

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΙΑΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΙΩΤΩΝ ΙΟΝΤΙΚΗΣ ΙΣΧΥΟΣ ΣΤΗ  
ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ ΣΤΑ ΜΙΚΤΑ ΥΔΑΤΙΚΑ  
ΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ  
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ**

**ΙΩΑΝΝΗΣ ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ**

**ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 1995**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΙΑΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΙΩΤΩΝ ΙΟΝΤΙΚΗΣ ΙΣΧΥΟΣ ΣΤΗ  
ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ ΣΤΑ ΜΙΚΤΑ ΥΔΑΤΙΚΑ  
ΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ  
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ**

**ΙΩΑΝΝΗΣ ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ**

**ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 1995**

Στο Βασίλη Ξυνογαλά

## Πρόλογος

Το μεγαλύτερο μέρος της διατριβής αυτής πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας Πρωτεϊνών, που ανήκει στο τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB), υπό τον Αναπλ. Καθηγητή Μιχάλη Κοκκαϊνίδη. Ευχαριστώ τον καθηγητή Μιχάλη Κοκκαϊνίδη, καθώς επίσης τη Μεταξία Βλάχη, τον Κυριάκο Πετράτο, τον Κώστα Παλιακάκη, τον Αλέκο Αθανασιάδη, τη Ντίνα Κοτσιφάκη, την Ελένη Βασιουράκη, τη Μαρία Παπαδοβασιλάκη, το Μανώλη Πατταροκοίλη και τη Ρενάτε Γκέομαν για τη συμβολή τους.

Το εργαστήριο Ενζυμικής Τεχνολογίας του Ινστιτούτου, υπό τον Αναπλ. Καθηγητή Βασίλη Μπουριώτη μου πρόσφερε αμέριστη υλικοτεχνική και θεωρητική υποστήριξη. Σημαντικό μέρος της εργασίας αυτής πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο αυτό. Ο Γιώργος Βλατάκης, ο Δημήτρης Καφετζόπουλος και ο Μπάμπης Ποζίδης στάθηκαν πάντοτε φίλοι και δάσκαλοι στο έργο μου. Επιπλέον πρέπει να ευχαριστήσω το Δημήτρη Διαλεκτάκη, τη Μαρία Μαρκάκη, τη Μαίρη Ρίνα και τη Μαρία Παγωμένου για τη βοήθειά τους.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Σίφη Παπαματθαίου και τους συνεργάτες του καθώς επίσης και τα μέλη του εργαστηρίου του Ζαχαρομύκητα για τη συνεχή παροχή γνώσης και βοήθειας. Ειδικότερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δημήτρη Θένο που με προετοιμάσθηκε στο χώρο της πειραματικής Βιολογίας.

Ευχαριστώ θερμά τη Θεοδώρα Αγαλιώτη, τον Παύλο Αλιφραγκή, τον Αλέξανδρο Αργυροκαστριτή, την Αλεξάνδρα Βουτσινά, τον Τάσο Γεωργακόπουλο, τη Μαριρένα Γρηγορίου, το Μιχάλη Ζουμαδάκη, την Ηρώ Κοντοδήμου, τη Νίση Κρετούβαλη, τον Αριστείδη Κριτή, το Νίκο Κυριπίδη, την Κατερίνα Λιαπάκη, το Θανάση Λουκέρη, τον Τάκη Μοκαντωνάκη, τον Άκη Μιχαηλίδη, τη Ντέπη Παπαδοπούλου, το Γιώργο Σκαρπέλη, το Δημήτρη Στραβοπόδη, το Νεκτάριο Ταβερναράκη, το Δημήτρη Τζαμαρία, το Γιώργο Τζημαγιώρη και το Γιώργο Τσολάκη, για όσα μου έχουν προσφέρει.

Ιδιαίτερα επίσης πρέπει να ευχαριστήσω τον Ιάσωνα Τσίγκο, για την άριστη συνεργασία μας, και τον Γιώργο Φαγκιαδάκη, για τη βοήθειά του και για τις εποικοδομητικές συζητήσεις μας.

Ευχαριστώ τον διευθυντή του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Γιώργο Θηραίο για την πολύτιμη συμπαράστασή του και τις φιλικές του υποδείξεις.

Ευχαριστώ επίσης όλους όσους φλότμα φροντίζουν για την καλή λειτουργία του Ινστιτούτου.

Η υποστήριξη της οικογένειάς μου, των φίλων μου και της Δέσποινας Αλεξανδράκη είναι ανυπολόγιστη.

## Περίληψη

Η διαλυτότητα των βιομορίων στα υδατικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα περιγράφεται από την εξίσωση του Green και έχει μελετηθεί εκτεταμένα. Στα αραιά ηλεκτρολυτικά διαλύματα η συμπεριφορά των βιομορίων ελέγχεται κυρίως από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, ενώ στα πυκνά ηλεκτρολυτικά διαλύματα η συμπεριφορά τους ελέγχεται κυρίως από τις πολικές και τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Σαν συνέπεια, η κατακρήμνιση ενός βιομορίου απουσία αλατιού (εναλάτωση) και η αλληλεπίδρασή του με τα χρωματογραφικά υποστρώματα ιοντοανταλλαγής είναι αποτέλεσμα ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Αντίστοιχα, η κατακρήμνιση ενός βιομορίου παρουσία μεγάλης συγκέντρωσης αλατιού (εξαλάτωση) και η αλληλεπίδρασή του με τα χρωματογραφικά υδροφοβικά υποστρώματα είναι αποτέλεσμα πολικών και υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων.

Η διαλυτότητα των βιομορίων μειώνεται στα οργανικά υδατικά διαλύματα και στα υδατικά διαλύματα PEG. Αυτό οφείλεται κυρίως στην ελάττωση της διηλεκτρικής σταθεράς των διαλυμάτων αυτών, εξαιτίας της προσθήκης των οργανικών διαλυτών ή του PEG.

Παρατήρησα ότι, η διαλυτότητα, η κατακρήμνιση, η κρυστάλλωση και η αλληλεπίδραση των βιομορίων με τα χρωματογραφικά ιοντοανταλλακτικά και υδροφοβικά υποστρώματα, παρουσία οργανικών διαλυτών και PEG, παρουσιάζουν απρόσμενη συμπεριφορά. Σκοπός της διατριβής αυτής είναι η θεωρητική εξήγηση της συμπεριφοράς των βιομορίων στα μικτά υδατικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα και παράλληλα η εφαρμογή των πορισμάτων της στην χρωματογραφία και τις κρυσταλλώσεις.

Ορίζουμε σαν **μειωτές ιοντικής ισχύος** ή απλά **μειωτές** τους οργανικούς διαλύτες, το PEG και όλα άλλα πολικά μόρια μειώνουν την ιοντική ισχύ ενός ηλεκτρολυτικού διαλύματος, όταν προστεθούν σε αυτό. Οι μειωτές, ελαττώνοντας τη διηλεκτρική σταθερά του διαλύματος, επάγουν την δημιουργία ουδέτερων ιοντικών ζευγών, που έχει σαν συνέπεια την ελάττωση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος.

Η εξίσωση του Green περιγράφει την εξάρτηση της διαλυτότητας ενός βιομορίου από την ιοντική ισχύ του υδατικού ηλεκτρολυτικού διαλύματος. Η παρουσία μειωτών στο υδατικό ηλεκτρολυτικό διάλυμα επάγει την ελάττωση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος. Συνδυάζοντας αυτά τα δύο δεδομένα δημιουργήσα τη **γενικευμένη εξίσωση του Green** η οποία περιγράφει τη διαλυτότητα των βιομορίων στα μικτά υδατικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα. Σύμφωνα με την εξίσωση αυτή, η παρουσία μειωτών στις χαμηλές συγκεντρώσεις ηλεκτρολυτών μειώνει τη διαλυτότητα των βιομορίων. Η διαλυτότητα όμως των βιομορίων στην περιέλιξη αυτή μπορεί να αυξηθεί, αν αυξηθεί η συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών. Επίσης, σύμφωνα με τη γενικευμένη εξίσωση του Green, η παρουσία μειωτών στις μεγάλες

σχηματισμούς ηλεκτρολυτών αυξάνει τη διαλυτότητα. Άρα οι μειωτές αναστέλλουν την εξαλάτωση. Οι συνήθειες των προβλέψεων αυτών έχουν σημαντικές εφαρμογές, τόσο στην κατακρήμνιση σε μέθοδο καθαρισμού, όσο και στην κατακρήμνιση με σκοπό την κρυστάλλωση. Συνοψίζοντας, η διαλυτότητα ενός βιομορίου στη **γενικευμένη εξαλάτωση** αυξάνει, με αύξηση του ηλεκτρολύτη ή και με ελάττωση του μειωτή και αντίθετα και η διαλυτότητα στη **γενικευμένη εξαλάτωση** αυξάνει, με ελάττωση του ηλεκτρολύτη ή και με αύξηση του μειωτή και αντίθετα.

Ειδικότερα για την ιοντοανταλλακτική και υδροφοβική χρωματογραφία ισχύουν τα ακόλουθα. Στην ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία, η παρουσία μειωτών οδηγεί σε καθυστέρηση της έκλυσης των βιομορίων. Γενικά η έκλυση από τους ιοντοανταλλακτικούς προσροφητές επάγεται από την αύξηση του ηλεκτρολύτη ή και την ελάττωση του μειωτή και αντίθετα. Στην υδροφοβική χρωματογραφία, η παρουσία μειωτών προάγει την έκλυση των βιομορίων. Γενικά η έκλυση από τους υδροφοβικούς προσροφητές επάγεται από την ελάττωση του ηλεκτρολύτη ή και την αύξηση του μειωτή και αντίθετα.

Συμπερασματικά, στα υδατικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα, οι διάφορες ουσίες, άρα και τα βιομόρια, αλληλεπιδρούν κυρίως με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, παρουσία μικρής συγκέντρωσης ηλεκτρολύτη, και με πολικές και υδρόφοβες, παρουσία μεγάλης συγκέντρωσης ηλεκτρολύτη. Η προσθήκη μειωτών ιοντικής ισχύος αυξάνει τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και μειώνει τις πολικές αλληλεπιδράσεις.

## Summary

The solubility of the biomolecules in aqueous electrolyte solutions has been studied in detail, and is described by the Green's equation. The behavior of biomolecules, in dilute electrolyte solutions, is mainly governed by electrostatic interactions. Their behavior, in dense electrolyte solutions, is mainly governed by polar and hydrophobic interactions. As a result, the precipitation of biomolecules in the absence of salt (salting in) and their interaction with ion exchange chromatographic matrices is a result of electrostatic interactions. Accordingly, the precipitation of biomolecules in the presence of high salt concentration (salting out) and their interaction with hydrophobic chromatographic matrices is a result of polar and hydrophobic interactions.

The solubility of biomolecules decreases in aqueous organic solvents and aqueous PEG solutions. This results from the reduced dielectric constant, due to the addition of organic solvents or PEG.

I have noticed that, the solubility, the precipitation, the crystallization and the interaction of biomolecules with ion exchange and hydrophobic chromatographic matrices, in the presence of organic solvents and PEG, exhibit an unexpected behavior. The aim of this thesis is to provide a theoretical explanation for this behavior of biomolecules in mixed aqueous electrolyte solutions and to apply these results to chromatography and crystallization.

We define as **ionic strength reducers** or simply **reducers** the organic solvents, PEG and all other polar substances that reduce the ionic strength of an electrolyte solution. The reducers, by decreasing the dielectric constant of a solution, induce the formation of neutral ion pairs, which results in reduced ionic strength.

Green's equation describes the solubility of biomolecules in an electrolyte solution as a function of the ionic strength. The presence of reducers in aqueous electrolyte solution decreases the ionic strength. By combining these two facts, I have formulated the **generalized Green's equation**, which describes the solubility of biomolecules in the mixed aqueous electrolyte solutions. According to this equation, the presence of reducers, at low electrolyte concentrations, reduces the solubility of biomolecules. In this case, the solubility of biomolecules can be increased, if the electrolyte concentration is increased. In addition, according to the generalized Green's equation, the presence of reducers, in high electrolyte concentrations, increases the solubility. Thus the reducers shift salting out to higher salt concentrations. These findings, have very important applications, not only to the precipitation as a purification method, but also to the precipitation aiming crystallization. In summary, the solubility of biomolecules in the **generalized**

**salting in** increases, when the electrolyte concentration increases and or the reducer concentration decreases and vice versa. The solubility of macromolecules in the **generalized salting out** increases, when the electrolyte concentration decreases and or the reducer concentration increases and vice versa.

The following apply to ion exchange and hydrophobic chromatography. In ion exchange chromatography, the presence of reducers leads to delay of elution of biomolecules. In general, elution from ion exchange matrices is induced by the increase of the electrolyte concentration and or by the decrease of the reducers concentration and vice versa. In hydrophobic chromatography, the presence of reducers induces the elution of biomolecules. In general, elution from the hydrophobic matrices is induced by the decrease of the electrolyte concentration and or the increase of the reducers concentration and vice versa.

In conclusion, in aqueous electrolyte solutions, the different substances, and as a result biomolecules, interact mainly via electrostatic interactions in the presence of low electrolyte concentration and via polar and hydrophobic interactions in the presence of high electrolyte concentration. The addition of ionic strength reducers increases electrostatic interactions and decreases polar interactions.



## **Περιεχόμενα**

<b>Πρόλογος</b>	<b>1</b>
<b>Περίληψη</b>	<b>2</b>
<b>Summary</b>	<b>4</b>
<b>Περιεχόμενα</b>	<b>6</b>
1. Εισαγωγή	15
<b>1.1. Διαλύματα.</b>	<b>16</b>
1.1.1. Αλληλεπιδράσεις ανάμιξης. Διαλύτες.	16
1.1.2. Πρωταγονιστικοί και εν δυνάμει ηλεκτρολύτες. Σταθερά διάστασης των εν δυνάμει ηλεκτρολυτών.	16
1.1.3. Σύμπλοκη σφαίρα ή σφαίρα ενυδάτωσης των ιόντων. Αριθμός ενυδάτωσης.	17
1.1.4. Τα βιομόρια σαν πολυηλεκτρολύτες και πολικά μόρια.	17
1.1.5. Σφαίρα ενυδάτωσης βιομορίων.	18
<b>1.2. Φυσικοχημικές θεωρίες για τα υδατικά και τα μικτά υδατικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα.</b>	<b>20</b>
1.2.1. Ο συντελεστής ενεργότητας. Έλεγχος θεωρητικών μοντέλων.	20
1.2.2. Σημαντικές θεωρίες που στηρίζονται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.	21
1.2.2.1. Η θεωρία των Debye-Hückel (ιοντικό νέφος).	21
1.2.2.2. Η θεωρία των Debye-Hückel αποτελεί ορισμό νόμο για τα ηλεκτρολυτικά διαλύματα. Ισχύει για αραιούς ηλεκτρολύτες (από 0 μέχρι 0,001 M).	21
1.2.2.3. Η θεωρία του ιοντικού ζεύγους (Bjerrum, Fuoss, Onsager). Σταθερά σύνδεσης.	22
1.2.3. Άλλες θεωρίες	22
<b>1.3. Η διαλυτότητα των βιομορίων.</b>	<b>24</b>
1.3.1. Η διαλυτότητα των βιομορίων σε υδατικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα.	24
1.3.1.1. Εναλάτωση.	24
1.3.1.2. Εξοάλωση.	24
1.3.1.3. Η γενική εξίσωση του Green.	25
1.3.2. Διαλυτότητα βιομορίων σε οργανικά διαλύματα.	25
1.3.3. Διαλυτότητα βιομορίων σε διαλύματα PEG.	27
<b>1.4. Εφαρμογές της διαφορικής διαλυτότητας των βιομορίων.</b>	<b>27</b>
1.4.1. Κλασμάτωση βιομορίων με κατακρήνηση.	27
1.4.2. Κρυστάλλωση βιομορίων με σκοπό την απομόνωσή τους ή και την κρυστάλλογραφική μελέτη τους.	27
<b>1.5. Αλληλεπιδράσεις.</b>	<b>28</b>
1.5.1. Αλληλεπιδράσεις βιομορίων στη στερεή φάση του ιζήματος και των κρυστάλλων.	28
1.5.2. Αλληλεπίδραση βιομορίων με τη στερεή φάση των χρωματογραφικών προσροφητών.	28

<b>1.6. Κρυστάλλωση βιομορίων.</b>	<b>29</b>
1.6.1. Ειδική περίπτωση κατακρήμνισης. Ομοιογένεια. Καθαρότητα.	29
1.6.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση.	29
1.6.3. Διαγράμματα διαλυτότητας.	29
1.6.3.1. Πυκνές κρυστάλλωσης. Ζώνη πυκνήωσης.	30
1.6.3.2. Μεγάλα κρυστάλλων. Μετασταθερή ζώνη.	30
1.6.4. Σχεδιασμός κρυστάλλωσης.	32
1.6.5. Σχεδιασμός κρυστάλλωσης σε ένα βήμα.	32
1.6.6. Σχεδιασμός κρυστάλλωσης σε δύο βήματα. Εντυκνήωση.	32
1.6.7. Διατήρηση συνθηκών μετασταθερής ζώνης.	33
1.6.8. Τεχνικές κρυστάλλωσης.	33
1.6.8.1. Ολική ανάμιξη (Batch).	33
1.6.8.2. Εξάτμιση ή συμπύκνωση (evaporation or concentration).	33
1.6.8.3. Διαπίδυση (dialysis).	33
1.6.8.4. Διάχυση ατμών (vapor diffusion).	33
<b>1.7. Τα βιομόρια που εμφανίζονται στη διατριβή.</b>	<b>36</b>
1.7.1. Μεταλλάγες της πρωτεΐνης ROP (Repressor Of Primer)	36
1.7.2. Η πρωτεΐνη PI (Polyamine Induced protein).	36
1.7.3. Η πρωτεΐνη BseCI.	37
1.7.4. Η πρωτεΐνη νιτροδοξειδικτάση (Nitrite reductase).	37
<b>1.8. Σκοπός της διατριβής.</b>	<b>38</b>

## 2. Μικτά υδατικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα 39

<b>2.1. Γενικευμένη εναλάτωση και εξαλάτωση. Μειωτές ιοντικής ισχύος. Γενικευμένο διάγραμμα διαλυτότητας σε μικτά υδατικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα.</b>	<b>40</b>
2.1.1. Λογικό παράδοξο.	40
2.1.2. Γενικευμένη εναλάτωση.	40
2.1.3. Γενικευμένη εξαλάτωση. Αναστολή εξαλάτωσης.	40
2.1.4. Μειωτές ιοντικής ισχύος	41
2.1.5. Γενικευμένο διάγραμμα διαλυτότητας σε μικτά υδατικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα.	41
2.1.6. Γενικές παρατηρήσεις.	44
<b>2.2. Κατανόηση της γενικευμένης εναλάτωσης και εξαλάτωσης.</b>	<b>48</b>
2.2.1. Η θεωρία των Debye-Hückel προβλέπει τη γενικευμένη εναλάτωση.	48
2.2.2. Η θεωρία του ιοντικού ζεύγους ισχυροποιεί ακόμα περισσότερο την πρόβλεψη.	48
2.2.3. Η θεωρία του ιοντικού ζεύγους προβλέπει την αναστολή της εξαλάτωσης.	48
2.2.4. Επεξήγηση και ορισμός του όρου μειωτής ιοντικής ισχύος.	49
2.2.5. Μικροσκοπική εξήγηση της εναλάτωσης.	49
2.2.6. Μικροσκοπική εξήγηση της εξαλάτωσης.	50
2.2.7. Παράγοντες που περιτάλκουν το πρόβλημα.	51

<b>2.3.</b>	<b>Η γενικευμένη εξίσωση του Green, για τα ηλεκτρολυτικά διαλύματα παρουσία μειωτών, προβλέπει τις πειραματικές παρατηρήσεις και τα πορίσματα του γενικευμένου διαγράμματος.</b>	<b>52</b>
2.3.1.	Πρόβλεψη της γενικευμένης εναλάτωσης.	52
2.3.2.	Πρόβλεψη της γενικευμένης εξαλάτωσης, με την συμβολή της θεωρίας του ιοντικού ζεύγους.	53
<b>2.4.</b>	<b>Ιδιότητες της διαλυτής φάσης στη γειτονιά των δύο διαφορετικών ζωνών κατακρήμνισης.</b>	<b>57</b>
2.4.1.	Περιοχή γενικευμένης εναλάτωσης, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία.	57
2.4.2.	Περιοχή γενικευμένης εξαλάτωσης, πολικές και υδροφοβες αλληλεπιδράσεις και υδροφοβική χρωματογραφία.	57
2.4.3.	Προβλέψεις του γενικευμένου διαγράμματος για την υδροφοβική και την ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία. Ιδιοχαρακτηριστική συμπεριφορά.	58
<b>2.5.</b>	<b>Ζώνη πυρήνωσης και μετασταθερή ζώνη στο γενικευμένο διάγραμμα.</b>	<b>60</b>
2.5.1.	Ζώνη πυρήνωσης.	60
2.5.2.	Μετασταθερή ζώνη.	60
2.5.3.	Προβλέψεις του γενικευμένου διαγράμματος για την κρισιμότητα και την κατακρήμνιση. Ιδιοχαρακτηριστική συμπεριφορά.	60
<b>2.6.</b>	<b>Πόρισμα. Η κατακρήμνιση με μεταβολή του pH στην περιοχή της εναλάτωσης αναστέλλεται με αύξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη. Οξένιση.</b>	<b>62</b>
<b>2.7.</b>	<b>Έλεγχος του μοντέλου και εφαρμογές.</b>	<b>62</b>

### **3. Χρωματογραφία, Εφαρμογές** **63**

<b>3.1.</b>	<b>Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής.</b>	<b>64</b>
3.1.1.	Προβλέψεις της γενικευμένης εναλάτωσης για την ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία.	64
3.1.2.	Κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία. Μετατόπιση της έκλυσης της ριβονουκλεάσης Α σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλατιού.	66
3.1.3.	Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία. Μετατόπιση της έκλυσης της β λακτοσφαιρίνης σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλατιού.	66
3.1.4.	Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία. Μετατόπιση της έκλυσης της οβαλβουμίνης σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλατιού.	67
3.1.5.	Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία. Έκλυση της οβαλβουμίνης με ελάττωση του PEG 8000.	68
<b>3.2.</b>	<b>Χρωματογραφία Υδροφοβικότητας.</b>	<b>73</b>
3.2.1.	Πρόβλεψη της γενικευμένης εξαλάτωσης για την υδροφοβική χρωματογραφία.	73
3.2.2.	Έκλυση της λισοζύμης με αύξηση του PEG.	75
3.2.3.	Έκλυση της ριβονουκλεάσης Α με αύξηση του PEG.	75
3.2.4.	Έκλυση του χιμοθρυψινογόνου με αύξηση της γλυκερόλης.	76
3.2.5.	Έκλυση της ριβονουκλεάσης Α με ελάττωση του αλατιού.	76

<b>3.3. Πρωτόκολλο καθαρισμού των μεταλλαγών της πρωτεΐνης ROP.</b>	<b>82</b>
3.3.1. Μειοενετήματα του αρχικού πρωτοκόλλου απομόνωσης των μεταλλαγών της πρωτεΐνης ROP.	82
3.3.2. Βελτιωμένο σχήμα απομόνωσης των μεταλλαγών της πρωτεΐνης ROP.	82
3.3.2.1. Εσχόλαση.	82
3.3.2.2. Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία Q Sepharose Fast Flow.	82
3.3.2.3. Χρωματογραφία προσρόφησης Υδροξυλαπατίτη.	83
3.3.2.4. Συμπύκνωση.	83
3.3.2.5. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης Sephacryl 100 ή Superdex 75.	83
3.3.2.6. Συμπύκνωση και ανταλλαγή διαλύματος με διαλυτοδιαπίδωση.	83
<b>3.5. Για πρώτη φορά στην πρωτεΐνη RM Δ5 χρησιμοποιούνται οι γνώσεις για τους μειωτές ιοντικής ισχύος στην ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία.</b>	<b>85</b>
<b>3.6. Πρωτόκολλο καθαρισμού της πρωτεΐνης PI.</b>	<b>86</b>
3.6.1. Το σχήμα απομόνωσης της πρωτεΐνης PI.	86
3.6.1.1. Εσχόλαση.	86
3.6.1.2. Κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία S Sepharose Fast Flow.	86
3.6.1.3. Ανταλλαγή διαλύματος με διαλυτοδιαπίδωση.	86
3.6.1.4. Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία Q Sepharose Fast Flow.	86
3.6.1.5. Συμπύκνωση.	87
3.6.1.6. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης Sephacryl 200.	87
3.6.1.7. Συμπύκνωση και ανταλλαγή διαλύματος με διαλυτοδιαπίδωση.	87
3.6.1.8. Χρήση της μεθόδου χρωματοεστίασης.	87
3.6.2. Το χρωματογραφικό παράδοξο.	88
<b>3.7. Μετατροπή στο πρωτόκολλο καθαρισμού της πρωτεΐνης NIR.</b>	<b>89</b>
3.7.1. Σύνομη περιγραφή του πρωτοκόλλου καθαρισμού της πρωτεΐνης NIR.	89
3.7.2. Τα προβλήματα του πρωτοκόλλου καθαρισμού της πρωτεΐνης NIR.	89
3.7.3. Για πρώτη φορά στην πρωτεΐνη NIR χρησιμοποιείται το PEG για έλκυση από υδροφοβή χρωματογραφία.	89
<b>3.8. Μετατροπή στο πρωτόκολλο καθαρισμού της πρωτεΐνης BseCI.</b>	<b>91</b>
3.8.1. Σύνομη περιγραφή του πρωτοκόλλου καθαρισμού της πρωτεΐνης BseCI.	91
3.8.2. Τα προβλήματα του πρωτοκόλλου καθαρισμού της πρωτεΐνης BseCI.	91
3.8.3. Βελτίωση του πρωτοκόλλου απομόνωσης της πρωτεΐνης BseCI.	91

<b>3.9.</b>	<b>Εφαρμογή των συνεπειών της γενικευμένης εναλάτωσης και εξαλάτωσης για την ταχύτερη απομόνωση βιομορφιών με κατακρήμνιση.</b>	<b>93</b>
3.9.1.	Παρατηρήσεις.	93
3.9.2.	Πρωτεϊκόλλο για την γρήγορη απομόνωση των μεταλλαγών της ROP.	93
3.9.2.1.	Εξούλιση:	93
3.9.2.2.	Οξόνηση σε pH 5.2 που δεν κατακρήμνίζει την πρωτεΐνη ROP.	93
3.9.2.3.	Εξαλάτωση με θειικό αμμώνιο σε pH 5.2 που δεν κατακρήμνίζει την πρωτεΐνη ROP.	94
3.9.2.4.	Εξαλάτωση με θειικό αμμώνιο σε pH 4.0 που κατακρήμνίζει την πρωτεΐνη ROP.	94
3.9.2.5.	Επαναδιάλυση του ιζήματος.	94
3.9.2.6.	Εξαλάτωση με θειικό αμμώνιο σε pH 7,5 που δεν κατακρήμνίζει την πρωτεΐνη ROP.	94
3.9.2.7.	Εξαλάτωση με θειικό αμμώνιο σε pH 5,2 που δεν κατακρήμνίζει την πρωτεΐνη ROP.	94
3.9.2.8.	Εξαλάτωση με θειικό αμμώνιο σε pH 4,0 που κατακρήμνίζει την πρωτεΐνη ROP.	94
3.9.2.9.	Επαναδιάλυση του ιζήματος σε συνθήκες εναλάτωσης.	95
3.9.2.10.	Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία Q Sepharose Fast Flow.	95
<b>3.10.</b>	<b>Επίδραση του PEG 8000 στην ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία Q Sepharose για την πρωτεΐνη BseCl.</b>	<b>97</b>
3.10.1.	Πρώτο στάδιο ανιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας.	97
3.10.2.	Ελάττωση του pH. Δεύτερο στάδιο ανιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας.	97
3.10.3.	Ελάττωση του pH παρουσία 15% w/v PEG 8000. Δεύτερο στάδιο ανιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας.	97
3.10.4.	Σύγκριση των αποτελεσμάτων.	98

#### 4. Κρυσταλλώσεις, Εμφυσιές 100

<b>4.1.</b>	<b>Αρχικές δοκιμές κρυστάλλωσης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης RM 31A-P.</b>	<b>101</b>
4.1.1.	Συνθήκες κρυστάλλωσης της φυσικής πρωτεΐνης ROP και των μεταλλαγών του υδρόφοβου πυρήνα της ROP.	101
4.1.2.	Αρχική συνθήκη κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης RM 31A-P.	101
4.1.3.	Δοκιμή βελτιστοποίησης των συνθηκών κρυστάλλωσης.	102
4.1.3.1.	Ρυθμιστικό διάλυμα.	102
4.1.3.2.	Αρχική και τελική συγκέντρωση αιθανόλης.	102
4.1.3.3.	Έλεγχος επιπρόσθετων ουσιών και θερμοκρασίας.	102
4.1.4.	Μεταπήδηση στην τεχνική καθιστής σταγόνας. Δημιουργία νέας συσκευής κρυστάλλωσεων.	102
4.1.5.	Εντυχνήωση.	103

<b>4.2.</b>	<b>Αρχικές δοκιμές για κρυστάλλωση της πρωτεΐνης PI.</b>	<b>104</b>
4.2.1.	Αρχική συνθήκη κρυστάλλωσης της PI.	104
4.2.2.	Δοκιμή βελτιστοποίησης των συνθηκών κρυστάλλωσης.	104
4.2.2.1.	Ρυθμιστικό διάλυμα.	104
4.2.2.2.	Αρχική και τελική συγκέντρωση PEG.	104
4.2.2.3.	Έλεγχος επιπρόσθετων ουσιών και θερμοκρασίας.	104
4.2.2.4.	Μεταπήδηση στην τεχνική της καθιστής σταγόνας. Εντυξη- νωση.	104
4.2.2.5.	Κάθε διαφορετική παρτίδα πρωτεΐνης PI συμπεριφέρεται διαφορετικά.	104
<b>4.3.</b>	<b>Η γενικευμένη εναλάτωση εξηγεί και προτείνει.</b>	<b>105</b>
4.3.1.	Τρόπος δράσης της τεχνικής της διάχυσης ατμών στην περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης. Αδυναμίες της τεχνικής.	105
4.3.2.	Εξήγηση της αδυναμίας κρυστάλλωσης της PI και της πρωτεΐνης RM 31A-P.	105
4.3.3.	Η κρυστάλλωση των μεταλλαγών της ROP, με τη μέθοδο της κρυσταλλής σταγόνας, εντελώς τυχαία χρησιμοποιεί τα πορίσματα της γενικευμένης εναλάτωσης.	106
<b>4.4.</b>	<b>Η δημιουργία δύο συστημάτων μικροδιαπίδυσης για κρυσταλλώσεις.</b>	<b>108</b>
4.4.1.	Η τεχνική της διαπίδυσης είναι η μόνη συμβατή με τη γενικευμένη εναλάτωση και εξαλάτωση.	108
4.4.2.	Σύστημα μικροδιαπίδυσης από δοκιμαστικό σωλήνα Eppendorf 500 ή 1500 μl και τριβλίο Petri. Όγκος σταγόνας από 30 ως 300 μl.	108
4.4.3.	Σύστημα μικροδιαπίδυσης από κίτρινο αιεροφόρο, γέφυρα καθιστής σταγόνας και πιάτα 24 πηγαδιών (Limbro). Όγκος σταγόνας από 5 ως 50 μl.	109
<b>4.5.</b>	<b>Σχεδιασμός πειραμάτων κρυστάλλωσης στην περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης.</b>	<b>112</b>
4.5.1.	Κρυστάλλωση της πρωτεΐνης RM 31A-P.	112
4.5.2.	Βελτίωση των ποιοματικών κρυστάλλων.	112
4.5.3.	Βελτίωση των ραβδόμορφων κρυστάλλων.	113
4.5.4.	Άλλες προοπτικές. Με την πάροδο του χρόνου οι κρύσταλλοι γερνάνε.	113
4.5.5.	Κρυστάλλωση της πρωτεΐνης RM Δ5. Ιδιαιτερότητες της πρωτεΐνης αυτής.	115
4.5.6.	Κρυστάλλωση της φυσικής πρωτεΐνης ROP με την τεχνική της διαπί- δυσης.	115
4.5.7.	Κρυστάλλωση της πρωτεΐνης PI.	117
4.5.8.	Η κρυστάλλωση της πρωτεΐνης PI εξαρτάται από την παρτίδα καθαρι- σμού. Οι κρύσταλλοι της πρωτεΐνης αυτής γερνάνε εύκολα.	119
4.5.9.	Κρυστάλλωση της μεθυλάσης BseCI.	119
4.5.10.	Η κρυστάλλωση της πρωτεΐνης BseCI εξαρτάται από την ομοιογένεια του δείγματος. Οι κρύσταλλοι της πρωτεΐνης αυτής γερνάνε εύκολα.	120
4.5.11.	Γενικές παρατηρήσεις για την κρυστάλλωση στην περιοχή της γενικευ- μένης εναλάτωσης.	120

<b>4.6.</b>	<b>Η γενικευμένη εξαλάτωση εξηγεί και προτείνει.</b>	<b>123</b>
4.6.1.	Τρόπος δράσης της τεχνικής της διάχυσης ατμών στην περιοχί της γενικευμένης εξαλάτωσης. Αδυναμίες της τεχνικής.	123
4.6.2.	Τα πειράματα με τη λυσοζύμη ρίχνουν φως στην περιοχί της γενικευμένης εξαλάτωσης.	123
4.6.3.	Παρατηρήσεις από τη βιβλιογραφία βρίσκουν πλέον εξήγηση από τη γενικευμένη εξαλάτωση.	123
<b>4.7.</b>	<b>Σχεδιασμός πειραμάτων κρυστάλλωσης στην περιοχί της γενικευμένης εξαλάτωσης.</b>	<b>126</b>
4.7.1.	Κρυστάλλωση της νιτροδοροδοικτάσης NIR.	126
4.7.2.	Έλεγχος της συμπεριφοράς της πρωτεΐνης NIR σε πειράματα εντυρήωσης συναρτήσσει της συγκέντρωσης PEG 200.	126
<b>4.8.</b>	<b>Γενικές παρατηρήσεις.</b>	<b>127</b>
4.8.1.	Οι κρυστάλλοι είναι συνήθως εξαρτημένοι από τις ιδιότητες της περιοχής στην οποία δημιουργήθηκαν.	127
4.8.2.	Οι κρυστάλλοι της πρωτεΐνης RM 31A-P είναι πολύ ευαίσθητοι στις αλλαγές του μητρικού διαλύματος.	127
<b>4.9.</b>	<b>Κρυσταλλογραφικά δεδομένα.</b>	<b>128</b>
4.9.1.	Κρυσταλλογραφικά δεδομένα για τους κρυστάλλους της πρωτεΐνης RM 31A-P.	128
4.9.2.	Κρυσταλλογραφικά δεδομένα για τους κρυστάλλους της πρωτεΐνης RM Δ5.	128
4.9.3.	Κρυσταλλογραφικά δεδομένα για τους κρυστάλλους της πρωτεΐνης PI.	129
4.9.4.	Κρυσταλλογραφικά δεδομένα για τους κρυστάλλους της πρωτεΐνης BseCI.	129
<b>4.10.</b>	<b>Προσπάθειες για την επίλυση των δομών.</b>	<b>131</b>
4.10.1.	Η πρωτεΐνη RM 31A-P.	131
4.10.2.	Η πρωτεΐνη RM Δ5.	131
4.10.3.	Η πρωτεΐνη PI.	131

## 5. Συζήτηση 132

<b>5.1.</b>	<b>Η πραγματική σειρά των γεγονότων.</b>	<b>133</b>
5.1.1.	Η συμβολή των πρωτεΐνών RM 31A-P και PI.	133
5.1.2.	Η συγκαρία.	133
<b>5.2.</b>	<b>Συμπεράσματα.</b>	<b>134</b>
5.2.1.	Κατακρίσηση.	134
5.2.2.	Χρωματογραφία.	134
5.2.3.	Κρυστάλλωση.	135
5.2.4.	Οργάνωση της γνώσης για τα βιομόρια κάτω από το πρίσμα των ηλετροστατικών και των πολικών αλληλεπιδράσεων.	136
<b>5.3.</b>	<b>Προοπτικές.</b>	<b>136</b>



<b>6.1. Πρωτόκολλο μέτρησης της διαλυτής πρωτεΐνης στα πειράματα του πίνακα 2.1. και 2.2.</b>	<b>139</b>
6.1.1. Πείραμα πίνακα 2.1.	139
6.1.2. Πείραμα πίνακα 2.2.	139
<b>6.2. Το αρχικό σχήμα απομόνωσης των μεταλλαγών της πρωτεΐνης ROP.</b>	<b>139</b>
6.2.1. Εκχύλιση.	139
6.2.2. Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία DEAE Sephacel.	140
6.2.3. Συμπύκνωση και ανταλλαγή διαλύματος με διαπίδωση.	140
6.2.4. Χρωματογραφία προσρόφησης Υδροξυλαπατίτη.	140
6.2.5. Συμπύκνωση και ανταλλαγή διαλύματος με διαπίδωση.	140
6.2.6. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης Sephadex G75 superfine.	140
6.2.8. Επιπλέον βήματα καθαρισμού. Συμπύκνωση.	141
<b>6.3. Ηλεκτροφόρηση σε SDS αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμίδης.</b>	<b>141</b>
<b>6.4. Πρωτόκολλο εκχύλισης βακτηρίων <i>E. coli</i>.</b>	<b>141</b>
<b>6.5. Παραγωγή βακτηριακής πάστας της πρωτεΐνης PI.</b>	<b>141</b>
<b>6.6. Διαλυτοδιαπίδωση.</b>	<b>142</b>
<b>6.7. Υλικά</b>	<b>143</b>
6.7.1. Συσκευές.	143
6.7.2. Χρωματογραφικά Υλικά.	143
6.7.3. Πρωτεΐνικοί μάγνητες.	143
6.7.4. Χημικά.	143
<b>Συντομογραφίες</b>	<b>144</b>
<b>Γλωσσάρι</b>	<b>146</b>
<b>Βιβλιογραφία</b>	<b>149</b>

## 1. Εισαγωγή

## 1.1. Διαλύματα.

### 1.1.1. Αλληλεπιδράσεις ανάμιξης. Διαλύτες. (1)

Οι αλληλεπιδράσεις ανάμιξης στα διαλύματα μπορεί να είναι διαφόρων τύπων: ιοντικές-διπολικές, διπολικές-διπολικές, υδρογονικοί δεσμοί και ιοντικές-ιοντικές. Με βάση τη διηλεκτρική τους σταθερά ( $\epsilon$ ) οι διαλύτες μπορούν να ομαδοποιηθούν σύμφωνα με τον πίνακα 1.1.

	Διπολικοί ( $\epsilon > 15$ )		Μη πολικοί ή Άπολοι ( $\epsilon < 15$ )
	Πρωτικοί (O-H, N-H...)	Απρωτικοί	
Νερό	80	Ακετονιτρόλιο 37,5	Βενζόλιο 2,3
Φορμικό οξύ	58	Ακετόνη 21	ν-Εξάνιο 1,9
Μεθανόλη	34		
Αιθανόλη	25		

**Πίνακας 1.1.** Πολικότητα και διηλεκτρική σταθερά  $\epsilon$  των διαλυμάτων στους 20° C. (1)

Στα μόρια των διπολικών διαλυτών ( $\epsilon > 15$ ) δημιουργούνται δίπολα μεταξύ ατόμων διαφορετικής ηλεκτραρνητικότητας (π.χ. C=O, C-Cl, κλπ). Τα δίπολα αυτά είναι υπεύθυνα για τις διπολικές αλληλεπιδράσεις. Αν τα μόρια των διπολικών διαλυτών περιέχουν και εκτεθειμένα πρωτόνια (O-H, N-H, κλπ), τότε οι διπολικοί αυτοί διαλύτες ονομάζονται πρωτικοί (Protic), διαφορετικά μη πρωτικοί ή απρωτικοί (Aprotic). Στην κατηγορία των μη πολικών διαλυτών ( $\epsilon < 15$ ) ανήκουν κυρίως οι υδρογονάνθρακες.

### 1.1.2. Πραγματικοί και εν δυνάμει ηλεκτρολύτες. Σταθερά διάστασης των εν δυνάμει ηλεκτρολυτών. (2)

Πραγματικοί (True) ή ισχυροί ηλεκτρολύτες ονομάζονται τα ιοντικά σύμπλοκα, τα οποία διάστανται πλήρως σε διπολικούς διαλύτες. Οι ισχυροί ηλεκτρολύτες (π.χ. τα αλάτια) διαλυτοποιούνται σε πολικούς διαλύτες με ιοντικές-πολικές αλληλεπιδράσεις.

Εν δυνάμει (Potential) ή ασθενείς ηλεκτρολύτες ονομάζονται τα ιοντικά συμπλέγματα που δεν διάστανται πλήρως σε διπολικούς διαλύτες. Το ποσοστό διάστασης των ηλεκτρολυτών αυτών προσδιορίζεται από τη σταθερά διάστασης. Η σταθερά διάστασης εξαρτάται κυρίως από τη φύση του διαλύτη.

### 1.1.3. Σύμπλοξη σφαίρα ή σφαίρα ενυδάτωσης των ιόντων. Αριθμός ενυδάτωσης. (2)

Τα ιόντα σε υδατικό διάλυμα αλληλεπιδρούν άμεσα με ιοντικές-διπολικές (ιοντικές-τετραπολικές (2)) δυνάμεις με τα μόρια του νερού. Συνέπεια της αλληλεπίδρασης αυτής είναι η οργάνωση της σύμπλοξης σφαίρας ή σφαίρας ενυδάτωσης (Εικόνα 1.1.). Κάθε ιόν διατάσσει, πολώνει, συγκεκριμένο αριθμό μορίων νερού γύρω του και δημιουργεί τη λεγόμενη πρώτη σφαίρα ενυδάτωσης. Ο συγκεκριμένος αριθμός μορίων νερού που οργανώνεται για τη δημιουργία της πρώτης σφαίρας ενυδάτωσης ονομάζεται αριθμός ενυδάτωσης και μπορεί να προσδιοριστεί πειραματικά με διάφορες φυσικοχημικές μεθόδους (2). Την πρώτη σφαίρα ενυδάτωσης περιβάλλει μία δεύτερη λιγότερο οργανωμένη σφαίρα ενυδάτωσης. Το νερό που περιβάλλει την δεύτερη σφαίρα ενυδάτωσης ονομάζεται άμορφο νερό (bulk water).

Η διηλεκτρική σταθερά των υδατικών ηλεκτρολυτικών διαλυμάτων ελαττώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης των ηλεκτρολυτών στο διάλυμα (2). Η αύξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη στο διάλυμα συνεπάγεται αύξηση του ποσοστού των οργανωμένων μορίων νερού, που συμμετέχουν σε σφαίρες ενυδάτωσης. Η αύξηση του οργανωμένου νερού έχει σαν αποτέλεσμα την ελάττωση της πολωσιμότητας του διαλύματος και σαν συνέπεια την ελάττωση της διηλεκτρικής σταθεράς του.

Είναι γνωστό ότι, 5 μόρια νερού συμμετέχουν στην πρώτη σύμπλοξη σφαίρα ενός ιόντος νατρίου και 2 μόρια νερού συμμετέχουν στην πρώτη σύμπλοξη σφαίρα ενός ιόντος χλωρίου. Άρα 7 moles νερού συμμετέχουν στις πρώτες σφαίρες ενυδάτωσης για κάθε 1mole ιόντων NaCl. Η μοριακότητα του καθαρού νερού είναι 55,5M ενώ η μοριακότητα του νερού σε διάλυμα 5M NaCl είναι 48,5M (2).

Υπολογίζοντας το ποσοστό των δεσμευμένων μορίων νερού για ένα διάλυμα 5M NaCl βρίσκουμε ότι 35 moles νερού από τα προσφερόμενα 48,5 moles συμμετέχουν σε πρώτες σφαίρες ενυδάτωσης. Άρα το 72 % των μορίων νερού του διαλύματος είναι δεσμευμένο από τα ιόντα για τη δημιουργία της πρώτης σφαίρας ενυδάτωσης (2).

### 1.1.4. Τα βιομόρια σαν πολυηλεκτρολύτες και πολικά μόρια. (3,4)

Τα βιομόρια, συνήθως, εμφανίζουν στην επιφάνειά τους τόσο πολικές όσο και φορτισμένες, ιοντικές, ομάδες.

α) Με τις πολικές ομάδες τους, τα βιομόρια μπορούν να αλληλεπιδράσουν με υδρογονικούς δεσμούς με μόρια νερού, μεταξύ τους ή και με άλλα βιομόρια.

β) Με τις φορτισμένες ομάδες τους, τα βιομόρια προσανατολίζουν τα μόρια νερού γύρω τους, με τον ίδιο τρόπο που πολώνουν τα μόρια του νερού γύρω τους τα ιόντα των αλατιών. Με τις φορτισμένες ομάδες τους, τα βιομόρια μπορούν επίσης

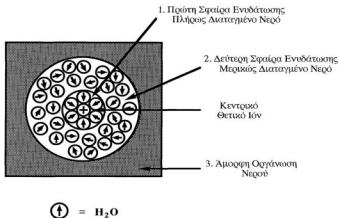
να αλληλεπιδράσουν με άλλα αντίθετα φορτισμένα ιόντα ή άλλες αντίθετα φορτισμένες ομάδες ίδιων ή διαφορετικών μορίων.

#### **1.1.5. Σφαίρα ενυδάτωσης βιομορίων. (3-5)**

Τα βιομόρια λοιπόν δημιουργούν γύρω τους όπως και τα ιόντα μία πρώτη σφαίρα ενυδάτωσης ισχυρά διατεταγμένων μορίων νερού. Μία δεύτερη σφαίρα ενυδάτωσης με λιγότερο διαταγμένα μόρια νερού περιβάλλει την πρώτη σφαίρα. Στους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας που υπολογίζονται από την κρυσταλλογραφική μελέτη των βιομορίων, πολλά από τα μόρια του νερού που αποτελούν την πρώτη σφαίρα ενυδάτωσης είναι ορατά. Εκτιμάται ότι για κάθε αμινοξικό κατάλοιπο μίας πρωτεΐνης αντιστοιχεί περίπου ένα δεσμευμένο μόριο νερού, που είναι ορατό στους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας.

Ένα μόριο λυσοζύμης περιβάλλεται από 200 περίπου δεσμευμένα μόρια νερού σύμφωνα με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα. Σε ένα διάλυμα λυσοζύμης 100 mg/ml, τα μόρια της λυσοζύμης καταλαμβάνουν το 8% του συνολικού όγκου του διαλύματος. Άρα η μοριακότητα του νερού στο διάλυμα αυτό είναι 51 M. Για κάθε 1 M λυσοζύμης 200 M νερού είναι δεσμευμένα από τα πρωτεΐνικά μόρια.

Υπολογίζοντας το ποσοστό των δεσμευμένων μορίων νερού για ένα διάλυμα 100mg/ml ( 0,007 M) λυσοζύμης βρίσκουμε ότι 1,4 moles νερού είναι δεσμευμένα από τα μόρια της πρωτεΐνης. Άρα περίπου το 3% των μορίων του νερού είναι δεσμευμένα από τα μόρια της πρωτεΐνης. Οι υπολογισμοί και τα απαραίτητα πειράματα για τη λυσοζύμη πραγματοποιήθηκαν για να ικανοποιήσουν την περιέργειά μου.



**Εικόνα 1.1.** (3) Τα μόρια του διαλύτη στη γειτονιά ενός ιόντος μπορεί να θεωρηθούν ότι συμμετέχουν στη δημιουργία τριών περιοχών διαφορετικής οργάνωσης διαλύτη. Οι τρεις αυτές περιοχές είναι: (1) Πρώτη σφαίρα ενυδάτωσης. Πλήρως διαταγμένος διαλύτης. (2) Δεύτερη σφαίρα ενυδάτωσης. Μερικώς διαταγμένος διαλύτης. (3) Άμορφος διαλύτης. Περιοχή ανοργάνωτου διαλύτη.

## 1.2. Φυσιοχημικές θεωρίες για τα υδατικά και τα μικτά υδατικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα. (2,6-9)

Οι ιδιότητες των ηλεκτρολυτικών διαλυμάτων αποτελούν αντικείμενο έρευνας της ηλεκτροχημείας και γενικότερα της φυσιοχημείας. Διάφορες θεωρίες έχουν αναπτυχθεί με σκοπό την περιγραφή των ιδιοτήτων αυτών.

### 1.2.1. Ο συντελεστής ενεργότητας. Έλεγχος θεωρητικών μοντέλων. (2)

Σε ιδανικά διαλύματα μη ηλεκτρολυτών το χημικό δυναμικό περιγράφεται από τον τύπο 1.1.

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln x_i \quad 1.1.$$

Όπου R η παγκόσμια σταθερά των αερίων, T η θερμοκρασία,  $x_i$  η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας εκφρασμένη σε κλάσμα της μοριακότητας και  $\mu_i^0$  το χημικό δυναμικό για την κανονική κατάσταση όπου  $x_i = 1$ .

Στα πραγματικά διαλύματα η μεταβολή του χημικού δυναμικού δεν εξαρτάται από τη συγκέντρωση αλλά από την ενεργή συγκέντρωση  $f_i x_i$  της διαλυμένης ουσίας. Ο συντελεστής  $f_i$  ονομάζεται συντελεστής ενεργότητας. Για τα πραγματικά διαλύματα η μεταβολή του χημικού δυναμικού περιγράφεται από τον τύπο 1.2.

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln f_i x_i \quad 1.2.$$

Από τις εξισώσεις 1.1. και 1.2. είναι φανερό ότι η μεταβολή του χημικού δυναμικού μεταξύ πραγματικού και ιδανικού διαλύματος δίνεται από τον τύπο 1.3. και οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων του διαλύματος.

$$\Delta\mu_{i-1} = RT \ln f_i \quad 1.3.$$

Ο συντελεστής ενεργότητας μπορεί να μετρηθεί πειραματικά ή να υπολογιστεί θεωρητικά από το ελαττοτε θεωρητικό μοντέλο που περιγράφει τα διαλύματα. Η σύγκριση της θεωρητικής τιμής του συντελεστή ενεργότητας με την πειραματική τιμή του αποτελεί μέτρο αξιοπιστίας του θεωρητικού μοντέλου.

### 1.2.2. Σημαντικές θεωρίες που στηρίζονται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. (2,6,7)

Οι περισσότερες θεωρίες που αφορούν τα ηλεκτρολυτικά διαλύματα στηρίζονται στις ηλεκτροστατικές, κωλομοτυικές αλληλεπιδράσεις.

#### 1.2.2.1. Η θεωρία των Debye-Hückel (ιοντικό νέφος) (2).

Η θεωρία των Debye-Hückel είναι από τις πρωταρχικές στο χώρο της ηλεκτροχημείας. Η θεωρία αυτή απλοποιεί το πολυπαραμετρικό πρόβλημα του ηλεκτρολυτικού διαλύματος με το ακόλουθο μοντέλο. Το ηλεκτρολυτικό διάλυμα γύρω από ένα ιόν περιγράφεται σαν μία κατανομή ενός νοητού νέφους αντίθετου φορτίου γύρω από το κεντρικό σημειώο φορτίο του ιόντος.

Η θεωρία των Debye-Hückel στηρίζεται στις εξισώσεις των Poisson και Boltzmann. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή η μεταβολή του χημικού δυναμικού  $\mu$  ενός ηλεκτρολυτικού διαλύματος ως προς το ιδανικό διάλυμα δίνεται από τον τύπο 1.4.

$$\Delta\mu_{i1} = \frac{N_A(z_i e_0)^2}{2 \epsilon \kappa^{-1}} \quad 1.4.$$

Όπου  $N_A$  ο αριθμός του Avogadro,  $z_i e_0$  το φορτίο του κεντρικού ιόντος,  $\epsilon$  η διηλεκτρική σταθερά του μέσου. Η σταθερά  $\kappa^{-1}$  έχει διαστάσεις μήκους, καλείται "ακτίς" της ιονικής ατμόσφαιρας και προσδιορίζεται από τον τύπο 1.5.

$$\kappa^{-1} = \left( \frac{\epsilon k T}{4\pi \sum_i n_i^0 z_i^2 e_0^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad 1.5.$$

Όπου  $\epsilon$  η διηλεκτρική σταθερά,  $k$  η σταθερά Boltzmann,  $T$  η θερμοκρασία,  $n_i^0$  η συγκέντρωση ενός τύπου ιόντων στο διάλυμα και  $z_i$  το σθένος του συγκεκριμένου ιόντος.

#### 1.2.2.2. Η θεωρία των Debye-Hückel αποτελεί οριακό νόμο για τα ηλεκτρολυτικά διαλύματα. Ισχύει για αραιούς ηλεκτρολύτες (από 0 μέχρι 0,001 M) (2,6,7).

Συγκρίνοντας τις πειραματικές τιμές του συντελεστή ενεργότητας με τις θεωρητικά υπολογισμένες από το μοντέλο των Debye-Hückel, αποδεικνύεται ότι ο νόμος αυτός είναι ικανός να περιγράψει ικανοποιητικά μόνο τα αραιά ηλεκτρολυτικά διαλύματα (από 0 μέχρι 0,001 M). Διάφορες βελτιωμένες μορφές της θεωρίας έχουν δημιουργηθεί, αλλά και αυτών η ισχύς περιορίζεται στα αραιά ηλεκτρολυτικά διαλύματα (μέχρι 0,1 M).



### 1.2.2.3. Η θεωρία του ιοντικού ζεύγους (Bjerrum, Fuoss, Onsager). Σταθερά σύνδεσης. (2,6)

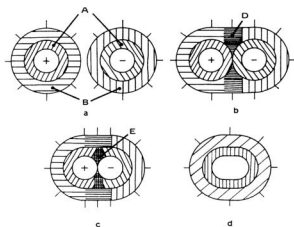
Η θεωρία του ιοντικού ζεύγους (Ion Pair) υποθέτει ότι, αν για κάποιο χρονικό διάστημα δύο ιόντα αντίθετου φορτίου βρεθούν σε απόσταση μικρότερη από  $a$ , τότε τα ιόντα αυτά δημιουργούν ένα ουδέτερο συνολικά δίπολο το οποίο ορίζεται σαν ιοντικό ζεύγος (Εικόνα 1.2.). Το ποσοστό των ιόντων που βρίσκεται σε ιοντικά ζεύγη υπολογίζεται από τη σταθερά σύνδεσης  $K_A$  (Ion association constant). Η δημιουργία των ιοντικών ζευγών εξαρτάται από την ελάττωση της διηλεκτρικής σταθεράς του μέσου και την αύξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη. Η δημιουργία ιοντικών ζευγών μπορεί να επεκταθεί σε δημιουργία τριπλών τετραπλών και πολλαπλών ιοντικών συμπλεγμάτων. Τέτοια συμπλέγματα έχουν παρατηρηθεί σε διαλύτες με μικρή διηλεκτρική σταθερά. Η θεωρία του ιοντικού ζεύγους αποχτά ιδιαίτερη σημασία στα πυκνά ηλεκτρολυτικά διαλύματα και στους διαλύτες με μικρή διηλεκτρική σταθερά.

### 1.2.3. Άλλες θεωρίες. (2,6,7)

Στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις βασίζονται και άλλες θεωρίες. Η μεταβολή της διηλεκτρικής σταθεράς, η θεώρηση του ηλεκτρολύτη σαν ψευδοπλέγμα και η χρησιμοποίηση της μη γραμμικής εξίσωσης των Poisson-Boltzmann έχουν αποτελέσει αρχές για την θεμελίωση των θεωριών αυτών (2,6,7).

Για τη μελέτη των ηλεκτρολυτικών διαλυμάτων έχουν αναπτυχθεί και διάφορες μη κουλอมπιές θεωρίες. Αναφορικά, η θεωρία της ενυδάτωσης και η θεωρία της επέκτασης του συντελεστή virial (virial coefficient expansion) (6,7).

Η μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ηλεκτρολυτικών διαλυμάτων με την στατιστική μηχανική βρίσκεται σε εξέλιξη. Το πρόβλημα είναι αρκετά πολύπλοκο και οι μαθηματικές εξισώσεις που το προσεγγίζουν είναι δύσκολες (6,7).



**Εικόνα 1.2.** Διαγραμματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ιόντων και διαλύτη στο διάλυμα. Ο άμορφος διαλύτης δεν εμφανίζεται στην εικόνα. (a) Πρώτη σφαίρα ενυδάτωσης (περιοχή A) και δεύτερη σφαίρα ενυδάτωσης (περιοχή B) για κατιόν και ανιόν. (b) Οι δεύτερες σύμπλοκες σφαίρες επικαλύπτονται (περιοχή D). Ιοντικό ζεύγος διαχωριζόμενο από διαλύτη. (c) Οι πρώτες σύμπλοκες σφαίρες επικαλύπτονται (περιοχή E). Ιοντικό ζεύγος σε επαφή. (d) Αφόρτιστη οργάνωση. (10)

### 1.3. Η διαλυτότητα των βιομορίων. (1,11-13)

#### 1.3.1. Η διαλυτότητα των βιομορίων σε υδατικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα. (1,11,12)

Η διαλυτότητα των βιομορίων σε ηλεκτρολυτικά διαλύματα έχει μελετηθεί εκτεταμένα. Δύο ιδιαίτερα χαρακτηριστικά παρουσιάζει η διαλυτότητα των βιομορίων σε σχέση με τη συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών στο διάλυμα. Τα χαρακτηριστικά αυτά αναφέρονται με τους όρους εναλάτωση (Salting-in) και εξαλάτωση (Salting-out) (Εικόνα 1.3.).

##### 1.3.1.1. Εναλάτωση (1,12).

Η αύξηση της διαλυτότητας των βιομορίων με την ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη σε χαμηλές συγκεντρώσεις αλατιών (<0,5 M) ονομάζεται εναλάτωση (Εικόνα 1.3.). Το φαινόμενο αυτό εξηγείται με τη θεωρία των Debye-Hückel και αφορά τις μη ειδικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φορτίων των βιομορίων και των ιόντων που βρίσκονται στο διάλυμα. Το αντίθετο της εναλάτωσης είναι η ελάτωση της διαλυτότητας των βιομορίων όταν ελαττώνεται η συγκέντρωση ιόντων αλατιού σε χαμηλές συγκεντρώσεις αλατιών.

##### 1.3.1.2. Εξαλάτωση (1,12).

Στα πυκνά ηλεκτρολυτικά διαλύματα η διαλυτότητα των βιομορίων ελαττώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων στο διάλυμα. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται εξαλάτωση (Εικόνα 1.3.). Στην περίπτωση αυτή τα βιομόρια συμπεριφέρονται σαν ουδέτερα δίπολα και διέπονται από τον υδροφοβικό και πολικό τους χαρακτήρα. Το φαινόμενο αυτό περιγράφεται από την εμπειρική γραμμική εξίσωση των Cohn-Green 1.6.

$$\log S = \beta - k_0 I \quad 1.6.$$

Γ είναι η ιοντική ισχύ και υπολογίζεται από τις συγκεντρώσεις και τα σθένη όλων των ιόντων που περιέχονται στο διάλυμα από τον τύπο 1.7. S είναι η διαλυτότητα ενός βιομορίου.  $\beta$  είναι σταθερά που εξαρτάται από το pH και τη θερμοκρασία και ισούται με  $\log S_0$  για την οριακή κατάσταση όπου  $I=0$ ,  $S_0=S_w$  η διαλυτότητα του βιομορίου στο νερό.  $k_0$  είναι η σταθερά της εξαλάτωσης και εξαρτάται από το pH, τη θερμοκρασία αλλά και από τη φύση των ιόντων. Η ιοντική ισχύ ενός διαλύματος περιέχεται στον νόμο των Debye-Hückel και αποτελεί μέρος της σταθεράς  $\kappa^{-1}$  του τύπου 1.2.

$$I = 1/2 \sum (m_i z_i^2 e_0^2) \quad 1.7.$$

$m_i$  είναι η συγκέντρωση και  $z_i$  είναι το σθένος κάθε τύπου ιόντων που περιέχονται στο διάλυμα.

### 1.3.1.3. Η γενική εξίσωση του Green. (1,12)

Η μεταβολή της διαλυτότητας ενός βιομορίου σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση των ιόντων του αλατιού στο διάλυμα προσεγγίζεται από τη γενική εξίσωση του Green 1.8.

$$\log S = \log S_0 + k_1 \sqrt{I} - k_0 I \quad 1.8.$$

Όπου  $k_1$  και  $k_0$  είναι οι σταθερές εναλάτωσης και εξαλάτωσης αντίστοιχα.  $S_0 = S_w$  είναι η διαλυτότητα του βιομορίου στο καθαρό νερό.  $I$  είναι η ιοντική ισχύ του διαλύματος. Στην εξίσωση αυτή η συνεισφορά της εναλάτωσης προσεγγίζεται από τον απλουστευμένο όρο  $k_1 (I)^{1/2}$ , ενώ η συνεισφορά της εξαλάτωσης από τον όρο  $-k_0 I$ .

Στη εξίσωση αυτή εμφανίζεται τόσο η συμβολή των ηλεκτροστατικών (Salting-in) όσο και των υδρόφοβων (Salting-out) αλληλεπιδράσεων (Εικόνα 1.3.).

Παρότι η εξίσωση 1.8. έχει αποδειχθεί χρήσιμη για την ερμηνεία της διαφορικής διαλυτότητας των βιομορίων, στα πειραματικά δεδομένα παρατηρείται συχνά ότι η διαλυτότητα δεν είναι γραμμική συνάρτηση της συγκέντρωσης του αλατιού.

### 1.3.2. Διαλυτότητα βιομορίων σε οργανικά διαλύματα. (1,12)

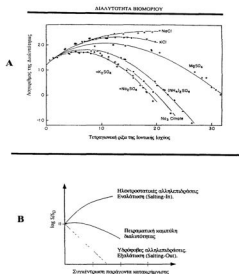
Η διαλυτότητα των βιομορίων ελαττώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης των οργανικών διαλυτών στο διάλυμα.

Ο τύπος 1.9. εκφράζει την εξάρτηση της διαλυτότητας από τη μεταβολή της διηλεκτρικής σταθεράς του διαλύματος εξαιτίας της παρουσίας του οργανικού διαλύτη.

$$\log (S_{CO} / S_w) = (A / RT) (1 / \epsilon_w - 1 / \epsilon_{CO}) \quad 1.9.$$

$S_{CO}$  η διαλυτότητα του βιομορίου παρουσία συγκεκριμένης συγκέντρωσης οργανικού διαλύτη,  $S_w$  η διαλυτότητα του βιομορίου στο νερό,  $\epsilon_{CO}$  η διηλεκτρική σταθερά του διαλύματος παρουσία οργανικού διαλύτη,  $\epsilon_w$  η διηλεκτρική σταθερά του νερού,  $R$  η παγκόσμια σταθερά των αερίων,  $T$  η θερμοκρασία και  $A$  μία σταθερά.

Η διαλυτότητα των βιομορίων είναι ανάλογη της διηλεκτρικής σταθεράς ενός διαλύματος. Με την προσθήκη οργανικών διαλυτών στο διάλυμα, η διηλεκτρική σταθερά του διαλύματος ελαττώνεται και κατά συνέπεια ελαττώνεται και η διαλυτότητα των βιομορίων.



**Εικόνα 1.3.** (A) Πειραματική καμπύλη διαλυτότητας της καρβοξυαμινοσφαιρίνης για διάφορους ηλεκτρολύτες στους 25 βαθμούς Κελσίου. (12) (B) Συνδυασμός των ηλεκτροστατικών και υδροφικών επιδράσεων στη διαλυτότητα  $S$ , κανονικοποιημένη ως προς την διαλυτότητα  $S_0=S_w$  για το καθαρό νερό, όπως προβλέπεται από τον τύπο 1.8. (1)

### **1.3.3. Διαλυτότητα βιομορίων σε διαλύματα PEG (PolyEthylene Glycol). (1,11,12)**

Η διαλυτότητα των βιομορίων ελαττώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του PEG στο διάλυμα. Διάφορες απόψεις έχουν κατά καιρούς ληφθεί για τη δράση του PEG. Αρχικά θεωρήθηκε ότι το PEG δρα σαν αλάτι και ότι εξαλατώνει τα βιομόρια. Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες εκτιμήσεις, το PEG θεωρείται ότι δρα τόσο σαν οργανικός διαλύτης όσο και σαν αλάτι. Επιπλέον πιστεύεται ότι, στη δράση του PEG συντελεί και η μείωση του ωφέλιμου όγκου του διαλύτη που προκαλείται εξαιτίας της προσθήκης του PEG στο διάλυμα.

## **1.4. Εφαρμογές της διαφορικής διαλυτότητας των βιομορίων.**

### **1.4.1. Κλασμάτωση βιομορίων με κατακρήμνιση. (11,12,14-19)**

Από τις γνωστότερες εφαρμογές της διαφορικής διαλυτότητας των βιομορίων είναι η κλασμάτωσή τους με κατακρήμνιση. Η μέθοδος της κλασμάτωσης με θειικό αμμώνιο και οργανικούς διαλύτες εφαρμόζονται συστηματικά στη χημεία και τη βιοχημεία. Η χρήση του PEG σαν μέσο κλασμάτωσης για κατακρήμνιση έχει εισαχθεί σχετικά πρόσφατα στο χώρο της βιοχημείας.

### **1.4.2. Κρυστάλλωση βιομορίων με σκοπό την απομόνωσή τους ή και την κρυσταλλογραφική μελέτη τους.**

Είναι γνωστό από τη χημεία ότι η κρυστάλλωση αποτελεί μέθοδο εμπλουτισμού του ιζήματος στο επιθυμητό προϊόν. Επαναληπτικές κρυσταλλώσεις ενός μορίου οδηγούν σε μεγάλο βαθμό καθαρότητας του μορίου αυτού.

Η κρυστάλλωση αποτελεί το πρωταρχικό βήμα στην κρυσταλλογραφία. Για τη δομική μελέτη των μορίων με τη μέθοδο της περιέθλασης ακτίνων X το πρωταρχικό αν όχι και το σημαντικότερο βήμα είναι η κρυστάλλωση του μορίου.

## 1.5. Αλληλεπιδράσεις.

### 1.5.1. Αλληλεπιδράσεις βιομορίων στη στερεή φάση του ιζήματος και των κρυστάλλων.

Τόσο η κατακρήμνιση όσο και η κρυστάλλωση μορίων συνεπάγεται αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων της στερεάς φάσης. Η κρυστάλλωση αποτελεί ειδική περίπτωση κατακρήμνισης. Τα μόρια που κατακρήμνίζονται αλληλεπιδρούν μεταξύ τους δημιουργώντας μεγαλύτερα συσσωματώματα. Τα συσσωματώματα αυτά όταν γίνουν αρκετά μεγάλα δεν είναι πλέον δυνατό να συγκρατηθούν από τον διαλύτη και σαν συνέπεια αποχωρίζονται από την υγρή φάση και δημιουργούν ιζήματα. Η κατακρήμνιση γενικότερα δεν απαιτεί αλληλεπίδραση μεταξύ ομοειδών προομιμάτων. Διαφορετικά μόρια μπορούν να συμμετέχουν στην άτακτη οργάνωση σε συσσωματώματα που δημιουργούν το ιζημα.

Στην περίπτωση της κρυστάλλωσης οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων είναι συγκεκριμένες και επαναλαμβανόμενες στο χώρο. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι γνωστές σαν κρυσταλλικές επαφές. Τα μόρια τοποθετούνται στο κρυσταλλικό πλέγμα με απόλυτη συμμετρία. Η κρυστάλλωση αποτελεί αλληλεπίδραση μεταξύ ταυτόσημων μορίων ή ταυτόσημων συμπλεγμάτων μορίων.

### 1.5.2. Αλληλεπίδραση βιομορίων με τη στερεή φάση των χρωματογραφικών προσροφητών. (20-28)

Στην χρωματογραφία προσροφητών υγρής φάσης, τα βιομόρια αποχωρίζονται από την υγρή φάση του διαλύματος και προσαρτώνται στη στερεά φάση των χρωματογραφικών υλικών, ανάλογα με τις εννοούμενες από το υπόστρωμα ως προς το διάλυμα αλληλεπιδράσεις.

Στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής χρησιμοποιούνται οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Όσα μόρια σε ένα διάλυμα εμφανίζουν φορτία προσδένονται σε υποστρώματα ιοντοανταλλακτικών. Για την έλωση των μορίων αυτών από τους ιοντοανταλλακτικές χρειάζεται να ανταγωνιστεί το διάλυμα με το υπόστρωμα ως προς την ιοντική ισχύ. Στις χρωματογραφίες ιοντοανταλλαγής χρησιμοποιείται το φαινόμενο της ενάλωσης.

Στη χρωματογραφία υδροφοβικότητας χρησιμοποιούνται οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Όσα μόρια σε ένα διάλυμα εμφανίζουν υδρόφοβες ιδιότητες προσδένονται σε υδροφοβικά υποστρώματα. Οι υδρόφοβες ιδιότητες ενός μορίου εντείνονται σε διαλύματα μεγάλης συγκέντρωσης αλατιών. Η έλωση των μορίων αυτών από τα υδρόφοβα υποστρώματα γίνεται με ελάττωση της ιοντικής ισχύος στο διάλυμα ή με την προσθήκη οργανικών διαλυτών. Στη χρωματογραφία υδροφοβικότητας χρησιμοποιείται το φαινόμενο της εξαλάτωσης.

## 1.6. Κρυστάλλωση βιομορίων. (1,11,12,29-61)

### 1.6.1. Ειδική περίπτωση κατακρήμνισης. Ομοιογένεια. Καθαρότητα. (1,11,12,29-41)

Όπως έχουμε προαναφέρει η κρυστάλλωση είναι υποσύνολο της κατακρήμνισης. Οι αλληλεπιδράσεις που κρατούν τα βιομόρια στο κρυσταλλικό πλέγμα ονομάζονται κρυσταλλικές επαφές και είναι ίδιες σε κάθε οργανωμένη βασική μονάδα μορίων που περιέχεται στη στοιχειώδη κυψέλιδα του κρυσταλλικού πλέγματος.

Το κρυσταλλικό πλέγμα προϋποθέτει επαναλήψεις όμοιων δομικών μονάδων. Άρα ανομοιογενή δείγματα βιομορίων δεν μπορούν να δημιουργήσουν κρυσταλλικά πλέγματα και να κρυσταλλώσουν. Η καθαρότητα του δείγματος βιομορίων που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα κρυστάλλωσης απαιτείται να είναι η μεγαλύτερη δυνατή. Η ύπαρξη ανομοιογένειας λόγω βιοχημικών τροποποιήσεων σε ένα δείγμα μορίων δημιουργεί σοβαρά προβλήματα στην κρυστάλλωση. Η ανομοιογένεια αυτή μπορεί να προέρχεται από μερικές υδρολύσεις (πρωτεόλυση), από μερικές αναγωγές ή οξειδώσεις και από μερικές τροποποιήσεις (φωσφορυλίωση, γλυκοσυλίωση). Βιομόρια που παρουσιάζουν ειμετάβλητη δομή αποτελούν ανομοιογενή δείγματα. Βιομοριακά δείγματα που παρουσιάζουν ανομοιογένειες δεν κρυσταλλώνουν ή κρυσταλλώνουν δύσκολα.

### 1.6.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση. (11,29-31,33-39)

Τόσο η δημιουργία πυρήνων κρυστάλλωσης όσο και το μέγεθος των κρυστάλλων εξαρτάται από πολλές παραμέτρους. Οι κυριότερες από αυτές είναι η συγκέντρωση και η ομοιογένεια του βιομορίου στο διάλυμα, η φύση των αλατιών, των οργανικών διαλυτών και των άλλων μορίων που χρησιμοποιούνται, η θερμοκρασία και το pH του διαλύματος. Στον πίνακα 1.2. γίνεται λεπτομερέστερη παράθεση των παραγόντων αυτών.

### 1.6.3. Διαγράμματα διαλυτότητας. (1,11-13,34,42-50)

Διαγράμματα διαλυτότητας ονομάζονται τα διαγράμματα που περιγράφουν τη διαλυτότητα ενός βιομορίου σαν εξάρτηση της συγκέντρωσης του βιομορίου, της συγκέντρωσης των παραγόντων κατακρήμνισης, της θερμοκρασίας, του pH και άλλων μεταβλητών. Η κρυστάλλωση είναι μία πολυπαραμετρική διαδικασία. Τα διαγράμματα διαλυτότητας είναι ιδιοχαρακτηριστικά για κάθε βιομόριο. Η γνώση των διαγραμμάτων αυτών είναι ένα σημαντικό βήμα για την κατάρτιση των πειραμάτων κρυστάλλωσης. Η πλήρης διερεύνηση των διαγραμμάτων διαλυτότητας ενός βιομορίου απαιτεί χρόνο αλλά κυρίως μεγάλες ποσότητες βιομορίου.



Απλούστευση στον έλεγχο της διαλυτότητας ενός βιομορίου αποτελεί η μέθοδος της μερικής παραμετρικής σχεδίασης (fractional factorial design) (48).

#### 1.6.3.1. Πυρήνες κρυστάλλωσης. Ζώνη πυρήνωσης. (1,11,42)

Πυρήνες κρυστάλλωσης ονομάζονται οι μικρότατες οργανωμένες μορφές βιομοριακών συσσωματωμάτων. Ζώνη πυρήνωσης (nucleation zone) ονομάζεται στην κρυσταλλογένεση η περιοχή των διαγραμμάτων διαλυτότητας στην οποία δημιουργούνται πυρήνες κρυστάλλων. Η περιοχή αυτή είναι υποσύνολο της περιοχής κατακρήμνισης. Η εύρεση της ζώνης πυρήνωσης αποτελεί τον πρωταρχικό σκοπό των πειραμάτων κρυστάλλωσης.

#### 1.6.3.2. Μεγάλωμα κρυστάλλων. Μετασταθερή ζώνη. (1,11,42)

Μετασταθερή ζώνη (metastable zone) ονομάζεται η περιοχή των διαγραμμάτων διαλυτότητας στην οποία δεν δημιουργούνται πυρήνες κρυστάλλωσης, αλλά οι πυρήνες κρυστάλλωσης που προϋπάρχουν μπορούν να συνεχίσουν να μεγαλώνουν.



**Εικόνα 1.4.** Σχηματική αναπαράσταση ενός δυοδιάστατου διαγράμματος διαλυτότητας. Στους δύο άξονες x και y μεταβάλλονται αντίστοιχα οι συγκεντρώσεις του ηλεκτρολύτη και του βιομορίου. (1)

**Ενδογενείς φυσικοχημικές παράμετροι:**

Υπεριοσμωσμός (συγκέντρωση βιομορίων και παραγόντων κατακρήμνισης).

Θερμικρασία, pH (μεταβολές αυτών των παραμέτρων).

Χρόνος (ρυθμίο εξισορρόπησης και μεγετώματος).

Ιοντική ισχύς και καθαρότητα των χημικών (φύση των παραγόντων κατακρήμνισης, ρυθμιστικά διαλύματα, επιπρόσθετες χημικές ουσίες).

Διάχυση και μεταφορά (περιτόματα, μορφοβαρότητα).

Όγκος και γεωμετρία του δείγματος και των πειραματικών συσκευιών (επιφάνεια των συσκευιών κρυστάλλωσης).

Στερεά σωματίδια, αλληλεπιδράσεις με τα τοιχώματα και με τις διάμεσες επιφάνειες (ομοιογενής, ετερογενής, επιταξιακή πύκνωση).

Φαινόμενα εξαρτημένα από την πυκνότητα ή το υζώδες (διαφορές μεταξύ κρυστάλλου και μητρικού υγρού).

Πίεση, ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία.

Δονήσεις και ήχος (ακουστικά κύματα).

Σειρά των γεγονότων, επαναληψιμότητα (εξεινητής ή ρομπότ).

**Βιοχημικές και βιοφυσικές παράμετροι:**

Ευστοφθία της δομής του βιομορίου σε φυσικές παραμέτρους (θερμικρασία, pH, ιοντική ισχύς, διαλύτες,...).

Δεσμενση ουσιών με αλληλεπιδράσεις συγγένειας (υποστρώματα, σφαιραπαρόντες, μεταλλικά ιόντα, άλλα ιόντα,...).

Ειδικές επιπρόσθετες ουσίες (αναγωγικές ουσίες, μη ιοντικά απορρυπαντικά, πολυαμίνες,...).

Ιδιότητες των βιομορίων (οξειδωσιμ, υδροφοβικότητα, υδροφιλικότητα, πολυηλεκτρολυτική φύση των νουκλεϊνικών οξέων,...).

Γήρανση του δείγματος (οξειδοαναγωγικές μεταβολές, αποδιάταξη, αποικοδόμηση).

**Βιολογικές παράμετροι:**

Τα περισσότερα βιομόρια απαντώνται σε πολύ μικρές ποσότητες στη φύση.

Βιολογικές πηγές και φυσικολογική κατάσταση των οργανισμών ή των κυττάρων που παράγουν τα βιομόρια (θερμόφιλοι, ψυχρόφιλοι, αλατόφιλοι, μεσόφιλοι οργανισμοί, στατική ή αναπτυσσόμενη φύση,...).

Πεπτησιακές μολύνσεις.

**Καθαρότητα των μακρομορίων:**

Μικροοσμωσικές επιμολύνσεις (επιμολύνσεις με άλλα μακρομόρια ή μικρά μόρια).

(Μικροστερογένεια στην αλληλοσχημ (ολισμάτωση από πρωτεάσες ή νουκλεάσες-τα κλάσματα των μακρομορίων μπορεί να κρυσταλλώνουν καλύτερα-, μερικές ή ετερογενείς μεταμεταφαστικές τροποποιήσεις,...).

Δομικές (μικροστερογένειες (εγκίνητες δομικές υπομονάδες, βαθμός και τρόπος πολυμερισμού, συσσωματώματα, αποδιάταξη,...).

Επίδραση παρτίδας ( δύο παρτίδες δεν είναι αλδιδες!).

**Πίνακας 1.2.** Παράμετροι που επηρεάζουν τη διαλυτότητα και την κρυστάλλωση των βιομορίων. (37)

#### **1.6.4. Σχεδιασμός κρυστάλλωσης.**

Για την κρυσταλλογραφική μελέτη ενός βιομορίου απαιτούνται μεγάλοι και καλοσχηματισμένοι κρύσταλλοι. Για να επιτευχθεί κάτι τέτοιο πρέπει σε πρώτη φάση να δημιουργηθούν πυρήνες κρυστάλλωσης και σε δεύτερη φάση οι πυρήνες αυτοί να αφηθούν στην μετασταθερή ζώνη για να μεγαλώσουν. Η δημιουργία πολλών πυρήνων κρυστάλλωσης δεν ευνοεί τη δημιουργία μεγάλων και καλοσχηματισμένων κρυστάλλων. Πολλοί πυρήνες κρυστάλλωσης συνεπάγονται μοίρασμα του προσφερόμενου βιομορίου σε μεγάλο αριθμό κρυστάλλων που οδηγεί σε κρυστάλλους μικρότερου όγκου. Η αύξηση του όγκου των κρυστάλλων σε ένα διάλυμα με πολλούς πυρήνες κρυστάλλωσης οδηγεί σε επικαλύψεις κρυσταλλικών πλεγματίων και άρα σε κακοσχηματισμένους κρυστάλλους.

#### **1.6.5. Σχεδιασμός κρυστάλλωσης σε ένα βήμα.**

Για να δημιουργήσουμε κρυστάλλους με ένα πειραματικό βήμα θα πρέπει να ικανοποιήσουμε με ένα πείραμα και τη δημιουργία πυρήνων κρυστάλλωσης και το μέγεθος των πυρήνων αυτών. Δηλαδή το διάλυμα του βιομορίου θα πρέπει από τη διαλυτή φάση να περάσει στην ζώνη πυρήνωσης για να δημιουργηθούν πυρήνες κρυστάλλωσης. Η παραμονή του διαλύματος στην ζώνη πυρήνωσης πρέπει να είναι σύντομη για να μη δημιουργηθούν πολλοί πυρήνες κρυστάλλωσης. Στη συνέχεια, το διάλυμα πρέπει να μεταπέσει στη μετασταθερή ζώνη, όπου οι πυρήνες θα συνεχίσουν να μεγαλώνουν για να δώσουν χρήσιμους κρυστάλλους.

#### **1.6.6. Σχεδιασμός κρυστάλλωσης σε δύο βήματα. Ενπυρήνωση. (51-55)**

Η κρυστάλλωση είναι διαδικασία που απαιτεί δύο επιμέρους διαδικασίες, τη δημιουργία πυρήνων και τη διαδικασία του μεγάλωματος των πυρήνων. Είναι μάλλον φανερό ότι η υλοποίηση των δύο διαδικασιών σε δύο επιμέρους πειράματα είναι πιο εύκολη, πιο ελεγχόμενη και μπορεί να δώσει καλύτερα αποτελέσματα, δηλαδή μεγάλους και καλοσχηματισμένους κρυστάλλους.

Στη διαδικασία των δύο βημάτων με το πρώτο βήμα επιδιώκεται η μεταφορά ενός διαλύματος του βιομορίου από τη διαλυτή φάση στη ζώνη πυρήνωσης. Στη διαδικασία αυτή δημιουργείται μεγάλος αριθμός πυρήνων. Στο δεύτερο βήμα, που ονομάζεται ενπυρήνωση (seeding), πυρήνες από το πρώτο βήμα επιλέγονται και εμβιβατίζονται σε διάλυμα βιομορίου το οποίο εκ των προτέρων βρίσκεται στη μετασταθερή περιοχή. Με τη διαδικασία αυτή μπορούμε να επιλέξουμε το μέγεθος συγκεκριμένου αριθμού και συγκεκριμένου τύπου κρυστάλλων. Η μέθοδος της ενπυρήνωσης μπορεί να χωριστεί με βάση το μέγεθος πυρήνων που χρησιμοποιούνται στην μικροενπυρήνωση και στην μακροενπυρήνωση.

### **1.6.7. Διατήρηση συνθηκών μετασταθερής ζώνης.**

Όσο οι κρυστάλλοι μεγαλώνουν τόσο η συγκέντρωση των διαλυμένων βιομορίων μικραίνει. Σαν συνέπεια η μετασταθερή ζώνη μετατοπίζεται, καθόσον εξαρτάται από την συγκέντρωση του βιομορίου στο διάλυμα. Άρα στα πειράματα κρυστάλλωσης ένα από τα κύρια προβλήματα είναι η δημιουργία συνθηκών συνεχούς παρακολούθησης της μετασταθερής ζώνης.

### **1.6.8. Τεχνικές κρυστάλλωσης. (11,29,50,56-61)**

Για την κρυστάλλωση των βιομορίων έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές. Οι βασικότερες από αυτές παρουσιάζονται παρακάτω.

#### **1.6.8.1. Ολική ανάμιξη (Batch).**

Το βιομόριο διαλύεται σε ένα συγκεκριμένο διάλυμα, όπου μπορούν να δημιουργηθούν και να μεγαλώσουν κρυστάλλοι.

#### **1.6.8.2. Εξάτμιση ή συμπύκνωση (evaporation or concentration).**

Το διάλυμα του βιομορίου συμπυκνώνεται με εξάτμιση ή άλλες μεθόδους συμπύκνωσης.

#### **1.6.8.3. Διαπίδυση (dialysis).**

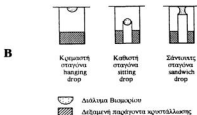
Διάλυμα βιομορίου τοποθετείται σε ημιδιαπερατές μεμβράνες και υποβάλλεται με διαπίδυση σε μεταβολές της συγκέντρωσης διαφόρων παραγόντων που ευνοούν την κρυστάλλωση. Τα πειράματα διαπίδυσης μπορεί να είναι μικρού ή μεγάλου όγκου.

#### **1.6.8.4. Διάχυση ατμών (vapor diffusion).**

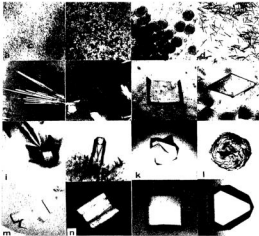
Η τεχνική αυτή είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη και στηρίζεται στο φαινόμενο της τάσης ατμών. Σε ένα αεροστεγώς κλειστό σύστημα δύο διαλύματα εξισορροπούν την τάση ατμών τους μέσω διάχυσης. Αν το ένα διάλυμα που περιέχει το βιομόριο είναι σημαντικά μικρότερου όγκου από το άλλο διάλυμα που ονομάζεται δεξαμενή τότε οι μεταβολές της συγκέντρωσης των διαφόρων ουσιών στο διάλυμα του βιομορίου εξαρτώνται άμεσα από τις συγκεντρώσεις των διαφόρων ουσιών της δεξαμενής. Αν το διάλυμα του βιομορίου συγκρατείται με δυνάμεις συνάφειας από το καπάκι του κλειστού συστήματος τότε έχουμε τα λεγόμενα πειράματα κρεμαστής σταγόνας (hanging-drop). Αν το διάλυμα του βιομορίου στηρίζεται σε ειδική κοιλότητα στο πάτωμα του κλειστού συστήματος τότε έχουμε τα λεγόμενα πειράματα καθιστής σταγόνας (sitting-drop).

Ο μεγαλύτερος όγκος διαλύματος βιομορίου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στα πειράματα κρεμαστής σταγόνας είναι 20 μλ.

Στα πειράματα διάχυσης ατμών οι σταγόνες των βιομορίων μπορούν να βρῖσκονται με τη μορφή περὶτόματος παρουσία αγωγιμότητας ἢ περὶτίου (59).



**Εικόνα 1.6.** (Α) Σχηματικὴ αναπαράσταση πειραματικῆς διάταξης κρυστάλλωσης γιὰ τὴν τεχνικὴ τῆς διαπίδωσης (50). (Β) Σχηματικὴ αναπαράσταση πειραματικῆς διάταξης κρυστάλλωσης γιὰ τὴν τεχνικὴ τῆς διάχυσης ατμῶν. (50)



**Εικόνα 1.7.** (36) Από το έζημα στη δημιουργία τέλειων κρυστάλλων βιολογικών μακρομορίων. (a) Ψέμα λυσοζύμης. (b) Μικροκρυστάλλοι της συνθετάσης του t-RNA του ασπαρτικού της ζύμης. (c) Σφαιρουλίτες του σύμπλοκου της συνθετάσης του t-RNA του ασπαρτικού με το t-RNA του ασπαρτικού. (d) Κοντές βελόνες της πρωτεΐνης TIMP. (e) Μεγιστοί ραβδόμορφοι κρυστάλλοι της συνθετάσης του t-RNA του ασπαρτικού. (f) Λεπτά πλακιάδια με ελαττώματα, εξαιτίας του μεγάλωματος του εναρκτηρίου t-RNA της μεθειονίνης. (g) Πλακιδιόμορφοι κρυστάλλοι της κολλαγενάσης του *Hyaloderma lineatum*. (h) Τετραγωνικοί κρυστάλλοι της συνθετάσης του t-RNA του ασπαρτικού που παρουσιάζουν ελαττώματα, εξαιτίας του μεγάλωματος, και θυσάνους βελονών σαν βούτστα. (i) Παράδειγμα αποδιαταραγμένης πρωτεΐνης με τη μορφή επιδερμίδας γύρω από ένα κρυστάλλο της λυσοζύμης. (j) Κρυστάλλοι της μελλιτίνης που παρουσιάζει εσοχή. (k,l) Δίδυμοι και επικαλυπτόμενοι δίδυμοι κρυστάλλοι της κολλαγενάσης και της λυσοζύμης. (m,n,o,p) Τέλειοι τριδοιάστατοι κρυστάλλοι. (m) Πολυμορφισμός στην ίδια σταγόνα που δείχνει την κυβική και την ορθορομβική μορφή των κρυστάλλων του σύμπλοκου της συνθετάσης του t-RNA του ασπαρτικού με το t-RNA του ασπαρτικού. (n) Κρυστάλλοι του t-RNA του ασπαρτικού με ραγίσματα εξαιτίας της γήρανσης. (o) Κρυστάλλοι της λυσοζύμης. (p) Κρυστάλλοι της κολλαγενάσης του *H. lineatum*.

## 1.7. Τα βιομόρια που εμφανίζονται στη διατριβή.

### 1.7.1. Μεταλλαγές της πρωτεΐνης ROP (Repressor Of Primer). (62-66)

Η φυσική πρωτεΐνη ROP αποτελείται από 63 αμινοξέα. Το γονίδιο που την κωδικοποιεί βρίσκεται στα πλασμίδια με ελεγχόμενο αριθμό αντιγράφων. Ο έλεγχος αυτός γίνεται με τη συμμετοχή της πρωτεΐνης ROP.

Η πρωτεΐνη ROP είναι διμερής. Η κρυσταλλογραφική δομή της έδειξε ότι το μονομερές της πρωτεΐνης αυτής αποτελείται από δύο α ελίκες οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με μία μικρή στροφή. Το διμερές μόριο δημιουργεί ένα δεμάτι 4 α ελίκων (64,65). Το μοτίβο αυτό φαίνεται να εμφανίζεται συχνά στις δομές των πρωτεϊνών (65). Για να μελετηθούν οι ιδιότητες του μοτίβου αυτού έχουν δημιουργηθεί διάφορες μεταλλαγές. Η μελέτη της δομής των μεταλλαγών αυτών προϋποθέτει την απομόνωση και την κρυστάλλωση των μορίων αυτών. Δύο μεταλλαγές με τις οποίες ασχολήθηκα αφορούν την δημιουργία της στροφής, που ενώνει τις δύο έλικες του μονομερούς μορίου, και τη σταθερότητα του μορίου (66).

Η μεταλλαγή RM31A-P είναι μία σημειακή μεταλλαγή που μετατρέπει την αλανίνη στη θέση 31 σε προλίνη. Η αλανίνη 31 αποτελεί το πρώτο κατάλοιπο της στροφής μεταξύ των δύο ελίκων. Η προλίνη έχει ένα βαθμό ελευθερίας λιγότερο από την αλανίνη και παράλληλα δεν μπορεί να υιοθετήσει τη στερεοδιάταξη της αλανίνης στη θέση 31. Από θερμοδομετρικές μελέτες αποδιάταξης είναι γνωστό ότι το μόριο RM31A-P είναι αρκετά ασταθές. Από μετρήσεις κυκλικού διχρωϊσμού το μόριο αυτό φαίνεται να έχει ελαττωμένη περιεκτικότητα σε α έλικα.

Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη RM Δ5 αποτελείται από 58 αμινοξέα. Στη μεταλλαγή αυτή έχουν αφαιρεθεί τα 5 αμινοξικά κατάλοιπα από 30D ως και 34Q στην περιοχή της στροφής της φυσικής πρωτεΐνης. Η μεταλλαγή αυτή δημιουργήθηκε για να εξεταστεί η θεωρία της επανάληψης των επτάδων που έχει αναπτυχθεί για τα μοτίβα των 4 α ελίκων (65).

### 1.7.2. Η πρωτεΐνη PI (Polyamine Induced protein). (67-69)

Η πρωτεΐνη PI είναι μία περιπλασματική πρωτεΐνη των βακτηρίων *E. coli* η οποία ανήκει στο μεταφορικό σύστημα πεπτιδίων στο βακτήριο. Ενσωματώνει κυρίως τριπεπτίδια και τετραπεπτίδια από το θρεπτικό μέσο και τα μεταβιβάζει στο αντίστοιχο διαμεμβρανικό κανάλι. Η πρωτεΐνη αυτή επάγεται από την παρουσία πολυαμινών στο θρεπτικό μέσο, αποτελείται από 517 αμινοξικά κατάλοιπα, είναι μονομερής και είναι 84% ταυτόσημη με την αντίστοιχη πρωτεΐνη OPPA της *Salmonella typhimurium*. Η κρυσταλλογραφική δομή της πρωτεΐνης OPPA λήθηκε πρόσφατα (69).

**1.7.3. Η πρωτεΐνη BseCI. (70,71)**

Η BseCI ανήκει στην οικογένεια μεθυλοτρανοφερασών τύπου I. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ισοχιζομερής της μεθυλάσης M.ClaI και μεθυλιώνει επιλεκτικά το N6 της 3' A στην αλληλουχίας 5'-ATCGAT-3'. Προέρχεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Bacillus steareothermophilus*, είναι μονομερής και αποτελείται από 579 αμινοξικά κατάλοιπα.

**1.7.4. Η πρωτεΐνη νιτροδοξειδουκτάση (Nitrite reductase). (72)**

Η πρωτεΐνη αναγωγή του νιτροδίου είναι μία έγχρωμη (πράσινη) χαλκοπρωτεΐνη της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων του βακτηρίου *Alcaligenes faecalis*. Η πρωτεΐνη αυτή είναι τριμερής (α<sub>3</sub>) και το μονομερές της αποτελείται από 343 αμινοξέα.



### **1.8. Σκοπός της διατριβής.**

Σκοπός της διατριβής αυτής είναι η εξέταση της διαλυτότητας των βιομορίων σε μικτά υδατικά διαλύματα ηλεκτρολυτών. Όπως θα γίνει φανερό με τη συμβολή της εργασίας αυτής ενοποιούνται πολλές παρατηρήσεις αλλά και μεθοδολογίες πάνω σε δύο βασικές ιδιότητες των μορίων, την ιοντική και την πολική φύση τους. Παρότι και οι δύο αυτές ιδιότητες είναι αποτέλεσμα της συμπεριφοράς του ηλεκτρονιακού νέφους των ατόμων, αποτελούν δύο διαφορετικές ιδιοχαρακτηριστικές. Ο συνδυασμός των δύο συντελεί στην πολυπλοκότερη συμπεριφορά των μορίων στο διάλυμα.

Η γνώση της συμπεριφοράς των βιομορίων εξαιτίας της πολικής και ιοντικής φύσης τους έχει σημαντικές εφαρμογές. Στην εργασία αυτή θα περιοριστούμε στις εφαρμογές που αφορούν την χρωματογραφία, την κατακρήμνιση και την κρυστάλλωση των βιομορίων.

## **2. Μικτά υδατικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα**

## **2.1. Γενικευμένη εναλάτωση και εξαλάτωση. Μειωτές ιοντικής ισχύος. Γενικευμένο διάγραμμα διαλυτότητας σε μικτά υδατικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα**

### **2.1.1. "Λογικό" παράδοξο.**

Ας θεωρήσουμε ότι, ένα βιομόριο κατακρημνίζεται σε pH 5,0, σε συγκέντρωση 37% v/v αιθανόλης ή 30% v/v MPD και το ίδιο βιομόριο κατακρημνίζεται με εξαλάτωση σε pH 5,0, σε συγκέντρωση 2,0 M θειικού αμμωνίου.

1. Τι αναμένεται να συμβεί αν το βιομόριο αυτό βρεθεί σε ένα διάλυμα 37%v/v αιθανόλης και 200 mM θειικού αμμωνίου;
2. Τι αναμένεται να συμβεί αν το βιομόριο αυτό βρεθεί σε ένα διάλυμα 5%v/v MPD και 2,0 M θειικού αμμωνίου;

Η πιο "λογική" ίσως πρόβλεψη είναι ότι το βιομόριο θα κατακρημνίζεται και στις συνθήκες αυτές. Όπως θα δειχθεί παρακάτω όμως, η πρόβλεψη αυτή μπορεί να είναι λάθος. Το συγκεκριμένο παράδοξο ισχύει στην περίπτωση της πρωτεΐνης RM 31A-P.

### **2.1.2. Γενικευμένη εναλάτωση.**

Με το πείραμα του πίνακα 2.1. θέλησα να δώσω πειραματική απάντηση στην πρώτη ερώτηση.

Η ριβονουκλεάση A κατακρημνίζεται σε διάφορες συγκεντρώσεις οργανικού διαλύτη MPD και PEG 6000. Η συγκέντρωση της ριβονουκλεάσης A που παραμένει διαλυτή μετρείται με φωτομέτρηση απορρόφησης στα 280 nm. Για τις ίδιες συγκεντρώσεις MPD και PEG, η συγκέντρωση της διαλυμένης ριβονουκλεάσης A μετρείται παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης NaCl.

Από το πίνακα 2.1. διαπιστώνουμε ότι η αρχική "λογική" πρόβλεψη είναι απλά ένα λογικό σφάλμα. Αυτό που πραγματικά συμβαίνει, τουλάχιστον στην περίπτωση του πίνακα 2.1., είναι αύξηση της διαλυτότητας αυξανόμενης της συγκέντρωσης αλατιού παρουσίας σταθερής συγκέντρωσης οργανικού διαλύτη ή PEG. Σύμφωνα όμως με τους ορισμούς η ιδιότητα αυτή της διαλυτότητας ονομάζεται εναλάτωση. Άρα τα οργανικά μόρια καθώς και το PEG στη συγκεκριμένη περίπτωση δημιουργούν φαινόμενα γενικευμένης εναλάτωσης.

### **2.1.3. Γενικευμένη εξαλάτωση. Αναστολή εξαλάτωσης.**

Με το πείραμα του πίνακα 2.2. θέλησα να δώσω πειραματική απάντηση στην δεύτερη ερώτηση.

Η λυσοζύμη κατακρημνίζεται με εξαλάτωση σε διάφορες συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου και θειικού αμμωνίου. Η συγκέντρωση της λυσοζύμης που παραμένει διαλυτή μετρείται με φωτομέτρηση απορρόφησης στα 280 nm. Για τις

ίδιες συγκεντρώσεις θειικού αμμωνίου και χλωριούχου νατρίου, η συγκέντρωση της διαλυμένης λισοζύμης μετρείται παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης PEG 6000, PEG 200, MPD και γλυκερόλη.

Από τον πίνακα 2.2. διαπιστώνουμε ότι η αρχική "λογική" πρόβλεψη είναι και πάλι ένα λογικό σφάλμα. Αυτό που πραγματικά συμβαίνει, τουλάχιστον στην περίπτωση του πίνακα 2.2., είναι αναστολή της εξαλάτωσης, εξαρτημένη από τη συγκέντρωση του PEG ή των οργανικών διαλυτών που προστέθηκαν. Εναλλακτικά μπορούμε να πούμε ότι παρατηρούμε μετατόπιση του φαινομένου της εξαλάτωσης σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλατιών. Η μετατόπιση αυτή εξαρτάται από τη συγκέντρωση των οργανικών διαλυτών ή του PEG.

#### **2.1.4. Μειωτές ιοντικής ισχύος.**

Στα πειράματα των πινάκων 2.1. και 2.2. οι οργανικοί διαλύτες φαίνεται να τροποποιούν τις ιδιότητες ενυδάτωσης και εξαλάτωσης των ηλεκτρολυτών. Αναλυτικότερα, αν η συγκέντρωση  $Cl^-$  ενός ηλεκτρολύτη είναι ικανή να διαλυτοποιήσει μία ποσότητα βιομορίου, η ίδια συγκέντρωση  $Cl^-$  παρουσία οργανικών διαλυτών ή PEG δεν είναι αρκετή για τη διαλυτοποίηση, αλλά χρειάζεται μεγαλύτερη συγκέντρωση ηλεκτρολύτη  $Cl^- > Cl^-$ . Επίσης, αν η συγκέντρωση  $Co^{2+}$  ενός ηλεκτρολύτη είναι ικανή να κατακρήμνισι μία ποσότητα βιομορίου, παρουσία οργανικών διαλυτών ή PEG η συγκέντρωση  $Co^{2+}$  δεν είναι αρκετή για την κατακρήμνιση αλλά χρειάζεται μεγαλύτερη συγκέντρωση ηλεκτρολύτη  $Co^{2+} > Co^{2+}$ . Οι οργανικοί διαλύτες και το PEG επιδρούν με κάποιο τρόπο στην "ενεργή" συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών και δρουν σαν μειωτές της "ενεργής" συγκέντρωσης τους. Ορίζουμε λοιπόν σαν μειωτές ιοντικής ισχύος τα μόρια αυτά που έχουν την ικανότητα να αναιρούν τις ιδιότητες ενυδάτωσης και εξαλάτωσης των ηλεκτρολυτών.

#### **2.1.5. Γενικευμένο διάγραμμα διαλυτότητας σε μικτά υδατικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα.**

Με βάση τις παραπάνω πειραματικές παρατηρήσεις θα δημιουργήσουμε ένα γενικευμένο θεωρητικό διάγραμμα διαλυτότητας για ένα υποθετικό βιομόριο.

Το διάγραμμα αυτό (Εικόνα 2.1.) παρουσιάζει τις δύο διαφορετικές περιοχές κατακρήμνισης ενός θεωρητικού βιομορίου. Η συγκέντρωση του βιομορίου θεωρείται σταθερή. Σταθερές επίσης θεωρούνται και οι κλίμακες μεταβλητές θερμοκρασίας και pH. Η κατάσταση που περιγράφει το διάγραμμα αφορά την κατάσταση ισορροπίας του συστήματος. Οι θεωρητικές γραμμές που χωρίζουν το διάγραμμα στις αντίστοιχες περιοχές διαλυτότητας και κατακρήμνισης περιγράφουν θεωρητικές καταστάσεις απειροστές κατακρήμνισης.

<b>A</b>			
10 mg/ml ριβονουκλεάση A 10 mM οξικό νάτριο pH 5,0			
% MPD	Χωρίς Αλάτι	NaCl 0,1 M	NaCl 0,2 M
40% v/v	<b>0,248</b> 0,001	<b>0,248</b> 0,002	<b>0,253</b> 0,005
50% v/v	<b>0,191</b> 0,006	<b>0,253</b> 0,002	<b>0,252</b> 0,007
60% v/v	<b>0,022</b> 0,001	<b>0,158</b> 0,005	<b>0,201</b> 0,006
70% v/v	<b>0,013</b> 0,001	<b>0,020</b> 0,001	<b>0,021</b> 0,001

<b>B</b>		
10 mg/ml ριβονουκλεάση A 10 mM οξικό νάτριο pH 5,0		
% PEG 6000	Χωρίς Αλάτι	NaCl 0,5 M
25% w/v	<b>0,137</b> 0,002	<b>0,232</b> 0,001
30% w/v	<b>0,045</b> 0,001	<b>0,235</b> 0,004
35% w/v	<b>0,020</b> 0,001	<b>0,237</b> 0,004
40% w/v	<b>0,012</b> 0,001	<b>0,204</b> 0,004

**Πίνακας 2.1. Γενικευμένη εναλάτωση:** Αναστολή της κατακρήμνισης από οργανικούς διαλύτες (A) και από PEG (B) με την αύξηση της ιοντικής ισχύς στο διάλυμα. Οι αριθμοί με την έντονη γραφή είναι η μέση τιμή των μετρήσεων, ενώ με τη μικρή γραφή είναι το σφάλμα των μετρήσεων.

**Πειραματική διαδικασία:** Κάθε συνθήκη διαλύματος στους πίνακες A και B επαναλήφθηκε 3 φορές. Ο συνολικός όγκος κάθε συνθήκης είναι 400 ml και περιέχει 10 mg/ml Ριβονουκλεάσης A και 10 mM ρυθμιστικού οξικού νατρίου pH 5,0. Το κάθε διάλυμα αναδεύεται έντονα και στη συνέχεια επωάζεται για δύο ώρες σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 16 βαθμών Κελσίου. Μετά την επώαση τα διαλύματα φυγοκεντρώνονται για 15 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο Eppendorf στα 15000xg. Πηροσειτικά αφαιρούνται από το κάθε διάλυμα 200 ml τα οποία αφαιρώνονται με 4,8 ml νερού. Η απορρόφηση του αφαιρωμένου διαλύματος φωτομετρείται στα 280 nm. Η μέση τιμή της απορρόφησης δίνεται στους πίνακες A και B.

<b>A</b>				
20 mg/ml λυσοζύμη				
20 mM οξικό νάτριο pH 5,0				
<b>NaCl</b>	<b>Μόνο NaCl</b>	<b>MPD 1% v/v</b>	<b>MPD 5% v/v</b>	<b>PEG 6000 10% w/v</b>
<b>1,50 M</b>	<b>1,900</b> 0,010	<b>2,070</b> 0,020	<b>2,020</b> 0,020	<b>2,020</b> 0,040
<b>2,00 M</b>	<b>1,131</b> 0,006	<b>1,840</b> 0,005	<b>2,056</b> 0,008	<b>1,950</b> 0,030
<b>2,50 M</b>	<b>0,717</b> 0,004	<b>1,265</b> 0,001	<b>2,050</b> 0,010	<b>2,050</b> 0,010
<b>3,00 M</b>	<b>0,470</b> 0,002	<b>0,859</b> 0,002	<b>2,039</b> 0,005	<b>1,950</b> 0,050
<b>3,50 M</b>	<b>0,309</b> 0,002	<b>0,629</b> 0,002	<b>2,049</b> 0,008	<b>1,970</b> 0,020

<b>B</b>				
20 mg/ml λυσοζύμη				
20 mM οξικό νάτριο pH 5,0				
<b>A.S.</b>	<b>Μόνο A.S.</b>	<b>PEG 200 5% v/v</b>	<b>MPD 5% v/v</b>	<b>Γλυκερόλη 30% v/v</b>
<b>1,40 M</b>	<b>1,900</b> 0,040	<b>2,007</b> 0,008	<b>2,070</b> 0,030	<b>2,050</b> 0,010
<b>1,75 M</b>	<b>0,470</b> 0,050	<b>1,980</b> 0,020	<b>2,040</b> 0,010	<b>2,040</b> 0,010
<b>2,10 M</b>	<b>0,095</b> 0,001	<b>1,500</b> 0,020	<b>0,675</b> 0,004	<b>2,050</b> 0,010
<b>2,45 M</b>	<b>0,019</b> 0,002	<b>0,347</b> 0,002		
<b>2,80 M</b>	<b>0,008</b> 0,001	<b>0,072</b> 0,001		

**Πίνακας 2.2. Γενικευμένη εξαλάτωση:** Αναστολή της κατακρήμνισης από χλωριούχο νάτριο (A) και από θειικό αμμώνιο (B) με την αύξηση της συγκέντρωσης του PEG 200, του PEG 6000 και του MPD. Οι αριθμοί με την έντονη γραφή είναι η μέση τιμή των μετρήσεων, ενώ με τη μικρή γραφή είναι το σφάλμα των μετρήσεων.

**Πειραματική διαδικασία:** Κάθε συνθήκη διαλύματος στους πίνακες A και B επαναλήφθηκε 3 φορές. Ο συνολικός όγκος κάθε συνθήκης είναι 1 ml και περιέχει 20 mg/ml λυσοζύμης και 20 mM ρυθμιστικού οξικού νατρίου pH 5,0. Το κάθε διάλυμα αναδεύεται έντονα και στη συνέχεια επωάζεται για δύο ώρες σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 16 βαθμών Κελσίου. Μετά την επώαση τα διαλύματα φυγοκεντρώνται για 15 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο Eppendorf στα 15000xg. Προσθετικά αφαιρούνται από το κάθε διάλυμα 200 μl τα οποία αραιώνονται με 4,8 ml νερού. Η απορρόφηση του αραιωμένου διαλύματος φθορομετρείται στα 280 nm. Η μέση τιμή της απορρόφησης αυτής δίνεται στους πίνακες A και B.

Ο άξονας x του διαγράμματος 2.1. παριστάνει τη συγκέντρωση αλατιού στο διάλυμα. Ο άξονας y παριστάνει τη συγκέντρωση των μειωτών ιοντικής ισχύος. Μπορούμε να φανταστούμε κάθετα στο χαρτί έναν τρίτο άξονα z, που παριστάνει τη συγκέντρωση του βιομορίου. Το διάγραμμα στο επίπεδο zy δεν είναι άλλο από το διάγραμμα διαλυτότητας που περιγράφεται από την εξίσωση του Green (1.8.) για υδατικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα (Εικόνα 2.2.). Το θεωρητικό τριδιάστατο διάγραμμα περιγράφει τη διαλυτότητα των βιομορίων σε μικτά υδατικά διαλύματα (Εικόνα 2.2.). Για λόγους απλούστευσης θα περιοριστούμε στο διάγραμμα των δύο διαστάσεων (Εικόνα 2.1.) που αφορά συγκεκριμένη συγκέντρωση βιομορίου.

Η περιοχή Pi (Salting In) είναι η περιοχή κατακρήμνισης (Precipitation) εξαιτίας της γενικευμένης εναλάτωσης. Αν αυξήσουμε τους μειωτές ιοντικής ισχύος η διαλυτότητα των βιομορίων στην περιοχή αυτή μειώνεται. Αύξηση της συγκέντρωσης των ηλεκτρολυτών στις συνθήκες αυτές αυξάνει τη διαλυτότητα. Μείωση της συγκέντρωσης των ηλεκτρολυτών μειώνει παραπέρα τη διαλυτότητα.

**Γενικά στην περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης ισχύουν τα εξής:**  
Αύξηση της διαλυτότητας των βιομορίων επιτυγχάνεται με ελάττωση των μειωτών ιοντικής ισχύος ή και αύξηση της αλατιότητας.  
Ισοδύναμα κατακρήμνιση ή ελάττωση της διαλυτότητας των βιομορίων επιτυγχάνεται με αύξηση των μειωτών ή και μείωση της αλατιότητας.

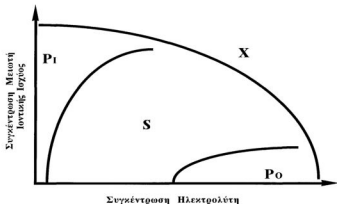
Η περιοχή Po (Salting Out) είναι η περιοχή κατακρήμνισης με εξαλάτωση. Αν αυξήσουμε τους μειωτές ιοντικής ισχύος η διαλυτότητα των βιομορίων στην περιοχή αυτή αυξάνεται. Αύξηση της συγκέντρωσης των ηλεκτρολυτών στις συνθήκες αυτές μειώνει τη διαλυτότητα. Μείωση της συγκέντρωσης των ηλεκτρολυτών αυξάνει παραπέρα τη διαλυτότητα.

**Γενικά στην περιοχή της εξαλάτωσης ισχύουν τα εξής:**  
Αύξηση της διαλυτότητας των βιομορίων επιτυγχάνεται με αύξηση των μειωτών ιοντικής ισχύος ή και ελάττωση της αλατιότητας.  
Ισοδύναμα κατακρήμνιση ή ελάττωση της διαλυτότητας των βιομορίων επιτυγχάνεται με μείωση των μειωτών ή και αύξηση της αλατιότητας.

**Οι καμπύλες στο διάγραμμα της εικόνας 2.1. έχουν δημιουργηθεί αυθαίρετα, με σκοπό την ποιοτική αναπαράσταση της συμπεριφοράς ενός υποθετικού βιομορίου.**

### 2.1.6. Γενικές παρατηρήσεις.

Είναι φανερό ότι οι ηλεκτρολύτες και οι μειωτές ιοντικής ισχύος επενεργούν διαφορετικά στις διαφορετικές περιοχές κατακρήμνισης του διαγράμματος και παράλληλα οι ηλεκτρολύτες και οι μειωτές ιοντικής ισχύος λειτουργούν συμπληρωματικά.



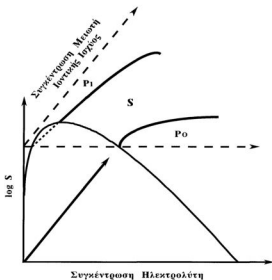
**Εικόνα 2.1.** Γενικευμένο σχηματικό διάγραμμα κατακορήμησης ενός βιομορίου σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη και του μειωτή ιοντικής ισχύος στο διάλυμα. Η συγκέντρωση του βιομορίου θεωρείται σταθερή  $C_b$ . Σταθερές, επίσης, θεωρούνται και όλες οι άλλες παράμετροι που επηρεάζουν τη διαλυτότητα των βιομορίων.

**S (Soluble)** ορίζεται στο διάγραμμα η περιοχή όπου το βιομόριο είναι πλήρως διαλυτό.

**P<sub>1</sub>** και **P<sub>0</sub> (Precipitation)** ορίζονται στο διάγραμμα οι περιοχές όπου το βιομόριο δεν είναι πλήρως διαλυτό. Ειδικότερα σαν **P<sub>1</sub>** και **P<sub>0</sub>** ορίζονται οι περιοχές κατακορήμησης στην περίπτωση της γενικευμένης ενολάτωσης (Salting In) και της γενικευμένης εξαλάτωσης (Salting Out) αντίστοιχα. Οι δύο καμπύλες που χωρίζουν τις περιοχές **P<sub>1</sub>** και **P<sub>0</sub>** από την περιοχή **S** είναι οι συνθήκες απειροστής κατακορήμησης του βιομορίου.

**X** είναι η περιοχή για την οποία δεν υπάρχει αρκετή οργανωμένη γνώση. Στην περιοχή αυτή ανήκουν οι καταστάσεις των διερασιακών συστημάτων.





**Εικόνα 2.2.** Αναπαράσταση της μεταβολής του λογαρίθμου της διαλυτότητας ενός βιομορίου σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη και της συγκέντρωσης του μειωτή ιοντικής ισχύος. Το διάγραμμα της εικόνας 2.1. φαίνεται στο διάγραμμα αυτό σαν κάθετη διατομή.

Στην προσπάθειά μας να κατανοήσουμε τις παραπάνω ιδιότητες των μειτών υδατικών διαλυμάτων θεωρούμε σκόπιμο να κάνουμε κάποιες γενικές παρατηρήσεις και υπενθυμίσεις.

Τι διαφορετικό έχουν οι ηλεκτρολύτες από τους μειωτές;

Οι ηλεκτρολύτες είναι ιόντα. Αυτό συνεπάγεται ότι μπορούν να αλληλεπιδράσουν με ιοντικές-ιοντικές, και ιοντικές-πολικές δυνάμεις. Οι μειωτές ιοντικής ισχύος δεν περιέχουν συνήθως φορτισμένες ομάδες και είναι μόρια πολικά. Αν οι μειωτές ιοντικής ισχύος διάστανται τότε η σταθερά διάστασής τους είναι μικρή ή αμελητέα. Οι αλληλεπιδράσεις που μπορούν να κάνουν είναι πολικές-πολικές με άλλα δίοπολα όπως το νερό ή άλλες πολικές ομάδες μορίων του διαλύματος. Επίσης μπορούν να κάνουν και πολικές-ιοντικές αλληλεπιδράσεις με ιόντα που βρίσκονται στο διάλυμα. Είναι δυνατόν επίσης να αντικαταστήσουν μόρια νερού στη σφαίρα ενυδάτωσης των ιόντων ή και των βιομορίων αλλάζοντας με τον τρόπο αυτό τις ιδιότητες της σφαίρας ενυδάτωσης. Άρα γενικά μπορούμε να πούμε ότι:

Σε ένα υδατικό διάλυμα μειωτών ιοντικής ισχύος έχουμε αντικατάσταση των πολικών μορίων νερού με κάποια άλλα πολικά μόρια.

Οι ιδιότητες ενός υδατικού διαλύματος μειωτών ιοντικής ισχύος, όπως η διηλεκτρική σταθερά και το ιξώδες, είναι διαφορετικές από αυτές του νερού. Οι μειωτές ιοντικής ισχύος έχουν μικρότερη διηλεκτρική σταθερά από το νερό. Τα υδατικά τους διαλύματα σαν συνέπεια έχουν και αυτά μικρότερη διηλεκτρική σταθερά από το νερό. Το ιξώδες των υδατικών διαλυμάτων των περισσότερων μειωτών ιοντικής ισχύος αυξάνει (7). Σύμφωνα με την αγωγιμομετρία, μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς ή και αύξηση του ιξώδους ενός διαλύματος συνεπάγεται την ελάττωση της κινητικότητας των ιόντων μέσα στο διάλυμα και άρα της αγωγιμότητας του διαλύματος. (9)

## 2.2. Κατανόηση της γενικευμένης εναλάτωσης και εξαλάτωσης.

### 2.2.1. Η θεωρία των Debye-Hückel προβλέπει τη γενικευμένη εναλάτωση.

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί η θεωρία των Debye-Hückel προβλέπει ότι εάν η διηλεκτρική σταθερά του μέσου ελαττωθεί τότε ελαττώνεται και η διαλυτότητα των βιομορίων. Άλλωστε αυτή είναι και η εξήγηση για την κατακρήμνιση των βιομορίων με οργανικούς διαλύτες και PEG. Η παρατήρηση όμως που είχε διαφύγει από την εξέταση του νόμου είναι η αύξηση της διαλυτότητας με την προσθήκη αλατιού στο μικτό υδατικό διάλυμα. Άρα είναι δυνατόν η ελάττωση της διαλυτότητας που προκαλείται από μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς να αναιρεθεί με την παράλληλη αύξηση της αλατότητας.

### 2.2.2. Η θεωρία του ιοντικού ζεύγους ισχυροποιεί ακόμα περισσότερο την πρόβλεψη.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, όσο η διηλεκτρική σταθερά του διαλύτη μειώνεται τόσο αυξάνεται το φαινόμενο του ιοντικού ζεύγους. Αυτό σημαίνει ότι η "ενεργή" συγκέντρωση ιόντων ελαττώνεται καθώς σχηματίζονται ουδέτερα δίπολα ιόντων. Στην απλουστευμένη εξίσωση διαλυτότητας κατά Green (Εξίσωση 1.8.), η διαλυτότητα ενός βιομορίου στην περιοχή της εναλάτωσης εξαρτάται από την τετραγωνική ρίζα της συγκέντρωσης των ιόντων που βρίσκονται στο διάλυμα. Αν λοιπόν μειώσουμε τη διηλεκτρική σταθερά του διαλύτη τότε ένα ποσοστό των ιόντων καθίσταται ανενεργό λόγω συμμετοχής του σε ιοντικά ζεύγη. Η συγκέντρωση των ελεύθερων ιόντων στο διάλυμα ελαττώνεται άρα και η διαλυτότητα που εξαρτάται από την τετραγωνική ρίζα της συγκέντρωσής τους ελαττώνεται. Για να αναιρεθεί η ελάττωση της διαλυτότητας πρέπει να αυξήσουμε τη συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη.

### 2.2.3. Η θεωρία του ιοντικού ζεύγους προβλέπει την αναστολή της εξαλάτωσης.

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, η θεωρία των Debye-Hückel ισχύει για αραιούς ηλεκτρολύτες (0-1 mM). Η συγκέντρωση αυτή είναι πολύ μικρή συγκριτικά με τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται στις καθημερινές εφαρμογές. Το φαινόμενο της εξαλάτωσης, όπως ήδη αναφέρθηκε, περιγράφεται από τη γραμμική σχέση -  $K_D I$ . Η ιοντική ισχύς  $I$  σχετίζεται με τη συγκέντρωση των ελεύθερων ιόντων του ηλεκτρολύτη (Εξίσωση 1.7.).

Με βάση και πάλι τη θεωρία του ιοντικού ζεύγους σε πυκνά διαλύματα μέρος των ιόντων βρίσκεται σε ουδέτερα συμπλέγματα. Η θεώρηση αυτή εξηγεί γιατί η γραμμική σχέση  $K_D I$  δεν περιγράφει ικανοποιητικά τα πειραματικά δεδομένα.

Προφανώς, με την αύξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη στο διάλυμα, η συγκέντρωση των ελεύθερων ιόντων στο διάλυμα δεν αυξάνεται γραμμικά αλλά αποκλίνει ανάλογα με το ποσοστό ουδέτερων ιοντικών συμπλεγμάτων που δημιουργούνται. Αν λοιπόν, σε μία συνθήκη εξαλάτωσης ελαττώσουμε τη διηλεκτρική σταθερά του μέσου με την προσθήκη κάποιου μειωτή τότε το φαινόμενο ιοντικού ζεύγους αυξάνει. Σαν συνέπεια η συγκέντρωση των ελεύθερων ιόντων ελαττώνεται, άρα η ιοντική ισχύ του διαλύματος μειώνεται και άρα, η εξαλάτωση αναρτείται.

#### 2.2.4. Επεξήγηση και ορισμός του όρου μειωτής ιοντικής ισχύος.

Με βάση τη θεωρία του ιοντικού ζεύγους η προσθήκη μειωτών ιοντικής ισχύος αυξάνει το ποσοστό των ιόντων που συμμετέχουν σε ουδέτερα συμπλέγματα. Συνεπώς ελαττώνει το ποσό των ελεύθερων, ενεργών ιόντων που συμμετέχουν στη δημιουργία του ηλεκτροστατικού πεδίου μέσα στο διάλυμα. Η ελάττωση των ελεύθερων ιόντων μειώνει την ιοντική ισχύ του διαλύματος. Η έκφραση μειωτής ιοντικής ισχύος αυτή ακριβώς την ιδιότητα περιγράφει.

Μειωτής ιοντικής ισχύος ή μειωτής ονομάζεται η πολική ουσία, η οποία όταν προστεθεί σε υδατικό ηλεκτρολυτικό διάλυμα ελαττώνει τη συγκέντρωση των ελεύθερων ιόντων και κατά συνέπεια μειώνει την ιοντική ισχύ του διαλύματος.

#### 2.2.5. Μικροσκοπική εξήγηση της εναλάτωσης.

Τα βιομόρια είναι πολυηλεκτρολύτες. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή τους στο καθαρό νερό, τόσο αυξάνεται και η δημιουργία συμπλόκων τους λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Από κάποια συγκέντρωση και πέρα, τα συσσωματώματα των βιομορίων γίνονται ιδιαίτερα μεγάλα και οι αλληλεπιδράσεις τους με τα μόρια νερού δεν αρκούν για να τα κρατήσουν στο διάλυμα και τότε κατακρημνίζονται. Αν προστεθούν ιόντα στο διάλυμα, τότε τα επιφανειακά φορτία των βιομορίων μπορούν να αλληλεπιδράσουν και με τα ιόντα του αλατιού. Όσο η συγκέντρωση των ιόντων αυξάνει, αυξάνεται στατιστικά και η δημιουργία ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων των βιομορίων με τα ιόντα. Σαν συνέπεια, η δημιουργία μεγάλων συσσωματωμάτων αναστέλλεται και η διαλυτότητα αυξάνει.

Αν σε ένα διάλυμα σταθερής συγκέντρωσης βιομορίου προστεθεί κάποια ποσότητα μειωτή τότε η ισχύς των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ιόντων του διαλύματος αυξάνει και με βάση τη θεωρία του ιοντικού ζεύγους τα ιόντα δημιουργούν συμπλοκα, άρα η συγκέντρωση των ελεύθερων ιόντων μειώνεται. Άρα δημιουργείται έλλειψη φορτίων στο διάλυμα και σαν συνέπεια τα βιομόρια συσσωματώνονται και κατακρημνίζονται. Τα βιομόρια σαν πολυηλεκτρολύτες επηρεάζονται επίσης από την αλλαγή της διηλεκτρικής σταθεράς και σαν συνέπεια αλληλεπιδρούν με ισχυρότερες κοιλιομηπίες δυνάμεις μεταξύ τους. Άρα η προσθήκη

μειωτών στο διάλυμα αυξάνει τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βιομορίων, αλλά και παράλληλα ελαττώνει τη συγκέντρωση των ελεύθερων ιόντων στο διάλυμα. Και οι δύο παραπάνω συνιστώσες οδηγούν στην κατακρήμνιση των βιομορίων στην περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης. Ο μόνος τρόπος αναστολής της κατακρήμνισης αυτής είναι η αύξηση της συγκέντρωσης των ελεύθερων ιόντων με αύξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη στο διάλυμα.

**Παρατήρηση:** Στο ισοηλεκτρικό του σημείο, ένα βιομόριο μπορεί να προσεγγίσει με μεγαλύτερη ευκολία άλλα βιομόρια καθώς δεν υπάρχουν αποθιτικές ομώνυμες δυνάμεις. Άρα η κατακρήμνιση ενός βιομορίου στην περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης ενοείται, αν το pH του διαλύματος συμπίπτει με το ισοηλεκτρικό σημείο του βιομορίου. Το συνολικό φορτίο ενός βιομορίου στο ισοηλεκτρικό του σημείο είναι μηδέν. Στην πραγματικότητα, στην επιφάνεια των βιομορίων είναι κατανομημένος ίσος αριθμός θετικών και αρνητικών φορτίων. Η κατανομή των φορτίων αυτών μπορεί να είναι ομοιόμορφη ή πολωμένη. Η πολωμένη κατανομή φορτίων στην επιφάνεια ενός βιομορίου μπορεί να παίζει ιδιαίτερο ρόλο τόσο στη δομή όσο και στη δράση του βιομορίου.

#### 2.2.6. Μικροσκοπική εξήγηση της εξαλάτωσης.

Στο φαινόμενο της εξαλάτωσης τα βιομόρια έχουν γύρω τους μεγάλο αριθμό φορτίων. Εξαιτίας της θεωρίας του ιοντικού ζεύγους τα επιφανειακά φορτία των βιομορίων τείνουν και αυτά να δημιουργήσουν ουδέτερα ιοντικά σύμπλοκα. Καθώς όμως τα ιόντα γύρω τους βρίσκονται σε περίσσεια μπορούν να δημιουργήσουν ιοντικά σύμπλοκα με αυτά. Άρα, στην περίπτωση της γενικευμένης εξαλάτωσης, τα βιομόρια δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της γενικευμένης εναλάτωσης.

Στα πυκνά ηλεκτρολυτικά διαλύματα, η αυξημένη συγκέντρωση ιόντων στο διάλυμα μειώνει την προσφορά μορίων νερού για τη δημιουργία της σφαίρας ενυδάτωσης τόσο των ιόντων όσο και των βιομορίων. Τα ελεύθερα μόρια νερού μειώνονται και άρα η δεύτερη σφαίρα ενυδάτωσης η οποία περιβάλλει τόσο τα ιόντα όσο και τα βιομόρια μικραίνει. Στην περίπτωση αυτή τα βιομόρια μπορούν εναλλακτικά να αλληλεπιδράσουν πολικά μεταξύ τους. Όσο η συγκέντρωση των ιόντων αυξάνει τόσο μεγαλύτερη γίνεται η έλλειψη πολικών αλληλεπιδράσεων με τον διαλύτη και τόσο περισσότερο τα βιομόρια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με πολικές αλληλεπιδράσεις δημιουργώντας όλο και μεγαλύτερα συσσωματώματα. Τα συσσωματώματα αυτά, από ένα μέγεθος και πάνω, είναι αδύνατον να διατηρηθούν στο διάλυμα και κατακρήμνίζονται. Καθώς η σφαίρα ενυδάτωσης των βιομορίων μικραίνει εξαιτίας της έλλειψης ελεύθερων μορίων νερού, υδρόφοβα τμήματα της επιφάνειας των βιομορίων είναι πιθανό να αποκαλυφθούν. Στην περίπτωση αυτή οι αλληλεπιδράσεις κατακρήμνισης εκτός από πολικές είναι και υδρόφοβες.

Όταν στο πυκνό ηλεκτρολυτικό διάλυμα προστεθούν μειωτές ιοντικής ισχύος, το φαινόμενο του ιοντικού ζεύγους αυξάνει, εξαιτίας της μεταβολής της διηλεκτρικής σταθεράς. Δηλαδή περισσότερα ιόντα συμμετέχουν σε ιοντικά ομοιομετάγματα. Σαν συνέπεια μεγάλο μέρος της σφαίρας ενυδάτωσής των ιόντων απελευθερώνεται, αυξάνοντας τα ελεύθερα μόρια νερού. Σαν αποτέλεσμα η διαλυτότητα των βιομορίων αυξάνεται.

### **2.2.7. Παράγοντες που περιπλέκουν το πρόβλημα.**

Οι φορτισμένες ομάδες των βιομορίων δεν δίστανται πλήρως και άρα οι ιδιότητές τους δεν είναι ίδιες με αυτές των ισχυρών ηλεκτρολυτών. Τα μόρια των μειωτών ιοντικής ισχύος είναι πιθανό να συμμετέχουν στη σφαίρα ενυδάτωσης τόσο των ιόντων όσο και των βιομορίων. Η συμμετοχή των μειωτών ιοντικής ισχύος στη σφαίρα ενυδάτωσης έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ιόντων και των βιομορίων. Η μεθενόλη για παράδειγμα μπορεί να αλληλεπιδράσει με υδρογονικούς δεσμούς με ένα βιομόριο χρησιμοποιώντας το υδροξύλιό της. Σαν αποτέλεσμα, η υδρόφοβη πλευρά της μένει εκτεθειμένη στο διαλύτη, προσδίδοντας με τον τρόπο αυτό μία υδρόφοβη ιδιότητα στην επιφάνεια της σύμπλοκης σφαίρας του βιομορίου. Οι περισσότεροι από τους μειωτές ιοντικής ισχύος αυξάνουν το ιξώδες του διαλύματος και άρα μειώνουν την κινητικότητα των μορίων του διαλύματος.

### 2.3. Η γενικευμένη εξίσωση του Green, για τα ηλεκτρολυτικά διαλύματα παρουσία μειωτών, προβλέπει τις πειραματικές παρατηρήσεις και τα πορίσματα του γενικευμένου διαγράμματος.

#### 2.3.1. Πρόβλεψη της γενικευμένης εναλάτωσης.

Η εξίσωση του Green όπως προαναφέρθηκε στην εισαγωγή (Εξίσωση 1.8.) περιγράφει τη διαλυτότητα ενός βιομορίου σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης των ιόντων στο διάλυμα και δίνεται από τον τύπο 2.1. ή 2.2.

$$\log S = \log S_0 + k_1 \sqrt{I} - k_0 I \quad 2.1.$$

ή

$$\log (S/S_0) = k_1 \sqrt{I} - k_0 I \quad 2.2.$$

Στην εικόνα 2.3. και στην εικόνα 2.4. η καμπύλη A δείχνει σχηματικά τη μεταβολή του λογαριθμίου της διαλυτότητας S ενός βιομορίου σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης των ιόντων στο νερό για αυθαίρετες τιμές των μεταβλητών της εξίσωσης 2.1. Η αριστερή περιοχή της καμπύλης, που αντιστοιχεί στην χαμηλή συγκέντρωση ηλεκτρολύτη, είναι η περιοχή της εναλάτωσης. Η δεξιά περιοχή της καμπύλης, που αντιστοιχεί στην υψηλή συγκέντρωση ηλεκτρολύτη, είναι η περιοχή της εξαλάτωσης. Η διαλυτότητα του βιομορίου στο καθαρό νερό είναι  $S_w$ , και άρα στη συγκεκριμένη περίπτωση  $S_0 = S_w$ .

Η μεταβολή της διαλυτότητας ενός βιομορίου παρουσία ενός οργανικού διαλύτη ή PEG μεταβάλλεται σύμφωνα με την εξίσωση 2.3. Η εξίσωση αυτή, όπως προαναφέρθηκε στην εισαγωγή (εξίσωση 1.9., σελ. 25), περιγράφει την ελάττωση της διαλυτότητας ενός βιομορίου συναρτήσει της ελάττωσης της διηλεκτρικής σταθεράς του διαλύματος, η οποία όμως εξαρτάται από την αύξηση της συγκέντρωσης του οργανικού διαλύτη ή του PEG στο διάλυμα.

$$\log (S_{CO}/S_w) = (A / RT) (1 / \epsilon_w - 1 / \epsilon_{CO}) \quad 2.3.$$

Η εξίσωση 2.3. περιγράφει τη μεταβολή της διαλυτότητας ανεξάρτητα από την παρουσία ηλεκτρολύτη. Η μεταβλητή  $S_{CO}$  είναι η διαλυτότητα του βιομορίου παρουσία συγκέντρωσης  $C_0$  οργανικού διαλύτη ή PEG και προσδίδει στο διάλυμα διηλεκτρική σταθερά  $\epsilon_{CO}$ . Ισχύει ότι  $S_{CO} < S_w$  και άρα:

$$\log S_{CO} < \log S_w. \quad 2.4.$$

Στην εικόνα 2.3. η καμπύλη Β παριστάνει την εξάρτηση του λογαρίθμου της διαλυτότητας του βιομορίου σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης των ιόντων στο διάλυμα παρουσία σταθερής συγκέντρωσης  $C_O$  οργανικού διαλύτη ή PEG. Στη περίπτωση αυτή η διαλυτότητα του βιομορίου απουσία ηλεκτρολύτη δεν είναι  $S_w$  αλλά  $S_{CO}$ . Η καμπύλη Β υπολογίζεται από την εξίσωση 2.5.

$$\log S = \log S_{CO} + k\sqrt{I} - k_O I \quad 2.5.$$

Εξαιτίας της ανίωσης 2.4. η καμπύλη Β αποτελεί παράλληλη μετατόπιση της καμπύλης Α ως προς τον άξονα του λογάριθμου της διαλυτότητας κατά μία ποσότητα:

$$\Delta(\log S) = \log S_{CO} - \log S_w \quad 2.6.$$

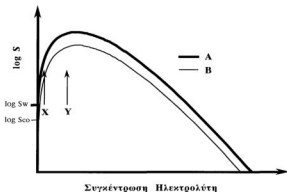
Από την εικόνα 2.3. είναι φανερό ότι προβλέπονται τα πορίσματα του γενικευμένου διαγράμματος για την περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης. Η κατάσταση Χ είναι κατάσταση διαλυτότητας για την περίπτωση του υδατικού διαλύματος και κατακρήμνισης για το διάλυμα συγκεντρωμένης συγκέντρωσης  $C_O$  οργανικού διαλύτη ή PEG. Η κατάσταση Υ είναι κατάσταση διαλυτότητας τόσο για το υδατικό διάλυμα όσο και για το διάλυμα οργανικού διαλύτη ή PEG. Για την περίπτωση του διαλύματος οργανικού διαλύτη ή PEG, η κατάσταση Υ είναι αναστολή της κατακρήμνισης της κατάστασης Χ εξαιτίας της αυξημένης συγκέντρωσης ιόντων. Από την εξίσωση 2.1. δηλαδή, προβλέπεται η αναστολή της κατακρήμνισης, που προξενείται από τους οργανικούς διαλύτες ή το PEG, με την αντίστοιχη αύξηση της ιοντικής ισχύος. Από την εξίσωση αυτή όμως, δεν προβλέπεται η αναστολή της εξαλάτωσης, παρουσία μειωτών.

### 2.3.2. Πρόβλεψη της γενικευμένης εξαλάτωσης, με τη συμβολή της θεωρίας του ιοντικού ζεύγους.

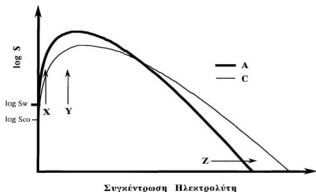
Εδώ πρέπει να επαναλάβουμε ότι, με την παρουσία μειωτών ιοντικής ισχύος στο διάλυμα, η συγκέντρωση των ελεύθερων ιόντων στο διάλυμα μειώνεται, εξαιτίας της της θεωρίας του ιοντικού ζεύγους. Άρα η εξίσωση 2.1. και κατά συνέπεια η εξίσωση 2.5. πρέπει να αντικατασταθεί με τη γενικότερη εξίσωση 2.7. Η εξίσωση αυτή περιλαμβάνει τη μείωση των ελεύθερων ιόντων στο διάλυμα εξαιτίας της προσθήκης του μειωτή ιοντικής ισχύος.

$$\log S = \log S_{CO} + k\sqrt{fI} - k_O I \quad 2.7.$$





**Εικόνα 2.3.** Η καμπύλη A παριστάνει την εξάρτηση του λογάριθμου της διαλυτότητας ενός βιομορίου από τη συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη στο υδατικό διάλυμα σύμφωνα με την εξίσωση 2.1., όπου  $S_0 = S_w$ . Η καμπύλη B παριστάνει την εξάρτηση του λογάριθμου της διαλυτότητας ενός βιομορίου από τη συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη σε μικτό υδατικό διάλυμα παρουσία συγκεκριμένης συγκέντρωσης μειωτή ιοντικής ισχύος σύμφωνα με τις εξισώσεις 2.1. και 2.5., όπου  $S_0 = S_{CO} < S_w$ . Η κατάσταση X είναι κατάσταση διαλυτή για την περίπτωση της καμπύλης A και αδιάλυτη για την περίπτωση της καμπύλης B. Η κατάσταση Y είναι κατάσταση διαλυτή τόσο για την περίπτωση της καμπύλης A όσο και της καμπύλης B.



**Εικόνα 2.4.** Η καμπύλη A παριστάνει την εξάρτηση του λογάριθμου της διαλυτότητας ενός βιομορίου από τη συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη στο υδατικό διάλυμα σύμφωνα με την εξίσωση 2.1., όπου  $S_0 = S_w$ . Η καμπύλη C παριστάνει την εξάρτηση του λογάριθμου της διαλυτότητας ενός βιομορίου από τη συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη σε μικτό υδατικό διάλυμα παρουσία συγκεκριμένης συγκέντρωσης μειωτή ιοντικής ισχύος σύμφωνα με την εξίσωση 2.7., όπου  $S_0 = S_{CO} < S_w$ . Η κατάσταση X είναι κατάσταση διαλυτή για την περίπτωση της καμπύλης A και αδιάλυτη για την περίπτωση της καμπύλης C. Η κατάσταση Y είναι κατάσταση διαλυτή τόσο για την περίπτωση της καμπύλης A όσο και της καμπύλης C. Η κατάσταση Z είναι κατάσταση διαλυτή για την περίπτωση της καμπύλης C και αδιάλυτη για την περίπτωση της καμπύλης A.

Στην εξίσωση 2.7, ο συντελεστής  $r$  είναι το ποσοστό των ελεύθερων ιόντων στο διάλυμα, μετά από την προσθήκη μειωτή ιοντικής ισχύος. Ο συντελεστής αυτός είναι μικρότερος της μονάδας και εξαρτάται από τη συγκέντρωση των μειωτών ιοντικής ισχύος στο διάλυμα. Στην εικόνα 2.4, η καμπύλη C περιγράφει την διαλυτότητα ενός βιομορίου σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης των ιόντων σε ένα διάλυμα σταθερής συγκέντρωσης  $C_0$  οργανικού διαλύτη ή PEG. Η προσθήκη του οργανικού διαλύτη ή του PEG μειώνει τα ελεύθερα ιόντα κατά ένα παράγοντα  $r$ . Η καμπύλη C υπολογίζεται από τον τύπο 2.7. Η εξίσωση 2.1, αποτελεί υποπερίπτωση της εξίσωσης 2.7, για  $S_0 = S_{CO} = S_w$  και  $r=1$

Από την εικόνα 2.4, είναι φανερό ότι προβλέπονται τα πορίσματα του γενικευμένου διαγράμματος για την περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης. Η κατάσταση X είναι κατάσταση διαλυτότητας για την περίπτωση του υδατικού διαλύματος και κατακρήμνισης για το διάλυμα συγκεκριμένης συγκέντρωσης  $C_0$  οργανικού διαλύτη ή PEG. Η κατάσταση Y είναι κατάσταση διαλυτότητας τόσο για το υδατικό διάλυμα όσο και για το διάλυμα οργανικού διαλύτη ή PEG. Για την περίπτωση του διαλύματος οργανικού διαλύτη ή PEG, η κατάσταση Y είναι αναστολή της κατακρήμνισης της κατάστασης X εξαιτίας της αυξημένης συγκέντρωσης ιόντων. Από την εξίσωση 2.7, δηλαδή, προβλέπεται η αναστολή της κατακρήμνισης, που προξενείται από τους οργανικούς διαλύτες ή το PEG, με την αντίστοιχη αύξηση της ιοντικής ισχύος.

Από την εικόνα 2.4, είναι επίσης φανερό ότι προβλέπονται τα πορίσματα του γενικευμένου διαγράμματος για την περιοχή της γενικευμένης εξαλάτωσης. Η κατάσταση Z είναι κατάσταση κατακρήμνισης για την περίπτωση του υδατικού διαλύματος και διαλυτότητας για το διάλυμα συγκεκριμένης συγκέντρωσης  $C_0$  οργανικού διαλύτη ή PEG. Από την εξίσωση 2.7, δηλαδή, προβλέπεται η αναστολή της κατακρήμνισης από εξαλάτωση με την παρουσία οργανικών διαλυτών ή PEG.

## 2.4. Ιδιότητες της διαλυτής φάσης στη γειτονιά των δύο διαφορετικών ζωνών κατακρήμνισης.

### 2.4.1. Περιοχή γενικευμένης εναλάτωσης, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία.

Όπως έχει αναφερθεί στην περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης τα βιομόρια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους κυρίως με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και σταδιακά δημιουργούν σύμπλοκα τα οποία και κατακρήμνίζονται. Τονίζουμε ότι, ηλεκτροστατικές κυρίως αλληλεπιδράσεις συνδέουν τα μόρια στα συσσωματώματα που δημιουργούν το ίζημα στην περιοχή αυτή. Τα βιομόρια λοιπόν στη διαλυτή φάση του γενικευμένου διαγράμματος, στην περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης, εμφανίζουν έντονα τον ηλεκτρολυτικό, ιοντικό τους χαρακτήρα. Έχουν δηλαδή την τάση να αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά (1,34).

As περιοριστούμε τώρα στον άξονα της αλατότητας  $x$  του γενικευμένου διαγράμματος 2.1. Ένα βιομόριο που βρίσκεται σε ένα διάλυμα μικρής αλατότητας, μπορεί ανάλογα με το φορτίο του να προσδεθεί σε χρωματογραφικά υποστρώματα ιοντοανταλλαγής. Δηλαδή, το βιομόριο αποχωρίζεται την υγρή φάση και αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με την στερεά φάση του χρωματογραφικού υποστρώματος. Αύξηση της συγκέντρωσης της αλατότητας στην υγρή φάση οδηγεί στην έλωση του βιομορίου.

Είναι φανερό ότι, η διαλυτή φάση στη γειτονιά της περιοχής P1 είναι η φάση όπου επενεργεί η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Όσο η αλατότητα ενός διαλύματος αυξάνει, τόσο η ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία γίνεται ανίσχυρη στο να προσδένει βιομόρια. Δημιουργείται λοιπόν η ανάγκη να ανεπιραστήσουμε στο γενικευμένο διάγραμμα την περιοχή της ιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας. Η περιοχή αυτή ονομάζεται Π (Interactions in Salting In area) και εμφανίζεται σαν η σκιασμένη περιοχή μέσα στην διαλυτή περιοχή S του διαγράμματος στην εικόνα 2.5.

### 2.4.2. Περιοχή γενικευμένης εξαλάτωσης, πολικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και υδροφοβική χρωματογραφία.

Όπως έχει αναφερθεί στην περιοχή της γενικευμένης εξαλάτωσης, τα βιομόρια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους κυρίως με πολικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και σταδιακά δημιουργούν όλο και μεγαλύτερα σύμπλοκα τα οποία και κατακρήμνίζονται. Τονίζουμε ότι, πολικές και υδρόφοβες κυρίως αλληλεπιδράσεις συνδέουν τα βιομόρια στα συσσωματώματα που δημιουργούν το ίζημα στην περιοχή της γενικευμένης εξαλάτωσης. Τα βιομόρια λοιπόν στη διαλυτή φάση του γενικευμένου διαγράμματος, στην περιοχή της γενικευμένης εξαλάτωσης εμφανίζουν έντονα τον πολικό και υδρόφοβο χαρακτήρα τους. Έχουν δηλαδή την τάση να κάνουν πολικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (1,34).

As περιοριστούμε και πάλι στον άξονα της αλατότητας  $x$  του γενικευμένου διαγράμματος. Ένα βιομόριο που βρίσκεται σε ένα διάλυμα μεγάλης αλατότητας, μπορεί να προσδεθεί σε χρωματογραφικά υποστρώματα υδροφοβικότητας. Δηλαδή το βιομόριο αποχωρίζεται την υγρή φάση και αλληλεπιδρά υδροφοβικά με την στερεά φάση του χρωματογραφικού υποστρώματος. Μείωση της συγκέντρωσης της αλατότητας στην υγρή φάση οδηγεί στην έκλυση του βιομορίου.

Είναι φανερό ότι η διαλυτή φάση στη γειτονιά της περιοχής Ρο είναι η φάση όπου ερασιμύζεται η χρωματογραφία υδροφοβικότητας. Όσο η αλατότητα του διαλύματος μειώνεται, τόσο η υδρόφοβη χρωματογραφία γίνεται ανίσχυρη στο να προσδέσει βιομόρια. Δημιουργείται λοιπόν η ανάγκη να αναπαραστήσουμε την περιοχή της υδροφοβικής χρωματογραφίας στο γενικευμένο διάγραμμα της εικόνας 2.5. Η περιοχή αυτή ονομάζεται Ιο (Interactions in Salting Out area) και εμφανίζεται σαν η οικιασμένη περιοχή μέσα στην διαλυτή περιοχή S του διαγράμματος στην εικόνα 2.5. Σύμφωνα με τις ιδιότητες που θεωρούμε ότι δρουν στην περιοχή αυτή η χρωματογραφία υδροφοβικότητας φαίνεται ότι είναι μάλλον χρωματογραφία πολικότητας, υδροφοβικότητας.

#### **2.4.3. Προβλέψεις του γενικευμένου διαγράμματος για την υδροφοβική και την ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία. Ιδιοχαρακτηριστική συμπεριφορά.**

Από το γενικευμένο διάγραμμα προβλέπονται οι ακόλουθες ιδιότητες για την ιοντοανταλλακτική και την υδρόφοβη χρωματογραφία.

Αν στην ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία ένα μόριο εκλύεται σε συγκέντρωση αλατότητας  $C_1$  τότε, παρουσία σταθερής συγκέντρωσης μειωτή ιοντικής ισχύος, το βιομόριο θα εκλύεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση αλατότητας  $C_1' > C_1$ . Παρουσία σταθερής συγκέντρωσης αλατιού  $C_1$  και σταθερής συγκέντρωσης μειωτή ιοντικής ισχύος το μόριο παραμένει δεσμευμένο στο υπόστρωμα. Ελάττωση της συγκέντρωσης του μειωτή ιοντικής ισχύος οδηγεί σε έκλυση.

Αν στην υδρόφοβη χρωματογραφία ένα βιομόριο εκλύεται σε συγκέντρωση αλατότητας  $C_0$ , τότε παρουσία σταθερής συγκέντρωσης μειωτή ιοντικής ισχύος θα εκλύεται σε μεγαλύτερη συγκριτικά συγκέντρωση αλατότητας  $C_0' > C_0$ . Παρουσία σταθερής συγκέντρωσης αλατιού  $C_0$  το μόριο παραμένει δεσμευμένο στο υπόστρωμα. Αύξηση της συγκέντρωσης του μειωτή ιοντικής ισχύος οδηγεί σε έκλυση.

Οι περιοχές Π και Ιο είναι ιδιοχαρακτηριστικές κάθε βιομορίου. Το γενικό διάγραμμα δεν περιγράφει την κάθε ειδική περίπτωση αλλά οικιασραφεί τις γενικές τάσεις. Η γνώση της ιδιοχαρακτηριστικής συμπεριφοράς ενός βιομορίου δίνει τη δυνατότητα σχεδιασμού αποδοτικότερων χρωματογραφικών πειραμάτων.

### 1.2.2. Σημαντικές θεωρίες που στηρίζονται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. (2,6,7)

Οι περισσότερες θεωρίες που αφορούν τα ηλεκτρολυτικά διαλύματα στηρίζονται στις ηλεκτροστατικές, κοιλομετρικές αλληλεπιδράσεις.

#### 1.2.2.1. Η θεωρία των Debye-Hückel (ιοντικό νέφος) (2).

Η θεωρία των Debye-Hückel είναι από τις πρωταρχικές στο χώρο της ηλεκτροχημείας. Η θεωρία αυτή απλοποιείται το πολυπαραμετρικό πρόβλημα του ηλεκτρολυτικού διαλύματος με το ακόλουθο μοντέλο. Το ηλεκτρολυτικό διάλυμα γύρω από ένα ιόν περιγράφεται σαν μία κατανομή ενός νοητού νέφους αντίθετου φορτίου γύρω από το κεντρικό σημειώο φορτίο του ιόντος.

Η θεωρία των Debye-Hückel στηρίζεται στις εξισώσεις των Poisson και Boltzmann. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή η μεταβολή του χημικού δυναμικού  $\mu$  ενός ηλεκτρολυτικού διαλύματος ως προς το ιδανικό διάλυμα δίνεται από τον τύπο 1.4.

$$\Delta\mu_{i1} = \frac{N_A(z_i e_0)^2}{2 \epsilon \kappa^{-1}} \quad 1.4.$$

Όπου  $N_A$  ο αριθμός του Avogadro,  $ze_0$  φορτίο του κεντρικού ιόντος,  $\epsilon$  η διηλεκτρική σταθερά του μέσου. Η σταθερά  $\kappa^{-1}$  έχει διαστάσεις μήκους, καλείται "ακτίς" της ιονικής ατμόσφαιρας και προσδιορίζεται από τον τύπο 1.5.

$$\kappa^{-1} = \left( \frac{\epsilon kT}{4\pi \sum_i n_i^0 z_i^2 e_0^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad 1.5.$$

Όπου  $\epsilon$  η διηλεκτρική σταθερά,  $k$  η σταθερά Boltzmann,  $T$  η θερμοκρασία,  $n_i^0$  η συγκέντρωση ενός τύπου ιόντων στο διάλυμα και  $z_i$  το σθένος του συγκεκριμένου ιόντος.

#### 1.2.2.2. Η θεωρία των Debye-Hückel αποτελεί οριακό νόμο για τα ηλεκτρολυτικά διαλύματα. Ισχύει για αραιούς ηλεκτρολύτες (από 0 μέχρι 0,001 M) (2,6,7).

Συγκρίνοντας τις πειραματικές τιμές του συντελεστή ενεργότητας με τις θεωρητικά υπολογισμένες από το μοντέλο των Debye-Hückel, αποδεικνύεται ότι ο νόμος αυτός είναι ικανός να περιγράψει ικανοποιητικά μόνο τα αραιά ηλεκτρολυτικά διαλύματα (από 0 μέχρι 0,001 M). Διάφορες βελτιωμένες μορφές της θεωρίας έχουν δημιουργηθεί, αλλά και αυτών η ισχύς περιορίζεται στα αραιά ηλεκτρολυτικά διαλύματα (μέχρι 0,1 M).

### 1.2.2.3. Η θεωρία του ιοντικού ζεύγους (Bjerrum, Fuoss, Onsager). Σταθερά σύνδεσης. (2,6)

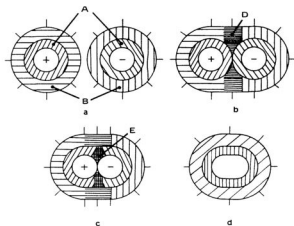
Η θεωρία του ιοντικού ζεύγους (Ion Pair) υποθέτει ότι, αν για κάποιο χρονικό διάστημα δύο ιόντα αντιθέτου φορτίου βρεθούν σε απόσταση μικρότερη από  $a$ , τότε τα ιόντα αυτά δημιουργούν ένα ουδέτερο συνολικά δίπολο το οποίο ορίζεται σαν ιοντικό ζεύγος (Εικόνα 1.2.). Το ποσοστό των ιόντων που βρίσκεται σε ιοντικά ζεύγη υπολογίζεται από τη σταθερά σύνδεσης  $K_A$  (Ion association constant). Η δημιουργία των ιοντικών ζευγών εξαρτάται από την ελάττωση της διηλεκτρικής σταθεράς του μέσου και την αύξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη. Η δημιουργία ιοντικών ζευγών μπορεί να επεκταθεί σε δημιουργία τριπλών τετραπλών και πολλαπλών ιοντικών συμπλεγμάτων. Τέτοια συμπλέγματα έχουν παρατηρηθεί σε διαλύτες με μικρή διηλεκτρική σταθερά. Η θεωρία του ιοντικού ζεύγους αποχτά ιδιαίτερη σημασία στα πυκνά ηλεκτρολυτικά διαλύματα και στους διαλύτες με μικρή διηλεκτρική σταθερά.

### 1.2.3. Άλλες θεωρίες. (2,6,7)

Στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις βασίζονται και άλλες θεωρίες. Η μεταβολή της διηλεκτρικής σταθεράς, η θεώρηση του ηλεκτρολύτη σαν ψευδοπλέγμα και η χρησιμοποίηση της μη γραμμικής εξίσωσης των Poisson-Boltzmann έχουν αποτελέσει αρχές για την θεμελίωση των θεωριών αυτών (2,6,7).

Για τη μελέτη των ηλεκτρολυτικών διαλυμάτων έχουν αναπτυχθεί και διάφορες μη κινλομπικές θεωρίες. Αναφορικά, η θεωρία της ενυδάτωσης και η θεωρία της επέκτασης του συντελεστή virial (virial coefficient expansion) (6,7).

Η μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ηλεκτρολυτικών διαλυμάτων με την στατιστική μηχανική βρίσκεται σε εξέλιξη. Το πρόβλημα είναι αρκετά πολύπλοκο και οι μαθηματικές εξισώσεις που το προσεγγίζουν είναι δύσκολες (6,7).



**Εικόνα 1.2.** Διαγραμματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ιόντων και διαλύτη στο διάλυμα. Ο άμορφος διαλύτης δεν εμφανίζεται στην εικόνα. (a) Πρώτη σφαίρα ενδάτωσης (περιοχή A) και δεύτερη σφαίρα ενδάτωσης (περιοχή B) για κατιόν και ανιόν. (b) Οι δεύτερες σύμπλοκες σφαίρες επικαλύπτονται (περιοχή D). Ιοντικό ζεύγος διαχωριζόμενο από διαλύτη. (c) Οι πρώτες σύμπλοκες σφαίρες επικαλύπτονται (περιοχή E). Ιοντικό ζεύγος σε επαφή. (d) Αφόρτιστη οργάνωση. (10)



### 1.3. Η διαλυτότητα των βιομορίων. (1,11-13)

#### 1.3.1. Η διαλυτότητα των βιομορίων σε υδατικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα. (1,11,12)

Η διαλυτότητα των βιομορίων σε ηλεκτρολυτικά διαλύματα έχει μελετηθεί εκτεταμένα. Δύο ιδιαίτερα χαρακτηριστικά παρουσιάζει η διαλυτότητα των βιομορίων σε σχέση με τη συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών στο διάλυμα. Τα χαρακτηριστικά αυτά αναφέρονται με τους όρους εναλάτωση (Salting-in) και εξαλάτωση (Salting-out) (Εικόνα 1.3.).

##### 1.3.1.1. Εναλάτωση (1,12).

Η αύξηση της διαλυτότητας των βιομορίων με την ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη σε χαμηλές συγκεντρώσεις αλατιών (<0,5 M) ονομάζεται εναλάτωση (Εικόνα 1.3.). Το φαινόμενο αυτό εξηγείται με τη θεωρία των Debye-Hückel και αφορά τις μη ειδικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φορτίων των βιομορίων και των ιόντων που βρίσκονται στο διάλυμα. Το αντίθετο της εναλάτωσης είναι η ελάτωση της διαλυτότητας των βιομορίων όταν ελαττώνεται η συγκέντρωση ιόντων αλατιού σε χαμηλές συγκεντρώσεις αλατιών.

##### 1.3.1.2. Εξαλάτωση (1,12).

Στα πυκνά ηλεκτρολυτικά διαλύματα η διαλυτότητα των βιομορίων ελαττώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων στο διάλυμα. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται εξαλάτωση (Εικόνα 1.3.). Στην περίπτωση αυτή τα βιομόρια συμπεριφέρονται σαν ουδέτερα δίπολα και διέπονται από τον υδροφοβικό και πολικό τους χαρακτήρα. Το φαινόμενο αυτό περιγράφεται από την εμπειρική γραμμική εξίσωση των Cohn-Green 1.6.

$$\log S = \beta - k_0 I \quad 1.6.$$

I είναι η ιοντική ισχύ και υπολογίζεται από τις συγκεντρώσεις και τα σθένος όλων των ιόντων που περιέχονται στο διάλυμα από τον τύπο 1.7. S είναι η διαλυτότητα ενός βιομορίου.  $\beta$  είναι σταθερά που εξαρτάται από το pH και τη θερμοκρασία και ισοδύναμα με  $\log S_0$  για την οριακή κατάσταση όπου  $I=0$ ,  $S_0=S_w$  η διαλυτότητα του βιομορίου στο νερό.  $k_0$  είναι η σταθερά της εξαλάτωσης και εξαρτάται από το pH, τη θερμοκρασία αλλά και από τη φύση των ιόντων. Η ιοντική ισχύ ενός διαλύματος περιέχεται στον νόμο των Debye-Hückel και αποτελεί μέρος της σταθεράς  $\kappa^{-1}$  του τύπου 1.2.

$$I = 1/2 \sum_i (m_i z_i^2 e_0^2) \quad 1.7.$$

$m_i$  είναι η συγκέντρωση και  $z_i$  είναι το σθένος κάθε τύπου ιόντων που περιέχονται στο διάλυμα.

### 1.3.1.3. Η γενική εξίσωση του Green. (1,12)

Η μεταβολή της διαλυτότητας ενός βιομορίου σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση των ιόντων του αλατιού στο διάλυμα προσεγγίζεται από τη γενική εξίσωση του Green 1.8.

$$\log S = \log S_C + k_1 \sqrt{I} - k_0 I \quad 1.8.$$

Όπου  $k_1$  και  $k_0$  είναι οι σταθερές εναλάτωσης και εξαλάτωσης αντίστοιχα.  $S_C = S_w$  είναι η διαλυτότητα του βιομορίου στο καθαρό νερό.  $I$  είναι η ιοντική ισχύ του διαλύματος. Στην εξίσωση αυτή η συνεισφορά της εναλάτωσης προσεγγίζεται από τον απλουστευμένο όρο  $k_1 (I)^{1/2}$ , ενώ η συνεισφορά της εξαλάτωσης από τον όρο  $-k_0 I$ .

Στη εξίσωση αυτή εμφανίζεται τόσο η συμβολή των ηλεκτροστατικών (Salting-in) όσο και των υδρόφοβων (Salting-out) αλληλεπιδράσεων (Εικόνα 1.3.).

Παρότι η εξίσωση 1.8. έχει αποδειχθεί χρήσιμη για την εξήγηση της διαφορικής διαλυτότητας των βιομορίων, στα πειραματικά δεδομένα παρατηρείται συχνά ότι η διαλυτότητα δεν είναι γραμμική συνάρτηση της συγκέντρωσης του αλατιού.

### 1.3.2. Διαλυτότητα βιομορίων σε οργανικά διαλύματα. (1,12)

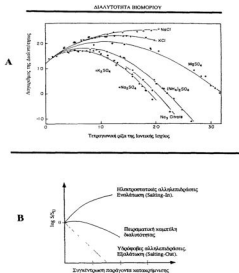
Η διαλυτότητα των βιομορίων ελαττώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης των οργανικών διαλυτών στο διάλυμα.

Ο τύπος 1.9. εκφράζει την εξάρτηση της διαλυτότητας από τη μεταβολή της διηλεκτρικής σταθεράς του διαλύματος εξαιτίας της παρουσίας του οργανικού διαλύτη.

$$\log (S_{CO} / S_w) = (A / RT) (1 / \epsilon_w - 1 / \epsilon_{CO}) \quad 1.9.$$

$S_{CO}$  η διαλυτότητα του βιομορίου παρουσία συγκεκριμένης συγκέντρωσης οργανικού διαλύτη,  $S_w$  η διαλυτότητα του βιομορίου στο νερό,  $\epsilon_{CO}$  η διηλεκτρική σταθερά του διαλύματος παρουσία οργανικού διαλύτη,  $\epsilon_w$  η διηλεκτρική σταθερά του νερού,  $R$  η παγκόσμια σταθερά των αερίων,  $T$  η θερμοκρασία και  $A$  μία σταθερά.

Η διαλυτότητα των βιομορίων είναι ανάλογη της διηλεκτρικής σταθεράς ενός διαλύματος. Με την προσθήκη οργανικών διαλυτών στο διάλυμα, η διηλεκτρική σταθερά του διαλύματος ελαττώνεται και κατά συνέπεια ελαττώνεται και η διαλυτότητα των βιομορίων.



**Εικόνα 1.3.** (A) Πειραματική καμπύλη διαλυτότητας της καρβοξυαμινοσφαιρίνης για διάφορους ηλεκτρολύτες στους 25 βαθμούς Κελσίου. (12) (B) Συνδυασμός των ηλεκτροστατικών και υδροφοβικών επιδράσεων στη διαλυτότητα  $S$ , κανονικοποιημένη ως προς την διαλυτότητα  $S_0=S_w$  για το καθαρό νερό, όπως προβλέπεται από τον τύπο 1.8. (1)

### **1.3.3. Διαλυτότητα βιομορίων σε διαλύματα PEG (PolyEthylene Glycol). (1,11,12)**

Η διαλυτότητα των βιομορίων ελαττώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του PEG στο διάλυμα. Διάφορες απόψεις έχουν κατά καιρούς ληφθεί για τη δράση του PEG. Αρχικά θεωρήθηκε ότι το PEG δρα σαν αλάτι και ότι εξαλατώνει τα βιομόρια. Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες εκτιμήσεις, το PEG θεωρείται ότι δρα τόσο σαν οργανικός διαλύτης όσο και σαν αλάτι. Επιπλέον πιστεύεται ότι, στη δράση του PEG συντελεί και η μείωση του ωφέλιμου όγκου του διαλύτη που προκαλείται εξαιτίας της προσθήκης του PEG στο διάλυμα.

## **1.4. Εφαρμογές της διαφορεικής διαλυτότητας των βιομορίων.**

### **1.4.1. Κλασμάτωση βιομορίων με κατακρήμνιση. (11,12,14-19)**

Από τις γνωστότερες εφαρμογές της διαφορεικής διαλυτότητας των βιομορίων είναι η κλασμάτωσή τους με κατακρήμνιση. Η μέθοδος της κλασμάτωσης με θειικό αμμώνιο και οργανικούς διαλύτες εφαρμόζονται συστηματικά στη χημεία και τη βιοχημεία. Η χρήση του PEG σαν μέσο κλασμάτωσης για κατακρήμνιση έχει εισαχθεί σχετικά πρόσφατα στο χώρο της βιοχημείας.

### **1.4.2. Κρυστάλλωση βιομορίων με σκοπό την απομόνωσή τους ή και την κρυσταλλογραφική μελέτη τους.**

Είναι γνωστό από τη χημεία ότι η κρυστάλλωση αποτελεί μέθοδο εμπλουτισμού του ιζήματος στο επιθυμητό προϊόν. Επαναληπτικές κρυσταλλώσεις ενός μορίου οδηγούν σε μεγάλο βαθμό καθαρότητας του μορίου αυτού.

Η κρυστάλλωση αποτελεί το πρωταρχικό βήμα στην κρυσταλλογραφία. Για τη δομική μελέτη των μορίων με τη μέθοδο της περιθλάσης ακτίνων X το πρωταρχικό αν όχι και το σημαντικότερο βήμα είναι η κρυστάλλωση του μορίου.

## 1.5. Αλληλεπιδράσεις.

### 1.5.1. Αλληλεπιδράσεις βιομορίων στη στερεή φάση του ιζήματος και των κρυστάλλων.

Τόσο η κατακρήμνιση όσο και η κρυστάλλωση μορίων συνεπάγεται αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων της στερεάς φάσης. Η κρυστάλλωση αποτελεί ειδική περίπτωση κατακρήμνισης. Τα μόρια που κατακρήμνίζονται αλληλεπιδρούν μεταξύ τους δημιουργώντας μεγαλύτερα συσσωματώματα. Τα συσσωματώματα αυτά όταν γίνουν αρκετά μεγάλα δεν είναι πλέον δυνατό να συγκρατηθούν από τον διαλύτη και σαν συνέπεια αποχωρίζονται από την υγρή φάση και δημιουργούν ιζήματα. Η κατακρήμνιση γενικότερα δεν απαιτεί αλληλεπίδραση μεταξύ ομοειδών προομιμάτων. Διαφορετικά μόρια μπορούν να συμμετέχουν στην άτακτη οργάνωση σε συσσωματώματα που δημιουργούν το ιζημα.

Στην περίπτωση της κρυστάλλωσης οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων είναι συγκεκριμένες και επαναλαμβανόμενες στο χώρο. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι γνωστές σαν κρυσταλλικές επαφές. Τα μόρια τοποθετούνται στο κρυσταλλικό πλέγμα με απόλυτη συμμετρία. Η κρυστάλλωση αποτελεί αλληλεπίδραση μεταξύ ταυτόσημων μορίων ή ταυτόσημων συμπλεγμάτων μορίων.

### 1.5.2. Αλληλεπίδραση βιομορίων με τη στερεή φάση των χρωματογραφικών προσροφητών. (20-28)

Στην χρωματογραφία προσροφητών υγρής φάσης, τα βιομόρια αποχωρίζονται από την υγρή φάση του διαλύματος και προσαρτώνται στη στερεά φάση των χρωματογραφικών υλικών, ανάλογα με τις εννοούμενες από το υπόστρωμα ως προς το διάλυμα αλληλεπιδράσεις.

Στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής χρησιμοποιούνται οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Όσα μόρια σε ένα διάλυμα εμφανίζουν φορτία προσδένονται σε υποστρώματα ιοντοανταλλακτών. Για την έλωση των μορίων αυτών από τους ιοντοανταλλάκτες χρειάζεται να ανταγωνιστεί το διάλυμα με το υπόστρωμα ως προς την ιοντική ισχύ. Στις χρωματογραφίες ιοντοανταλλαγής χρησιμοποιείται το φαινόμενο της εναλάτωσης.

Στη χρωματογραφία υδροφοβικότητας χρησιμοποιούνται οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Όσα μόρια σε ένα διάλυμα εμφανίζουν υδρόφοβες ιδιότητες προσδένονται σε υδροφοβικά υποστρώματα. Οι υδρόφοβες ιδιότητες ενός μορίου εντείνονται σε διαλύματα μεγάλης συέντρωσης αλατιών. Η έλωση των μορίων αυτών από τα υδρόφοβα υποστρώματα γίνεται με ελάττωση της ιοντικής ισχύος στο διάλυμα ή με την προσθήκη οργανικών διαλυτών. Στη χρωματογραφία υδροφοβικότητας χρησιμοποιείται το φαινόμενο της εξαλάτωσης.

## 1.6. Κρυστάλλωση βιομορίων. (1,11,12,29-61)

### 1.6.1. Ειδική περίπτωση κατακρήμνισης. Ομοιογένεια. Καθαρότητα. (1,11,12,29-41)

Όπως έχουμε προαναφέρει η κρυστάλλωση είναι υποσύνολο της κατακρήμνισης. Οι αλληλεπιδράσεις που κρατούν τα βιομόρια στο κρυσταλλικό πλέγμα ονομάζονται κρυσταλλικές επαφές και είναι ίδιες σε κάθε οργανωμένη βασική μονάδα μορίων που περιέχεται στη στοιχειώδη κυψελίδα του κρυσταλλικού πλέγματος.

Το κρυσταλλικό πλέγμα προϋποθέτει επαναλήψεις όμοιων δομικών μονάδων. Άρα ανομοιογενή δείγματα βιομορίων δεν μπορούν να δημιουργήσουν κρυσταλλικά πλέγματα και να κρυσταλλώσουν. Η καθαρότητα του δείγματος βιομορίων που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα κρυστάλλωσης απαιτείται να είναι η μεγαλύτερη δυνατή. Η ύπαρξη ανομοιογένειας λόγω βιοχημικών τροποποιήσεων σε ένα δείγμα μορίων δημιουργεί σοβαρά προβλήματα στην κρυστάλλωση. Η ανομοιογένεια αυτή μπορεί να προέρχεται από μερικές υδρολύσεις (πρωτεόλυση), από μερικές αναγωγές ή οξειδώσεις και από μερικές τροποποιήσεις (φωσφορυλίωση, γλυκοσυλίωση). Βιομόρια που παρουσιάζουν εμετάβλητη δομή αποτελούν ανομοιογενή δείγματα. Βιομοριακά δείγματα που παρουσιάζουν ανομοιογένειες δεν κρυσταλλώνουν ή κρυσταλλώνουν δύσκολα.

### 1.6.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση. (11,29-31,33-39)

Τόσο η δημιουργία πυρήνων κρυστάλλωσης όσο και το μέγεθος των κρυστάλλων εξαρτάται από πολλές παραμέτρους. Οι κυριότερες από αυτές είναι η συγκέντρωση και η ομοιογένεια του βιομορίου στο διάλυμα, η φύση των αλατιών, των οργανικών διαλυτών και των άλλων μορίων που χρησιμοποιούνται, η θερμοκρασία και το pH του διαλύματος. Στον πίνακα 1.2. γίνεται λεπτομερέστερη παράθεση των παραγόντων αυτών.

### 1.6.3. Διαγράμματα διαλυτότητας. (1,11-13,34,42-50)

Διαγράμματα διαλυτότητας ονομάζονται τα διαγράμματα που περιγράφουν τη διαλυτότητα ενός βιομορίου σαν εξάρτηση της συγκέντρωσης του βιομορίου, της συγκέντρωσης των παραγόντων κατακρήμνισης, της θερμοκρασίας, του pH και άλλων μεταβλητών. Η κρυστάλλωση είναι μία πολυπαραμετρική διαδικασία. Τα διαγράμματα διαλυτότητας είναι ιδιοχαρακτηριστικά για κάθε βιομόριο. Η γνώση των διαγραμμάτων αυτών είναι ένα σημαντικό βήμα για την κατάστρωση των πειραμάτων κρυστάλλωσης. Η πλήρης διερεύνηση των διαγραμμάτων διαλυτότητας ενός βιομορίου απαιτεί χρόνο αλλά κυρίως μεγάλες ποσότητες βιομορίου.

Απλούστευση στον έλεγχο της διαλυτότητας ενός βιομορίου αποτελεί η μέθοδος της μερικής παραμετρικής σχεδίασης (fractional factorial design) (48).

### 1.6.3.1. Πυρήνες κρυστάλλωσης. Ζώνη πυρήνωσης. (1,11,42)

Πυρήνες κρυστάλλωσης ονομάζονται οι μικρότατες οργανωμένες μορφές βιομοριακών συσσωματωμάτων. Ζώνη πυρήνωσης (nucleation zone) ονομάζεται στην κρυσταλλογένεση η περιοχή των διαγραμμάτων διαλυτότητας στην οποία δημιουργούνται πυρήνες κρυστάλλων. Η περιοχή αυτή είναι υποσύνολο της περιοχής καταρρήμισης. Η εύρεση της ζώνης πυρήνωσης αποτελεί τον πρωταρχικό σκοπό των πειραμάτων κρυστάλλωσης.

### 1.6.3.2. Μεγάλομα κρυστάλλων. Μετασταθερή ζώνη. (1,11,42)

Μετασταθερή ζώνη (metastable zone) ονομάζεται η περιοχή των διαγραμμάτων διαλυτότητας στην οποία δεν δημιουργούνται πυρήνες κρυστάλλωσης, αλλά οι πυρήνες κρυστάλλωσης που προϋπάρχουν μπορούν να συνεχίζουν να μεγαλώνουν.



**Εικόνα 1.4.** Σχηματική αναπαράσταση ενός δυοδιάστατου διαγράμματος διαλυτότητας. Στους δύο άξονες x και y μεταβάλλονται αντίστοιχα οι συγκεντρώσεις του ηλεκτρολύτη και του βιομορίου. (1)

**Ενδογενείς φυσικοχημικές παράμετροι:**

Υπεροξορισμός (συνένανση βιομορίων και παραγόντων κατακρήμνισης).

Θερμοκρασία, pH (μεταβολές απέναντι των περιμέτρων).

Χρόνος (ρυθμοί εξοξοφόρησης και μεγετώματος).

Ιοντική ισχύς και καθαρότητα των χημικών (φύση των παραγόντων κατακρήμνισης, ρυθμιστικά διαλύματα, επιπρόσθετες χημικές ουσίες).

Διάχυση και μεταφορά (πρωτόματα, μορφοπαράτητα).

Όγκος και γεωμετρία του δείγματος και των πειραματικών συσκευιών (επιφάνεια των συσκευιών κρυστάλλωσης).

Στερεά σωματίδια, αλληλεπιδράσεις με τα τοιχώματα και με τις διάμεσες επιφάνειες (ομοιογενής, ετερογενής, επαταξιακή πύκνωση).

Φαινόμενα εξαρτημένα από την πυκνότητα ή το ιξώδες (διαφορές μεταξύ κρυστάλλου και μητρικού υγρού).

Πίεση, ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία.

Δονήσεις και ήχος (ακουστικά κύματα).

Σειρά των γεγονότων, επαναληψιμότητα (εξεινητής ή ροιπότη).

**Βιοχημικές και βιοφυσικές παράμετροι:**

Ευστοθία της δομής του βιομορίου σε φυσικές παραμέτρους (θερμοκρασία, pH, ιοντική ισχύς, διαλύτες,...).

Δέσμευση ουσιών με αλληλεπιδράσεις συγγένειας (υποστρώματα, συμπαραγόντες, μεταλλικά ιόντα, άλλα ιόντα,...).

Ειδιές επιπρόσθετες ουσίες (αναγωγικές ουσίες, μη ιοντικά απορρυπαντικά, πολυαμίνες,...).

Ιδιότητες των βιομορίων (οξειδωσιμότητα, υδροφοβικότητα, υδροφιλικότητα, πολυηλεκτρολυτική φύση των νοσιλευμένων οβίων,...).

Γήρανση του δείγματος (οξειδοαναγωγικές μεταβολές, αποδιάταξη, αποικοδόμηση).

**Βιολογικές παράμετροι:**

Τα περισσότερα βιομόρια επαντώνται σε πολύ μικρές ποσότητες στη φύση.

Βιολογικές πηγές και φυσιολογική κατάσταση των οργανισμών ή των κυττάρων που περιέχουν τα βιομόρια (θερμόφιλοι, ψυχρόφιλοι, αλατόφιλοι, μεσόφιλοι οργανισμοί, στατική ή αναπτυσσόμενη φύση,...).

Βετησιακές μολύνσεις.

**Καθαρότητα των μακρομορίων:**

Μακρομοριακές επιμολύνσεις (επιμολύνσεις με άλλα μακρομόρια ή μικρά μόρια).

(Μικροπυρογένεια στην αλληλοσχημική σύσπασση από πρωτεάσες ή νοσιλευσες-τα κλάσματα των μακρομορίων μπορεί να κρυσταλλώνουν καλύτερα-, μεριές ή ετερογενείς μεταμεταφαστικές τροποποιήσεις,...).

Δομικές (μικροπυρογένειες (εγκίνητες δομικές υπομονάδες, βαθμός και τρόπος πολυμερισμού, συσσωματώματα, αποδιάταξη,...).

Επίδραση παρτίδας ( δύο παρτίδες δεν είναι αλδιδες!).

**Πίνακας 1.2.** Παράμετροι που επηρεάζουν τη διαλυτότητα και την κρυστάλλωση των βιομορίων. (37)



#### **1.6.4. Σχεδιασμός κρυστάλλωσης.**

Για την κρυσταλλογραφική μελέτη ενός βιομορίου απαιτούνται μεγάλοι και καλοσχηματισμένοι κρυστάλλοι. Για να επιτευχθεί κάτι τέτοιο πρέπει σε πρώτη φάση να δημιουργηθούν πυρήνες κρυστάλλωσης και σε δεύτερη φάση οι πυρήνες αυτοί να αφεθούν στην μετασταθερή ζώνη για να μεγαλώσουν. Η δημιουργία πολλών πυρήνων κρυστάλλωσης δεν ευνοεί τη δημιουργία μεγάλων και καλοσχηματισμένων κρυστάλλων. Πολλοί πυρήνες κρυστάλλωσης συνεπάγονται μοίρασμα του προσφερόμενου βιομορίου σε μεγάλο αριθμό κρυστάλλων που οδηγεί σε κρυστάλλους μικρότερου όγκου. Η αύξηση του όγκου των κρυστάλλων σε ένα διάλυμα με πολλούς πυρήνες κρυστάλλωσης οδηγεί σε επικαλύψεις κρυσταλλικών πλεγμάτων και άρα σε κακοσχηματισμένους κρυστάλλους.

#### **1.6.5. Σχεδιασμός κρυστάλλωσης σε ένα βήμα.**

Για να δημιουργήσουμε κρυστάλλους με ένα πειραματικό βήμα θα πρέπει να ικανοποιήσουμε με ένα πείραμα και τη δημιουργία πυρήνων κρυστάλλωσης και το μέγεθος των πυρήνων αυτών. Δηλαδή το διάλυμα του βιομορίου θα πρέπει από τη διαλυτή φάση να περάσει στην ζώνη πυρήνωσης για να δημιουργηθούν πυρήνες κρυστάλλωσης. Η παραμονή του διαλύματος στην ζώνη πυρήνωσης πρέπει να είναι σύντομη για να μη δημιουργηθούν πολλοί πυρήνες κρυστάλλωσης. Στη συνέχεια, το διάλυμα πρέπει να μεταπέσει στη μετασταθερή ζώνη, όπου οι πυρήνες θα συνεχίσουν να μεγαλώνουν για να δώσουν χρήσιμους κρυστάλλους.

#### **1.6.6. Σχεδιασμός κρυστάλλωσης σε δύο βήματα. Ενπυρήνωση. (51-55)**

Η κρυστάλλωση είναι διαδικασία που απαιτεί δύο επιμέρους διαδικασίες, τη δημιουργία πυρήνων και τη διαδικασία του μεγάλωματος των πυρήνων. Είναι μάλλον φανερό ότι η υλοποίηση των δύο διαδικασιών σε δύο επιμέρους πειράματα είναι πιο εύκολη, πιο ελεγχόμενη και μπορεί να δώσει καλύτερα αποτελέσματα, δηλαδή μεγάλους και καλοσχηματισμένους κρυστάλλους.

Στη διαδικασία των δύο βημάτων με το πρώτο βήμα επιδιώκεται η μεταφορά ενός διαλύματος του βιομορίου από τη διαλυτή φάση στη ζώνη πυρήνωσης. Στη διαδικασία αυτή δημιουργείται μεγάλος αριθμός πυρήνων. Στο δεύτερο βήμα, που ονομάζεται ενπυρήνωση (seeding), πυρήνες από το πρώτο βήμα επιλέγονται και εμβαιβίζονται σε διάλυμα βιομορίου το οποίο εκ των προτέρων βρίσκεται στη μετασταθερή περιοχή. Με τη διαδικασία αυτή μπορούμε να επιλέξουμε το μέγεθος συγκεκριμένου αριθμού και συγκεκριμένου τύπου κρυστάλλων. Η μέθοδος της ενπυρήνωσης μπορεί να χωριστεί με βάση το μέγεθος πυρήνων που χρησιμοποιούνται στην μικροενπυρήνωση και στην μακροενπυρήνωση.

### **1.6.7. Διατήρηση συνθηκών μετασταθερής ζώνης.**

Όσο οι κρύσταλλοι μεγαλώνουν τόσο η συγκέντρωση των διαλυμένων βιομορίων μειώνεται. Σαν συνέπεια η μετασταθερή ζώνη μετατοπίζεται, καθόσον εξαρτάται από την συγκέντρωση του βιομορίου στο διάλυμα. Άρα στα πειράματα κρυστάλλωσης ένα από τα κύρια προβλήματα είναι η δημιουργία συνθηκών συνεχούς παρακολούθησης της μετασταθερής ζώνης.

### **1.6.8. Τεχνικές κρυστάλλωσης. (11,29,50,56-61)**

Για την κρυστάλλωση των βιομορίων έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές. Οι βασικότερες από αυτές παρουσιάζονται παρακάτω.

#### **1.6.8.1. Ολική ανάμιξη (Batch).**

Το βιομόριο διαλύεται σε ένα συγκεκριμένο διάλυμα, όπου μπορούν να δημιουργηθούν και να μεγαλώσουν κρύσταλλοι.

#### **1.6.8.2. Εξάτμιση ή συμπύκνωση (evaporation or concentration).**

Το διάλυμα του βιομορίου συμπυκνώνεται με εξάτμιση ή άλλες μεθόδους συμπύκνωσης.

#### **1.6.8.3. Διαπίδωση (dialysis).**

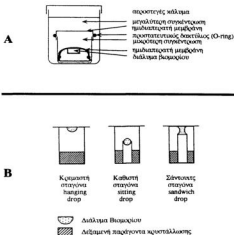
Διάλυμα βιομορίου τοποθετείται σε ημιδιαπερατές μεμβράνες και υποβάλλεται με διαπίδωση σε μεταβολές της συγκέντρωσης διαφόρων παραγόντων που ευνοούν την κρυστάλλωση. Τα πειράματα διαπίδωσης μπορεί να είναι μικρού ή μεγάλου όγκου.

#### **1.6.8.4. Διάχυση ατμών (vapor diffusion).**

Η τεχνική αυτή είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη και στηρίζεται στο φαινόμενο της τάσης ατμών. Σε ένα αεροστεγές κλειστό σύστημα δύο διαλύματα εξισορροπούν την τάση ατμών τους μέσω διάχυσης. Αν το ένα διάλυμα που περιέχει το βιομόριο είναι σημαντικά μικρότερου όγκου από το άλλο διάλυμα που ονομάζεται δεξαμενή τότε οι μεταβολές της συγκέντρωσης των διαφόρων ουσιών στο διάλυμα του βιομορίου εξαρτώνται άμεσα από τις συγκεντρώσεις των διαφόρων ουσιών της δεξαμενής. Αν το διάλυμα του βιομορίου συγκρατείται με δυνάμεις συνάφειας από το καπάκι του κλειστού συστήματος τότε έχουμε τα λεγόμενα πειράματα κρεμαστής σταγόνας (hanging-drop). Αν το διάλυμα του βιομορίου στηρίζεται σε ειδική κοιλότητα στο πάτωμα του κλειστού συστήματος τότε έχουμε τα λεγόμενα πειράματα καθιστής σταγόνας (sitting-drop).

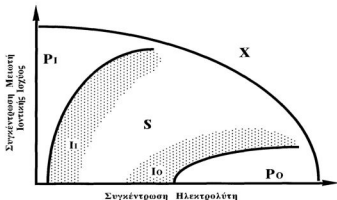
Ο μεγαλύτερος όγκος διαλύματος βιομορίου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στα πειράματα κρεμαστής σταγόνας είναι 20 μλ.

Στα πειράματα διάχυσης ατμών οι σταγόνες των βιομορίων μπορούν να βρίσκονται με τη μορφή πριτσώματος παρουσία αγωγόξης ή πυριτίου (59).



**Εικόνα 1.6.** (Α) Σχηματική αναπαράσταση πειραματικής διάταξης κρυστάλλωσης για την τεχνική της διαπίδωσης (50). (Β) Σχηματική αναπαράσταση πειραματικής διάταξης κρυστάλλωσης για την τεχνική της διάχυσης ατμών. (50)

Οι καμπύλες και οι ζώνες στο διάγραμμα της εικόνας 2.5. έχουν δημιουργηθεί αυθαίρετα, με σκοπό την ποιοτική αναπαράσταση της συμπεριφοράς ενός υποθετικού βιομορίου.



**Εικόνα 2.5.** Γενικευμένο σχηματικό διάγραμμα κατακρήμνισης και αλληλεπιδράσεων ενός βιομορίου σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη και του μειωτή ιοντικής ισχύος στο διάλυμα. Η συγκέντρωση του βιομορίου θεωρείται σταθερή  $C_b$ . Σταθερές θεωρούνται και όλες οι άλλες παράμετροι που επηρεάζουν τη διαλυτότητα των βιομορίων.

**S** (Soluble) ορίζεται στο διάγραμμα η περιοχή όπου το βιομόριο είναι πλήρως διαλυτό.

**P1** και **P0** (Precipitation) ορίζονται στο διάγραμμα οι περιοχές όπου το βιομόριο δεν είναι πλήρως διαλυτό. Ειδικότερα σαν **P1** και **P0** ορίζονται οι περιοχές κατακρήμνισης στην περίπτωση της γενικευμένης εναλάτωσης (Salting In) και της γενικευμένης εξαλάτωσης (Salting Out) αντίστοιχα. Οι δύο καμπύλες που χωρίζουν τις περιοχές **P1** και **P0** από την περιοχή **S** είναι οι συνθήκες απειροστής κατακρήμνισης του βιομορίου.

**I1** και **I0** (Interaction) ορίζονται οι περιοχές στη διαλυτή περιοχή **S** όπου το βιομόριο αλληλεπιδρά με τα στερεά υποστρώματα ιοντοανταλλακτικής και υδροφοβικής χρωματογραφίας αντίστοιχα. Στην περιοχή **I1** υπερισχύουν οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ενώ στην περιοχή **I0** οι πολικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

**X** είναι η περιοχή για την οποία δεν υπάρχει αρκετή οργανωμένη γνώση. Στην περιοχή αυτή ανήκουν οι καταστάσεις των διαραικίων συστημάτων.

## 2.5. Ζώνη πυρήνωσης και μετασταθερή ζώνη στο γενικευμένο διάγραμμα.

### 2.5.1. Ζώνη πυρήνωσης.

Οι ζώνες πυρήνωσης (Nucleation) στις δύο περιοχές P1 και P0 του διαγράμματος παριστάνονται με τα σύμβολα N1 και N0 αντίστοιχα (Εικόνα 2.6.). Η τοποθέτηση των ζωνών αυτών στο διάγραμμα είναι αυθαίρετη. Η ζώνη πυρήνωσης δεν εμφανίζεται σε κάθε συνδυασμό μειωτών και αλατιών, και δεν είναι αναγκαίο να υπάρχει και στις δύο περιοχές κατακρήμνισης P1 και P0.

### 2.5.2. Μετασταθερή ζώνη.

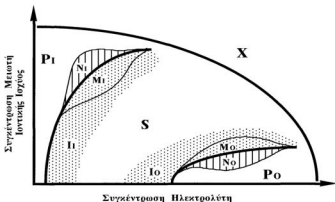
Οι μετασταθερές ζώνες (Metastable) παριστάνονται με τα σύμβολα M1 και M0 αντίστοιχα (Εικόνα 2.6.). Είναι υποσύνολα των περιοχών I1 και I0 και γειτονεύουν με τις ζώνες πυρήνωσης N1 και N0 αντίστοιχα. Η τοποθέτηση των ζωνών αυτών στο διάγραμμα είναι αυθαίρετη. Η μετασταθερή ζώνη δεν εμφανίζεται σε κάθε συνδυασμό μειωτών και αλατιών, και δεν είναι αναγκαίο να υπάρχει και στις δύο περιοχές I1 και I0.

### 2.5.3. Προβλέψεις του γενικευμένου διαγράμματος για την κρυστάλλωση και την κατακρήμνιση. Ιδιοσημασιολογική συμπεριφορά.

Από το γενικευμένο διάγραμμα προβλέπονται οι ακόλουθες ιδιότητες για την κρυστάλλωση και την κατακρήμνιση.

Αν σε πειράματα κρυστάλλωσης ή κατακρήμνισης με οργανικούς διαλύτες ή PEG αυξηθεί η συγκέντρωση του αλατιού στο διάλυμα τότε χρειάζεται μεγαλύτερη συγκέντρωση οργανικών διαλυτών ή PEG για να επιτευχθεί κρυστάλλωση ή κατακρήμνιση. *Οι κρυστάλλώσεις με οργανικούς διαλύτες ή PEG είναι γενικευμένα πειράματα εναλάτωσης.* Μπορούμε λοιπόν να χρησιμοποιήσουμε την γνωστή διαδικασία της ελάτωσης της συγκέντρωσης αλατιού για την δημιουργία κρυστάλλων σε πειράματα σταθερής συγκέντρωσης οργανικών διαλυτών ή PEG.

Αν σε πειράματα κρυστάλλωσης ή κατακρήμνισης με μεγάλη συγκέντρωση αλατιού, εξαλάτωση, αυξηθεί η συγκέντρωση των μειωτών ιοντικής ισχύος στο διάλυμα, τότε χρειάζεται μεγαλύτερη συγκέντρωση αλατιού για να επιτευχθεί κρυστάλλωση ή κατακρήμνιση. Κρυστάλλωση στην περιοχή της εξαλάτωσης μπορεί να γίνει αν, διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του αλατιού ελαττώνεται σταδιακά η αρχική συγκέντρωση ενός μειωτή που προϋπάρχει στο διάλυμα.



**Εικόνα 2.6.** Γενικευμένο σχηματικό διάγραμμα κατακρήμνισης, αλληλεπιδράσεων και κριστάλλωσης ενός βιομορίου σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη και του μειωτή ιοντικής ισχύος στο διάλυμα. Η συγκέντρωση του βιομορίου θεωρείται σταθερή  $C_b$ . Σταθερές, επίσης, θεωρούνται και όλες οι άλλες παράμετροι που επηρεάζουν τη διαλυτότητα των βιομορίων.

**S (Soluble)** ορίζεται στο διάγραμμα η περιοχή όπου το βιομόριο είναι πλήρως διαλυτό.

**P1** και **P0 (Precipitation)** ορίζονται στο διάγραμμα οι περιοχές όπου το βιομόριο δεν είναι πλήρως διαλυτό. Ειδικότερα σαν P1 και P0 ορίζονται οι περιοχές κατακρήμνισης στην περίπτωση της γενικευμένης εναλάτωσης (Salting In) και της γενικευμένης εξαλάτωσης (Salting Out) αντίστοιχα. Οι δύο παχιές καμπύλες που χωρίζουν τις περιοχές P1 και P0 από την περιοχή S είναι οι συνθήκες απειροστής κατακρήμνισης του βιομορίου.

**I1** και **I0 (Interaction)** ορίζονται οι περιοχές στη διαλυτή περιοχή S όπου το βιομόριο αλληλεπιδρά με τα στερεά υποστρώματα ιοντοανταλλακτικής και υδροφοβικής χρωματογραφίας αντίστοιχα. Στην περιοχή I1 υπεριοχθούν οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ενώ στην περιοχή I0 οι πολικές και υδροφοβές αλληλεπιδράσεις.

**N1** και **N0 (Nucleation)** ορίζονται οι ζώνες πυρήνωσης στις περιοχές κατακρήμνισης P1 και P0 αντίστοιχα.

**M1** και **M0 (Metastable)** ορίζονται οι μετασταθερές ζώνες στις περιοχές αλληλεπιδράσης I1 και I0 αντίστοιχα.

**X** είναι η περιοχή για την οποία δεν υπάρχει αρκετή οργανωμένη γνώση. Στην περιοχή αυτή ανήκουν οι καταστάσεις των διερασιών συστημάτων.

Οι περιοχές Ni, No, Mi και Mo είναι ιδιοχαρακτηριστικές κάθε βιομορίου. Το γενικό διάγραμμα δεν περιγράφει την κάθε ειδική περίπτωση αλλά σκιαγραφεί τις γενικές τάσεις. Η γνώση της ιδιοχαρακτηριστικής συμπεριφοράς ενός βιομορίου δίνει τη δυνατότητα σχεδιασμού αποδοτικότερων πειραμάτων κρυστάλλωσης ή κατακρήμνισης.

**Οι καμπύλες και οι ζώνες στο διάγραμμα της εικόνας 2.6. έχουν δημιουργηθεί αυθαίρετα, με σκοπό την ποιοτική αναπαράσταση της συμπεριφοράς ενός υποθετικού βιομορίου.**

Οι κύριες ιδιότητες που δημιουργούν τα κρυσταλλικά πλέγματα στην περιοχή της γενικευμένης εξαλάτωσης και της γενικευμένης εναλάτωσης είναι διαφορετικής φύσης. Είναι λοιπόν δύσκολο να μεταφερθούν κρύσταλλοι από τη μία περιοχή στην άλλη χωρίς να καταστραφούν. Ο μόνος τρόπος να πετύχει κάτι τέτοιο είναι με σταδιακή μεταβολή των κρυσταλλικών επαφών από το ένα είδος στο άλλο. Αυτό μπορεί να γίνει κυρίως στις περιπτώσεις εκείνες, όπου οι κρυσταλλικές επαφές δεν είναι κατά απόλυτη πλειοψηφία του ενός ή του άλλου τύπου. Δυσκολότερο ακόμα είναι να μεγαλώσουν πυρήνες κρυστάλλων της μίας περιοχής στην άλλη.

## **2.6. Πόρισμα. Η κατακρήμνιση με μεταβολή του pH στην περιοχή της εναλάτωσης αναστέλλεται με αύξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη. Οξύνιση. (15)**

Η κατακρήμνιση που οφείλεται σε μεταβολές του pH παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης ηλεκτρολύτη μπορεί να ανασταλεί με αύξηση της αλατότητας. Η μεταβολή του pH μεταβάλλει την κατανομή των φορτίων στην επιφάνεια των βιομορίων. Η μεταβολή αυτή επιδρά στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βιομορίων. Η μεταβολή των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μπορεί να οδηγήσει σε πλεονεκτικότερες ελκτικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις οι οποίες οδηγούν στη δημιουργία μεγάλων συσσωματωμάτων και άρα στην κατακρήμνιση. Αύξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη στο διάλυμα αποτρέπει τη δημιουργία μεγάλων συσσωματωμάτων και άρα την κατακρήμνιση.

## **2.7. Έλεγχος του μοντέλου και εφαρμογές.**

Στα επόμενα δύο κεφάλαια θα παρουσιαστεί μία σειρά πειραματικών προσεγγίσεων, που σκοπό έχουν, αφενός να ελέγξουν την ορθότητα του μοντέλου της εικόνας 2.6., αφετέρου να εφαρμόσουν τις ιδιότητες του μοντέλου της εικόνας 2.6., τόσο στην περίπτωση της χρωματογραφίας όσο και στην περίπτωση της κρυστάλλωσης (υποσύνολο της κατακρήμνισης).

### **3. Χρωματογραφία, Εφαρμογές**

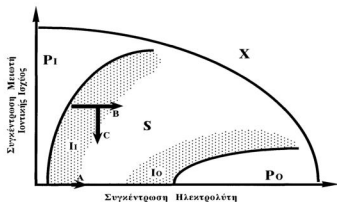


### 3.1. Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής.

#### 3.1.1. Προβλέψεις της γενικευμένης εναλάτωσης για την ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία (Εικόνα 3.1.).

Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής ανήκει στην περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης. Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2, προβλέπεται ότι η παρουσία μειωτών ιοντικής ισχύος καθυστερεί την έκλυση των βιομορίων από τα υλικά της ιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας. Δηλαδή παρουσία μειωτών χρειάζεται μεγαλύτερη συγκέντρωση αλατιού για την έκλυση των βιομορίων. Επίσης, παρουσία μειωτών, τα βιομόρια μπορούν να παραμείνουν δεσμευμένα σε χρωματογραφικά υλικά ιοντοανταλλαγής, σε συγκεντρώσεις αλατιού ικανές να επιφέρουν έκλυση των βιομορίων απουσία μειωτών ιοντική ισχύος. Σαν αποτέλεσμα, η ελάττωση της συγκέντρωσης του μειωτή στις συνθήκες αυτές οδηγεί σε έκλυση.

Στα πειράματα που ακολουθούν θα ελέγξουμε τις προβλέψεις της γενικευμένης εναλάτωσης για τις περιπτώσεις της κατιοντοανταλλακτικής και ανιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας.



**Εικόνα 3.1.** Προβλέψεις για την ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία.

Η διαδρομή A αντιστοιχεί σε έκλυση ενός βιομορίου από ιοντοανταλλακτικό υπόστρωμα με αυξανόμενη συγκέντρωση αλατιού, απουσία μειωτή ιοντικής ισχύος.

Η διαδρομή B αντιστοιχεί σε έκλυση του βιομορίου από ιοντοανταλλακτικό υπόστρωμα με αυξανόμενη συγκέντρωση αλατιού, παρουσία μειωτή ιοντικής ισχύος. Περισσότερο αλάτι χρειάζεται για την έκλυση παρουσία του μειωτή ιοντικής ισχύος.

Η διαδρομή C αντιστοιχεί σε έκλυση του βιομορίου από ιοντοανταλλακτικό υπόστρωμα με ελαττωμένη συγκέντρωση μειωτή ιοντικής ισχύος παρουσία σταθερής συγκέντρωσης αλατιού.

### 3.1.2. Κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία. Μετατόπιση της έκλουσης της ριβονουκλεάσης Α σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλατιού.

Στα πειράματα για την κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκαν 10 ml χρωματογραφικού υλικού S Sepharose Fast Flow. Σαν πρωτεϊνικός μάρτυρας για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η ριβονουκλεάση Α. Περίπου 2mg πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν ανά πείραμα.

Στο πρώτο πείραμα το χρωματογραφικό υλικό εξισορροπείται με 20 mM Hepes pH 8,2 και 0 M NaCl (διάλυμα Α). Η πρωτεΐνη έχει διαλυτοποιηθεί στο διάλυμα Α. Φορτώνεται στο χρωματογραφικό υλικό και στη συνέχεια το υλικό πλένεται με 10 όγκους χρωματογραφικού υλικού με το διάλυμα Α. Τέλος στο χρωματογραφικό υλικό εφαρμόζεται διαβάθμιση αλατιού (10 όγκοι χρωματογραφικού υλικού). Για τη δημιουργία της διαβάθμισης χρησιμοποιείται σαν αρχικό διάλυμα το διάλυμα Α και σαν τελικό διάλυμα το διάλυμα Α+1M NaCl (Εικόνα 3.2. Καμπύλη Α.).

Στο δεύτερο πείραμα το χρωματογραφικό υλικό εξισορροπείται με 20 mM Hepes pH 8,2 και 0 M NaCl (διάλυμα Α). Η πρωτεΐνη έχει διαλυτοποιηθεί στο διάλυμα Α. Φορτώνεται στο χρωματογραφικό υλικό και στη συνέχεια το υλικό πλένεται με 10 όγκους χρωματογραφικού υλικού με διάλυμα 20 mM Hepes pH 8,2 και 20% w/v PEG 1000 (διάλυμα Β). Τέλος στο χρωματογραφικό υλικό εφαρμόζεται διαβάθμιση αλατιού (10 όγκοι χρωματογραφικού υλικού). Για τη δημιουργία της διαβάθμισης χρησιμοποιείται σαν αρχικό διάλυμα το διάλυμα Β και σαν τελικό διάλυμα το διάλυμα Β+1M NaCl (Εικόνα 3.2. Καμπύλη Β.).

Από την εικόνα 3.2. είναι φανερή η μετατόπιση της έκλουσης σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλατιού εξαιτίας της παρουσίας του μειωτή PEG 1000. Η καμπύλη Α της εικόνας 3.2. αντιστοιχεί στη διαδρομή Α της εικόνας 3.1. και η καμπύλη Β της εικόνας 3.2. αντιστοιχεί στη διαδρομή Β της εικόνας 3.1.

### 3.1.3. Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία. Μετατόπιση της έκλουσης της β λακτοσφαιρίνης σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλατιού.

Στα πειράματα για την ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκαν 10 ml χρωματογραφικού υλικού Q Sepharose Fast Flow. Σαν πρωτεϊνικός μάρτυρας για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η β λακτοσφαιρίνη. Περίπου 2mg β λακτοσφαιρίνης χρησιμοποιήθηκαν ανά πείραμα.

Στο πρώτο πείραμα με την β λακτοσφαιρίνη το χρωματογραφικό υλικό εξισορροπείται με 20 mM Bis-Tris pH 6,0 και 0 M NaCl (διάλυμα Α). Η πρωτεΐνη έχει διαλυτοποιηθεί στο διάλυμα Α. Φορτώνεται στο χρωματογραφικό υλικό και στη συνέχεια το υλικό πλένεται με 10 όγκους χρωματογραφικού υλικού με το διάλυμα Α. Τέλος στο χρωματογραφικό υλικό εφαρμόζεται διαβάθμιση αλατιού (10 όγκοι χρωματογραφικού υλικού). Για τη δημιουργία της διαβάθμισης χρησιμοποιείται

σαν αρχικό διάλυμα το διάλυμα Α και σαν τελικό διάλυμα το διάλυμα Α+1M NaCl (Εικόνα 3.3. Καμπύλη Α.).

Στο δεύτερο πείραμα με την β λακτοσφαιρίνη το χρωματογραφικό υλικό εξισορροπείται με 20 mM Bis-Tris pH 6,0 και 0 M NaCl (διάλυμα Α). Η πρωτεΐνη έχει διαλυτοποιηθεί στο διάλυμα Α. Φορτώνεται στο χρωματογραφικό υλικό και στη συνέχεια το υλικό πλένεται με 10 όγκους χρωματογραφικού υλικού με διάλυμα 20 mM Bis-Tris pH 6,0 και 15% w/v PEG 3350 (διάλυμα Β). Τέλος στο χρωματογραφικό υλικό εφαρμόζεται διαβάθμιση αλατιού (10 όγκοι χρωματογραφικού υλικού). Για τη δημιουργία της διαβάθμισης χρησιμοποιείται σαν αρχικό διάλυμα το διάλυμα Β και σαν τελικό διάλυμα το διάλυμα Β+1M NaCl (Εικόνα 3.3. Καμπύλη Β.).

Από την εικόνα 3.3. είναι φανερή η μετατόπιση της έκλουσης σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλατιού εξαιτίας της παρουσίας του μειωτή PEG 3350. Η καμπύλη Α της εικόνας 3.3. αντιστοιχεί στη διαδρομή Α της εικόνας 3.1. και η καμπύλη Β της εικόνας 3.3. αντιστοιχεί στη διαδρομή Β της εικόνας 3.1.

### **3.1.4. Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία. Μετατόπιση της έκλουσης της οβαλβουμίνης σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλατιού.**

Στα πειράματα για την ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκαν 10 ml χρωματογραφικού υλικού Q Sepharose Fast Flow. Σαν πρωτεϊνικός μάρτυρας για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η οβαλβουμίνη. Περίπου 2mg πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν ανά πείραμα.

Στο πρώτο πείραμα το χρωματογραφικό υλικό εξισορροπείται με 20 mM Bis-Tris pH 6,0 και 0 M NaCl (διάλυμα Α). Η πρωτεΐνη έχει διαλυτοποιηθεί στο διάλυμα Α. Φορτώνεται στο χρωματογραφικό υλικό και στη συνέχεια το υλικό πλένεται με 10 όγκους χρωματογραφικού υλικού με το διάλυμα Α. Τέλος στο χρωματογραφικό υλικό εφαρμόζεται διαβάθμιση αλατιού (10 όγκοι χρωματογραφικού υλικού). Για τη δημιουργία της διαβάθμισης χρησιμοποιείται σαν αρχικό διάλυμα το διάλυμα Α και σαν τελικό διάλυμα το διάλυμα Α+1M NaCl (Εικόνα 3.4. Καμπύλη Α.).

Στο δεύτερο πείραμα το χρωματογραφικό υλικό εξισορροπείται με 20 mM Bis-Tris pH 6,0 και 0 M NaCl (διάλυμα Α). Η πρωτεΐνη έχει διαλυτοποιηθεί στο διάλυμα Α. Φορτώνεται στο χρωματογραφικό υλικό και στη συνέχεια το υλικό πλένεται με 10 όγκους χρωματογραφικού υλικού με διάλυμα 20 mM Bis-Tris pH 6,0 και 10% w/v PEG 3350 (διάλυμα Β). Τέλος στο χρωματογραφικό υλικό εφαρμόζεται διαβάθμιση αλατιού (10 όγκοι χρωματογραφικού υλικού). Για τη δημιουργία της διαβάθμισης χρησιμοποιείται σαν αρχικό διάλυμα το διάλυμα Β και σαν τελικό διάλυμα το διάλυμα Β+1M NaCl (Εικόνα 3.4. Καμπύλη Β.).

Στο τρίτο πείραμα το χρωματογραφικό υλικό εξισορροπείται με 20 mM Bis-Tris pH 6,0 και 0 M NaCl (διάλυμα Α). Η πρωτεΐνη έχει διαλυτοποιηθεί στο διάλυμα Α.

Φορτώνεται στο χρωματογραφικό υλικό και στη συνέχεια το υλικό πλένεται με 10 όγκους χρωματογραφικού υλικού με διάλυμα 20 mM Bis-Tris pH 6,0 και 15% w/v PEG 3350 (διάλυμα Γ). Τέλος στο χρωματογραφικό υλικό εφαρμόζεται διαβάθμιση αλατιού (10 όγκοι χρωματογραφικού υλικού). Για τη δημιουργία της διαβάθμισης χρησιμοποιείται σαν αρχικό διάλυμα το διάλυμα Γ και σαν τελικό διάλυμα το διάλυμα Γ+1M NaCl (Εικόνα 3.4. Καμπύλη Γ.).

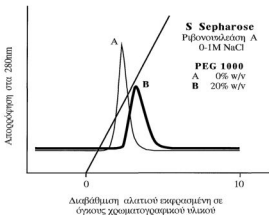
Από την εικόνα 3.4. είναι φανερή η μετατόπιση της έκλουσης σε όλο και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλατιού όσο η συγκέντρωση του μειωτή PEG 3350 αυξάνει. Η καμπύλη Α της εικόνας 3.4. αντιστοιχεί στη διαδρομή Α της εικόνας 3.1. και η καμπύλη Β και Γ της εικόνας 3.4. αντιστοιχούν σε παράλληλες διαδρομές Β της εικόνας 3.1.

### **3.1.5. Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία. Έκλυση της οβαλβουμίνης με ελάττωση του PEG 8000.**

Στο πείραμα αυτό για την ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκαν 10 ml χρωματογραφικού υλικού Q Sepharose Fast Flow και 2mg οβαλβουμίνης.

Στο πείραμα αυτό το χρωματογραφικό υλικό εξισορροπείται με 20 mM Bis-Tris pH 6,0 και 0 M NaCl (διάλυμα Α). Η πρωτεΐνη έχει διαλυτοποιηθεί στο διάλυμα Α. Φορτώνεται στο χρωματογραφικό υλικό και στη συνέχεια το υλικό πλένεται με 10 όγκους χρωματογραφικού υλικού με διάλυμα 20 mM Bis-Tris pH 6,0, 250 mM NaCl και 20% w/v PEG 8000 (διάλυμα Δ). Τέλος στο χρωματογραφικό υλικό εφαρμόζεται διαβάθμιση PEG (10 όγκοι χρωματογραφικού υλικού). Για τη δημιουργία της διαβάθμισης χρησιμοποιείται σαν αρχικό διάλυμα το διάλυμα Δ και σαν τελικό διάλυμα το διάλυμα Α+250 mM NaCl (Εικόνα 3.5. Καμπύλη Α).

Η καμπύλη Α της εικόνας 3.5. αντιστοιχεί στη διαδρομή C της εικόνας 3.1.

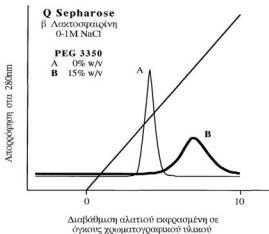


**Εικόνα 3.2.** Διαβάθμιση αλατιού σε κατιοντοαλλακτικό υπόστρωμα S Sepharose Fast Flow για την πρωτεΐνη ριβονουκλεάση A.

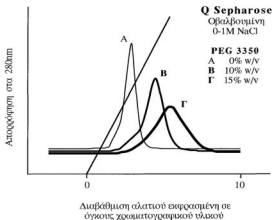
Η καμπύλη A παρακολουθεί την έλωση της πρωτεΐνης από το υπόστρωμα για τη διαβάθμιση χλωριούχου νατρίου από 0 σε 1M απουσία PEG.

Η καμπύλη B παρακολουθεί την έλωση της πρωτεΐνης από το υπόστρωμα για τη διαβάθμιση χλωριούχου νατρίου από 0 σε 1M παρουσία 20% w/v PEG 1000.

Η μετατόπιση της έλωσης σε μεγαλύτερη συγκέντρωση αλατιότητας παρουσία PEG είναι φανερή.



**Εικόνα 3.3.** Διαβάθμιση αλατιού σε ανιοντοανταλλακτικό υπόστρωμα Q Sepharose Fast Flow για την πρωτεΐνη β λακτοσφαιρίνης. Η καμπύλη A παρακολουθεί την έλωση της πρωτεΐνης από το υπόστρωμα για τη διαβάθμιση χλωριούχου νατρίου από 0 σε 1M απουσία PEG. Η καμπύλη B παρακολουθεί την έλωση της πρωτεΐνης από το υπόστρωμα για τη διαβάθμιση χλωριούχου νατρίου από 0 σε 1M παρουσία 15% w/v PEG 3350. Η μετατόπιση της έλωσης σε μεγαλύτερη συγκέντρωση αλατιότητας παρουσία PEG είναι φανερή.



**Εικόνα 3.4.** Διαβάθμιση αλατιού σε ανιοντοανταλλακτικό υπόστρωμα Q Sepharose Fast Flow για την πρωτεΐνη οβαλβουμίνη.

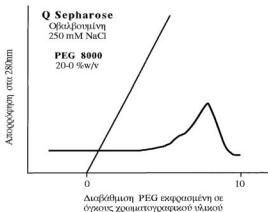
Η καμπύλη A παρακολουθεί την έκλυση της πρωτεΐνης από το υπόστρωμα για τη διαβάθμιση χλωριούχου νατρίου από 0 σε 1M απουσία PEG.

Η καμπύλη B παρακολουθεί την έκλυση της πρωτεΐνης από το υπόστρωμα για τη διαβάθμιση χλωριούχου νατρίου από 0 σε 1M παρουσία 10% w/v PEG 3350.

Η καμπύλη Γ παρακολουθεί την έκλυση της πρωτεΐνης από το υπόστρωμα για τη διαβάθμιση χλωριούχου νατρίου από 0 σε 1M παρουσία 15% w/v PEG 3350.

Η μετατόπιση της έκλυσης σε μεγαλύτερη συγκέντρωση αλατότητας παρουσία PEG είναι φανερή.





**Εικόνα 3.5.** Διαβάθμιση ελαττωμένης συγκέντρωσης PEG, παρουσία σταθερής συγκέντρωσης αλατιού, σε ανιοντοανταλλακτικό υπόστρωμα Q Sepharose Fast Flow για την πρωτεΐνη οβαλβουμίνη.

Η καμπύλη παρακολουθεί την έκλυση της πρωτεΐνης από το υπόστρωμα για τη διαβάθμιση PEG 8000 από 20% w/v σε 0% w/v παρουσία 250 mM χλωριούχου νατρίου.

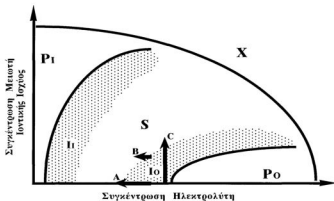
Η έκλυση με ελαττωμένη διαβάθμιση PEG παρουσία σταθερής συγκέντρωσης αλατιού είναι πραγματικότητα.

## **3.2. Χρωματογραφία Υδροφοβικότητας.**

### **3.2.1. Πρόβλεψη της γενικευμένης εξαλάτωσης για την υδροφοβική χρωματογραφία (Εικόνα 3.6.).**

Η χρωματογραφία υδροφοβικότητας ανήκει στην περιοχή της γενικευμένης εξαλάτωσης. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο, η παρουσία των μειωτών ιοντικής ισχύος επάγει την έκλυση των βιομορίων από τα υλικά της υδροφοβικής χρωματογραφίας. Είναι γνωστό ότι η ελάττωση της αλατότητας οδηγεί στην έκλυση των βιομορίων από τα υδρόφοβα χρωματογραφικά υλικά. Η παρουσία κάποιας ποσότητας μειωτή επιτρέπει την έκλυση των βιομορίων σε μεγαλύτερη συγκέντρωση αλατιού. Η συγκέντρωση μειωτή ιοντικής ισχύος που χρειάζεται για την έκλυση ενός βιομορίου εξαρτάται από τη συγκέντρωση του αλατιού στο διάλυμα.

Στα ακόλουθα πειράματα ελέγχουμε τις προβλέψεις του γενικευμένου διαγράμματος για την περίπτωση της υδροφοβικής χρωματογραφίας.



**Εικόνα 3.6.** Προβλέψεις για την υδροφοβική χρωματογραφία.

Η διαδρομή A αντιστοιχεί σε έκλυση ενός βιομορίου από υδροφοβικό υπόστρωμα με ελαττωμένη συγκέντρωση αλατιού, απουσία μειωτή ιοντικής ισχύος.

Η διαδρομή B αντιστοιχεί σε έκλυση του βιομορίου από υδροφοβικό υπόστρωμα με ελαττωμένη συγκέντρωση αλατιού, παρουσία μειωτή ιοντικής ισχύος. Η έκλυση, παρουσία του μειωτή, γίνεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλατιού.

Η διαδρομή C αντιστοιχεί σε έκλυση του βιομορίου από υδροφοβικό υπόστρωμα με αυξανόμενη συγκέντρωση μειωτή, παρουσία σταθερής συγκέντρωσης αλατιού.

### 3.2.2. Έκλυση της λυσοζύμης με αύξηση του PEG.

Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιούμε 10 ml χρωματογραφικού υλικού Phenyl Sepharose Fast Flow High Substitution. Σαν πρωτεϊνικός μάρτυρας για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η λυσοζύμη. Περίπου 1mg πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε ανά πείραμα.

Στο πρώτο πείραμα το χρωματογραφικό υλικό εξισορροπείται με 50 mM οξικό νατρίου pH 5,0 και 1,5M NaCl (διάλυμα Α). Η πρωτεΐνη έχει διαλυτοποιηθεί στο διάλυμα Α. Φορτώνεται στο χρωματογραφικό υλικό και στη συνέχεια το υλικό πλένεται με 10 όγκους χρωματογραφικού υλικού με διάλυμα Α. Τέλος στο χρωματογραφικό υλικό εφαρμόζεται διαβάθμιση PEG 200 (10 όγκοι χρωματογραφικού υλικού). Για τη δημιουργία της διαβάθμισης χρησιμοποιείται σαν αρχικό διάλυμα το διάλυμα Α και σαν τελικό διάλυμα το διάλυμα Α + 20% w/v PEG 200 (Εικόνα 3.7. Καμπύλη Α.).

Στο δεύτερο πείραμα το χρωματογραφικό υλικό εξισορροπείται με 50 mM οξικό νατρίου pH 5,0 και 1,5M NaCl (διάλυμα Α). Η πρωτεΐνη έχει διαλυτοποιηθεί στο διάλυμα Α. Φορτώνεται στο χρωματογραφικό υλικό και στη συνέχεια το υλικό πλένεται με 10 όγκους χρωματογραφικού υλικού με διάλυμα Α. Τέλος στο χρωματογραφικό υλικό εφαρμόζεται διαβάθμιση PEG 1000 (10 όγκοι χρωματογραφικού υλικού). Για τη δημιουργία της διαβάθμισης χρησιμοποιείται σαν αρχικό διάλυμα το διάλυμα Α και σαν τελικό διάλυμα το διάλυμα Α+20% w/v PEG 1000 (Εικόνα 3.7. Καμπύλη Β.).

Από την εικόνα 3.7. είναι φανερή η δυνατότητα έκλυσης με PEG, παρουσία σταθερής συγκέντρωσης αλατιού. Η καμπύλη Α της εικόνας 3.7. αντιστοιχεί στη διαβάθμιση με PEG 200 και η καμπύλη Β της εικόνας 3.7. αντιστοιχεί στη διαβάθμιση με PEG 1000. Τόσο η καμπύλη Α όσο και η Β αντιστοιχούν στη διαδρομή C της εικόνας 3.6.

### 3.2.3. Έκλυση της ριβονουκλεάσης Α με αύξηση του PEG.

Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιούμε 10 ml χρωματογραφικού υλικού Phenyl Sepharose Fast Flow High Substitution. Σαν πρωτεϊνικός μάρτυρας για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η ριβονουκλεάση Α. Περίπου 2mg πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε ανά πείραμα.

Στο πρώτο πείραμα το χρωματογραφικό υλικό εξισορροπείται με 50 mM Tris pH 7,5 και 1,5 M θειικό αμμώνιο (διάλυμα Α). Η πρωτεΐνη έχει διαλυτοποιηθεί στο διάλυμα Α. Φορτώνεται στο χρωματογραφικό υλικό και στη συνέχεια το υλικό πλένεται με 10 όγκους χρωματογραφικού υλικού με διάλυμα Α. Τέλος στο χρωματογραφικό υλικό εφαρμόζεται διαβάθμιση PEG 200 (10 όγκοι χρωματογραφικού υλικού). Για τη δημιουργία της διαβάθμισης χρησιμοποιείται σαν αρχικό

διάλυμα το διάλυμα Α και σαν τελικό διάλυμα το διάλυμα Α+20% v/v PEG 200 (Εικόνα 3.8. Καμπίλη Α.).

Στο δεύτερο πείραμα το χρωματογραφικό υλικό εξισορροπείται με 50 mM Tris pH 7,5 και 1,75 M θειικού αμμωνίου (διάλυμα Α). Η πρωτεΐνη έχει διαλυτοποιηθεί στο διάλυμα Α. Φορτώνεται στο χρωματογραφικό υλικό και στη συνέχεια το υλικό πλένεται με 10 όγκους χρωματογραφικού υλικού με διάλυμα Α. Τέλος στο χρωματογραφικό υλικό εφαρμόζεται διαβάθμιση PEG 200 (10 όγκοι χρωματογραφικού υλικού). Για τη δημιουργία της διαβάθμισης χρησιμοποιείται σαν αρχικό διάλυμα το διάλυμα Α και σαν τελικό διάλυμα το διάλυμα Α+20%v/v PEG 200 (Εικόνα 3.8. Καμπίλη Β.).

Από την εικόνα 3.8. είναι φανερή η δυνατότητα έλκυσης με PEG, παροικία σταθερής συγκέντρωσης αλατιού. Η καμπίλη Α της εικόνας 3.8. αντιστοιχεί στη διαβάθμιση παρουσία 1,5 M θειικού αμμωνίου και η καμπίλη Β της εικόνας 3.8. αντιστοιχεί στη διαβάθμιση παρουσία 1,75 M θειικού αμμωνίου. Τόσο η καμπίλη Α όσο και η Β αντιστοιχούν στη διαδρομή C της εικόνας 3.6. Παρουσία χαμηλότερης συγκέντρωσης αλατιού, απαιτείται μικρότερη συγκέντρωση PEG για την έλκυση.

### **3.2.4. Έκλυση του χρομοθρεψινογόνου με αύξηση της γλυκερόλης.**

Στο πείραμα της εικόνας 3.9. χρησιμοποιήθηκε το χρωματογραφικό υλικό Alkyl Superose. Σαν πρωτεϊνικός μάρτυρας για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε περίπου 1 mg της πρωτεΐνης χιμοθρεψινογόνο.

Στο πείραμα αυτό το χρωματογραφικό υλικό εξισορροπείται με 50 mM Tris pH 7,5 και 1,5 M θειικού αμμωνίου (διάλυμα Α). Η πρωτεΐνη έχει διαλυτοποιηθεί στο διάλυμα Α. Φορτώνεται στο χρωματογραφικό υλικό και στη συνέχεια το υλικό πλένεται με 10 όγκους χρωματογραφικού υλικού με διάλυμα Α. Τέλος στο χρωματογραφικό υλικό εφαρμόζεται διαβάθμιση γλυκερόλης (10 όγκοι χρωματογραφικού υλικού). Για τη δημιουργία της διαβάθμισης χρησιμοποιείται σαν αρχικό διάλυμα το διάλυμα Α και σαν τελικό διάλυμα το διάλυμα Α+30% v/v γλυκερόλη.

Από την εικόνα 3.9. είναι φανερή η δυνατότητα έκλυσης με γλυκερόλη, παρουσία σταθερής συγκέντρωσης αλατιού. Η καμπίλη αντιστοιχεί στη διαδρομή C της εικόνας 3.6.

### **3.2.5. Έκλυση της ριβονουκλεάσης Α με ελάττωση του αλατιού.**

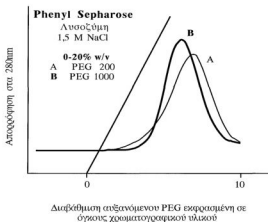
Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε 10 ml χρωματογραφικού υλικού Phenyl Sepharose Fast Flow High Substitution. Σαν πρωτεϊνικός μάρτυρας για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η ριβονουκλεάση Α. Περίπου 2mg πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε ανά πείραμα.

Στο πρώτο πείραμα το χρωματογραφικό υλικό εξισορροπείται με 50 mM Tris pH 7.5 και 2 M θειικού αμμωνίου (διάλυμα Α). Η πρωτεΐνη έχει διαλυτοποιηθεί

στο διάλυμα Α. Φορτώνεται στο χρωματογραφικό υλικό και στη συνέχεια το υλικό πλένεται με 10 όγκους χρωματογραφικού υλικού με διάλυμα Α. Τέλος στο χρωματογραφικό υλικό εφαρμόζεται ελαττωμένη διαβάθμιση αλατιού (10 όγκοι χρωματογραφικού υλικού). Για τη δημιουργία της διαβάθμισης χρησιμοποιείται σαν αρχικό διάλυμα το διάλυμα Α και σαν τελικό διάλυμα το διάλυμα 50 mM Tris pH 7.5 και 0 M θειικού αμμωνίου (Εικόνα 3.10. Καμπύλη Α.).

Στο δεύτερο πείραμα το χρωματογραφικό υλικό εξισορροπείται με 50 mM Tris pH 7.5, 2% v/v PEG 200 και 2 M θειικού αμμωνίου (διάλυμα Α). Η πρωτεΐνη έχει διαλυτοποιηθεί στο διάλυμα Α. Φορτώνεται στο χρωματογραφικό υλικό και στη συνέχεια το υλικό πλένεται με 10 όγκους χρωματογραφικού υλικού με διάλυμα Α. Τέλος στο χρωματογραφικό υλικό εφαρμόζεται διαβάθμιση αλατιού (10 όγκοι χρωματογραφικού υλικού). Για τη δημιουργία της διαβάθμισης χρησιμοποιείται σαν αρχικό διάλυμα το διάλυμα Α και σαν τελικό διάλυμα το διάλυμα 50 mM Tris pH 7.5, 2% v/v PEG 200 και 0 M θειικού αμμωνίου (Εικόνα 3.10. Καμπύλη Β.).

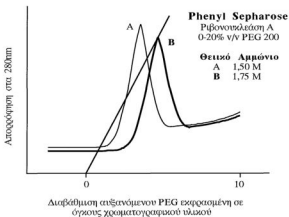
Η καμπύλη Α της εικόνας 3.10. παρακολουθεί τη διαβάθμιση ελαττωμένης αλατότητας απουσία PEG και αντιστοιχεί στη διαδρομή Α της εικόνας 3.6. και η καμπύλη Β της εικόνας 3.10. παρακολουθεί τη διαβάθμιση ελαττωμένης αλατότητας παρουσία 2% PEG και αντιστοιχεί στη διαδρομή Β της εικόνας 3.6. Παρουσία μειωτή η έκλυση του βιομορίου γίνεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση αλατιού.



**Εικόνα 3.7.** Διαβάθμιση PEG, παρουσία σταθερής συγκέντρωσης αλατιού, σε υδρόφοβο υπόστρωμα Phenyl Sepharose Fast Flow για την πρωτεΐνη λυσοζύμη.

Η καμπύλη A παρακολουθεί την έκλυση της πρωτεΐνης από το υπόστρωμα για τη διαβάθμιση του PEG 200 από 0 % w/v σε 20 % w/v παρουσία σταθερής συγκέντρωσης 1,5 M χλωριούχου νατρίου.

Η καμπύλη B παρακολουθεί την έκλυση της πρωτεΐνης από το υπόστρωμα για τη διαβάθμιση του PEG 1000 από 0 % w/v σε 20 % w/v παρουσία σταθερής συγκέντρωσης 1,5 M χλωριούχου νατρίου.



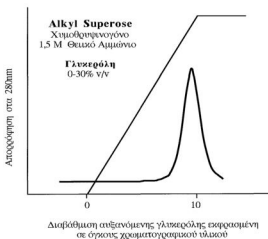
**Εικόνα 3.8.** Διαβάθμιση PEG, παρουσία σταθερής συγκέντρωσης αλατιού, σε υδροφόρο υπόστρωμα Phenyl Sepharose Fast Flow για την ριβονουκλεάση Α.

Η καμπύλη Α παρακολουθεί την έκλυση της πρωτεΐνης από το υπόστρωμα για τη διαβάθμιση του PEG 200 από 0 % v/v σε 20 % v/v παρουσία σταθερής συγκέντρωσης 1,5 M θειικού αμμωνίου.

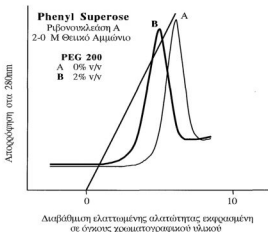
Η καμπύλη Β παρακολουθεί την έκλυση της πρωτεΐνης από το υπόστρωμα για τη διαβάθμιση του PEG 200 από 0 % v/v σε 20 % v/v παρουσία σταθερής συγκέντρωσης 1,75 M θειικού αμμωνίου.

Μεγαλύτερη συγκέντρωση PEG χρειάζεται για την έκλυση του βιομορίου, όταν η συγκέντρωση του αλατιού είναι μεγαλύτερη.





**Εικόνα 3.9.** Διαβάθμιση γλυκερόλης, παρουσία σταθερής συγκέντρωσης αλατιού, σε υδρόφοβο υπόστρωμα Alkyl Superose για την πρωτεΐνη χημοθρυψινογόνο. Η καμπύλη παρακολουθεί την έλιξη της πρωτεΐνης από το υπόστρωμα για τη διαβάθμιση της γλυκερόλης από 0 % v/v σε 30 % v/v παρουσία σταθερής συγκέντρωσης 1,5 M θειικού αμμωνίου.



**Εικόνα 3.10.** Διαβάθμιση αλατιού σε υδρόφοβο υπόστρωμα Phenyl Sepharose Fast Flow για την πρωτεΐνη ριβονουκλεάση Α.

Η καμπύλη Α παρακολουθεί την έλωση της πρωτεΐνης από το υπόστρωμα για τη διαβάθμιση του θειικού αμμωνίου από 2 Μ σε 0 Μ.

Η καμπύλη Β παρακολουθεί την έλωση της πρωτεΐνης από το υπόστρωμα για τη διαβάθμιση του θειικού αμμωνίου από 2 Μ σε 0 Μ, παρουσία 2 % v/v PEG 200.

Η έλωση του βιομορίου γίνεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση αλατιού παρουσία του μεικτού.

### **3.3. Πρωτόκολλο καθαρισμού των μεταλλαγών της πρωτεΐνης ROP.**

#### **3.3.1. Μειονεκτήματα του αρχικού πρωτοκόλλου απομόνωσης των μεταλλαγών της πρωτεΐνης ROP. (73)**

Το αρχικό πρωτόκολλο απομόνωσης των μεταλλαγών της πρωτεΐνης ROP παρουσιάζεται στο κεφάλαιο των υλικών και μεθόδων (62,63). Ένα από τα κύρια μειονεκτήματα του πρωτοκόλλου αυτού είναι η διάρκεια του. Κατά μέσο όρο η διαδικασία για κάθε μεταλλαγή είχε διάρκεια 15 με 20 ημέρες. Ένα δεύτερο μειονέκτημα της διαδικασίας αυτής είναι η έλλειψη επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων της.

Ειδικά για την πρωτεΐνη RM31A-P το αρχικό πρωτόκολλο απέδιδε από 0 mg ως 32 mg καθαρής πρωτεΐνης (τιτροδότηση με Bradford με μάρτυρα BSA (74)) για περίπου 50 γραμμάρια βακτηριακής πάστας.

Για τους λόγους αυτούς το πρωτόκολλο αυτό βελτιώθηκε.

#### **3.3.2. Βελτιωμένο σχήμα απομόνωσης των μεταλλαγών της πρωτεΐνης ROP. (75-78)**

Το βελτιωμένο σχήμα απομόνωσης των μεταλλαγών της πρωτεΐνης ROP περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

##### **3.3.2.1. Εσχύλιση. (79)**

Άμεση ολιγόχρονη ομογενοποίηση της βακτηριακής πάστας σε διάλυμα 50 mM Tris pH 7,5, 1 mM DTT 1mM EDTA, 200 mM NaCl, 5% Γλυκερόλη, 1mM PMSF (τελικός όγκος σε ml διπλάσιος της μάζας της βακτηριακής πάστας σε gr).

Διάρρηξη των βακτηριακών κυττάρων με βιοχημική μέθοδο με τη χρήση Λυσοζύμης και Νουκλεάσης (79). Φυγοκέντρηση για μία ώρα σε 14000xg. Η μέθοδος περιγράφεται στο κεφάλαιο των υλικών και μεθόδων.

##### **3.3.2.2. Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία Q Sepharose Fast Flow (Ταχύτητα ροής 400-500ml/hr). (20-26)**

Ρυθμίζεται σε 8,5 το pH του υπερκείμενου που προκύπτει από την παραπάνω διαδικασία και αμέσως φορτώνεται σε ανιοντοανταλλακτικό υπόστρωμα Q Sepharose Fast Flow (2,6cmX20cm=100ml) εξισορροπημένο με διάλυμα 25mM Tris pH 8,5. Το χρωματογραφικό υπόστρωμα στη συνέχεια πλένεται με διάλυμα 25 mM Tris pH 8,5 5 (3 όγκοι χρωματογραφικού υλικού) και στη συνέχεια με διάλυμα A (20mM Tris pH 7,5) (20-30 όγκοι χρωματογραφικού υλικού). Εφαρμόζεται διαβάθμιση συγκέντρωσης αλατιού 0- 0,6 M NaCl (10 όγκοι χρωματογραφικού υλικού).

### **3.3.2.3. Χρωματογραφία προσρόφησης Υδροξυλαπατίτη (Ταχύτητα ροής 300-500ml/hr). (26)**

Τα κλάσματα της διαβάθμισης που περιέχουν το προς μελέτη μόριο αναμειγνύονται και φορτώνονται σε υπόστρωμα υδροξυλαπατίτη (2,6cmX16cm = 80ml) το οποίο έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί με 20 mM Tris pH 7,5.

Το χρωματογραφικό υπόστρωμα πλένεται με διάλυμα 20 mM Tris pH 7,5 (2 όγκους χρωματογραφικού υλικού) και στη συνέχεια με 10 mM φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+NaOH) pH 6,8 (10 όγκοι χρωματογραφικού υλικού).

Εφαρμόζεται διαβάθμιση συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος 10mM - 300 mM (10 όγκοι χρωματογραφικού υλικού).

Στο *Methods in Enzymology* τόμος 182 (26) αναφέρεται ότι μία όξινη πρωτεΐνη, η οποία βρίσκεται σε διάλυμα το οποίο δεν περιέχει φωσφορικά ιόντα μπορεί να φορτωθεί απευθείας χωρίς ανταλλαγή διαλύτη σε χρωματογραφικό υλικό υδροξυλαπατίτη. Σαν αποτέλεσμα από το βήμα της ανιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας περνάμε στο βήμα της χρωματογραφίας με υδροξυλαπατίτη χωρίς τη διαδικασία της συμπύκνωσης και της ανταλλαγής διαλύτη με διαλυτική.

### **3.3.2.4. Συμπύκνωση.**

Τα κλάσματα της διαβάθμισης που περιέχουν το προς μελέτη μόριο συμπυκνώνονται στα 3 ml με Amicon.

### **3.3.2.5. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης Sephacryl 100 ή Superdex 75 (Ταχύτητα ροής 80 ml/hr). (80-82)**

Το δείγμα φορτώνεται σε χρωματογραφικό υπόστρωμα μοριακής διήθησης Sephacryl 100 ή Superdex 75 (2,6cmX100cm=500ml ή 2,6cmX60cm=300ml αντίστοιχα).

Το δείγμα δεν υπάρχει λόγος να υποβληθεί σε διαδικασίες ανταλλαγής διαλύτη καθώς αυτή είναι μία διαδικασία που γίνεται αυτόματα στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης (80-82).

### **3.3.2.6. Συμπύκνωση και ανταλλαγή διαλύματος με διαλυτοδιαπίδυση.**

Τα κλάσματα που περιέχουν το προς μελέτη μόριο συμπυκνώνονται για κρυσταλλώσεις (τελική συγκέντρωση 10-30 mg/ml). Παράλληλα υποβάλλονται σε ανταλλαγή διαλύματος με διαλυτοδιαπίδυση (diafiltration) έναντι διαλύματος 2 mM Tris pH 7,5, 1mM EDTA, 1mM DTT. Για τη συμπύκνωση χρησιμοποιείται η συσκευή υπερδιήθησης Amicon και τα ημιδιαπερατά φίλτρα φυγοκέντρωσης Centrigrper της Amicon. Εξήγηση της μεθόδου της διαλυτοδιαπίδυσης βρίσκεται στα κεφάλαιο των υλικών και μεθόδων.

Όλα τα παραπάνω βήματα γίνονται σε θερμοκρασία 4 βαθμών Κελσίου.

Η ταυτοποίηση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης γίνεται με αποδιστακτικά πηκτώματα ακρυλαμίδης 15% κατά Laemmli (83,84).

Η παραπάνω μέθοδος ειδικά για την πρωτεΐνη RM 62 ή RM31A-P, για περίπου 50 γραμμάρια βακτηριακής πάστας, αποδίδει συστηματικά τουλάχιστον 60 mg καθαρής πρωτεΐνης (τιτλοδότηση με Bradford με μάρτυρα BSA (74)).

Η παραπάνω μέθοδος χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς μία φορά και στην απομόνωση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης RM7.

### 3.5. Για πρώτη φορά στην πρωτεΐνη RM Δ5 χρησιμοποιούνται οι γνώσεις για τους μειωτές ιοντικής ισχύος στην ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία.

Η πρωτεΐνη RM Δ5 υπερπαραγάγεται σε πολύ μεγάλα ποσά. Είναι χαρακτηριστικό ότι περίπου 50 γραμμάρια βακτηριακής πάστας δίνουν περίπου 1,5 γραμμάρια καθαρής πρωτεΐνης RM Δ5.

Σαν συνέπεια της μεγάλης ποσότητας της πρωτεΐνης ξεπεράστηκε η χωρητικότητα του χρωματογραφικού υλικού υδροξυλαπατίτη που χρησιμοποιείται στο 3 στάδιο του βελτιωμένου σχήματος καθαρισμού των μεταλλικών της ROP.

Η πρωτεΐνη μετά το στάδιο 3 είχε αραιωθεί σημαντικά καθώς υπήρχε τόσο στα διαλύματα πλυσίματος του χρωματογραφικού υλικού όσο και σε όλα τα αρχικά κλάσματα της διαβάθμισης συγκέντρωσης φοσφορικού που ακολουθήσε.

Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα έπρεπε να πακεταριστεί μία πολύ μεγαλύτερη ποσότητα υδροξυλαπατίτη, να υποβληθεί η πρωτεΐνη σε ανταλλαγή διαλύτη και να επαναληφθεί η διαδικασία.

Ήταν γνωστό όμως από τα πειράματα κρυστάλλωσης ότι, η πρωτεΐνη αυτή είναι αδιάλυτη παρουσία 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος Bis Tris pH 6,0 και 20 % v/v αιθανόλης. Επίσης ήταν γνωστό ότι 600 mM χλωριούχου νατρίου στο παραπάνω διάλυμα διαλυτοποιούν την πρωτεΐνη.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες αποφάσισα να χρησιμοποιήσω για πρώτη φορά μειωτές ιοντικής ισχύος στην ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία για να εμμεταλλευτώ την γκόση της διαλυτότητας από τα κρυσταλλογραφικά πειράματα.

Έγινε λοιπόν το ακόλουθο πείραμα:

Το διάλυμα της πρωτεΐνης τοποθετήθηκε σε ημιδιαπερατές μεμβράνες και υποβλήθηκε σε ανταλλαγή διαλύτη έναντι 25 mM Tris pH 8,5. Το διάλυμα αυτό φορτώθηκε στο ανιοντοανταλλακτικό υπόστρωμα Q Sepharose, το οποίο προηγουμένως είχε εξισορρογηθεί με διάλυμα 25 mM Tris pH 8,5. Στη συνέχεια το χρωματογραφικό υπόστρωμα πλύνθηκε με 2 όγκους διαλύματος 25 mM Tris pH 8,5, 5 όγκους διαλύματος 20 mM Tris pH 7,5, 10 όγκους διαλύματος 20 mM Tris pH 8,5 και 20% v/v αιθανόλη, 10 όγκους διαλύματος 20 mM Bis Tris pH 6,0 και 20% v/v αιθανόλης. Στην συνέχεια εφαρμόστηκε διαβάθμιση αλατότητας 0 με 1 M NaCl σε διάλυμα 20 mM Bis Tris pH 6,0 και 20% v/v αιθανόλης. Στη διαβάθμιση αυτή η πρωτεΐνη RMΔ5 εκλούστηκε σε αλατότητα περίπου 600 mM χλωριούχου νατρίου όπως αναμενόταν.

Η καθαρότητα της πρωτεΐνης RM Δ5, μετά από αυτή τη διαδικασία, ήταν ικανοποιητική για τα πειράματα κρυστάλλωσης.

### 3.6. Πρωτόκολλο καθαρισμού της πρωτεΐνης P1.

#### 3.6.1. Το σχήμα απομόνωσης της πρωτεΐνης P1. (73,75-78)

##### 3.6.1.1. Επεξεύλιση. (79)

Ταχεία ομογενοποίηση της βακτηριακής πάστα σε διάλυμα 50mM Tris pH 7,5, 1 mM DTT 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 5% Γλυκερόλη, 1 mM PMSF (τελικός όγκος σε ml διυλίσματος της μάζας της βακτηριακής πάστας σε gr).

Διάφραξη των βακτηριακών κυττάρων με βιοχημική μέθοδο με τη χρήση λυσοζύμης και δεοξυριβονουκλεάσης (79). Φυγοκέντρωση για μία ώρα σε 14000xg. Η μέθοδος περιγράφεται στο κεφάλαιο των υλικών και μεθόδων.

##### 3.6.1.2. Κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία S Sepharose Fast Flow (Ταχύτητα ροής 400-500ml/hr). (20-26)

Το υπερκείμενο που προκύπτει από την παραπάνω διαδικασία αραιώνεται 1:3 με διάλυμα 4/3X50 mM Hesperes pH 6,5 και αμέσως φορτώνεται σε κατιοντοανταλλακτικό υπόστρωμα S Sepharose fast flow (2,6cmX16cm=80ml) εξισορροπημένο με διάλυμα 50mM Hesperes pH 6,5.

Το χρωματογραφικό υπόστρωμα στη συνέχεια πλένεται με διάλυμα 50 mM Hesperes pH 6,5 (3 όγκοι χρωματογραφικού υλικού) και στη συνέχεια με διάλυμα 50mM Hesperes pH 7,8 (30-40 όγκοι χρωματογραφικού υλικού).

Η πρωτεΐνη P1 εκλύεται με απότομη αύξηση της αλατότητας και συγκεντρωμένα με διάλυμα 50mM Hesperes pH 7,8 και 200 mM NaCl. Η έκλυση της πρωτεΐνης παρακολουθείται με ανιχνευτή απορρόφησης.

##### 3.6.1.3. Ανταλλαγή διαλύματος με διαλυτοδιαπίδωση.

Το διάλυμα που περιέχει την πρωτεΐνη υποβάλλονται σε ανταλλαγή διαλύματος με διαλυτοδιαπίδωση έναντι διαλύματος 20 mM Tris pH 8,5. Εξήγηση της μεθόδου της διαλυτοδιαπίδωσης βρίσκεται στο κεφάλαιο των υλικών και μεθόδων.

##### 3.6.1.4. Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία Q Sepharose Fast Flow (Ταχύτητα ροής 400-500ml/hr). (20-26)

Το διάλυμα που προκύπτει από την παραπάνω διαδικασία φορτώνεται σε ανιοντοανταλλακτικό υπόστρωμα Q Sepharose Fast Flow (2,6cmX10cm=50ml) εξισορροπημένο με διάλυμα 20mM Tris pH 8,7.

Το χρωματογραφικό υπόστρωμα στη συνέχεια πλένεται με διάλυμα 20 mM Tris pH 8,7 (3 όγκοι χρωματογραφικού υλικού) και στη συνέχεια με διάλυμα 20mM Tris pH 8,2 (10 όγκοι χρωματογραφικού υλικού).

Εφαρμόζεται διαβάθμιση συγκέντρωσης αλατιού 0,00 - 0,40 M NaCl. (10 όγκοι χρωματογραφικού υλικού).

Η έλωση των πρωτεϊνών παρακολουθείται με ανιχνευτή απορρόφησης. Το πρώτο σήμα έλωσης περιέχει το πρόδρομο μόριο της PI. Το δεύτερο σήμα έλωσης περιέχει το μόριο της PI (150 mM NaCl).

### 3.6.1.5. Συμπύκνωση.

Τα κλάσματα της διαβάθμισης που περιέχουν την PI συμπυκνώνονται στα 3 ml με Amicon.

### 3.6.1.6. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης Sephacryl 200 (Ταχύτητα ροής 80 ml/hr). (80-82)

Το δείγμα φορτώνεται σε χρωματογραφικό υπόστρωμα μοριακής διήθησης Sephacryl 200 (2,6cmX100cm=500ml). Η έλωση των πρωτεϊνών παρακολουθείται με ανιχνευτή απορρόφησης. Η PI εκλύεται σαν μονομερές (όγκος έλωσης 250 ml).

### 3.6.1.7. Συμπύκνωση και ανταλλαγή διαλύματος με διαλυτοδιαπίδυση.

Τα κλάσματα που περιέχουν το προς μελέτη μόριο συμπυκνώνονται για κρυσταλλώσεις (τελική συγκέντρωση 10-20 mg/ml). Παράλληλα υποβάλλονται σε ανταλλαγή διαλύματος με διαλυτοδιαπίδυση έναντι διαλύματος 2 mM Tris pH 7,5, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT. Για τη συμπύκνωση χρησιμοποιείται η σπυκτική υπερδιήθηση Amicon και τα ημιδιαπερατά φίλτρα φυγοκέντρησης Centrifrep της Amicon. Εξήγηση της μεθόδου της διαλυτοδιαπίδυσης βρίσκεται στο κεφάλαιο των υλικών και μεθόδων.

Όλα τα παραπάνω βήματα γίνονται σε θερμοκρασία 4 βαθμών Κελσίου.

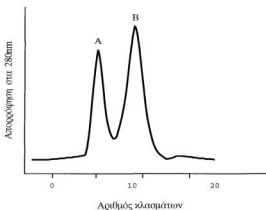
### 3.6.1.8. Χρήση της μεθόδου χρωματοεστίασης (Ταχύτητα ροής 60-80 ml/hr). (24,25)

Η μέθοδος της χρωματοεστίασης (chromatofocusing) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση της καθαρότητας της πρωτεΐνης PI. Η μέθοδος αυτή μπορεί να παρεμβληθεί μεταξύ των βημάτων 5 και 6. Τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη PI συμπυκνώνονται και εξισορροπούνται έναντι διαλύματος 25 mM Tris-Acetate pH 8,3. Το δείγμα (10 ml) φορτώνεται στο χρωματογραφικό υλικό PBE94 (1,6cmX30cm=60ml) που έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί με διάλυμα διαλύματος 25 mM Tris-Acetate pH 8,3 (15 όγκοι χρωματογραφικού υλικού). Στη συνέχεια περνάμε από το χρωματογραφικό υλικό Polybuffer 96 αραιωμένο 1:13 με νερό και εξισορροπημένο σε pH 6,0 με οξικό οξύ (11 όγκους χρωματογραφικού υλικού). Η πρωτεΐνη PI εκλύεται σε pH 6,8-6,6.



### 3.6.2. Το χρωματογραφικό παράδοξο. (20-26)

Σύμφωνα με τη θεωρία της ιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας ένα μόριο δένεται σε κατιοντοανταλλάκτη 1 μονάδα του pH κάτω από το pI της και σε ανιοντοανταλλάκτη 1 μονάδα του pH πάνω από το pI της. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η πρωτεΐνη PI (pI=6,6-6,8) δένεται περίπου στο ίδιο pH (8,0) τόσο σε κατιοντοανταλλακτικό υπόστρωμα όσο και σε ανιοντοανταλλακτικό. Σε αυτή την περίπτωση συμπεριφορά οφείλεται η ευκολία καθαρισμού του μορίου. Εξήγηση στο παραπάνω φαινόμενο μπορεί να δοθεί αν θεωρήσουμε ότι η κατανομή των φορτίων στην επιφάνεια του μορίου σε pH 8,0 είναι άνιση και επομένως δημιουργεί πολωμένες περιοχές θετικών και αρνητικών φορτίων.



**Εικόνα 3.11.** Διαβάθμιση χλωριούχου νατρίου από 0 M σε 0,4 M στην ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία Q Sepharose Fast Flow για την πρωτεΐνη PI. Η κορυφή A αντιστοιχεί στο πρόδρομο μόριο της PI ενώ η κορυφή B αντιστοιχεί στο ώριμο μόριο της PI.

### **3.7. Μετατροπή στο πρωτόκολλο καθαρισμού της πρωτεΐνης NIR. (73,75-78)**

#### **3.7.1. Σύντομη περιγραφή του πρωτοκόλλου καθαρισμού της πρωτεΐνης NIR.**

Το αρχικό πρωτόκολλο απομόνωσης της πρωτεΐνης NIR δημιουργήθηκε από την Ε. Βακουράκη και αποτελείται από τρία χρωματογραφικά βήματα. Στο πρώτο βήμα χρησιμοποιείται το χρωματογραφικό υλικό Q Sepharose. Στο δεύτερο βήμα χρησιμοποιείται το χρωματογραφικό υλικό Q Superose. Στο τρίτο βήμα χρησιμοποιείται το χρωματογραφικό υλικό υδροξυλαπατίτης.

#### **3.7.2. Τα προβλήματα του πρωτοκόλλου καθαρισμού της πρωτεΐνης NIR.**

Το πρωτόκολλο που προαναφέρθηκε παρουσίαζε δύο κύρια μειονεκτήματα.

Το πρώτο μειονέκτημα είναι η χρησιμοποίηση στο δεύτερο βήμα χρωματογραφικού υλικού με παραπλήσιες χρωματογραφικές ιδιότητες με τις ιδιότητες του χρωματογραφικού υλικού που χρησιμοποιείται στο πρώτο βήμα. Το υλικό Q Superose διατίθεται σε μικρές συσκευασίες προπαραεπιλεγμένο για το FPLC (23). Η χωρητικότητα του υλικού αυτού για τη συγκροτημένη διαδικασία είναι μικρή. Σαν συνέπεια το δείγμα έπρεπε να διαμοιράζεται και να υποβάλλεται σταδιακά στο χρωματογραφικό αυτό βήμα. Τέλος το δείγμα δεν μπορούσε να είναι μεγάλο γιατί το βήμα αυτό έπαιρνε πολύ χρόνο. Δηλαδή εξαιτίας του βήματος αυτού δεν μπορούσαν να γίνουν πειράματα μεγάλης κλίμακας. Παράλληλα η συχνή χρήση του χρωματογραφικού υλικού Q Superose στα όρια της χωρητικότητας του δημιουργούσε την ανάγκη για συχνό καθαρισμό του υλικού.

Το δεύτερο μειονέκτημα του πρωτοκόλλου ήταν η επαναληψιμότητα. Η καθαρότητα της πρωτεΐνης στο τέλος του καθαρισμού δεν ήταν πάντα η ίδια. Σαν αποτέλεσμα δεν υπήρχε επαναληψιμότητα στα πειράματα των κρυσταλλώσεων. Η πρωτεΐνη γενικά χρειαζόταν αρκετό χρόνο για να κρυσταλλώσει (από 15 ημέρες μέχρι και τέσσερις μήνες).

#### **3.7.3. Για πρώτη φορά στην πρωτεΐνη NIR χρησιμοποιείται το PEG για έκλυση από υδρόφοβη χρωματογραφία.**

Για τη βελτίωση του πρωτοκόλλου καθαρισμού της πρωτεΐνης NIR αντικαταστήθηκε το δεύτερο βήμα του καθαρισμού με ένα βήμα υδρόφοβης χρωματογραφίας (20,27,28). Το χρωματογραφικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε είναι η Phenyl Sepharose Fast Flow High Substitution.

Το χρωματογραφικό υλικό εξισορροπείται με διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου pH 5,0 (διάλυμα Α) και 1,2 Μ θειικού αμμωνίου. Το δείγμα φορτώνεται στο υλικό

και το χρωματογραφικό υλικό πλένεται με το διάλυμα A + 1,2 M θειικού αμμωνίου. Στη συνέχεια εφαρμόζεται διαβάθμιση ελαττωμένης αλατότητας από 1,2 σε 0 M θειικού αμμωνίου. Η πρωτεΐνη δεν εκλύεται στη διαδικασία αυτή.

Είναι γνωστό ότι αν ένα βιομόριο δεν εκλύεται από τα υδρόφοβα υλικά με την ελάττωση της αλατότητας τότε για να επιτευχθεί η έκλυση μπορούμε να εφαρμόσουμε διαβάθμιση αυξημένης συγκέντρωσης αιθυλικής γλυκόλης ή άλλων οργανικών διαλυτών (20,27,28). Στη διαδικασία αυτή υπάρχει ο κίνδυνος να αποδιαταχθεί το βιομόριο.

Γνωρίζοντας ήδη τις ιδιότητες της γενικευμένης εξαλάτωσης αποφάσισα να δοκιμάσω την έκλυση της πρωτεΐνης NIR από το υδρόφοβο υπόστρωμα με PEG. Στην αρχή δοκίμασα την έκλυση με PEG 200 και στη συνέχεια με PEG 6000. Η συγκέντρωση του PEG 6000 που χρειάζεται για την έκλυση της πρωτεΐνης NIR είναι μικρότερη από τη συγκέντρωση του PEG 200 που απαιτείται για τον ίδιο σκοπό. Τόσο το PEG 200 όσο και το PEG 6000 δεν αποδιατάσσουν τα βιομόρια αιόμα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις.

Το βήμα της υδρόφοβης χρωματογραφίας για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη εξελίχθηκε ως εξής. Μετά το πλύσιμο του χρωματογραφικού υλικού με το διάλυμα A + 1,2 M θειικού αμμωνίου ακολουθεί πλύσιμο του υλικού με διάλυμα A + 2 M NaCl. Η αλλαγή αυτή είναι απαραίτητη για την αποφυγή δημιουργίας διαφασικών συστημάτων μεταξύ θειικού αμμωνίου και PEG. Η έκλυση της πρωτεΐνης από το υπόστρωμα γίνεται με εφαρμογή παράλληλης διαβάθμιση ελαττωμένης αλατότητας από 2 σε 0 M NaCl και διαβάθμιση αυξημένης συγκέντρωσης PEG από 0 σε 15% w/v.

### **3.8. Μετατροπή στο πρωτόκολλο καθαρισμού της πρωτεΐνης BseCI. (73,75-78)**

#### **3.8.1. Σύντομη περιγραφή του πρωτοκόλλου καθαρισμού της πρωτεΐνης BseCI. (70)**

Το αρχικό πρωτόκολλο απομόνωσης της πρωτεΐνης BseCI αποτελείται από ένα βιακό χρωματογραφικό βήμα. Στο βήμα αυτό χρησιμοποιείται το χρωματογραφικό υλικό Φωσφοκυτταρίνη (PC Phosphocellulose). Το υπόστρωμα φωσφοκυτταρίνης δρα σαν υπόστρωμα ψευδοσυγγένειας (Pseudoaffinity matrix) για της πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με DNA. Ο βαθμός καθαρότητας που πετυχαίνει η φωσφοκυτταρίνη πλησιάζει σχεδόν την ομοιογένεια.

#### **3.8.2. Τα προβλήματα του πρωτοκόλλου καθαρισμού της πρωτεΐνης BseCI.**

Ο όγκος του χρωματογραφικού υλικού της φωσφοκυτταρίνης που χρησιμοποιείται στον καθαρισμό αυτό είναι μεγάλος. Αυτό απαιτεί μεγάλους όγκους εξισορρόπησης, πλυσίματος και διαβάθμισης αλατότητας. Συνέπεια αυτού είναι η μεγάλη διάρκεια του βήματος. Το υπόστρωμα της φωσφοκυτταρίνης πουλιέται σε μορφή σκόνης. Η σκόνη αυτή πρέπει να υποβληθεί σε μία διαδικασία ενεργοποίησης που απαιτεί πολλαπλάσιους όγκους διαλυμάτων από ότι ο τελικός όγκος του παραγόμενου υποστρώματος. Άρα όσο μεγαλύτερος είναι ο όγκος του χρωματογραφικού υποστρώματος που απαιτείται για ένα πείραμα τόσο μεγαλύτεροι οι όγκοι των διαλυμάτων για τη διαδικασία ενεργοποίησης. Εκτός των άλλων το ενεργοποιημένο υλικό της φωσφοκυτταρίνης έχει μικρό χρόνο ημιζωής. Άρα η διαδικασία παραγωγής ενεργοποιημένου υλικού πρέπει να γίνεται συχνά.

Από το σχήμα καθαρισμού η πρωτεΐνη που παράγεται δεν είναι απόλυτα καθαρή (>95%). Το κυριότερο όμως πρόβλημα όσο αφορά την καθαρότητα είναι η ύπαρξη ενός πρωτεολυτικού τμήματος της πρωτεΐνης στο τελικό δείγμα. Η ποσότητα του πρωτεολυτικού αυτού κομματιού αυξάνει με την πάροδο του χρόνου. Αυτό είναι ένδειξη ύπαρξης μικροποσότητας πρωτεασών στο δείγμα. Συνέπεια όλων αυτών είναι η μικρή διάρκεια ζωής της καθαρής πρωτεΐνης στο διάλυμα. Βασικότερη όμως συνέπεια είναι η δυσκολία με την οποία η πρωτεΐνη αυτή κρυσταλλώνεται και ο μικρός χρόνος ημιζωής των κρυστάλλων που παράγει.

#### **3.8.3. Βελτίωση του πρωτοκόλλου απομόνωσης της πρωτεΐνης BseCI.**

Η πρωτεΐνη BseCI είναι γνωστό ότι δεσμεύεται σε χρωματογραφικό υπόστρωμα Q Sepharose Fast Flow σε 20 mM Tris pH 7,5 και εκλύεται από το υπόστρωμα από παρουσία περίπου 250 mM NaCl.

Η χωρητικότητα του χρωματογραφικού υλικού Q Sepharose είναι μεγάλη. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε σαν πρώτο βήμα στον καθαρισμό της BseCI. Το δείγμα που βγαίνει από το ανιοντοανταλλακτικό υπόστρωμα φορτώνεται στη συνέχεια σε υπόστρωμα φωσφοκυταρίνης. Η πρωτεΐνη BseCI αποτελεί σχεδόν το μοναδικό βιομόριο που δεσμεύεται από το χρωματογραφικό υλικό της φωσφοκυταρίνης. Με δεδομένο την παρατήρηση αυτή είναι δυνατόν να μικρύνει κατά μία τάξη μεγέθους ο όγκος του χρωματογραφικού υλικού φωσφοκυταρίνης που απαιτείται. Με τη διαδικασία αυτή εξαφανίζεται επιπλέον και το πρωτεολυτικό κομμάτι της πρωτεΐνης από το δείγμα.

Για την επίτευξη της μεγαλύτερης δυνατής καθαρότητας προστέθηκε και ένα βήμα μοριακής διάθλιξης στο τέλος του πρωτοκόλλου καθαρισμού. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για το βήμα αυτό είναι το Sephacryl S 200.

### **3.9. Εφαρμογή των συνεπειών της γενικευμένης εναλάτωσης και εξαλάτωσης για την ταχύτερη απομόνωση βιομορίων με κατακρήμνιση.**

#### **3.9.1. Παρατηρήσεις.**

Η κατακρήμνιση παρουσιάζει οργανικών διαλυτών ή PEG αναστέλλεται από τους ηλεκτρολύτες. Η κατακρήμνιση από ηλεκτρολύτες αναστέλλεται από την παρουσία μειωτών ιοντικής ισχύος.

Στο βιβλίο Protein purification methods (15) επισημαίνεται, ότι αν μετά από κατακρήμνιση με αιθανόλη ακολουθεί κατακρήμνιση με εξαλάτωση η συγκέντρωση του αλατιού που απαιτείται είναι μεγαλύτερη από αυτή που απαιτείται αν δεν έχει προηγηθεί το βήμα της κατακρήμνισης με αιθανόλη. Η εξήγηση της παρατήρησης είναι σαφής.

#### **3.9.2. Πρωτόκολλο για την γρήγορη απομόνωση των μεταλλαγών της ROP. (Εικόνα 3.13.)**

Μεταλλαγμένες πρωτεΐνες ROP οι οποίες δεν έχουν υποστεί δραματικές αλλαγές στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες μπορούν να απομονωθούν σε λιγότερο από 12 ώρες.

Το σχήμα καθαρισμού που θα αναφέρουμε δοκιμάστηκε με επιτυχία τόσο στην πρωτεΐνη RM 31A-P όσο και στην ίδια την φυσική ROP. Παραπέρα βελτίωση του σχήματος είναι δυνατή.

##### **3.9.2.1. Εκχύλιση. (79)**

Τεχία ομογενοποίησης της βακτηριακής πάστας σε διάλυμα 50mM Tris pH 7,5, 1 mM DTT 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 5% Γλυκερόλη, 1 mM PMSF (τελικός όγκος σε ml διυλίσματος της μάζας της βακτηριακής πάστας σε gr).

Διάρρηξη των βακτηριακών κυττάρων με βιοχημική μέθοδο με τη χρήση λυσοζύμης και δεοξυριβονουκλεάσης (79). Φυγοκέντρηση για μία ώρα σε 14000xg. Η μέθοδος περιγράφεται στο κεφάλαιο των υλικών και μεθόδων.

##### **3.9.2.2. Οξόνηση σε pH 5,2 που δεν κατακρημνίζει την πρωτεΐνη ROP.**

Στο υπερκείμενο που παίρνουμε από τη φυγοκέντρηση προσθέτουμε στερεό κιτρικό οξύ, τόσο ώστε το τελικό διάλυμα να έχει συγκέντρωση 100 mM κιτρικού. Ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος σε 5,2 με 10 N NaOH. Φυγοκεντρούμε το διάλυμα για 5 λεπτά στα 15000xg.

Η πρωτεΐνη ROP παραμένει διαλυτή.

**3.9.2.3. Εξαλάτωση με θειικό αμμώνιο σε pH 5,2 που δεν κατακρημνίζει την πρωτεΐνη ROP.**

Στο υπερκείμενο που παίρνουμε από τη φυγοκέντρηση προσθέτουμε στερεό θειικό αμμώνιο έτσι ώστε να δημιουργήσουμε τελική συγκέντρωση θειικού αμμωνίου 1,5 M. Φυγοκεντρούμε το διάλυμα για 5 λεπτά στα 15000xg.

Η πρωτεΐνη ROP παραμένει διαλυτή.

**3.9.2.4. Εξαλάτωση με θειικό αμμώνιο σε pH 4,0 που κατακρημνίζει την πρωτεΐνη ROP.**

Στο υπερκείμενο που παίρνουμε ρυθμίζουμε το pH σε 4,0 με 5 N HCl. Φυγοκεντρούμε το διάλυμα για 5 λεπτά στα 15000xg.

Η πρωτεΐνη ROP είναι αδιάλυτη.

**3.9.2.5. Επαναδιάλυση του ιζήματος.**

Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε διάλυμα 50 mM Tris pH 7,5 και όγκο ο οποίος είναι το ένα τέταρτο του όγκου που αρχικά είχαμε στο βήμα 2. Φυγοκεντρούμε το διάλυμα για 10 λεπτά στα 15000xg.

Η πρωτεΐνη ROP παραμένει διαλυτή.

**3.9.2.6. Εξαλάτωση με θειικό αμμώνιο σε pH 7,5 που δεν κατακρημνίζει την πρωτεΐνη ROP.**

Στο υπερκείμενο που παίρνουμε από τη φυγοκέντρηση προσθέτουμε στερεό θειικό αμμώνιο έτσι ώστε να δημιουργήσουμε τελική συγκέντρωση θειικού αμμωνίου 1,5 M. Φυγοκεντρούμε το διάλυμα για 5 λεπτά στα 15000xg.

Η πρωτεΐνη ROP παραμένει διαλυτή.

**3.9.2.7. Εξαλάτωση με θειικό αμμώνιο σε pH 5,2 που δεν κατακρημνίζει την πρωτεΐνη ROP.**

Στο υπερκείμενο που παίρνουμε από τη φυγοκέντρηση προσθέτουμε στερεό κιτρικό οξύ έτσι ώστε να δημιουργήσουμε τελική συγκέντρωση κιτρικού 0,1 M. Με 10 N NaOH ρυθμίζουμε το pH στο 5,2. Φυγοκεντρούμε το διάλυμα για 5 λεπτά στα 15000xg.

Η πρωτεΐνη ROP παραμένει διαλυτή.

**3.9.2.8. Εξαλάτωση με θειικό αμμώνιο σε pH 4,0 που κατακρημνίζει την πρωτεΐνη ROP.**

Στο υπερκείμενο που παίρνουμε ρυθμίζουμε το pH σε 4,0 με 5 N HCl. Φυγοκεντρούμε το διάλυμα για 5 λεπτά στα 15000xg.

Η πρωτεΐνη ROP είναι αδιάλυτη.

### 3.9.2.9. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε συνθήκες εναλάτωσης.

Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε διάλυμα 100 mM κατρικού pH 4,8, 0,5 M NaCl 35% v/v αιθανόλη και όγκο ο οποίος είναι το μισό του όγκου που είχαμε στο βήμα 5. Η επαναδιαλυτοποίηση στο στάδιο αυτό γίνεται προσθέτοντας αρχικά το ρυθμιστικό διάλυμα και το αλάτι, και αφού το ίζημα επαναιωρηθεί, τότε προσθέτουμε τον απαιτούμενο όγκο αιθανόλης. Φυγοκεντρούμε το διάλυμα για 5 λεπτά στα 15000xg.

Η πρωτεΐνη ROP παραμένει διαλυτή.

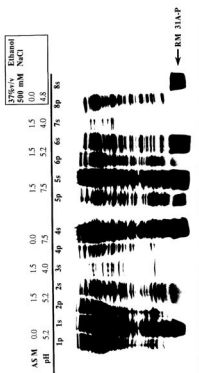
### 3.9.2.10. Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία Q Sepharose Fast Flow (Ταχύτητα ροής 400-500ml/hr). (20-26)

Αραιώνουμε το υπερκείμενο 10 φορές με διάλυμα 25mM Tris pH 8,5. Το πρωτεϊνικό διάλυμα που προκύπτει φορτώνεται σε ανιοντοανταλλακτικό υπόστρωμα Q Sepharose fast flow (2,6cmX10cm=50ml) εξισορροπημένο με διάλυμα 25mM Tris pH 8,5.

Το χρωματογραφικό υπόστρωμα στη συνέχεια πλένεται με διάλυμα 25 mM Tris pH 8,5 (3 όγκοι χρωματογραφικού υλικού) και στη συνέχεια με διάλυμα A (20 mM Tris pH 7.5) (20-30 όγκοι χρωματογραφικού υλικού).

Εφαρμόζεται διαβάθμιση συγκέντρωσης αλατιού 0.00 - 0,60 M NaCl. (10 όγκοι χρωματογραφικού υλικού).





**Εικόνα 3.13.** Τα στάδια απομόνωσης της πρωτεΐνης RM31A-P με διαδοχικές κατακρημνίσεις και επαναουζήσεις. (Αποδιατετακτικό πύρετωμα ακριλαμίδης 15%)

1p,1s Τζημα και υπερεκίμενο από την οξίνιση σε pH 5,2 (3.9.2.2.)

2p,2s Τζημα και υπερεκίμενο από την εξάλαιωση σε pH 4,0 (3.9.2.3.)

3s Υπερεκίμενο από την εξάλαιωση με οξίνιση σε pH 4,0 (3.9.2.4.)

4p,4s Τζημα και υπερεκίμενο από την επαναδιάλυση σε pH 7,5 (3.9.2.5.)

5p,5s Τζημα και υπερεκίμενο από την εξάλαιωση σε pH 7,5 (3.9.2.6.)

6p,6s Τζημα και υπερεκίμενο από την εξάλαιωση με οξίνιση σε pH 5,2 (3.9.2.7.)

7s Υπερεκίμενο από την εξάλαιωση με οξίνιση σε pH 4,0 (3.9.2.8.)

8p,8s Τζημα και υπερεκίμενο από την εναλάτωση σε pH 4,8. (3.9.2.9.)

### **3.10. Επίδραση του PEG 8000 στην ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία Q Sepharose για την πρωτεΐνη BseCl.**

Με σκοπό να δειχθεί η σημασία της επίδραση των μειωτών στην χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε η ακόλουθη πειραματική διαδικασία.

#### **3.10.1. Πρώτο στάδιο ανιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας.**

20 γραμμάρια βακτηριακής πάστας που περιέχει την πρωτεΐνη BseCl εκχυλίστηκαν με το πρωτόκολλο της λυσοζύμης κεφάλαιο 6 και φυγοκεντρήθηκαν στα 14000xg (79).

Το υπερκείμενο μετά τη φυγοκέντρηση αραίώθηκε στα 350 ml και ρυθμίστηκε το pH του δείγματος στο 8,5. Το δείγμα φορτώθηκε σε χρωματογραφικό υπόστρωμα Q Sepharose (50 ml), το οποίο είχε προηγουμένως εξισορροπηθεί με 20 mM Tris pH 8,5. Στη συνέχεια το χρωματογραφικό υλικό πλύθηκε με 3 όγκους διαλύματος 20 mM Tris pH 8,5 και 20 όγκους διαλύματος 50 mM Tris pH 7,5. Τέλος εφαρμόστηκε διαβάθμιση αλατιού από 0 σε 1 M NaCl, επιλέχθηκαν και ενώθηκαν τα κλάσματα που περιέχουν την μεθυλάση. Ο τελικός όγκος του διαλύματος που περιέχει τη μεθυλάση έγινε 350 ml με αραίωση και το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στο 7,5.

#### **3.10.2. Ελάττωση του pH. Δεύτερο στάδιο ανιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας.**

100 ml από το διάλυμα της μεθυλάσης φορτώθηκε σε χρωματογραφικό υπόστρωμα Q Sepharose (10 ml), το οποίο είχε προηγουμένως εξισορροπηθεί με 50 mM Tris pH 7,5. Στη συνέχεια το χρωματογραφικό υλικό πλύθηκε με 10 όγκους διαλύματος 50 mM Tris pH 7,5 και 10 όγκους διαλύματος 50 mM Piperazine pH 5,0. Τέλος οι πρωτεΐνες που είχαν παραμείνει δεσμευμένες στο υπόστρωμα εκλούστηκαν με διάλυμα 50 mM Piperazine pH 5,0 και 1 M NaCl. Ο όγκος του διαλύματος έγινε μετά από αραίωση 100 ml και το pH ρυθμίστηκε σε 7,5. Το διάλυμα αυτό υποβλήθηκε σε διαπίδυση έναντι διαλύματος 50 mM Tris pH 7,5 και 200 mM NaCl.

#### **3.10.3. Ελάττωση του pH παρουσία 15% w/v PEG 8000. Δεύτερο στάδιο ανιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας.**

100 ml από το διάλυμα της μεθυλάσης της διαδικασίας 3.10.1. φορτώθηκε σε χρωματογραφικό υπόστρωμα Q Sepharose (10 ml), το οποίο είχε προηγουμένως εξισορροπηθεί με 50 mM Tris pH 7,5. Στη συνέχεια το χρωματογραφικό υλικό πλύθηκε με 5 όγκους διαλύματος 50 mM Tris pH 7,5 και 10 όγκους διαλύματος 50 mM Tris pH 7,5 και 15% w/v PEG 8000. Στη συνέχεια το υπόστρωμα πλένεται

με 10 όγκους διαλύματος 50 mM Piperazine pH 5,0 και 10% w/v PEG 8000. Τέλος οι πρωτεΐνες που είχαν παραμείνει δεσμευμένες στο υπόστρωμα εκλούστηκαν με διάλυμα 50 mM Piperazine pH 5,0 και 0,2 M NaCl. Ο όγκος του διαλύματος έγινε μετά από αραίωση 100 ml και το pH ρυθμίστηκε σε 7,5. Το διάλυμα αυτό υποβλήθηκε σε διαπίδυση έναντι διαλύματος 50 mM Tris pH 7,5 και 200 mM NaCl.

### 3.10.4. Σύγκριση των αποτελεσμάτων. (Εικόνα 3.14.)

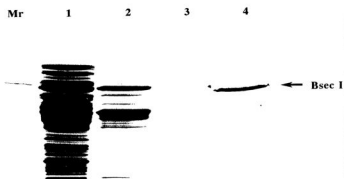
Για τα δείγματα από τις τρεις διαδικασίες έγινε η μέτρηση της ποσότητας συνολικής πρωτεΐνης και μετρήθηκε η δραστηριότητα του ενζύμου (Πίνακας 3.1.).

Με την ελάττωση του pH, απουσία PEG, η μεθυλίωση δεν μπορεί να παραμείνει δεσμευμένη στο ανιοντοσενταλλακτικό υπόστρωμα. Παρουσία του PEG, η μεθυλίωση όχι μόνο παραμένει δεσμευμένη στο υπόστρωμα αλλά και μπορεί να εκλουστεί σε αρκετά καθαρότερη κατάσταση.

Στάδια	Συνολική Πρωτεΐνη (mg)	Συνολική ενζυμική δραστηριότητα (μονάδες)*	Ειδική δραστηριότητα (μονάδες/mg)	Απόδοση (%)	Καθαρισμός (φορές)
Επεχύλιση	850	$2,3 \times 10^6$	$2,7 \times 10^3$	100	1
Q Sepharose pH 7,5	95	$1,5 \times 10^6$	$15,8 \times 10^3$	65	5,9
Q Sepharose pH 5,0 παρουσία PEG 8000	32	$1 \times 10^6$	$31,3 \times 10^3$	43	11,6
Q Sepharose pH 5,0	1,5	-	-	-	-

**Πίνακας 3.1.** Απόδοση των χρωματογραφικών σταδίων που εφαρμόστηκαν στην πρωτεΐνη BseCI.

\* Ως μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την πλήρη μεθυλίωση 1 μg DNA σε μία ώρα (71).



**Εικόνα 3.14.** Αποδιαστακτικό πύρετωμα ακρυλαμίδης 10% που επιδεικνύει τα στάδια της ανιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας για την πρωτεΐνη BseCI.

Mr. Πρωτεϊνικοί μάρτυρες μικρών μοριακών βαρών.

1. Συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα.
2. Μείγμα των ελασμάτων της διαβήθμισης αλατιού σε pH 7,5.
3. Πρωτεΐνες οι οποίες εκλύονται με 1 M αλάτι σε pH 5,0. Στο πείραμα αυτό δεν χρησιμοποιήθηκε PEG.
4. Πρωτεΐνες οι οποίες εκλύονται με 0,2 M αλάτι σε pH 5,0. Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε PEG.

## **4. Κρυσταλλώσεις, Εφαρμογές**

#### 4.1. Αρχικές δοκιμές κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης RM 31A-P.

##### 4.1.1. Συνθήκες κρυστάλλωσης της φυσικής πρωτεΐνης ROP και των μεταλλαγών του υδρόφοβου πυρήνα της ROP. (62,66)

Η φυσική πρωτεΐνη ROP κρυσταλλώνεται με την τεχνική της ολικής ανάμιξης και την τεχνική της διάχυσης ατμών (ικεμαστή σταγόνα).

Η συνθήκη κρυστάλλωσης με την τεχνική της ολικής ανάμιξης είναι 5 mg/ml πρωτεΐνη, 30% v/v MPD, 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου pH 6,8, 50 mM NaCl και 1 mM DTT.

Η συνθήκη κρυστάλλωσης με την τεχνική της διάχυσης ατμών είναι 5 mg/ml πρωτεΐνη, 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου pH 5,4-5,6, 200400 mM NaCl, 1 mM DTT. Ο παράγοντας κατακρήμνισης στην περίπτωση αυτή είναι η μεθανόλη η οποία μεταβάλλεται από 0% v/v στη σταγόνα σε 38-40% v/v στη δεξαμενή.

Αρχιτές από τις μεταλλαγές του υδρόφοβου πυρήνα της πρωτεΐνης ROP κρυσταλλώνονται με την τεχνική της διάχυσης ατμών (ικεμαστή σταγόνα).

Οι συνθήκες κρυστάλλωσης για την τεχνική της διάχυσης ατμών στις μεταλλαγές αυτές είναι παραπλήσιες με τις συνθήκες κρυστάλλωσης της φυσικής πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται είναι από 2 ως 10 mg/ml. Η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται κυμαίνεται από 50 ως 100 mM οξικού νατρίου. Το pH κυμαίνεται από 5,0 ως 5,6, η συγκέντρωση NaCl από 100 ως 300 mM και η συγκέντρωση μεθανόλης στη δεξαμενή από 36 ως 52% v/v.

##### 4.1.2. Αρχική συνθήκη κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης RM 31A-P.

Οι πρώτες δοκιμές για την κρυστάλλωση της πρωτεΐνης RM 31A-P που έγιναν από τη Ν. Κοτσιράκη έδειξαν ότι η πρωτεΐνη αυτή κρυσταλλώνει με την τεχνική της διάχυσης ατμών (ικεμαστή σταγόνα) σε 35% v/v αιθανόλης. Οι υπόλοιπες παράμετροι των συνθηκών κρυστάλλωσης είναι παρόμοιες με αυτές που προαναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο. Οι κρύσταλλοι που δημιουργούνται στις συνθήκες αυτές δεν είναι καλοσχηματισμένες και αυτό είναι δείγμα γρήγορου μεγαλώματος. Ο όγκος των κρυστάλλων αυτών είναι μικρός.

Σκοπός της ενασχόλησής μου με την πρωτεΐνη RM 31A-P ήταν η βελτίωση των συνθηκών κρυστάλλωσής της και η επίλυση της δομής της.

### **4.1.3. Δοκιμή βελτιστοποίησης των συνθηκών κρυστάλλωσης.**

#### **4.1.3.1. Ρυθμιστικό διάλυμα.**

Βασική παράμετρος στην κρυστάλλωση είναι το pH του διαλύματος.

Ειδικά για την πρωτεΐνη RM 31A-P παρατήρησα ότι σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου η πρωτεΐνη είναι διαλυτή μέχρι το pH 5,2 ενώ σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού νατρίου η πρωτεΐνη είναι διαλυτή μέχρι το pH 4,7. Επέλεξα να χρησιμοποιήσω το κιτρικό νάτριο στις κρυσταλλώσεις, γιατί αυτό μου πρόσφερε τη δυνατότητα να πειραματιστώ σε μεγαλύτερο εύρος του pH. Επιπλέον η μεταβολή του pKa του ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού νατρίου μεταβάλλεται ελάχιστα με τη θερμοκρασία. Το μειονέκτημα του ρυθμιστικού αυτού είναι η εύκολη μόλυνσή του από μικροοργανισμούς.

#### **4.1.3.2. Αρχική και τελική συγκέντρωση αιθανόλης.**

Διάφορες δοκιμές έγιναν για τη βελτιστοποίηση της αρχικής και της τελικής συγκέντρωσης της αιθανόλης σε συνάρτηση με το pH και της συγκέντρωσης τόσο του ρυθμιστικού διαλύματος όσο και των αλατιών. Δύο παρατηρήσεις είναι σημαντικές. Σε συγκέντρωση 50 mM κιτρικού νατρίου pH 5,2 και 20% v/v αιθανόλης η πρωτεΐνη RM 31A-P δημιουργεί ίζημα ενώ σε συγκέντρωση 50mM κιτρικού νατρίου pH 5,2 και 35% v/v αιθανόλης η πρωτεΐνη RM 31A-P δεν δημιουργεί ίζημα.

Παρόλες τις προσπάθειες δεν μπόρεσα να βελτιώσω την ποιότητα των κρυστάλλων. Στη διαδικασία αυτή διαπίστωσα ότι μπορούσαν να δημιουργηθούν κρυστάλλοι της πρωτεΐνης όταν οι συνθήκες τόσο στη σταγόνα όσο και στη δεξαμενή ήταν ίδιες και συγκεκριμένα 35% v/v αιθανόλης και 50 mM κιτρικού νατρίου pH 5,0.

#### **4.1.3.3. Έλεγχος επιπρόσθετων ουσιών και θερμοκρασίας.**

Η συμπεριφορά της κρυστάλλωσης ελέγχθηκε παρουσία μονοθενών, δισηθενών και πολυσηθενών αλατιών, γλυκερόλης και απορρυπαντικών. Εξετάστηκε επίσης η παράμετρος της θερμοκρασίας.

#### **4.1.4. Μεταπήδηση στην τεχνική καθιστής σταγόνας. Δημιουργία νέας συσκευής κρυσταλλώσεων.**

Εξαιτίας της παρατήρησης της παραγράφου 4.1.3.2. αποφάσισα να ελέγξω την επίδραση του pH στην κρυστάλλωση σε στατικές συνθήκες, όπου τόσο η σταγόνα όσο και η δεξαμενή περιέχουν περίπου τις ίδιες συγκεντρώσεις αιθανόλης, αλατιών και ρυθμιστικού διαλύματος. Για να διευκολυνθεί το πείραμα χρησιμοποίησα τη μέθοδο της καθιστής σταγόνας χρησιμοποιώντας σαν βάση για τις σταγόνες μία λουρίδα από διαχωριζόμενα τριβλία μικροεπιτοποίησης και σαν δεξαμενή τριβλία

Petri. Η διάταξη αυτή έχει τα εξής δύο πλεονεκτήματα. Πρώτον ο όγκος της σταγόνας μπορεί να κυμαίνεται από 20 ως 50  $\mu\text{l}$  και δεύτερο διαφορετικές συνθήκες ως προς το pH μπορούν να ελέγχονται ταυτόχρονα μέσα στις συνθήκες της ίδιας δεξαμενής.

Από τα πειράματα αυτά διαπιστώθηκε ότι σε pH πάνω από 5,0 μεγαλώνουν κατά προτίμηση θύσανοι ραβδόμορφων κρυστάλλων και ότι σε pH κάτω από 5,0 μεγαλώνουν κατά προτίμηση θύσανοι ρομβικών πλακιδίων.

Παρόλες τις δοκιμές δεν ήταν δυνατό να βρεθούν συνθήκες όπου να μεγαλώνουν καλοσηματισμένοι κρυστάλλοι. Είναι φανερό ότι η απαίτησή μου να δημιουργήσω πυρήνες και παράλληλα να τους μεγαλώσω ήταν υπερβολική. Αυτό που κατάφερα να ήταν να δημιουργώ συνθήκες πυρήνωσης.

#### 4.1.5. Εντυρήνωση.

Ο μόνος τρόπος που μου φάνηκε ικανός να με βοηθήσει στο πρόβλημά μου ήταν να χωρίσω το πείραμά μου σε δύο μέρη. Να διατηρήσω τις παραπάνω συνθήκες για την δημιουργία πυρήνων και μικροκρυστάλλων και να χρησιμοποιήσω την τεχνική της εντυρήνωσης για να μεγαλώσω τον πυρήνες.

Προτίμησα να μεγαλώσω τα ρομβικά πλακίδια γιατί τουλάχιστον αυτά είχαν καλοσηματισμένες δύο από τις τρεις τους διαστάσεις.

Άρχισα λοιπόν και πάλι να δοκιμάζω διάφορες συνθήκες pH, συγρέντρωσης ρυθμιστικού διαλύματος και συγρέντρωσης αιθανόλης. Χρησιμοποιούσα πάντοτε το σύστημα των κρυσταλλώσεων καθιστής σταγόνας που αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο.

Σε pH από 4,7 ως 4,5 πρωτοεμφανίστηκε μία καινούργια πρισματική μορφή κρυστάλλου. Τα κρυσταλλάκια αυτά ήταν τέλεια μονοκρυσταλλικά πρίσματα. Το ενδιαφέρον μου στράφηκε στο μέγεθος των κρυστάλλων αυτών.

Παρά τις διαρκείς δοκιμές δεν μπορούσα να ελέγξω το μέγεθος των κρυστάλλων αυτών. Ήταν μάλλον ένα σπάνιο γεγονός η δημιουργία ενός σχετικά μεγάλου κρυστάλλου.



## 4.2. Αρχικές δοκιμές για κρυστάλλωση της πρωτεΐνης PI.

### 4.2.1. Αρχική συνθήκη κρυστάλλωσης της PI.

Οι πρώτες δοκιμές για την κρυστάλλωση της PI έδειξαν ότι η πρωτεΐνη αυτή κρυσταλλώνει με την τεχνική της διάχυσης ατμών (κρυσταστή σταγόνα) σε 20% w/v PEG 6000 σε pH από 5,0 μέχρι 7,0. Οι κρυστάλλοι που δημιουργούνται στις συνθήκες αυτές είναι άμορφα λεπτά πλασάδια με πολύ μεγάλες τις δύο διαστάσεις τους και με τάση να μεγαλώνουν σε θυσάνους. Οι επιφάνειές τους δεν είναι καλοσχηματισμένες και αυτό είναι δείγμα γρήγορου μεγαλώματος. Το πάχος των κρυστάλλων αυτών είναι μικρό.

### 4.2.2. Δοκιμή βελτιστοποίησης των συνθηκών κρυστάλλωσης.

#### 4.2.2.1. Ρυθμιστικό διάλυμα.

Στην περίπτωση της PI δοκιμάστηκαν διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα στην περιοχή του pH από 5,0 ως 8,0. Πάντα φρόντιζα να κρατάω την ιονική ισχύ στα πειράματά μου χαμηλή σύμφωνα με την παρότρυνση του A McPherson. Προσπαθούσα να διατηρώ το πρωτεϊνικό δείγμα σε συνθήκες χαμηλής αλατινότητας και στα πειράματα των κρυσταλλώσεων φρόντιζα να κρατώ τη συγκέντρωση των ρυθμιστικών διαλυμάτων κάτω από τα 20 mM.

Γενικά παρατήρησα ότι η κρυστάλλωση της PI είναι ευαίσθητη στη φύση του ρυθμιστικού διαλύματος.

#### 4.2.2.2. Αρχική και τελική συγκέντρωση PEG.

Διάφορες δοκιμές έγιναν για τη βελτιστοποίηση της αρχικής και τελικής συγκέντρωση διαφόρων μοριακών βαρών PEG.

#### 4.2.2.3. Έλεγχος επιπρόσθετων ουσιών και θερμοκρασίας.

Η συμπεριφορά της κρυστάλλωσης ελέγχθηκε παρουσία μονοθενών, διοθενών και πολυθενών αλατιών, γλυκερόλης και απορρυπαντικών. Εξετάστηκε επίσης η παράμετρος της θερμοκρασίας.

#### 4.2.2.4. Μεταπήδηση στην τεχνική της καθιστής σταγόνας. Εντυρήνωση.

Όπως και στην περίπτωση της πρωτεΐνης RM 31A-P μεταπήδησα στην τεχνική της καθιστής σταγόνας και στην εντυρήνωση.

#### 4.2.2.5. Κάθε διαφορετική παρτίδα πρωτεΐνης PI συμπεριφέρεται διαφορετικά.

Γενικά, παρόλες τις δοκιμές δεν ήταν σαφής κάποια βελτίωση στην κρυστάλλωση. Η μόνη σημαντική παρατήρηση για την πρωτεΐνη αυτή είναι ότι κάθε διαφορετική παρτίδα συμπεριφέρεται διαφορετικά στις ίδιες συνθήκες κρυστάλλωσης. Αυτή η διαφοροποίηση είναι γνωστή από τον πίνακα 1.1. (37).

### 4.3. Η γενικευμένη εναλάτωση εξηγεί και προτείνει.

#### 4.3.1. Τρόπος δράσης της τεχνικής της διάχυσης ατμών στην περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης. Αδυναμίες της τεχνικής.

Στο γενικευμένο διάγραμμα της εικόνας 4.1 με το βέλος Α φαίνεται η πορεία που ακολουθείται από την τεχνική της διάχυσης ατμών στα πειράματα με οργανικούς διαλύτες και PEG. Καθώς το PEG και το MPD δεν είναι πτητικές ουσίες στα πειράματα με οργανικούς διαλύτες και PEG η κίνηση στο γενικευμένο διάγραμμα διαλυτότητας δεν είναι παράλληλη με τον άξονα των μειωτών ιοντικής ισχύος αλλά ακολουθεί μία διαγώνια πορεία. Αυτό συμβαίνει, γιατί όσο ο όγκος της σταγόνας μικραίνει τόσο η συγκέντρωση των μειωτών όσο και η συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών στο διάλυμα αυξάνει. Η εύρεση της πειραματικής διαδικασίας που θα οδηγήσει διαγώνια διαμέσου της ζώνης πυρήνωσης στη μετασταθερή περιοχή δεν είναι εύκολη. Μία τέτοια διαδικασία περιγράφεται από το βέλος Β στην εικόνα 4.1. Η διαδικασία αυτή προϋποθέτει ότι η κρυστάλλωση ξεκινά από κατάσταση πυρήνωσης. Ο προσδιορισμός της περιοχής αυτής είναι δύσκολος.

#### 4.3.2. Εξήγηση της αδυναμίας κρυστάλλωσης της PI και της πρωτεΐνης RM 31A-P.

Τόσο η κρυστάλλωση της πρωτεΐνης RM 31A-P (αιθανόλη) όσο και η κρυστάλλωση της PI (PEG) είναι πειράματα κρυστάλλωσης με ενπυρήνωση στην περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης.

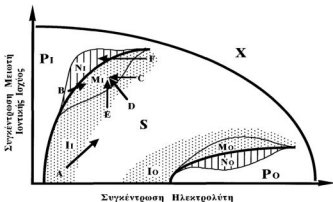
Η γενικευμένη εναλάτωση προβλέπει προσέγγιση από τη διαλυτή στη μετασταθερή περιοχή με ελάττωση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη ή και με αύξηση της συγκέντρωσης των μειωτών ιοντικής ισχύος. Η έλλειψη της γνώσης αυτής δεν επιτρέπει σχεδιασμό πειραμάτων αύξησης της συγκέντρωσης των μειωτών χωρίς την ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη. Ακόμη περισσότερο δεν αφήνει περιθώρια σχεδιασμού πειραμάτων ελάττωσης της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη παρουσία σταθερής συγκέντρωσης μειωτών ή και αυξανόμενης συγκέντρωσης μειωτών.

Εδώ μπορούμε πλέον να εξηγήσουμε την παρατήρηση της μεγαλύτερης διαλυτότητας της πρωτεΐνης RM 31A-P παρουσία κιτρικού νατρίου αντί οξικού νατρίου σε pH μικρότερα του 5.0. Η ιοντική ισχύ 50 mM κιτρικού νατρίου είναι πολύ μεγαλύτερη από την ιοντική ισχύ 50 mM οξικού νατρίου. Αυτό συμβαίνει γιατί το κιτρικό είναι τρισθενές ενώ το οξικό μονοσθενές και η ιοντική ισχύ εξαρτάται από το τετράγωνο του σθένους των ιόντων του διαλύματος. Άρα καθώς η γενικευμένη εναλάτωση εξαρτάται από την ιοντική ισχύ του διαλύτη περιμένουμε ισχυρότερη αναστολή της κατακρήμνισης από το κιτρικό από ότι από το οξικό.

**4.3.3. Η κρυστάλλωση των μεταλλαγών της ROP, με τη μέθοδο της κρεμαστής σταγόνας, εντελώς τυχαία χρησιμοποιεί τα πορίσματα της γενικευμένης εναλάτωσης.**

Στις κρυσταλλώσεις των μεταλλαγών της ROP τελείως τυχαία χρησιμοποιούνται τα πορίσματα της γενικευμένης εναλάτωσης. Δηλαδή στα πειράματα αυτά συμβαίνει ταυτόχρονη αύξηση του μειωτή ιοντικής ισχύος και ελάττωση του ηλεκτρολύτη.

Στις κρυσταλλώσεις αυτές η σταγόνα της πρωτεΐνης δεν περιέχει μεθανόλη και περιέχει κάποια συγκέντρωση αλατιού και ρυθμιστικού διαλύματος. Η μεθανόλη καθώς είναι πολύ πτητική μεταφέρεται από τη δεξαμενή στη σταγόνα και σαν συνέπεια μεγαλώνει σημαντικά τον όγκο της σταγόνας. Η αύξηση του όγκου της σταγόνας έχει σαν αποτέλεσμα την ελάττωση της συγκέντρωσης του αλατιού και του ρυθμιστικού διαλύματος στο διάλυμα. Άρα στα πειράματα αυτά έχουμε ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης της μεθανόλης, που είναι ο μειωτής ιοντικής ισχύος, και ελάττωση της ιοντικής ισχύος.



**Εικόνα 4.1.** Διαδρομές κρυστάλλωσης στην γενικευμένη εναλάτωση.

Η διαδρομή A αντιστοιχεί στην συνηθισμένη τεχνική της διάχυσης ατμών. Η μεταβολή δεν είναι παράλληλη με τον άξονα των μειωτών της ιοντικής ισχύος, δηλαδή των οργανικών διαλυτών και του PEG.

Η διαδρομή B αντιστοιχεί σε πειράματα κρυστάλλωσης ενός βήματος που πρώτα περνάνε από την ζώνη πυρήνωσης και στη συνέχεια μπαίνουν στη μετασταθερή ζώνη.

Οι διαδρομές C, D και E αντιστοιχούν σε πειράματα κρυστάλλωσης με ενπυρήνωση.

Οι διαδρομές αυτές είναι εφικτές μόνο με τη χρήση συσκευιών μικροδιαπίδυσης.

Η διαδρομή F αντιστοιχεί σε πειράματα δημιουργίας πυρήνων.

#### 4.4. Η δημιουργία δύο συστημάτων μικροδιαπίδωσης για κρυσταλλώσεις.

##### 4.4.1. Η τεχνική της διαπίδωσης είναι η μόνη συμβατή με τη γενικευμένη εναλάτωση και εξαλάτωση.

Η μόνη προς το παρόν τεχνική που επιτρέπει οποιοδήποτε είδους κινήσεις στο γενικευμένο διάγραμμα διαλυτότητας είναι η τεχνική της διαπίδωσης. Οι βασικές συσκευές για διαπίδωση σε μικροκλίμακα που χρησιμοποιούνται ήδη είναι οι διάφορες παραλλαγές των συσκευών Zeprenzauer (Εικόνα 1.6.).

Οι απαιτήσεις από τις συσκευές κρυσταλλώσεων είναι η εύκολη πρόσβασης για τον χειρισμό των διαλυμάτων και των κρυστάλλων και η διαφάνεια για την εύκολη παρατήρηση της διαδικασίας της κρυστάλλωσης.

Οι συσκευές μικροδιαπίδωσης που υπάρχουν μέχρι τώρα για πειράματα κρυσταλλώσεων υστερούν είτε στη μία είτε στην άλλη από τις δύο παραπάνω απαιτήσεις.

Είναι φανερό λοιπόν ότι για την καλύτερη δυνατή εφαρμογή της γνώσης του γενικευμένου διαγράμματος διαλυτότητας πρέπει να κατασκευαστούν συσκευές ικανές να πληρούν τις απαιτήσεις των πειραμάτων κρυστάλλωσης.

##### 4.4.2. Σύστημα μικροδιαπίδωσης από δοκιμαστικό σωλήνα Eppendorf 500 ή 1500 μl και τριβλίο Petri. Όγκος σταγόνας από 30 ως 300 μl.

Το πρώτο σύστημα μικροδιαπίδωσης που κατασκεύασα χρησιμοποιεί τους δοκιμαστικούς σωλήνες Eppendorf των 500 ή 1500 μl και τριβλία Petri (Εικόνα 4.2.). Ο δοκιμαστικός σωλήνας κόβεται όπως φαίνεται στην εικόνα. Το καπάκι του σωλήνα τρυπιέται. Από το τοίχωμα του σωλήνα αφαιρούνται αντιδιαμετρικά δύο λωρίδες υλικού έτσι ώστε να δημιουργηθεί ασυνέχεια στο κυλινδρικό τοίχωμα. Το καπάκι και ο δοκιμαστικός σωλήνας κλείνουν ερμητικά με την παρεμβολή ενός κομματιού ημιδιαπερατής μεμβράνης. Στην κατασκευή αυτή το καπάκι αποτελεί το χώρο όπου τοποθετείται η σταγόνα της πρωτεΐνης. Η κατασκευή αυτή τοποθετείται μέσα σε τριβλίο Petri στο οποίο υπάρχει το διάλυμα της δεξαμενής. Το τριβλίο Petri κλείνεται ερμητικά με ένα κομμάτι parafilm. Η ασυνέχεια στο κυλινδρικό τμήμα του σωλήνα επιτρέπει την άνετη κίνηση του διαλύματος της δεξαμενής κάτω από την ημιδιαπερατή μεμβράνη καθώς και την αποφυγή δημιουργίας φροσάλιδων στην κάτω πλευρά της ημιδιαπερατής μεμβράνης.

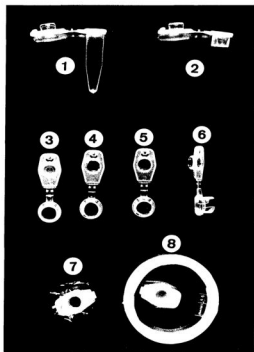
Είναι φανερό ότι το σύστημα που παρουσιάσαμε είναι βολικό τόσο στην παρατήρηση όσο και στο χειρισμό του. Πρέπει εδώ να παρατηρήσουμε ότι στο σύστημα αυτό δεν συμβαίνει μόνο διαπίδωση αλλά και διάχυση ατμών. Βέβαια το πρόβλημα αυτό μπορεί να παρακαμφθεί αν πάνω από τη σταγόνα της πρωτεΐνης προσθέσουμε ένα στρώμα παραφινέλαιου.

Το σύστημα αυτό χρησιμοποιήθηκε σχεδόν κατά αποκλειστικότητα στα πειράματα κρυσταλλώσεων που ακολουθούν.

#### **4.4.3. Σύστημα μικροδιαπίδυσης από κίτρινο ακροφύσιο, γέφυρα καθιστής σταγόνας και πιάτα 24 πηγαδιών (Linbro). Όγκος σταγόνας από 5 ως 50 μl.**

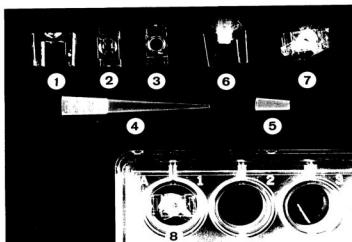
Το δεύτερο σύστημα μικροδιαπίδυσης που κατασκευάσα χρησιμοποιεί τα κίτρινα ακροφύσια, τις γέφυρες καθιστής σταγόνας και τα πιάτα 24 πηγαδιών (Linbro) (Εικόνα 4.3.). Κάθετα στη γέφυρα καθιστής σταγόνας ανοίγεται τρύπα διαμέτρου από 1 ως 5 mm. Το κίτρινο ακροφύσιο κόβεται και από τις δύο πλευρές του και σφηνώνεται στην τρύπα που ανοίχτηκε στην γέφυρα. Ανάμεσα στο ακροφύσιο και στη γέφυρα παρεμβάλλεται ένα κομμάτι ημιδιαπερατής μεμβράνης. Μέσα στο ακροφύσιο τοποθετείται το διάλυμα της πρωτεΐνης. Η γέφυρα τοποθετείται σε ένα από τα πηγάδια του πιάτου. Μέσα στο πηγάδι βάζουμε το διάλυμα της δεξαμενή. Το πηγάδι κλείνεται ερμητικά με μία καλυπτρίδα με τη χρήση βαζελίνης ή παχύρρευστου οριωτέλαιου.

Είναι φανερό ότι το δεύτερο σύστημα που παρουσιάζουμε είναι βολικό τόσο στην παρατήρηση όσο και στο χειρισμό του. Το πλεονέκτημα του συστήματος αυτού είναι τόσο ο μικρός όγκος του δείγματος που απαιτεί όσο και η ευκολία κατασκευής του. Πρέπει εδώ να παρατηρήσουμε ότι και στο σύστημα αυτό δεν συμβαίνει μόνο διαπίδυση αλλά και διάχυση ατμών. Βέβαια το πρόβλημα αυτό μπορεί και πάλι να παρακαμφθεί αν πάνω από τη σταγόνα της πρωτεΐνης προσθέσουμε ένα στρώμα παραφινέλαιου.



**Εικόνα 4.2.** Σύστημα μικροδιαπίδυσης κατασκευασμένα από δοκιμαστικούς σωλήνες Eppendorf 500 µl και τριβλίο Petri.

1. Δοκιμαστικός σωλήνας Eppendorf 500 µl.
- 2, 3. Κάθετο κόψιμο του δοκιμαστικού σωλήνα.
4. Τμήμα του πόματος του δοκιμαστικού σωλήνα.
- 5, 6. Δημιουργία κάθετων τομών στο κυλινδρικό σώμα του δοκιμαστικού σωλήνα.
7. Κλείσιμο της κατασκευής με παρεμβολή ημιδιαπερατής μεμβράνης.
8. Τοποθέτηση της κατασκευής σε τριβλίο Petri. Ολοκληρωμένο σύστημα.



**Εικόνα 4.3.** Σύστημα μικροδιαπίδυσης κατασκευασμένα από κίτρινα ακροφόδια και γέφυρες καθιστής σταγόνας.

1. , 2. Γέφυρα καθιστής σταγόνας.
3. Τμήμα της γέφυρας.
4. Κίτρινο ακροφόδιο.
5. Κάθετο κήψιμο του κίτρινου ακροφόδιου.
6. , 7. Τοποθέτηση του κομμένου ακροφόδιου στην τρίτη γέφυρα με παρεμβολή ημιδιαπερατής μεμβράνης.
8. Τοποθέτηση της κατασκευής σε πιάτο Linbro. Ολοκληρωμένο σύστημα.



#### 4.5. Σχεδιασμός πειραμάτων κρυστάλλωσης στην περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης.

##### 4.5.1. Κρυστάλλωση της πρωτεΐνης RM 31A-P (Εικόνα 4.4.).

Η γνώση της ύπαρξης της γενικευμένης εναλάτωσης οδήγησε σε μία σειρά πειραμάτων που κατέληξαν στη δημιουργία καλοσχηματισμένων κρυστάλλων τόσο της πρισματικής όσο και της ραβδόμορφης μορφολογίας της πρωτεΐνης RM 31A-P.

##### 4.5.2. Βελτίωση των πρισματικών κρυστάλλων.

Οι πρισματικοί κρυστάλλοι της πρωτεΐνης RM 31A-P εμφανίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM κιτρικού νατρίου pH 4,4, 100 mM NaCl και 37% v/v αιθανόλης. Η πρωτεΐνη στις συνθήκες αυτές δεν είναι διαλυτή.

Η πρώτη δοκιμή αναστολής της κατακρήμνισης έγινε με την αύξηση της συγκέντρωσης του κιτρικού νατρίου. Περίπου 250 mM κιτρικού νατρίου μπορούν να αναστείλουν τη δράση της αιθανόλης. Στο πρώτο πείραμα που σχεδιάστηκε εφαρμόστηκε η τεχνική της διαπίδωσης με τη χρήση των συσκευιών Zeprenzauer. Στο πείραμα αυτό ελαττώθηκε η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος από 250 σε 50 mM, παρουσία σταθερής συγκέντρωσης αιθανόλης και χλωριούχου νατρίου τόσο στη σταγόνα όσο και στη δεξαμενή. Το αποτέλεσμα του πειράματος ήταν απρόσμενο. Μέσα σε ένα βράδυ οι πυρήνες που είχαν προστεθεί στη σταγόνα της πρωτεΐνης είχαν μεγαλώσει σε διαστάσεις μετρήσιμες. Η μορφολογία των κρυστάλλων αυτών ήταν αρκετά καλή.

Στο παραπάνω πείραμα συνάντησα τις ακόλουθες δυσκολίες. Η συγκέντρωση του αποθεματικού ρυθμιστικού διαλύματος είναι 0,5 M. Σαν συνέπεια στις διαδικασίες της αραίωσης, για τη δημιουργία της σταγόνας του πρωτεϊνικού διαλύματος, αποτελεί μεγάλο ποσοστό του τελικού διαλύματος. Δεύτερη και σημαντικότερη δυσκολία αποτέλεσε το ερμητικό κλείσιμο της συσκευής Zeprenzauer χωρίς τη δημιουργία φυσαλίδων στο εσωτερικό της.

Το δεύτερο πρόβλημα λύθηκε με τη σχεδίαση των συσκευιών μικροδιαπίδωσης που προαναφέρθηκε. Το πρώτο πρόβλημα αντιμετωπίστηκε αρχικά με την αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος με τη βοήθεια θειικού αμμωνίου. Το θειικό αμμώνιο επιλέχθηκε σαν το καθαρότερο αλάτι που υπήρχε στο εργαστήριο. Περίπου 150 με 200 mM θειικού αμμωνίου είναι ικανά να αναστείλουν την κατακρήμνιση εξαιτίας της αιθανόλης. Γρήγορα το θειικό αμμώνιο αντικαταστάθηκε με χλωριούχο νάτριο καθώς το θειικό αμμώνιο σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δημιουργεί διαφασικά συστήματα με την αιθανόλη.

Μετά από πολλές δοκιμές βρέθηκε ότι η καλύτερη πειραματική διαδικασία εντυπώσεως για το μέγεθος των πρισματικών κρυστάλλων της πρωτεΐνης RM 31A-P είναι η ελάττωση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου στη

σταγόνα της πρωτεΐνης από 450 σε 250 mM παρουσία σταθερής συγκέντρωσης 37%v/v αιθανόλης 100 mM κίτρικού νατρίου pH 4,4, 1 mM DTT και 1 mM EDTA.

Μία ικανοποιητική πειραματική διαδικασία δημιουργίας πυρήνων πρισματικών κρυστάλλων της πρωτεΐνης RM 31A-P είναι η ελάττωση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου στη σταγόνα της πρωτεΐνης από 450 σε 200 mM παρουσία σταθερής συγκέντρωσης 37%v/v αιθανόλης 100 mM κίτρικού νατρίου pH 4,4, 1 mM DTT και 1 mM EDTA. Στη σταγόνα της πρωτεΐνης αναδεύεται έντονα ένας μικρός πρισματικός κρυστάλλος από τον οποίο αποχωρίζονται μικρότατα κομμάτια. Τα κομμάτια αυτά δίνουν στη συνέχεια πολλά μικροσκοπικά κρυστάλλια, τα οποία χρησιμοποιούνται στη διαδικασία της εντυρήνωσης.

#### 4.5.3. Βελτίωση των ραβδόμορφων κρυστάλλων.

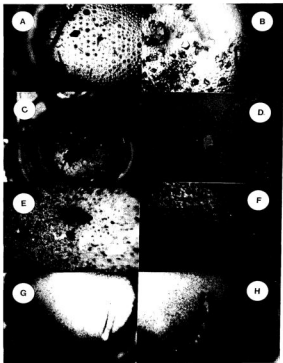
Ενδιαφέρον θεωρήθηκε επίσης το μέγεθος των ραβδόμορφων κρυστάλλων της πρωτεΐνης RM 31A-P. Μετά από μερικές δοκιμές και έχοντας την προηγούμενη εμπειρία από το μέγεθος των πρισματικών κρυστάλλων βρέθηκε ότι η καλύτερη πειραματική διαδικασία εντυρήνωσης για το μέγεθος των ραβδόμορφων κρυστάλλων είναι η ελάττωση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου στη σταγόνα της πρωτεΐνης από 500 σε 300 mM παρουσία σταθερής συγκέντρωσης 37%v/v αιθανόλης 100 mM κίτρικού νατρίου pH 4,8, 1 mM DTT και 1 mM EDTA.

Μία ικανοποιητική πειραματική διαδικασία δημιουργίας πυρήνων ραβδόμορφων κρυστάλλων της πρωτεΐνης RM 31A-P είναι η ελάττωση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου στη σταγόνα της πρωτεΐνης από 500 σε 250 mM παρουσία σταθερής συγκέντρωσης 37% v/v αιθανόλης 100 mM κίτρικού νατρίου pH 4,8, 1 mM DTT και 1 mM EDTA. Στη σταγόνα της πρωτεΐνης αναδεύεται έντονα ένας μικρός ραβδόμορφος κρυστάλλος, από τον οποίο αποχωρίζονται μικρότατα κομμάτια. Τα κομμάτια αυτά δίνουν στη συνέχεια πολλά μικροσκοπικά κρυστάλλια, τα οποία χρησιμοποιούνται στη διαδικασία της εντυρήνωσης.

#### 4.5.4. Άλλες προσπάθειες. Με την πάροδο του χρόνου οι κρυστάλλοι γερνάνε.

Εκτός από τα πρισματικά και τα ραβδόμορφα κρυστάλλια έγιναν κάποιες δοκιμές για το μέγεθος των ρομβικών πλασιδίων. Οι προσπάθειες αυτές δεν ήταν πολύ συστηματικές και δεν έχουν οδηγήσει σε κάποια τελική πειραματική διαδικασία.

Με την πάροδο του χρόνου (1-2 μήνες) οι πρισματικοί κρυστάλλοι γερνάνε και συνήθως εμφανίζονται ραβδόμορφοι. Γενικότερα οι κρυστάλλοι της πρωτεΐνης RM 31A-P έχουν μικρή διάρκεια ζωής.



**Εικόνα 4.4.** Κρύσταλλοι της πρωτεΐνης RM 31A-P.

A , B , C. Μικροί κρύσταλλοι. Στην ίδια σταγόνα είναι δυνατή η συνύπαρξη όλων των διαφορετικών τύπων κρυστάλλων. Στις σταγόνες A και B παρουσιάζονται σταγονίδια δεύτερης φάσης. Αυτό παρατηρείται όταν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι μεγάλη .

D , E. Πρισματικοί κρύσταλλοι (χωροομάδα C222<sub>1</sub>).

F , G , H. Ραβδόμορφοι κρύσταλλοι (χωροομάδα C2).

Γενικά, όπως έχει παρατηρηθεί και από άλλους (49), κρύσταλλοι που δημιουργούνται από οργανικά διαλύματα ή PEG γερνάνε εύκολα και παρουσιάζουν σχετικά μεγαλύτερη ευαισθησία στην ακτινοβολία (radiation damage) (11,38).

#### **4.5.5. Κρυστάλλωση της πρωτεΐνης RM Δ5. Ιδιαιτερότητες της μεταλλαγής αυτής (Εικόνα 4.5).**

Η πρωτεΐνη RM Δ5 κρυσταλλώνει επίσης στην περιοχή της γενικευμένης ενυδάτωσης. Μετά από αρκετές δοκιμές και έχοντας την προηγούμενη εμπειρία από το μέγεθος των κρυστάλλων της πρωτεΐνης RM 31A-P βρέθηκε ότι η καλύτερη πειραματική διαδικασία εντυρήνωσης για το μέγεθος των κρυστάλλων της πρωτεΐνης αυτής είναι η ελάττωση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου στη σταγόνα της πρωτεΐνης από 900 σε 800 mM παρουσία σταθερής συγκέντρωσης 45% v/v μεθανόλης 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος Bis-Tris pH 6,2, 1 mM DTT και 1 mM EDTA.

Μία ικανοποιητική πειραματική διαδικασία δημιουργίας πυρήνων κρυστάλλων της πρωτεΐνης RM Δ5 είναι η ελάττωση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου στη σταγόνα της πρωτεΐνης από 900 σε 750 mM παρουσία σταθερής συγκέντρωσης 45% v/v μεθανόλης 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος Bis-Tris pH 6,2, 1 mM DTT και 1 mM EDTA. Στη σταγόνα της πρωτεΐνης αναδεύεται έντονα ένας μικρός κρύσταλλος, από τον οποίο αποχωρίζονται μικρότατα κομμάτια. Τα κομμάτια αυτά δίνουν στη συνέχεια πολλά μικροσκοπικά κρυστάλλια, τα οποία χρησιμοποιούνται στη διαδικασία της εντυρήνωσης.

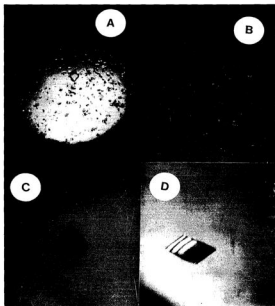
Η πρωτεΐνη RM Δ5 παρουσιάζει την ιδιαιτερότητα να χρειάζεται και μεγάλη συγκέντρωση μεθανόλης αλλά και μεγάλη συγκέντρωση αλατιού για να κρυσταλλώσει στις συγκεκριμένες συνθήκες συγκέντρωσης πρωτεΐνης, pH και θερμοκρασίας.

Οι κρύσταλλοι της πρωτεΐνης αυτής παρότι εμφανισιακά δείχνουν τέλειοι στην πραγματικότητα εμφανίζουν μεγάλη μοσαστικότητα (mosaicity) (11,38). Η δυσκολία στη βελτίωση των κρυστάλλων αυτών είναι η αδυναμία έλεγχου της ποιότητας των κρυστάλλων στο εργαστήριό μας εξαιτίας της έλλειψης των κατάλληλων οργάνων.

#### **4.5.6. Κρυστάλλωση της φυσικής ROP με την τεχνική της διαπίδωσης.**

Η δοκιμή της κρυστάλλωσης της φυσικής πρωτεΐνης ROP με την τεχνική της διαπίδωσης αποτέλεσε έλεγχο της νέας μεθοδολογίας.

Μετά από ελάχιστες δοκιμές βρέθηκε ότι η καλύτερη πειραματική διαδικασία εντυρήνωσης για το μέγεθος των κρυστάλλων της φυσικής πρωτεΐνης ROP είναι η ελάττωση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου στη σταγόνα της πρωτεΐνης από 600 σε 550 mM παρουσία σταθερής συγκέντρωσης 45% v/v μεθανόλης, 50 mM οξικός νατρίου pH 5,4, 1 mM DTT και 1 mM EDTA.



**Εικόνα 4.5.** Κρύσταλλοι της πρωτεΐνης RM Δ5.

A. Μικροί κρύσταλλοι, που χρησιμοποιούνται στην μακροεντυρήνωση.

B. Πολικρυσταλλικά σμειλέγματα.

C , D. Πρισματικοί κρύσταλλοι (χρωσομάδα C2).

Μία ικανοποιητική πειραματική διαδικασία δημιουργίας πυρήνων κρυστάλλων της φυσικής πρωτεΐνης ROP είναι η ελάττωση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου στη σταγόνα της πρωτεΐνης από 600 σε 450 mM παρουσία σταθερής συγκέντρωσης 45% v/v μεθανόλης, 50 mM οξικού νατρίου pH 5,4, 1 mM DTT και 1 mM EDTA. Στη σταγόνα της πρωτεΐνης αναδεύεται έντονα ένας μικρός κρύσταλλος, από τον οποίο αποχωρίζονται μικρότατα κομμάτια. Τα κομμάτια αυτά δίνουν στη συνέχεια πολλά μικροσκοπικά κρυσταλλάκια, τα οποία χρησιμοποιούνται στη διαδικασία της ενπυρήνωσης.

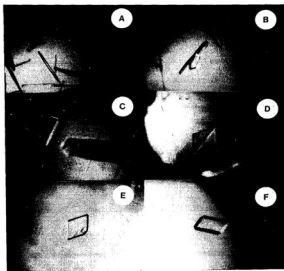
#### 4.5.7. Κρυστάλλωση της πρωτεΐνης PI (Εικόνα 4.6.).

Αρχικά δοκιμάστηκε η αναστολή της κατακρήμνισης της πρωτεΐνης PI από το PEG 6000 με τη χρήση χλωριούχου νατρίου. Η συγκέντρωση του PEG στην αρχή κρατήθηκε σταθερή στα 15% w/v. Για τη συγκέντρωση αυτή του PEG και για 50 mM ρυθμιστικό διαλύματος MES pH 6,4 η απαιτούμενη μεταβολή του χλωριούχου νατρίου για την δημιουργία κρυστάλλων είναι από 300 mM σε 150 mM. Το κρυσταλλικό πλέγμα των κρυστάλλων που δημιουργούνται από τα πειράματα αυτά είναι 30% μεγαλύτερο από ότι το αντίστοιχο πλέγμα για τους κρυστάλλους που δημιουργούνται παρουσία μεγαλύτερης συγκέντρωσης PEG. Καθένας από τους τρεις άξονες του αραιού πακεταρίσματος είναι 10% μεγαλύτερος από τους αντίστοιχους άξονες του πυκνού πακεταρίσματος.

Σημαντική αλλαγή στα πειράματα κρυστάλλωσης της PI είναι η χρησιμοποίηση του θεικού αμμωνίου σαν ρυθμιστή ηλεκτρολότης.

Μετά από πολλές δοκιμές βρέθηκε ότι η καλύτερη πειραματική διαδικασία ενπυρήνωσης για το μέγιστο των κρυστάλλων της πρωτεΐνης PI είναι η ελάττωση της συγκέντρωσης του θεικού αμμωνίου στη σταγόνα της πρωτεΐνης από 120 σε 80 mM παρουσία σταθερής συγκέντρωσης 17% w/v PEG 6000 και 20 mM κιτρικού νατρίου pH 6,4.

Μία ικανοποιητική πειραματική διαδικασία δημιουργίας πυρήνων της πρωτεΐνης PI είναι η ελάττωση της συγκέντρωσης του θεικού αμμωνίου στη σταγόνα της πρωτεΐνης από 120 σε 50 mM παρουσία σταθερής συγκέντρωσης 17% w/v PEG 6000 και 20 mM κιτρικού νατρίου pH 6,4. Στη σταγόνα της πρωτεΐνης αναδεύεται έντονα ένας μικρός κρύσταλλος, από τον οποίο αποχωρίζονται μικρότατα κομμάτια. Τα κομμάτια αυτά δίνουν στη συνέχεια πολλά μικροσκοπικά κρυσταλλάκια, τα οποία χρησιμοποιούνται στη διαδικασία της ενπυρήνωσης.



**Εικόνα 4.6.** Κρύσταλλοι της πρωτεΐνης P1.

A., B., C. Κακοσχηματισμένοι κρύσταλλοι. Πολυκρυσταλλικότητα.

D., E., F. Πηγματικοί κρύσταλλοι (χωροομάδα P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>).

#### **4.5.8. Η κρυστάλλωση της πρωτεΐνης PI εξαρτάται από την παρτίδα καθαρισμού. Οι κρύσταλλοι της πρωτεΐνης αυτής γερνάνε εύκολα.**

Ένα από τα προβλήματα στην κρυστάλλωση της PI είναι η διαφορετική συμπεριφορά που παρουσιάζει κάθε ξεχωριστή παρτίδα καθαρισμού της πρωτεΐνης.

Η ώριμη πρωτεΐνη PI διαχωρίζεται από την πρόδρομη πρωτεΐνη στη χρωματογραφία ανιόντοανταλλαγής (Q Sepharose). Οι δύο αυτές πρωτεΐνες έχουν μία περιοχή αλληλοεπικάλυψης. Είναι σημαντικό η καθαρή ώριμη PI να περιέχει όσο το δυνατόν μικρότερη πρόδρομη πρόδρομης πρωτεΐνης. Η πρόδρομη PI όχι μόνο δεν καταπονημίζεται με PEG αλλά δημιουργεί και δυφασικά συστήματα σε διαλύματα με PEG. Η παρουσία της πρόδρομης PI λειτουργεί αρνητικά την κρυστάλλωση της ώριμης πρωτεΐνης.

Οι κρύσταλλοι της PI γερνάνε μετά την πάροδο μερικών μηνών και είναι ευαίσθητοι στην ακτινοβολήση με ακτίνες X. Η πρωτεΐνη PI γερνάει αρκετά εύκολα και στο διάλυμα. Σαν συνέπεια μετά από μερικές εβδομάδες η καθαρή πρωτεΐνη δεν μπορεί να κρυσταλλωθεί.

#### **4.5.9. Κρυστάλλωση της μεθυλάσης BseCI (Εικόνα 4.7).**

Η μεθυλάση BseCI πρωτοκρυσταλλώθηκε, από τον Α. Αθανασιάδη, με την τεχνική της διάχυσης ατμών (κρεμαστή σταγόνα), από PEG. Στην προσπάθεια αυτή χρησιμοποιήθηκαν PEG διαφόρων μοριακών βαρών και έγιναν προσπάθειες για την βελτιστοποίηση τόσο της συγκέντρωσης του PEG όσο και του pH και της συγκέντρωσης διαφόρων άλλων μεταβλητών. Η ποιότητα των κρυστάλλων που δημιουργήθηκαν από όλες αυτές τις προσπάθειες δεν ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητική καθώς οι κρύσταλλοι αυτοί έδειχναν σημάδια γρήγορου μεγάλωματος.

Η πρωτεΐνη BseCI επιλέχθηκε σαν άλλη μία περίπτωση για τον έλεγχο της γενευσιμής ενάλυσης και του συστήματος διαπίδωσης.

Σταδιακά ελέγχθηκε η σχέση συγκέντρωσης PEG 6000 και θειικού αμμωνίου. Μετά από κάποιες δοκιμές βρέθηκε ότι η καλύτερη πειραματική διαδικασία εντυπώσεως για το μέγεθος των κρυστάλλων της πρωτεΐνης BseCI είναι η ελάττωση της συγκέντρωσης του θειικού αμμωνίου στη σταγόνα της πρωτεΐνης από 250 σε 180 mM παρουσία σταθερής συγκέντρωσης 10%w/v PEG 6000 και 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος Bis-Tris pH 6,6.

Μία ικανοποιητική πειραματική διαδικασία δημιουργίας πυρήνων κρυστάλλων της πρωτεΐνης BseCI είναι η ελάττωση της συγκέντρωσης του θειικού αμμωνίου στη σταγόνα της πρωτεΐνης από 250 σε 150 mM παρουσία σταθερής συγκέντρωσης 10%w/v PEG 6000 και 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος Bis-Tris pH 6,6. Στη σταγόνα της πρωτεΐνης αναδεύεται έντονα ένας μικρός κρύσταλλος, από τον οποίο αποχωρίζονται μικρότατα κομμάτια. Τα κομμάτια αυτά δίνουν στη συνέχεια



πολλά μικροσκοπικά κρυστάλλια, τα οποία χρησιμοποιούνται στη διαδικασία της εντυπώσεως.

Η πρωτεΐνη BseCI κάτω από τις ίδιες συνθήκες κρυστάλλωσης μπορεί να δώσει διάφορους τύπους κρυστάλλων.

#### **4.5.10. Η κρυστάλλωση της πρωτεΐνης BseCI εξαρτάται από την ομοιογένεια του δείγματος. Οι κρύσταλλοι της πρωτεΐνης αυτής γερνάνε εύκολα.**

Το νέο πρωτόκολλο καθαρισμού της πρωτεΐνης BseCI απαλλάσσει την καθαρή πρωτεΐνη από διάφορες πρωτεάσες και κυρίως από ένα πρωτεολυτικό κλάσμα της ίδιας της πρωτεΐνης. Το πρωτεολυτικό αυτό κλάσμα εξαφανίζεται με τη γρήγορη εκτέλεση των δύο πρώτων χρωματογραφικών βημάτων του καθαρισμού. Η ύπαρξη του πρωτεολυτικού κλάσματος δυσκολεύει, αν δεν παρεμποδίζει, την κρυστάλλωση της μεθυλάσης BseCI.

Η πρωτεΐνη BseCI δεν είναι διαλυτή σε διαλύματα απουσία ηλεκτρολυτών. Η πρωτεΐνη αυτή παρουσιάζει ισχυρή εναλάτωση. Με τις κλασικές γνώσεις για την κρυστάλλωση με PEG, τα βιομόρια πρέπει να διατηρούνται σε διαλύματα χαμηλής ιονικής ισχύος. Για την περίπτωση της BseCI αυτό είναι μάλλον αδύνατο. Με τη γνώση της γενικευμένης εναλάτωσης το βιομόριο μπορεί να διατηρείται σε διαλύματα αρκετά μεγάλης ιονικής ισχύος και με τη διαδικασία της διαπίδωσης να ελαττώνεται η συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών για την κρυστάλλωση. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα η BseCI διατηρείται σε διάλυμα 100 mM Bis-Tris pH 6,6 και 200 mM θειικού αμμωνίου. Στο διάλυμα αυτό η πρωτεΐνη ικανοποιεί τις απαιτήσεις της για ιοντική ισχύ και διατηρείται για αρκετό διάστημα στο ψυγείο.

Οι κρύσταλλοι της BseCI γερνάνε μετά την πάροδο μερικών μηνών και είναι ευαίσθητοι στην ακτινοβολήση με ακτίνες Χ.

#### **4.5.11. Γενικές παρατηρήσεις για την κρυστάλλωση στην περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης.**

Από όσα αναφέρθηκαν παραπάνω είναι φανερό ότι, η γενικευμένη εναλάτωση, όχι μόνο εξηγεί μία σειρά διαδικασιών, αλλά παράλληλα προτείνει τρόπους επίλυσης διαφόρων προβλημάτων που εμφανίζονται στα πειράματα των κρυστάλλωσης. Η διαπίδωση αποτελεί την καταλληλότερη τεχνική για την εκτέλεση των πειραμάτων στην περιοχή αυτή.

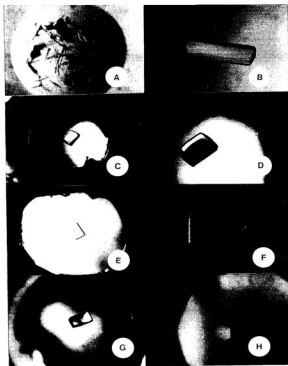
Η καθαρότητα του δείγματος που θέλουμε να κρυσταλώσουμε καθώς και των χημικών που χρησιμοποιούμε μπορεί να παίζει καθοριστικό ρόλο στην επιτυχία και την επαναληψιμότητα των πειραμάτων μας. Αυτή η παρατήρηση δεν είναι πάντα σημαντική. Τόσο στην περίπτωση της πρωτεΐνης RM 31A-P όσο και στην περίπτωση της πρωτεΐνης RM Δ5 η καθαρότητα δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα.

Η ταχύτητα της απομόνωσης, και ο σωστός σχεδιασμός του πρωτοκόλλου απομόνωσης ενός βιομορίου παίζουν κύριο ρόλο στην ποιότητα και στην καθαρότητα του βιομοριακού δείγματος. Η ποιότητα και η καθαρότητα ενός βιομοριακού δείγματος προδιαγράφει την επιτυχία μίας κρυσταλλογραφικής μελέτης.

Όλες οι παραπάνω διαδικασίες κρυστάλλωσης δεν διαρκούν πάνω από μία εβδομάδα. Η ταχύτητα της μεθοδολογίας που προαναφέρθηκε είναι σημαντική τόσο για τον προγραμματισμό όσο και για τον έλεγχο των διαφόρων βημάτων στη διαδικασία ενός κρυσταλλογραφικού θέματος.

Όπως έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές (49), οι κρυστάλλοι που δημιουργούνται από οργανικά διαλύματα ή PEG έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής και μεγαλύτερη ευαισθησία στην ακτινοβολία Χ συγκριτικά με τους κρυστάλλους που δημιουργούνται από εξαλάτωση.

Πολλές από τις πρωτεΐνες που κρυσταλλώνονται στην περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης χρειάζονται αλάτι για να διατηρηθούν. Με τη μεθοδολογία κρυστάλλωσης που προαναφέρθηκε η παρουσία αλατιού στο διάλυμα της πρωτεΐνης είναι θεμετή και ίσως επιβλητική.



**Εικόνα 4.7.** Κρυστάλλοι της πρωτεΐνης BseCI.

A. Τα αρχικά κρυσταλλάκια της BseCI, που εμφανίζονταν στα πειράματα κρεμαστής σταγόνας.

B. Ραβδόμορφος κρυστάλλος.

C. , D. , E. , F. , G. , H. Πρισματικοί κρυστάλλοι.

#### 4.6. Η γενικευμένη εξαλάτωση εξηγεί και προτείνει.

##### 4.6.1. Τρόπος δράσης της τεχνικής της διάχυσης αμιών στην περιοχή της γενικευμένης εξαλάτωσης. Αδυναμίες της τεχνικής.

Στο γενικευμένο διάγραμμα της εικόνας 4.8, με το βέλος Α φαίνεται η πορεία που ακολουθείται από την τεχνική της διάχυσης αμιών στα πειράματα εξαλάτωσης παρουσία οργανικών διαλυτών.

Η γενικευμένη εξαλάτωση προβλέπει προσέγγιση στην μετασταθερή περιοχή με αύξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη είτε με ελάττωση της συγκέντρωσης των μειωτών ιοντικής ισχύος (Βέλη Β και C). Η έλλειψη της γνώσης αυτής δεν επιτρέπει σχεδιασμό πειραμάτων ελάττωσης της συγκέντρωσης των μειωτών χωρίς την ταυτόχρονη ελάττωση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη. Ακόμη περισσότερο δεν αφήνει περιθώρια σχεδιασμού πειραμάτων ελάττωσης της συγκέντρωσης του μειωτή, παρουσία σταθερής ή και αυξανόμενης συγκέντρωσης ηλεκτρολύτη.

##### 4.6.2. Τα πειράματα με τη λυσοζύμη ρίχνουν φως στην περιοχή της γενικευμένης εξαλάτωσης.

Παρατηρώντας τη συμμετοφορά της λυσοζύμης στα πειράματα εξαλάτωσης που έγιναν για τη δημιουργία του Πίνακα 2.1, διαπιστώθηκε ότι, η λυσοζύμη στις συνθήκες των πειραμάτων αυτών κρυσταλλώνει καλύτερα παρουσία μειωτών ιοντικής ισχύος, παρά παρουσία μόνο των ηλεκτρολυτών. Δηλαδή οι κρύσταλλοι που δημιουργούνται παρουσία 1,5 M χλωριούχου νατρίου είναι πολύ κακής ποιότητας και κυρίως είναι πολικρυσταλλικοί. Οι κρύσταλλοι που δημιουργούνται παρουσία 1,5 M χλωριούχου νατρίου και 5% w/v PEG 6000 είναι μονοκρύσταλλοι, καλοσηματισμένοι και μεγάλοι σε όγκο. Η επιλογή της ζώνης πυρήνωσης και της μετασταθερής ζώνης στη συγκεκριμένη θέση στο γενικευμένο διάγραμμα είναι συνάετα των παρατηρήσεων μου από τα πειράματα στη λυσοζύμη. Είναι λοιπόν φανερό ότι για την κρυστάλλωση της λυσοζύμης στις συνθήκες των πειραμάτων του Πίνακα 2.1, οι βέλτιστες πειραματικές προσεγγίσεις παρουσιάζονται από τα βέλη Β, C και D.

##### 4.6.3. Παρατηρήσεις από τη βιβλιογραφία βρίσκουν πλέον εξήγηση από τη γενικευμένη εξαλάτωση.

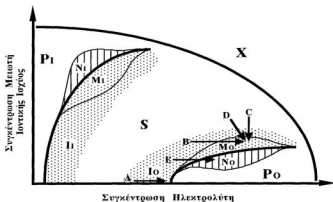
Ο Mac Pherson στο βιβλίο του, Preparation and analysis of protein crystals (29), προτείνει την προσθήκη οργανικών διαλυτών, όπως διοξάνης, σαν τοξικό μέσο για τη βελτίωση των πειραμάτων εξαλάτωσης με θειικό αμμώνιο.

Η παρουσία γλυκερόλης ή ζάχαρης σε πειράματα κρυστάλλωσης με θειικό αμμώνιο βελτιώνει την κρυστάλλωση (85).

Αρκετά πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι η παρουσία PEG 400 σε πειράματα εξαλάτωσης με θειικό αμμώνιο βελτιώνουν την κρυστάλλωση (86).

Είναι αρκετά εύκολο να καταλάβουμε ότι όλοι αυτοί οι ερευνητές ψηλαφούν τη γενικευμένη εξαλάτωση.

Τώρα πλέον είναι γνωστό ότι οι μειωτές ιοντικής ισχύος αναστέλλουν την κατακρήμνιση στην περιοχή της εξαλάτωσης. Αν λοιπόν κάποια βιομόρια όπως η λυσοζύμη έχουν την ζώνη πυρήνωσης τους και τη μετασταθερή ζώνη τους μακριά από τον άξονα του ηλεκτρολύτη η κρυστάλλωση των βιομορίων αυτών βελτιώνεται ή γίνεται δυνατή μόνο παρουσία μειωτών.



**Εικόνα 4.8.** Διαδρομές κρυστάλλωσης στην γενικευμένη εξαλάτωση.

Η διαδρομή Α αντιστοιχεί στην συνηθισμένη τεχνική της διάχυσης ατμών.

Οι διαδρομές Β, C και D αντιστοιχούν σε πειράματα κρυστάλλωσης με ενπυρήνωση.

Οι διαδρομές αυτές είναι εφικτές μόνο με τη χρήση συσκευών μικροδιαπίδυσης.

Η διαδρομή Ε αντιστοιχεί σε πειράματα δημιουργίας πυρήνων.

#### **4.7. Σχεδιασμός πειραμάτων κρυστάλλωσης στην περιοχή της γενικευμένης εξαλάτωσης.**

##### **4.7.1. Κρυστάλλωση της νιτροδορεδουκτάσης NIR.**

Η πρωτεΐνη NIR κρυσταλλώνεται με την τεχνική της διάχυσης ατμών (καθιστή σταγόνα). Η κρυστάλλωση της πρωτεΐνης αυτής έγινε από το εργαστήριο του Κ. Πετράτου. Η κρυστάλλωση γίνεται σε 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου pH 5,4, με αύξηση της συγκέντρωσης του θειικού αμμωνίου στη σταγόνα από 20% σε 45% της κλίμακας κορεσμού του αλατιού.

##### **4.7.2. Έλεγχος της συμπεριφοράς της πρωτεΐνης NIR σε πειράματα ενυδρήνωσης συναρτήσει της συγκέντρωσης PEG 200.**

Χρησιμοποίησα μικρούς κρυστάλλους της πρωτεΐνης NIR σε πειράματα ενυδρήνωσης παρουσία θειικού αμμωνίου και PEG 200. Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε το σύστημα μικροδιαλύσεως που προαναφέρθηκε.

Η συνθήκες για τα πειράματα είναι στατικές. Δηλαδή τόσο η σταγόνα όσο και η δεξαμενή περιέχουν την ίδια συγκέντρωση 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου pH 5,4, την ίδια συγκέντρωση 45% της κλίμακας κορεσμού του θειικού αμμωνίου και την ίδια συγκέντρωση PEG 200.

Δημιουργήθηκαν τέσσερις διαφορετικές συνθήκες πειραμάτων που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την συγκέντρωση του PEG 200. Η πρώτη συνθήκη δεν περιέχει PEG 200. Η δεύτερη περιέχει 2% v/v PEG 200, η τρίτη 4% v/v PEG 200 και η τέταρτη 6% v/v PEG 200. Οι σταγόνες της πρωτεΐνης φυγοκεντρώνται πριν τη διαδικασία της ενυδρήνωσης.

Στην πρώτη συνθήκη όπου δεν υπάρχει PEG 200 παρατηρείται έντονο θόλωμα. Δηλαδή η πρωτεΐνη είναι σε κατάσταση υπερκορεσμού και δημιουργεί ίζημα. Μετά από δύο μέρες η σταγόνα γεμίζει από κινουόγρια κρυστάλλαινα τα οποία μεγαλώνουν σαν πολικρυσταλλικοί σχηματισμοί. Η συνθήκη αυτή είναι στην περιοχή της ζώνης πυρήνωσης.

Στην δεύτερη συνθήκη όπου υπάρχει 2% v/v PEG 200 η πρωτεΐνη δεν δημιουργεί ίζημα. Μετά από δύο μέρες η σταγόνα γεμίζει από κινουόγρια κρυστάλλαινα τα οποία μεγαλώνουν σαν πολικρυσταλλικοί σχηματισμοί. Η συνθήκη αυτή είναι στην περιοχή της ζώνης πυρήνωσης.

Στην τρίτη συνθήκη όπου υπάρχει 4% v/v PEG 200 η πρωτεΐνη δεν δημιουργεί ίζημα. Μετά από δύο μέρες στη σταγόνα εμφανίζονται κινουόγρια κρυστάλλαινα τα οποία μεγαλώνουν σε όγκο αλλά ακόμα εμφανίζουν πολικρυσταλλικότητα. Η πολικρυσταλλικότητα αυτή δεν είναι στο βαθμό των δύο προηγούμενων πειραμάτων. Η συνθήκη αυτή είναι στην περιοχή της ζώνης πυρήνωσης αλλά στα όρια με την μετασταθερή ζώνη.

Στην τέταρτη συνθήκη όπου υπάρχει 6% v/v PEG 200 η πρωτεΐνη δεν δημιουργεί ίζημα. Μετά από δύο μέρες στη σταγόνα δεν εμφανίζονται καινούργια κρυσταλλάκια. Το αρχικό κρυσταλλάκι που προστέθηκε στην εντυρήνωση δεν φαίνεται να έχει μεγαλώσει. Η συνθήκη αυτή είναι στην περιοχή της μετασταθερής ζώνης και μάλιστα στα όρια με την διαλυτή περιοχή.

Η τέταρτη συνθήκη αποτελεί ιδανική αρχική συνθήκη για τα πειράματα εντυρήνωσης της πρωτεΐνης NIR.

#### 4.8. Γενικές παρατηρήσεις.

**4.8.1. Οι κρύσταλλοι είναι συνήθως εξαρτημένοι από τις ιδιότητες της περιοχής στην οποία δημιουργήθηκαν.**

Όπως γίνεται φανερό από διάφορες βιβλιογραφικές αναφορές κρύσταλλοι που δημιουργούνται στην περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης δεν μπορούν να διατηρηθούν στην περιοχή της γενικευμένης εξαλάτωσης και αντίθετα (38,97).

Η παρατήρηση αυτή εξηγείται από τις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις που δημιουργούν τους κρυστάλλους στις δύο διαφορετικές περιοχές. Στην περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης το κρυσταλλικό πλέγμα συγκρατείται κυρίως από ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ενώ στην περιοχή της γενικευμένης εξαλάτωσης το κρυσταλλικό πλέγμα συγκρατείται κυρίως από πολικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Η μεταφορά των κρυστάλλων από τη μία περιοχή στην άλλη είναι πιθανώς δυνατή αν το κρυσταλλικό πλέγμα δημιουργείται από μερική συμμετοχή όλων των τύπων αλληλεπιδράσεων. Η σταδιακή διαδικασία είναι απαραίτητη για την επιτυχία της μεταφοράς των κρυστάλλων σε διαλύματα διαφορετικού τύπου.

**4.8.2. Οι κρύσταλλοι της πρωτεΐνης RM 31A-P είναι πολύ ευαίσθητοι στις αλλαγές του μητρικού διαλύματος.**

Οι κρύσταλλοι της πρωτεΐνης RM 31A-P είναι πολύ ευαίσθητοι στις αλλαγές του μητρικού διαλύματος. Αντικατάσταση της αιθανόλης με άλλους οργανικούς διαλύτες ή PEG είναι μάλλον αδύνατη, ιδίως όταν οι κρύσταλλοι αυτοί είναι σχετικά μεγάλοι. Αύξηση της ιοντικής ισχύος στο διάλυμα δημιουργεί ροημές στους κρυστάλλους ή τους λειώνει. Η μεταφορά των κρυστάλλων της πρωτεΐνης αυτής από την περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης στην περιοχή της γενικευμένης εξαλάτωσης οδηγεί πάντα σε καταστροφή των κρυστάλλων.



## 4.9. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα. (11,29,38,88-94)

### 4.9.1. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα για τους κρυστάλλους της πρωτεΐνης RM 31A-P.

Τόσο για τους πρισματικούς όσο και για τους ραβδόμορφους κρυστάλλους της πρωτεΐνης RM 31A-P μετρήθηκαν κρυσταλλογραφικά δεδομένα τόσο στο περιθλασίμετρο του εργαστηρίου όσο και σε πηγές ακτίνων X περιστρεφόμενη ανόδου και ακτίνες X παραγόμενες από πηγές κυκλικής επιτάχυνσης ηλεκτρονίων (σύγχροτρο). Οι μετρήσεις των δεδομένων έγιναν, από σημειακούς ανιχνευτές ακτινοβολίας, από ανιχνευτές δίσκου ειδήλου (Image plate detectors) και από ανιχνευτές περιοχής (Area detectors). Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τα πακέτα προγραμμάτων XDS (91) και DENZO (92).

Οι πρισματικοί κρυστάλλοι ανήκουν στο χωροσύστημα (space group) C222<sub>1</sub>. Στην ασύμμετρη μονάδα του πλέγματος υπάρχει ένα μονομερές του μορίου. Οι σταθερές της στοιχειώδους κυψελίδας a,b,c μεταβάλλονται σημαντικά από κρυστάλλο σε κρυστάλλο και αυτό δημιουργεί προβλήματα ανισομορφισμού. Αρκετοί από τους κρυστάλλους του τύπου αυτού παρουσιάζουν μεγάλη μωσαϊκότητα. Στον πίνακα 4.1. δίνονται οι πληροφορίες που αφορούν τα κρυσταλλικά δεδομένα του χωροσυστήματος C222<sub>1</sub>.

Οι ραβδόμορφοι κρυστάλλοι ανήκουν στο χωροσύστημα (space group) C2. Στην ασύμμετρη μονάδα του πλέγματος υπάρχουν δύο μονομερή του μορίου. Οι σταθερές της στοιχειώδους κυψελίδας στο χωροσύστημα αυτό δεν μεταβάλλονται σημαντικά. Στον πίνακα 4.1. δίνονται οι πληροφορίες που αφορούν τα κρυσταλλικά δεδομένα του χωροσυστήματος C2.

### 4.9.2. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα για τους κρυστάλλους της πρωτεΐνης RM Δ5.

Κρυσταλλογραφικά δεδομένα για τους κρυστάλλους της πρωτεΐνης RM Δ5 μετρήθηκαν σε πηγές ακτίνων X περιστρεφόμενης ανόδου. Οι μετρήσεις των δεδομένων έγιναν από ανιχνευτές δίσκου ειδήλου (Image plate detectors). Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το πακέτο προγραμμάτων XDS (91).

Οι κρυστάλλοι της πρωτεΐνης RM Δ5 ανήκουν στο χωροσύστημα (space group) C2. Στην ασύμμετρη μονάδα του πλέγματος υπάρχουν δύο μονομερή του μορίου. Οι σταθερές της στοιχειώδους κυψελίδας δεν μεταβάλλονται. Σημαντικό πρόβλημα των κρυστάλλων αυτών είναι η μεγάλη μωσαϊκότητα και ο μεγάλος θερμικός διαχειόμενος σπασδαμός. Στον πίνακα 4.1. δίνονται οι πληροφορίες που αφορούν τα κρυσταλλικά δεδομένα του χωροσυστήματος C2.

#### 4.9.3. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα για τους κρυστάλλους της πρωτεΐνης PI.

Κρυσταλλογραφικά δεδομένα για τους κρυστάλλους της πρωτεΐνης PI μετρήθηκαν σε πηγές ακτίνων X περιστρεφόμενης ανόδου και ακτίνες X παραγόμενες από πηγές κυκλικής επιτάχυνσης ηλεκτρονίων (σύγχροτρο). Οι μετρήσεις των δεδομένων έγιναν από ανιχνευτές δίσκου ειδώλου (Image plate detectors). Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τα πακέτα προγραμμάτων XDS (91) και DENZO (92).

Οι κρύσταλλοι της πρωτεΐνης PI ανήκουν στο χωροσυστήμα (space group)  $P2_12_12_1$ . Στην ασύμμετρη μονάδα του πλέγματος υπάρχει ένα μόριο της πρωτεΐνης. Οι σταθερές της στοιχειώδους κυψελίδας  $a, b, c$  μεταβάλλονται σημαντικά από κρύσταλλο σε κρύσταλλο και αυτό δημιουργεί προβλήματα ανισομορφισμού. Σημαντικό πρόβλημα των κρυστάλλων αυτών είναι η μεγάλη μωσαϊκότητα και η μεγάλη εναισθησία τους στην ακτινοβολία X. Στον πίνακα 4.1, δίνονται οι πληροφορίες που αφορούν τα κρυσταλλικά δεδομένα του χωροσυστήματος  $P2_12_12_1$ .

#### 4.9.4. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα για τους κρυστάλλους της πρωτεΐνης BseCI.

Κρυσταλλογραφικά δεδομένα για τους κρυστάλλους της πρωτεΐνης BseCI μετρήθηκαν σε πηγές ακτίνων X περιστρεφόμενης ανόδου και ακτίνες X παραγόμενες από πηγές κυκλικής επιτάχυνσης ηλεκτρονίων (σύγχροτρο). Οι μετρήσεις των δεδομένων έγιναν από ανιχνευτές δίσκου ειδώλου (Image plate detectors). Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τα πακέτα προγραμμάτων XDS (91) και DENZO (92).

Οι κρύσταλλοι της πρωτεΐνης BseCI ανήκουν σε διάφορα χωροσυστήματα (space group). Στον πίνακα 4.1, δίνονται οι πληροφορίες που αφορούν τα κρυσταλλικά δεδομένα των διαφόρων τύπων κρυστάλλων.

Πρωτεύωνη	Χορο-ομάδα	Διαστάσεις στοιχειώδους κυψελίδας						$V_M$ (Å/Da)	Διαπερατότητα (Å)	Παράγω- ντας R	Πληρότητα Δεδομένων (%)
		a (Å)	b (Å)	c (Å)	α	β	γ				
RM 31A-P Nat 1	C222 <sub>1</sub>	30.4	42.1	81.4	90.0	90.0	90.0	1.80	40 - 2.0	-	100%
RM 31A-P Nat 2	C222 <sub>1</sub>	30.7	42.7	79.4	90.0	90.0	90.0	1.79	15 - 1.7	9.9	80%
RM 31A-P K1 Ανώμαλος	C222 <sub>1</sub>	30.2	42.5	81.1	90.0	90.0	90.0	1.79	15 - 2.0	2.6	95% 51%
RM 31A-P PDDC 1	C222 <sub>1</sub>	30.8	42.5	81.4	90.0	90.0	90.0	1.83	15 - 2.0	5.7	90%
RM 31A-P PDDC 2 Ανώμαλος	C222 <sub>1</sub>	30.6	42.3	81.5	90.0	90.0	90.0	1.81	15 - 2.8	8.5	93% 43%
RM 31A-P K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> 1 Ανώμαλος	C222 <sub>1</sub>	31.0	42.7	81.8	90.0	90.0	90.0	1.86	15 - 2.0	6.0	97% 96%
RM 31A-P K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> 2 Ανώμαλος	C222 <sub>1</sub>	30.8	43.0	81.7	90.0	90.0	90.0	1.86	15 - 2.0	7.9	99% 98%
RM 31A-P SmCl <sub>3</sub> Ανώμαλος	C222 <sub>1</sub>	30.5	42.5	81.0	90.0	90.0	90.0	1.81	15 - 2.0	2.5	97% 94%
RM 31A-P UNO <sub>3</sub> 1 Ανώμαλος	C222 <sub>1</sub>	30.8	42.6	82.1	90.0	90.0	90.0	1.86	15 - 2.0	5.9	98% 94%
RM 31A-P Nat	C2	94.4	24.1	64.4	90.0	130.6	90.0	1.91	20 - 1.7	4.1	99%
RM Δ5 Nat	C2	54.5	42.6	51.8	90.0	104.7	90.0	2.18	15 - 2.3	16.7	97%
PI Nat 1	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	59.0	83.6	128.2	90.0	90.0	90.0	2.71	15 - 3.0	14.8	87%
PI UNO <sub>3</sub> 1 Ανώμαλος	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	58.7	83.6	126.4	90.0	90.0	90.0	2.66	15 - 3.0	19.83	91% 91%
PI UNO <sub>3</sub> 2	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	55.0	74.0	117.6	90.0	90.0	90.0	1.81	7 - 3.3	8.6	95%
BseCl Nat 1	P2 <sub>1</sub>	53.8	86.0	152.1	90.0	95.1	90.0	2.62	20 - 2.5	4.7	97%
BseCl Nat 2	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	53.7	85.8	149.6	90.0	90.0	90.0	2.58	-	-	-

**Πίνακας 4.1.** Πληροφορίες για τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα των πρωτεύωνων RM 31A-P, RM Δ5, PI και BseCl.

a,b,c,α,β,γ οι σταθερές της στοιχειώδους κυψελίδας.

$V_M$  (93) η σταθερά του Matthews.

#### **4.10. Προσπάθειες για την επίλυση των δομών.**

##### **4.10.1. Η πρωτεΐνη RM 31A-P.**

Τόσο για τα δεδομένα του χωροσυστήματος C222<sub>1</sub> όσο και για τα δεδομένα του χωροσυστήματος C2 εφαρμόστηκε η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης για την επίλυση της δομής. Η μέθοδος αυτή παρόλες τις διαφορετικές δοκιμές δεν έδωσε κάποια λύση. Η αποτυχία αυτή είναι ένδειξη της αλλαγής του μορίου σε σύγκριση με το μόριο της φυσικής πρωτεΐνης.

Η αμέσως επόμενη επιλογή ήταν η δημιουργία ισόμορφων παραγώγων των κρυστάλλων της πρωτεΐνης (11,29,94). Διάφορα βαριά μέταλλα δοκιμάστηκαν στη διαδικασία αυτή. Τελικά η πλατίνα (PDDC) φαίνεται να δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Ο ανισομορφισμός των διαφορετικών κρυστάλλων της πρωτεΐνης αυτής αποτελεί ένα σοβαρό πρόβλημα για τη μέθοδο της ισόμορφης αντικατάστασης.

##### **4.10.2. Η πρωτεΐνη RM Δ5.**

Για τα δεδομένα των κρυστάλλων της πρωτεΐνης RM Δ5 εφαρμόστηκε η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης για την επίλυση της δομής. Η μέθοδος αυτή παρόλες τις διαφορετικές δοκιμές δεν έδωσε κάποια ικανοποιητική λύση. Η αποτυχία αυτή είναι ένδειξη της αλλαγής του μορίου σε σύγκριση με το μόριο της φυσικής πρωτεΐνης.

##### **4.10.3. Η πρωτεΐνη PI.**

Για τα δεδομένα των κρυστάλλων της πρωτεΐνης PI εφαρμόστηκε η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης για την επίλυση της δομής. Το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το μοντέλο της ομόλογης πρωτεΐνης OPRA (69). Η μέθοδος αυτή έχει δώσει κάποια λύση.

## 5. Συζήτηση

## 5.1. Η πραγματική σειρά των γεγονότων.

### 5.1.1. Η συμβολή των πρωτεϊνών RM 31A-P και PI.

Τόσο η πρωτεΐνη RM 31A-P όσο και η πρωτεΐνη PI αποδείχθηκαν δύσκολες περιπτώσεις για κρυστάλλωση, σύμφωνα με τις ήδη γνωστές θεωρίες, μεθοδολογίες και τεχνικές. Εξαιτίας της δυσκολίας αυτής χρειάστηκε να καταλάβο καλύτερα τις θεωρίες και του νόμους που διέπουν την κρυστάλλωση των βιομορίων και συνεπώς της διαλυτότητας και των αλληλεπιδράσεων των βιομορίων. Απόρροια αυτού ήταν η δημιουργία του γενικευμένου διαγράμματος διαλυτότητας και η ανάλυση των συνεπειών του.

### 5.1.2. Η σγκυρία.

Στα άρθρα του Alexander McPherson για τις κρυσταλλώσεις με PEG, τα αλάτια έχουν πάντοτε την έννοια του δηλητηρίου της κρυστάλλωσης. Ειδικά στα πειράματα κρυστάλλωσης με PEG, οι συγκεντρώσεις των αλατιών και των ρυθμιστικών ενώσεων προτείνεται να διατηρούνται χαμηλές.

Σε μία παράλληλη προσπάθεια να δοκιμάσω πειράματα κρυστάλλωσης με μείωση της αλατότητας και να αλλάξω δραστικά τη συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος στα πειράματα κρυστάλλωσης με αιθανόλη της πρωτεΐνης RM 31A-P, παρατήρησα έκπληκτος ότι παρουσία μεγάλης συγκέντρωσης ρυθμιστικού διαλύματος το διάλυμα της πρωτεΐνης δεν θόλωνε για την ίδια συγκέντρωση αιθανόλης. Οι προτάσεις του A. McPherson και η μελέτη των ιδιοτήτων της εναλάτωσης σε συνδυασμό με αυτή την παρατήρηση, καθώς και η αμυδρή ανάμνηση αντίστοιχης αναστολής της κατακρήμνισης της PI από αλάτι, οδήγησαν σε μία σειρά σύντομων πειραμάτων κατακρήμνισης. Δοκιμάστηκε άμεσα τόσο η αναστολή με αλάτι της κατακρήμνισης της PI από PEG, όσο και η αναστολή με αλάτι της κατακρήμνισης της RM 31A-P από αιθανόλη. Οι ενδείξεις ήταν αποκαλυπτικές. Κατευθείαν αποφάσισα να χρησιμοποιήσω στα πειράματα κρυσταλλώσεων την ελάττωση της αλατότητας παρουσία σταθερής συγκέντρωσης αιθανόλης για την περίπτωση της RM 31A-P και την ελάττωση της αλατότητας παρουσία σταθερής συγκέντρωσης PEG για την περίπτωση της PI. Η σκέψη ότι η αιθανόλη και το PEG δημιουργούν έλλειψη ηλεκτρολύτη ήταν πλέον η αχρή της μελέτης. Η λυσοζύμη και η ριβονουκλεάση Α αποτέλεσαν στη συνέχεια τα μόρια μοντέλα για τη λεπτομερέστερη μελέτη της γενικευμένης εναλάτωσης και εξελάττωσης.

## 5.2. Συμπεράσματα

### 5.2.1. Κατακρήμιση.

Η κατακρήμιση είναι μία από τις πρώτες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των βιομορίων. Είναι ήδη γνωστό από τη βιβλιογραφία (15) ότι η αυθανόλη αναστέλλει την κατακρήμιση με εξάλαιψη. Η αιτία όμως για την οποία συμβαίνει κάτι τέτοιο δεν ήταν γνωστή μέχρι τώρα.

Η αντιμετώπιση των οργανικών διαλυτών και του PEG σαν μειωτές ιοντικής ισχύος έχει μεγάλη επίδραση τόσο στην κατανόηση της κατακρήμισης όσο και στην εφαρμογή της. Ο σχεδιασμός πειραμάτων κατακρήμισης με τη σωστή επιλογή ηλεκτρολυτών και μειωτών μπορεί να επιφέρει θεαματικά αποτελέσματα.

### 5.2.2. Χρωματογραφία.

Η χρωματογραφία αποτελεί ευκαίριστη μέθοδο απομόνωσης των βιομορίων. Στη χρωματογραφία χρησιμοποιούνται οι γενικές και ειδικές ιδιότητες των βιομορίων. Η αντιμετώπιση των οργανικών διαλυτών και του PEG σαν μειωτές της ιοντικής ισχύος έχει μεγάλη επίδραση και στις χρωματογραφικές εφαρμογές.

Η παρουσία μειωτών στην ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία μεταθέτει την έκλυση των βιομορίων σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλατιού. Παράλληλα επιτρέπει σχεδιασμό πειραμάτων όπου η έκλυση των βιομορίων γίνεται με μείωση του μειωτή.

Η παρουσία μειωτών στην υδρόφοβη χρωματογραφία επισπεύδει την έκλυση των βιομορίων προς μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλατιού. Παράλληλα, επιτρέπει σχεδιασμό πειραμάτων όπου η έκλυση των βιομορίων γίνεται με αύξηση του μειωτή. Καθώς οι ιδιότητες των βιομορίων είναι ιδιοχαρακτηριστικές είναι δυνατό να σχεδιαστούν πειράματα χρωματογραφίας με εξαιρετικά αποτελέσματα.

Το PEG επιφέρει έκλυση των βιομορίων από τα υδρόφοβα χρωματογραφικά υποστρώματα. Άρα, το PEG αποτελεί ανταγωνιστή των υδρόφοβων υποστρωμάτων. Αναμένεται λοιπόν ότι, το PEG σαν χρωματογραφικό υπόστρωμα θα πρέπει να δρα σαν υπόστρωμα υδροφοβικότητας. Πράγματι λοιπόν, PEG αμνητοποικημένο σε οξείδιο του πυριτίου δρα ως υδρόφοβο υπόστρωμα (95).

Ο υδροξυλαπατίτης είναι χρωματογραφικό υπόστρωμα μεικτών φορτίων. Το υπόστρωμα αυτό περιέχει αρνητικές ομάδες φωσφορικών και θετικές ομάδες ασβεστίου. Είναι γνωστό ότι, η παρουσία μειωτών σε ένα διάλυμα απξάνει τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Άρα, ένα διάλυμα μειωτών σε υλικό υδροξυλαπατίτη αναμένεται να επιφέρει συρρίνωση του υλικού. Πράγματι, για διαλύματα PEG έχει παρατηρηθεί στο εργαστήριο έντονη συρρίνωση του υδροξυλαπατίτη.

Τα υλικά για την χρωματογραφία μοριακής διήθησης είναι πολικά και αφόρτυστα. Η παρουσία μεγάλης συγκέντρωσης ηλεκτρολυτών αυξάνει τις πολικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Άρα, για τα υλικά της μοριακής διήθησης αναμένεται συρρίκνωση παρουσία μεγάλης συγκέντρωσης ηλεκτρολυτών. Αυτή είναι μία γνωστή ιδιότητα για τα περισσότερα από τα υλικά αυτά.

### 5.2.3. Κρυστάλλωσεις.

Η κρυστάλλωση αποτελεί ειδική περίπτωση κατακρήμνισης. Η αντιμετώπιση των οργανικών διαλυτών και του PEG σαν μειωτές της ιοντικής ισχύος έχει μεγάλη επίδραση και στην κρυστάλλωση.

Πολλές βιβλιογραφικές αναφορές παρατηρούν τόσο τη γενικευμένη εναλάτωση όσο και την γενικευμένη εξαλάτωση.

Η κλασική παρατήρηση του A. McPherson, ότι η μεγάλη ιοντική ισχύ είναι δηλητηριώδης για τα πειράματα με PEG, όχι μόνο με βοήθησε να καταλάβω τη δράση των μειωτών της ιοντικής ισχύος, αλλά παράλληλα αποτελεί υποστήριξη της όλης θεώρησης.

Η εικόνα 5.1. (85) δείχνει την επίδραση της ζάχαρης και της γλυκερόλης σε πειράματα εξαλάτωσης. Οι σταγόνες του βιομορίου παρουσία ζάχαρης αλλά κυρίως γλυκερόλης δεν εμφανίζουν ίζημα. Τόσο η ζάχαρη όσο και η γλυκερόλη αναστέλλουν την εξαλάτωση και βελτιώνουν την κρυστάλλωση.

Στην περίπτωση της εναλάτωσης, οι μειωτές δημιουργούν συνθήκες έλλειψης ιόντων και αυξάνουν τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Με αύξηση της συγκέντρωσης των ηλεκτρολυτών στο διάλυμα είναι δυνατή η αναστολή της κατακρήμνισης.

Στην περίπτωση της εξαλάτωσης, η έλλειψη μορίων νερού αυξάνει τις πολικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και σαν συνέπεια την κατακρήμνιση. Οι μειωτές αυξάνουν τη δημιουργία ιοντικών ζευγών, ελευθερώνοντας μόρια νερού από τη σύμπλοξη σφαίρα των μεμονωμένων ιόντων που δημιουργούν το ζεύγος. Παρουσία μειωτών, η έλλειψη μορίων νερού που εμφανίζεται στην εξαλάτωση μειώνεται και άρα η κατακρήμνιση αναστέλλεται.

Η δημιουργία των ουσκευών μικροδιαπίδυσης, επέτρεψε την εφαρμογή των συνεπειών της γενικευμένης εναλάτωσης και εξαλάτωσης στην κρυστάλλωση.

Η κρυστάλλωση, στην περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης, οφείλεται κυρίως σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Ο έλεγχος της συγκέντρωσης του αλατού, στα πειράματα κρυστάλλωσης στην περιοχή αυτή, επηρεάζει άμεσα την αιτία της δημιουργίας των κρυστάλλων.

Η κρυστάλλωση στην περιοχή της γενικευμένης εξαλάτωσης οφείλεται κυρίως σε πολικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Ο έλεγχος της συγκέντρωσης των μειωτών



ιοντικής ισχύος, στα πειράματα κρυστάλλωσης στην περιοχή αυτή, επηρεάζει άμεσα την αιτία της δημιουργίας των κρυστάλλων.

#### **5.2.4. Οργάνωση της γνώσης για τα βιομόρια κάτω από το πρίσμα των ηλεκτροστατικών και των πολικών αλληλεπιδράσεων.**

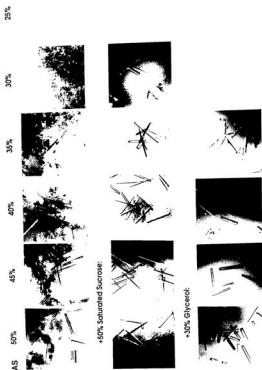
Οι ηλεκτροστατικές και οι πολικές αλληλεπιδράσεις δημιουργούν αντίστοιχα τα φαινόμενα στην περιοχή της γενικευμένης εναλάτωσης και εξαλάτωσης. Η σχετική συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών και των μειωτών ρυθμίζει την σχέση των ηλεκτροστατικών και πολικών αλληλεπιδράσεων. Αυτό έχει πολύ σημαντικές συνέπειες στη χρωματογραφία, την κατακρήμνιση και κατά επέκταση στην κρυστάλλωση.

Γενικότερα, η προσθήκη μειωτών ιοντικής ισχύος σε ένα διάλυμα, αυξάνει τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και μειώνει τις πολικές.

### **5.3. Προοπτικές**

Τα συμπεράσματα της γενικευμένης εναλάτωσης και εξαλάτωσης μπορούν να βρουν άμεσα πρακτικές εφαρμογές, τόσο στην χρωματογραφία, όσο και στην κρυστάλλωση. Η δυσκολία που παρουσιάζεται στην κρυστάλλωση πολλών βιομορίων μπορεί να περιοριστεί σε σημαντικό βαθμό. Σαν συνέπεια, θα επιλυθεί μεγαλύτερος αριθμός κρυσταλλογραφικών δομών, προσφέροντας σημαντική πληροφορία για τους βιοχημικούς μηχανισμούς. Οι χρωματογραφικές εφαρμογές μπορούν να επιταχύνουν την απομόνωση των βιομορίων, προσφέροντας ποιοτικότερα αποτελέσματα.

Το περιβάλλον στο οποίο ζούμε και κατά συνέπεια τα βιολογικά συστήματα στηρίζονται σε λεπτές ρυθμίσεις των διαφόρων τύπων αλληλεπιδράσεων. Η λεπτομερέστερη εξέταση της σχέσης μειωτών και ηλεκτρολυτών θα βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση των διαφόρων μορφών αλληλεπίδρασης στα βιολογικά συστήματα.



Εικόνα 5.1. Αναστολή της κατακερμήνισης της T7 πολυμεράσης του RNA από φωσφορικό αμιμόνιο, εξαιτίας της παρουσίας ζάχαρης ή γλυκερόλης (85).

## **6. Υλικά και Μέθοδοι**

## 6.1. Πρωτόκολλο μέτρησης της διαλυτής πρωτεΐνης στα πειράματα του πίνακα 2.1. και 2.2.

### 6.1.1. Πείραμα πίνακα 2.1.

Κάθε συνθήκη διαλύματος στους πίνακες Α και Β επαναλήφθηκε 3 φορές. Ο συνολικός όγκος κάθε συνθήκης είναι 400 μl και περιέχει 10 mg/ml ριβονουκλεάσης Α και 10 mM ρυθμιστικού οξικού νατρίου pH 5,0. Το κάθε διάλυμα αναδεύεται έντονα και στη συνέχεια επωάζεται για δύο ώρες σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 16 βαθμών Κελσίου. Μετά την επώαση τα διαλύματα φυγοκεντρώνται για 15 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο Eppendorf στα 15000xg. Προσεκτικά αφαιρούνται από το κάθε διάλυμα 200 μl τα οποία αραιώνονται με 4,8 ml νερού. Η απορρόφηση του αραιωμένου διαλύματος φωτομετρείται στα 280 nm. Η μέση τιμή της απορρόφησης δίνεται στους πίνακες Α και Β.

### 6.1.2. Πείραμα πίνακα 2.2.

Κάθε συνθήκη διαλύματος στους πίνακες Α και Β επαναλήφθηκε 3 φορές. Ο συνολικός όγκος κάθε συνθήκης είναι 1 ml και περιέχει 20 mg/ml λυσοζύμης και 20 mM ρυθμιστικού οξικού νατρίου pH 5,0. Το κάθε διάλυμα αναδεύεται έντονα και στη συνέχεια επωάζεται για δύο ώρες σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 16 βαθμών Κελσίου. Μετά την επώαση τα διαλύματα φυγοκεντρώνται για 15 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο Eppendorf στα 15000xg. Προσεκτικά αφαιρούνται από το κάθε διάλυμα 200 μl τα οποία αραιώνονται με 4,8 ml νερού. Η απορρόφηση του αραιωμένου διαλύματος φωτομετρείται στα 280 nm. Η μέση τιμή της απορρόφησης αυτής δίνεται στους πίνακες Α και Β.

## 6.2. Το αρχικό σχήμα απομόνωσης των μεταλλαγών της πρωτεΐνης ROP. (62,63)

Το αρχικό σχήμα απομόνωσης των μεταλλαγών της πρωτεΐνης ROP περιλάμβανε τα ακόλουθα στάδια.

### 6.2.1. Εκχύλιση.

Δια νυκτός ομογενοποίηση της βακτηριακής πάστας σε διάλυμα Α (50mM Tris pH 8,5, 1 mM DTT, 1mM EDTA, 1mM Sodium Azide και 150 mM NaCl) (τελικός όγκος σε ml διπλάσιος της μάζας της βακτηριακής πάστας σε gr).

Διάρρηξη των βακτηριακών κυττάρων με υπερηχοβόληση ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση. Το στερεό ίζημα επαναδιαλύεται σε διάλυμα Α, επαναυπερηχοβόλεται και επαναφυγοκεντρείται. Τα υπερκείμενα της παραπάνω διαδικασίας υποβάλλονται σε δίωρη υπερφυγοκέντρηση.

### **6.2.2. Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία DEAE Sephacel (Ταχύτητα ροής 80 ml/hr). (20-23)**

Το υπερκείμενο φορτώνεται σε ανιοντοανταλλακτικό υπόστρωμα DEAE Sephacel (2,6cmX40cm=200ml) εξισορροπημένο με διάλυμα Α.

Το χρωματογραφικό υπόστρωμα στη συνέχεια πλένεται με διάλυμα Α (1-3 όγκοι χρωματογραφικού υλικού).

Εφαρμόζεται διαβάθμιση συγκέντρωσης αλατιού 0,15 - 0,6 M NaCl (διάλυμα Α με διάλυμα Α συν 0,45 M NaCl) (5 όγκοι χρωματογραφικού υλικού).

### **6.2.3. Συμπύκνωση και ανταλλαγή διαλύματος με διαπίδωση.**

Τα κλάσματα της διαβάθμισης που περιέχουν το προς μελέτη μόριο συμπυκνώνονται με Amicon ή με ημιδιαπερατή μεμβράνη τοποθετημένη σε στερεό PEG και στη συνέχεια υποβάλλονται σε ανταλλαγή διαλύματος με διαπίδωση έναντι 1 mM φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος pH 7,0.

### **6.2.4. Χρωματογραφία προσρόφησης Υδροξυλαπατιτή (Ταχύτητα ροής 100 ml/hr). (26)**

Το δείγμα φορτώνεται σε υπόστρωμα υδροξυλαπατιτή (2,6cmX40cm=200ml) το οποίο έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί με 1 mM φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,0.

Το χρωματογραφικό υπόστρωμα πλένεται με 1 mM φωσφορικό διάλυμα (ένα όγκο χρωματογραφικού υλικού).

Εφαρμόζεται διαβάθμιση συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος 1 mM - 500 mM (5 όγκοι χρωματογραφικού υλικού).

### **6.2.5. Συμπύκνωση και ανταλλαγή διαλύματος με διαπίδωση.**

Τα κλάσματα της διαβάθμισης που περιέχουν το προς μελέτη μόριο συμπυκνώνονται στα 6 ml με Amicon ή με ημιδιαπερατή μεμβράνη τοποθετημένη σε στερεό PEG και στη συνέχεια υποβάλλονται σε ανταλλαγή διαλύματος με διαπίδωση έναντι διαλύματος Β (50 mM φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM Sodium Azide και 100 mM NaCl).

### **6.2.6. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης Sephadex G75 superfine (Ταχύτητα ροής 5 ml/hr). (80-82)**

Το δείγμα φορτώνεται σε χρωματογραφικό υπόστρωμα μοριακής διήθησης Sephadex G75 (2,6cmX100cm=500ml).

### 6.2.8. Επιπλέον βήματα καθαρισμού. Συμπύκνωση.

Τα κλάσματα που περιλαμβάνουν το προς μελέτη μόριο στην περίπτωση που το μόριο είναι αρκετά καθαρό συμπυκνώνονται για κρυσταλλώσεις (τελική συγκέντρωση 10-30 mg/ml). Σε αντίθετη περίπτωση παρεμβάλλονται επιπλέον βήματα καθαρισμού (FPLC Mono Q, υδροξυλαεπατίτης, Sephadex G75).

Όλα τα παραπάνω βήματα γίνονται σε θερμοκρασία 4 βαθμών Κελσίου.

Η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης γίνεται με αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμίδης 15% κατά Laemmli (83,84).

Η παραπάνω μέθοδος ειδικά για την πρωτεΐνη RM 62 ή RM 31A-P για περίπου 50 γραμμάρια βακτηριακής πάστας απέδιδε από 0,0 mg έως 32 mg καθαρής πρωτεΐνης (τιτλοδότηση με Bradford με μάρτυρα BSA (74)).

### 6.3. Ηλεκτροφόρηση σε SDS αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμίδης. (83,84)

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε SDS αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμίδης περιγράφεται αναλυτικά στις αναφορές 83 και 84.

### 6.4. Πρωτόκολλο εκχύλισης βακτηρίων E. coli. (79)

Ταχεία ομογενοποίηση της βακτηριακής πάστας σε διάλυμα 50 mM Tris pH 7,5, 1 mM DTT, 1mM EDTA, 200 mM NaCl, 5% Γλυκερόλη και 1 mM PMSF (τελικός όγκος σε ml διπλάσιος της μάζας της βακτηριακής πάστας σε gr).

Για κάθε ml ομογενοποιημένου διαλύματος προσθέτουμε 300 μg λυσοζύμης. Αφήνουμε για επώαση μίας ώρας το διάλυμα σε θερμοκρασία 4 βαθμών Κελσίου. Στη συνέχεια προσθέτουμε χλωριούχο μαγνήσιο, τελική συγκέντρωση 10 mg/ml και Δεοξυριβονουκλεάση, τελική συγκέντρωση 10 μg/ml. Επιδόξουμε το διάλυμα για άλλη μισή ώρα και στη συνέχεια φηγοκεντρούμε το διάλυμα για μία ώρα σε θερμοκρασία 4 βαθμών Κελσίου στα 14000xg.

Τα κύρια πλεονεκτήματα του πρωτοκόλλου αυτού είναι τα ακόλουθα.

Δεν υπάρχει άνω ή κάτω όριο για την ποσότητα της πάστας που μπορούμε να εκχύλουμε. Το αποτέλεσμα της εκχύλισης είναι πάντα της ίδιας ποιότητας γιατί τα βιομόρια δεν υποβάλλονται σε ακραίες συνθήκες.

### 6.5. Παραγωγή βακτηριακής πάστας της πρωτεΐνης P1.

Η πρωτεΐνη P1 αυτομονώνεται από το βακτηριακό στέλεχος K38 (96) το οποίο φέρει το πλασμίδιο pGP1-2 (97). Το στέλεχος αυτό μεγαλώνει στους 30 βαθμούς Κελσίου παρουσία 50 μg/ml καναμικίνης. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται είναι:

2% w/v Tryptone, 1% w/v Yeast Extract, 0,5% w/v NaCl, 0,2% v/v Glycerol, 50 mM (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaOH) pH 7,2, 50 μg/ml Kanamycin.

- α. Βακτήρια από απόθεμα απλώνονται σε τριβλία Petri.  
 β. Μία αποικία επιλέγεται και μεγαλώνεται σε υγρή καλλιέργεια 500 ml μέσα σε κοινική φιάλη 2 lt.  
 γ. Η υγρή καλλιέργεια προσθέεται σε θρεπτικό υλικό 30 lt, σε εποικιστή μεγάλης κλίμακας.  
 δ. Όταν η απορρόφηση της καλλιέργειας φτάσει την τιμή 0,8-1,0 τότε τα βακτήρια συλλέγονται με φυγόκεντρο συνεχούς ροής.

### 6.6. Διαλυτοδιαπίδυση. (22)

Η διαλυτοδιαπίδυση (Diafiltration) είναι η μέθοδος που χρησιμοποιεί ημιδιαπερατά φίλτρα όπως για παράδειγμα τη συσκευή υπερδιήθησης Amicon και μπορεί να μεταβάλλει το διαλύτη ενός βιομορίου. Για την εφαρμογή της διαλυτοδιαπίδυσης, ανάμεσα στη συσκευή υπερδιήθησης και στην παροχή πεπαιομένου αζώτου παρεμβάλλεται μία δεξαμενή, η οποία περιέχει το διάλυμα στο οποίο θέλουμε να βρίσκεται το βιομόριο μετά τη διαδικασία. Όση ποσότητα διαλύτη αφαιρείται από τη συσκευή υπερδιήθησης, τόση ποσότητα διαλύτη από τη δεξαμενή προσθέεται. Η μέθοδος της διαλυτοδιαπίδυσης υπόκειται στις εξισώσεις 6.1. και 6.2.

$$C=C_0 [1-\exp (-V/V_0)] \quad 6.1.$$

Όπου  $C_0$  η αρχική συγκέντρωση μίας ουσίας στη δεξαμενή και  $C$  η συγκέντρωση της ουσίας αυτής στο διάλυμα του βιομορίου μετά το πέρασμα όγκου  $V$  από τη συσκευή υπερδιήθησης.  $V_0$  ο όγκος του διαλύματος του βιομορίου στη συσκευή υπερδιήθησης.

$$C=C_0 \exp (-V/V_0) \quad 6.2.$$

Όπου  $C_0$  η αρχική συγκέντρωση μίας ουσίας η οποία βρίσκεται διαλυμένη στο διάλυμα του βιομορίου και  $C$  η συγκέντρωση μίας ουσίας η οποία βρίσκεται διαλυμένη στο διάλυμα του βιομορίου μετά το πέρασμα όγκου  $V$  από τη συσκευή υπερδιήθησης.  $V_0$  ο όγκος του διαλύματος του βιομορίου στη συσκευή υπερδιήθησης.

## 6.7. Υλικά

### 6.7.1. Συσκευές.

#### 1. PHARMACIA

FPLC. (Fast Protein Liquid Chromatography), Κολώνες (ΧΚ), UV Ανιχνευτής και Καταγραφέας.

#### 2. AMICON

Amicon Flow Cells, Centricon, Centriprep.

### 6.7.2. Χρωματογραφικά Υλικά.

#### 1. PHARMACIA

Alkyl Superose, PBE 94, Phenyl Sepharose, Polybuffer 96, Polybuffer 74, Q Sepharose, Sephacryl S100, Sephacryl S200, Sephadex G75, S Sepharose, Superdex 75.

#### 2. BIORAD

Hydroxyl Apatite

#### 3. Watmann

Phosphocellulose (PC)

### 6.7.3. Πρωτεϊνικοί μάρτυρες.

#### 1. SIGMA

BSA, β Λακταλβουμίνη, α Λακτοσφαιρίνη, Λυσοζύμη, Ριβονουκλεάση Α.

#### 2. PHARMACIA

Οβαλβουμίνη, Ριβονουκλεάση Α, Χιμοθρυψινογόνο.

### 6.7.4. Χημικά.

#### 1. FLUKA

Θεικό αμμώνιο

#### 2. HAMPTON

PEG 8000, PEG 6000, PEG 1000

#### 3. KODAK

MPD

#### 4. SIGMA

Η πλειοψηφία των χημικών.



### Συντομογραφίες

Å	Ångstrom
A.S.	Ammonium Sulfate
Bis-Tris	bis[2-Hydroxyethyl]imino-tris[hydroxymethyl]methane
Bis-Tris Propane	(1,3-bis[tris(Hydroxymethyl)-methylamino]propane)
C	Concentration
Da	Dalton
DTT	1,4 Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
$\epsilon$	Dielectric Constant
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
Hepes	2-[4-(2 Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonic acid
I	Ionic Strength
I <sub>i</sub>	Interactions Area for Salting In
I <sub>o</sub>	Interactions Area for Salting Out
K <sub>i</sub>	Salting In Constant
K <sub>o</sub>	Salting Out Constant
$\mu$	Chemical Potential
MES	(2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid
M <sub>i</sub>	Metastable Zone for Salting In
M <sub>o</sub>	Metastable Zone for Salting Out
MPD	2-Methyl -2,4-pentandiol
Mr	Marker
N <sub>A</sub>	Avogadro Number
N <sub>i</sub>	Nucleation Zone for Salting In
N <sub>o</sub>	Nucleation Zone for Salting Out
NIR	Nitrite Reductase
PC	Phosphocellulose
PDDC	Platinum Ethylenediamine Dichloride
PEG	Polyethylene Glycol
PI	Polyamine Induced Protein
P <sub>i</sub>	Precipitation for Salting In
P <sub>o</sub>	Precipitation for Salting Out
PMSF	Phenylmethyl-Sulfonic Fluoride
R	Gas Constant
RM	ROP Mutant
ROP	Repressor of Primer
S	Solubility

SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
T	Temperature
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteases
Trizma Base	(Tris[hydroxylmethyl]amino-methane)
$V_M$	Matthews Constant
$z_i e_i$	Ion charge

## Γλωσσάρι

Αεροφόριο	Tip
Άμορφο νερό	Bulk water
Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία	Anion exchange chromatography
Ανιχνευτής περιοχής	Area detector
Αποικία	Colony
Απρωτικό	Aprotic
Αριθμός ενυδάτωσης	Hydration number
Ασύμμετρη μονάδα	Asymmetric unit
Βαστηριακό στέλεχος	Bacterial strain
Βελόνα	Needle
Βελονοειδής	Needle like
β Λακτοσφαιρίνη	β Lactoglobulin
Γενικευμένη εναλάτωση	Generalized salting in
Γενικευμένη εξελάτωση	Generalized salting out
Γενικευμένη εξίσωση του Green	Generalized Green's equation
Γενικευμένο διάγραμμα διαλυτότητας	Generalized solubility diagram
Γήρανση	Ageing
Δεξαμενή	Reservoir
Διαβάθμιση	Gradient
Διαγράμματα διαλυτότητας	Solubility diagrams
Διακριτική ικανότητα	Resolution
Διαλυτοδιακρίδυση	Diafiltration
Διαλυτότητα	Solubility
Διαμόρφωση	Conformation
Διαπίδυση	Dialysis
Διάχυση ατμών	Vapor diffusion
Δίδυμοι κρύσταλλοι	Twinned crystals
Διηλεκτρική σταθερά	Dielectric constant
Διπολικό	Dipolar
Δίπολο	Dipole
Δίσκος ειδήλου	Image plate
Διφασικό σύστημα	Two phase system
Έκλυση	Elution
Ελαττώματα εξαιτίας του μεγάλωματος	Growth defects

Εναλάτωση	Salting in
Ενδυνάμει ηλεκτρολύτες	Potential electrolytes
Εντυρήνωση	Seeding
Εξαλάτωση	Salting out
Εξάτμιση	Evaporation
Εξισορρόπηση	Equilibration
‘Επιδερμίδα’	‘Skin’
Ηλεκτροστατικός	Electrostatic
Θερμικός διαχυόμενος σπιδισμός	Thermal diffusion scattering
Θεωρία ενυδάτωσης	Hydration theory
Θεωρία ψευδοπλέγματος	Quasilattice theory
Εξόδες	Viscosity
Ιοντική ισχύς	Ionic strength
Ιοντικό ζεύγος	Ion-pair
Ιοντικό νέφος	Ionic cloud
Ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία	Ion exchange chromatography
Ισομορφή αντικατάσταση	Isomorphous replacement
Καλλιέργεια	Culture
Καθιστή σταγόνα	Sitting drop
Καναμυκίνη	Kanamycin
Καρβοξυαιμοσφαιρίνη	Carboxyhemoglobin
Κατακρήμνιση	Precipitation
Κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία	Cation exchange chromatography
Κρεμαστή σταγόνα	Hanging drop
Λυσοζύμη	Lysozyme
Μακροεντυρήνωση	Macroseeding
Μάρτυρας	Marker
Μειωτής ιοντικής ισχύος	Ionic strength reducer
Μερική παραμετρική σχεδίαση	Fractional factorial design
Μετασταθερή ζώνη	Metastable zone
Μη-πολικό	Non-polar
Μικροεντυρήνωση	Microseeding
Μοριακή αντικατάσταση	Molecular replacement
Μωσαϊκότητα	Mosaicity
Οβαλβουμίνη	Ovalbumin
Όγκος χρωματογραφικού υλικού	Bed volume
Ολική ανάμιξη	In batch

Παράγοντας R	R factor
Περιστρεφόμενη άνοδος	Rotating anode
Πήκτωμα	Gel
Πλακίδιο	Plate
Πλακιδιόμορφο	Plate like
Πλασμίδιο	Plasmid
Πλύσιμο	Wash
Πολικό	Polar
Πολυηλεκτρολύτης	Polyelectrolyte
Πραγματικοί ηλεκτρολύτες	True electrolytes
Πρωτικό	Protic
Πυρήνωση	Nucleation
Ραβδόμορφος	Rod like
Ράβδος	Rod
Ριβονουκlease A	Ribonuclease A
Σταθερά διάστασης	Dissociation constant
Σταθερά σύνδεσης	Association constant
Στοιχειώδη κυψελίδα	Unit cell
Σύμπλοση σφαίρα	Cosphere
Συντελεστής ενεργότητας	Activity coefficient
Συντελεστής virial	Virial coefficient
Σφαίρα ενυδάτωσης	Hydration sphere
Σφαιρουλίτες	Spherulites
Τετράπολο	Quadrupole
Υδροξυλαπατίτης	Hydroxylapatite
Υδροφοβή χρωματογραφία	Hydrophobic chromatography
Υδροφοβικός	Hydrophobic
Υπερκορεσμός	Supersaturation
Υπόστρωμα	Matrix
Φθορά ακτινοβολίας	Radiation damage
Φωσφοκυτταρίνη	Phosphocellulose
Χημικό δυναμικό	Chemical potential
Χρωματοεστίαση	Chromatofocusing
Χυμοθρυψινογόνο A	Chymotrypsinogen A
Χωροομάδα	Space group
Ψευδοσυγγένεια	Pseudoaffinity

## Βιβλιογραφία

1. Ries-Kautt, M., Ducruix, A. **Phase diagrams.** Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach. Editors Ducruix, A., Giegé, R. Oxford University Press 195-218, 1992
2. Bockris, J., O'M., Reddy, A., K., N. **Modern Electrochemistry.** Volume 1. Plenum Press, New York, 1970
3. Ling, G., N. **Hydration of Macromolecules.** Water and Aqueous Solutions: Structure, Thermodynamics, and Transport processes. Editor Horne, R., A. John Wiley & Sons, Inc. 663-700, 1972
4. Jeffrey, G., A., Saenger, W. **Hydrogen Bonding in Biological Structure.** Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1991
5. Dick, D., A., T. **Biofluids.** Water and Aqueous Solutions: Structure, Thermodynamics, and Transport processes. Editor Horne, R., A. John Wiley & Sons, Inc. 265-294, 1972
6. Vaslow, F. **Thermodynamics of Solutions of Electrolytes.** Water and Aqueous Solutions: Structure, Thermodynamics, and Transport processes. Editor Horne, R., A. John Wiley & Sons, Inc. 465-518, 1972
7. Friedman, H., L., Krishnan, C., V. **Thermodynamics of Ion Hydration.** Water. A comprehensive Treatise. Volume 3. Aqueous Solutions of Simple Electrolytes. Editor Franks, F. Plenum Press, New York 1-118, 1973
8. Padova, J. **Nonaqueous Electrolyte Solutions.** Water and Aqueous Solutions: Structure, Thermodynamics, and Transport processes. Editor Horne, R., A. John Wiley & Sons, Inc. 109-174, 1972
9. Kay, R., L. **Ionic Transport in Water and Mixed Aqueous Solvents.** Water. A comprehensive Treatise. Volume 3. Aqueous Solutions of Simple Electrolytes. Editor Franks, F. Plenum Press, New York 173-209, 1973
10. Lilley, T. H. **Raman Spectroscopy of Aqueous Electrolyte Solutions.** Water. A comprehensive Treatise. Volume 3. Aqueous Solutions of Simple Electrolytes. Editor Franks, F. Plenum Press, New York 265-299, 1973
11. Blundell, T., L., Johnson, L., N. **Protein Crystallography.** Academic Press Inc. 1976
12. Arakawa, T., Timasheff, S., N. **Theory of Protein Solubility.** Diffraction Methods for Biological Macromolecules Part A. Methods Enzymol. Volume 114. Editors Wyckoff, H., W., Hirs, C., H., W., Timasheff, S., N. 49-76, 1985
13. Howard, S., B., Twigg, P., J., Baird, J., K., Meehan, E., J. **The solubility of hen egg-white lysozyme.** J. Crystal Growth 90:94-104, 1988
14. Scopes, R., K. **Protein Purification.** Principles and Practice. Springer-Verlang New York Inc. 1987

15. Harris, E., V., L. **Concentration of the Extract.** Protein Purification Methods. A Practical Approach. Editors Harris, E.L.V., Angal, S. Oxford University Press, 1989
16. Pohl, T. **Concentration of Proteins and Removal of Solutes.** Guide to Protein Purification. Methods Enzymol. Volume 182. Editor Deutscher, M., P. 68-82, 1990
17. Englard, S., Selter, S. **Precipitation Techniques.** Guide to Protein Purification. Methods Enzymol. Volume 182. Editor Deutscher, M., P. 285-300, 1990
18. Ingham, K., C. **Protein Precipitation with Polyethylene Glycol.** Enzyme Purification and Related Techniques. Part C. Methods Enzymol. Volume 104. Editor Jakoby, W., B. 351-355, 1984
19. Ingham, K., C. **Precipitation of Proteins with Polyethylene Glycol.** Guide to Protein Purification. Methods Enzymol. Volume 182. Editor Deutscher, M., P. 301-306, 1990
20. Roe, S. **Separation Based on Structure.** Protein Purification Methods. A Practical Approach. Editors Harris, E.L.V., Angal, S. Oxford University Press, 175-244, 1989
21. Rossomando, E., F. **Ion-Exchange Chromatography.** Guide to Protein Purification. Methods Enzymol. Volume 182. Editor Deutscher, M., P. 309-316, 1990
22. **Ion Exchange Chromatography. Principles and Methods.** Pharmacia LKB Biotechnology
23. **FPLC Ion Exchange and Chromatofocusing. Principles and Methods.** Pharmacia LKB Biotechnology
24. Giri, L. **Chromatofocusing.** Guide to Protein Purification. Methods Enzymol. Volume 182. Editor Deutscher, M., P. 380-391, 1990
25. **Chromatofocusing with Polybuffer and PBE.** Pharmacia LKB Biotechnology
26. Golburnoff, M., J. **Protein Chromatography on Hydroxyapatite Columns.** Guide to Protein Purification. Methods Enzymol. Volume 182. Editor Deutscher, M., P. 329-338, 1990
27. Shaltiel, S. **Hydrophobic Chromatography.** Enzyme Purification and Related Techniques. Part C. Methods Enzymol. Volume 104. Editor Jakoby, W., B. 69-96, 1984
28. Kennedy, R., M. **Hydrophobic Chromatography.** Guide to Protein Purification. Methods Enzymol. Volume 182. Editor Deutscher, M., P. 339-342, 1990

29. McPherson, A. **Preparation and analysis of protein crystals.** John Wiley and Sons, Inc. 1982
30. Gilliland, G., L., Davies, D., R. **Protein Crystallization: The Growth of Large-Scale Single Crystals.** Enzyme Purification and Related Techniques. Part C. Methods Enzymol. Volume 104. Editor Jakoby, W., B. 370-380, 1984
31. McPherson, A. **Crystallization of Macromolecules: General Principles.** Diffraction Methods for Biological Macromolecules Part A. Methods Enzymol. Volume 114. Editors Wyckoff, H., W., Hirs, C., H., W., Timasheff, S., N. 112-119, 1985
32. Feigelson, R. S. **The relevance of small molecule crystal growth theories and techniques to the growth of biological macromolecules.** J. Crystal Growth 90:1-13, 1988
33. Giegé, R., Mokol, V. **Crystallogenesis of proteins.** Tibtech 7:277-282, 1989
34. Mc Pherson, A. **Current Approaches to Macromolecular Crystallization.** Eur. J. Biochemistry 189:1-23, 1990
35. Ollis, D., White, S. **Protein Crystallization.** Guide to Protein Purification. Methods Enzymol. Volume 182. Editor Deutscher, M., P. 646-660, 1990
36. Giegé, R., Ducruix, A. **An Introduction to the Crystallogenesis of Biological Macromolecules.** Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach. Editors Ducruix, A., Giegé, R. Oxford University Press 1-18, 1992
37. Lorber, B., Giegé, R. **Preparation and handling of biological macromolecules for crystallization.** Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach. Editors Ducruix, A., Giegé, R. Oxford University Press 19-46, 1992
38. McRee, D.,E. **Practical Protein Crystallography.** Academic Press, Inc. 1993
39. Giegé, R., Lorber, B., Théobald-Dietrich, A. **Crystallogenesis of Biological Macromolecules: Facts and Perspectives.** Acta Cryst. D50: 339-350, 1994.
40. Mikol, V., Giegé, R. **The physical chemistry of protein crystallization.** Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach. Editors Ducruix, A., Giegé, R. Oxford University Press 219-240, 1992
41. Timasheff, s., N., Arakawa, T. **Mechanism of protein precipitation and stabilization by co-solvents.** J. Crystal Growth 90:39-46, 1988



42. Feher, G., Kam, Z. **Nucleation and Growth of Protein Crystals: General Principles and Assays.** Diffraction Methods for Biological Macromolecules Part A. Methods Enzymol. Volume 114. Editors Wyckoff, H., W., Hirs, C., H., W., Timasheff, S., N. 77-111, 1985
43. McPherson, A. **Use of Polyethylene Glycol in the Crystallization of Macromolecules.** Diffraction Methods for Biological Macromolecules Part A. Methods Enzymol. Volume 114. Editors Wyckoff, H., W., Hirs, C., H., W., Timasheff, S., N. 120-124, 1985
44. Carter, C., W., Baldwin, E., T., Frick, L. **Statistical design of experiments for protein crystal growth and the use of a precrystallization assay.** J. Crystal Growth 90:60-73, 1988
45. Ducruix, A., F., Ries-Krautt, M., M. **Solubility Diagram Analysis and the Relative Effectiveness of Different Ions on Protein Crystal Growth.** Methods: A Companion to Methods Enzymol. 1:25-30, 1990
46. Pusey, M., L. **A method for rapid liquid-solid phase solubility measurements using the protein lysozyme.** J. Crystal Growth 88:419-424, 1988
47. Carter, Jr, C., W. **Efficient Factorial Designs and the Analysis of Macromolecular Crystal Growth Conditions.** Methods: A Companion to Methods Enzymol. 1:12-24, 1990
48. Carter, C., W., Jr. **Design of crystallization experiments and protocols. Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach.** Editors Ducruix, A., Giegé, R. Oxford University Press 47-72, 1992
49. Sieker, L., C. **Interesting observations on the nature of protein crystals and their growth.** J. Crystal Growth 90:31-38, 1988
50. Ducruix, A., Giegé, R. **Methods of crystallization.** Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach. Editors Ducruix, A., Giegé, R. Oxford University Press 73-98, 1992
51. Thaller, C., Eichele, G., Weaver, L., H., Wilson, E., Karlsson, R., Jansonius, J., N. **Seed Enlargement and Repeated Seeding.** Diffraction Methods for Biological Macromolecules Part A. Methods Enzymol. Volume 114. Editors Wyckoff, H., W., Hirs, C., H., W., Timasheff, S., N. 132-135, 1985
52. Stura, E., A., Wilson, I., A. **Analytical and Production Seeding Techniques.** Methods: A Companion to Methods Enzymol. 1:38-49, 1990
53. Stura, E., A., Wilson, I., A. **Seeding techniques.** Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach. Editors Ducruix, A., Giegé, R. Oxford University Press 99-126, 1992

54. Rayment, I. **Treatment and Manipulation of Crystals.** Diffraction Methods for Biological Macromolecules Part A. Methods Enzymol. Volume 114. Editors Wyckoff, H., W., Hirs, C., H., W., Timasheff, S., N. 136-139, 1985
55. Stura, E., A., Chen, P. **Soaking of crystals.** Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach. Editors Ducruix, A., Giegé, R. Oxford University Press 241-254, 1992
56. McPherson, A. **Crystallization of Proteins by Variation of pH or Temperature.** Diffraction Methods for Biological Macromolecules Part A. Methods Enzymol. Volume 114. Editors Wyckoff, H., W., Hirs, C., H., W., Timasheff, S., N. 125-127, 1985
57. Phillips, G., N., Jr. **Crystallization in Capillary Tubes.** Diffraction Methods for Biological Macromolecules Part A. Methods Enzymol. Volume 114. Editors Wyckoff, H., W., Hirs, C., H., W., Timasheff, S., N. 128-131, 1985
58. Ataka, M., Asai, M. **Systematic studies on the crystallization of lysozyme.** J. Crystal Growth 90:86-93, 1988
59. Robert, M., C., Provost, K., Lefauchaux, F. **Crystallization in gels and related methods.** Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach. Editors Ducruix, A., Giegé, R. Oxford University Press 127-144, 1992
60. Ward, K., B., Perozzo, M., A., Zuk, W., M. **Automating crystallization experiments.** Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach. Editors Ducruix, A., Giegé, R. Oxford University Press 291-310, 1992
61. Gilliland, G., L. **A biological macromolecule crystallization database: A basis for a crystallization strategy.** J. Crystal Growth 90:51-59, 1988
62. Banner, D., W., Cesareni, G. & Tsernoglou, D. **Crystallization of the ColE1 Rop protein.** J. Mol. Biol. 170:1059-1060, 1983
63. Lacatena, R., M., Banner, D., W., Castagnoli, L., Cesareni, G. **Control of initiation of pMB1 replication: Purified Rop protein and RNA I affect primer formation in vitro.** Cell 37:1009-1014, 1984
64. Banner, D.W., Kokkinidis, M., Tsernoglou, D. **Structure of the ColE1 Rop protein at 1.7 Å resolution.** J. Mol. Biol. 196:657-675, 1987
65. Pallakakis, C.D., Kokkinidis, M. **The stability of the four- $\alpha$ -helix bundle motif in proteins.** Protein Eng. 4:849-850, 1991

66. Kokkinidis, M., Vlassi, M., Papanikolaou, Y., Kotsifaki, D., Kingswell, A., Tsernoglou, D., Hinz, H.J. **Correlation between protein stability and crystal properties of designed ROP variants.** *Proteins: Structure, Function and Genetics* 16:214-216, 1993
67. Gueryl, C.A., Morgan, D.G., Staros, J.V. **Binding specificity of the periplasmic oligopeptide-binding protein from *Escherichia coli*.** *J. Bacteriol.* 168:775-779, 1986
68. Kashiwagi, K., Yamaguchi, Y., Sakai, Y., Kobayashi, H., Igarashi, K. **Identification of the polyamine-induced protein as a periplasmic oligopeptide binding protein.** *J. Biol. Chem.* 265:8387-8391, 1990
69. Tame, J., Murshudov, G.N., Dodson, E.J., Neil, T.K., Dodson, G.G., Higgins, C.F., Wilkinson, A.J. **The structural basis of sequence-independent peptide binding by OppA protein.** *Science.* 264:1578-1581, 1994
70. Rina, M., Bouriotis, V. **Cloning, purification and characterization of the BseCI DNA methyltransferase from *Bacillus stearothermophilus*.** *Gene* 133: 91-94, 1993.
71. Rina, M., Markaki, M., Bouriotis, V. **Sequence of the cloned bseCIM gene: M.BseCI reveals high homology to M.BanIII.** *Gene* 150: 71-73, 1994.
72. Kakutani, T., Watanabe, H., Arima, K., Beppu, T. **Purification and properties of a Copper-containing nitrite reductase from a Denitrifying bacterium, *Alcaligenes faecalis* strain S-6.** *J. Biochem.* 89:453-461, 1981
73. Deutscher, M., P. **Rethinking Your Purification Procedure.** *Guide to Protein Purification. Methods Enzymol. Volume 182.* Editor Deutscher, M., P. 779-780, 1990
74. Stoscheck, C., M. **Quantitation of Protein.** *Guide to Protein Purification. Methods Enzymol. Volume 182.* Editor Deutscher, M., P. 50-67, 1990
75. Harris, E., L., V., Dunn, E., L., V., Benyon, R., J. **Initial Planing.** *Protein Purification Methods. A Practical Approach.* Editors Harris, E.L.V., Angal, S. Oxford University Press, 1-66, 1989
76. Blanchard, J., S. **Buffers for Enzymes.** *Enzyme Purification and Related Techniques. Part C. Methods Enzymol. Volume 104.* Editor Jakoby, W., B. 404-414, 1984
77. Stoll, V., S., Blanchard, J., S. **Buffers: Principles and Practice.** *Guide to Protein Purification. Methods Enzymol. Volume 182.* Editor Deutscher, M., P. 24-37, 1990

78. Deutscher, M., P. **Maintaining Protein Stability.** Guide to Protein Purification. Methods Enzymol. Volume 182. Editor Deutscher, M., P. 83-89, 1990
79. Cull, M., McHenry, C., S. **Preparation of Extracts from Prokaryotes.** Guide to Protein Purification. Methods Enzymol. Volume 182. Editor Deutscher, M., P. 147-153, 1990
80. Preneta, A., Z. **Separation on the Basis of Size: Gel Permeation Chromatography.** Protein Purification Methods. A Practical Approach. Editors Harris, E.L.V., Angal, S. Oxford University Press, 293-306, 1989
81. Stellwagen, E. **Gel Filtration.** Guide to Protein Purification. Methods Enzymol. Volume 182. Editor Deutscher, M., P. 317-328, 1990
82. **Gel Filtration. Theory and Practice.** Pharmacia LKB Biotechnology
83. Sambrook, J., Fritsch, E., F., Maniatis, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989
84. Hames, B., D. **One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.** Gel electrophoresis of proteins. A practical approach. Editors Hames, B., D., Rickwood, D. Oxford University Press, 1990
85. Sousa, R., Lafer, E., M. **The Use of Glycerol in Crystallization of T7 RNA Polymerase: Implications for the Use of Cosolvents in Crystallizing Flexible Proteins.** Methods: A Companion to Methods Enzym. 1:50-56, 1990
86. Ray, W., J. **Effect of polyethylene glycol 400 at low concentrations on long term growth of muscle phosphoglucomutase crystals from concentrated salt solutions.** Proteins 14:300-308, 1992
87. Bell, J., A., Wilson, K., P., Zhang, X., J., Faber, H., R., Nicholson, H., Matthews, B., W. **Comparison of the crystal structure of bacteriophage T4 lysozyme at low, medium, and high ionic strengths.** Proteins 10:10-21, 1991
88. Sawyer, L., Turner, M., A. **X-ray analysis.** Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach. Editors Ducruix, A., Giegé, R. Oxford University Press 255-290, 1992
89. **International Tables for X-ray Crystallography, Vol. A.** Editor Theo Hahn. Kluwer Academic Publishers, 1989
90. **SERC Daresbury Laboratory. CCP4. A Suite of Programs for Protein Crystallography.** Daresbury Laboratory, Warrington, England.
91. Kabsch, W. **Automatic Indexing of Rotation Diffraction Patterns.** J. Appl. Cryst. 21: 67-71, 1988

92. Otwinowski, Z. **Proceedings of the CCP4 Study Weekend. Data Collection and Processing.** pp. 56-62. Warrington: SERC Daresbury Laboratory, 1993
93. Mathews, B., W. **Solvent content of protein crystals.** *J. Mol. Biol.* 33: 491-497, 1968
94. Petsko, G., A. **Preparation of Isomorphous Heavy-Atom Derivatives.** *Diffraction Methods for Biological Macromolecules Part A. Methods Enzymol.* Volume 114. Editors Wyckoff, H., W., Hirs, C., H., W., Timasheff, S., N. 147-155, 1985
95. Hatch, R., G. **Chromatography of Proteins on a Silica-Based Support with Polyethylene Glycol Ligands.** *J. Chromatographic Science* 28:210-214, 1990
96. Russel, M., Model, P. **Replacement of the flp gene of Escherichia coli by an inactive gene cloned on a plasmid.** *J. Bacteriol.* 159:1034-1039, 1984
97. Tabor, S., Richardson, C., C. **A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1074-1078, 1985