

תהליכי הפרדה 1 - מעבדה

מיצוי

חלבונים

מיצואם

ביולוגיה

| | |
|---------------|--------------|
| 271040320 / 1 | מס' קבוצה |
| בקי לביא | שם המנחה |
| 14-16.1.07 | תאריך המעבדה |

סקר ספרות

הפקת אסקורבט פרוקסידאז מ- Rough Endoplasmic Reticulum של תאי דלעת¹:

מאמר זה עוסק בהשערה כי נגזרות של פראוקסידאזות של דלעת קיימים בסוג מסוים של ה-RER של תאי דלעת.

בבדיקות אימונופלורנסציה התגלה כי קיימת סבירות גבוהה כי ריכוז גבוה של אנזימים אלו קיימים בסוג מסוים של ה-RER של תאי דלעת, כדי לאמת הנחה זו בוצעה פרקציונציה של התאים במפל צפיפויות, כאשר אברוני התאים הופרדו ובוצעה בכל פרקציה בדיקת פעילות אנזימטית ע"י cytochrome c oxidase, בבדיקה נוספת של immunoblot analyses התברר כי באותן פרקציות שהראו פעילות אנזימטית מקסימאלית נכחו פולי פפטידים בעלי מסה מולקולארית של 31KD, בבדיקה נוספת במיקרוסקופ אלקטרוניים התברר כי אברונים אלו הם פראוקסידזומים והאנזימים זהו כנגזרות של פרוקסידאז.

הפקה וטיהור של נגזרת של פרוקסידאז מדלעת²:

פרוקסידאז מסוג *Short-Chain Acyl-Coenzyme A Oxidase*, זוהה ובודד מדלעת בשרשרת כרומטוגרפיות להלן: Phenyl-Supherose, hydroxyapatite, Hi-Trap Blue, and Mono S columns, עד להגעה לרמה של פעילות אנזימטית של $71.7 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, ע"י הרצה ע"י SDS-PAGE וזיהוי חלבונים נעשה ע"י immunoblotting + SILVER STAINING, בדיקות אלו העלו כי מדובר באנזים בעל מסה מולקולארית של כ-47KD, ומזוהה ע"י אנטיסרום כנגד פראוקסידאז דלעת (ACOX), תהליך זה הוכח כיעיל לנוכח תוצאותיו.

הפקה וטיהור של פרוקסידאזות מתוך ממבראנות גליקוסומיות ופרוקסיזומיות של עלי דלעת³:

מאמר זה עוסק בבידודו והפקתו של אנזים אסקורבט פרוקסידאז במשקל 31KD מתוך ממבראנות של עלי דלעת, באמצעות כרומטוגרפיה SDS-PAGE בודדו גליקוסומים מממבראנות העלים, לאחר מכן ביצעו אלקטרופורוזה ע"י ג'ל פוליאקרילאמיד בשיטת Laemmli, לאחר מכן החלבון בודד ע"י חיתוך פרוטאוליטי של אנזים שמקורו בחיידקי סטפילוקוקוס V8.

לאחר מכן ביצעו הרצה נוספת ב- SDS-PAGE בתוספת בופר טריס-טריצין, ושוב עברו אלקטרופורוזה הפעם על משטח PVDF. הפפטידים נצבעו לצורך זיהוי ב- Coomassie brilliant blue, והחלבונים המסומנים התאימים נחתכו ע"י תער, זיהוי רצפי החלבונים נעשה ע"י דגרדציית אדמן ב- protein sequencer, בידוד הפרוקסיזומים נעשה ע"י צנטריפוגה גרדיאנט PERCOLL ולאחר מכן בצנטריפוגת מפל צפיפויות ע"ב סוכרוז.

הפעילות הספציפית של הפרוקסידאז בסוף התהליך גדלה פי 5 ביחס לתחילת התהליך, דבר המצביע על יעילות התהליך.

זוהו 3 איזומרים של פרוקסידאז בעלי הדלעת.

מטרות המעבדה:

1. הכרת שיטות למיצוי הפרדה וניקוי של חלבונים.
2. אפיון חלבונים בעזרת אלקטרופורוזה.
3. השוואת ריכוזי האנזים פרוקסידאז בעלים מסוגי צמחים שונים.
4. בדיקת פעילות ספציפית ויעילות הניקוי בשלבי ההפרדה השונים.
5. מיצוי פראוקסידאזות מעלי זלעת.

מבוא:**פרוקסידאז**

אנזימי הפרוקסידאז השונים הם קבוצת חלבונים אשר מזרזים תגובות חמצון חיזור, מולקולות רעילות כגון "superoxide" ורדיקלים של הידרוקסידים נמצאים בתאים בשל נוכחות חמצן, תרכובות אלו הינם תוצאי לוואי הנוצרים בנשימה אווירנית ומפורקים על ידי הסוגים השונים של הפרוקסידאז. H_2O_2 (hydrogen peroxide) הינו סובסטרט לרוב סוג הפרוקסידאז והוא מחוזר למים על ידי מולקולה מחזרת והאנזים המזרז את התגובה, הריאקציה מתוארת להלן:



לאנזימי הפרוקסידאז קופקטור, מולקולה הקשורה לאנזים והכרחית לקטליזה של הריאקציה, מולקולה זו הינה מולקולת Hemme, קומפלקס המכיל טבעת אימידזולית ויון ברזל המשמש כקולט חמצן.

חומרים ושיטות**רכוז וצנטריפוגה**

צנטריפוגה מסתמכת על הגברת השיקוע של חלקיקים אשר שונים בצפיפותם מאשר המדיום הסובב אותם על ידי הפעלה של כוח צנטריפוגלי, הכוח הפועל על החלקיקים פרופורציוני לגודלם ולכן כאשר בתמיסה חלקיקים בעלי גדלים שונים, החלקיקים הגדולים יקדימו לשקוע, ע"פ ניסויים אמפיריים וידע מוקדם ניתן לדעת את המהירות וזמן הסרכוז הדרוש על מנת לשקע חומר רצוי או לשקע חומרים בלתי רצויים ולהשתמש בפאזה העליונה המתקבלת, ההחלטה תלויה בחומר אותו אנו רוצים להפיק ומהסביבה ממנה אנחנו מפיקים אותו. יתרונות ההפרדה בצנטריפוגה באים לידי ביטוי בכך שזמני ההפרדה קצרים, ניתן לקבל ניצולת הפרדה גדולה כאשר שולטים בצורה מושכלת על הטמפ' זמן הפעולה מהירות הסיבוב ושאר תנאי התהליך, בנוסף בהפרדה צנטריפוגלית אין צורך במרכיבים כימיים אשר יזהמו לנו את התוצר הרצוי.

הפרדת חלבונים על סמך מסיסות- שימוש במלח אמוניום סולפאט

לכל חלבון יש מטען חשמלי הנקבע עפ"י הרכב חומצות האמינו שלו ועפ"י ה-pH שבו התמיסה בה הוא מצוי. לחלבונים יש צורה מרחבית תלת ממדית שלפיה נקבע אילו חומצות אמינו חשופות לסביבה ואילו "חבויות" בפנים החלבון. הקבוצות הצדדיות של חומצות האמינו יכולות להיות בעלות מטען שלילי, חיובי או ניטרלי. לחלבונים שונים בתמיסה נתונה הרכב שונה של חומצות אמינו החשופות לסביבה ולכן המטען החשוף למדיום שונה, חלבונים בעלי אזורים שלהם מטענים מנוגדים יימשכו זה לזה. המסיסות של חלבונים נקבעת לפי המידה שבה חלבונים נמשכים אחד לשני. ככל שהחלבונים נמשכים יותר אחד לשני מסיסותם תקטן מפני שהם יוצרים מצבורים גדולים שאינם מסיסים. ניתן לשלוט על מסיסות החלבונים בתמיסה על ידי הוספת מלח, במקרה שלנו אמוניום סולפאט, להוספתו שתי השפעות אפשריות:

- הגברת מסיסות - הוספת כמויות קטנות של אמוניום סולפאט תגביר את המסיסות של החלבון מכיוון שיוני המלח יוצרים אינטראקציה עם האזורים הטעונים שעל פני החלבון ובכך מנטרלים את המטען שעל פני החלבון. (SALTING IN)
- הקטנת מסיסות - הוספה של כמויות מלח מעבר לנקודה קריטית מסוימת תגרום להשפעה הפוכה ותגרום להורדת מסיסות החלבונים. (SALTING OUT)

ניתן להשתמש בהשפעת האמוניום סולפאט על מסיסות החלבון על מנת לבודד אותו. לכל חלבון יש ריכוז מלחים מסוים שגורם לשקיעתו וניתן להשתמש בעובדה זו על מנת להשקיע חלבון ספציפי מתוך תמיסה המכילה חלבונים רבים. לשיטת השיקוע באמוניום סולפאט כמה חסרונות, אם בתמיסה חלבונים בעלי ריכוז קריטי קרוב, ההפרדה לא תהיה מלאה ובנוסף שיקוע החלבונים עלול לפגוע בתפקוד החלבון.

הפרדת חלבונים ע"י אלקטרופורוזה

לכל חלבון יש מטען מסוים בתמיסה בעלת pH מסוים. ניתן להשתמש במטענים השונים של חלבונים שונים על מנת להפריד ביניהם ע"י הפעלת מטען חשמלי. חלבון בעל מטען חיובי ינוע לכיוון האלקטרודה שלילית, הקתודה, חלבון בעל מטען שלילי ינוע לכיוון האלקטרודה החיובית, חלבון בעל מטען ניטרלי יישאר באמצע בין שתי האלקטרודות. בניסוי שלנו תבוצע צביעה של החלבונים ע"י קומסי-כחול על מנת לראותם, הצביעה פוגעת בפעילות החלבונים ולכן נעשית רק לאחר בדיקת התגובה. בניסוי נשתמש ב-2 סוגי אלקטרופורוזה :

- א. אלקטרופורוזה נטיבית - מתאימה להפרדת חלבונים כאשר רוצים לשמר את המבנה הטבעי של החלבון ולבודד אותו על סמך המטען הכללי שלו, שיטה זו משמשת למציאת מספר סוגי החלבונים הנמצאים בתמיסה והאיזוזימים השונים של הפרוקסידאז.
 - ב. אלקטרופורוזה דנטורטיבית - כאשר רוצים לבודד חלבון על סמך גודלו בלבד ואיננו מעוניינים בשימור המבנה המרחבי ופעילות החלבון, בניסוי שלנו נשתמש ב- SDS (sodium dodecyl sulfate) הנקשר לחלבון ומעניק לו מטען שלילי ביחס ישר לגודל של החלבון (למספר חומצות האמינו שלו). כמו כן נשתמש ב-β mercaptoethanol וחימום הדגימה (β mercaptoethanol הינו חומר מחזר המפרק את הקשרים הקוולנטיים, קשרי ה-S-S החזקים המאפשרים את קיפול החלבון בהיווצרותו ונותנים לו את מבנהו המרחבי).
- בניסוי שלנו נשתמש בגיל מפוליאקרילאמיד, המורכב ממונומרים של אקרילאמיד המצולבים ביניהם באמצעות BIS Acrylamid, ניתן לשלוט הרמת הפרוויזיביות של הגיל על ידי אחוז האקרילאמיד ועל רמת הצילוב על ידי אחוז הביסאקריל אמיד בתערובת.

ניקוי החלבונים על ידי דיאליזה

דיאליזה מבוססת על ההבדל ביכולתם של חומרים שונים לחזור מבעד ממבראנות. התמיסה מוכנסת לשקית שהיא ממבראנה המאפשרת מעבר למולקולות מסוימות (בדרך כלל רק למולקולות קטנות), השקית מוכנסת לכלי גדול המכיל תמיסה עם ריכוז המלחים אליו מעוניינים להגיע, גודל המולקולות העוברות את הממברנה תלוי בגודל הסריגים שלה ומוגדר cut off size, בדיאליזה מעבר המולקולות הינו דו כיווני, מולקולות אשר גודלם קטן מגודל ה-cut off ינוע מחוץ לשקית הדיאליזה בהתאם לאוסמוזה ומפל הריכוזים ומים יכנסו אל תוך השקית על מנת להשוות את ריכוזי המומסים.

ספקטרוסקופיה

ספקטרוסקופיה מבוססת על ההבדלים בספיגת קרינה אלקטרומגנטית על-ידי תרכובות שונות. בניסוי שלנו נשתמש בה לבדיקת פעילות אנזימטית, על ידי הוספת גואיקול ומי חמצן לקיווטה, הפרוקסידאז מזרז את ריאקציית החמצון חיזור, הגואיקול שמתחמצן גורם לשינוי הצבע של הדוגמא, ע"י תוצאות ה-O.D. המתקבלות מקבלים מדד לריכוזו של הפרוקסידאז בדגימה ועל פעילותו האנזימטית.

הגדרות בסיסיות :

פעילות ספציפית

על פי ההגדרה הפעילות הספציפית נותנת לנו מדד לרמת ניקיון האנזים ושווה ל-

פעילות ביולוגית בדוגמא (u)

כמות חלבון כללית בדוגמא (mg)

את הפעילות האנזימטית בדוגמא אנחנו בודקים על ידי מדידה של שינוי ערך ה-O.D. באורך גל של 470_{nm} לאורך מקטע זמן של דקה, שינוי של O.D. מצוין את הפעילות האנזימטית כאשר שינוי של 1 O.D. שווה לפעילות אנזימטית שערכה 1 ויחידותיה u (unit).

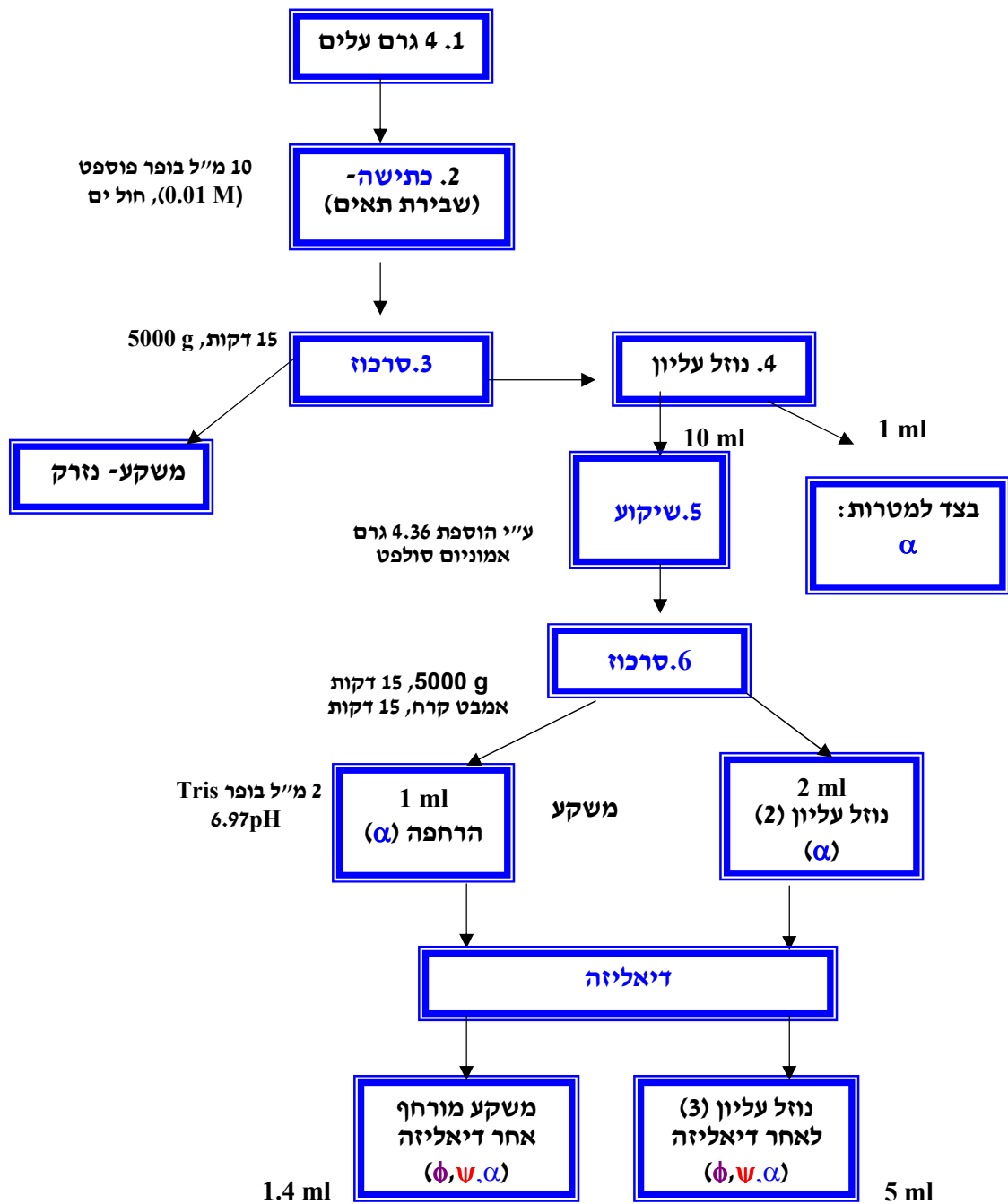
את כמות החלבון הכללית בדוגמא אנחנו בודקים על ידי מדידה באורך גל של 280_{nm}, כל יחידה מדידה (1 O.D.) שווה בערכה ל-1 מ"ג חלבון. ניתן לכתוב :

$$\frac{O.D. (\Delta 470nm)}{O.D. (280nm)} = \text{פעילות ספציפית}$$

פקטור ניקוי

פקטור הניקוי (purification factor) מוגדר כיחס בין הפעילות הספציפית של האנזים אחרי תהליך מסוים (או מספר תהליכים) לבין הפעילות הספציפית של האנזים לפני תהליך זה (או מספר תהליכים), הערך המתקבל יכול לתת לנו הערכת כדאיות כלכלית להשתמש בתהליך ספציפי כאשר מדובר בתהליכים תעשייתיים גדולים.

להלן תרשים זרימה המתאר את שלבי העבודה, כמויות וחומרים בהם נעשה שימוש במהלך המעבדה.



מקרא:

- סימון בכחול- שיטות הפרדה וניקוי.
- α- ביצוע מדידת O.D. ב 280nm ו 470 nm.
- ψ- ביצוע אלקטרופורוזה דנטורטיבית.
- φ- ביצוע אלקטרופורוזה נטיבית

תוצאות

טבלה מס' 1: תוצאות גולמיות שהתקבלו בשלבי העבודה השונים

| נוזל עליון 2 | | משקע מורחף | | נוזל עליון 1 | | עלי הצמח | שמות | זוג מספר |
|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|------------|----------|-------------------|----------|
| $\Delta 470_{nm}$ | 280_{nm} | $\Delta 470_{nm}$ | 280_{nm} | $\Delta 470_{nm}$ | 280_{nm} | | | |
| 0.126 | 0.298 | 1.890 | 0.722 | 1.778 | 0.652 | דלעת | זוהר ושגיא | 1 |
| 0.104 | 0.078 | 2.353 | 0.520 | 1.475 | 0.776 | דלעת | אנה ואסתי | 2 |
| 0.151 | 0.285 | 1.645 | 0.631 | 0.045 | 0.980 | צנונית | קרן וצביקה | 3 |
| 0.004 | 0.040 | 2.310 | 0.423 | 0.539 | 0.939 | צנונית | אלכסנדרה וולדימיר | 4 |
| 0 | 0.430 | 0.429 | 1.140 | 1.413 | 0.435 | ארטישוק | שרית ואורן | 5 |
| 0 | 0 | 0.051 | 0.152 | 1.478 | 0.138 | ארטישוק | קארין ועמי | 6 |
| 0 | 0.995 | 1.510 | 1.385 | 0.260 | 0.944 | חזרת | אביטל ואודליה | 7 |
| 0.085 | 0.271 | 1.430 | 0.291 | 0.748 | 0.670 | כרובית | עודד ואיתי | 8 |
| 0.062 | 0.032 | 3.026 | 0.22 | | | | | |
| 0.292 | 0.108 | 2.103 | 0.170 | | | | | |
| 0 | 0.224 | 2.218 | 0.163 | | | | | |
| 0.341 | 0.167 | 0.330 | 0.262 | | | | | |
| 0.556 | 0.032 | 0.359 | 0.042 | | | | | |
| 0.025 | 0.218 | 1.399 | 0.995 | | | | | |
| 0.052 | 0.035 | 1.363 | 0.696 | | | | | |

שחור – לפני דיאליזה
 אדום – לאחר דיאליזה
 כחול – דוגמת חישוב

דוגמת חישוב לתוצאת O.D. לאחר תיקון פקטור המיהול עקב הדיאליזה:

משקע (470nm) : $V_1=2ml$ (לפני דיאליזה), $V_2=3ml$ (לאחר דיאליזה).

מכאן נובע כי פקטור המיהול הוא : $F_d = \frac{3ml}{2ml} = 1.5$, לכן צריך לבצע תיקון לערך ה-O.D. המקורי:

$$O.D._1 \cdot F_d = 0.909 \cdot 1.5 = 1.3635$$

- הערכים בטבלה הם ערכי ה-O.D מוכפלים בפקטור המיהול לאחר הדיאליזה ובפקטור המיהול במקרה ונעשה מיהול עקב O.D שלא בטווח הליניארי.

טבלה מס' 2: נפחי התמיסות לפני ואחרי דיאליזה

| סוג הדגימה | נפח הדגימה לפני דיאליזה [ml] | נפח הדגימה אחרי דיאליזה [ml] | פקטור מיהול |
|--------------|------------------------------|------------------------------|-------------|
| משקע מורחף | 1.5 | 2 | פי 1.333 |
| נוזל עליון 2 | 1.5 | 3 | פי 2 |

דוגמת חישוב: ערך ה-O.D שהתקבל לנו בדוגמת המשקע המורחף לאחר דיאליזה ב-280nm הינו 0.39,

פקטור המיהול הינו 1.333, כלומר שה"כ החלבונים נמהלו פי 1.333 ולכן נכפיל את הערך המתקבל בפקטור המיהול, התוצאה הינה 0.520.

טבלה מס' 3: פעילות ספציפית, נוזל עליון 1

| זוג מספר | עלי הצמח | פעילות אנזימטית (u) | כמות החלבון כללית בדוגמא [mg] | פעילות ספציפית [u/mg*min] |
|----------|----------|---------------------|---------------------------------|---------------------------|
| 1 | דלעת | 1.778 | 0.652 | 2.726 |
| 2 | דלעת | 1.475 | 0.776 | 1.900 |
| 3 | צנונית | 0.045 | 0.980 | 0.046 |
| 4 | צנונית | 0.539 | 0.939 | 0.574 |
| 5 | ארטישוק | 1.413 | 0.435 | 3.248 |
| 6 | ארטישוק | 1.478 | 0.138 | 10.71 |
| 7 | חזרת | 0.260 | 0.944 | 0.275 |
| 8 | כרובית | 0.748 | 0.670 | 1.110 |

* פעילויות ספציפיות גבוהות ביותר סומנו בצהוב

טבלה מס' 4: פעילות ספציפית, משקע מורחף

| אחרי דיאליזה | | | לפני דיאליזה | | | עלי הצמח | זוג מספר |
|---------------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------|----------|----------|
| פעילות ספציפית [u/mg*min] | כמות החלבון כללית בדוגמא [mg] | פעילות אנזימטית (u) | פעילות ספציפית [u/mg*min] | כמות החלבון כללית בדוגמא [mg] | פעילות אנזימטית (u) | | |
| 4.525 | 0.520 | 2.353 | 2.617 | 0.722 | 1.890 | דלעת | 1 |
| 5.460 | 0.423 | 2.310 | 1.022 | 0.631 | 1.645 | דלעת | 2 |
| 0.335 | 0.152 | 0.051 | 0.376 | 1.140 | 0.429 | צנונית | 3 |
| 3.023 | 0.303 | 0.916 | 1.090 | 1.385 | 1.510 | צנונית | 4 |
| 13.754 | 0.220 | 3.026 | 4.914 | 0.291 | 1.430 | ארטישוק | 5 |
| 13.607 | 0.163 | 2.218 | 12.370 | 0.170 | 2.103 | ארטישוק | 6 |
| 8.547 | 0.042 | 0.359 | 1.259 | 0.262 | 0.330 | חזרת | 7 |
| 1.958 | 0.696 | 1.363 | 1.406 | 0.995 | 1.399 | כרובית | 8 |

* פעילויות ספציפיות גבוהות ביותר סומנו בצהוב

טבלה מס' 5: פעילות ספציפית, נוזל עליון 2

| אחרי דיאליזה | | | לפני דיאליזה | | | עלי הצמח | זוג מספר |
|---------------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------|----------|----------|
| פעילות ספציפית [u/mg*min] | כמות החלבון כללית בדוגמא [mg] | פעילות אנזימטית (U) | פעילות ספציפית [u/mg*min] | כמות החלבון כללית בדוגמא [mg] | פעילות אנזימטית (U) | | |
| 1.333 | 0.078 | 0.104 | 0.422 | 0.298 | 0.126 | דלעת | 1 |
| 0.100 | 0.040 | 0.004 | 0.529 | 0.285 | 0.151 | דלעת | 2 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0.430 | 0 | צנונית | 3 |
| 0 | 0.050 | 0 | 0 | 0.995 | 0 | צנונית | 4 |
| 1.937 | 0.032 | 0.062 | 0.313 | 0.271 | 0.085 | ארטישוק | 5 |
| 0 | 0.224 | 0 | 2.703 | 0.108 | 0.292 | ארטישוק | 6 |
| 17.375 | 0.032 | 0.556 | 2.041 | 0.167 | 0.341 | חזרת | 7 |
| 1.485 | 0.035 | 0.052 | 0.114 | 0.218 | 0.025 | כרובית | 8 |

• פעילויות ספציפיות גבוהות ביותר סומנו בצהוב

• סימון באדום – נלקח לדוגמת חישוב עבור פקטורי ניקוי

טבלה מס' 6: פקטורי הניקוי של כלל הזוגות בשלבי העבודה השונים

| פקטור הניקוי לכלל התהליכים | | שלב סינון בדיאליזה | | שלב שיקוע באמוניום סולפאט | | עלי הצמח | זוג מספר |
|-------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------|----------|
| דיאליזט משקע מורחף מול נוזל עליון 1 | דיאליזט נוזל עליון 2 מול נוזל עליון 1 | דיאליזט משקע מורחף מול משקע מורחף | דיאליזט נוזל עליון 2 מול נוזל עליון 2 | משקע מורחף אל מול נוזל עליון 1 | נוזל עליון 2 אל מול נוזל עליון 1 | | |
| 1.659 | 0.488 | 1.729 | 3.158 | 0.960 | 0.154 | דלעת | 1 |
| 2.873 | 0.052 | 2.090 | 0.189 | 0.537 | 0.278 | דלעת | 2 |
| 7.282 | 0 | 0.890 | 0 | 8.173 | 0 | צנונית | 3 |
| 5.266 | 0 | 2.773 | 0 | 1.898 | 0 | צנונית | 4 |
| 4.234 | 0.596 | 2.798 | 6.188 | 1.512 | 0.096 | ארטישוק | 5 |
| 1.270 | 0 | 1.100 | 0 | 1.154 | 0.252 | ארטישוק | 6 |
| 31.080 | 63.080 | 6.788 | 8.520 | 4.578 | 7.421 | חזרת | 7 |
| 1.763 | 1.337 | 1.392 | 13.026 | 1.266 | 0.102 | כרובית | 8 |

• פקטורי הניקוי הגבוהים ביותר סומנו בצהוב

דוגמה לחישוב פקטור ניקוי:

$$\text{cleaning factor} = \frac{S.A_{\text{upper_liquid2_after_dialysis}}}{S.A_{\text{upper_liquid2_before_dialysis}}} = \frac{1.333}{0.422} \approx 3.15$$

אלקטרופורוזה דנטורטיבית

טבלה מספר 7: סדר הטענת הדגימות באלקטרופורוזה דנטורטיבית

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------------------------------|---|---|------|---|------------------------------|---|---|---|----|
| נייע 1 (עודד ואיתי כרובית) | A | P | מרקר | C | נייע 1 (זוהר+שגיא – דלעת) | - | - | - | - |

(נייע = נוזל עליון)

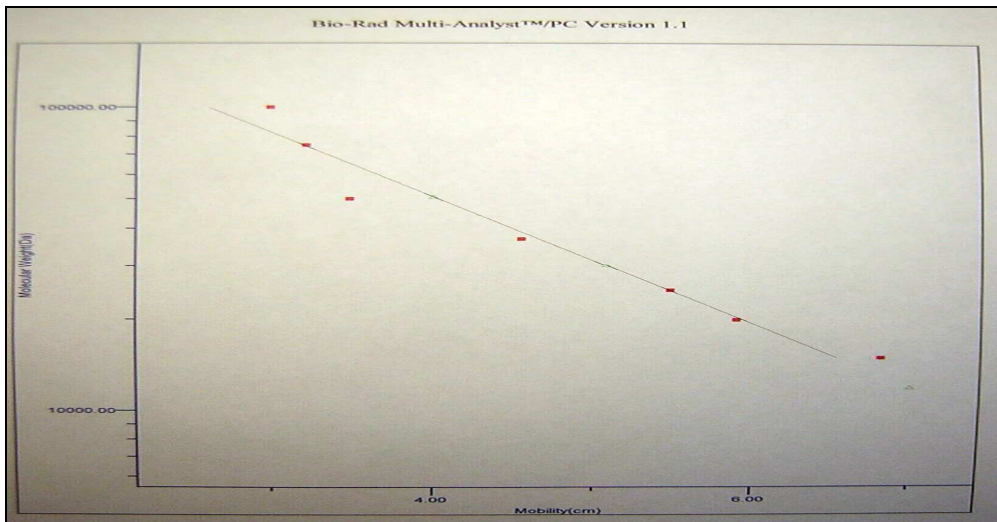


תמונה מס' 1: סריקת תוצאות הרצה – אלקטרופורוזה דנטורטיבית

תוצאות ההרצה עובדו באמצעות תוכנת מחשב. תוכנת המחשב מספקת פלט נתונים אשר לפיו ניתן לבנות עקומת כיוול למציאת משקל מולקולארי. להלן פלט המחשב שהתקבל:

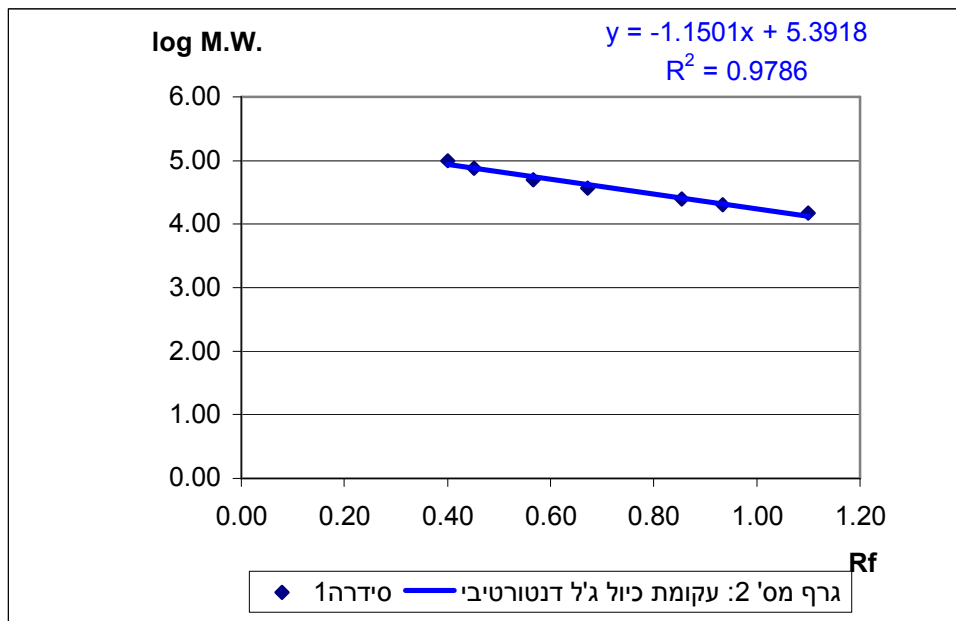
טבלה מס' 8: פלט תוכנת המחשב עבור ג'ל דנטורטיבי

| | Name | MW (Da) | Mobility cm |
|------------|-----------|-----------|-------------|
| Lane1 | Band 1 | 58352.09 | 3.72 |
| | Band 2 | 31883.88 | 5.24 |
| | Band 3 | 11751.39 | 7.75 |
| Sum | | | |
| In Lane | | | |
| Lane2 | Band 1 | 70427.57 | 3.25 |
| Sum | | | |
| In Lane | | | |
| Lane3 | Band 1 | 49949.26 | 4.11 |
| Sum | | | |
| In Lane | | | |
| Lane4(STD) | StdBand 1 | 100000.00 | 2.72 |
| | StdBand 2 | 75000.00 | 3.07 |
| | StdBand 3 | 50000.00 | 3.85 |
| | StdBand 4 | 37000.00 | 4.57 |
| | StdBand 5 | 25000.00 | 5.81 |
| | StdBand 6 | 20000.00 | 6.35 |
| | StdBand 7 | 15000.00 | 7.48 |
| Sum | | | |
| In Lane | | | |
| Lane5 | Band 1 | 11517.98 | 7.80 |
| Sum | | | |
| In Lane | | | |
| Lane6 | Band 1 | 57914.72 | 3.74 |
| | Band 2 | 43842.29 | 4.44 |
| | Band 3 | 11460.35 | 7.81 |
| Sum | | | |
| In Lane | | | |



גרף מס' 1: עקום כיוול של משקל מולקולארי כנגד אורך הנדידה

להלן הגרף המתקבל מנתוני הטבלה עבור סטנדרט החלבונים :



גרף מס' 2 – לוגריתם המסה המולקולארית כתלות ב-Rf

מתקבל גרף ליניארי מובהק, משוואת הגרף המתקבלת היא : $y = -1.1501x + 5.3918$

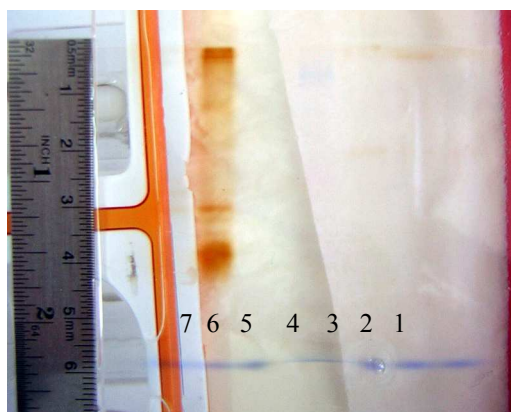
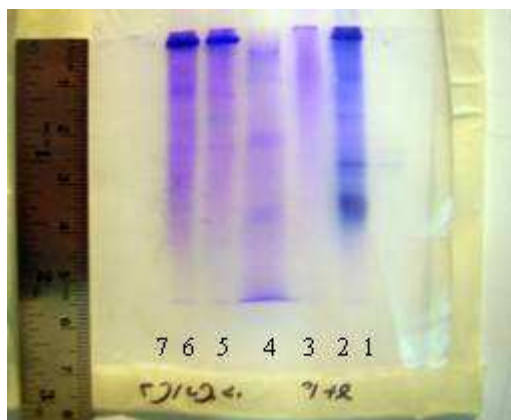
טבלה מס' 9 : תוצאות Rf ו-Mw של הדגימות בג'ל דנטורטיבי

| Mw (Da) | Log (Mw) (Da) | R _f | מרחק נדידה (cm) | מס' פס | דגימה |
|---------|---------------|----------------|-----------------|--------|-----------------------|
| 58352 | 4.77 | 0.59 | 3.72 | 1 | ני"ע 1 (איתי+עודד) |
| 31883 | 4.50 | 0.75 | 5.24 | 2 | |
| 11751 | 4.07 | 1.02 | 7.75 | 3 | |
| 70427 | 4.85 | 0.53 | 3.25 | 1 | נעלם A |
| 49949 | 4.70 | 0.62 | 4.11 | 1 | נעלם P |
| 11517 | 4.06 | 1.04 | 7.09 | 1 | נעלם C |
| 57914 | 4.76 | 0.58 | 3.98 | 1 | ני"ע 1 (שגיא+זוהר) |
| 43842 | 4.64 | 0.65 | 4.44 | 2 | |
| 11460 | 4.06 | 1.15 | 7.81 | 3 | |

• מרחק הנדידה הכללי כ- 6.8 ס"מ

אלקטרופורוזה נטורטיבית**ג'ל נטיבי קבוצתי****טבלה מס' 10: סדר הטענת הדגימות באלקטרופורוזה נטורטיבית**

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|------------------------|----------------------|-------------------------------|------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
| נייע 2 (עודד ואיתי) | משקע (איתי+ עודד) | נוזל עליון 1 (איתי + עודד) | מרקר | נייע 1 (זוהר + שגיא) | משקע (זוהר + שגיא) | נייע 2 (זוהר + שגיא) |

**תמונה מס' 2: סריקת תוצאות הרצה עבור אלקטרופורוזה נטורטיבית לפני צביעה****תמונה מס' 3: תוצאות ההרצה על ג'ל נטיבי - לאחר צביעה**

טבלה מס' 13: מרחקי הנדידה (ב-cm) כפי שנמדדו לאחר צביעת גואיקול בג'ל הנטיבי הקבוצתי

| רזרבה | נייע 2 ש+ז | משקע ש+ז | נייע 1 ש+ז | סטנדרט | נייע 1 א+ע | משקע א+ע | נייע 2 א+ע | רזרבה | רזרבה |
|-------|---------------|--------------|---------------|--------|---------------|-------------|---------------|-------|-------|
| 10 | 9 | 8 | 7 | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 |
| | | 0.2 | | | | | | | |
| | | 0.3 | | | | | | | |
| | | 1.1 | | | | | | | |
| | 2.6 | 2.6 | | | 2 ס"מ | | | | |
| | 3 | 3 | | | | | | | |
| | | 3.2 | | | | | | | |
| | | 3.5-4 (מרוח) | | | | | | | |

א+ע = איתי + עודד, ש+ז = שגיא + זוהר, נייע = נוזל עליון
מרחק ריצה: 5.7 ס"מ

טבלה מס' 14: תוצאות Rf של הדגימות בג'ל ע"פ מדידה

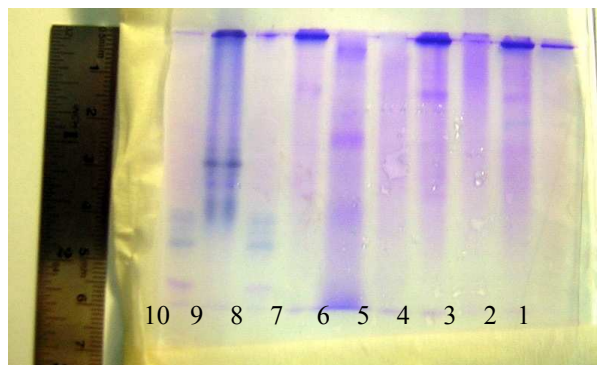
| Rf | מרחק נדידה (cm) | מס' פס | דגימה |
|------|-----------------|--------|----------------------|
| 0.35 | 2 | 1 | נייע 1 - (איתי+עודד) |
| 0.04 | 0.2 | 1 | משקע - (שגיא + זוהר) |
| 0.05 | 0.3 | 2 | |
| 0.19 | 1.1 | 3 | |
| 0.46 | 2.6 | 4 | |
| 0.53 | 3 | 5 | |
| 0.56 | 3.2 | 6 | |
| 0.61 | 3.5 | 7 | |
| 0.70 | 4 | 1 | נייע 2 - (שגיא+זוהר) |
| 0.46 | 2.6 | 1 | |
| 0.53 | 3 | 2 | |

המריחה במשקע הופרדה לגבול המריחה העליון וגבול המריחה התחתון רק לצורך קבלת סדר גודל.

ג'ל נטיבי כיתתי



תמונה מס' 4: תוצאות הרצה על ג'ל נטיבי (לפני צביעה) של כלל הצמחים



תמונה מס' 5: תוצאות הרצה על ג'ל נטיבי (לאחר צביעה) של כלל הצמחים

טבלה מס' 15: תוצאות הרצה כיתתית של דיאליזט משקע

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------|---------------------|-------------------|---------------------|----------------------|----------------|---------------------|----------------------|------------------|----------------------|
| רזרבה | עודד ואיתי (כרובית) | זוהר ושגיא (דלעת) | קרן וצביקה (צנונית) | אביטל ואודליה (חזרת) | סטנדרט חלבונים | אלכס וולדי (צנונית) | קארין ועמי (ארטישוק) | אנה ואסתי (דלעת) | שרית ואורן (ארטישוק) |
| - | 2.2 | - | - | - | | - | 4 | 2.3 | 4 |
| - | - | - | - | - | | - | 4.5 | 4-4.5 | 4.5 |

* קו סופי 5.7 ס"מ

טבלה מס' 16: תוצאות R_f עבור של הדגימות עבור ג'ל נטיבי לפני צביעה.

| R _f | מרחק נדידה (cm) | מס' פס | דגימה |
|----------------|-----------------------|--------|--------------------|
| 0.39 | 2.2 | 2 | ני"ע 1 עודד + איתי |
| 0.70 | 4 | 8 | ני"ע 1 עמי + קארין |
| 0.79 | 4.5 | | |
| 0.40 | 2.3 | 9 | ני"ע 1 אנה + אסתי |
| 0.75 | 4-4.5 (4.25 ממוצע) | | |
| 0.70 | 4 | 10 | ני"ע 1 אורן + שרית |
| 0.79 | 4.5 | | |

כרובית :

- התקבל פס אחד בלבד בנוזל העליון.

דלעת :

- התקבלו 7 פסים בדגימת המשקע, מתוכם פס אחד שהוא מריחה.
- התקבלו 2 פסים בני"ע 2.

ארטישוק :

- התקבלו 2 פסים.

טבלה מס' 17: תוצאות R_f עבור של הדגימות עבור ג'ל נטיבי אחרי צביעה.

| R _f | מרחק נדידה (cm) | מס' פס | דגימה |
|----------------|-----------------|--------|--------------|
| 0.263 | 1.5 | 2 | ני"ע 1 עודד |
| 0.386 | 2.2 | | |
| 0.263 | 1.5 | 4 | ני"ע 1 צביקה |
| 0.228 | 1.3 | 7 | ני"ע 1 וובה |
| 0.701 | 4 | 8 | ני"ע 1 עמי |
| 0.789 | 4.5 | | |
| 0.403 | 2.3 | 9 | ני"ע 1 אנה |
| 0.456 | 2.6 | | |
| 0.491 | 2.8 | | |
| 0.579 | 3.3 | | |
| 0.701 | 4 | 10 | ני"ע 1 אורן |
| 0.701 | 4 | | |
| 0.789 | 4.5 | | |
| 0.964 | 5.5 | | |

שחור- חלבונים שאומתו כבעלי פעילות פרוקסידאז – איזוזימים.
אפור – חלבונים שהופיעו לאחר הצביעה.

ריכוז תוצאות

בדיקות עכירות, פעילות ספציפית

נבדוק את יעילות שלבי העבודה השונים אשר אנחנו ביצענו :

בנוזל עליון 1 המתקבל לאחר שלב הכתישה והסרכוז, ערך הפעילות הספציפית של האנזים הינו $2.726_{[u/mg]}$,
הערך המתקבל עבור המשקע המורחף לפני הדיאליזה הינו $2.617_{[u/mg]}$ ועבור נוזל עליון 2 הערך הינו

$$\frac{2.726}{2.726 + 0.422} * 100 = 86.5\% , 0.422_{[u/mg]}$$

לאחר הדיאליזה ערך הפעילות הספציפית של האנזים המשקע המורחף הינו $4.525_{[u/mg]}$, רמת הניקיון בפאזה זו עלתה עקב תהליך הדיאליזה פי 1.729, **כלומר עלייה של כ-73%**, לאחר הדיאליזה ערך הפעילות הספציפית של האנזים בנוזל עליון 2 הינו $1.333_{[u/mg]}$, רמת הניקיון בפאזה זו עלתה **עקב תהליך הדיאליזה פי 3.158**, כלומר **עלייה של כ-216%**, הערכים המתקבלים נמוכים מהערכים המצופים ומראים לנו כי הרבה מכלל החלבונים בדגימת המשקע לא עברו את הממברנה וגודלם גדול מ- 15_{KD} (cut off size= 15_{KD}), בנוסף ניתן לראות כי דוגמת הנוזל העליון 2 הכילה ככל הנראה הרבה מלחים אשר פגעו בפעילות האנזים

חישוב ניצולת

על מנת לחשב את כמות האנזים נכפיל את נתוני הפעילות האנזימטית (ראה/י טבלאות מס' 3,4) בנפח הדוגמא בה השתמשנו (עבור המשקע ונוזל עליון 2 ראה/י טבלה מס'2),

מפני שרוב האנזים נמצא בפאזה המשקע ומפני שכמות האנזים בפאזה המשקע לפני ואחרי הדיאליזה אינה אמורה להשתנות נחשב את הניצולת הכללית לתהליך כאשר פאזה המשקע היא הפאזה המעניינת אותנו.

נפח כללי של הנוזל העליון 1 : 4.4 מ"ל, נפח כללי של דיאליזט המשקע המורחף : 2 מ"ל, נפח הדגימה בה השתמשנו לקריאת O.D, 470_{nm} : $25_{\mu l}$ שהם 0.025 מ"ל, את חישוב הכמות בנפח הכללי נעשה על פי

$$C_1 V_2 = C_2 V_1$$

O.D ב- 470_{nm} עבור דוגמת נוזל עליון 1 הינו 1.778 כלומר $1.778u$, נפח הדגימה הנבדקת הינו 0.025 מ"ל ולכן :

$$1.778 * 4.4 = C_2 * 0.025 \Rightarrow C_2 = 312.928u$$

כלומר כ-313 יחידות אנזים בנפח של 4.4 מ"ל, הנפח אותו הצלחנו להפיק בכתישה.

O.D ב- 470_{nm} עבור דוגמת משקע מורחף לאחר דיאליזה הינו 2.353 כלומר $2.353u$, נפח הדגימה הנבדקת

$$2.353 * 2 = C_2 * 0.025 \Rightarrow C_2 = 188.240u$$

הינו 0.025 מ"ל ולכן :

כלומר כ-188 יחידות אנזים אותם הצלחנו להפיק כתוצר סופי, הניצולת המתקבלת לתהליך הכולל היא :

$$\eta = 188.240 / 312.928 = 0.601 \text{ כלומר-} 60\% \text{ ניצולת.}$$

אלקטרופורוזה דנטורטיבית

ביצענו אלקטרופורוזה דנטורטיבית על מנת שנוכל לאפיין את המשקל המולקולארי של החלבונים המופקים

תוך השוואה לחלבונים נתונים A,P,C אשר לפי הספרות משקלם המולקולארי הוא :

A - אלבומין 97.4KD

C - ציטוכרום 12.4KD

P - פרוקסידאז דלעת נקי (מנתוני המאמרים ומהספרות - 47KD

מהתוצאות המובאות בטבלה ניתן לבדוק את החלבונים שקיבלנו, הסטייה באחוזים לגבי החלבונים הנתונים בהשוואה לערכים הספרותיים היא:

$$\text{חלבון P} : \frac{|47000 - 49949|}{47000} \cdot 100 = 6.27\%$$

$$\text{חלבון A} : \frac{97400 - 70427}{97400} \cdot 100 = 27.6\%$$

$$\text{חלבון C} : \frac{12400 - 11517}{12400} \cdot 100 = 7.12\%$$

בחלבון P ו C קיבלנו תוצאות זהות לספרות עם סטייה קטנה מאוד. לעומת זאת בחלבון A קיבלנו סטייה גדולה יותר, כמו כן, גם קיבלנו בדגימות של 2 הזוגות (שגיא + זוהר וגם עודד + איתי) חלבונים בעלי מסה מולקולארית דומה למסתו של פרוקסידאז נק'.

אלקטרופורוזה נטיבית

הרצה קבוצתית

לא התקבלו בדגימת הדלעת איזוזימים בנוזל עליון 1, מעיד על בעייתיות בתוצאות מאחר ובנוזל עליון אחד אמור להיות הפרוקסידאז המבוקש, והאיזוזימים שלו, זהו שלב הפרדה יחסית ראשוני ולכן לא הגיוני שלא התקבלו תוצאות, ככל הנראה הייתה בעיה עם הכנת הדגימה. אצל הזוג השותף, לא התקבלו תוצאות צביעה בגואיקול בנוזל עליון 1 של צנונית, אך לאחר צביעה ב - Coomassie blue התקבלו תוצאות ולכן ניתן להניח כי הפסים החומים לאחר צביעה בגואיקול היו עדינים מדי ולכן לא נראו בטרם הצביעה.

ניתן לראות כי לפני הצביעה מבחינים ב-3 חלבונים אשר מבצעים פעילות אנזימטית של פרוקסידאז ולכן ניתן להניח שאלה איזוזימים, לאחר הצביעה מבחינים בחלבונים אחרים, אך ניתן לזהות בבירור איזוזים בני"ע 1 של איתי ועודד, ני"ע 2 + משקע שלנו.

ניתן לזהות איזוזים נוסף במשקע + ני"ע 2 שלנו.

מעבר לכך ניתן לראות מספר גדול יותר של איזוזימים בדגימת הדלעת ביחס לדגימת הכרובית, למרות שהם דווקא במשקע.

הרצה כיתתית

בגיל הנטיבי הכיתתי, למרות שלנו לא יצאו תוצאות, ניתן להבחין לפני צביעת גואיקול בבירור ב- איזוזימים של פרוקסידאז. איזוזים אחד מופיע הן בדלעת והן בכרובית, ואילו איזוזים שני מופיע בדלעת, כרובית וארטישוק גם יחד. לאחר הצביעה הופיעו פסים נוספים, המעידים על נוכחות חלבונים שאינם בעלי פעילות פרוקסידאז. נראה כי הדלעת היא צמח עשיר מאוד בחלבונים.

דיון ומסקנות

דיון

- על פי טבלה מס' 3 וערכי הפעילות האנזימטית, נסיק כי מספר יחידות האנזים הגדול ביותר נמצא בדלעת ובארטישוק.
- על פי טבלה מס' 7 וערכי פקטור הניקוי הכללי, נסיק כי כלל תהליך ההפרדה יעיל במיוחד בחזרת.
- תהליך השיקוע - הערכים המתקבלים מראים לנו כי לתהליך השיקוע על ידי המלח במקרה זה לא היה תפקיד בניקוי החלבון, האמוניום סולפאט גרם בנוסף לשיקוע האנזים פרוקסידאז, לשיקוע של מרבית החלבונים האחרים המצויים בדוגמא, כאשר מסתכלים על הנתונים המתקבלים מהזוגות האחרים, נראה כי לתהליך הוספת המלח אין השפעה גדולה על רמת ניקיון האנזים, לאור עובדה זו המסקנה המתבקשת הינה כי רצוי לבצע ניסויים אמפיריים נוספים על מנת למצוא ריכוז מלח אחר מ-70% תמיסה רוויה אשר יגרום להעלאת רמת הניקיון.
- דיאליזה - כאשר מסתכלים על תוצאות הזוגות האחרים ניתן לראות בדוגמת המשקע עלייה מקסימאלית ברמת הניקיון אצל זוג מספר 2 (דלעת) והיא עלייה בכ-435% ועד לעלייה מינימאלית של כ-39% אצל זוג מספר 8 (כרובית), בנוסף לגבי דוגמת הנוזל העליון 2, עלייה מקסימאלית אצל אותו הזוג, זוג 8 בכרובית, עלייה של כ-1200%, ומקרים בהם נראתה ירידה בפעילות הספציפית ומרמזת על נוכחות איזוזימים בעלי גודל קטן מה-cut off size או על עבודה לא נכונה בחלק משלבי ההפקה או קריאת התוצאות, לאור התוצאות המתקבלות וניתוח הנתונים ניתן לומר כי לדיאליזה חלק בלתי מבוטל בניקיון האנזים.
- בתהליך השיקוע באמוניום סולפאט שיקענו כ-85% מהאנזים.
- התקבלו פקטורי ניקוי גבוהים עבור חלק מהירקות, הירקות שעבורם לא התקבל פקטור ניקוי גבוה, כך הדבר ככל הנראה בגלל הכנה לא מדויקת של תהליך ההפרדה.

מסקנות

- המסקנה הראשית המתבקשת מניסוי זה היא שלמדנו באופן מעשי על תהליכי הפרדה במעבדה.
- תהליך ההפרדה הוכח כיעיל עבור חלק מהירקות, האנזים התקבל בצורה הנקייה ביותר מעלי חזרת (פקטור ניקוי 63.080), אם כי הפעילות הספציפית הגבוהה ביותר נמדדה אצל אנזים שבודד מעלי ארטישוק (10.71 יחידות למ"ג לדקה בנוזל עליון 1).
- בהתחשב בעובדה שחלק מהתוצאות שלנו לא תאמו לציפיות, למשל המצאות פרוקסידאזות בפאזות שלא ציפינו למצאם שם, מעידה כי ייתכן וביצענו הפרדה לא יעילה, כנראה בשלב השיקוע והן בשלב הדיאליזה, אך יש לקחת בחשבון גם שגיאות שבוצעו בניסוי כגון טעויות במיהולים, גילים לא תקינים, הטענה לא טובה על הגילים, מדידת זמנים לא נכונה, שגיאות סרגל וכד'.
 • התוצאות הסופיות הראו כי מצאנו נוכחות מס' איזוזימים של פרוקסידאז, ייתכן ותהליך ההפרדה לא היה יעיל במיוחד, ייתכן ולא התאים לחלק מהצמחים, לבטח ניתן לשפר אותו ולקבוע תהליך מסוים וטוב יותר עבור כל צמח וצמח.

1. Lisenbee. C. S., Heinze. M., & Trelease. R. N. (2003) *Peroxisomal Ascorbate Peroxidase Resides within a Subdomain of Rough Endoplasmic Reticulum in Wild-Type Arabidopsis Cells*, Department of Plant Biology and Graduate Program in Molecular and Cellular Biology, Arizona State University, Tempe, Arizona. **Plant Physiology**, Vol. 132, pp. 870–882.
2. De Bellis. L., Gonzali. S., Alpi. A., Hayashi. H., Hayashi. M., Nishimura. M, (2000), *Purification and Characterization of a Novel Pumpkin Short-Chain Acyl-Coenzyme A Oxidase with Structural Similarity to Acyl-Coenzyme A Dehydrogenases*, Dipartimento di Biologia, via Provinciale Lecce-Monteroni, 73100 Lecce, Italy (L.D.B.); Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie, 56124 Pisa, Italy (S.G., A.A.); and Department of Cell Biology, National Institute for Basic Biology, Okazaki 444–8585, Japan. **Plant Physiology**, Vol. 123, pp. 327–334.
3. Yamaguchi K., Mori H., & Nishimura M.,(1995) *A Novel Isoenzyme of Ascorbate Peroxidase Localized on Glyoxysomal and Leaf Peroxisomal Membranes in Pumpkin*, Department of Cell Biology, National Institute for Basic Biology, Myodaiji, Okazaki, 444 Japan, **Plant Cell Physiology**. 36(6): 1157-1162.