευγμένη, μεταηπατική)** χολερυθρίνη, που είναι ευδιάλυτη, δίνει την αντίδραση χωρίς προσθήκη άλλου αντιδραστήριου. Αντίθετα, ο προσδιορισμός της **έμμεσης (προηπατική, ελεύθερη)**, που είναι αδιάλυτη στο νερό, απαιτεί την προσθήκη του αντιδραστήριου καφεΐνης-βενζοϊκού οξέος το οποίο επιταχύνει την αντίδραση. Συγκεκριμένα λαμβάνουν χώρα οι εξής αντιδράσεις:

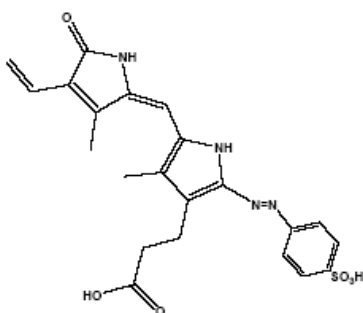


Χολερυθρίνη

+

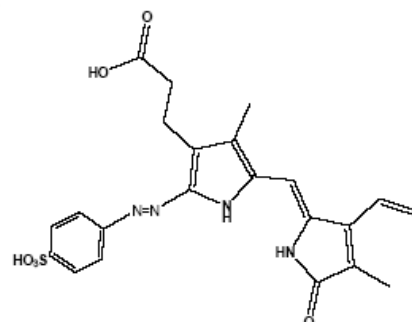


διάζωβενζοσουλφονικό οξύ



Αζωχολερυθρίνη II

+



Αζωχολερυθρίνη I

### Υλικά:

Δείγμα ορού (δεν πρέπει να έχει γίνει αιμόλυση)

6 δοκιμαστικοί σωλήνες

6 πλαστικές κυψελίδες φωτομέτρου

**Αντιδραστήριο 1** (Για προσδιορισμό ΟΛΙΚΗΣ: σουλφονικό οξύ, HCl, καφεΐνη, βενζοϊκό οξύ)

**Αντιδραστήριο 2** (Για προσδιορισμό ΟΛΙΚΗΣ: Νιτρώδες Νάτριο)

**Αντιδραστήριο 3** (Για προσδιορισμό ΑΜΕΣΗΣ: Διάζωβενζοσουλφονικό οξύ, HCl)

**Αντιδραστήριο 4** (Για προσδιορισμό ΑΜΕΣΗΣ: Νιτρώδες Νάτριο)

**Τεχνική:** Προσθέσετε σε δοκιμαστικούς σωλήνες

### Ολική Χολερυθρίνη (OX)

| Αντιδραστήρια (ml)  | Τυφλό | Δείγμα 1 | Δείγμα 2 |
|---|-------|----------|----------|
| Αντιδραστήριο 1   | 1     | 1        | 1        |
| Αντιδραστήριο 2   | –     | 0,04     | 0,04     |
| Αναδεύσατε καλά και επωάστε για 5 λεπτά   |       |          |          |
| Δείγμα ορού   | 0,1   | 0,1      | 0,1      |
| Αναδεύσατε καλά και επωάστε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφέρετε το περιεχόμενο των σωλήνων στις κυψελίδες και μετρήστε την απορρόφηση στα 546 nm έναντι του τυφλού (A <sub>OX</sub> ). |       |          |          |

**Υπολογισμός:** A<sub>OX</sub> X 13 = mg/dl Ολικής χολερυθρίνης

### Άμεση Χολερυθρίνη (AX)

| Αντιδραστήριο (ml)  | Τυφλό | Δείγμα 1 | Δείγμα 2 |
|---|-------|----------|----------|
| Αντιδραστήριο 3   | 1     | 1        | 1        |
| Αντιδραστήριο 4   | –     | 0,04     | 0,04     |
| Αναδεύσατε καλά και προσθέστε το δείγμα   |       |          |          |
| Δείγμα ορού   | 0,1   | 0,1      | 0,1      |
| Αναδεύσατε καλά και επωάστε για <b>5 λεπτά ακριβώς</b> σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφέρετε το περιεχόμενο των σωλήνων στις κυψελίδες και μετρήστε την απορρόφηση στα 546 nm έναντι του τυφλού (A <sub>AX</sub> ). |       |          |          |

**Υπολογισμός:**  $A_{AX} \times 13 = \text{mg/dl Άμεσης χολερυθρίνης}$

**Έμμεση χολερυθρίνη = Ολική χολερυθρίνη - Άμεση χολερυθρίνη**

Φυσιολογικές τιμές σε ενήλικες:

Ολική χολερυθρίνη: 0,1 – 1,1 mg/dl

Άμεση χολερυθρίνη: 0 - 0,25 mg/dl

**Σημείωση:** Η φυσιολογική τιμή ολικής χολερυθρίνης στα νεογνά και βρέφη έως 5 ημερών μπορεί να φθάσει από 5 έως 12 mg/dl, αντίστοιχα

## ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΣΚΗΣΗΣ 4

### Προσδιορισμός Χολερυθρίνης Ορού

#### α) Πίνακας αποτελεσμάτων

| Δείγμα ορού | Ολική Χολερυθρίνη<br>(A <sub>546</sub> ) | Άμεση Χολερυθρίνη<br>(A <sub>546</sub> ) |
|-------------|--|--|
| 1           |  |  |
| 2           |  |  |

#### β) Υπολογίστε την συγκέντρωση χολερυθρίνης σε mg/dl του δείγματος σύμφωνα με τους παράγοντες που δίνονται:

| Δείγμα ορού | Ολική Χολερυθρίνη<br>A <sub>OX</sub> X 13 mg/dl | Άμεση Χολερυθρίνη<br>A <sub>AX</sub> X 13 mg/dl | Έμμεση Χολερυθρίνη<br>OX – AX mg/dl |
|-------------|---|---|-------------------------------------|
| 1           |   |   |                                     |
| 2           |   |   |                                     |

#### γ) Σχολιάστε τα αποτελέσματά σας.

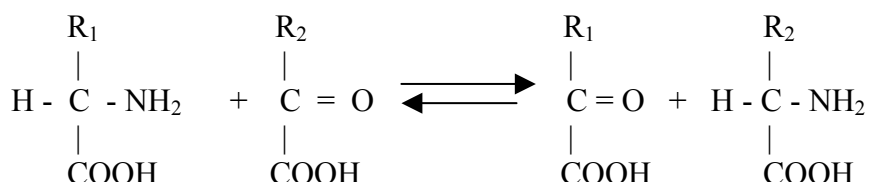
## ΑΣΚΗΣΗ 5<sup>η</sup>

### ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΑΝΣΑΜΙΝΑΣΩΝ - ΟΥΡΙΑΣ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ

#### Θεωρητικό μέρος

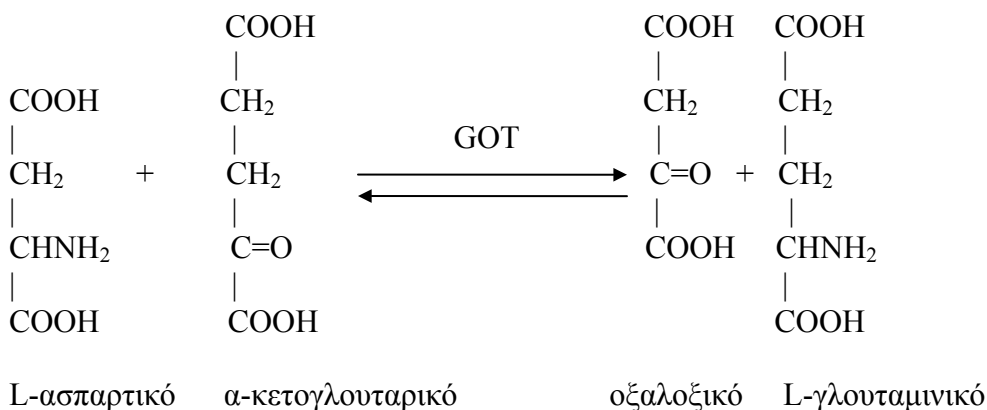
#### Τρανσαμινάσες

Οι τρανσαμινάσες (ή αμινοτρανσφεράσες ή αμινομεταφοράσες) είναι μία κατηγορία ενζύμων που καταλύουν την μεταφορά μιας αμινομάδας από ένα α-αμινοξύ σε ένα α-κετοξύ, παράγοντας το αντίστοιχο α-κετοξύ και α-αμινοξύ κατά την αντίδραση:



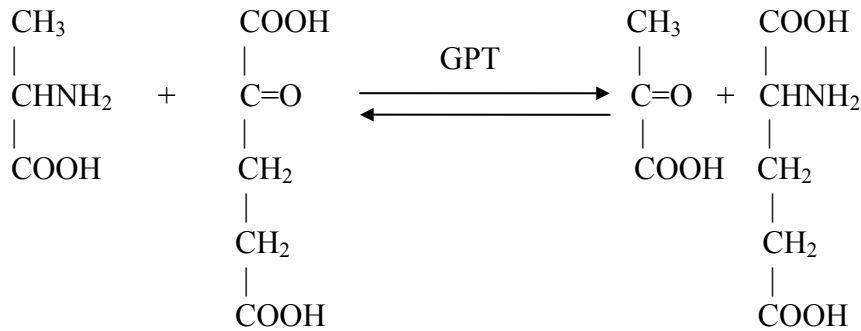
Είναι γνωστός ένας μεγάλος αριθμός τρανσαμινασών. Όλες χρησιμοποιούν σαν συνένζυμο την φωσφορική πυριδοξάλη (βιταμίνη B<sub>6</sub>) και οι περισσότερες χρησιμοποιούν το α-κετογλουταρικό ως δέκτη των αμινομάδων. Δύο ένζυμα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον από την σκοπιά της κλινικής χημείας: Η ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (αμινομεταφοράση) ή γλουταμινική-οξαλοξική τρανσαμινάση (GOT ή AST) και η αμινοτρανσφεράση (αμινομεταφοράση) της αλανίνης ή γλουταμινική-πυροσταφυλική τρανσαμινάση (GPT ή ALT). Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται σε όλους τους ιστούς αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο ήπαρ, καρδιακούς και σκελετικούς μύς και νεφρούς. Όταν ένας ιστός υποστεί βλάβη ή νέκρωση των κυττάρων επιτρέπει την είσοδο των τρανσαμινασών αυτών στο αίμα κι έτσι η συγκέντρωσή τους στον ορό αυξάνεται πάνω από τα φυσιολογικά επίπεδα (3-20 IU/L). Σύγκριση της αύξησης SGOT/SGPT (S: Serum) είναι ενδεικτική του οργάνου που υπέστη βλάβη.

Η GOT καταλύει την αντίδραση:



Η ενεργότητα του ενζύμου αυτού στον ορό αυξάνεται σε ηπατικές παθήσεις (οξεία ηπατίτιδα, κίρρωση, καρκίνωμα, αποφρακτικός ίκτερος), καρδιακές παθήσεις (έμφραγμα του μυοκαρδίου, αρρυθμία, περικαρδίτιδα) και σε άλλες περιπτώσεις (νεφρική ή πνευμονική εμβολή, μυϊκή δυστροφία κλπ). Χαρακτηριστική είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της GOT στον ορό 24-48 ώρες μετά από έμφραγμα, καθώς και η αύξηση της GOT και της GPT στην οξεία ηπατίτιδα.

Η GPT καταλύει την αντίδραση:



L-αλανίνη

α-κετογλουταρικό

πυροσταφυλικό

L-γλουταμινικό

Η ενεργότητα του ενζύμου αυτού στο ορό αυξάνει κυρίως σε ηπατοχολικές παθήσεις.

## Ουρία

Η ουρία είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού του αζώτου στον άνθρωπο και στους άλλους ουριοτελικούς οργανισμούς. Η ουρία συντίθεται στο ήπαρ σε ένα κυκλικό δρόμο (κύκλος ουρίας) όπου δύο αμινομάδες, που προέρχονται από αμινοξέα (με την μορφή αμμωνίας και ασπαρτικού), ενώνονται με ένα μόριο CO<sub>2</sub> και εξέρχεται ένα μόριο ουρίας. Έτσι η αμμωνία, μια τοξική ένωση που παράγεται κατά τον καταβολισμό αζωτούχων ενώσεων, μετατρέπεται σε μία μη τοξική, υδατοδιαλυτή ένωση που μεταφέρεται με την κυκλοφορία από το ήπαρ στους νεφρούς και αποβάλλεται με τα ούρα.

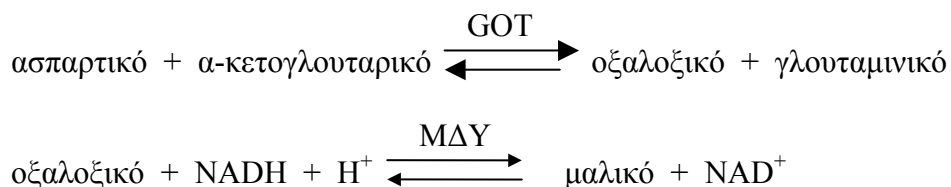
Η συγκέντρωση της ουρίας στον ορό του αίματος είναι φυσιολογικά 15-40mg/dl, αλλά αυξάνεται σε διάφορες προνεφρικές (καρδιακή ανεπάρκεια, shock), νεφρικές, ή μετανεφρικές παθήσεις (απόφραξη ουρητήρων). Όταν υπάρχει βαριά βλάβη των ηπατοκυττάρων τότε παρατηρείται ελάττωση της ουρίας στον ορό του αίματος. Επομένως τα επίπεδα της ουρίας στο αίμα αντικατοπτρίζουν την λειτουργικότητα διαφόρων οργάνων (ήπατος, νεφρών κτλ).

## Εργαστηριακό μέρος

Θα προσδιορίσετε την ενεργότητα των δύο τρανσαμινασών (GOT και GPT) και την συγκέντρωση ουρίας σε δείγμα ορού που σας δίνεται.

### 1) Χρωματομετρικός προσδιορισμός της GOT

**Αρχή:** Η δραστηριότητα του ενζύμου θα προσδιοριστεί με τη χρήση δύο συζευγμένων αντιδράσεων και την μέτρηση της ελάττωσης της ανηγμένης μορφής του συνενζύμου  $\text{NAD}^+$ . Στις συζευγμένες αντιδράσεις το προϊόν του πρώτου ενζύμου αποτελεί το υπόστρωμα του δεύτερου. Το οξαλοξικό, που παράγεται από το ασπαρτικό με την δράση της GOT, μετατρέπεται σε μηλικό με την δράση της μηλικής δεϋδρογονάσης, παρουσία  $\text{NADH}$ . Στις συζευγμένες αυτές αντιδράσεις η ταχύτητα μετατροπής του  $\text{NADH}$  σε  $\text{NAD}^+$  είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της GOT στο δείγμα.



Η ποσότητα του  $\text{NAD}^+$  μπορεί να υπολογιστεί από την μείωση της απορρόφησης του  $\text{NADH}$  στα 340nm.

#### Τεχνική:

Σε ένα φωτομετρικό σωλήνα τοποθετήστε 0,3 ml ορού και 3,0 ml αντιδραστήριου. Ως τυφλό χρησιμοποιήστε απεσταγμένο νερό. (Το αντιδραστήριο, που έρχεται έτοιμο σε kit, περιέχει σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα τα υποστρώματα ασπαρτικό και  $\alpha$ -κετογλουταρικό, το ένζυμο μηλική δεϋδρογονάση και το  $\text{NADH}$ ). Αναδεύστε το περιεχόμενο του σωλήνα και μετρήστε την απορροφητικότητα του δείγματος στα 340 nm ακριβώς μετά από 1, 2, 3 και 4 λεπτά. Υπολογίστε την  $\Delta A$  340nm/min. (Αν είναι μεγαλύτερη από 0,16 αραιώστε τον ορό 1:5 με 0,9% NaCl και επαναλάβετε την μέτρηση).

#### Υπολογισμός ενεργότητας GOT

$$\text{U/L} = 1746 \times \Delta A \text{ 340 nm/min} \quad \mu\text{Kat/L} = 29,11 \times \Delta A \text{ 340 nm/min}$$

#### Φυσιολογικές τιμές (στους 25°C)

Ανδρες: έως 18 U/L ή έως 0,3  $\mu\text{Kat/L}$

Γυναίκες: έως 15 U/L ή έως 0,25  $\mu\text{Kat/L}$

**Σημείωση:**  $\text{U(IU)}$  = Διεθνής μονάδα = ποσό ενζύμου που προκαλεί την μετατροπή 1,0  $\mu\text{mole}$  υποστρώματος ανά λεπτό στους 25°C.

1 μικρό – katal (μκ) = ποσό ενζυμικής ενεργότητας που μετατρέπει ένα μmole υποστρώματος σε ένα δευτερόλεπτο, κάτω από συνθήκες ενζυμικού κορεσμού. Εκφράζεται σε μmole\*sec<sup>-1</sup>

## 2) Χρωματομετρικός προσδιορισμός της GPT

Είναι παρόμοιος της GOT με την διαφορά ότι το πυροσταφυλικό, που παράγεται από την αλανίνη με την δράση της GPT, μετατρέπεται σε γαλακτικό με την δράση της γαλακτικής δεϋδρογονάσης παρουσία NADH. Ακολουθήστε την ίδια τεχνική (προσθήκη 3,0 ml αντιδραστηρίου σε 0,3 ml ορού και μέτρηση της A στα 340 nm μετά από 1, 2, 3 και 4 λεπτά) και υπολογίστε την ενεργότητα της GPT όπως πριν.

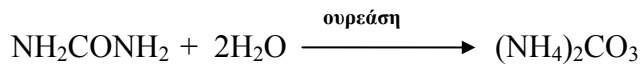
### Φυσιολογικές τιμές (στους 25°C)

Άνδρες: έως 22 U/L ή έως 0,36 μKat/L

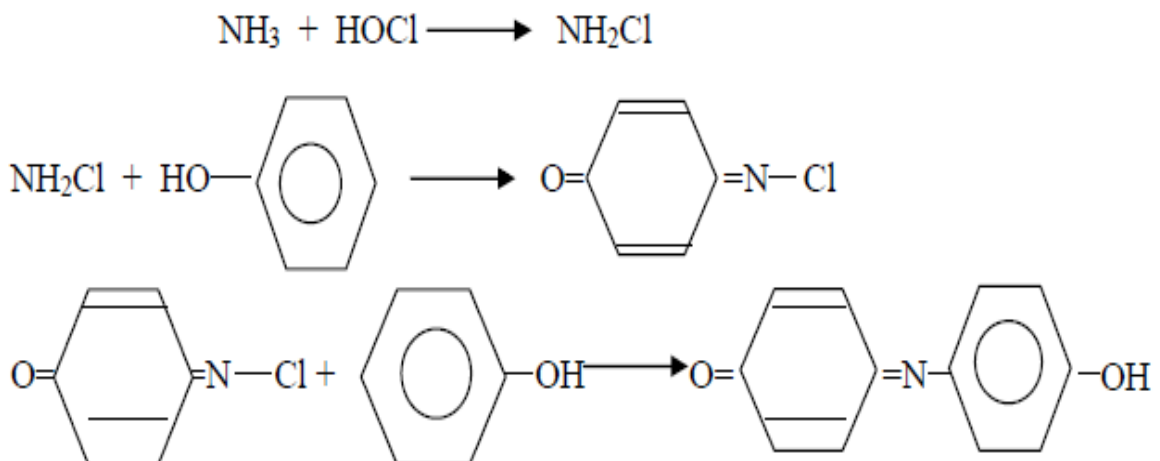
Γυναίκες: έως 17 U/L ή έως 0,28 μ Kat/L

## 3) Ποσοτικός προσδιορισμός της ουρίας στον ορό (Μέθοδος Berthelot)

Για τον προσδιορισμό της ουρίας χρησιμοποιούνται δύο είδη μεθόδων, χημικές ή ενζυμικές. Η χημική μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση των αμινομάδων της ουρίας με τις κετομάδες της διακετυλομονοξίμης και τη δημιουργία ενός έγχρωμου προϊόντος. Επειδή η αντίδραση αυτή δεν είναι ειδική για την ουρία προτιμάται η μέθοδος κατά την οποία το ένζυμο ουρεάση υδρολύει την ουρία προς ανθρακικό αμμώνιο:



Τα ιόντα αμμωνίου αντιδρούν με υποχλωριώδες νάτριο και φαινόλη, παρουσία νιτροπρωσσικού νατρίου, παράγοντας ινδοφαινόλη. Η ένωση αυτή σε αλκαλικό περιβάλλον έχει μπλέ χρώμα, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ουρίας στον ορό. Οι αντιδράσεις είναι οι ακόλουθες:





**Μέθοδος:**

Σε τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες φωτομέτρου τοποθετήστε τα κάτωθι:

| Αντιδραστήρια         | σωλήνας    | σωλήνας    | σωλήνας    |
|-----------------------|------------|------------|------------|
|                       | <b>1</b>   | <b>2</b>   | <b>3</b>   |
| <b>(ml)</b>           | <b>(Γ)</b> | <b>(Π)</b> | <b>(Δ)</b> |
| H <sub>2</sub> O      | 0,1 ml     | --         | 0,1 ml     |
| Πρότυπο ουρίας 4 mg % | --         | 0,1 ml     | --         |
| Ορός                  | --         | --         | 0,01 ml    |
| Ουρεάση               | 50 μl      | 50 μl      | 50 μl      |

Ανακινήστε τα σωληνάρια και επώαστε για 10' σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια τοποθετήστε τα εξής αντιδραστήρια:

| <b>(ml)</b>    | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> |
|----------------|----------|----------|----------|
| Φαινόλη - NaOH | 2,5 ml   | 2,5 ml   | 2,5 ml   |
| NaOCl          | 2,5 ml   | 2,5 ml   | 2,5 ml   |

Ανακινήστε μετά την προσθήκη του τελευταίου διαλύματος και επώαστε τα σωληνάρια άλλα 15' (λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου. Μετρήστε την Α του δείγματος και του προτύπου έναντι του τυφλού σε μήκος κύματος 550nm.

**Υπολογισμός:**

Οι τιμές της ουρίας στον ορό υπολογίζονται ως εξής:

$$\frac{A_{550} \text{ δείγμα}}{A_{550} \text{ πρότυπο}} \times 40 = \text{mg ουρίας/100ml (mg \%)}$$

**Φυσιολογικές τιμές:**

15-40 mg/dL (2,5-6,6 mmol/L)

## ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΣΚΗΣΗΣ 5

### 1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ GOT

| min | A <sub>340</sub> ορού |
|-----|-----------------------|
| 1   |                       |
| 2   |                       |
| 3   |                       |
| 4   |                       |

$\Delta A_{340} / \text{min} =$

Ενεργότητα GOT:

U / L =

$\mu\text{Kat} / \text{L} =$

**Ερώτηση:**

Ποιος είναι ο ρόλος της μηλικής δεϋδρογονάσης σ' αυτή την αντίδραση;

## 2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ GPT

| min | A <sub>340</sub> ορού |
|-----|-----------------------|
| 1   |                       |
| 2   |                       |
| 3   |                       |
| 4   |                       |

$$\Delta A_{340} / \text{min} =$$

Ενεργότητα GPT:

$$U / L =$$

$$\mu\text{Kat} / L =$$

**Ερώτηση:**

Ποιος είναι ο ρόλος της γαλακτικής δεϋδρογονάσης σ' αυτή την αντίδραση;

## 3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΥΡΙΑΣ (Μέθοδος Berthelot)

|      | A <sub>550</sub> |
|------|------------------|
| Ορός |                  |

Υπολογισμός:

$$\text{mg \%} =$$

$$\text{mmol} / L =$$

**ΠΙΝΑΚΑΣ:**

|      | <b>GOT</b> |        | <b>GPT</b> |        | <b>Ουρία</b> |        |
|------|------------|--------|------------|--------|--------------|--------|
|      | U/L        | μKat/L | U/L        | μKat/L | mg %         | mmol/L |
| ορός |            |        |            |        |              |        |

**Σχολιάστε τα αποτελέσματά σας:**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στην συγγραφή των εργαστηριακών ασκήσεων μας βοήθησε η πρόσβαση σε παρόμοιες ασκήσεις των κάτωθι εργαστηρίων, τους διευθυντές των οποίων και ευχαριστούμε.

Εργ. Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής,  
Αριστ. Παν. Θεσσαλονίκης (Καθ. Α.Τρακατέλλης)

Εργ. Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής,  
Παν. Ιωαννίνων (Καθ. Ο. Τσόλας)

Εργ. Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής,  
Κ. Παν. Αθηνών (Δρ Θ. Κεφαλάς και Δρ Γ. Παλαιολόγος)

Εργ. Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας,  
Αριστ. Παν. Θεσσαλονίκης (Καθ. Ι. Γ. Γεωργάτσος)

Εργ. Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας,  
Παν. Πατρών (Καθ. Κ. Τσίγγανος)

Dept. of Biochemistry, King's College,  
University of London (Profs. H. Arnstein M. Scrutton & B. Halliwell)