

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διατριβή αυτή πραγματοποιήθηκε κατά το διάστημα 1996-1997 στο εργαστήριο κρυσταλλογραφίας που ανήκει στο Βιολογικό τμήμα του Πανεπιστημίου Κρήτης και στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB), υπό την επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή Μιχάλη Κοκκινίδη. Από την θέση αυτή θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή Μιχάλη Κοκκινίδη για την αμέριστη ηθική αλλά και υλικότεχνική και οικονομική συμπαράσταση στο δύσκολο αυτό έργο, αλλά και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου να φέρω σε πέρας το ζητούμενο αυτής της διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον καθηγητή Βασίλειο Μπουριώτη για την εμπιστοσύνη την θεωρητική υποστήριξη και τις εύστοχες παρατηρήσεις του πάνω στην παρούσα εργασία.

Πρέπει επίσης να ευχαριστήσω την Μαρία Ρίνα ερευνητή του Ινστιτούτου για την παροχή χρήσιμων πληροφοριών και την προμήθεια του βακτηριακού στελέχους.

Ευχαριστώ επίσης την Μαρία Μαρκάκη για την ακούραστη βοήθεια της πάνω στις καλλιέργειες του βακτηριακού στελέχους.

Ευχαριστώ τον Μπάμπη Ποζίδη, Δημήτρη Διαλεκτάκη, Αγγελική Μαρτίνου, για την βοήθεια τους σε τεχνικά ζητήματα.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ντίνα Κοτσιφάκη και την Μαρία Παπαδοβασιλάκη για την μεγάλη υπομονή τους και την απεριόριστη βοήθεια τους.

Ευχαριστώ τον Κυριάκο Πετράτο για τις ωραίες συζητήσεις αλλά και την παροχή γνώσεων που μόνον ένας γνήσιος κρυσταλλογράφος μπορεί να δώσει.

Ενα μεγάλο ευχαριστώ αξίζει και στον Μανώλη Πιταροκοίλη για την αμέριστη βοήθεια του και την άψογη εργασία πάνω στην λειτουργία των υπολογιστικών συστημάτων του εργαστηρίου.

Ευχαριστώ τις γραμματείς του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB), Γεωργία Χουλάκη, Μαρία Τζατζαδάκη και Νεκταρία Κελαϊδη για την άψογη λειτουργία των διοικητικών διαδικασιών του Ινστιτούτου, καθώς και όλους αυτούς που φροντίζουν την εύρυθμη λειτουργία του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον φίλο και δάσκαλο μου στην Βιοχημεία και ειδικότερα στην χρωματογραφία, Ιάσωνα Τσίγκο για τις συμβουλές του αλλά και για τις γνώσεις που απλόχερα μου μετέδωσε.

Ευχαριστώ τον Κώστα Μαυρομάτη για τις εποικοδομητικές συζητήσεις μας αλλά και για την πειραματική και θεωρητική υποστήριξη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου γιατί χωρίς την δική τους υποστήριξη θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση αυτού του έργου.

Ευχαριστώ και την Μαριάννα Γιαννουλάκη για την συμπαράσταση και την αμέριστη υπομονή που έδειξε κατά την διάρκεια αυτής της εργασίας.

Ηράκλειο, Κρήτη
26 Σεπτεμβρίου 1997

A.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
A.1.1. Οι ακραιόφιλοι οργανισμοί ως πηγές για την Βιοτεχνολογία και την Μοριακή Βιολογία.....	5
A.1.2. Ψυχρόφιλα ένζυμα. Πηγές, ιδιομορφίες και ταξινόμηση τους.....	6
A.1.3. Ιδιομορφίες των ψυχρόφιλων ενζύμων. Σταθερότητα και ευκαμψία.....	6
A.2. ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ.....	8
A.2.1. Γενική θεώρηση.....	8
A.2.2. Οργάνωση των γενετικών τόπων των περιοριστικών συστημάτων τύπου II.....	10
A.2.3. Μη ειδική δέσμευση του DNA και γραμμική διάχυση.....	10
A.2.4. Δομές των περιοριστικών ενδονουκλεασών.....	12
A.3.5. Σκοπός της εργασίας.....	13
A.3.6. Η περιοριστική ενδονουκλεάση <i>R.PspPI</i>	14
B. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ ΒΑΣΙΣΜΕΝΕΣ ΣΤΗΝ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗ.....	16
B.1. Χρωματογραφία.....	16
B.1.1. Η φύση της χρωματογραφίας και των συγγενών μεθόδων.....	16
B.1.2. Βασική ονοματολογία.....	16
B.1.3. Τροποποιήσεις στην χρωματογραφία.....	17
B.1.4. Η σπουδαιότητα της χρωματογραφίας ως μεθόδου ανάλυσης βιομορίων.....	17
B.2. Θεωρία της χρωματογραφίας.....	17
B.2.1. Εισαγωγή.....	17
B.2.2. Διασπορά ζώνης και η αρχή της μη ισορροπίας.....	18
B.2.3. Η χρωματογραφία σαν τυχαίος περίπατος (<i>Random walk</i>).....	20
B.2.5. Διαχωριστικότητα (<i>Seperability</i>).....	23
B.3. Ηλεκτροφόρηση και ηλεκτροχρωματογραφία.....	26
B.3.1. Εισαγωγή.....	26
B.3.2. Αρχές της ηλεκτροφόρησης.....	26
B.3.3. Ηλεκτροκινητικό δυναμικό.....	26
B.3.4. Ηλεκτροφορητική κινητικότητα.....	28
B.4. Τύποι χρωματογραφικής ανάλυσης βιομορίων.....	30
B.4.1. Ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία (<i>IEX</i>).....	30
B.4.2. Φορέας (<i>Matrix</i>).....	30
B.4.3. Φορτισμένες ομάδες.....	31
B.4.4. Χωρητικότητα (<i>Capacity</i>).....	31
B.4.5. Φυσικές ιδιότητες των υλικών ιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας.....	32
B.4.6. Ισορροπία ιοντοανταλλαγής. Ειδικότητα του προσροφητή.....	32
B.4.7. Ιοντοανταλλακτικές στήλες. Βασική θεώρηση.....	33
B.4.9. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (<i>Gel filtration chromatography, GF</i>).....	38
B.4.10. Χρωματογραφία υδροφοβικών αντεπιδράσεων (<i>HIC</i>).....	39
B.4.11. Χρωματογραφία συγγένειας με δεσμευμένες χρωστικές.....	40
B.4.12. Ομάδες συγγένειας: Ορισμός και ιδιότητες.....	40
B.4.13. Χρωστικές: Χημική φύση και δέσμευση σε αδρανή υποστρώματα.....	40
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	42
Γ.1. Βιολογικό υπόστρωμα.....	42
Γ.2. Εκχύλιση των βακτηριακών κυττάρων και παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.....	42
Γ.2.1. Εκχύλιση με την χρήση υπέρηχων (<i>Sonication</i>).....	42
Γ.2.2. Εκχύλιση των βακτηριακών κυττάρων με τροποποιημένη μέθοδο της λυσοζύμης.....	46
Γ.3. Χρωματογραφικές μέθοδοι ανάλυσης.....	47
Γ.3.1. Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία.....	48
Γ.3.1.1. Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή <i>Q sepharose fast flow</i>	48
Γ.3.1.2. Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή <i>DEAE-sephacel</i>	49
Γ.3.1.3. Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή <i>MonoQ</i>	49
Γ.3.2. Κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία.....	50
Γ.3.2.1. Κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή <i>S sepharose fast flow</i>	50
Γ.3.2.2. Κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή <i>P11</i>	50
Γ.3.3. Χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή <i>Blue-sepharose fast flow</i>	51
Γ.3.4. Χρωματογραφία υδροφοβικών αντεπιδράσεων σε προδροφητή <i>Phenyl sepharose fast flow(High sub)</i>	51
Γ.3.5. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης(<i>Gel Filtration</i>).....	52

Γ.4. Ηλεκτροφορητικές μέθοδοι ανάλυσης.....	52
Γ.4.1. Ηλεκτροφόρηση αποδιατακτικού πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE).....	52
Γ.5. Τεχνικές χρώσεις αποδιατακτικών πηκτωμάτων.....	52
Γ.5.1. Χρώση <i>Commassie Brilliant Blue R250</i>	52
Γ.5.2. Αρνητική χρώση με ιμιδαζόλιο και χλωριούχο ψευδάργυρο.....	52
Γ.5.3. Μονοχρωματική χρώση νιτρικού αργύρου.....	53
Γ.5.5. Χρώση υπεριώδους με την χρωστική <i>SybroRED</i>	53
Γ.5.6. Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης.....	54
Γ.6. Ενζυμική δοκιμασία ανίχνευσης ενεργότητας της ενδονουκλεάσης <i>R.PspI</i>	54
Γ.7. Μέθοδος μέτρησης μονάδων ενζυμικής ενεργότητας της ενδονουκλεάσης <i>R.PspI</i>	55
Γ.8. Άλλες μέθοδοι χειρισμού του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.....	56
Γ.8.1. Συμπύκνωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με συσκευή υπερδιήθησης.....	56
Γ.8.2. Αλλαγή του διαλύτη μέσω συστήματος διαπήδησης και υπερδιήθησης.....	57
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	59
Δ.1. Κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία.....	60
Δ.1.1. Κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή <i>P11 Whatman</i> σε pH 7.0.....	60
Δ.1.2. Κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή <i>S sepharose fast flow</i> σε pH 5.01.....	61
Δ.1.3. Κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή <i>S sepharose fast flow</i> σε pH 4.563.....	63
Δ.1.4. Συμπεράσματα από την κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία.....	63
Δ.2. Ανιοανταλλακτική χρωματογραφία.....	64
Δ.2.1. Ανιοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή <i>DEAE-sephacel</i> , pH 7.4.....	64
Δ.2.2. Ανιοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή <i>Q sepharose fast flow</i> pH 7.4.....	66
Δ.2.3. Ανιοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή <i>Q sepharose fast flow</i> pH 8.2.....	66
Δ.2.4. Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή <i>MonoQ</i> pH 7.4.....	68
Δ.3. Χρωματογραφία σε υδροφοβικό προσροφητή <i>Phenyl sepharose fast flow (high sub)</i>	69
Δ.4. Χρωματογραφία διήθησης πηκτώματος (<i>Gel filtration</i>).....	72
Δ.5. Το τελικό σχήμα καθαρισμού της ενδονουκλεάσης <i>R.PspI</i>	72
Δ.5.1. Λύση των κυττάρων.....	73
Δ.5.2. Προετοιμασία του δείγματος και χρωματογραφία σε ανιοντοανταλλακτική στήλη <i>Q sepharose fast flow</i>	73
Δ.5.3. Προετοιμασία και χρωματογραφία σε προσροφητή <i>Blue sepharose fast flow</i>	74
Δ.5.4. Προετοιμασία και χρωματογραφία σε στήλη <i>MonoQ HR 10/10</i> pH 7.4.....	75
Δ.6. Άλλες αναλύσεις σχετικά με την <i>R.PspI</i>	77
Δ.6.1. Κατακρήμνιση της ενεργότητας της <i>R.PspI</i> με Θεϊκό Αμμώνιο ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).....	77
Δ.6.2. Ισοηλεκτρική εστίαση (<i>IEF</i>) του μορίου της <i>R.PspI</i>	77
Δ.6.3. Θερμική σταθερότητα της <i>R.PspI</i>	78
Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	78
ΣΤ. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	79
Ζ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	81

A.1. Εισαγωγή

A.1.1. Οι ακραιόφιλοι οργανισμοί ως πηγές για την Βιοτεχνολογία και την Μοριακή Βιολογία

Μέχρι πρόσφατα η βιολογική έρευνα ασχολούνταν με οργανισμούς που για διάφορους λόγους είχαν επιλεγθεί ως πειραματικά υλικά γιατί πληρούσαν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που διευκόλυναν την αναπαραγωγή τους στο εργαστήριο, αλλά και γιατί εξυπηρετούσαν συγκεκριμένα βιολογικά ερωτήματα. Τα τελευταία χρόνια έχει παρουσιαστεί μια προτίμηση προς οργανισμούς των οποίων το ενδιαίτημα παρουσιάζει ιδιομορφίες και ακραίες συνθήκες. Μετά τις πρόσφατες προόδους της μοριακής βιολογίας σχετικά με την δομή και λειτουργία των πρωτεϊνών αλλά και με την γνώση που έχει αποκτηθεί σχετικά με την οργάνωση του γονιδιώματος των διάφορων οργανισμών που έχουν μελετηθεί, τα βιολογικά ερωτήματα που θέτουμε είναι πολύπλοκότερα και αφορούν εκείνους τους μοριακούς μηχανισμούς με τους οποίους οι οργανισμοί καταφέρνουν να προσαρμόζονται στο περιβάλλον τους. Από μεγάλη ποικιλία των διαφορετικών περιβαλλόντων στα οποία διαβιών ζωντανοί οργανισμοί, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ακραίες συνθήκες. Ψύχος, υψηλές θερμοκρασίες, υψηλή αλατότητα, ανοξικές συνθήκες, καθώς και ιδιομορφίες στην ικανότητα διάσπασης τοξικών και άλλων χημικών προϊόντων είναι μερικές από τις συνθήκες που κεντρίζουν το ενδιαφέρον όχι μόνο από την μεριά του καθαρού ερευνητικού αποτελέσματος, αλλά και από την πληθώρα των δυνατών εφαρμογών που ανοίγονται με την μελέτη των ακραιόφιλων οργανισμών. Εφαρμογές όπως ένζυμα εργαλεία με ανθεκτικότητες στο ψύχος ή στην υπερβολική θερμοκρασία ή αλατότητα, εφαρμογές στην βιομηχανία απορρυπαντικών και σε άλλους βιομηχανικούς κλάδους (βυρσοδεψία, γεωργικά λιπάσματα, εντομοκτόνα, ακόμα και βιομηχανία μετάλλων) είναι μερικά από τα στοιχεία που καθιστούν την μελέτη των ακραιόφιλων οργανισμών ενδιαφέρουσα και σε μερικές περιπτώσεις επιτακτική. Μεταξύ των ακραιόφιλων οργανισμών λιγότερο μελετημένοι είναι εκείνοι που ζούν προσαρμοσμένοι σε συνθήκες ψύχους δηλαδή οι ψυχρόφιλοι οργανισμοί.

A.1.2. Ψυχρόφιλα ένζυμα. Πηγές, ιδιομορφίες και ταξινόμηση τους.

Βασικά αυτό που ενδιαφέρει περισσότερο στην μελέτη των ακραιόφιλων οργανισμών είναι τα ένζυμα τους και το πως αυτά προσαρμόζουν τις ιδιότητες τους στις ιδιομορφες συνθήκες του περιβάλλοντος προκειμένου να εξυπηρετήσουν τον σκοπό τους που είναι σε τελική ανάλυση η επιτάχυνση βιοχημικών αντιδράσεων που πρέπει να πραγματοποιηθούν για να παραμείνει ζωντανός ο οργανισμός.

Ενζυμα προσαρμοσμένα στο κρύο μπορούν να παραχθούν τόσο από προκαρυωτικούς όσο και από ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Μέχρι τώρα τα περισσότερα προέρχονται από βακτήρια και ψάρια που ζούν σε πολικές περιοχές, ειδικά σε θάλασσα νερά της Ανταρκτικής τα οποία αποτελούν ένα σταθερό και μόνιμο θερμοκρασιακό ενδιαίτημα ($0\pm 2^{\circ}\text{C}$) το οποίο εξασκεί στα ενδημικά είδη μια σκληρή επιλεκτική πίεση. Σε αυτά τα περιβάλλοντα οι βακτηριακοί πλυθισμοί είναι ιδιαίτερα επιτυχείς αφού πυκνότητες κυττάρων της τάξεως 10^5 - 10^6 /ml έχουν καταγραφεί τόσο στην κολώνα του νερού όσο και σε πάγους στη θάλασσα. Μια άλλη πηγή ψυχρόφιλων ενζύμων αποτελούν τα βακτήρια που ζούν σε μεγάλα βάθη. Διάφορα γένη όπως *Alteromonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, έχουν ταυτοποιηθεί σε ιζήματα από μεγάλα βάθη και θερμοκρασίες 3°C . Η άριστη και μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης για αυτά τα στελέχη είναι μεταξύ 4 - 12°C . Μπορούν έτσι να χαρακτηριστούν σαν ψυχρόφιλα σύμφωνα με τα κριτήρια που έχουν θεσπίσει οι Morita και Russel, που διακρίνουν τους ψυχρόφιλους σαν οργανισμούς με ανώτατο όριο ανάπτυξης κάτω από 20°C και ψυχρότροφους σαν οργανισμούς που είναι ικανοί να αναπτυχθούν στους 0°C αλλά εμφανίζουν άνω όριο ανάπτυξης μέχρι 40°C . Αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο στις πολικές περιοχές όσο και στα μεγάλα βάθη οι ψυχρότροφοι οργανισμοί είναι πολυπληθέστεροι των ψυχρόφιλων. Ψυχρόφιλα ένζυμα μπορούν επίσης να βρεθούν και στα ψάρια τα οποία είναι σε μεγάλους αριθμούς στα Αρκτικά και Ανταρκτικά ύδατα. (Feller, G., et al., 1996)

A.1.3. Ιδιομορφίες των ψυχρόφιλων ενζύμων. Σταθερότητα και ευκαμψία.

Παρόλο που ο όρος σταθερότητα συμπεριλαμβάνει διαφορετικές πλευρές του μοριακού χαρακτήρα μιας πρωτεΐνης που εξαρτώνται από το ποιος είναι ο

αποσταθεροποιητικός παράγοντας, μπορούμε να το θεωρήσουμε πιο γενικά υποθέτωντας ότι η σταθερότητα συσχετίζεται με την σχετική διατήρηση της δομής που μπορεί να εκτιμηθεί μετρώντας την ανθεκτικότητα της τρισδιάστατης δομής στις υψηλές θερμοκρασίες. Καθώς τα μεσόφιλα και θερμόφιλα ένζυμα έχουν μελετηθεί εκτενώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν σημεία αναφοράς. Κατά γενική ομολογία οι διαφορές που παρουσιάζουν τα ψυχρόφιλα ένζυμα σε σχέση με τα μεσόφιλα η θερμόφιλα εστιάζονται κυρίως στον τομέα της ευκαμψίας της δομής των πρώτων. Αυτό μπορεί να γίνει κατανοητό διότι τα ψυχρόφιλα ένζυμα καλούνται να καταλύσουν τις ίδιες αντιδράσεις με τα αντίστοιχα μεσόφιλα σε ένα θερμοκρασιακό περιβάλλον που δεν ευνοεί την αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης και έτσι αυτά πρέπει να διατηρούν μια τέτοια δομή στην οποία ο σχηματισμός του συμπλόκου ενζύμου υποστρώματος να είναι ευκολότερος ώστε και η ενέργεια ενεργοποίησης να είναι σε χαμηλότερα επίπεδα. Επιπλέον διαφορές πρέπει να αναμένονται και στην σύσταση της μοριακής επιφάνειας έτσι ώστε να διευκολύνεται η αλληλεπίδραση με τον διαλύτη. Η ευκαμψία της δομής που αποτελεί πλεονέκτημα σε ψυχρό περιβάλλον οδηγεί σε αποσταθεροποίηση του μορίου με την άνοδο της θερμοκρασίας καθώς οι θερμική ταλάντωση των ατόμων εντείνεται με τελικό αποτέλεσμα την αποδιάταξη και την απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας. Εύκολα μπορεί να συμπεράνει κανείς ότι αφού στην περίπτωση των θερμόφιλων πρωτεϊνών η αύξηση της θερμοκρασίας δεν οδηγεί στην αποδιάταξη και αφού οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ισχυροποιούνται με την θερμοκρασία, τότε το περιεχόμενο των ψυχρόφιλων περιοχών σε υδρόφοβικές περιοχές πρέπει να είναι χαμηλό ενώ αντίθετα η ύπαρξη πολικών και φορτισμένων καταλοίπων δρά σταθεροποιητικά (Feller, G., et al., 1996). Γενικά οι ιδιότητες των ψυχρόφιλων ενζύμων έχουν τα ακόλουθα κοινά χαρακτηριστικά:

- Μια καμπύλη ενεργότητας σαν συνάρτηση της θερμοκρασίας που είναι μετατοπισμένη προς τις χαμηλές θερμοκρασίες.
- Μια ειδική ενεργότητα k_{cat} , ή φυσιολογική αποτελεσματικότητα k_{cat}/k_m υψηλότερη από τα αντίστοιχα μεσόφιλα ένζυμα από 0-30⁰C.
- Περιορισμένη θερμική σταθερότητα που εκδηλώνεται από την γρήγορη αποδιάταξη τους σε ενδιάμεσες θερμοκρασίες.

Είναι ξεκάθαρο ότι η προσαρμογή στο κρύο δεν μπορεί να γίνει κατανοητή χωρίς πλήρως βελτιστοποιημένες δομές. Μέχρι στιγμής μόνο μία δομή είναι γνωστή ενώ είναι αναγκαία η ύπαρξη και άλλων δομών.

A.2. Περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

A.2.1. Γενική θεώρηση

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αποτελούν τμήματα των συστημάτων περιορισμού και τροποποίησης, που απαντούν μόνο μεταξύ των προκαρυωτικών οργανισμών. Τα συστήματα περιορισμού και τροποποίησης που για συντομία αναφέρονται και ως R-M, συμπεριλαμβάνουν μία ενδονουκλεάση και μία μεθυλοτρανσφεράση. Λειτουργούν προστατεύοντας τα βακτηριακά κύτταρα από μολύνσεις βακτηριοφάγων, διότι το εξωγενές DNA πέπτει με μεγάλη ειδικότητα από την ενδονουκλεάση εάν αυτό περιέχει την ειδική αλληλουχία αναγνώρισης. Το κυτταρικό DNA προστατεύεται από την πέψη από μια ειδική μεθύλιση στις αλληλουχίες αναγνώρισης η οποία καταλύεται από την μεθυλοτρανσφεράση του συστήματος .

Τα συστήματα R-M μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες σύμφωνα με την σύσταση των υπομονάδων τους και την απαίτηση σε συμπράγοντες. Τα συστήματα τύπου I αποτελούνται από τρεις υπομονάδες: R για περιορισμό, M για μεθύλιση και S για την ειδικότητα. Σχηματίζουν συχνά πενταμερή σύμπλοκα που περιέχουν δύο R, δύο M και μία S υπομονάδα και αναγνωρίζουν μία αλληλουχία που αποτελείται από δύο μέρη. Η μεθύλιση απαιτεί τη παρουσία S-αδενοσύλο-μεθειονίνης(AdoMet) και συμβαίνει μέσα στην αλληλουχία αναγνώριση ενώ η πέψη λαμβάνει χώρα σε μία απομακρυσμένη περιοχή και απαιτεί και αυτή S-αδενοσύλο-μεθειονίνης(AdoMet) καθώς και ATP το οποίο υδρολύεται σε μεγάλα ποσά ακολούθως της πέψης του DNA.

Τα περιοριστικά συστήματα τύπου II αποτελούνται από δύο διακριτές ενζυμικές ενεργότητες , μία ομοδιμερή ενδονουκλεάση που δεν εξαρτάται από S-αδενοσύλο-μεθειονίνης(AdoMet) και ATP και μία μονομερή μεθυλοτρανσφεράση που απαιτεί μόνο S-αδενοσύλο-μεθειονίνης(AdoMet) σαν συμπράγοντα. Τα περιοριστικά ένζυμα τύπου II τυπικά αναγνωρίζουν παλίνδρομες αλληλουχίες μήκους 4-8bp και πέπτουν το DNA μέσα σε αυτές ή στην άμεση γειτνία τους. Η μεθύλιση συμβαίνει μέσα στην αλληλουχία αναγνώρισης.

Τα περιοριστικά συστήματα τύπου III αποτελούνται από δύο υπομονάδες: R και M. Ενώ η M υπομονάδα καταλύει μόνη την τροποποίηση του DNA απαιτώντας μόνο S-αδενοσύλο-μεθειονίνη (AdoMet), ο περιορισμός απαιτεί την συνεργασία των δύο

υπομονάδων καθώς και την παρουσία ATP το οποίο όμως δεν υδρολύεται στην διαδικασία πέψης. Τέλος πολλά περιοριστικά συστήματα χαρακτηρίζονται σαν τύπου IV τα οποία χρειάζονται σαν συμπαράγοντα το S-αδενοσύλο-μεθειονίνη(AdoMet) αλλά δεν απαιτούν ATP όπως και τα τύπου II. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι κλάσεις των περιοριστικών συστημάτων καθώς και παρόμοια ένζυμα.

Πίνακας. 1 Γενική θεώρηση όλων των τύπων περιοριστικών συστημάτων.

Τύπος	Δομή	Συμπαράγοντες	Αλληλ. Στόχος	πέψη
I	$\alpha_2\beta_2\gamma$	ATP(υδρόλυση) AdoMet	ασύμμετρη 7bp	στατιστικά σε μεγάλη απόσταση από τον στόχο
EcoB		Mg^{2+}	-TGA(N)TGCT-	
II	α_2	Mg^{2+}	παλίνδρομική 4-8bp,	Μέσα στην αλληλουχία
EcoRV			GATATC	
Its	α	Mg^{2+}	ασύμμετρη 4-7bp -GGATG-	έξω αλλά σε καθορισμένη απόσταση
FokI				
Ite	α_2	Mg^{2+}	παλίνδρομική 4-8bp,-	μέσα στην αλληλουχία
EcoRII		DNA	CC(^A / _T)GG-	
III	$\alpha\beta$	ATP Mg^{2+} AdoMet	ασύμμετρη διακοπτόμενη 5-6bp -AGACC-	μη μακριά σε καθορισμένη απόσταση
EcoPI		DNA		
IV, Eco571	$\alpha(2)$	Mg^{2+} AdoMet	ασύμμετρη, 6bp -CTGAAG-	μακριά, καθορισμένη απόσταση
BglI-like	$\alpha_2\beta$	Mg^{2+} AdoMet	διακοπτόμενη -AC(N ₄)GTA(^C / _T)C	έξω, σε καθορισμένη απόσταση και στις δύο μεριές
BaeI				

Μέχρι στιγμής έχουν μελετηθεί περίπου 2500 περιοριστικά ένζυμα τύπου II από τα οποία σε πάνω από 50 είναι γνωστή η αμινοξική τους αλληλουχία και έχει γίνει ο βιοχημικός χαρακτηρισμός τους.

Πολλά από αυτά είναι ισοσχιζομερή δηλαδή αναγνωρίζουν την ίδια αλληλουχία στόχο και άλλα είναι νεοσχιζομερή δηλαδή αναγνωρίζουν την ίδια αλληλουχία στόχο αλλά την πέπτουν σε άλλο σημείο (Pingoud, A., Jeltsch, A, 1997)

A.2.2. Οργάνωση των γενετικών τόπων των περιοριστικών συστημάτων τύπου II

Τα γονίδια για τα περιοριστικά συστήματα τύπου II βρίσκονται σε διάφορες θέσεις όπως για παράδειγμα τα περιοριστικά συστήματα της *E.coli* καθώς και τα *PaeR71* και *PvuII*. Τα γονίδια για τα περιοριστικά συστήματα *DpnI* και *DpnII* εδράζονται στο χρωμόσωμα ενώ για τα συστήματα *PstI*, *TaqI*, *HhaI* θεωρούνται ότι εδράζονται στο χρωμόσωμα αλλά δεν έχει αποκλειστεί και η ύπαρξη τους σε πλασμίδια. Τα γονίδια *R* και *M* του ίδιου συστήματος τείνουν να βρίσκονται στενά συνδεδεμένα, πράγμα που υποδηλώνει την λειτουργική αλληλεξάρτηση τους, ενώ τίποτα δεν είναι γνωστό για την γεινία διαφορετικών περιοριστικών συστημάτων του ίδιου βακτηριακού είδους (Wilson, G.G., 1988).

A.2.3. Μη ειδική δέσμευση του DNA και γραμμική διάχυση

Η βιολογική λειτουργία των περιοριστικών ενδονουκλεασών βασίζεται στην ταχεία πέψη του εισβάλοντος φαγικού DNA. Η πέψη πρέπει να ολοκληρωθεί πριν η αντίστοιχη μεθυλάση μεθυλίωση αυτό το DNA και πριν αυτό αρχίσει την δηλητηριώδη δράση του στο βακτηριακό κύτταρο. Αυτό απαιτεί πολύ γρήγορο εντοπισμό των θέσεων στόχων, το οποίο είναι αρκετά δύσκολο αν θεωρήσουμε την μεγάλη περίσσεια μη ειδικών θέσεων πάνω στο ξένο φαγικό DNA. Προκειμένου να ξεπεράσουν αυτό το πρόβλημα τα περιοριστικά ένζυμα φαίνεται να έχουν αναπτύξει μια κοινή στρατηγική που διευκολύνει τον εντοπισμό του στόχου. Η πρωτεΐνη πολύ γρήγορα δεσμεύεται στο DNA μη ειδικά οπουδήποτε και έπειτα σαρώνει το υπόστρωμα σε αναζήτηση της αλληλουχίας στόχου σε μία μονοδιάστατη διαδικασία διάχυσης.

Μη ειδική δέσμευση του DNA. Αυτή η διαδικασία έχει δειχθεί ότι συμβαίνει σε όλα τα περιοριστικά ένζυμα που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα από αυτή την άποψη. Παρόλα αυτά λίγες μόνο μελέτες έχουν γίνει σε ότι αφορά τις αλληλεπιδράσεις που αναμειγνύονται στην μη ειδική δέσμευση. Μέχρι στιγμής η μόνη δομή που είναι διαθέσιμη και αφορά μη ειδική δέσμευση σε DNA είναι αυτή της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *EcoRV* μαζί με DNA που δεν έχει την αλληλουχία στόχο. Το σύμπλεγμα αυτό κρατείται σταθερό από αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης και του

φωσφοδιεστερικού σκελετού του DNA. Πέντε αλληλεπιδράσεις μεταξύ αμινοξέων από τις δύο υπομονάδες σχηματίζονται με τις φωσφορικές ομάδες στο DNA αλλά οι άμεσες αλληλεπιδράσεις με τις βάσεις του DNA απουσιάζουν παντελώς. Επίσης η κάμψη του DNA που είναι χαρακτηριστικό της καταλυτικής διαδικασίας του ενζύμου δεν εμφανίζεται σε αυτή την περίπτωση και το ενεργό κέντρο του μορίου δεν είναι πλήρως σχηματισμένο. Αυτές οι περιοχές του μορίου που ευθύνονται για την αναγνώριση των βάσεων του DNA φαίνεται ότι πληρούνται με ασθενώς συνδεδεμένα μόρια νερού κάτι το οποίο έχει παρατηρηθεί και στη περίπτωση της *EcoRI* όπου περίπου 110 κατάλοιπα συστοιχίζονται στο μη ειδικό σύμπλοκο υποδηλώνοντας ότι μια πλήρης στιβάδα υδάτωσης διαχωρίζει την πρωτεΐνη από το DNA. Αυτά τα μόρια του νερού που είναι παρόντα κατά την μη ειδική δέσμευση στο DNA αποχωρίζονται από την πρωτεΐνη κατά τον σχηματισμό του ειδικού συμπλόκου αναγνώρισης που δημιουργείται από την αντίληψη της αλληλουχίας στόχου.

Γραμμική διάχυση. Η παραπάνω διαδικασία είναι απαραίτητη για να ξεκινήσει η διαδικασία σάρωσης του υποστρώματος σε αναζήτηση του στόχου. Η διαδικασία διάχυσης χαρακτηρίζεται από μία τυχαία βόλτα (random walk) μέχρι να βρεθεί η αλληλουχία στόχος. Η ταχύτητα εντοπισμού του στόχου εξαρτάται από τον ρυθμό και τη γεωμετρία της κίνησης διότι μια τρισδιάστατη κίνηση θεωρητικά απαιτεί περισσότερο χρόνο και βήματα από μια δισδιάστατη ή ακόμα και μονοδιάστατη αναζήτηση πάνω σε μία γραμμή.

Η έννοια της διευκολυνόμενης αναζήτησης στόχου μέσω μείωσης των διαστάσεων στις οποίες πρέπει να γίνει αυτή είναι μια στρατηγική που υιοθετείται από πρωτεϊνικά μόρια που αλληλεπιδρούν με μεμβράνες ή με το DNA.

Εξαιτίας της μείωσης των αναζητούμενων διαστάσεων η ταχύτητα της γραμμικής διάχυσης είναι μεγαλύτερη αν και ο συντελεστής γραμμικής διάχυσης είναι κατά πολύ μικρότερος του ανάλογου συντελεστή για τις τρεις διαστάσεις. Για παράδειγμα το ένζυμο *EcoRI* σαρώνει το DNA με μια ταχύτητα $7 \cdot 10^6$ bp/sec με ένα συντελεστή γραμμικής διάχυσης $5 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ που είναι δύο τάξεις μεγέθους μικρότερος από τον αντίστοιχο συντελεστή των τριών διαστάσεων. Όπως αποδεικνύεται η γραμμική διάχυση είναι αποτέλεσμα ηλεκτροστατικών δυνάμεων που αναπτύσσονται μεταξύ του ενζύμου και του DNA. Για να ισορροπήσει τις ελκτικές και απωστικές δυνάμεις το ένζυμο κατασκευάζει μια ηλεκτροστατική παγίδα μέσα στην οποία το DNA μπορεί να κινηθεί εύκολα χωρίς να σχηματίζονται πολλές άμεσες επαφές με αμινοξικά

κατάλοιπα. Μέχρι τώρα όλες οι δομές που είναι γνωστές σε περιοριστικά ένζυμα αποδεικνύουν την ύπαρξη μίας τέτοιας δομής που αγκαλιάζει το DNA και υποδηλώνει ότι η υπόθεση για ηλεκτροστατική δέσμευση του DNA είναι γενικά ορθή.

Καθώς η γραμμική διάχυση πάνω στο DNA διαταράσσεται από άλλες ισχυρά προσδεδωμένες πρωτεΐνες πράγμα που αποδεικνύεται από *in vitro* παρατηρήσεις, υπήρξε για πολλά χρόνια συζήτηση κατά πόσο αυτό το φαινόμενο είναι πραγματικό ή τεχνητό. Από μελέτες που έχουν γίνει σε μεταλλαγές του συστήματος EcoRV στην *E. coli* βρέθηκε ότι η ικανότητα περιορισμού φαγικού DNA συσχετίζεται ισχυρά με την ικανότητα γραμμικής διάχυσης πάνω στο DNA. (Jeltsch et al., 1996). Αυτό αποδεικνύει ότι η γραμμική διάχυση πάνω στο DNA είναι πραγματικό γεγονός και λαμβάνει χώρα *in vivo*.

A.2.4. Δομές των περιοριστικών ενδονουκλεασών

Η ανάλυση αλληλουχιών περισσοτέρων από 50 διαφορετικών περιοριστικών ενζύμων απέδειξε ότι δεν υπάρχει καμία ένδειξη για την ύπαρξη των κλασσικών DNA-δεσμευτικών προτύπων όπως τα: έλικα-στροφή-έλικα, δάκτυλα ψευδαργύρου και έλικα-θηλειά-έλικα, ή φερμουάρ διαφόρων τύπων. Για την ακρίβεια οι τέσσερις δομές συκρυστάλλων που έχουν λυθεί μέχρι στιγμής προτείνουν ότι το κάθε ένζυμο υιοθετεί μία διαφορετική στρατηγική για την αναγνώριση των αλληλουχιών του DNA (Athanasiadis, A., *et al.*, 1994)

Η σύγκριση των κρυσταλλικών δομών μεταξύ της *EcoRI*, *EcoRV*, *PvuII*, *BamHI*, *Cfr10I*, δείχνει ότι όλες αυτές οι πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από μία μικτή α/β αρχιτεκτονική με μία ανάμεικτη κεντρική περιοχή πέντε β-ελασμάτων που περιβάλλονται από α-έλικες. Ενώ είναι ιδιαίτερα δύσκολο να διακρίνει κανείς τις δομικές ομοιότητες μεταξύ της *EcoRI* και *EcoRV* είναι παραπάνω από προφανείς αυτή η ομοιότητα αν κανείς κοιτάξει τις δομές της *EcoRV* και *PvuII*, από την μία και τις δομές *EcoRI* και *BamHI* από την άλλη. Περιέργως το καταλυτικό κέντρο και των τεσσάρων αυτών ενζύμων παρουσιάζει εξαιρετική ομοιότητα όχι μόνο στο τύπο των καταλοίπων που απαρτίζεται αλλά και στην τοπολογία αυτών αφού φαίνεται ότι εδράζονται σε ομόλογα στοιχεία δευτεροταγούς δομής. Γενικά μπορεί κανείς να πει

με σιγουριά ότι οι δομές των μονομερών υπομονάδων των περιοριστικών ενζύμων που είναι γνωστές μέχρι τώρα έχουν κάποια μικρή ομοιότητα, ενώ αντίθετα ο τρόπος διμερισμού αυτών των υπομονάδων για την κατασκευή του ενεργού ενζύμου είναι τελείως διαφορετικός για τα διάφορα ένζυμα. Έτσι η μέθοδος διμερισμού των *EcoRI*-*BamHI* από την μία και των *EcoRV*-*PvuII* από την άλλη διαφέρουν κατά πολύ.

Επίσης μία ακόμα σημαντική διαφορά μεταξύ των ενζύμων των δυο ομάδων που αναφέρονται παραπάνω εστιάζεται στο τρόπο με τον οποίο αυτά προσεγγίζουν το DNA όπως υποδηλώνεται από τις συκρυσταλλικές δομές, όπου η *EcoRI* και η *BamHI* προσεγγίζουν το DNA από την μεγάλη αύλακα ενώ οι *EcoRV* και *PvuII* από την μικρή. Αυτό το γεγονός υπαγορεύεται από το προϊόν της αντίδρασης πέψης τυπ DNA με τα συγκεκριμένα ένζυμα. Πιο ειδικά φαίνεται ότι η διαδικασία αναγνώρισης και προσέγγισης του υποστρώματος έχει να κάνει με το φωσφοδιεστερικό δεσμό που πρόκειται να κοπεί. Έτσι τα ένζυμα που αφήνουν 5' άκρα προσεγγίζουν καλύτερα το υπόστρωμα από την μεγάλη αύλακα, ενώ κόπτες τυφλών άκρων όπως οι *EcoRV* και *PvuII* έχουν ευκολότερη πρόσβαση από την μικρή αύλακα του DNA στους δεσμούς που αποτελούν τον στόχο τους. Η κατά ζεύγη ομολογίες που παρουσιάζουν τα παραπάνω ένζυμα προφανώς και έχουν να κάνουν με τους τοπολογικούς περιορισμούς που πρέπει να τηρηθούν κατά περίπτωση και επομένως θα πρέπει να περιμένει κανείς ότι και τα ένζυμα που παράγουν 3' άκρα θα εμφανίζουν ομαδοποίηση και προσεγγισιμότητα του υποστρώματος από την μικρή αύλακα και πιθανό να εμφανίζουν δομική ομοιότητα με την ομάδα της *PvuII* - *EcoRV*.

A.3.5. Σκοπός της εργασίας

Συνδυάζοντας τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, στην παρούσα εργασία έγινε μία προσπάθεια που ενσωματώνει την μελέτη των ψυχρόφιλων ενζύμων και την μελέτη των περιοριστικών ενδονουκλεασών πάνω στο θέμα της απομόνωσης μίας νέας ψυχρόφιλης περιοριστικής ενδονουκλεάσης από το ανταρκτικό ψυχρότροφο βακτήριο *Psychrobacter* sp. TAD137. Η ενδονουκλεάση αυτή που ταξινομείται ως *R.PspPI*, αποτελεί μία μοναδική ευκαιρία για την μελέτη τόσο του ψυχρόφιλου χαρακτήρα του ενζύμου, όσο και για την μελέτη των περιοριστικών του ιδιοτήτων που εμπίπτουν στα γενικότερα ενδιαφέροντα του εργαστηρίου Μακρομοριακών

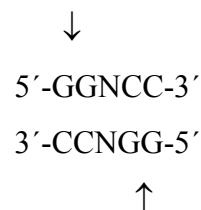
δομών με υπεύθυνο τον καθηγητή Μιχ. Κοκκινίδη πάνω στην δομική μελέτη των περιοριστικών ενδονουκλεασών γενικότερα.

Η εργασία αυτή αναφέρεται στην προσπάθεια απομόνωσης του ενζύμου αυτού από την φυσική πηγή προέλευσης του *Psychrobacter sp.* TAD137.

Πρέπει εδώ να τονισθεί ότι ο τελικός στόχος είναι η κρυστάλλωση του ενζύμου R.*Psp*PI και η εύρεση της δομής του μέσω κρυσταλλογραφικών μεθόδων. Αυτό θα σημαίνει ότι η R.*Psp*PI θα είναι η έκτη περιοριστική ενδονουκλεάση με κρυσταλλογραφικά λυμένη δομή και η δεύτερη ψυχρόφιλη πρωτεΐνη για την οποία θα υπάρχει δομική πληροφορία.

A.3.6. Η περιοριστική ενδονουκλεάση R.*Psp*PI

Σύμφωνα με την ταξινόμηση που αναφέρεται παραπάνω για τα περιοριστικά συστήματα τύπου II η R.*Psp*PI αποτελεί το περιοριστικό μέρος του συστήματος R-M.*Psp*PI που ανιχνεύεται στο βακτήριο *Psychrobacter sp.* TAD137. Είναι ισοσχιζομερές του περιοριστικού ενζύμου *Sau*96I και όπως αυτό αναγνωρίζει την παλίνδρομη αλληλουχία :



και καταλύει την διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της πρώτης και δεύτερης γουανίνης όπως υποδηλώνουν τα βέλη στο παραπάνω σχήμα, παράγοντας θραύσματα με ελεύθερα 5' άκρα.

Η αμινοξική αλληλουχία του ενζύμου δεν είναι γνωστή και δεν έχει κλωνοποιηθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη. Αναμένεται να είναι ομοδιμερής με απαίτηση σε ιόντα Mg^{2+} για να καταλύσει την διάσπαση του υποστρώματος.

Το άλλο μέρος του περιοριστικού συστήματος η M. *Psp*PI έχει κλωνοποιηθεί (Rina, M., 1997) και είναι γνωστή η αμινοξική του αλληλουχία.

Η φύση της αλληλουχίας αναγνώρισης που είναι μήκους 5bp καθιστά την *R. PspPI* συχνό κόπτη (frequent cutter) αφού η συχνότητα της αλληλουχίας αυτής είναι μεγάλη. Πράγματι αυτό διαπιστώνεται αν κανείς κοιτάξει την συχνότητα της αλληλουχίας αυτής σε λDNA όπου απαντάται 74 φορές.

B. Μέθοδοι ανάλυσης βιομορίων βασισμένες στην διαφορική μετανάστευση

B.1. Χρωματογραφία

B.1.1. Η φύση της χρωματογραφίας και των συγγενών μεθόδων

Η χρωματογραφία είναι μια αναλυτική και διαχωριστική διαδικασία η οποία βασίζεται στα πειράματα προσρόφησης όπως αυτά περιγράφονται από τον Tsweet το 1903 και το 1906. Στα πειράματα αυτά ο Tsweet παρασκεύασε ένα εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα από πράσινο ιστό φυτού και προσέθεσε λίγο από αυτό το υλικό σε μια στήλη από κονιορτοποιημένο προσροφητικό υλικό όπως ιννουλίνη ή κιμωλία, το οποίο είχε πακεταριστεί μέσα σε ένα υάλινο σωλήνα ο οποίος ήταν περιορισμένος στην μία του άκρη. Τα χρωμοφόρα τα οποία είχαν προσροφηθεί σε μια λεπτή ζώνη εκπλύθηκαν στην συνέχεια με φρέσκο διαλύτη. Τότε εξαιτίας της επιλεκτικής προσρόφησης τους, τα χρωμοφόρα εκλούονταν από την στήλη με διαφορετικούς ρυθμούς και διαχωρίζονταν σαν μια σειρά από πράσινες και κίτρινες ζώνες οι οποίες μπορούσαν να συλλεγούν ξεχωριστά. Σε αυτή την διαδικασία δύο βημάτων ο Tsweet όχι μόνο κατάφερε να διαχωρίσει ένα μίγμα στα συστατικά του αλλά κατάφερε να διαχωρίσει ένα πολυσύνθετο μίγμα στα συστατικά του χωρίς χημική αλλαγή ή τροποποίηση αυτών έτσι ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν αργότερα για ανάλυση των ιδιοτήτων τους.

B.1.2. Βασική ονοματολογία

Ο Tsweet όχι μόνο χρησιμοποίησε αυτή την πρωτοποριακή διαδικασία αλλά αναγνωρίζοντας την σημασία της καθιέρωσε και την σχετική ονοματολογία. Έτσι, ο σωλήνας ο οποίος είναι γεμάτος με τον προσροφητή, καλείται χρωματογραφική στήλη. Το υγρό, ο διαλύτης καλείται χρωματογραφικό διάλυμα ή υγρό έκπλυσης. Η σειρά των έγχρωμων ζωνών καλείται χρωματογράφημα και η έκπλυση του μίγματος για τον σχηματισμό των ζωνών καλείται σχηματισμός ή ανάπτυξη του χρωματογραφήματος. Ο διαχωρισμός μιγμάτων με χρωματογραφικές στήλες καλείται χρωματογραφική ανάλυση ή απλούστερα χρωματογραφία.

B.1.3. Τροποποιήσεις στην χρωματογραφία.

Από την εποχή των πειραμάτων του Tsweet η χρωματογραφία έχει χρησιμοποιηθεί από την πολύ μικρή μέχρι και την βιομηχανική κλίμακα. Έχει δεχθεί ποικίλες γεωμετρικές και λειτουργικές τροποποιήσεις όπως : με μονόδρομη ή γραμμική ροή του διαλύτη σε στήλες, λωρίδες ή φύλλα προσροφητή, με αμφίδρομη ροή ή με διαδοχή διαλυτών πάνω σε φύλλα προσροφητή.

Οι μεγάλη ποικιλία των προσροφητών (ή στερεής φάσης όπως καλούνται) συνεπάγεται και μεγάλη ποικιλία διαλυτών που κυμαίνονται από μη πολικούς υδρογονάνθρακες μέχρι οξέα και βάσεις και υδατικά διαλύματα διαφόρων τύπων.

B.1.4. Η σπουδαιότητα της χρωματογραφίας ως μεθόδου ανάλυσης βιομορίων

Η σημασία της χρωματογραφίας κείται πρωτίστως στην χρήση της σαν αναλυτικό μέσο για τον διαχωρισμό μιγμάτων και την απομόνωση και μερική περιγραφή των ιδιοτήτων τους. Μελέτες πάνω στην θεωρία της χρωματογραφίας έχουν δώσει πληροφορίες γύρω από τους μηχανισμούς διαχωρισμού.

B.2. Θεωρία της χρωματογραφίας

B.2.1. Εισαγωγή

Καθώς η χρωματογραφία εξελίσσεται διαρκώς από τέχνη σε μια ακριβή επιστημονική διαδικασία, η θεωρία βαθμιαία μας επιτρέπει να χειριζόμαστε τις διάφορες φυσικές, χημικές και οργανολογικές ιδιότητες οι οποίες μπορούν να εκφραστούν σε αριθμούς και να επηρεάσουν το τρόπο διεξαγωγής κάποιων διαχωρισμών ή ακόμα και να βελτιώσουν παλαιότερους διαχωρισμούς και να ελαττώσουν τους χρόνους ανάλυσης.

Υπάρχει μια κατανοητή απροθυμία από μερικούς μη εκπαιδευμένους στις φυσικές επιστήμες, στο να χρησιμοποιούν την θεωρία της χρωματογραφίας. Η μεγάλη σημασία της δεν σημαίνει τίποτα σε κάποιους, ειδικά αν πρόκειται να έρθουν αντιμέτωποι με διαφορικές εξισώσεις. Είναι έτσι προτιμότερο να αντικαταστήσει κανείς τα μαθηματικά με πιο απλά επιχειρήματα. Αυτή η προσέγγιση όμως δεν δίνει λύση σε όλες της δυσκολίες της θεωρητικής ερμηνείας, αλλά θα μας δείξει πως οι φυσικές διεργασίες επηρεάζουν τον διαχωρισμό. Επίσης τα παρακάτω θα μας οδηγήσουν σε μια ποιοτική περιγραφή των φαινομένων της διασποράς των ζωνών και της πολυσυζητημένης μη-ισορροπίας.

B.2.2. Διασπορά ζώνης και η αρχή της μη ισορροπίας

Η αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού στην χρωματογραφία εξαρτάται πρωτίστως από το εύρος της αποδέσμευσης των κέντρων των ζωνών και κατά δεύτερον από το πόσο συμπαγείς είναι οι ζώνες. Συχνά, απόπειρες διαχωρισμού είναι αναποτελεσματικές διότι οι ζώνες αντί να παραμείνουν συμπαγείς και διακριτές έχουν επικαλυφθεί. Οι φυσικές διεργασίες που ρυθμίζουν την διασπορά των ζωνών είναι πολύ σημαντικές διότι ο έλεγχος του μπορεί να μειώσει την διασπορά και να βελτιώσει την διαδικασία του διαχωρισμού.

Τρία φαινόμενα συνεισφέρουν στην διασπορά των ζωνών:

α) Κανονική διάχυση (ordinary diffusion) Η κίνηση των μορίων από περιοχές υψηλής προς περιοχές χαμηλής συγκέντρωσης μέσα στην χρωματογραφική στήλη η κατ'άξονα οδηγεί σε απευθείας διάχυση των ζωνών.

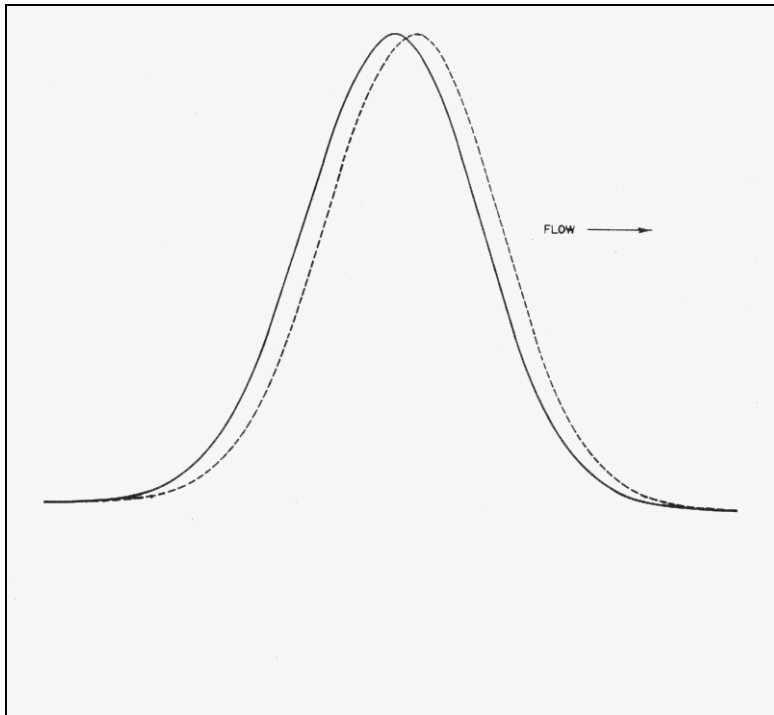
β) Τυρβώδης διάχυση (Eddy diffusion) Σε ένα πορώδες υλικό τέτοιο οι προσροφητές τμήματα της ροής ακολουθούν μια στροβιλιστή διαδρομή σε σχέση με άλλα. Μια ζώνη θα διαχυθεί εξαιτίας κάποιων μορίων που ακολουθούν μακρύτερα μονοπάτια και καθυστερούν σε σχέση με τα υπόλοιπα και εξαιτίας κάποιων άλλων που ακολουθούν κοντύτερα μονοπάτια και προπορεύονται σε σχέση με τον μεγαλύτερο αριθμό των μορίων.

γ) Τοπική μη-ισορροπία (Local nonequilibrium). Αυτό είναι το πιο σημαντικό φαινόμενο αλλά την ίδια στιγμή το πιο δύσκολο να εκτιμηθεί η συνεισφορά του. Μπορεί να εξηγηθεί καλύτερα ως εξής. Μια μονή ζώνη μορίων, παρουσιάζει αρκετή διαφοροποίηση της συγκέντρωσης της καθώς μετακινούμαστε από το ακολουθόν άκρο μέσα από το κέντρο και προς το οδηγόν άκρο. Στην τυπική περίπτωση το προφίλ της συγκέντρωσης θα φαίνεται σαν κωδωνοειδής Γκαουσιανή καμπύλη. Οι διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα σε μια μικροσκοπική περιοχή του χρωματογραφήματος συσχετίζονται με τις βαθμιδώσεις των συγκεντρώσεων στην περιοχή. Θεωρούμε σαν παράδειγμα μια μικρή περιοχή εντοπισμένη κοντα στο κέντρο της ζώνης και προς το οδηγόν άκρο. Η κινητή φάση (είτε υγρή είτε αέρια) εισβάλλει στην περιοχή και φέρνει μαζί της μόρια σε υψηλότερη συγκέντρωση από ότι υπάρχει ήδη εκεί. Η στατική φάση απορροφά όλη ή σχεδόν όλη την περίσσεια, έτσι ώστε η συγκέντρωση της στατικής φάσης να βρίσκεται σε ισορροπία με την συγκέντρωση της κινητής φάσης. Αν σε αυτή την στιγμή η ροή σταματούσε η εξισορρόπηση θα ήταν πλήρης. Ομως η ροή δεν σταματά και συνεχίζει να φέρνει μόρια σε υψηλότερη συγκέντρωση από αυτή της ισορροπίας μέχρι να μπει στην περιοχή το ακολουθόν άκρο της ζώνης. Έτσι μια ισορροπία αποκαθίσταται γρήγορα μεταξύ της ροής η οποία διαρκώς αναστατώνει την ισορροπία και την κινητική διαδικασία μεταφορά μάζας που την διατηρεί.

Δύο συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν αμέσως από τα παραπάνω:

- Μεγαλύτερη ταχύτητα ροής θα ενισχύει την ανισορροπία και

- Πιο γρήγορη ανταλλαγή μορίων μεταξύ της κινητής και στατικής φάσεως θα ενισχύσει την διατήρηση της ισορροπίας



Εικ.1 Κατανομές συγκεντρώσεων στην κινητή φάση. Κάθετος: συγκέντρωση. Οριζόντιος: απόσταση από την αρχή. Η πλήρης γραμμή απεικονίζει τη συγκέντρωση ισορροπίας στην κινητή φάση. Η διακεκομμένη γραμμή απεικονίζει τη πραγματική συγκέντρωση στην κινητή φάση.

Αυτά τα δύο γεγονότα είναι η βάση για την βελτίωση της διαχωριστικότητας.

Παρόλα αυτά μέχρις αυτού του σημείου δεν έχει γίνει καμία απόπειρα σύνδεσης του φαινομένου της τοπικής μη ισορροπίας με την διασπορά των ζωνών. Η σύνδεση αυτή μπορεί να γίνει με τον ακόλουθο συλλογισμό.

Μια ποσότητα μορίων, μπορεί σε κάθε στιγμή να βρεθεί στην κινητή και στην στατική φάση. Η ταχύτητα με την οποία κινείται η ζώνη είναι η μέση ταχύτητα όλων των μορίων. Εάν ένα κλάσμα R μορίων στην κινητή φάση κινείται με την ταχύτητα ροής v και ένα κλάσμα $1-R$ που βρίσκεται στην στατική φάση κινείται με σχεδόν μηδενική ταχύτητα τότε η μέση ταχύτητα είναι Rv . Το κλάσμα R αντιπροσωπεύει την κατανομή των μορίων μεταξύ της κινητής και στατικής φάσης στην ισορροπία. Σύμφωνα με τα παραπάνω στο οδηγόν άκρο της ζώνης η συγκέντρωση θα είναι $R' > R$ και η ταχύτητα θα υπερβαίνει το Rv . Το αντίθετο συμβαίνει στο ακολουθόν άκρο της ζώνης. Τελικά το αποτέλεσμα θα είναι μια βαθμιαία απομάκρυνση των δύο άκρων της ζώνης και επομένως διάχυση.

B.2.3. Η χρωματογραφία σαν τυχαίος περίπατος (Random walk)

Οι τυχαίες διαδικασίες που είναι υπεύθυνες για την διασπορά των ζωνών όπως αναφέρθηκε παραπάνω είναι: κανονική διάχυση, τυρβώδης διάχυση και τοπική μη ισορροπία.

Η κανονική διάχυση συμβαίνει στο μοριακό επίπεδο όταν μόρια μετακινούνται εμπρός και πίσω μεταξύ τυχαίων συγκρούσεων.

Η τυρβώδης διάχυση είναι αποτέλεσμα της ροής μέσα από τυχαίως διεσπαρμένα σωματίδια ή ινίδια του προσροφητικού μέσου.

Η τοπική μη ισορροπία καθορίζεται από την κινητική διαδικασία μεταφοράς μορίων μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Όλες αυτές οι διαδικασίες είναι τυχαίες αν ιδωθούν στο μοριακό επίπεδο. Μια μέθοδος να υπολογίζει κανείς την διασπορά ζώνης βασίζεται στο μοντέλο του τυχαίου περιπάτου. Ένα καλό παράδειγμα αυτού του μοντέλου είναι η περίπτωση του μεθυσμένου που δεν ξέρει τον δρόμο του. Μετά από κάθε βήμα προς μία κατεύθυνση, σταματά και σκέφτεται και στην συνέχεια κάνει ένα βήμα προς μια τελείως διαφορετική κατεύθυνση ανεξάρτητη της προηγούμενης. Κάθε βήμα είναι του ίδιου μήκους με τα προηγούμενα ενώ η κατεύθυνση είναι τελείως ανεξάρτητη. Αν πολλά άτομα ξεκινήσουν ταυτόχρονα από το ίδιο σημείο κάποια από αυτά θα καταλήξουν στην μία πλευρά του σημείου εκκίνησης και κάποια άλλα στην άλλη. Αν παραστήσουμε γραφικά τον αριθμό των ατόμων στις διάφορες αποστάσεις ως συνάρτηση της απόστασης, η προκύπτουσα πυκνότητα θα ήταν η κωδωνοειδής Γκαουσιανή κατανομή. Το μέτρο της διασποράς θα ήταν το σ η γνωστή τυπική απόκλιση η οποία είναι ανάλογη με το πλάτος της καμπύλης. Η τιμή του είναι :

$\lambda\sqrt{n}$ (1) όπου λ είναι το μήκος του βήματος και n ο αριθμός των βημάτων που έγιναν. Αυτή η εξίσωση υποδηλώνει ότι η διασπορά παρόλο που είναι ευθέως ανάλογη του μήκους του βήματος δεν αυξάνει ανάλογα με τον αριθμό των βημάτων. Τέσσερις φορές περισσότερα βήματα θα οδηγήσουν σε μια μέση μετατόπιση μόνο δύο φορές μεγαλύτερη. Εάν αρκετές τυχαίες διαδικασίες δρουν ταυτόχρονα για να προκαλέσουν διασπορά όπως στην πραγματικότητα, τότε το καθαρό αποτέλεσμα είναι :

$\sigma^2 = \sum \sigma_i^2$ (2) όπου σ_i είναι η τυπική απόκλιση από μόνο μία διαδικασία. Στην χρωματογραφία τρεις μόνο σ υπάρχουν.

Για την κανονική διάχυση έχουμε ότι $\sigma_D^2 = 2Dt$ (3) όπου το D είναι ο συντελεστής διάχυσης και το t ο χρόνος στην κινητή φάση από την αρχή της διαδικασίας. Ο χρόνος

$t = \frac{L}{v}$ (4) όπου L είναι η απόσταση που διένυσε η ζώνη και v η ταχύτητα ροής.

Η τυρβώδης διάχυση, όπως επισημάνθηκε παραπάνω, είναι ένα φαινόμενο διασποράς, εξαιτίας άνισων ταχυτήτων και διαδρομών που προκύπτουν τυχαία σε ένα πακεταρισμένο ή ινώδες υλικό. Ένα μόριο που μεταφέρεται από τον διαλύτη την μία στιγμή θα κινείται σε ένα γρήγορο μονοπάτι και την επόμενη

σε ένα αργό. Ενώ βρίσκεται σε ένα γρήγορο μονοπάτι κινείται μπροστά σε σχέση με το κέντρο της ζώνης και μπορεί να θεωρηθεί ότι κάνει ένα βήμα εμπρός. Στο αργό κανάλι χάνει έδαφος μια διαδικασία ισοδύναμη με το να κάνει ένα βήμα πίσω. Πόσο μεγάλα είναι τα βήματα αυτής της διαδικασίας όμως. Ένα κανάλι μεταξύ δύο σωματιδίων ή ινών θα έχει το μήκος μιας διαμέτρου d και μετά ο διαλύτης θα κινηθεί σε ένα νέο κανάλι με ταχύτητα και κατεύθυνση ανεξάρτητη από την προηγούμενη. Εξαρτάται από το αν είναι ένα αργό ή γρήγορο κανάλι, αν το βήμα θα είναι της τάξεως $+d$ ή $-d$ σε σχέση με το κέντρο της ζώνης. Έτσι το μήκος του βήματος είναι d . Ο αριθμός των βημάτων n είναι ο αριθμός των ξεχωριστών καναλιών μήκους d στην απόσταση μετατόπισης της ζώνης L έτσι ώστε $n = \frac{L}{d}$ (5). Αντικαθιστώντας το d για το l και $n = \frac{L}{d}$ για n τότε έχουμε $\sigma_E = \sqrt{Ld}$ (6).

Εκφρασμένο σε λόγια, η διασπορά της ζώνης αυξάνει με την τετραγωνική ρίζα της απόστασης μετατόπισης και την τετραγωνική ρίζα του μεγέθους των σφαιριδίων ή ινιδίων όσον αφορά την τυρβώδη διάχυση μόνο.

Μια παρόμοια προσέγγιση μπορεί να γίνει και στην διαδικασία μεταφοράς μορίων η οποία είναι υπεύθυνη για το φαινόμενο της τοπικής μη ισορροπίας. Ο ρυθμός της αποκατάστασης της ισορροπίας μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης μπορεί να ελεγχθεί είτε μέσω διάχυσης από την μία φάση στην άλλη, είτε μέσω προσρόφησης και αποβολής. Σε κάθε περίπτωση k_1 είναι η σταθερά για την προσρόφηση (ο μέσος αριθμός προσροφήσεων που λαμβάνουν χώρα για κάθε μονάδα του χρόνου στην οποία μένουν τα μόρια στην κινητή φάση). Το αντίστροφο αυτού $1/k_1$, είναι ο μέσος χρόνος ζωής ή ο μέσος χρόνος που απαιτείται για να συμβεί ένα μόνο φαινόμενο προσρόφησης. Η σταθερά για αποπροσρόφηση είναι k_2 και το αντίστροφο $1/k_2$ είναι ο μέσος χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθεί ένα συμβάν αποπροσρόφησης.

Το φαινόμενο προσρόφησης-αποπροσρόφησης είναι παρόμοιο με τον τυχαίο περίπατο. Ένα μόριο στην κινητή φάση που κινείται με την ροή του διαλύτη με μία ταχύτητα v , κινείται ταχύτερα από το κέντρο της ζώνης η οποία έχει μία ταχύτητα R_v ($R < 1$). Όταν το μόριο συνδέεται στην στατική φάση η ταχύτητα του μηδενίζεται και αυτό είναι ακίνητο σε σχέση με το κέντρο της ζώνης. Έτσι ένα μόριο θα κινείται εμπρός και πίσω σε σχέση με το κέντρο της ζώνης αφού κάθε βήμα θα είναι μια αντίδραση μεταφοράς φάσης που βασίζεται σε μια τυχαία σύγκρουση (μεταξύ μορίων ή μεταξύ μορίων και ομάδων του προσροφητικού μέσου) ή σε μια διακύμανση της ενέργειας για την επιτυχία της. Μπορούμε έτσι να θεωρήσουμε ότι κατά την διάρκεια της ζωής του ένα μόριο υποβάλλεται σε μια τυχαία επιλεκτική διαδικασία μεταξύ αλλαγής φάσης και μη αλλαγής, μια διαδικασία που οδηγεί σε ένα βήμα εμπρός ή πίσω.

Ο αριθμός των βημάτων n είναι ο συνολικός αριθμός αλλαγών φάσης. Αφού για να συμβεί μία αποπροσρόφηση πρέπει πρώτα να γίνει προσρόφηση τότε ο n είναι διπλάσιος από τον συνολικό αριθμό των αποπροσροφήσεων. Ο χρόνος που απαιτείται από μία ζώνη να ταξιδέψει μια απόσταση L με ταχύτητα R_v είναι L/R_v . Σε αυτό τον συνολικό χρόνο ένα μόριο κατα μέσο όρο θα ξοδέψει ένα κλάσμα R στην κινητή φάση και ένα κλάσμα $(1-R)$ στην στατική φάση. Άρα ο μέσος χρόνος που το μόριο μένει στην στατική φάση είναι $(1-R)L/R_v$ (7). Ο αριθμός των αποπροσροφήσεων ισούται με αυτόν τον χρόνο διαιρεμένο με τον χρόνο που απαιτείται για μία αποπροσρόφηση $1/k_2$. Έτσι ο αριθμός των αποπροσροφήσεων είναι $k_2(1-R)L/R_v$ (8) και ο αριθμός των βημάτων είναι $n=2k_2(1-R)L/R_v$ (9). Το μήκος του βήματος λ , είναι η απόσταση στην οποία το μόριο κινείται προς τα πίσω κατά την διάρκεια του φαινομένου διαρκείας $1/k_2$. Αφού το μόριο το ίδιο δεν κινείται ενώ το κέντρο της ζώνης κινείται στον ίδιο χρόνο κατα $R_v(1/k_2)=R_v/k_2$, το μήκος του βήματος είναι απλά R_v/k_2 . Μέσο ενός ίδιου σκεπτικού το μόριο αποδεικνύεται ότι κινείται κατά την ίδια απόλυτη τιμή προς τα εμπρός όταν αυτό βρίσκεται στην κινητή φάση.

Αντικαθιστώντας $\lambda=R_v/k_2$ και $n=2k_2(1-R)L/R_v$ έχουμε την διασπορά λόγω της τυπικής μη-ισορροπίας

$$\sigma_c = \sqrt{\frac{2R(1-R)vL}{k_2}} \quad (10).$$

Αυτή η εξίσωση επιβεβαιώνει μια προηγούμενη δήλωση ότι η μη-ισορροπία και η διασπορά ζώνης αυξάνει με την αύξηση της ταχύτητας ροής και ελατώνεται με πιο γρήγορη ανταλλαγή μορίων μεταξύ των δύο φάσεων πράγμα το οποίο αντανακλά σε μια αύξηση της σταθεράς k_2 . Παρόλο που το παραπάνω συμπέρασμα δεν είναι αυστηρό εντούτοις το αποτέλεσμα είναι ακριβές αντί για προσεγγιστικό όταν αντίδραση και όχι διάχυση ελέγχει την μεταφορά μορίων μεταξύ των δύο φάσεων.

Η συνολική διασπορά της ζώνης εξαιτίας και των τριών επιδράσεων που αναφέρθηκαν παραπάνω μπορεί να υπολογιστεί αντικαθιστώντας τις εξισώσεις στην αθροιστική εξίσωση. Κατ'αρχήν είναι

$$\text{οφέλιμο να γράψουμε τον χρόνο } t \text{ ως } L/v. \text{ Έτσι παίρνουμε αρχικά } \sigma^2 = L \left(\frac{2D}{v} + d + \frac{2R(1-R)v}{k_2} \right) \quad (11)$$

Το πιο κοινό μέτρο της διασποράς ζώνης είναι μια μονάδα ύψους ίση με την θεωρητική πλάκα, H , η οποία εισήχθη στην χρωματογραφία από τον Martin και Synge. Αυτή η ποσότητα ισούται με σ^2/L και

$$\text{έτσι } H = \left(\frac{2D}{v} + d + \frac{2R(1-R)v}{k_2} \right) \quad (12). \text{ Εάν οι ζώνες των μορίων φεύγουν από το τέλος της στήλης}$$

όπως στην αέρια χρωματογραφία τότε ένα διάγραμμα της συγκέντρωσης συναρτήση του χρόνου (παρά της απόστασης) θα ήταν σχεδόν Γκαουσιανό. Η τυπική απόκλιση στο χρόνο, τ , είναι απλώς ο χρόνος που απαιτείται για να κινηθεί μια ζώνη σε απόσταση σ . Έτσι $\tau = \sigma/R_v$. Εάν η εξίσωση για το σ^2

αντικατασταθεί σε αυτή τότε η τιμή του τ πιστοποιείται εύκολα. Η αρχική μας πρόθεση να ελατώσουμε την διασπορά των ζωνών μπορεί να πραγματοποιηθεί μειώνοντας το ύψος της χρωματογραφικής πλάκας.

Ενας από τους παράγοντες με τους οποίους μπορούμε να ασχοληθούμε είναι η ταχύτητα ροής. Πώς η σωστή ταχύτητα ροής μπορεί να επιλεγεί για να μειώσει το ύψος της πλάκας. Η συνεισφορά της μη ισορροπίας στο H , αυξάνει με την ταχύτητα αλλά ο όρος της μοριακής διάχυσης μειώνεται με την αύξηση της ταχύτητας. Έτσι μια συμβιβαστική ταχύτητα πρέπει να βρεθεί ώστε κανένας από τους δύο όρους να μην είναι πολύ μεγάλος. Η καλύτερη ταχύτητα η οποία υπολογίζεται μαθηματικά έτσι ώστε

$$dH/dv=0 \text{ είναι } v = \sqrt{k_2 \frac{D}{R(1 - R)}} \quad (13) .$$

Η διάμετρος των σφαιριδίων ή των ινιδίων εμφανίζεται στο δεύτερο μέρος της εξίσωσης σαν d . Είναι φανερό ότι μικρότερο d δίνει μικρότερο ύψος πλάκας. Παρόλα αυτά αν τα σωματίδια είναι πολύ μικρά τότε γίνεται αναστολή της διείσδυσης του διαλύτη στο χρωματογράφημα. Επιπλέον πολύ μικρά σωματίδια τείνουν να συσσωματώνονται αφήνοντας κενούς χώρους κάνοντας έτσι το μέσο μήκος καναλιού μεγαλύτερο από d . Έτσι, ενώ η θεωρία δέν προτείνει ένα συγκεκριμένο μέγεθος σωματιδίων εντούτοις δείχνει ότι γενικά η βελτίωση έρχεται με μικρότερα σωματίδια.

B.2.5. Διαχωριστικότητα (Seperability)

Ασχετα με το αν ο σκοπός της χρωματογραφίας είναι αναλυτικός ή ποσοτικός, ή η πραγματική απομόνωση κάποιου μορίου, οι ζώνες πρέπει να είναι καλά διαχωρισμένες και χωρίς επικαλύψεις. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα ο διαχωρισμός εξαρτάται από δύο παράγοντες: την αποσύνδεση των κέντρων των ζωνών και το πόσο συμπαγείς είναι οι ζώνες αυτές.

Το πρόβλημα του διαχωρισμού προσεγγίζεται καλύτερα σχηματίζοντας μια έκφραση η οποία θα μετρά το βαθμό του διαχωρισμού όπως το μήκος της πλάκας μετρά τον βαθμό της διασποράς των ζωνών. Η διακριτικότητα είναι ένα τέτοιο μέγεθος που μετράται στην αέρια χρωματογραφία. Ορίζεται σαν $(t_{II} - t_I) / 2(\tau_{II} + \tau_I)$ (14) όπου t_{II} και t_I οι χρόνοι έκλουσης των συστατικών II και I αντίστοιχα και τ_{II} και τ_I είναι οι τυπικές αποκλίσεις στον χρόνο όπως συζητήθηκε παραπάνω. Η τιμή της παράστασης αυξάνει με την αποσύνδεση των συστατικών από την στήλη που εκφράζεται από τον παράγοντα $(t_{II} - t_I)$ και από την συνοχή των ζωνών που εκφράζεται από τον παράγοντα $1/(\tau_{II} + \tau_I)$ και αποτελεί έτσι μια άμεση μέτρηση της διαχωριστικότητας. Η τιμή της παράστασης πρέπει να είναι ≥ 1 για τον ικανοποιητικό διαχωρισμό οποιουδήποτε δοθέντος ζεύγους μορίων. Ενας εναλλακτικός τρόπος μέτρησης της διαχωριστικότητας είναι η τιμή του διαχωρισμού μιας συγγενούς μονάδας $F = (t_{II} - t_I)^2 / 8(\tau_{II}^2 + \tau_I^2)$ (15) όπου και αυτή πρέπει να είναι ≥ 1 για ένα καλό διαχωρισμό. Αυτή η εξίσωση είναι πλεονεκτικότερη από την εξίσωση (14) παραπάνω διότι η τιμή του F είναι ανάλογη με το μήκος της στήλης L . Η χρήση του F και άλλων

τέτοιων μαθηματικών εκφράσεων έχει πολύ μέλλον πάνω στην βελτίωση των μεθόδων διαχωρισμού χρησιμοποιώντας τις καλύτερες φυσικές, χημικές και οργανολογικές μεταβλητές για την βελτιστοποίηση των διαχωρισμών. Αυτές οι μεταβλητές είναι τόσες πολλές που είναι πρακτικά αδύνατον να τις βελτιστοποιήσει κάποιος όλες μέσω της πειραματικής διαδικασίας. Ο θεωρητικός στόχος του εντοπισμού πολλών άριστων συνθηκών είναι σχετικά νέος και θα συζητηθεί σύντομα παρακάτω.

Ας υποθέσουμε ότι ζητούμε την άριστη θερμοκρασία T για τον καλύτερο διαχωρισμό δύο ζωνών. Πρωτίστως θα ήταν αναγκαίο να εκφραστεί το μέγεθος F σαν συνάρτηση της θερμοκρασίας T , το οποίο σημαίνει ότι οι τιμές των t και t^2 για κάθε συστατικό θα πρέπει να εκφραστούν σαν συνάρτηση της θερμοκρασίας. Ο χρόνος παρακράτησης από την στήλη t , ισούται με L/R_v . Ενώ το L και το v δεν εξαρτώνται από τον χρόνο το R είναι μια ιδιότητα της ισορροπίας (συγκέντρωση στην κινητή φάση/συνολική συγκέντρωση), και μπορεί να εκφραστεί σαν συνάρτηση του T από γνωστές σχέσεις ισορροπίας. Η τιμή του t^2 όπως δείχθηκε παραπάνω να ισούται με σ^2/R^2v^2 . Τρεις όροι που αντιστοιχούν σε τρεις διαφορετικές αιτίες διασποράς συνεισφέρουν στο σ^2 . Ο όρος της κανονικής διάχυσης περιέχει έναν θερμοεξαρτώμενο παράγοντα, τον D . Η εξάρτηση του D από την θερμοκρασία είναι γνωστή, είτε η κινητή φάση είναι υγρή ή αέρια. Ενώ η τυρβώδης διάχυση είναι ανεξάρτητη από την θερμοκρασία T , ο όρος της τοπικής μη ισορροπίας εξαρτάται τόσο από την θερμοκρασία μέσω του R όσο και από το k_2 . Αφού το k_2 είναι ισοδύναμο με την σταθερά ταχύτητας στις χημικές αντιδράσεις, η εξάρτηση του από την θερμοκρασία μπορεί να υπολογιστεί από την θεωρία της ταχύτητας των χημικών αντιδράσεων ή από την εξίσωση του Arrhenius. Έτσι όρος με όρο, η εξάρτηση του F από την θερμοκρασία T μπορεί να βρεθεί. Ένα διάγραμμα του F σε σχέση με την θερμοκρασία T θα δείξει την θερμοκρασία που αντιστοιχεί στο μέγιστο F και έτσι μπορεί να επιτευχθεί ο καλύτερος διαχωρισμός. Είναι κάπως απλούστερο μαθηματικά να θέσει κανείς την παράγωγο του F ως προς την θερμοκρασία T , dF/dT , ίση με μηδέν και να βρεί το άριστο T .

Ενώ ο ρόλος της θερμοκρασίας είναι κάπως πολύπλοκος, μερικές μεταβλητές όπως το μήκος της στήλης, L , είναι αρκετά απλές στο να συνδεθούν με το F . Ο χρόνος παρακράτησης t , για παράδειγμα ισούται με L/R_v και είναι ανάλογο του L . Αφού $t = \sigma/R_v$ και το σ είναι ανάλογο του \sqrt{L} τότε το (t) είναι επίσης ανάλογο του \sqrt{L} . Άρα και το F είναι ανάλογο του L . Ένα διάγραμμα του F σε συνάρτηση του L θα έδειχνε ότι το F αυξάνει με την αύξηση του μήκους. Έτσι όσο μακρύτερη η στήλη τόσο καλύτερος ο διαχωρισμός. Αυτό το συμπέρασμα ισχύει εφόσον η ροή μπορεί να διατηρηθεί σταθερή κατά μήκος μιας μακρύτερης στήλης υλικού.

Άλλες μεταβλητές που μπορούν να μελετηθούν με τον ίδιο τρόπο είναι : το μέγεθος των σωματιδίων ή των ινιδίων του προσροφητή, η ταχύτητα ροής, η πίεση και τέλος οι ιδιότητες της κινητής φάσης (διαλύτη) όπως η πολικότητα και το ιξώδες.

B.3. Ηλεκτροφόρηση και ηλεκτροχρωματογραφία

B.3.1. Εισαγωγή

Η ηλεκτροφόρηση σε σταθεροποιημένα υποστρώματα, γνωστή και ως ηλεκτροχρωματογραφία, ιονογραφία, ηλεκτροφόρηση ζώνης κ.λ.π. , έχει αναθεωρηθεί σε πολλά βιβλία και άρθρα. Χρησιμεύει πολύ στην μελέτη της ηλεκτρομετανάστευσης (electromigration) ιόντων και κolloειδών υλικών και έχει σημειώσει μεγάλη επιτυχία σαν μέθοδος ανάλυσης, διαχωρισμού και απομόνωσης μικροποσοτήτων μεγαλομοριακών ουσιών όπως οι πρωτεΐνες και λιποπρωτεΐνες που είναι δύσκολο να διαχωριστούν μόνο με χρωματογραφικές μεθόδους.

B.3.2. Αρχές της ηλεκτροφόρησης

Υπάρχουν δύο τρόποι με τους οποίους μπορούν να καθοριστούν οι ποσοτικές σχέσεις μεταξύ της φαινόμενης ηλεκτρομετανάστευσης σε σταθεροποιημένα υποστρώματα και των ηλεκτροκινητικών ιδιοτήτων της ουσίας που μεταναστεύει. Ο ένας περιλαμβάνει μια ανεξάρτητη θεώρηση της συνεισφοράς του ρόλου πολλών παραγόντων που συμμετέχουν παρουσία ενός σταθερού υποστρώματος, όπως το φαινόμενο φράγματος, παρεμπόδιση κ.λ.π. με στόχο την ολοκλήρωση όλων αυτών σε μία ενοποιημένη εικόνα.

Η δεύτερη προσέγγιση περιλαμβάνει την ανάπτυξη όχι μιας ανεξάρτητης ομάδας εξισώσεων αλλά λειτουργικών μεθόδων μετασχηματισμού του δεδομένων της ηλεκτρομετανάστευσης από σταθεροποιημένα ή μή υποστρώματα. Αυτή η διαδικασία επιτρέπει την χρήση μιας πληθώρας δεδομένων γύρω από το θέμα για την κατανόηση των φαινομένων και των κανόνων που διέπουν την μέθοδο.

B.3.3. Ηλεκτροκινητικό δυναμικό

Υπάρχουν ενδείξεις που υποστηρίζουν την πεποίθηση ότι ένα φορτισμένο σωματίδιο σε διάλυμα συλλέγει γύρω του μία ατμόσφαιρα ή νέφος με κυριαρχία φορτίων αντίθετα από αυτά της επιφάνειας του σωματιδίου. Σαν παράδειγμα στην περίπτωση ενός αρνητικά φορτισμένου σωματιδίου, η περιοχή εγγύτερα στο σωματίδιο καταλαμβάνεται εντελώς από θετικά φορτισμένα σωματίδια. Σε μεγαλύτερη απόσταση από το σωματίδιο η περίσσεια των θετικών φορτίων μειώνεται με την απόσταση, μέχρι τα θετικά και τα αρνητικά φορτία να είναι ομογενώς κατανεμημένα στο διάλυμα. Η τοπική ιονική ατμόσφαιρα είναι στην πραγματικότητα ένα νέφος που περιέχει τόσα θετικά φορτία όσο ο καθарός αριθμός αρνητικών φορτίων στην επιφάνεια του σωματιδίου και είναι αρκετά πυκνή κοντά στην

επιφάνεια του σωματιδίου ενώ γίνεται όλο και πιο αραιή με την απόσταση. Τα ιόντα παρόλα αυτά είναι ελεύθερα να κινηθούν και το ιονικό νέφος πρέπει να θεωρηθεί σε στατιστική βάση, και οποιαδήποτε εικόνα έχουμε για αυτό πρέπει να θεωρηθεί οπωσδήποτε ένα στιγμιότυπο ενός χρονικού μέσου όρου.

Μερικά ακόμα χαρακτηριστικά του φορτισμένου σωματιδίου και του ιονικού νέφους πρέπει να σημειωθούν. Στην επιφάνεια του σωματιδίου κάποια υλικά προσροφούνται τόσο δυνατά ώστε κινείται σαν ένα κομμάτι του σωματιδίου. Μια τέτοια περίπτωση είναι το κέλυφος των μορίων του νερού στην υδρόφιλη περιοχή της επιφάνειας. Αυτή η στιβάδα δεν ξεπερνά σε πάχος το ένα μόριο. Η εξωτερική επιφάνεια της στιβάδας είναι το σημείο στο οποίο λαμβάνει χώρα μεταξύ των δύο φάσεων και καλείται επιφάνεια διατομής. Η διαφορά δυναμικού μεταξύ της επιφάνειας διατομής και ενός σημείου στο διάλυμα που τα αρνητικά και τα θετικά φορτία είναι ισοκατανεμημένα είναι υπεύθυνη για την ηλεκτροκινητική συμπεριφορά του σωματιδίου.

Μέσα στο διάλυμα το ηλεκτροστατικό δυναμικό σε οποιοδήποτε σημείο είναι μηδέν αφού θετικά και αρνητικά φορτία είναι ομογενώς κατανεμημένα γύρω από αυτό το σημείο. Κοντά στην επιφάνεια του φορτισμένου σωματιδίου το δυναμικό μπορεί να αποδοθεί στο φορτίο της επιφάνειας και του περιβάλλοντος ιονικού νέφους. Στην επιφάνεια διατομής το προκύπτον δυναμικό ονομάζεται ηλεκτροκινητικό δυναμικό και συμβολίζεται με (ζ). Αντιπροσωπεύει το άθροισμα του δυναμικού V_s από την φορτισμένη επιφάνεια και του δυναμικού V_i από τα περιβάλλοντα ιονικά φορτία. Τα δυναμικά V_s και V_i μπορούν να εκτιμηθούν θεωρώντας το δυναμικό σε διάφορα σημεία της γεινίας του φορτισμένου σωματιδίου. Το δυναμικό ορίζεται σαν το έργο που απαιτείται για να έρθει ένα μοναδιαίο φορτίο από το άπειρο σε μία απόσταση r , από ένα ομώνυμο φορτίο Q . Εισάγοντας την έννοια της διηλεκτρικής σταθεράς, D , το δυναμικό σε μια απόσταση r από ένα φορτίο Q είναι Q/Dr . Το δυναμικό στην επιφάνεια σφαίρας ακτίνας r και συνολικού φορτίου $-Q$ είναι τότε $V_s = -Q/Dr$ (16).

Το δυναμικό V_i που οφείλεται στα περιβάλλοντα ιόντα, είναι πιο δύσκολο να εκτιμηθεί εξαιτίας της διάχυτης φύσης της ιονικής ατμόσφαιρας. Η κλασική αντιμετώπιση του θέματος είναι να θεωρήσει κανείς ότι όλο το υπερέχον θετικό φορτίο είναι συγκεντρωμένο σε ένα λεπτό κέλυφος εντοπισμένο σε τέτοια απόσταση, d , ώστε να έχει το ίδιο αποτέλεσμα με την ιονική ατμόσφαιρα. Κάτω από αυτές τις συνθήκες το δυναμικό που συνεισφέρεται από το εξώτερο κέλυφος σε οποιοδήποτε σημείο εντός αυτού

είναι : $V_i = \frac{Q}{D(r+d)}$ (17). Αφού το ηλεκτροκινητικό δυναμικό είναι το άθροισμα των δυο δυναμικών

τότε μπορεί να γραφεί : $\zeta = -\frac{Q}{Dr} + \frac{Q}{D(r+d)}$ (18). Αναδιευθετώντας την εξίσωση και γενικεύοντας για

κάθε περίπτωση φορτίου έχουμε: $\zeta = \frac{Q}{Dr} \frac{d}{(r+d)}$ (19). Για σωματίδια τα οποία ποικίλουν στο μέγεθος

και επομένως στην επιφάνεια και στο καθαρό φορτίο, το ηλεκτροκινητικό δυναμικό διατυπώνεται συχνά σαν συνάρτηση της πυκνότητας φορτίου σ , στην επιφάνεια όπου $\sigma =$ συνολικό φορτίο/επιφάνεια $= Q/4\pi r^2$. Έτσι η παραπάνω εξίσωση γράφεται $\zeta = \frac{4\pi\sigma d}{D\epsilon} \frac{d}{(r+d)}$ (20). Το νόημα του όρου d χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Ο Helmholtz στην πρώτη του μαθηματική εργασία για το ηλεκτροκινητικό δυναμικό, υπέθεσε σαν πρώτη προσέγγιση, ότι τα ιόντα κοντά στην φορτισμένη επιφάνεια συγκεντρώνονται σε μια συγκεκριμένη και σταθερή απόσταση γύρω από την επιφάνεια. Στην παραπάνω προσέγγιση το d αναπαριστά αυτό που καλείται η διπλή στιβάδα του Helmholtz. Η ιδέα του ιονικού νέφους ή της διάχυτης διπλής στιβάδας είναι μια δεύτερη προσέγγιση. Τα βασικά επιχειρήματα μπορούν να ενσωματωθούν στην ιονική θεωρία των Debye και Huckel στην οποία ένας όρος κ με διαστάσεις $1/d$ εκφράζεται ως $\kappa = [8N^2\epsilon^2\mu/1000DRT]^{1/2}$ όπου N είναι ο αριθμός του Avogadro, ϵ είναι το στοιχειώδες ηλεκτρικό φορτίο, D είναι η διηλεκτρική σταθερά, T η απόλυτη θερμοκρασία, και μ είναι η ιονική ισχύς ($1/2\sum C_i Z_i^2$) και R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων. Οι διαστάσεις του κ είναι cm^{-1} και το αντίστροφο της τιμής του είναι το μέτρο του πάχους της ιονικής ατμόσφαιρας. Πρέπει να σημειωθεί ότι καθώς η ιονική ισχύς αυξάνει η παχύτητα της ιονικής ατμόσφαιρας μειώνεται και όταν το μ τείνει στο μηδέν η ενεργός ακτίνα της ιονικής ατμόσφαιρας τείνει στο άπειρο. Η παραπάνω εξίσωση μπορεί να γραφτεί και ως εξής: $\kappa = 1/d = \kappa(\mu)^{1/2}$. Στους 25°C το $\kappa = 0.33 \cdot 10^8$ και έτσι σε ένα διάλυμα ιονικής ισχύος 0.01 η ενεργός ακτίνα της ιονικής ατμόσφαιρας είναι $30 \cdot 10^{-8} \text{cm}$ που αντιστοιχεί σαν τάξη μεγέθους με ένα πρωτεϊνικό μόριο μοριακού βάρους 35000. Για μεγάλα σφαιρικά σωματίδια και για μεγάλη ιονική ισχύ ισχύει ότι $r \gg d$ και $r/(r+d) = 1$ άρα το ηλεκτροκινητικό δυναμικό δίνεται από την σχέση $\zeta = 4\pi\sigma d/D$ (21) ή $\zeta = (4\pi\sigma/D)(1/0.33 \cdot 10^8 (\mu)^{1/2})$ (22). Άρα το δυναμικό είναι ανάλογο με την πυκνότητα φορτίου στην επιφάνεια και αντιστρόφως ανάλογο με την ιονική ισχύ.

B.3.4. Ηλεκτροφορητική κινητικότητα

Ένα φορτισμένο σωματίδιο όπως ένα ιόν ή ένα πρωτεϊνικό μόριο, όταν είναι διαλυμένο σε ένα άγωγο υγρό μέσο και υποβάλλεται στην επίδραση ενός ομογενούς ηλεκτρικού πεδίου αποκτά ένα σταθερό ρυθμό μετανάστευσης ο οποίος καθορίζεται από το ιξώδες του μέσου και την ένταση του πεδίου.

Η ένταση του πεδίου X μπορεί να καθοριστεί σαν $X = E/l$ (23) όπου E είναι η διαφορά δυναμικού σε Volts μεταξύ των ηλεκτροδίων που απέχουν l μεταξύ τους. Το X είναι ισοδύναμο με την ηλεκτρική δύναμη ανά μοναδιαίο φορτίο. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα, u , ορίζεται σαν η ταχύτητα σε πεδίο μοναδιαίας έντασης, ή $u = v/X$ (24). Η αναχαιτιστική δύναμη εξαρτάται από το μέγεθος και το σχήμα του σωματιδίου και το ιξώδες του μέσου αλλά και την ταχύτητα μετανάστευσης v . Τώρα ο συντελεστής

ιξώδους n ορίζεται ως η δύναμη που απαιτείται για να μηδενίσει μια ταχύτητα v , μεταξύ δύο μοναδιαίων επιφανειών που απέχουν απόσταση d και είναι $F=nv/d$ (25).

Η ηλεκτρική δύναμη που προκαλεί την μετακίνηση εξαρτάται από την ισχύ του πεδίου και το ηλεκτροκινητικό δυναμικό.

B.4. Τύποι χρωματογραφικής ανάλυσης βιομορίων

B.4.1. Ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία (ΙΕΧ)

Η απομόνωση πολύ όμοιων βιολογικών μορίων από πολύπλοκα μίγματα τους είναι ένα από τα μείζονα προβλήματα στην βιοχημική έρευνα, το οποίο απαιτεί την χρησιμοποίηση τεχνικών υψηλής διακριτικότητας. Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί μια τέτοια τεχνική και είναι μία από τις σπουδαιότερες μεθόδους κλασμάτωσης βιολογικών ουσιών. Η βασική αρχή της ιοντοανταλλαγής είναι ότι ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με βάση το φορτίο που φέρουν τα βιολογικά μόρια. Η ιοντοανταλλαγή είναι ικανή να διαχωρίζει μόρια τα οποία διαφέρουν πολύ λίγο από άποψη φορτίου και αποτελεί έτσι μια τεχνική μεγάλη διακριτικής ικανότητας. Αφού όλα σχεδόν τα βιολογικά μακρομόρια είναι πολικά και μπορούν κάτω από κατάλληλες συνθήκες να φορτιστούν η ιοντοανταλλαγή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρύτατα.

Στην συνέχεια θα δούμε μερικά βασικά χαρακτηριστικά της ιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας και μερικά από τα βασικότερα μέρη της θεωρίας της ιοντοανταλλαγής που είναι απαραίτητα για την κατανόηση των φαινομένων του διαχωρισμού πολύπλοκων μιγμάτων.

B.4.2. Φορέας (Matrix)

Ένας ιοντοανταλλάκτης αποτελείται από ένα αδιάλυτο σκελετό πάνω στον οποίο φορτισμένες ομάδες έχουν δεθεί ομοιοπολικά. Αυτές οι φορτισμένες ομάδες σχετίζονται με τα αντίστοιχα τους ιόντα από την κινητή φάση. Αυτά τα ιόντα μπορούν να ανταλλάγουν με άλλα ιόντα χωρίς να επηρεάσουν τον σκελετό. Είναι δυνατόν να έχουμε θετικά και αρνητικά φορτισμένους ιοντοανταλλάκτες. Οι θετικά φορτισμένοι ιοντοανταλλάκτες έχουν αρνητικά φορτισμένα ζεύγη ιόντων και καλούνται για αυτό το λόγο ανιοντοανταλλάκτες. Οι αρνητικά φορτισμένοι έχουν θετικά ιόντα και καλούνται κατιοντοανταλλάκτες. Ο φορέας μπορεί να βασίζεται σε συνθετικά υποστρώματα ειδικά σχεδιασμένα για εργασίες όπως απιονισμός του νερού, απομετάλωση και ανάκτηση ιόντων από λύματα. Αυτοί οι φορείς αποτελούνται από υδρόφοβα πολυμερή με υψηλό βαθμό διασύνδεσης και μεγάλο βαθμό υποκατάστασης με φορτισμένες ομάδες και έχουν για αυτό το λόγο μεγάλη ικανότητα για ιόντα. Εξαιτίας του μεγάλου βαθμού διασύνδεσης τους η διάμετρος των πόρων τους είναι μικρή για βιολογικά μακρομόρια. Επιπρόσθετα η μεγάλη πυκνότητα φορτίου λόγω της μεγάλης υποκατάστασης οδηγεί σε πολύ ισχυρή δέσμευση και ο υδρόφοβος σκελετός συχνά οδηγεί σε αποδιάταξη των ευαίσθητων βιομορίων, έτσι άσχετα με τις άριστες υδροδυναμικές τους ιδιότητες αυτοί οι ιοντοανταλλάκτες είναι ακατάλληλοι για βιομόρια.

Οι πρώτοι ιοντοανταλλάκτες που σχεδιάστηκαν για χρήση με βιολογικά δείγματα είχαν σαν βάση την κυτταρίνη και αναπτύχθηκαν από τους Peterson και Sober. Εξαιτίας της υδροφιλικότητας της κυτταρίνης δεν αποδιάτασαν τα βιομόρια. Δυστυχώς όμως αυτοί οι ιοντοανταλλάκτες είχαν χαμηλό βαθμό υποκατάστασης διαφορετικά καθίστανται διαλυτοί και επομένως η ικανότητα να δεσμεύουν βιομόρια ήταν χαμηλή. Ένα άλλο πρόβλημα ήταν ότι οι υδροδυναμικές του ιδιότητες δέν ήταν ικανοποιητικές εξαιτίας του ακανόνιστου σχήματος των ινιδίων κυτταρίνης με αποτέλεσμα οι δυνατότητες ροής να ήταν περιορισμένες.

B.4.3. Φορτισμένες ομάδες

Η παρουσία φορτισμένων ομάδων είναι βασική ιδιότητα για τους ιοντοανταλλάκτες. Ο τύπος της φορτισμένης ομάδας καθορίζει τον τύπο και την ισχύ του ιοντοανταλλάκτη. Ο συνολικός αριθμός και η διαθεσιμότητα τους καθορίζει την ικανότητα. Υπάρχει μια ποικιλία ομάδων που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό και μερικές φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Ανιοντοανταλλάκτες	Ενεργές Ομάδες
Aminoethyl(AE-)	$-OCH_2CH_2NH_4^+$
Diethylaminoethyl(DEAE-)	$-OCH_2CH_2N^+(CH_2CH_3)_2$
Quaternary aminoethyl(QAE-)	$-OCH_2CH_2N^+(C_2H_5)_2CH_2CH(OH)CH_3$
Κατιοντοανταλλάκτες	
Carboxymethyl(CM-)	$-OCH_2COO^-$
Phospho	$-PO_4H_2^-$
Sulphopropyl(SP-)	$-CH_2CH_2CH_2SO_3^-$

Οι σουλφονικές και τεταρτοταγείς αμινομάδες χρησιμοποιούνται για την κατασκευή ισχυρών ιοντοανταλλακτικών υλικών. Οι φωσφορικές ομάδες χρησιμοποιούνται για την κατασκευή υλικών ενδιάμεση ισχύος. Οι όροι ισχυροί και ασθενείς ιοντοανταλλάκτες αναφέρονται στο εύρος του ιονισμού με το pH. Οι ισχυροί ιοντοανταλλάκτες είναι πλήρως ιονισμένοι σε ένα μεγάλο εύρος του pH, ενώ με τους ασθενείς ιοντοανταλλάκτες ο βαθμός ιονισμού και αποσύνδεσης και άρα η ιοντοανταλλακτικότητά τους ικανότητα εξαρτώνται πολύ από το pH.

B.4.4. Χωρητικότητα (Capacity)

Η χωρητικότητα ενός ιοντοανταλλάκτη είναι ένα ποσοτικό μέτρο της ικανότητας του να προσλαμβάνει και να ανταλλάσσει αντίθετα ιόντα και είναι επομένως μεγίστης σημασίας. Η χωρητικότητα μπορεί να εκφραστεί σαν συνολική χωρητικότητα ή διαθέσιμη χωρητικότητα. Η συνολική χωρητικότητα είναι το ποσό των φορτισμένων ή δυνητικά φορτισμένων ομάδων ανά γραμμάριο ξηρού ιοντοανταλλάκτη. Η

διαθέσιμη χωρητικότητα είναι η πραγματική χωρητικότητα που υπολογίζεται κάτω από συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Εξαρτάται από την προσεγγισιμότητα των ομάδων, την συγκέντρωση του διαλύματος και τη ιονική ισχύ, καθώς και την φύση των ιόντων και την εκλεκτικότητα του ιοντοανταλλάκτη για αυτά. Το pH και η θερμοκρασία είναι επίσης σημαντικά ειδικά για ασθενείς ιοντοανταλλάκτες.

B.4.5. Φυσικές ιδιότητες των υλικών ιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας

Τα υλικά ιοντοανταλλαγής είναι ελαστικά πηκτώματα τα οποία απορροφούν νερό και άλλους πολικούς διαλύτες και για αυτόν τον λόγο παρουσιάζουν μια μεταβολή στον όγκο τους. Αυτό το γεγονός το οποίο ισχύει για χρωματογραφικά υλικά παλαιότερης τεχνολογίας τα οποία βασίζονταν κυρίως στις δεξτράνες σαν σκελετό αλλά και στην κυτταρίνη, είχε σαν αποτέλεσμα να απαιτείται μια ειδική προεργασία του υλικού έτσι ώστε αυτό να γίνει έτοιμο προς χρήση. Η διαδικασία αυτή αποσκοπεί στην μετατροπή του υλικού από μια λεπτή σκόνη σε πήκτωμα, και ολοκληρώνεται όταν ο όγκος του πηκτώματος παραμένει πρακτικά αμετάβλητος. Σήμερα με την νέα τεχνολογία χρωματογραφικών υλικών τα οποία βασίζονται στην αгарόζη και χρησιμοποιούν υψηλού βαθμού διασύνδεση και διατίθενται με την εμπορική ονομασία σεφαρόζη παρουσιάζουν ευστάθεια και αντοχή σε υψηλές πιέσεις ενώ η διαδικασία του φουσκώματος αποφεύγεται μια και τα υλικά αυτά διατίθενται προκατεργασμένα σε μορφή πηκτώματος, έτοιμα προς χρήση.

Το εσωτερικό ενός σφαιριδίου χρωματογραφικού υλικού μοιάζει με μια σταγόνα συγκεντρωμένου ηλεκτρολυτικού διαλύματος και η συμπεριφορά των ιοντοανταλλακτών μπορεί γενικά να εξηγηθεί με αυτή την παραδοχή. Στην ίδια στιγμή υπάρχουν πολλές διαφορές από το ηλεκτρολυτικό διάλυμα. Οι ιδιότητες του πολυμερούς υλικού, συμπεριλαμβανομένης και της χαμηλής διηλεκτρικής σταθεράς, επηρεάζουν την συμπεριφορά στην ιοντοανταλλαγή.

B.4.6. Ισορροπία ιοντοανταλλαγής. Ειδικότητα του προσροφητή

Θεωρούμε την ανταλλαγή δύο ιόντων, A και B, ίσου φορτίου, μεταξύ του διαλύματος και του ανταλλάκτη R: $AR + B^+ \leftrightarrow BR + A^+$. Οι συγκεντρώσεις αυτών των ιόντων στο διάλυμα και στο ανταλλάκτη συνδέονται μέσω του παρακάτω λόγου $K_d = \frac{[BR][A^+]}{[AR][B^+]}$ (26). Το μέγεθος αυτού του λόγου δεν εξαρτάται από τις μονάδες στις οποίες εκφράζονται οι συγκεντρώσεις. Παρόλα αυτά δεν είναι σταθερά. Εξαρτάται από την αναλογία των ιόντων A και B, και την συνολική συγκέντρωση του διαλύματος. Η αληθής σταθερά είναι η θερμοδυναμική σταθερά: $K = K_d (\gamma_{BR}\gamma_{A^+} / \gamma_{AR}\gamma_{B^+})$ (27) όπου το

(γ) αντιπροσωπεύει τον συντελεστή δραστηριότητας. Η αναλογία γ_A^+ / γ_B^+ για το διάλυμα ισούται με $\gamma^2 \pm (AX) / \gamma^2 \pm (BX)$ όπου AX και BX είναι τα διαλελυμένα άλατα. Αυτή η αναλογία μπορεί να εκτιμηθεί με ακρίβεια σε ορισμένες περιπτώσεις. Παρόλα αυτά η αναλογία των συντελεστών δραστηριότητας στον ανταλλάκτη $\gamma_{BR} / \gamma_{AR}$, είναι δυσκολότερο να μετρηθεί και η τιμή της εξαρτάται από τις συνθήκες αναφοράς που έχουν χρησιμοποιηθεί. Αν χρησιμοποιήθηκαν σαν αρχικές καταστάσεις αναφοράς καθαρά AR και BR σε νερό τότε μπορεί να δειχθεί ότι :

$$\log K = \int \log K_a dN_B + \text{όροι διόρθωσης} \quad (28)$$

όπου N_B είναι το ισοδύναμο κλάσμα του κατιόντος B στον ανταλλάκτη και K_a είναι ίσο με $K_d \gamma_A^+ / \gamma_B^+$. Παρόμοιες εξισώσεις μπορούν να στοιχειοθετηθούν και για περιπτώσεις ανταλλαγής ιόντων άνισου φορτίου.

B.4.7. Ιοντοανταλλακτικές στήλες. Βασική θεώρηση

Η θεωρία των στηλών χρωματογραφίας αναπτύχθηκε σε προηγούμενη παράγραφο. Εδώ θα αρκεστούμε μόνο στα ειδικά σημεία της ιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας. Η μαθηματική προσέγγιση της θεωρίας των στηλών χρωματογραφίας είναι πολύ περίπλοκη. Εδώ θα παραθέσουμε τους βασικούς συλλογισμούς και τις παραδοχές που πρέπει να γίνουν για να κατασκευαστεί μια λειτουργική θεωρία.

Υπάρχουν δύο τύποι λειτουργίας των στηλών, εκτόπιση και έκλυση. Στην πρώτη, η στήλη αρχικά κορένεται σε όλη την έκταση της με το ιονικό είδος, A, και αυτό εκτοπίζεται και οδηγείται να εξέρθει της στήλης από ένα άλλο ιόν, B. Στην χρωματογραφία έκλυσης το είδος A το οποίο πρόκειται να εκτοπιστεί, καταλαμβάνει στην αρχή μόνο μια λεπτή ζώνη στην κορυφή της στήλης, ενώ η υπόλοιπη στήλη καταλαμβάνεται από το ιόν B. Αυτή η λεπτή ζώνη κινείται προς τα κάτω από την επίδραση περίσσειας του B το οποίο στην προκειμένη περίπτωση είναι ασθενέστερα συνδεδεμένο με τον προσροφητή από το A.

Εκτόπιση (displacement). Καθώς τα ιόντα B κινούνται προς τα κάτω μέσα στην στήλη, εκτοπίζουν ιόντα A από τον προσροφητή με καθαρά μηχανικό τρόπο και οδηγούν τα A έξω από τη στήλη ανεξάρτητα του αν το A ή το B είναι πιο ισχυρά συνδεδεμένο με τον προσροφητή. Είναι επιθυμητό να υπάρχει ένα οξύ σύνορο μεταξύ του A και του B. Εάν το B είναι πιο ασθενώς συνδεδεμένο από το A αυτό δέν είναι δυνατό να επιτευχθεί, διότι το σύνορο θα γίνεται όλο και πιο διάχυτο καθώς κινείται κάτω στην στήλη. Εάν συμβαίνει το αντίθετο τότε το ζητούμενο μπορεί να γίνει. Μια διάχυση προκύπτει αρχικά από τον σχηματισμό του μετώπου αλλά το προφίλ της συγκέντρωσης σύντομα σταθεροποιείται και δεν αλλάζει καθώς το σύνορο κινείται.

Ο Clueckauf είχε υπολογίσει το σχήμα του μετώπου εκτόπισης από την θεωρία των πλακών. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των θεωρητικών πλακών που περιέχει η στήλη, τόσο πιο οξύ θα είναι το

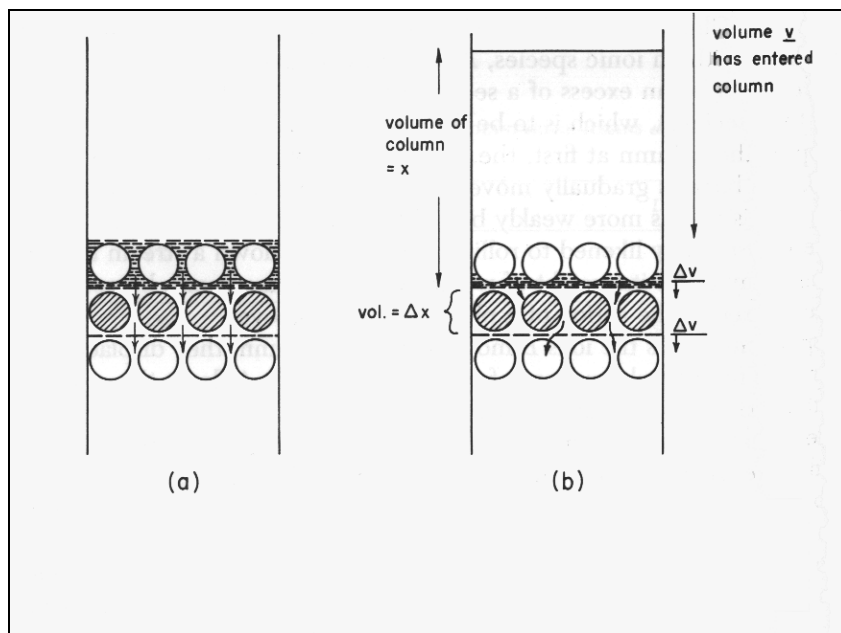
μέτωπο. Οι υπολογισμοί του ισχύουν για κατάσταση μη ισορροπίας και προβλέπουν το σχήμα του κατώτερου ή οδηγούντος τμήματος του προφίλ της συγκέντρωσης αρκετά καλά.

Έκλυση(elution). Η έννοια της θεωρητικής πλάκας. Η ιδέα της θεωρητικής πλάκας που εισήχθει στην χρωματογραφία από τους Martin και Synge, μεταφέρθηκε αρχικά επιτυχώς στην ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία από τους Mayer και Tompkins. Αυτοί θεώρησαν την στήλη να αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό από τμήματα ή πλάκες, πάχους της τάξεως των σφαιριδίων του υλικού. Μέσα σε καθένα από αυτά τα τμήματα, υποτίθεται ότι υπάρχει πλήρης ισορροπία, τα μόρια τα οποία κινούνται προς τα κάτω στην στήλη κατανέμονται μεταξύ των δύο φάσεων κατά μια σταθερά αναλογία D . Όπου D είναι το ποσό των συνδεδεμένων μορίων στον προσροφητή διαιρεμένο με το ποσό των μορίων στην κινητή φάση σε κάθε δεδομένη πλάκα και εξαρτάται από τον νεκρό όγκο της στήλης. Η κίνηση του διαλύματος, η οποία είναι στην πραγματικότητα συνεχής, θεωρήθηκε ότι προκύπτει σαν μία σειρά ασυνεχών πηδημάτων. Κατά συνέπεια με αυτή την εικόνα, τα ιονικά είδη τα οποία πρόκειται να εκλουστούν, θεωρούνται ότι καταλαμβάνουν μόνο μία πλάκα στην αρχή. Σε αυτή την πλάκα το κλάσμα $D/(1+D)$ βρίσκεται στον προσροφητή και το κλάσμα $1/(1+D)$ στο διάλυμα. Στο επόμενο βήμα το διάλυμα κινείται προς τα κάτω στην δεύτερη πλάκα και την θέση του παίρνει φρέσκο διάλυμα ίσου όγκου στην παραπάνω πλάκα. Στην συνέχεια τα μόρια ανακατανέμονται μεταξύ της κινητής και στατικής φάσης σε κάθε πλάκα. Στην ισορροπία η πρώτη πλάκα θα περιέχει ένα κλάσμα $D^2/(1+D)^2$ στον προσροφητή και ένα κλάσμα $D/(1+D)^2$ στην κινητή φάση. Η δεύτερη πλάκα θα περιέχει ένα κλάσμα $D/(1+D)^2$ στον προσροφητή και ένα κλάσμα $1/(1+D)^2$ στην κινητή φάση. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές. Κάθε κλάσμα του διαλύτη ακολουθείται από άλλο και η ισορροπία αποκαθίσταται πριν το επόμενο κλάσμα να φτάσει στην δεδομένη πλάκα. Τα μόρια τα οποία αρχικά καταλαμβάναν μόνο μια πλάκα στην κορυφή της στήλης τώρα έχουν εξαπλωθεί σαν μια ζώνη η οποία έχει την μέγιστη συγκέντρωση της σε κάποια πλάκα, ενώ μικρότερες συγκεντρώσεις έπονται και προηγούνται. Το κλάσμα των αρχικών μορίων τα οποία βρίσκονται στο διάλυμα στην νούμερο p πλάκα είναι:

$$L_{n,p} = (n+p-1)! D^{n-1} / (n-1)! p! (1+D)^{n+p} \quad (29)$$

όπου n είναι ο αριθμός των πολλαπλασίων Δn όπου Δn είναι ο όγκος του διαλύτη σε μία πλάκα η οποία έχει εξισορροπηθεί με την p πλάκα μέχρι αυτού του χρονικού σημείου. Εάν τα n και τα p είναι αρκετά μεγάλα τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί η προσέγγιση του Stirling για τα παραγοντικά και να πάρουμε μια συνεχή εξίσωση η οποία μπορεί να παραγωγηθεί και να δώσει τις συνθήκες για τις οποίες το $L_{n,p}$ είναι μέγιστο. Τότε $n_{\max} = p_{\max} D$. Υποθέστε ότι ο όγκος του διαλύματος ο οποίος παρακρατείται από μια ιοντοανταλλακτική στήλη είναι v , ο “όγκος της στήλης”, και ότι ένας όγκος του διαλύματος έκλυσης V , απαιτείται να διέλθει της στήλης για να κινήσει την κορυφή της ζώνης έκλυσης από την κορυφή της

στήλης μέχρι και τον πυθμένα. Άρα $D=V/v$ όπου D είναι οι όγκοι κολώνας που απαιτούνται για την έκλυση της κορυφής της ζώνης. Η παραπάνω εξίσωση φαίνεται να κρατεί καλά στην πράξη αν και στηρίζεται σε ένα κάπως αδρό μοντέλο. Ομως υπολογισμοί του ύψους της εκλυόμενης ζώνης (L_{max}) δεν συμφωνούν με τα πειραματικά δεδομένα. Οι ζώνες είναι λιγότερο οξείς και φαρδύτερες από ότι προβέπει η θεωρία. Με άλλα λόγια η θεωρητική πλάκα είναι μερικές φορές μεγαλύτερη από την διάμετρο των σφαιριδίων του υλικού ακόμα και κάτω από ιδανικές συνθήκες ροής. Η αιτία αυτής της ασυμφωνίας κείται κατά τον Clueckauf στην ατέλεια του μοντέλου. Τα σφαιρίδια είναι ασυνεχή αλλά η ροή του διαλύματος είναι συνεχής. Ενώ η πλάκα των Mayer και Tompkins είναι μια δεξαμενή που αδειάζει ημιτελώς και ξαναγεμίζει, η πλάκα του Clueckauf μοιάζει με δεξαμενή με το υγρό να ρέει διαρκώς από την μια άκρη στη άλλη, με ένα πανίσχυρο αναδευτήρα στην μέση ώστε να διατηρεί το διάλυμα ομογενές. Αυτό βέβαια είναι μια εξιδανίκευση αλλά καλύτερη από αυτήν των Mayer και Tompkins. Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με το νέο μοντέλο από την στιγμή που εισάγεται διαλύτης στην κορυφή της στήλης αυτός εξαπλώνεται στιγμιαία σε όλο το μήκος της στήλης και ίχνη του εμφανίζονται στο έκλουσμα αμέσως.



Εικ.2 Η θεωρητική πλάκα στην ιοντα ανταλλακτική χρωματογραφία. (a) Το μοντέλο Mayer-Tompkins (b) το μοντέλο συνεχούς ροής του Clueckauf

Η μαθηματική θεώρηση του Clueckauf ξεκινά ως εξής: Θεωρούμε μία πλάκα όγκου Δx , όπου x είναι ο όγκος της στήλης πάνω από αυτή. Υποθέτουμε ότι ένας όγκος v διαλύματος έχει εισέλθει στην στήλη και επομένως ένας ίσος όγκος έχει διέλθει μέσα από την πλάκα. Εστω ότι c_x είναι η συγκέντρωση μέσα στην πλάκα. Εστω ότι q_v είναι η συνολική συγκέντρωση του μορίου που μας ενδιαφέρει και έστω ότι προσωρινά έχει αποκατασταθεί ισορροπία μέσα στην πλάκα και ότι $q=ac$ όπου a είναι μια σταθερά.

Έστω ότι ένας στοιχειώδης όγκος Δv , ρέει μέσω της πλάκας. Το καθαρό ποσό μορίων που εισέρχονται στην στήλη είναι: $\Delta v [c_{(x-\Delta x)} - c_x] = \Delta x [q_{(v+\Delta v)} - q_v]$ (30)

Εισάγοντας παραγώγους έχουμε:

$$c_{(x-\Delta x)} = c_x - \Delta x (\partial c / \partial x)_v + \Delta x^2 / 2 (\partial^2 c / \partial x^2)_v \dots (31)$$

$$q_{(v+\Delta v)} = q_v + \Delta v (\partial q / \partial v)_x + \Delta v^2 / 2 (\partial^2 q / \partial v^2)_x \dots (32)$$

Αντικαθιστώντας στην αρχική εξίσωση και διαιρώντας με $\Delta x \Delta v$ έχουμε:

$$-(\partial c / \partial x)_v + \Delta x / 2 (\partial^2 c / \partial x^2)_v = (\partial q / \partial v)_x + \Delta v / 2 (\partial^2 q / \partial v^2)_x (33)$$

Επειδή η ροή είναι συνεχής, μπορούμε να κάνουμε το Δv όσο μικρό θέλουμε. Αυτό δεν μπορεί να γίνει για το Δx διότι είναι περιορισμένο από το μέγεθος των σφαιριδίων. Έτσι έχουμε: $(\partial c / \partial x)_v + (\partial q / \partial v)_x - \Delta x / 2 (\partial^2 c / \partial x^2)_v = 0$ (34)

Εάν ο προσροφητής και ο διαλύτης είναι σε ισορροπία και $q = ac$, τότε έχουμε:

$$(\partial c / \partial x)_v + a (\partial c / \partial v)_x - \Delta x / 2 (\partial^2 c / \partial x^2)_v = 0 (35)$$

Αυτή η γενική εξίσωση μπορεί να εφαρμοστεί σε όλους τους τύπους συμπεριφοράς στηλών, συμπεριλαμβανομένης και της εκτόπισης, ολοκληρώνοντας στις κατάλληλες συνθήκες ορίων. Μπορεί να εφαρμοστεί στην έκλυση μιας ζώνης πεπερασμένου μήκους χωρίς να απαιτεί να καταλαμβάνει στην αρχή μία μόνο πλάκα. Υποθέστε για παράδειγμα ότι πριν η έκλυση αρχίσει μία ζώνη μορίων καταλαμβάνει τις κορυφαίες N_0 θεωρητικές πλάκες στην στήλη. Έστω ότι το διάλυμα στις πλάκες έχει μία ομοιόμορφη συγκέντρωση C_0 . Έστω ότι διέρχονται M θεωρητικούς όγκους έκλυσης, διαλύτη όπου $M = v / a \Delta x$. Αν η συγκέντρωση στην N πλάκα είναι C τότε η λύση της διαφορικής εξίσωσης παραπάνω δίνει για αυτή την περίπτωση:

$$C / C_0 = A_\varepsilon (N - M / \sqrt{M}) - A_\varepsilon (N - M - N_0 / \sqrt{M}) (36)$$

όπου $A_\varepsilon(t)$ είναι η εξίσωση του σφάλματος:

$$A_\varepsilon(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int \exp(-t^2/2) dt (37)$$

Για περιπτώσεις πρακτικού ενδιαφέροντος στην χρωματογραφία, $N \gg N_0$ και οι ζώνες πρέπει να είναι οξείες πράγμα που σημαίνει ότι ο λόγος C/C_0 δεν είναι υπερβολικά μικρός. Με αυτές τις προσεγγίσεις μπορούμε να ξαναγράψουμε ότι:

$$c = \sqrt{\frac{N'}{2\pi}} \frac{M}{\sqrt{\alpha X' v}} \exp \left[-\frac{N'(\alpha X' - v)^2}{2\alpha X' v} \right] (38)$$

Εδώ έχουμε ότι: $N' = \frac{N - N_0}{2}$, και $X' = N' \Delta x$ και $M = a c_0 \chi_0 =$ η συνολική μάζα των μορίων στην ζώνη.

Από τον εκθετικό παράγοντα συμπεραίνεται ότι σε μία χοντρική προσέγγιση έχουμε $v_{\max} = \bar{v} = \alpha X'$. Το

παραπάνω είναι ισοδύναμο με την εξίσωση των Mayer και Tompkins και ταυτίζεται για την περίπτωση που $N_0=1$. Η συγκέντρωση του διαλύματος στην κορυφή της καμπύλης έκλυσης είναι:

$$c_{\max} = \frac{M}{\bar{v}} \sqrt{\frac{N'}{2\pi}} \quad (39). \text{ Το πλάτος της ζώνης σε ισοδύναμο πλακών είναι } N' = 8 \left(\frac{\bar{v}}{\beta} \right)^2 \quad (40) \text{ όπου το } \beta \text{ είναι}$$

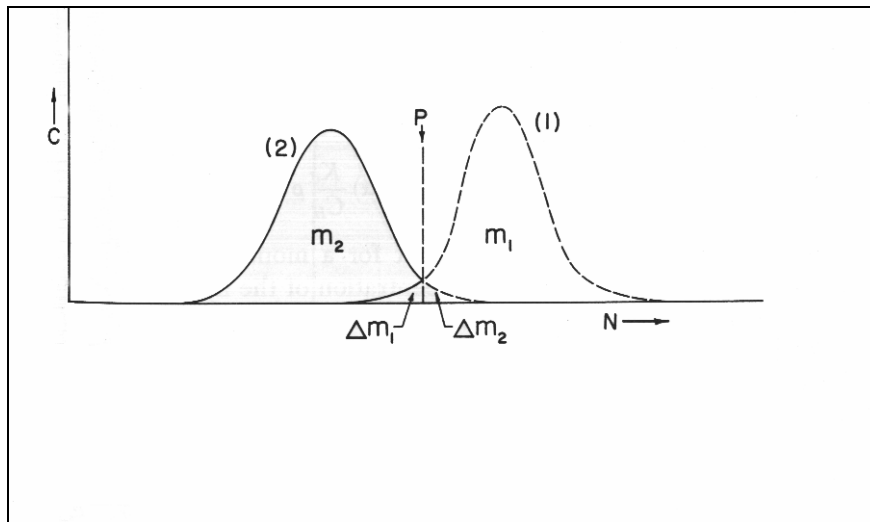
ο όγκος του εκλούσματος για τον οποίο η συγκέντρωση c ισούται ή υπερβαίνει το c_{\max}/e . Αντικαθιστώντας στις εξισώσεις έχουμε:

$$c = c_{\max} \exp \left[- \frac{N'(\bar{v} - v)^2}{2\bar{v}v} \right] \quad (41). \text{ Η εξίσωση αυτή μας δίνει την συγκέντρωση των μορίων σε συνάρτηση}$$

με τον αριθμό των θεωρητικών πλακών που υπολογίζεται εύκολα από την εξίσωση $c_{\max} = \frac{M}{\bar{v}} \sqrt{\frac{N'}{2\pi}}$ (42),

και από τις καμπύλες έκλυσης, είτε έχουμε συνθήκες ισορροπίας είτε όχι αφού πρακτικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν μόνο οι τελευταίες περιπτώσεις.

Αποτελεσματικότητα των διαχωρισμών έκλυσης. Μια από τις πιο σημαντικές χρήσεις της εξίσωσης $C/C_0 = A_e(N-M/\sqrt{M}) - A_e(N-M-N_0/\sqrt{M})$ είναι στην πρόβλεψη του μήκους της στήλης που απαιτείται για την πραγματοποίηση ενός διαχωρισμού. Αυτή η εξίσωση δίνει την συγκέντρωση του διαλελυμένου υλικού, c , σε οποιοδήποτε σημείο σε μια απείρως μακριά στήλη την στιγμή που ένας συγκεκριμένος όγκος v έχει εισέλθει στην στήλη. Εάν δύο ουσίες ταξιδεύουν προς τα κάτω στην στήλη την ίδια στιγμή το προφίλ της συγκέντρωσης σε κάθε στιγμή φαίνεται στο σχήμα παρακάτω



Εικ.3 Διαχωρισμός δύο συστατικών μέσω έκλυσης. Οι συγκεντρώσεις είναι οι πραγματικές μέσα στην στήλη σε μία δεδομένη χρονική στιγμή και το διάγραμμα δεν πρέπει να θεωρηθεί διάγραμμα έκλυσης. N είναι ο αριθμός των θεωρητικών πλακών από την αρχή της στήλης.

Η απόσταση που κινούνται οι ζώνες δίδεται από τον αριθμό των πλακών. Η παράμετρος $M = v/a\Delta x$ έχει μία τιμή για την ουσία 1 και άλλη για την 2. Ο όγκος που διήλθε της στήλης είναι ο ίδιος και για τις δύο

ουσίες. Επίσης το ύψος των πλακών είναι το ίδιο και για τις δύο ουσίες, αλλά οι συντελεστές κατανομής είναι διαφορετικοί. Ας υποθέσουμε ότι κόβουμε την στήλη στο σημείο P. Αν το σημείο αυτό ήταν το τέλος της στήλης τότε θα είχαμε καταφέρει να διαχωρίσουμε πλήρως το συστατικό 1 από το 2 το οποίο παραμένει στην στήλη και μπορεί να εκλουστεί αργότερα. Εστω ότι η συνολική ποσότητα του 2 να είναι m_2 και το ποσοστό που εκλούστηκε με το 1 να είναι Δm_2 τότε ισχύει:

$$\Delta m_2 = \int_z^{\infty} \alpha_2 c_2 dx = m_2 \left[0.5 - A_e \frac{(N - M_2)}{\sqrt{M_2}} \right] \quad (43) \text{ ομοίως } \Delta m_1 = m_1 \left[0.5 - A_e \frac{(N - M_1)}{\sqrt{M_1}} \right]. \text{ Εάν } \Delta m_1 = \Delta m_2 \text{ τότε}$$

$$\left[\frac{(N - M_2)}{\sqrt{M_2}} \right] = \pm \left[\frac{(N - M_1)}{\sqrt{M_1}} \right] \quad (44), \text{ όπου } M_1 M_2 = N^2. \text{ Επιπλέον } M_1/M_2 = \alpha_2/\alpha_1. \text{ Από τα παραπάνω είναι}$$

δυνατό να υπολογιστεί ο αριθμός των πλακών που απαιτούνται για τον επιτυχή διαχωρισμό δύο συστατικών όταν είναι γνωστός ο επιθυμητός βαθμός καθαρότητας των προϊόντων όταν δηλαδή το πηλίκο $\Delta m/m$ είναι γνωστό.

B.4.9. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Gel filtration chromatography, GF)

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης είναι μια μέθοδος χρωματογραφικής ανάλυσης η οποία εφαρμόζεται για τον διαχωρισμό διάφορων τύπων μορίων όπως αμινοξέα, πεπτίδια, ολιγο ή πολυσακχαρίτες, νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες. Ο διαχωρισμός που επιτυγχάνεται στην μέθοδο αυτή βασίζεται αποκλειστικά στο μοριακό βάρος των ουσιών που θέλουμε να διαχωρίσουμε. Η βάση της μεθόδου αυτής είναι η χρησιμοποίηση ενός σχετικά αδρανούς πηκτώματος το οποίο σήμερα έχει συνήθως βάση διάφορα πολυσακχαριδικά παράγωγα όπως οι δεξτράνες καθώς και παράγωγα της αγαρόζης όπως η σεφαρόζη όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Τα υλικά αυτά σχηματίζονται σε σφαιρίδια τα οποία διατίθενται με διάφορους βαθμούς διασύνδεσης. Η αρχή λειτουργίας αυτού του τύπου χρωματογραφικής ανάλυσης βασίζεται στην διαπίστωση ότι ένα μίγμα μορίων που διαφέρουν στο μοριακό βάρος μετακινούνται διαφορετικά μέσα στην στήλη ανάλογα με την επιλεκτικότητα του υλικού. Έτσι τα μικρά μόρια τα οποία έχουν μέγεθος της τάξεως της διαμέτρου των σφαιριδίων του υλικού θα εισχωρήσουν σε αυτά και η διαδρομή που θα κάνουν θα είναι μεγαλύτερη από εκείνα τα οποία δεν χωρούν να εισχωρήσουν και μετακινούνται μέσα στα κανάλια που δημιουργούνται μεταξύ των σφαιριδίων. Στην πραγματικότητα εκείνο που καθορίζει πως θα διαχωριστεί ένα μίγμα μορίων σε μία στήλη μοριακής διήθησης είναι το εύρος κλασμάτωσης το οποίο είναι χαρακτηριστικό του υλικού. Έτσι μόρια με μοριακό βάρος πολύ πάνω από το άνω όριο του εύρους κλασμάτωσης θα βγούν από την στήλη

στον νεκρό όγκο (void) ενώ τα μικρότερα μόρια θα διαχωριστούν με βάση τις διαδρομές που τους είναι επιτρεπτές από τα σφαιρίδια του υλικού.

B.4.10. Χρωματογραφία υδροφοβικών αντεπιδράσεων (HIC)

Στην χρωματογραφία υδροφοβικών αντεπιδράσεων, ο διαχωρισμός ενός μίγματος μορίων βασίζεται στις υδρόφοβες δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των μορίων και του προσροφητή. Επειδή η μαθηματική ερμηνεία των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ μορίων δεν είναι πολύ ανεπτυγμένη είναι δύσκολο να μελετήσει κανείς θεωρητικά την συμπεριφορά ενός μίγματος μορίων μέσα σε μία στήλη υδροφοβικών αντεπιδράσεων. Γενικά πάντως η αρχή λειτουργίας στηρίζεται στο γεγονός ότι τα μόρια ή πιο σωστά τα βιομόρια διαθέτουν στην επιφάνεια τους μία ποικιλία καταλοίπων από τα οποία άλλα έχουν πολικό και άλλα υδροφοβικό χαρακτήρα. Έτσι σε συνθήκες στις οποίες ο υδροφοβικός χαρακτήρας υπερτονίζεται ή ενισχύεται τα βιομόρια μπορούν να προσροφηθούν εκλεκτικά σε στήλες υδροφοβικών αντεπιδράσεων. Συνήθως για πρωτεϊνικά διαλύματα τέτοιες συνθήκες είναι διαλύματα με υψηλή ιονική ισχύ ή απορρυπαντικά αφού είναι γνωστό ότι οργανικοί διαλύτες υδρόφοβοι είναι ασυμβίβαστοι με τα βιολογικά μακρομόρια. Σε γενικές γραμμές το μίγμα των βιομορίων προσροφάται στην στήλη σε εκείνες τις συνθήκες που επιτρέπουν το σχηματισμό υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με τις ομάδες του υλικού και στην συνέχεια αλλαγή στις συνθήκες βαθμιαία οδηγεί στην έκλυση των μορίων με βάση την υδροφοβικότητα του. Τα υλικά τα οποία χρησιμοποιούνται στην χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων αποτελούνται και αυτά από ένα αδιάλυτο σκελετό και ομάδες οι οποίες είναι χημικώς συνδεδεμένες πάνω στον σκελετό. Συνήθως πρόκειται για ομάδες με βενζολικούς δακτυλίους είτε με αλειφατικές υδρογονοανθρακικές αλυσίδες. Ανάλογα με το μήκος και την υδροφοβικότητα των ομάδων καθορίζεται και το πόσο γερά μπορούν να προσροφηθούν τα μόρια πάνω στην στήλη. Έτσι και εδώ διαχωρίζονται οι προσροφητές σε ισχυρούς, σε μέτριους και ασθενείς. Αν και η χρωματογραφία υδροφοβικών αντεπιδράσεων και η ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία εκ πρώτης όψεως δεν έχουν πολλά κοινά μεταξύ εντούτοις αποτελούν συμπληρωματικές μεθόδους διαχωρισμού και πρέπει να χρησιμοποιούνται ως τέτοιες.

B.4.11. Χρωματογραφία συγγένειας με δεσμευμένες χρωστικές

Αυτή η μέθοδος βασίζεται στη βιοαναγνώριση. Το τελευταίο συνεπάγεται από την αντεπίδραση ενός συγκεκριμένου δεσμευτικού (ligand) μορίου με μια συμπληρωματική δεσμευτική θέση ενός βιομορίου. Σαν κανόνα το δεσμευτικό μόριο το οποίο βρίσκεται συνδεδεμένο με την ακίνητη ή στατική φάση προκαλεί αλλαγή στην κατανομή των βιομορίων που παρουσιάζουν συγγένεια για αυτό, μεταξύ των δύο φάσεων.

B.4.12. Ομάδες συγγένειας: Ορισμός και ιδιότητες

Οι ομάδες συγγένειας δεσμεύονται σε συμπληρωματικές λειτουργικές περιοχές των βιομορίων. Σε αντίθεση με απλούς δεσμευτές που αλληλεπιδρούν εκλεκτικά με πρωτεΐνες εξαιτίας εξειδικευμένων θέσεων, οι ομαδοειδικοί δεσμευτές αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες ομάδες πρωτεϊνών που μοιράζονται ένα κοινό πρότυπο στην επιφάνεια τους. Για παράδειγμα μόνο τα δινουκλεοτίδυλο-εξαρτώμενα ένζυμα διαθέτουν ένα κοινό δομικό στοιχείο που καλείται περιοχή δέσμευσης νουκλεοτιδίου. Άλλοι ομαδοειδικοί δεσμευτές είναι υδροφοβικοί και θειοφιλικί δεσμευτές, χηλικοί παράγοντες, τεταρτοταγή παράγωγα του αμμώνιου, ή χρωστικές. Μέσα την τάξη των χρωστικών πολλές μιμούνται περισσότερο ή λιγότερο με ακρίβεια δομικά πρότυπα νουκλεοτιδίων εξαιτίας της παρουσίας υδρόφοβων τμημάτων, φορτισμένων ομάδων και μεγάλης ευκαμψίας. Τέτοια μόρια έχουν χρησιμοποιηθεί σαν βιοειδικοί δεσμευτές σε μεθόδους διαχωρισμού συγγένειας.

B.4.13. Χρωστικές: Χημική φύση και δέσμευση σε αδρανή υποστρώματα.

Οι βιομιμητικές ενεργές χρωστικές έχουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των φυσικών αντιστοίχων τους. Μεταξύ άλλων συμπεριλαμβάνονται η μέτρια μέχρι υψηλή επιλεκτικότητα για ένζυμα και άλλες πρωτεΐνες, διαθεσιμότητα σε χαμηλό κόστος και μεγάλη ποικιλία δομών καθώς και υψηλή δραστηριότητα η οποία επιτρέπει πυρηνόφιλες προσθήκες σε διάφορα πολυμερή υποστρώματα, καθώς και χημική και βιολογική δραστηριότητα. Βασικά οι ενεργές χρωστικές περιέχουν ένα ειδικό χρωμοφόρο και μια δραστική ομάδα η οποία είναι ικανή να επηρεάσει την πυρηνόφιλη προσθήκη. Και τα δύο μέρη μιας δραστικής χρωστικής είναι συνδεδεμένα με αυξοχρωμικές ομάδες σε μεγάλη ποικιλία χημικών συνδυασμών. Υπάρχουν χρωστικές ανθρακινόνης όπως η πολύ γνωστή Cibacron Blue F3G-A, αζοχρώματα όπως η Procion Red HE-3B, χρωστικές φθαλοκυανίνης όπως η Procion Green H-4G, και χρωμομεταλλικά σύμπλοκα όπως η Procion Brown MX-5BR (I.C.I., Organics Division, Blackley, UK).

Όσον αφορά την δέσμευση σε αδρανή υποστρώματα παρατίθεται ειδική παράγραφος στο κομμάτι Υλικών και μεθόδων.

Γ. Υλικά και μέθοδοι

Στο τμήμα αυτό της παρούσας εργασίας περιγράφονται όλες οι πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για να επιτευχθεί το τελικό αποτέλεσμα. Οι πειραματικές μεθοδολογίες παρατίθενται σαν αυτούσιες θεματικές ενότητες και αντιμετωπίζονται ξεχωριστά όπως και στην καθημερινή εργαστηριακή πρακτική. Στόχος της εργασίας αυτής ήταν ο καθαρισμός και η απομόνωση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης R.PspPI από το σύστημα περιορισμού-τροποποίησης R-M.PspPI του βακτηρίου *Psychrobacter sp.* TAD137.

Γ.1. Βιολογικό υπόστρωμα.

Ως οργανισμό μοντέλο και πηγή του ενζύμου, του οποίου η απομόνωση ήταν ο σκοπός της εργασίας, χρησιμοποιήθηκε το ανταρκτικό βακτήριο *Psychrobacter sp.* TAD137, το οποίο προέρχεται από συλλογή ανταρκτικών ψυχρόφιλων βακτηρίων που διατηρείται στο εργαστήριο ενζυμικής τεχνολογίας με υπεύθυνο τον κ. Καθηγητή Βασίλειο Μπουρίωτη. Η ανάπτυξη του βακτηριακού στελέχους γίνεται εξολοκλήρου στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου της ενζυμικής τεχνολογίας με χρήση ζυμωτήρων και σε θερμοκρασία 8°C. Μετά την ανάπτυξη του στελέχους η συλλογή της βακτηριακής μάζας γίνεται με την χρήση αποβουτηρωτή. Η διαδικασία καλλιέργειας του στελέχους έχει μεγάλη απόδοση σε μάζα αφού από καλλιέργειες 15lt λαμβάνονται έως και 200g πάστας. Στην συνέχεια η πάστα καταψύχεται στους -20 °C και φυλάσσεται μέχρι την χρησιμοποίησή της για ερευνητικούς σκοπούς.

Γ.2. Εκχύλιση των βακτηριακών κυττάρων και παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.

Γ.2.1. Εκχύλιση με την χρήση υπέρηχων (Sonication)

Η χρήση των υπέρηχων ως μεθόδου διάρρηξης κυττάρων και ιστών έχει εφαρμοστεί με επιτυχία εδώ και αρκετά χρόνια και σε άλλες περιπτώσεις. Όπως είναι κατανοητό η μέθοδος αυτή εμπίπτει στην κατηγορία των μηχανικών μεθόδων, στην οποία η

διάρρηξη των κυττάρων επιτυγχάνεται με την εφαρμογή εξωτερικής δύναμης στα βακτηριακά κύτταρα τα οποία βρίσκονται εν αιωρήσει μέσα σε ρυθμιστικό σύστημα επιλεγμένο κατά περίπτωση για να ικανοποιεί τις κατάλληλες συνθήκες. Στην προκείμενη περίπτωση η εξωτερική δύναμη είναι κύματα πίεσης που δημιουργούνται μέσα στο υδατικό διάλυμα από μια ειδική γεννήτρια υπέρηχων, τα οποία θραύουν τα κυτταρικά τοιχώματα και τις πλασματικές μεμβράνες με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται τα κυτταροπλασματικά συστατικά. Αν και η εκχύλιση ενός συγκεκριμένου βιομορίου από βακτηριακά κύτταρα ή άλλη πηγή του εξαρτάται άμεσα από τις συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα, δηλαδή από τις συνθήκες όπως θερμοκρασία, pH, και ιονική ισχύ και αν πρόκειται για ένζυμο από τους διάφορους συμπάραγοντες που αυτό απαιτεί για να διατηρήσει την ενζυμική του ενεργότητα, εντούτοις κατά γενική παραδοχή η επιλογή του κατάλληλου ρυθμιστικού συστήματος βασίζεται στα παρακάτω:

α) Να παρέχει το κατάλληλο περιβάλλον από μοριακής πλευράς. Δηλαδή να διατηρεί το pH σταθερό και να παρέχει ιονικές συνθήκες κατάλληλες για τα βιολογικά μακρομόρια. Η διατήρηση του pH είναι κρίσιμη κατά την διαδικασία εκχύλισης διότι η απελευθέρωση των κυτταροπλασματικών συστατικών είναι δυνατόν να επιφέρει αλλαγές του pH. Επίσης η ρυθμιστική περιοχή στην οποία ενεργεί το σύστημα είναι σημαντική. Αφού το εσωτερικό του κυττάρου παρέχει ένα περιβάλλον με pH που κυμαίνεται από ουδέτερο έως ελαφρά αλκαλικό θεωρείται συνετό η ρυθμιστική περιοχή του συστήματος που θα επιλεγθεί να εμπίπτει σε αυτά τα όρια. Ακραίες τιμές του pH μπορεί να οδηγήσουν σε αποδιάταξη και απώλεια της βιολογικής δραστηριότητας, χωρίς βέβαια να αποκλειστούν ειδικές περιπτώσεις βιομορίων τα οποία παρουσιάζουν αυξημένους συντελεστές απόδοσης κατά την διαδικασία εκχύλισης σε ειδικές “ακραίες” συνθήκες.

β) Η ιονική ισχύς του διαλύματος δεν πρέπει να βρίσκεται σε ακραίες τιμές. Πολύ χαμηλή ή αντίθετα πολύ υψηλή ιονική ισχύς μπορεί να είναι καταστρεπτική για τα βιομόρια μια και ισχύουν τα συμπεράσματα της εναλάτωσης και εξαλάτωσης. Με άλλα λόγια πολύ χαμηλή ιονική ισχύς μπορεί να οδηγήσει πρωτεϊνικά μόρια σε ελάτωση της διαλυτότητας τους και επομένως σε κατακρήμνιση τους ως αδιάλυτο ίζημα. Το αυτό ισχύει και για την περιοχή της εξαλάτωσης (salting out).

γ) Πέρα από την διατήρηση σταθερών συνθηκών είναι απολύτως απαραίτητο το διάλυμα να προσφέρει στα βιομόρια εκείνα τα συστατικά που είναι απαραίτητα για

την διατήρηση της βιολογικής τους δράσης. Ιόντα όπως το Mg^{2+} , Zn^{2+} , αλλά και μικρά μόρια όπως ATP, NAD, NADH κ.α, μπορεί να χρειάζονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

δ) Ακόμα, δεν θα πρέπει να παραληφθεί το γεγονός ότι τα βιομόρια είναι επιρρεπή σε διάφορους οξειδωτικούς παράγοντες οι οποίοι βαθμιαία οδηγούν τα βιομόρια σε αποδιάταξη ή και σε χάσιμο της δραστηριότητάς τους. Επομένως πρέπει στο μέσο της εκχύλισης να συμπεριλάβουμε και αντιοξειδωτικούς παράγοντες όπως β-μερκαπτοαιθανόλη ή διθειοθρεϊτόλη. Τέλος η διάρκεια του βακτηριακού κυττάρου οδηγεί σε απελευθέρωση και διαφόρων υδρολυτικών ενζύμων όπως πρωτεάσες και άλλες υδρολάσες οι οποίες αν δεν εμποδιστούν θα δράσουν με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση των βιομορίων. Αρα κατάλληλοι αναστολείς πρέπει να συμπεριληφθούν.

Σύμφωνα με τα παραπάνω η διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε ακολουθεί παρακάτω. Πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι η χρήση του εκάστοτε ρυθμιστικού συστήματος υπαγορεύεται και από το επόμενο βήμα που θα ακολουθήσει στην διαδικασία κλασμάτωσης του βιομορίου που μας ενδιαφέρει.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Συγκεκριμένη ποσότητα βακτηριακής πάστας εναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα όγκου διπλάσιου του βάρους της. Η κατεψυγμένη πάστα αφήνεται να ομογενοποιηθεί με το ρυθμιστικό διάλυμα σε χαμηλή θερμοκρασία έως ότου το σύστημα μεταβληθεί σε παχύρευστη κρέμα.
- Το ρυθμιστικό διάλυμα αποτελείται από: τον ρυθμιστή, συνηθέστερα σύστημα Tris-HCl με pH που κυμαίνεται από 7,4 ως 8,2 σε συγκέντρωση 20 mM, ή Bis Tris Propane -HCl σε συγκέντρωση 20 mM, ή φωσφορικό ρυθμιστικό σύστημα μονόξινου και δισόξινου φωσφορικού νατρίου pH 7,0 σε συγκέντρωση 10 mM. Η επιλογή του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος γίνεται με βάση το επόμενο βήμα. Αλλα συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σύστημα οξικού οξέος-οξικού νατρίου pH 4,5-5,0 και σύστημα MES-NaOH pH 6,0-6,2.
- Η ιονική ισχύς ρυθμίζεται πάντα με NaCl και χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις από 10mM έως 100mM.
- Απαραίτητο κρίθηκε να περιέχει το μέσο της εκχύλισης ιόντα Mg^{2+} , τα οποία παρέχοντο ως $MgCl_2$ σε συγκέντρωση 10mM.

- Ως αντιοξειδωτικός παράγοντας χρησιμοποιήθηκε η διθειοθρεϊτόλη η β-μερκαπτοαιθανόλη σε συγκεντρώσεις 2-5mM.
- Τέλος μίγμα αναστολέων πρωτεασών που αποτελείτο από: PMSF, Leupeptin, Benzamidine χρησιμοποιήθηκε για να περιορίζει την δράση ενδογενών αλλά και εξωγενών πρωτεασών σε τελική συγκέντρωση 1mM

Το εναιώρημα των βακτηριακών κυττάρων μεταφέρεται σε δοχείο ζέσεως και τοποθετείται σε σύστημα ψύξης πάγου αιθανόλης για να διατηρηθεί σε χαμηλή θερμοκρασία. Το σύστημα υπερηχοβολείται 6x30 sec με ενδιάμεσα διαστήματα 2min. Το τελευταίο είναι απαραίτητο για να διατηρείται χαμηλή η θερμοκρασία του διαλύματος, η οποία φυσιολογικά αυξάνει λόγω της ενέργειας που μεταφέρεται από την γεννήτρια των υπέρηχων στο διάλυμα. Όταν η διαδικασία έχει ολοκληρωθεί είναι εμφανής η αλλαγή της όψεως του διαλύματος το οποίο μεταβάλλεται από παχύρευστη κρέμα σε υδαρές διάλυμα καθώς και αλλαγή στις φυσικές ιδιότητες (αύξηση ιξώδους). Στην συνέχεια το βακτηριακό εκχύλισμα φυγοκεντρείται στις 15000rpm για 60 min και το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης φυλάσσεται για περαιτέρω χρήση. Εναλλακτικά είναι δυνατό το ίζημα να επανεκχυλιστεί με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα και να υποβληθεί σε υπερηχοβόληση για τυχόν απώλειες κατά την διαδικασία, κάτι τέτοιο όμως δεν κρίθηκε απαραίτητο στην παρούσα εργασία. Επίσης μετά από αρκετές δοκιμασίες κρίθηκε απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί υπερφυγοκέντρωση για να καθαριστεί το εκχύλισμα από τα αδιάλυτα υπολείματα των κυττάρων. Στην περίπτωση αυτή το εκχύλισμα υπερφυγοκεντείτο στις 35000rpm με το SW41 ρότορα της υπερφυγοκέντρου ή στις 40000rpm με τον 50Ti ρότορα. Αυτό υπαγορεύτηκε από το γεγονός ότι το υπερκείμενο της απλής φυγοκέντρωσης ήταν συχνά θολό και νεφελώδες. Επίσης είναι γνωστό ότι η μέθοδος της υπερηχοβόλησης παράγει μεγάλες ποσότητες ριβοσωμικού υλικού που προκαλεί προβλήματα στην χρωματογραφική ανάλυση μια και εισάγει στο σύστημα μεγαλομοριακά νουκλεοπρωτεϊνικά συμπλέγματα τα οποία δύναται να λειτουργήσουν ως πυρήνες συσσωμάτωσης και άρα να οδηγήσουν σε απώλειες. Απώλειες επίσης εμφανίζονται και από την φύση της ίδιας της μεθόδου αφού τοπική υπερθέρμανση είναι αναπόφευκτη και οδηγεί σε αποδιάταξη των βιομορίων. Για αυτό το λόγο αυτή η μέθοδος εκχύλισης των βακτηριακών κυττάρων εγκαταλείφθηκε και χρησιμοποιήθηκε μέθοδος ενζυμικής λύσης η οποία είναι ηπιότερη και περιγράφεται στην ακόλουθη παράγραφο.

Γ.2.2. Εκχύλιση των βακτηριακών κυττάρων με τροποποιημένη μέθοδο της λυσοζύμης.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η μέθοδος που θα αναφερθεί σε αυτό το τμήμα χρησιμοποιήθηκε και χρησιμοποιείται (Scopes, R., K., Springer Verlag New York Inc. 1987) με επιτυχία για την εκχύλιση βακτηριακών κυττάρων και απομόνωση όχι μόνο πρωτεϊνών αλλά και νουκλεϊκών οξέων. Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση του ενζύμου λυσοζύμη που προέρχεται συνήθως από το άσπρο του αυγού κότας. Ως γνωστόν η λυσοζύμη καταλύει την διάσπαση των δεσμών μεταξύ των μονομερών N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνης και N-ακέτυλο-μουραμικού οξέος τα οποία βρίσκονται συνδεδεμένα σε εναλλαγή δημιουργώντας το κύριο πολυσακχαριδικό τμήμα του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηριακών κυττάρων. Επίσης είναι γνωστό από την μικροβιολογία ότι τα βακτηριακά κύτταρα ανάλογα με την σύσταση του τοιχώματος κατατάσσονται σε gram⁻ και gram⁺. Στα gram⁺ η λυσοζύμη έχει κατευθείαν πρόσβαση στο πολυσακχαριδικό τοίχωμα, ενώ στα gram⁻ το βακτήριο περιβάλλεται από μία επιπλέον στοιβάδα λιποπολυσακχαριδικής φύσεως με αποτέλεσμα η λυσοζύμη να μην έχει άμεση πρόσβαση στο στόχο της. Μιας και το *Psychrobacter sp.* TAD137 είναι gram⁻ ήταν αναγκαίο να χρησιμοποιηθεί ένα τροποποιημένο πρωτόκολο εκχύλισης των κυττάρων. Η λογική που ακολουθήθηκε για τον σχεδιασμό του πρωτοκόλου ήταν η ακόλουθη.

Πρώτο αναγκαίο βήμα είναι να εκχυλιστεί το λιποπολυσακχαριδικό στρώμα με την βοήθεια κάποιου απορυπαντικού παράγοντα και παρουσία κάποιου διαλυτικού μέσου που διατηρεί την υπόσταση των βακτηριακών κυττάρων ανέπαφη.

Δεύτερον, μετά την εκχύλιση του στρώματος στο σύστημα πρέπει να εισαχθεί η λυσοζύμη σε συγκέντρωση τέτοια που να μην παρεμβάλει εμπόδια στα περαιτέρω βήματα καθαρισμού αλλά και να βρίσκεται σε ικανή ποσότητα ώστε να πραγματοποιήσει την λύση των κυττάρων.

Τρίτον, από την λύση των κυττάρων ελευθερώνεται μεγάλη ποσότητα χρωμοσωμικού DNA το οποίο πρέπει να απομακρυνθεί διότι αυξάνει το ιξώδες και παρεμβάλεται στην χρωματογραφική ανάλυση. Αρα είναι αναγκαίο να συμπεριλάβουμε στο σύστημα και μια μη ειδική δεσοξυριβονουκλεάση η οποία και θα βρίσκεται σε τέτοια ποσότητα ώστε να μην παρεμβάλεται στα επόμενα βήματα. Σύμφωνα με τα παραπάνω το πρωτόκολο λύσης των κυττάρων με λυσοζύμη έχει ως εξής:

α) Στην βακτηριακή πάστα η οποία έχει προηγουμένως αφεθεί να αποψυχθεί στου 4 βαθμούς προστίθενται στην πάστα γλυκερόλη 100% σε αναλογία 280μl/g, δ/μα 10% v/v Triton X-100 σε αναλογία 20μl/g και β-μερκαπτοαιθανόλη 2,4μl/g. Το μίγμα αφήνεται σε ισχυρή ανάδευση για 30 min περίπου.

β) Στην συνέχεια ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris-HCl pH 7,4 , 1mM EDTA, 0,3mg/ml chicken egg white lysozyme (Sigma), όγκου διπλάσιου του βάρους των κυττάρων και αφήνεται υπό ισχυρή ανάδευση για 30 min περίπου. Μετά το πέρας του ορίου των 30 min παρατηρείται μια αύξηση του ιξώδους του διαλύματος και αλλαγή του χρώματος.

γ) Στην συνέχεια προστίθεται MgCl₂ σε τελική συγκέντρωση 10mM και 70μg Dnase I (Bovine pancreas Sigma) και το μίγμα αφήνεται να επωαστεί για 15 min περίπου. Αμα τη προσθήκη της δεσόξυριβονουκλεάσης παρατηρείται αλλαγή του ιξώδους και το μίγμα καθίσταται υδαρές και μπορούμε να το χειριστούμε εύκολα. Ακολούθως προστίθεται μίγμα αναστολέων πρωτεασών PMSF, Leupeptin, Benzamidine σε τελική συγκέντωση 1mM. Το διάλυμα υπερφυγοκεντρείται στις 40000rpm με τον 60Ti ρότορα της υπερφυγοκέντρου για 60 min και το υπερκείμενο φυλάσσεται για τα επόμενα στάδια.

Γ.3. Χρωματογραφικές μέθοδοι ανάλυσης

Στις επόμενες παραγράφους αναφέρονται εκείνες οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν για την προετοιμασία των χρωματογραφικών υλικών και για την διεξαγωγή των χρωματογραφικών αναλύσεων. Για την επίτευξη του στόχου της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν πολλοί τύποι χρωματογραφικής ανάλυσης και μεγάλη ποικιλία υλικών χρωματογραφίας. Σχετικά με την θεωρητική προσέγγιση των χρωματογραφικών αναλύσεων μιλήσαμε σε προηγούμενο τομέα αυτής της διατριβής. Τα υλικά της χρωματογραφίας που επιλέχθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων κρίθηκαν με βάση τα φυσικά και τεχνικά χαρακτηριστικά τους με ιδιαίτερη έμφαση στην ταχύτητα ροής, την επαναληψιμότητα, και την δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης. Τα υλικά που δοκιμάστηκαν είναι: **S sepharose fast flow(Pharmacia)**, **Q sepharose fast flow(Pharmacia)**, **Phenyl sepharose fast flow (high sub)(Pharmacia)**, **DEAE sephacel(Pharmacia)**, **P11 phosphocellulose Whatman**, **Biogel HA (Hydroxylapatite) Biorad**, **Superdex 200 Prep grade(Pharmacia)**, **Mono Q (Pharmacia)**, **Blue sepharose fast flow(custom**

made). Όλα τα παραπάνω υλικά με εξαίρεση το **P11 phosphocellulose Whatman** διατίθενται προετοιμασμένα σαν πήκτωμα με διάλυμα 20% αιθανόλη για συντηρητικό. Το **P11 phosphocellulose Whatman** απαιτεί προεργασία η οποία θα αναφερθεί παρακάτω.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ενεργοποίηση των προσροφητών και το πακετάρισμα των στηλών περιγράφεται αναλυτικά τόσο στα φυλλάδια οδηγιών που συνοδεύουν τα υλικά όσο και στα έντυπα της Pharmacia τα οποία καλύπτουν τεχνικές γνώσεις γύρω από διάφορους τύπους χρωματογραφικής ανάλυσης (**FPLC ion exchange and chromatofocusing. Principles and methods**. Pharmacia LKB Biotechnology). Εδώ θα αναφερθούμε σύντομα στους διάφορους τύπους χρωματογραφικής ανάλυσης ενώ για περισσότερες πληροφορίες ο αναγνώστης θα πρέπει να ανατρέξει στα τεχνικά φυλλάδια των υλικών καθώς και στην σχετική βιβλιογραφία.

Για τις στήλες χρωματογραφικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε η σειρά XK από την Pharmacia. Οι χρωματογραφικές αναλύσεις διεξάγοντο είτε σε συστήματα χαμηλής πίεσης με την χρήση περισταλτικών αντλιών τύπου **P1,P3, Micropeprex** είτε μέσω του αυτοματοποιημένου συστήματος **FPLC (Fast Product Liquid Chromatography, Pharmacia)**. Η έκλουση των βιομορίων από τις χρωματογραφικές στήλες ανιχνεύεται με την αλλαγή της απορόφησης στα 254nm με την βοήθεια φασματοφωτόμετρου υπεριώδους **UV-1 optical unit, control unit**, και καταγράφεται με αναλογικό καταγραφέα **REC 1**(στο σύστημα FPLC υπάρχει ταυτόχρονη καταγραφή και της βαθμίδωσης). Η συλλογή των κλασμάτων γίνεται με προγραμματιζόμενο συλλογέα κλασμάτων **FRAC-100, FRAC-200**, σε κλάσματα σταθερού όγκου

Γ.3.1. Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία

Γ.3.1.1. Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή Q sepharose fast flow

Το χρωματογραφικό υπόστρωμα πλένεται καταρχήν σε ηθμό πορώδους υάλου με nanopure νερό και στην συνέχεια εξισορροπείται μέσα στον ηθμό με 10 έως 20 όγκους υλικού με το ρυθμιστικό διάλυμα της επιλογής. Αν και το συγκεκριμένο υλικό είναι ισχυρός ανιοανταλλάκτης πράγμα που σημαίνει ότι παραμένει θετικά φορτισμένος σε μια περιοχή του pH από 2-12 εντούτοις η επιλογή του pH εργασίας

δεν πρέπει να είναι μικρότερη του 6 και μεγαλύτερη του 9 τουλάχιστον για την περίπτωση που μας ενδιαφέρει εδώ. Ως ρυθμιστικό διάλυμα επιλέγεται συνήθως Tris ή Bis Tris Propane -HCl. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η επιλογή του pH διότι επηρεάζει σημαντικά τον τρόπο και την ιονική ισχύ που απαιτείται για την έκλυση του μορίου που μας ενδιαφέρει.

Στην συνέχεια το υλικό έτοιμο πια φέρεται εντός της στήλης της επιλογής μας και πακετάρεται με βάση τις οδηγίες χρήσης του. Επειδή τα υλικά που φέρουν την ονομασία fast flow είναι υλικά με υψηλό βαθμό διασύνδεσης (crosslinking) έχουν την δυνατότητα να δέχονται μεγάλες πιέσεις χωρίς αλλαγή του όγκου. Αυτό έχει σαν συνέπεια η παροχή που απαιτείται για το πακετάρισμα να είναι μεγαλύτερη ή ίση με 400 ml/h. Επίσης η ταχύτητα πακεταρίσματος επηρεάζει και την ταχύτητα λειτουργίας της στήλης αφού αυτή δεν πρέπει να ξεπερνά το 75 % της ταχύτητας πακεταρίσματος (**Ion Exchange chromatography. Principles and methods.** Pharmacia LKB Biotechnology)

Γ.3.1.2. Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή DEAE-sephacel

Το χρωματογραφικό αυτό υπόστρωμα, είναι ένας ανιοντοανταλλάκτης μέσης ισχύος του οποίου ο σκελετός βασίζεται στην κυτταρίνη. Για αυτό το λόγο το υλικό αυτό δεν είναι κατάλληλο για υψηλές ταχύτητες. Έτσι ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία με την διαφορά ότι το πακετάρισμα του υλικού γίνεται σε χαμηλή παροχή περίπου 80ml/h. Ακόμα η διαφορά στις ενεργές ομάδες μεταξύ του προσροφητή Q fast flow που είναι τεταρτοταγείς αμινομάδες και του DEAE που είναι διαιθυλαμινο-ομάδες σημαίνει ότι το τελευταίο παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία σε τιμές του pH όσον αφορά τον ιονισμό των ομάδων του και επομένως η ικανότητα του υλικού επηρεάζεται ανάλογα. Γενικότερα το υλικό αυτό χρησιμοποιείται σαν αρχικό στάδιο όταν θέλουμε να επιτύχουμε διαχωρισμούς ομάδων βιομορίων μεταξύ τους (Rossomando, E., F., 1990).

Γ.3.1.3. Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή MonoQ

Το υλικό MonoQ αποτελεί μια ξεχωριστή κατηγορία υλικών τα οποία έχουν όλα τα χαρακτηριστικά της Q αλλά βασίζονται σε σκελετό που αποτελείται από mono beads,

σφαιρίδια ομοιόμορφης διαμέτρου τα οποία μπορούν να πακεταριστούν σε μεγάλες ταχύτητες και παρέχουν ομοιογένεια στην στατική φάση και μεγάλη διακριτικότητα. Τα υλικά αυτά διατίθενται σαν έτοιμες προπακεταρισμένες στήλες οι οποίες είναι συμβατές με το σύστημα FPLC (**FPLC ion exchange and chromatofocusing**, Pharmacia LKB Biotechnology).

Γ.3.2. Κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία

Γ.3.2.1. Κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή S sepharose fast flow

Όπως και με την Q έτσι και εδώ το υλικό πλένεται και εξισορροπείται με ρυθμιστικό διάλυμα της επιλογής μας.

Γ.3.2.2. Κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή P11

Το υλικό P11 είναι κυτταρίνη υποκατεστημένη με φωσφορικές ομάδες, και διατίθεται σαν ανενεργή σκόνη η οποία απαιτεί μια διαδικασία ενεργοποίησης που είναι η ακόλουθη:

- Μια ποσότητα του υλικού διαλύεται σε εικοσαπλάσια ποσότητα νερού αναδεύεται με υάλινη ράβδο και αφήνεται να καθιζάνει.
- Μετά την καθίζηση το υπερκείμενο νερό απορίπτεται και αντικαθίσταται από διάλυμα NaOH 0,1N αναδεύεται όπως παραπάνω και αφήνεται να καθιζάνει για 20 λεπτά.
- Στην συνέχεια πλένεται με νερό όπως στο πρώτο βήμα μέχρι η τιμή του pH να είναι μεγαλύτερη από 7 και μικρότερη από 10.
- Στην συνέχεια προστίθεται διάλυμα HCl 0,1N και αφήνεται για 20 λεπτά.
- Στην συνέχεια το οξύ απορίπτεται και αντικαθίσταται με νερό μέχρι το pH να είναι μεγαλύτερο του 3.
- Τότε προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα της επιλογής μας και γίνονται τόσες αλλαγές μέχρι όπου το pH να αποκτήσει την τιμή που πρέπει και τότε το υλικό αφήνεται να καθιζάνει κατά την διάρκεια της νύχτας και το πρωί είναι έτοιμο προς χρήση.

Όλες οι παραπάνω αλλαγές διαλυμάτων γίνονται για να ενεργοποιηθούν οι ομάδες του υλικού αλλά και για να απομακρυνθούν διάφορα θραύσματα απότα ινίδια της

κυτταρίνης τα οποία θα παρεμποδίσουν την σωστή λειτουργία του προσροφητή. Πρέπει να τονισθεί ότι το υλικό αυτό είναι ευαίσθητο σε προσβολή από μικροοργανισμούς που βαθμιαία προκαλούν την διάσπαση του και για αυτό πρέπει να φυλάσσεται σε χαμηλή θερμοκρασία παρουσία ισχυρό αντιμικροβιακού παράγοντα συνηθέστερα νατραζιδίου NaN_3 0,002% κ.ο. (Peterson, E., A., Sober, H., A., 1956)

Γ.3.3. Χρωματογραφία συγγένειας σε προσροφητή Blue-sepharose fast flow

Για τις ανάγκες αυτού του τύπου χρωματογραφικής ανάλυσης ήταν αναγκαία η κατασκευή του προσροφητή. Η απόφαση για την ιδιοκατασκευή του προσροφητή πάρθηκε εξαιτίας του κόστους των εμπορικά διαθέσιμων τέτοιων προσροφητών αλλά και με βάση τον χρόνο παραλαβής. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την κατασκευή του προσροφητή ήταν η ακόλουθη:

- 35 g πηκτώματος saepharose fast flow πλένονται σε ηθμό πορώδους υάλου με nanopure νερό
- Προστίθενται 54,64ml νερό
- Προστίθενται 6,6 ml 5M NaCl
- Προστίθενται 2,1g χρωστικής Procion Blue HB 5BR (I.C.I., Organics Division, Blackley, UK)
- Το μίγμα αναδεύεται ήπια με υάλινη ράβδο για 30 min στους 40°C
- Προστίθενται 2,31ml NaOH 10N, και το μίγμα αναδεύεται ήπια.
- Στην συνέχεια το υλικό πλένεται με
- H_2O nanopure
- 1M KCl
- 5M urea
- 20% v/v ethyleneglycol
- H_2O nanopure

Μετά την παραπάνω διαδικασία το υλικό είναι έτοιμο προς χρήση σε πειράματα χρωματογραφικής ανάλυσης. (Stellwagen, E., 1990)

Γ.3.4. Χρωματογραφία υδροφοβικών αντεπιδράσεων σε προσροφητή Phenyl sepharose fast flow(High sub)

Το χρωματογραφικό υπόστρωμα πλένεται με nanopure νερό και εξισορροπείται με το κατάλληλο ρυθμιστικό σύστημα σε υψηλή ιονική ισχύ. Συνηθέστερα χρησιμοποιείται

ως ρυθμιστής ιονικής ισχύος θειϊκό αμμώνιο $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sigma) αλλά και NaCl (Shaltiel, S., 1984)

Γ.3.5. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης(Gel Filtration)

Χρησιμοποιήθηκε προσροφητής **Superdex 200**. Η προετοιμασία του υλικού και η εφαρμογή και έκλουση του δείγματος έγινε κάθε φορά σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται στο αντίστοιχο τεχνικό σύγγραμμα της εταιρίας Pharmacia (**Gel filtration. Theory and Practice**. Pharmacia LKB Biotechnology, Stellwagen, E., 1990)

Γ.4. Ηλεκτροφορητικές μέθοδοι ανάλυσης

Γ.4.1. Ηλεκτροφόρηση αποδιατακτικού πηκτώματος πολυακριλαμίδιου (SDS-PAGE)

Η παρασκευή των πηκτώματων και η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων γίνεται σύμφωνα με το σύστημα τύπου **Laemlie** (Hames B., D., Rickwood D., Oxford: IRL press 1990). Η συσκευές ήταν τύπου **Hoefler** με διαστάσεις 8x14cm.

Γ.5. Τεχνικές χρώσεις αποδιατακτικών πηκτωμάτων

Γ.5.1. Χρώση Commasie Brilliant Blue R250

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα μεταφέρεται σε τρυβλίο ή άλλο δοχείο και εμβαπτίζεται σε όξινο διάλυμα χρωστικής Commasie Brilliant Blue R250, όπου και αφήνεται να αναδευτεί για 30-60min. Στην συνέχεια το πήκτωμα ξεπλένεται με άφθονο νερό και εμβαπτίζεται σε διάλυμα οξικού οξέος, μεθανόλης και νερού σε αναλογία 10% οξικό, 5% μεθανόλη και αφήνεται υπό ανάδευση με πολλές αλλαγές του διαλύματος. Μετά το τέλος της διαδικασίας η χρωστική η οποία δεν έχει αντιδράσει με πολυπεπτιδικές ζώνες αφήνει το πήκτωμα ενώ τα πολυπεπτιδια γίνονται ορατές σαν ζώνες μπλέ χρώματος (Hames B., D., Rickwood D., Oxford: IRL press 1990).

Γ.5.2. Αρνητική χρώση με ιμιδαζόλιο και χλωριούχο ψευδάργυρο

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα 0,2M ιμιδαζόλιου και αφήνεται υπό ανάδευση για 10min. Στην συνέχεια το διάλυμα αποχύνεται και τα υπολοίματα του αφαιρούνται προσεκτικά. Προστίθεται διάλυμα

0,2M $ZnCl_2$ και αμέσως παρατηρείται ότι το πήκτωμα χρούται λευκό ενώ οι πολυπεπτιδικές ζώνες παραμένουν άχρωμες και προσδιορίζονται εκ του αντιθέτου. Για το λόγο αυτό η χρώση καλείται αρνητική (Dzandu, J.,K., *et al.*, 1988).

Γ.5.3. Μονοχρωματική χρώση νιτρικού αργύρου

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα 50% μεθανόλης (CH_3OH) και αφήνεται υπό ανάδευση για 2h - 12h. Στην συνέχεια το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα εξισσορόπησης που κατασκευάζεται ως εξής:

- Σε 35ml H_2O διαλύεται 1g $AgNO_3$
- Προστίθενται 25ml διαλύματος 0,1M NaOH
- Προστίθενται 3ml διαλύματος αμμωνίας (NH_3) τουλάχιστον 25% v/v
- Προστίθενται 60ml μεθανόλης (CH_3OH)
- Το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τα 121,1ml με νερό

Το πήκτωμα αφήνεται υπό ανάδευση σε σκοτεινό περιβάλλον για 1,5h και στην συνέχεια το διάλυμα εξισσορόπησης αποχύνεται. Το πήκτωμα πλένεται για 8-10min με H_2O και στην συνέχεια εμβαπτίζεται σε διάλυμα εμφάνισης που αποτελείται από: 50mg κιτρικού οξέος (Free acid) και 0,5ml φορμαλδεΐδης (όγκος 2lt). Σε λίγα λεπτά το πήκτωμα αρχίζει να εμφανίζει ζώνες καφέ χρώματος που αντιστοιχούν στα πολυπεπτίδια. Προκειμένου να σταματήσει η αντίδραση εμφάνισης που τελικά οδηγεί σε αμαύρωση όλου του πηκτώματος το εμφανιστικό διάλυμα αποχύνεται και προστίθεται διάλυμα 12% w/v θειοθειϊκού νατρίου (Sodium thiosulfate). Το διάλυμα εξισσορόπησης είναι σταθερό για 5 ημέρες ενώ το εμφανιστικό διάλυμα μπορεί να διατηρηθεί για δύο εβδομάδες (Blum, H., *et al.*, 1987).

Γ.5.5. Χρώση υπεριώδους με την χρωστική SybroRED

Για την πραγματοποίηση αυτής της χρώσης διαλύονται 5μl του αντιδραστηρίου SybroRED σε 100ml διαλύματος 7,5% v/v οξικού οξέος. Το πήκτωμα εμβαπτίζεται στο διάλυμα και αφήνεται υπό ανάδευση σε σκοτεινό περιβάλλον για 60 min. Στην οι πολυπεπτιδικές ζώνες γίνονται ορατές με διέγερση του αντιδραστηρίου κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία. Το διάλυμα μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί για 2-3 ακόμα φορές.

Γ.5.6. Ηλεκτροφόρηση πήκτωματος αγαρόζης

Η προετοιμασία του πήκτωματος και οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης γίνονται όπως στην βιβλιογραφία. Η χρώση του πήκτωματος γίνεται με φθορίζουσα χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο και το πήκτωμα φωτογραφίζεται κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία (Sharp, P.A., *et al.*, 1973).

Γ.6. Ενζυμική δοκιμασία ανίχνευσης ενεργότητας της ενδονουκλεάσης

R.PspI

Η ανίχνευση της ενεργότητας της περιοριστικής ενδονουκλεάσης R.PspI γίνεται με την μέθοδο που περιγράφεται στην βιβλιογραφία για το ένζυμο περιορισμού. Αυτή έχει ως εξής:

- Διάλυμα αντίδρασης :20mM Tris-HCl pH 7,4 ,50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 2mM DTT (χρησιμοποιείται συγκεντρωμένο 10 φορές)
- Υπόστρωμα λ DNA μη μεθυλιωμένο σε συγκέντρωση 0,5μg/μl
- νερό

Μικρή ποσότητα του ενζύμου (3μl) αναμιγνύεται με 5μl του συγκεντρωμένου διαλύματος αντίδρασης και προστίθεται υπόστρωμα ποσότητας 1μg. Το μίγμα συμπληρώνεται μέχρι όγκο 50μl με nanopure H₂O και το ένζυμο αφήνεται να αντιδράσει για 1h. Στην συνέχεια προστίθεται loading buffer(σύσταση) και το μίγμα ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (Tris-Borate-EDTA) στα 120V. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα μπορεί να επιθεωρηθεί για το επιθυμητό αποτέλεσμα κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία. Η περιοριστική ενδονουκλεάση είναι ισοσχιζομερές του ενζύμου Sau96I (New England Biolabs) παράγει το χαρακτηριστικό πρότυπο πέψης που φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί αν χρησιμοποιηθεί σαν υπόστρωμα λ DNA. (Smith, H.O., *et al.*, 1970)



Εικ.4 Πρότυπο πέψης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης R.PspI σε υπόστρωμα λ DNA.

Γ.7. Μέθοδος μέτρησης μονάδων ενζυμικής ενεργότητας της ενδονουκλεάσης R.PspPI

Κατά την διάρκεια της μελέτης ενός ενζύμου, είναι αναγκαίο να μπορούμε να μετρήσουμε την ενζυμική δραστηριότητα. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί ειδικές δοκιμασίες για συγκεκριμένα ένζυμα ή για κατηγορίες ενζύμων, οι οποίες μπορούν να ποσοτικοποιήσουν την ενζυμική δραστηριότητα σε τυποποιημένες μονάδες γνωστές και ως U(units). Η μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας είναι το ποσό εκείνο του ενζύμου που καταλύει την μελετούμενη αντίδραση σε μια συγκεκριμένη και σταθερή χρονική περίοδο. Για την οικογένεια των περιοριστικών ενδονουκλεασών η ενζυμική δοκιμασία που χρησιμοποιείται είναι αντίδραση πέψης πρότυπου υποστρώματος λ DNA σε χρονική διάρκεια 1h και σε ποσότητα 1μg. Με άλλα λόγια μία μονάδα ενζυμικής ενεργότητας περιοριστικής ενδονουκλεάσης είναι η ποσότητα του ενζύμου που οδηγεί σε πλήρη πέψη ποσότητα λ DNA 1μg σε χρόνο 1h. Πρακτικά η μέτρηση των μονάδων δραστηριότητας των περιοριστικών ενζύμων γίνεται με μια διαδικασία διαδοχικών αραιώσεων του ενζυμικού παρασκευάσματος και χρήση των αραιώσεων αυτών σε αντιδράσεις πέψης. Από την διαδικασία αυτή εξάγουμε τον αριθμό των μονάδων ενζυμικής δραστηριότητας. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται μια σειρά από αραιώσεις και τα συστατικά που προστίθενται.

	1:10	1:20	1:30	1:40	1:50	1:60	1:70	1:80	1:90	1:100
H ₂ O	210	225	230	232.5	234	235	235.8	236.3	236.7	237
BSA	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
10X	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
sam.	30	15	10	7.5	6	5	4.2	3.7	3.3	3

Πίνακας 2. Πίνακας αραιώσεων που απαιτούνται για την μέτρηση μονάδων ενζυμικής δραστηριότητας της R.PspPI

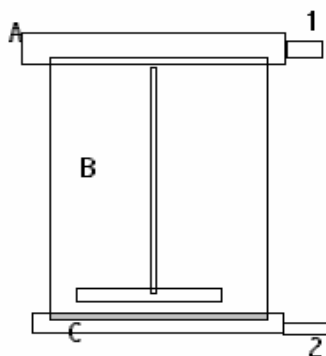
Στον παραπάνω πίνακα φαίνονται οι ποσότητες που πρέπει να προστεθούν τελικό όγκο 300μl για να έχουμε αραιώση που αναγράφεται. Αν τώρα από κάθε αραιώση πχ.1:30 χρησιμοποιήσουμε 10μl για να κάνουμε αντίδραση πέψης και διαπιστώσουμε ότι σε αυτή την δοκιμασία έχουμε πλήρη πέψη τότε αυτό το παρασκεύασμα έχει τουλάχιστον 3 units. Στην πράξη ο αριθμός των units είναι η μέγιστη αραιώση στην οποία έχουμε πλήρη πέψη. Σαν παράδειγμα έστω ότι έχουμε 30ml ενζυμικού παρασκευάσματος στο οποίο θέλουμε να μετρήσουμε τον συνολικό αριθμό των units. Κάνουμε την παραπάνω διαδικασία και έστω ότι έχουμε πλήρη πέψη μέχρι την

αραιώση 1:70. Άρα στην αντίδραση έχουμε 7 units και επειδή η αντίδραση είναι 10 φορές αραιότερη από την αραιώση που χρησιμοποιήσαμε εκείνη έχει 70 units. Πηγαίνοντας παραπάνω έχουμε ότι τα 70 units περιέχονται στα 4.2μl ενζυμικού παρασκευάσματος που προσθέσαμε και έτσι στα 4.2μl έχουμε 70 units και στα 30 ml έχουμε $(30000 \times 70) / 4.2 = 500000$ units.

Γ.8. Άλλες μέθοδοι χειρισμού του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.

Γ.8.1. Συμπύκνωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με συσκευή υπερδιήθησης

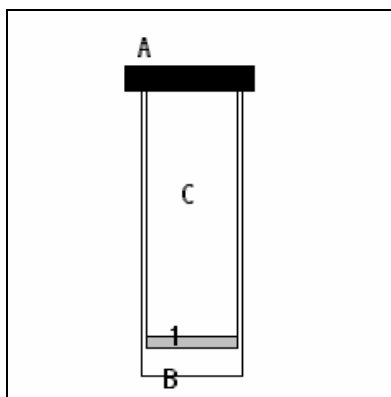
Εικ. 5 Διάγραμμα συσκευής υπερδιήθησης με μεμβράνη μοριακού αποκλεισμού



Πολλές φορές είναι αναγκαίο να συμπυκνωθεί το πρωτεϊνικό διάλυμα επειδή είναι αραιωμένο, αλλά και γιατί μερικές φορές οι μικροί όγκοι δειγμάτων είναι πιο εύκολα διαχειρίσιμοι. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται ένα σύστημα που οδηγεί σε συμπύκνωση μέσω της διαδικασίας της υπερδιήθησης.

Στο παραπάνω σχήμα φαίνεται η συσκευή υπερδιήθησης. Αυτή αποτελείται από τα στελέχη A,B,C. Στο στέλεχος C φαίνεται μια περιοχή γκρι χρώματος η οποία αντιστοιχεί σε μια μεμβράνη μοριακού αποκλεισμού, δηλαδή σε μια μεμβράνη η οποία επιτρέπει μόρια κάποιου μεγέθους να διέρχονται μέσα από αυτή και σε κάποια μεγαλύτερα να μη μπορούν. Στο στέλεχος B το οποίο είναι μία δεξαμενή τοποθετείται το διάλυμα προς συμπύκνωση. Το στέλεχος A είναι το καπάκι και διαθέτει μια είσοδο 1 από την οποία διαβιβάζεται πίεση αερίου αζώτου. Υπό την πίεση του αζώτου το διάλυμα μέσω της μεμβράνης διηθείται με αποτέλεσμα το νερό και οι συνδιαλύτες να διέρχονται από την μεμβράνη και να αποβάλλονται της συσκευής από την έξοδο 2 του στελέχους C ενώ οι πρωτεΐνες οι οποίες δεν δύνανται να διέλθουν από τους πόρους της μεμβράνης παραμένουν εντός του στελέχους B, με αποτέλεσμα να αυξάνει η

συγκέντρωση τους στο διάλυμα. Μια παραλλαγή της μεθόδου για μικρότερους όγκους φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Εικ. 6 Φυγοκεντρούμενη μονάδα υπερδιήθησης με μεμβράνη μοριακού αποκλεισμού

Στο παραπάνω σχήμα βλέπουμε μια συσκευή που αποτελείται από το καπάκι A και την δεξαμενή διαλύματος B. Στο στέλεχος C διακρίνεται μεμβράνη μοριακού αποκλεισμού. Το όλο σύστημα λειτουργεί μέσω φυγοκέντρωσης. Στην περίπτωση αυτή το υγρό δεχόμενο της δύναμη του φυγοκεντρικού πεδίου πιέζεται στην μεμβράνη 1 και υπερδιηθείται. Το διήθημα συλλέγεται στο στέλεχος C ενώ το συγκεντρωμένο διάλυμα παραμένει στην δεξαμενή B. Οι παραπάνω συσκευές διατίθενται από την Amicon με την εμπορική ονομασία Amicon flow cell για την πρώτη και Centrigrap και Centricon για την δεύτερη, με δυνατότητα επιλογής της ενεργής περιοχής της μεμβράνης σε διάφορα μεγέθη. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες μοριακού αποκλεισμού μεγέθους 10.000 dalton και 30000 dalton (Pohl, T., 1990)

Γ.8.2. Αλλαγή του διαλύτη μέσω συστήματος διαπήδησης και υπερδιήθησης

Για την αλλαγή του διαλυτικού μέσου χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες διαπήδησης Spectrapor. Η διαδικασία που ακολουθείται στην περίπτωση αυτή αναφέρεται εκτενώς στην βιβλιογραφία (Pohl, T., 1990) . Για την αλλαγή του διαλύτη με την βοήθεια συσκευής υπερδιήθησης γίνεται εκτενής αναφορά στην βιβλιογραφία (Παπανικολάου, I., 1995). Γενικά η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην διαπίστωση ότι αν κατά την συμπύκνωση ενός πρωτεϊνικού διαλύματος A έχουμε απώλεια όγκου V ενώ είχαμε ξεκινήσει από αρχικό όγκο V_0 τότε αν προστεθεί όγκος $V_1=(V_0-V)$ διαλύματος B και το διάλυμα συμπυκνωθεί μέχρι όγκου V τότε η αλλαγή του διαλύτη έχει ολοκληρωθεί σε ένα βήμα. Η μαθηματική ερμηνεία του φαινομένου αναφέρεται

στην βιβλιογραφία και δεν είναι σκόπιμο να αναφερθεί εδώ. Είναι φανερό ότι η συγκεκριμένη μεθοδολογία υπερτερεί έναντι της διαπήδησης σε ταχύτητα και προσφέρεται για βιολογικά δείγματα τα οποία είναι ευπαθή.

Δ. Αποτελέσματα

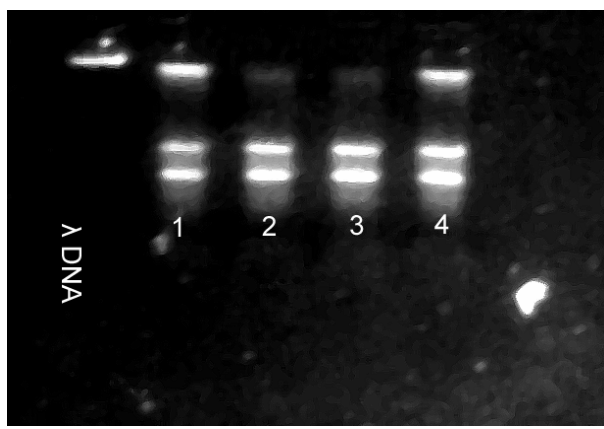
Στο τμήμα αυτό της παρούσας εργασίας παρατίθενται τα αποτελέσματα ταξινομημένα ανάλογα με τον τύπο της χρωματογραφικής ανάλυσης. Αυτός ο τρόπος παρουσίασης επιλέχθηκε διότι θεωρήθηκε σκόπιμο να σταθούμε στα επιμέρους βιοφυσικά χαρακτηριστικά της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *R.PspPI* όπως αυτά αναδεικνύονται μέσα από την χρωματογραφική ανάλυση. Επιπλέον στην προσπάθεια να καταρτιστεί ένα σχήμα καθαρισμού του μορίου το οποίο να πληρεί συγκεκριμένα χαρακτηριστικά όπως ταχύτητα και υψηλή απόδοση, δοκιμάστηκαν πολλά σχήματα και διάφορες μεθοδολογίες. Μια από τις μεγαλύτερες δυσκολίες στην προσπάθεια αυτή ήταν το γεγονός ότι η ενδονουκλεάση *R.PspPI* είναι ένα μόριο το οποίο καθαρίστηκε σε ομογένεια μόνο στην παρούσα εργασία. Αν και είχαν γίνει και άλλες απόπειρες καθαρισμού αυτές δεν αποσκοπούσαν στον βιοχημικό χαρακτηρισμό και κρυστάλλωση αλλά σε εμπορική εκμετάλλευση του ενζύμου και επομένως αν και έδιναν χρήσιμες πληροφορίες ήταν ακατάλληλες για τον στόχο της εργασίας. Επιπλέον η ενδονουκλεάση *R.PspPI* δεν έχει χαρακτηριστεί στο μοριακό επίπεδο δηλαδή δεν έχει γίνει κλωνοποίηση του γονιδίου της και η αμινοξική της αλληλουχία είναι ένα ακόμα πρόβλημα το οποίο θα κληθούμε να λύσουμε προκειμένου να προχωρήσουμε σε κρυσταλλογραφική ανάλυση. Είναι φανερό ότι η απομόνωση και ο καθαρισμός ενός ενζύμου από μια φυσική πηγή προελευσής του είναι μια δύσκολη διαδικασία με πολλά προβλήματα που πρέπει να λυθούν στην πορεία. Στις επόμενες σελίδες βρίσκεται μια περιγραφή της πορείας των πειραμάτων όπως αυτή υπαγορεύτηκε από τις ιδιότητες του μορίου όπως αυτές αναδύονταν βήμα με το βήμα μέσα από την καθημερινό πειραματισμό. Όπως θα γίνει φανερό οι ιδιότητες του μορίου δεν είναι αυτές που αναμενόταν από την μελέτη της σχετικής βιβλιογραφίας πάνω στις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, αλλά αυτό συμπεριφέρεται με έναν ειδικό τρόπο που πιθανόν να αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό όλων των ψυχρόφιλων ενζύμων όπως αναφερθηκε και στην εισαγωγή.

Δ.1. Κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία.

Δ.1.1. Κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή P11 Whatman σε pH 7.0

Αν ανατρέξει κανείς στην σχετική βιβλιογραφία για απομόνωση περιοριστικών ενδονουκλεασών (Wilson, G.A., Young, F.E., 1975, Sharp, P.A., *et al.*, 1973) θα διαπιστώσει ότι ένας από του συχνότερα χρησιμοποιούμενους προσροφητές είναι η φωσφοκυτταρίνη. Για το λόγο αυτό αλλά και γιατί η δομή της φωσφοκυτταρίνης παρουσιάζει χαρακτηριστικά που απαντώνται και στο φυσικό υπόστρωμα των πρωτεϊνών που δεσμεύονται στο DNA αποφασίστηκε η χρησιμοποίηση αυτού του υλικού.

Η προετοιμασία του υλικού και το πακετάρισμα αναφέρεται στο τμήμα των υλικών και μεθόδων. Για την εξισορρόπηση της στήλης το χρωματογραφικό υπόστρωμα πλύθηκε με 10 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος που αποτελούνταν από 10mM φωσφορικό ρυθμιστικό σύστημα $\text{Na}_2\text{HPO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_3$ pH 7.0, 10mM NaCl, 10mM MgCl_2 , 2mM DTT. Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα το οποίο βρισκόταν στις ίδιες συνθήκες φορτώθηκε στη στήλη με ταχύτητα 100ml/h και άμεσο έκλουσμα της στήλης (void) συλλέχθηκε. Ακολούθως η στήλη εκπλύθηκε με 10 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος. Ακολούθησε βαθμίδα συγκέντρωσης NaCl 200mM και το έκλουσμα της στήλης συλλέχθηκε σε κλάσματα σταθερού όγκου και δεύτερη βαθμίδωση σε 1M NaCl με την ίδια διαδικασία. Τα τρία κλάσματα που ελήφθησαν από την στήλη υποβλήθηκαν σε ενζυμική δοκιμασία και όπως φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί όλη η ενεργότητα του ενζύμου εκλύεται στο void της στήλης.



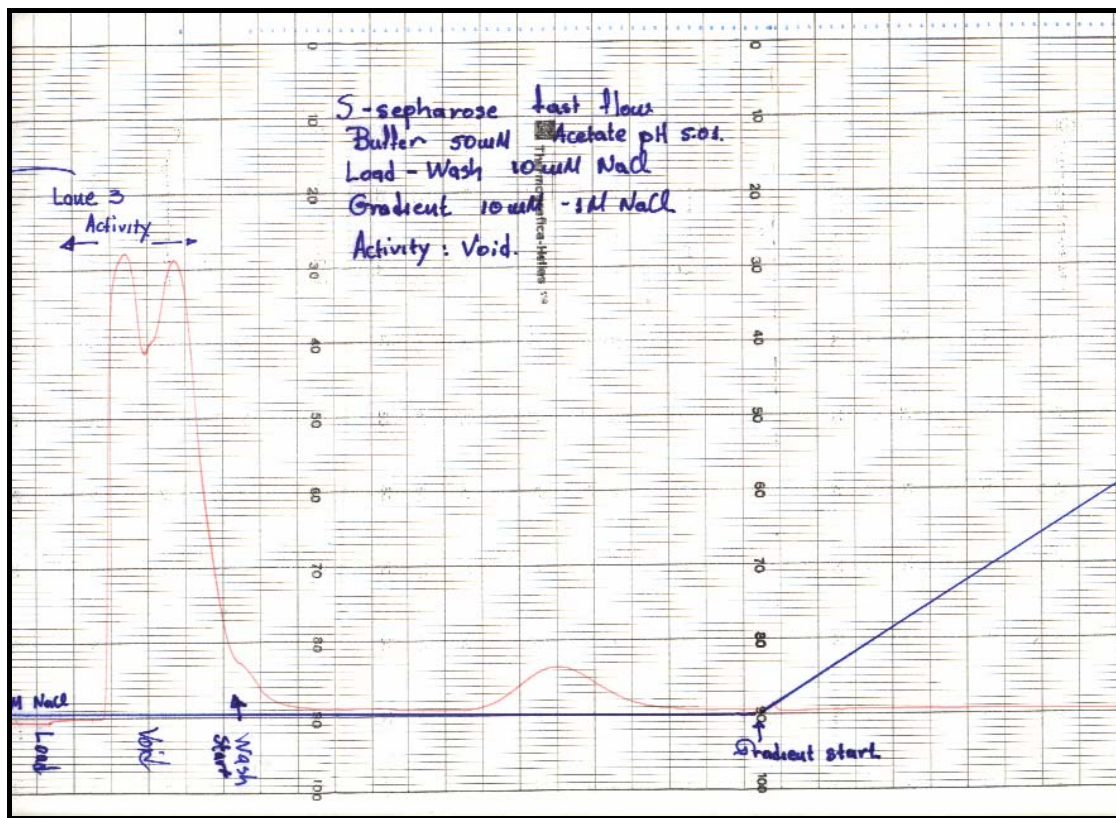
Εικ.7 Δοκιμασία ενζυμικής ενεργότητας στο κλάσμα νεκρού όγκου της στήλης. διακρίνεται πέψη του υποστρώματος

Στο ακόλουθο σχήμα φαίνεται η καταγραφή της οπτικής πυκνότητας στο έκλουσμα της στήλης στα 254nm. Από το σχήμα είναι φανερό ότι υπάρχει μια μαζική έκλυση στο void ενώ στα επομένα βήματα η οπτική πυκνότητα είναι κοντά στο επίπεδο αναφοράς. Το παραπάνω στοιχείο αποτέλεσε μια πρώτη ένδειξη ότι η ενδονουκλεάση *R.PspPI* είναι στην ουδέτερη περιοχή του pH αρνητικά φορτισμένη και το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για ένα μεγάλο αριθμό των πρωτεϊνών του βακτηρίου *Psychrobacter sp.* Αν και αυτό φαίνεται σαν μια απλή διαπίστωση ήταν η πρώτη γέυση από ένα μείζον πρόβλημα που εμφανίστηκε στην συνέχεια και έπρεπε να υπερπηδηθεί.

Δ.1.2. Κατιοντοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή S sepharose fast flow σε pH5.01

Στο επόμενο βήμα αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί χρωματογραφικό υπόστρωμα S sepharose fast flow. Τα τεχνικά χαρακτηριστικά του και οι ενεργές ομάδες φαίνονται στο πίνακα 1 στο τμήμα Β της διατριβής. Το χρωματογραφικό υπόστρωμα εξισσοροπήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα 50mM acetate pH 5.01, 10mM NaCl, 10mM MgCl₂, 2mM DTT. Οπως και παραπάνω το πρωτεϊνικό εκχύλισμα που βρισκόταν στο παραπάνω διάλυμα φορτώθηκε στην στήλη και συλλέχθηκε το αρχικό έκλουσμα (void). Στην συνέχεια το χρωματογραφικό υπόστρωμα πλύθηκε με 10 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος έως ότου η οπτική πυκνότητα να πέσει στο επίπεδο αναφοράς. Ακολούθησε βαθμίδωση (gradient) συγκέντρωσης NaCl από 10mM έως 1M και συλλέχθηκαν κλάσματα σταθερού όγκου. Τόσο στο αρχικό έκλουσμα όσο και στα κλάσματα της βαθμίδωσης έγιναν ενζυμικές δοκιμασίες. Η ενεργότητα της περιοριστικής ενδονουκλεάσης εκλύεται όλη στο void της στήλης πράγμα που υποδηλώνει ότι η ενδονουκλεάση εξακολουθεί να είναι αρνητικά φορτισμένη σε αυτή την τιμή του pH.

Στο ακόλουθο σχήμα φαίνεται η καταγραφή της οπτικής πυκνότητας στο έκλουσμα της στήλης. Φανερή είναι η ομοιότητα με την καταγραφή που φαίνεται στην προηγούμενη παράγραφο.



Εικ.8 Καταγραφή της οπτικής πυκνότητας από στήλη κατιοανταλλαγής S sepharose fast flow.

Δ.1.3. Κατιοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή S sepharose fast flow σε pH4.5

Σύμφωνα με την θεωρία των ιοντοανταλλακών ένα μόριο συνδέεται με κατιοανταλλάκτη μια μονάδα του pH κάτω από το pI του και σε ανιοανταλλάκτη μια μονάδα πάνω από αυτό. Σύμφωνα με αυτό αποφασίστηκε να επιχειρήσουμε μια κάθοδο στο pH στο 4.5 με την ελπίδα ότι σε μια τέτοια τιμή του pH η *R.PspPI* θα μπορούσε να συνδεθεί με κατιοανταλλακτική στήλη. Έτσι ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία με μόνη αλλαγή του pH στο 4.5. Πάλι η ενεργότητα εκλύεται στο void της στήλης.

Δ.1.4. Συμπεράσματα από την κατιοανταλλακτική χρωματογραφία.

Από τα παραπάνω έγινα κατανοητά μερικά πράγματα γύρω από τις ηλεκτρικές ιδιότητες της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *R.PspPI*

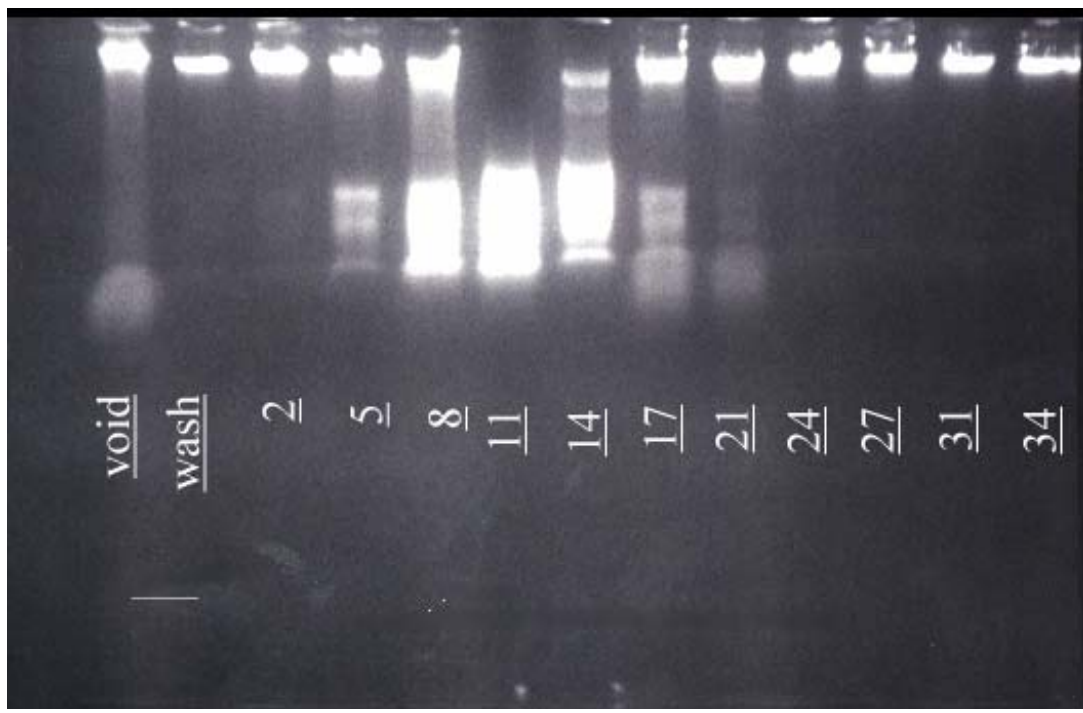
1. Το μόριο αυτό εμφανίζει έντονο αρνητικό φορτίο σε περιοχές του pH από 4.5 και πάνω. Η αδυναμία σύνδεσης του με κατιοανταλάκτες τόσο μέτριας ισχύος (P11) όσο και ισχυρούς (S sepharose) σε αυτές τις τιμές του pH μπορεί να οφείλεται είτε ότι το pI της βρίσκεται εντός της περιοχής 4.0-5.0 είτε η συμπεριφορά της να επηρεάζεται από ιοντικές αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια με τα οποία συνυπάρχει στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Πρέπει εδώ να τονισθεί ότι όλες οι παραπάνω δοκιμασίες έγιναν σα πρώτο στάδιο καθαρισμού στο αρχικό εκχύλισμα του βακτηρίου όπως αυτό λαμβάνεται μετά από την φυγοκέντρηση (Υλικά και μεθοδοι).
2. Όπως και να έχει το πράγμα και όπως αποδείχθηκε στην συνέχεια το μόριο αυτό είναι πράγματι αρκετά όξινο με pI πολύ χαμηλό.
3. Με την ελάτωση του pH παρατηρήθηκε ότι η απώλεια της ενζυμικής ενεργότητας αυξάνεται δραματικά με αποτέλεσμα εντός λίγων ωρών παραμονής σε όξινο περιβάλλον να μην είναι δυνατή η ανίχνευση της ενζυμικής ενεργότητας της *R.PspPI*.

Έτσι με βάση τα παραπάνω αποφασίστηκε να στραφεί η μελέτη σε άλλη κατεύθυνση. Επίσης από τα πρώιμα αποτελέσματα φάνηκε μια βασική διαφορά της *R.PspPI* από έν άλλο περιοριστικό ένζυμο την *R.PvuII* που αποτέλεσε και αποτελεί ακόμα ερευνητικό αντικείμενο του εργαστηρίου κρυσταλλογραφίας.

Δ.2. Ανιοανταλλακτική χρωματογραφία

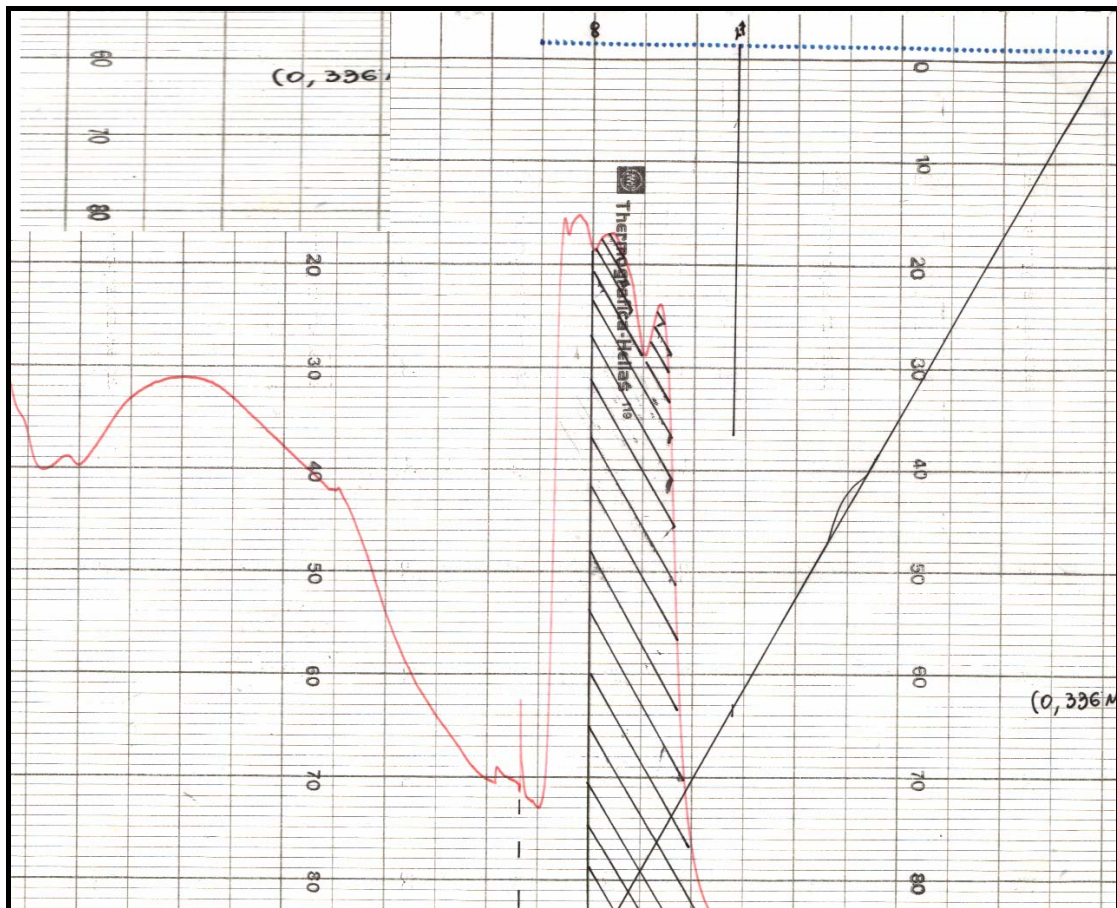
Δ.2.1. Ανιοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή DEAE-sephacel, pH 7.4

Για την διεξαγωγή αυτών των δοκιμασιών χρησιμοποιήθηκε προσροφητής DEAE-sephacel. Οι ενεργές ομάδες και η προετοιμασία του υλικού αναλύεται στο τμήμα των υλικών και μεθόδων και στον πίνακα 1 του Μέρους Β. Για την εξισσορόπηση του υλικού χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα A:20mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM NaCl, 10mM MgCl₂, 2mM DTT. Το πρωτεϊνικό διάλυμα φορτώθηκε στη στήλη με ταχύτητα 1.0 ml/min και στην συνέχεια ακολούθησε έκπλυση της στήλης με 20 όγκους από το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Στην συνέχεια πραγματοποιείται βαθμίδωση συγκέντρωσης άλατος (NaCl) από 10mM→1M, και συλλέγονται κλάσματα σταθερού όγκου. Στην επόμενη εικόνα φαίνεται ενζυμική δοκιμασία για την ανίχνευση της ενεργότητας της *R.Psp*PI.



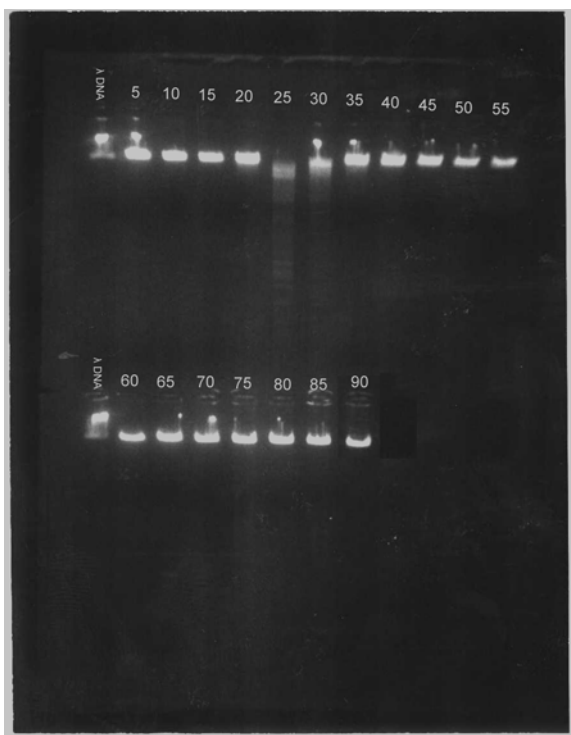
Εικ.9 Δοκιμασία ενζυμικής ενεργότητας σε κλάσματα από ανιοανταλλακτική στήλη DEAE-sephacel

Στο επόμενο σχήμα φαίνεται η καταγραφή της οπτικής πυκνότητας στα 254nm



Εικ.10 Καταγραφή της οπτικής πυκνότητας στα 254nm από ανιοανταλλακτική στήλη DEAE-sephacel.

Δ.2.2. Ανιοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή Q sepharose fast flow pH 7.4

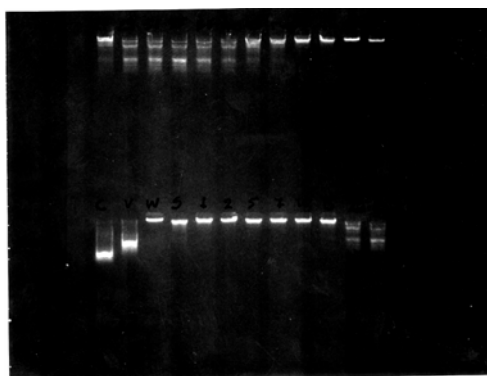


Η ανιοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή Q sepharose fast flow παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα επειδή ο προσροφητής αυτός είναι ισχυρός ιοντοανταλλάκτης, έχει μεγάλη χωρητικότητα, και λειτουργεί σε υψηλές ταχύτητες ροής. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε κατά κόρον σε διάφορες συνθήκες κατά την μελέτη της συμπεριφοράς της *R.PspPI* σε ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία. Όπως ήταν αναμενόμενο και όπως μπορεί να συμπεράνει κανείς από τα παραπάνω η *R.PspPI* παρουσιάζει

ισχυρή πρόσδεση σε ανιοανταλλάκτη Q sepharose σε pH 7.4. Οι ιονικές συνθήκες ήταν. Αρχικό διάλυμα (A) 20mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM NaCl, 10mM MgCl₂, 2mM DTT. Τελικό διάλυμα (B) 20mM Tris-HCl pH 7.4, 1M NaCl, 10mM MgCl₂, 2mM DTT. Βαθμίδωση 0-100%B.

Εικ. 11 Ενζυμική δοκιμασία σε κλάσματα βαθμίδωσης από ανιοανταλλακτική στήλη Q sepharose fast flow. Εκλούση της ενεργότητας παρατηρείται στα κλάσματα 25-30.

Δ.2.3. Ανιοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή Q sepharose fast flow pH 8.2



Για την πραγματοποίηση αυτής της σειράς των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris-HCl pH 8.2. Η μεθοδολογία αναπτύχθηκε σε δύο στάδια.

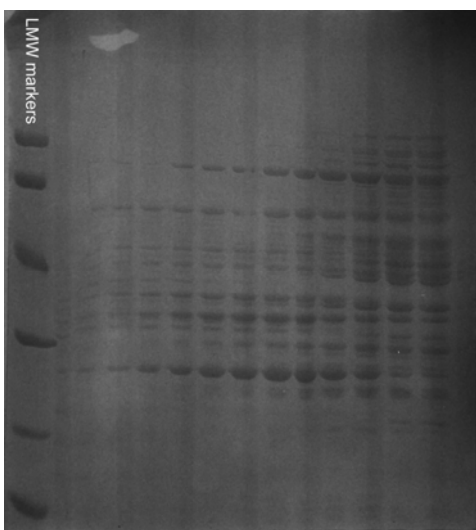
Εικ.12 Ενζυμική δοκιμασία ενεργότητας περιορισμού στα κλάσματα από ανιοανταλλακτική στήλη Q sepharose. Οι συνθήκες αναφέρονται στο κείμενο.

Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκαν πειραματικές εκλούσεις του ενζύμου από την στήλη με χρήση βαθμίδωσης από 10mM→1M NaCl και αφού

εντοπίστηκε η περιοχή έκλυσης της *R.PspPI* τότε η μεθοδολογία τροποποιήθηκε ως εξής. Αρχικά το πρωτεϊνικό διάλυμα φορτώνεται στην στήλη με διάλυμα A: 20mM Tris-HCl pH 8.2, 10mM NaCl, 10mM MgCl₂, 2mM DTT και το void της στήλης παραλαμβάνεται και ελέγχεται. Στην συνέχεια πραγματοποιείται βαθμίδα έκλυσης NaCl 100mM και το έκλουσμα παραλαμβάνεται και ελέγχεται. Κατόπιν τούτου πραγματοποιείται βαθμίδωση συγκέντρωσης NaCl από 100mM→400mM.

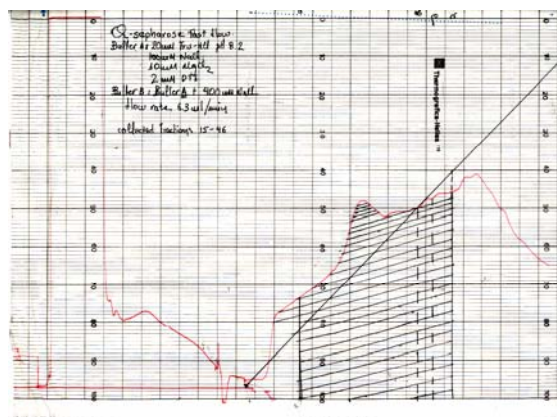
Τα κλάσματα που βρέθηκαν να διαθέτουν ενεργότητα περιοριστικής ενδονουκλεάσης *R.PspPI* ελέγχθησαν για το βαθμό καθαρότητας τους με ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE περιεκτικότητας 10%.

Στην επόμενη εικόνα φαίνεται η καταγραφή της οπτικής πυκνότητας στα 254nm στο έκλουσμα της στήλης. Η περιοχή έκλυσης της ενεργότητας φαίνεται



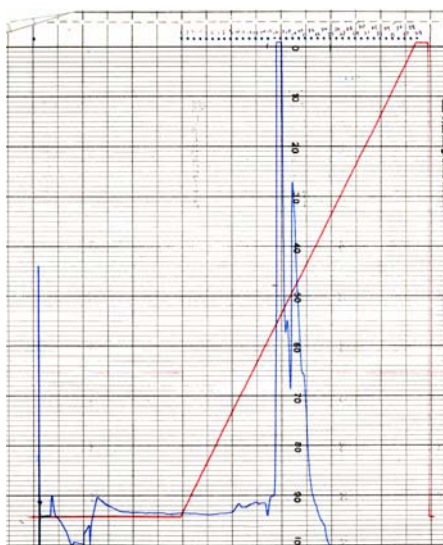
Εικ.13 Χρώση Coomassie Brilliant Blue R250 σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδιου 10%. Στην πρώτη αριστερά θέση φαίνονται δείκτες χαμηλού μοριακού βάρους σε κλίμακα από πάνω 93kd, 67kd, 43kd, 30kd, 20kd, 14.4kd

γραμμοσκιασμένη.



Εικ.14 Καταγραφή της οπτικής πυκνότητας στα 254nm στο έκλουσμα ανιοανταλλακτική στήλης Q sepharose fast flow. Με κόκκινο σημειώνεται η οπτική πυκνότητα

Δ.2.4. Ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία σε προσροφητή MonoQ pH 7.4
 Μεταξύ άλλων δοκιμάστηκε και ο προσροφητής MonoQ ο οποίος διατίθεται προπακεταρισμένος σε στήλες. Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκε στήλη MonoQ HR 10/10. Η στήλη εξισορροπείται με διάλυμα A: 20mM Tris-HCl pH 7.4, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 2mM β-mercaptoethanol. Το πρωτεϊνικό δείγμα με ενεργότητα περιορισμού προέρχεται από χρωματογραφία σε Q fast flow στις συνθήκες που αναφέρονται παραπάνω. Η εφαρμογή του δείγματος γίνεται μέσω supeloop των 50ml. Μετά την εφαρμογή του δείγματος ακολουθεί έκπλυση της

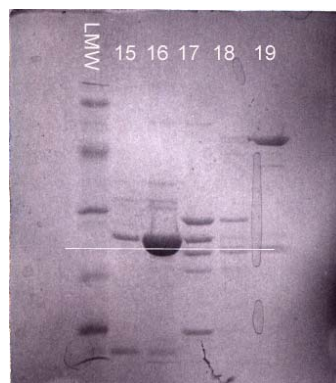


στήλης με 10 όγκους διαλύματος A και στην συνέχεια εφαρμόζεται βαθμίδωση συγκέντρωσης NaCl από 100mM→500mM (10 όγκοι). Κλάσματα σταθερού όγκου (2ml) συλλέγονται ενώ η οπτική πυκνότητα στο έκλουσμα της στήλης παρακολουθείται στα 254nm. Στην εικόνα που ακολουθεί φαίνεται η καταγραφή της οπτικής πυκνότητας. Η διεξαγωγή του πειράματος έγινε σε σύστημα FPLC (Pharmacia).

Εικ.15 Καταγραφή από στήλη MonoQ. Με μπλέ σημειώνεται η οπτική πυκνότητα, με κόκκινο η υπολογισμένη βαθμίδωση. Είναι φανερή η κορυφή στα κλάσματα 15-19 στα οποία και εκλύεται η ενεργότητα της *R.PspPI*.

Στην επόμενη εικόνα φαίνεται η ανάλυση των ενεργών κλασμάτων σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμιδίου περιεκτικότητας 10%. Με την άσπρη γραμμή σημειώνεται το πολυπεπίδιο που θεωρείται ότι είναι το μονομερές της *R.PspPI*. Το πολυπεπίδιο αυτό

εστιάζεται μεταξύ 30-20kd. Από τα θεωρητικώς αναμενόμενα το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τα γνωστά για τα περιοριστικά ένζυμα (Wilson, G.G., 1988).



Εικ.16 Χρώση Coomassie Blue σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμιδίου

Δ.3.Χρωματογραφία σε υδροφοβικό προσροφητή Phenyl sepharose fast flow(high sub)

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή η χρωματογραφία υδροφοβικών αντεπιδράσεων είναι μια σχετικά νέα μέθοδος χρωματογραφικής ανάλυσης που παρόλα αυτά όμως έχει βρεί πολλές εφαρμογές στον καθαρισμό και απομόνωση βιομορίων. Η αρχή της μεθόδου περιγράφετε στο τμήμα των υλικών και μεθόδων και δεν θα αναφερθεί εδώ. Το χρωματογραφικό υπόστρωμα Phenyl sepharose fast flow(high sub) χρησιμοποιήθηκε διότι ικανοποιεί τις απαιτήσεις που διατυπώθηκαν παραπάνω στο τμήμα της ανιοανταλλακτικής χρωματογραφίας. Σαν κατακρημνιστικός παράγων χρησιμοποιήθηκε τόσο θειϊκό αμμώνιο $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, αλλά και NaCl. Γενικά στα τεχνικά εγχειρίδια της κατασκευάστριας εταιρίας αναφέρεται ότι είναι δυνατό να υπάρχουν περιπτώσεις βιομορίων τα οποία κατά την σύνδεσή τους με το χρωματογραφικό υπόστρωμα να αναπτύσουν τόσο ισχυρή αλληλεπίδραση με τις ενεργές ομάδες της στήλης ώστε να είναι αδύνατο να εκλουστούν από την στήλη με απλή μείωση της ιονικής ισχύος, αλλά απαιτούν την χρήση διαλυμάτων μειωτών ιοντικής ισχύος όπως οι διάφορες πολυεθυλένο γλυκόλες (PEG) καθώς και σε ορισμένες περιπτώσεις και νερού. Αυτό το φαινόμενο έχει μελετηθεί εκτενώς (Παπανικολάου, I., 1995) και έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία μειωτών ιοντικής ισχύος επηρεάζει την διαλυτότητα των βιομορίων σε μεγάλο βαθμό. Συγκεκριμένα αποδείχθηκε πειραματικά σε διάφορα βιομόρια όπως ριβονουκλεάση A, χυμοθρυψινογόνο κ.α. ότι η παρουσία εντός του ηλεκτρολυτικού διαλύματος μειωτή ιοντικής ισχύος οδηγεί σε περιπτώσεις υδρόφοβης χρωματογραφίας σε έκλυση του βιομορίου σε υψηλότερη φαινόμενη ιονική ισχύ από ότι θα εκλούονταν χωρίς τον μειωτή. Αυτό το φαινόμενο παρατηρήθηκε και χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση της R.PspPI.

Αν πρωτεϊνικό δείγμα με ενεργότητα *R.PspPI* εφαρμοστεί σε στήλη Phenyl sepharose fast flow (high sub) σε διάλυμα (A): 20mM Tris-HCl pH 7.4 , 0.5M (NH₄)₂SO₄, 10mM MgCl₂, 2mM DTT, τότε παρατηρείται ότι όλη η ενεργότητα της *R.PspPI* κατακρατείται από την στήλη. Αν στην συνέχεια εφαρμοστεί βαθμίδωση 10 όγκων στήλης μέχρι 0M (NH₄)₂SO₄, τότε βλέπουμε ότι η ενεργότητα αρχίζει να εκλύεται

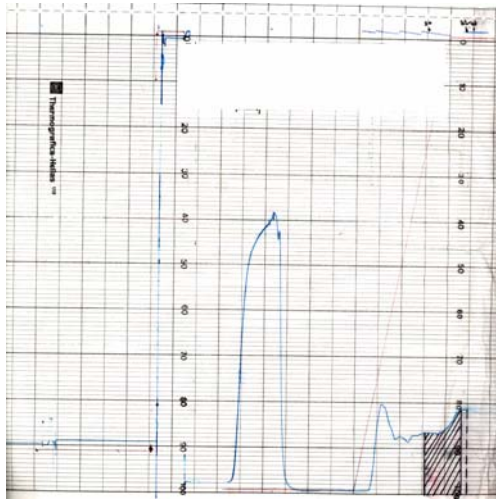


αφού έχουν περάσει από την στήλη 1-2 όγκοι διαλύματος (B): 20mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM MgCl₂, 2mM DTT και η έκλυση της ενεργότητας συνεχίζει μέχρι και την συλλογή του τελευταίου κλάσματος. Αν στην συνέχεια η στήλη εκπλυθεί με διάλυμα B+15%v/v PEG 200 τότε διαπιστώνεται ότι όλη η ενεργότητα εκλύεται μόνο σε αυτή την περίπτωση. Αν και το παραπάνω υποδηλώνει συγκεκριμένα βιοφυσικά χαρακτηριστικά για το βιομόριο που μελετάμε αυτά δεν θα συζητηθούν εδώ.

Εικ.17 Ενζυμική δοκιμασία σε κλάσματα από στήλη Phenyl sepharose fast flow. Ενεργά κλάσματα 32-42

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα βιβλιογραφικά στοιχεία συμφωνούν με τα πειραματικά δεδομένα η παραπάνω χρωματογραφική ανάλυση τροποποιήθηκε ως εξής: Διάλυμα A: : 20mM Tris-HCl pH 7.4 , 0.5M (NH₄)₂SO₄, 10mM MgCl₂, 2mM DTT , Διάλυμα B: : 20mM Tris-HCl pH 7.4 , 15% v/v PEG 2000, 10mM MgCl₂, 2mM DTT. Το δείγμα που βρίσκεται σε διάλυμα A εφαρμόζεται στην στήλη και ακολουθεί έκπλυση με 10 όγκους διαλύματος A. Ακολουθεί βαθμίδωση 0→100%B 10 όγκων στήλης και συλλέγονται κλάσματα σταθερού όγκου.

Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται ότι με την χρήση διπλής βαθμίδωσης επιτεύχθει η έκλουση του βιομορίου σε φαινόμενη ιοντική ισχύ μεγαλύτερη από ότι αναμένονταν. Στην επόμενη εικόνα φαίνεται η καταγραφή της οπτικής πυκνότητας στο έκλουσμα της στήλης.

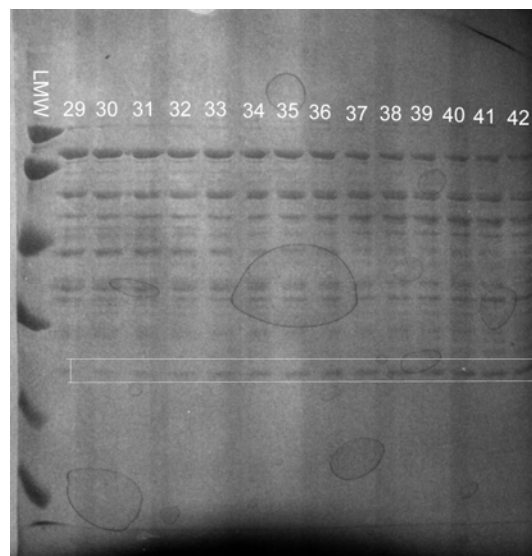


Εικ.18 Καταγραφή οπτικής πυκνότητας στα 254 nm

Με την γραμμοσκίαση σημειώνεται η περιοχή έκλουσης του ενζύμου. Με μπλέ σημειώνεται η οπτική πυκνότητα και με κόκκινο η βαθμίδωση. Τα ενεργά κλάσματα ελέγχθησαν για την καθαρότητα τους με ηλεκτροφόρηση. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα που ακολουθεί.

Εικ.19 Χρώση Coomassie Blue σε αποδιατακτικό πήκτωμα 10% ακρυλαμίδης. Με την λευκή γραμμή σημειώνεται το πολυπεπίδιο που ενδιαφέρει

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν μια ισχυρή ένδειξη για την ορθότητα της θεωρίας του ρόλου των μειωτών ιοντικής ισχύος μια και το βιομόριο που χρησιμοποιήθηκε δεν είναι κατά καμία έννοια πρότυπη πρωτεΐνη όπως αυτές που

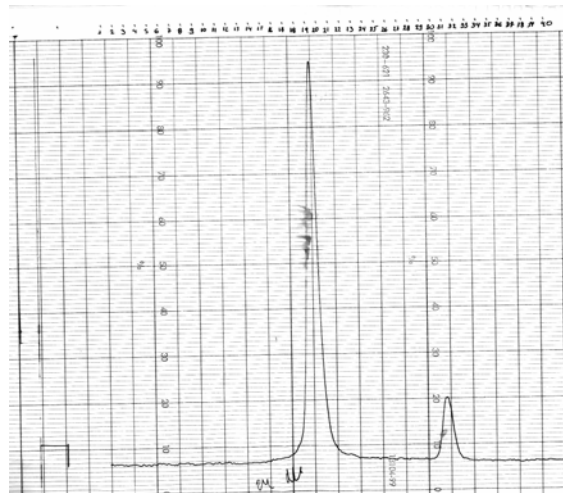


αναφέρθηκαν παραπάνω. Εκτός από το θειϊκό αμμώνιο χρησιμοποιήθηκε και NaCl σε διάφορες συγκεντρώσεις. Δυστυχώς τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών είναι μη ερμηνεύσιμα αφού φαίνεται ότι σε αρχική συγκέντρωση 1M NaCl το βιομόριο δεσμεύεται σε στήλη Phenyl sepharose, αλλά η έκλουση του είναι αδύνατο αν παρατηρηθεί ούτε ακόμα και παρουσία 20% v/v PEG 2000, είτε εξαιτίας απώλειας της ενζυμικής ενεργότητας για κάποια αδιευκρίνιστη μέχρι στιγμής αιτία, είτε εξαιτίας πολύ ισχυρής δέσμευσης στην στήλη που δεν μπορεί να ανταγωνιστεί η δεδομένη συγκέντρωση μειωτή. Δυστυχώς η αύξηση της συγκέντρωσης του μειωτή

δεν είναι δυνατή διότι παρουσιάζονται προβλήματα λειτουργίας της στήλης αλλά και απομάκρυνσης του μειωτή. Για την εξήγηση των φαινομένων που παρατηρούνται ο αναγνώστης θα πρέπει να ανατρέξει στην σχετική βιβλιογραφία (Shaltiel, S., 1984). Εδώ αρκεί να τονίσουμε το γεγονός ότι είναι δυνατόν η φύση των αντεπιδράσεων που αναπτύσσονται μέσα σε υδρόφοβες στήλες μπορεί να μην είναι υδρόφοβες αλλά πολικές μεταξύ του σκελετού της στήλης και των ομάδων του βιομορίου. Ο υπερτονισμός των πολικών χαρακτήρων των επιφανειακών αμινοξικών καταλοίπων από συνθήκες υψηλής ιονικής ισχύος είναι κάτι το οποίο απομένει να διερευνηθεί σε μεγαλύτερο βάθος και ίσως μας δώσει σαφέστερη εικόνα για την συμπεριφορά των βιομορίων στην “υδρόφοβη” χρωματογραφία.

Δ.4. Χρωματογραφία διήθησης πηκτώματος (Gel filtration)

Χρησιμοποιήθηκε προσροφητής Superdex 200 HR 10/30 ο οποίος εξισορροπείται με διάλυμα 20mM Tris-HCl pH 7.4, 200mM NaCl, ταχύτητα ροής 0.8ml/min. Στην εικόνα φαίνεται η καταγραφή της οπτικής πυκνότητας στο έκλουσμα της στήλης.



Εικ. 20 Καταγραφή της οπτικής πυκνότητας στα 254nm σε στήλη Superdex 200 HR 10/30

Δ.5. Το τελικό σχήμα καθαρισμού της ενδονουκλεάσης R.PspPI

Στο τμήμα αυτό θα παρουσιαστεί το τελικό σχήμα καθαρισμού της ενδονουκλεάσης R.PspPI όπως αυτή διαμορφώθηκε μέσα από το συνεχή πειραματισμό. Όπως θα διαπιστώσει και ο αναγνώστης καταβλήθηκε προσπάθεια να χρησιμοποιηθούν τεχνικές και συντομεύσεις στην πειραματική διαδικασία απαραίτητες για να διαφυλαχθεί το μόριο από πολυήμερη παραμονή και απώλεια της ενζυμικής του ενεργότητας. Για το σκοπό αυτό οι ιδιότητες των χρωματογραφικών υποστρωμάτων

χρησιμοποιήθηκαν στο έπακρο και έγινε λογικός σχεδιασμός των βημάτων για ταχύτητα και συμπληρωματικότητα.

Δ.5.1. Λύση των κυττάρων

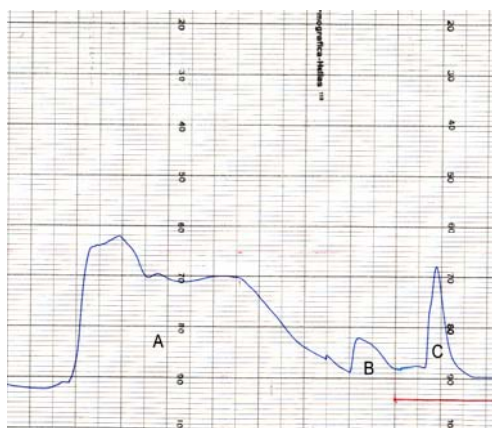
α) Στην βακτηριακή πάστα η οποία έχει προηγουμένως αποψυχθεί στους 4 βαθμούς προστίθονται γλυκερόλη 100% σε αναλογία 280μl/g, δ/μα 10% v/v Triton X-100 σε αναλογία 20μl/g και β-μερκαπτοαιθανόλη 2,4μl/g. Το μίγμα αφήνεται σε ισχυρή ανάδευση για 30 min περίπου.

β) Στην συνέχεια προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα 20mM Tris-HCl pH 7,4 , 1mM EDTA, 0,3mg/ml chicken egg white lysozyme (Sigma), όγκου διπλάσιου του βάρους των κυττάρων και αφήνεται υπό ισχυρή ανάδευση για 30 min περίπου. Μετά το πέρας του ορίου των 30 min παρατηρείται μια αύξηση του ιξώδους του διαλύματος και αλλαγή του χρώματος.

γ) Στην συνέχεια προστίθεται $MgCl_2$ σε τελική συγκέντρωση 10mM και 70μg Dnase I (Bovine pancreas Sigma) και το μίγμα αφήνεται να επωαστεί για 15 min περίπου. Αμα τη προσθήκη της δεσόξυριβονουκλεάσης παρατηρείται αλλαγή του ιξώδους και το μίγμα καθίσταται υδαρές και μπορούμε να το χειριστούμε εύκολα. Ακολούθως προστίθεται μίγμα αναστολέων πρωτεασών PMSF, Leupeptin, Benzamidine σε τελική συγκέντρωση 1mM. Το διάλυμα υπερφυγοκεντρείται στις 40000rpm με τον 60Ti ρότορα της υπερφυγοκέντρου για 60 min και το υπερκείμενο φυλάσσεται για τα επόμενα στάδια.

Δ.5.2. Προετοιμασία του δείγματος και χρωματογραφία σε ανιοντοανταλλακτική στήλη Q sepharose fast flow.

Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα που παραλαμβάνεται από το παραπάνω στάδιο υποβάλλεται σε ρύθμιση του pH με προσθήκη διαλύτος NaOH στην τιμή 8.2, και στην συνέχεια



Εικ.21 Καταγραφή της οπτικής πυκνότητας στα 254nm σε στήλη Q sepharose fast flow. A,B,C, βαθμίδες συγκέντρωσης

κορένεται με NaCl μέχρι συγκέντρωση 50mM με προσθήκη υγρού διαλύματος 5M

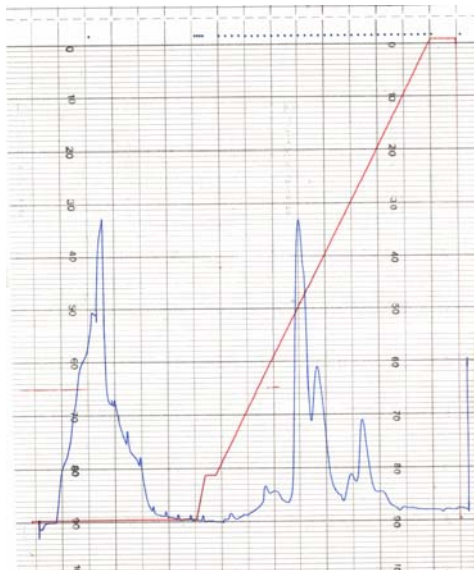
NaCl. Το δείγμα στην συνέχεια εφαρμόζεται σε στήλη Q sepharose fast flow, όγκου 60 ml που προηγουμένως έχει εξισορροπηθεί με διάλυμα A: 20mM Tris-HCl pH 8.2, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 2mM.

Παραλαμβάνεται το void και η στήλη εκπλύνεται με 10 όγκους χρωματογραφικού υλικού διαλύματος A. Στην συνέχεια πραγματοποιείται βαθμίδα (step) συγκέντρωσης με διάλυμα B: 20mM Tris-HCl pH 8.2, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 2mM β-mercaptoethanol και το έκλουσμα της στήλης συλλέγεται και φυλάσσεται. Ακολούθως πραγματοποιείται δεύτερη βαθμίδα συγκέντρωσης με διάλυμα C: 20mM Tris-HCl pH 8.2, 250mM NaCl, 10mM MgCl₂, 2mM β-mercaptoethanol. Το έκλουσμα της στήλης συλλέγεται. Τα κλάσματα της στήλης ελέγχονται και διαπιστώνεται ότι όλη η ενζυμική ενεργότητα εκλύεται στα 250mM NaCl. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται καταγραφή της οπτικής πυκνότητας στο έκλουσμα της στήλης.

Δ.5.3. Προετοιμασία και χρωματογραφία σε προσροφητή Blue sepharose fast flow

Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα υποβάλεται σε διαδικασία αλλαγής διαλύματος με την διαδικασία της διαλυτοδιαπήδησης έναντι διαλύματος D: 20mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM NaCl, 10mM MgCl₂, 2mM β-mercaptoethanol. Η διαδικασία περιγράφεται στο τμήμα Υλικών και Μεθόδων. Μετά την αλλαγή του διαλύτη το δείγμα εφαρμόζεται σε στήλη Blue sepharose fast flow όγκου 60ml και το void της στήλης συλλέγεται όπου και διαπιστώνεται ότι η ενεργότητα εκλύεται εκεί. Το βήμα αυτό είναι σημαντικό διότι σε αυτό το στάδιο απομακρύνεται η Dnase I που έχει παραμείνει στο δείγμα από το στάδιο της εκχύλισης των κυττάρων. Το πρωτεϊνικό διάλυμα με την ενεργότητα συμπυκνώνεται στο μισό όγκο με συσκευή υπερδιήθησης Amicon με την χρήση μεμβράνης μοριακού αποκλεισμού PK10(Amicon).

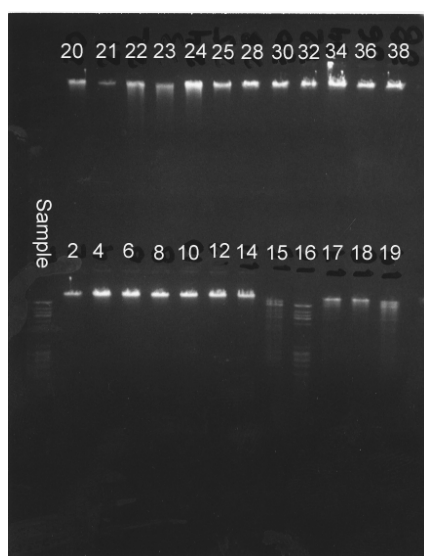
Δ.5.4. Προετοιμασία και χρωματογραφία σε στήλη MonoQ HR 10/10 pH 7.4



Το πρωτεϊνικό διάλυμα κορένεται μέχρι 100mM NaCl λαμβάνοντας υπόψη την αρχική του συγκέντρωση και εφαρμόζεται στην στήλη που προηγουμένως έχει εξισορροπηθεί με διάλυμα E: 20mM Tris-HCl pH 7.4, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 2mM β-mercaptoethanol. Η εφαρμογή του δείγματος γίνεται μέσω supelloop των 50ml.

Εικ.22 Καταγραφή της οπτικής πυκνότητας στα 254nm από στήλη MonoQ

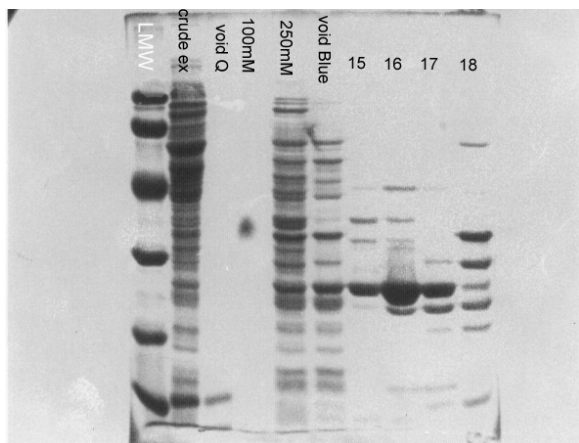
Μετά την εφαρμογή του δείγματος ακολουθεί έκπλυση της στήλης με 10 όγκους διαλύματος E και στην συνέχεια εφαρμόζεται βαθμίδωση συγκέντρωσης NaCl από 100mM→500mM (10 όγκοι). Κλάσματα σταθερού όγκου (2ml) συλλέγονται ενώ η οπτική πυκνότητα στο έκλουσμα της στήλης



παρακολουθείται στα 254nm. Στην εικόνα που ακολουθεί φαίνεται η καταγραφή της οπτικής πυκνότητας. Η διεξαγωγή του πειράματος έγινε σε σύστημα FPLC (Pharmacia). Στην εικόνα φαίνεται το διάγραμμα έκλουσης από την στήλη. Στην επόμενη εικόνα φαίνεται τα αποτελέσματα της ενζυμικής δοκιμασίας από τα κλάσματα της στήλης.

Εικ.23 Ενζυμική δοκιμασία. Παρατηρείται πλήρης πέψη μόνο στο κλάσμα 16

Όπως φαίνεται από την εικόνα το μέγιστο της ενεργότητας εστιάζεται στο κλάσμα 16 στο οποίο έχουμε πλήρη πέψη του υποστρώματος. Στην επόμενη εικόνα φαίνεται η ηλεκτροφορητική ανάλυση όλων των σταδίων που αναφέρθηκαν μέχρι εδώ, καθώς και των ενεργών κλασμάτων από την MonoQ.

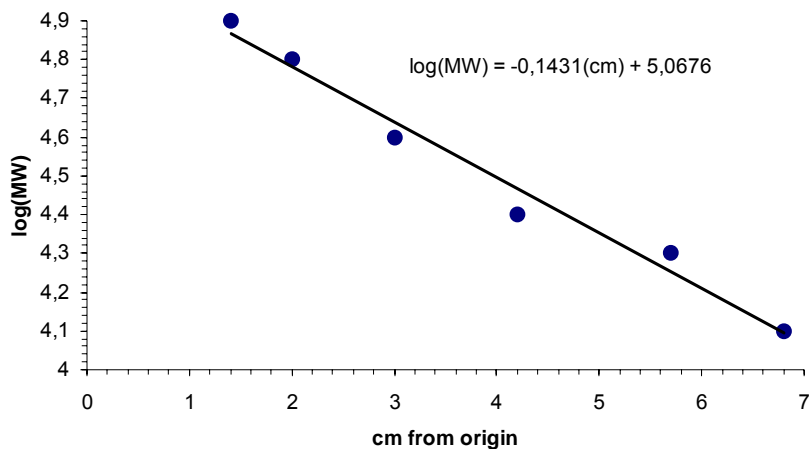


Εικ.24 Χρώση Coomassie Blue σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης 10%

Όπως φαίνεται και στην διπλανή εικόνα το κλάσμα 16 εστιάζει σχεδόν όλη την ποσότητα του ενζύμου και είναι σε ικανοποιητικό βαθμό καθαρότητας. Για το λόγο αυτό μόνο αυτό το κλάσμα συλλέγεται για τις

περαιτέρω εργασίες.

Ακολουθεί ο πίνακας καθαρισμού που κατασκευάστηκε με βάση τα στοιχεία από την παραπάνω διαδικασία. Η αρχική ποσότητα πάστα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 24,92 g. Από την ανάλυση του πηκτώματος έγινε υπολογισμός του μοριακού βάρους του υποψήφιου πολυπεπτιδίου. Στην παρακάτω εικόνα παρατίθεται γραφική παράσταση του λογαρίθμου του μοριακού βάρους σε συνάρτηση με την απόσταση από την αρχή της ηλεκτροφόρησης.



Εικ.25 Γραφική παράσταση του λογαρίθμου του μοριακού βάρους συναρτήση της απόστασης. Η εξίσωση είναι η άριστη ευθεία. Η απόσταση του πολυπεπτιδίου που μας ενδιαφέρει είναι 4.8 cm

Από την εξίσωση υπολογίζεται το μοριακό βάρος της R.PspI σε αποδιατακτικό πηκτωμα σε 24028 dalton και αναμενόμενο φυσικό μοριακό βάρος 48056 dalton.

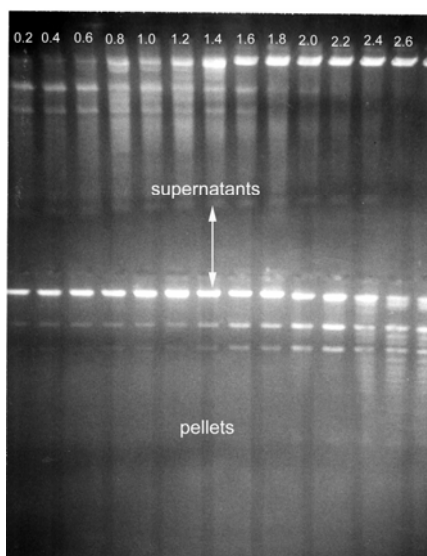
	Mg	Units	u/mg	fold
Crude	468,3 mg	2342750	5002,6	1
Q	74,25 mg	1216216	16380,01	3,2
Blue	51,97 mg	1200603	23101,8	4,2
Mono Q	2,38mg	225000	94537,8	18,8

Πίνακας 3 Πίνακας καθαρισμού της R.PspI

Δ.6. Άλλες αναλύσεις σχετικά με την R.PspI

Δ.6.1. Κατακρήμνιση της ενεργότητας της R.PspI με Θειϊκό Αμμώνιο $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Για το προσδιορισμό της συγκέντρωσης του $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ που απαιτείται



χρησιμοποιήθηκαν ποσότητες πρωτεϊνικού εκχυλίσματος 500μl. Σε αυτές προστίθεται η ποσότητα υγρού κορεσμένου διαλύματος $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.9M, σε σχέση με τον αρχικό όγκο και την αλλαγή του συνολικού όγκου έτσι ώστε να έχουμε την επιθυμητή συγκέντρωση. Για τις παρούσες συνθήκες πραγματοποιήθηκαν βήματα των 200mM στην αύξηση της συγκέντρωσης.

Εικ.26 Ενζυμική δοκιμασία στα υπερκείμενα και στα ιζήματα με το διπλό βέλος φαίνεται η μέγιστη συγκέντρωση στην οποία η ενεργότητα παύει να υπάρχει

στο υπερκείμενο και εμφανίζεται στο ίζημα

Μετά την προσθήκη του κατακρημνιστικού παράγοντα τα δείγματα επωάζονται στους 4°C για 30min και στην συνέχεια φυγοκεντρώνονται στις 15000rpm για 20min. Ακολουθεί ενζυμική δοκιμασία στα υπερκείμενα και στα ιζήματα της φυγοκέντρωσης. Στην επόμενη εικόνα φαίνονται τα αποτελέσματα των δοκιμασιών.

Δ.6.2. Ισοηλεκτρική εστίαση (IEF) του μορίου της R.PspI

Για την πραγματοποίηση της ισοηλεκτρικής εστίασης χρησιμοποιήθηκε συσκευή ηλεκτροφόρηση FAST (Pharmacia) και προετοιμασμένο πήκτωμα ακρυλαμίδης ειδικό για την διαδικασία σε κλίμακα pH από 3.0-9.0. Η ηλεκτροφόρηση έγινε με

έτοιμο πρόγραμμα της συσκευής και η χρώση του πηκτώματος έγινε με χρωστική Coomassie Blue. Στην εικόνα που ακολουθεί φαίνεται ότι το μόριο της R.PspPI εστιαζεται σε μια περιοχή από 4.0-4.5 γεγονός που εξηγεί και την γενικότερη βιοφυσική συμπεριφορά της στους διάφορους τύπους χρωματογραφίας.

Δ.6.3. Θερμική σταθερότητα της R.PspPI

Από προκαταρκτικές δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν διαπιστώθηκε ότι η άριστη θερμοκρασία λειτουργίας της ενδονουκλεάσης R.PspPI είναι γύρω στους 25 °C, ενώ αύξηση της θερμοκρασίας πάνω από αυτό το όριο εμφανίζεται απώλεια της ενεργότητας που οδηγεί σε ανενεργοποίηση του ενζύμου στους 50°C.

E. Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα που παρατέθηκαν παραπάνω, μπορούν να εξαχθούν κάποια συμπεράσματα σχετικά με το χαρακτήρα και την συμπεριφορά του μορίου.

1. Από τα αποτελέσματα των καθαρισμών όπως φαίνεται παραπάνω και σύμφωνα με ότι είναι γνωστό από την βιβλιογραφία η R.PspPI είναι ένα διμερές του οποίου η υπομονάδα έχει μοριακό βάρος όπως αυτό εκτιμάται από αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμίδης γύρω στις 24028 dalton
2. Από τα αποτελέσματα της ισοηλεκτρικής εστίασης διαπιστώνεται ότι πρόκειται για μία όξινη πρωτεΐνη γεγονός το οποίο είχε προαναγγελθεί από αποτελέσματα κατιοντοανταλλακτική διαδικασία. Αυτό πιθανώς συνεπάγεται την ύπαρξη μεγάλου αριθμού όξινων καταλοίπων στην επιφάνεια του μορίου, αλλά κανείς δεν μπορεί να αποκλείσει την ανισοκατανομή φορτίων στην επιφάνεια του που δημιουργεί περιοχές εντοπισμένου φορτίου που επηρεάζουν την ηλεκτροχημική συμπεριφορά του μορίου. Απομένει η δομική ανάλυση για να επιβεβαιώσει το γεγονός αυτό.
3. Όπως όλα τα περιοριστικά ένζυμα τύπου II η R.PspPI έχει απαίτηση για ιόντα Mg^{2+} , τα οποία αν αφαιρεθούν με την προσθήκη στο διάλυμα του ενζύμου χηλικού παράγοντα EDTA σε συγκεντρώσεις $> 10mM$, οδηγούν σε απενεργοποίηση του ενζύμου και απώλεια της δραστηριότητας.
4. Στο βαθμό καθαρότητας που παραλαμβάνεται το ένζυμο μετά το τελικό στάδιο χρωματογραφίας σε προσροφητή MonoQ, διατηρεί την ενεργότητα του χωρίς

- ανιχνεύσιμη απώλεια ενεργότητας για τουλάχιστο 15 ημέρες αν φυλαχθεί στους 4⁰C. Αντιθέτως μετά από χρωματογραφία μοριακής διήθησης το ένζυμο εμφανίζει γρήγορη απώλεια ενζυμικής ενεργότητας.
5. Από τα αποτελέσματα των χρωματογραφικών αναλύσεων σε υδροφοβικούς προσροφητές, μπορούμε να καταλήξουμε σε δύο πιθανές εξηγήσεις: α) το μόριο εκτός από τις φορτισμένες ομάδες που διαθέτει, φέρει και επιφανειακές πολικές περιοχές οι οποίες σε συνθήκες υψηλής ιοντικής ισχύος είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη πολικών αλληλεπιδράσεων με τα χρωματογραφικά υποστρώματα, έτσι ώστε να απαιτείται η προσθήκη πολικών παραγόντων όπως PEG-2000 για την έκλυση του από αυτά. β) υδρόφοβες περιοχές στην επιφάνεια του μορίου είναι υπεύθυνες για την σύνδεση του στα υδροφοβικά υποστρώματα γ) και τα δύο παραπάνω συμβαίνουν οπότε η συμπεριφορά του μορίου είναι η συνιστάμενη αυτών των δύο τύπων αλληλεπιδράσεων των οποίων τα αποτελέσματα έχουμε εμείς διαπιστώσει πειραματικά. Όποια και αν είναι η πραγματικότητα πάντως φαίνεται ότι η Θεωρία για το ρόλο των μειωτών ιοντικής ισχύος στα μικτά ηλεκτρολυτικά διαλύματα των βιομορίων ισχύει αφού η θεωρία προβλέπει την συμπεριφορά του βιομορίου αυτού όπως διαπιστώνεται παραπάνω.
 6. Είναι φανερό ότι απαιτείται να γίνει επιπλέον ο ακριβής χαρακτηρισμός του μορίου ο οποίος θα δώσει στοιχεία ακριβείας γύρω από τις φυσικοχημικές παραμέτρους του μορίου της *R.PspPI*.

ΣΤ. Προοπτικές

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή οι ψυχρόφιλοι οργανισμοί και τα ψυχρόφιλα ένζυμα παρουσιάζουν ενδιαφέρον από βιοχημικής και δομικής απόψεως διότι προσφέρουν το κατάλληλο πειραματικό υλικό πάνω στο οποίο εργαζόμενοι μπορούμε να καταλάβουμε την λογική με την οποία η εξέλιξη τροποποιεί τους κανόνες διπλώματος των πρωτεϊνών έτσι ώστε αυτές να μπορούν να προσαρμόζονται στα ψυχρά περιβάλλοντα. Έτσι αναλύοντας τις διαφορές των πρωτεϊνών από ψυχρόφιλους οργανισμούς σε σχέση με άλλες μεσόφιλες πρωτεΐνες θα μπορέσουμε στο μέλλον να καταλάβουμε του κανόνες επιλογής των καταλοίπων στις διάφορες θέσεις πάνω στις πρωτεΐνες. Στο πλαίσιο αυτό η *R.PspPI* αποτελεί το πρώτο ψυχρόφιλο ένζυμο περιορισμού του οποίου καθαρίστηκε με απώτερο στόχο κρυσταλλογραφική ανάλυση. Επιπλέον οι λίγες μόνο διαθέσιμες δομές περιοριστικών ενζύμων υποδηλώνουν ότι η

εργασία σε αυτό τον τομέα έχει μέλλον μια και τα περιοριστικά ένζυμα αποτελούν σημαντικό τομέα της βιομηχανίας που υποστηρίζει την βιολογική έρευνα με εργαλεία που παράγει. Αρα απώτερο στόχος είναι η κατανόηση των μηχανισμών διπλώματος και λειτουργίας των περιοριστικών ενζύμων και στην συνέχεια η εφαρμογή της συσσωρευμένης γνώσης στην προσπάθεια τροποποίησης αυτών των μηχανισμών ώστε να μπορούμε να επεμβαίνουμε στην ενεργότητα και στην ειδικότητα των ενζύμων φτιάχνοντας τροποποιημένα (engineered) ένζυμα.

Πέρα από τα παραπάνω σε επόμενο στάδιο είναι προγραμματισμένα τα ακόλουθα:

- Πλήρης χαρακτηρισμός του μορίου της *R.PspPI* που περιλαμβάνει, ακριβές μοριακό βάρος, ισοηλεκτρικό σημείο, κλωνοποίηση του γονιδίου, εύρεση της νουκλεοτιδικής και αμινοξικής αλληλουχίας. Πιθανόν είναι να προχωρήσουμε στην υπερέκφραση του γονιδίου μαζί με την αντίστοιχη μεθυλάση.
- Κρυστάλωση του ενζύμου. Ήδη, προκαταρτικές κρυσταλλώσεις έχουν δείξει ενθαρυντικά αποτελέσματα.
- Εύρεση της δομής του μορίου μέσω κρυσταλλογραφικής ανάλυσης και καταχώρηση της δομής στις διεθνείς βάσεις δεδομένων.

Z. Βιβλιογραφία

Aiken, C., R., Gumport, R., J. **Base analogs in study of restriction enzyme-DNA interactions.** Protein-DNA interaction. *Methods in enzymol.* (1991), **208**, 433-457

Arrand, J.R., Myers, P.A, Roberts, R.J. **A new restriction endonuclease from *Streptomyces albus* G.** *J. Mol. Biol.*(1978) **118**,127-135

Athanasiadis, A., Vlassi, M., Kotsifaki D., Tucker, P.A., Wilson, K.S., Kokkinidis, M. **Crystal structure of PvuII endonuclease reveals extensive structural homologies to EcoRV.** *Structural Biology* (1994), **1**, 469-475.

Bickle, T.A., Pirrota, V., Imber, R. **A simple general procedure for purifying restriction endonucleases.** *Nucleic Acids Research* (1977), **4**,2561-2572

Blum, H., Beier, H., Gross H., J. **Improved silver staining of plant proteins, RNA, DNA in polyacrylamide gels.** *Electrophoresis* (1987), **8**, 93-99

Deutscher, M., P. **Maintaing protein stability. Guide to protein purification.** *Methods Enzymol.* Editor Deutscher, M., P. (1990), **182**, 83-89

Deutscher, M., P. **Rethinking your purification procedure.** Guide to protein purification. *Methods Enzymol.* Editor Deutscher, M., P. (1990), **182**, 779-780

Dzandu, J.,K., Johnson, J.,F., Wise, G.,E. **Sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis: staining of polypeptides using heavy metals.** *Anal. Biochem.* (1988), **174**, 157-167

Endow, S.A., Roberts, R.J. **Two restriction like enzymes from *Xanthomonas malvacearum*.** *J. Mol. Biol.* (1977) **112**, 521-529

Englard, S., Seifter, S. **Precipitation techniques.** Guide to protein purification. *Methods Enzymol.* Editor Deutscher, M., P. (1990), **182**, 285-300

Feller, G., Narinx, E., Arpigny, J.,L., Aittaleb, M., Baise, E., Genicot, S., Gerday, C. **Enzymes from psychrophilic organisms.** *FEMS microbiology Reviews* (1996), **18**, 189-202

FPLC ion exchange and chromatofocusing. Principles and methods. Pharmacia LKB Biotechnology

Gel filtration. Theory and Practice. Pharmacia LKB Biotechnology

Gingeras, T.R., Myers, P.A., Olson J.A., Hanberg, F.A., Roberts R.J. **A new specific Endonuclease present in *Xanthomonas holcicola*, *Xanthomonas papavericola* and *Brevibacterium luteum*.** *J. Mol. Biol.* **118**,113-122

Golburnoff, M., J. **Protein chromatography on Hydroxyapatite Columns.** Guide to protein purification. *Methods Enzymol.* Editor Deutscher, M., P. (1990), **182**, 329-338

Hames B., D., Rickwood D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach.** Oxford: IRL press (1990)

Heftmann, E.. **Differential migration methods of analysis.** *Chromatography.* REINHOLD PUBLISHING CORPORATION New York, 1963, Chapter **2**. 11-18

Heftmann, E..**Techniques of ion exchange chromatography.** *Chromatography.* REINHOLD PUBLISHING CORPORATION New York, 1963, Chapter **12**. 11-18

Heftmann, E..**Theoretical basis of electrophoresis.** *Chromatography.* REINHOLD PUBLISHING CORPORATION New York, 1963, Chapter **9**. 11-18

Heftmann, E..**Theory of chromatography.** *Chromatography.* REINHOLD PUBLISHING CORPORATION New York, 1963, Chapter **3**. 20-31

Ion Exchange chromatography. Principles and methods. Pharmacia LKB Biotechnology

Kano, H., Taguchi, S., Momose, H. **Cold adaptation of a mesophilic serine protease, subtilisin, by in vitro random mutagenesis.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1997), **47**, 46-51

Kennedy, R., M. **Hydrophobic chromatography.** Guide to protein purification. *Methods Enzymol.* Editor Deutscher, M., P. (1990), **182**, 339-342

Konberg, A. **The private life of DNA polymerase I.** Guide to protein purification. *Methods Enzymol.* Appendix Personal Perspectives on enzyme purification. Editor Deutscher, M., P. (1990), **182**, 783-789

Kopperschlager, G. **Affinity extraction with dye ligands.** Aqueous two phase systems. *Methods in enzymol.* (1994), **228**, 121-137

Low, P.,S., Bada, J.,L., Somero, G.,N. **Temperature adaptation of enzymes: Roles of the free energy, the enthalpy, and the entropy of activation.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1973), **70**, 430-432

Merkle, D., L., Berg, J., M. **Metal requirements for nucleic acid binding proteins.** Protein-DNA interaction. *Methods in enzymol.* (1991), **208**, 46-55

Mohr, P.,W., Krawiec, S. **Temperature characteristics and Arrhenius plots for nominal psychrophiles, mesophiles and thermophiles.** *Journal of General Microbiology* (1980), **121**, 311-317

Ostove, S. **Affinity chromatography: General methods.** Guide to protein purification. *Methods Enzymol.* Editor Deutscher, M., P. (1990), **182**, 357-371

Ostove, S., Weiss, S. **Affinity chromatography: Specialized techniques**. Guide to protein purification. *Methods Enzymol.* Editor Deutscher, M., P. (1990), **182**, 371-379

Peterson, E., A., Sober, H.,A. **Chromatography of proteins. I. Cellulose ion-exchange absorbents**. *J. Amer. Chem. Soc.* (1956) , **78**, 751-755

Pingoud, A., Jeltsch, A. **Regognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases**. *Eur. J. Biochem.* (1997), **246**, 1-22

Pohl, T. **Concentration of proteins and removal of solutes**. Guide to protein purification. *Methods Enzymol.* Editor Deutscher, M., P. (1990), **182**, 68-82

Roberts, R.J., Myers, P.A., Morrison, A., Murray, K. **A specific Endonuclease from *Arthrobacter luteus***. *J. Mol. Biol.*(1976) **102**,157-165.

Rossomando, E., F. **Ion-Exchange chromatography**. Guide to protein purification. *Methods Enzymol.* Editor Deutscher, M., P. (1990), **182**, 309-316

Sayeeda Zain, B., Roberts, R.J. **A new specific Endonuclease from *Xanthomonas Bardii***. *J. Mol. Biol.*(1977) **115**,249-255

Scopes, R., K. **Protein purification. Principles amd practice**. Springer Verlang New York Inc. 1987

Shaltiel, S. **Hydrophobic chromatography**. Enzyme purification and related techniques.Part C. *Methods Enzymol.*Editor Jacoby, W., B. (1984), **104**, 309-316

Sharp, P.A., Sugden, B., Sambrook, J. **Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis**. *Biochemistry* (1973) **12**,3055-3063

Smith, H.O., Wilcox, K.W. **A restriction enzyme from *Hemophilus infuenzae***. *J. Mol. Biol.* (1970) **51**, 379-391

Stellwagen, E. **Chromatography on immobilized reactive dyes**. Guide to protein purification. *Methods Enzymol.* Editor Deutscher, M., P. (1990), **182**, 343-357

Stellwagen, E. **Gel filtration**. Guide to protein purification. *Methods Enzymol.* Editor Deutscher, M., P. (1990), **182**, 317-329

Wilson, G.A., Young, F.E. **Isolation of a sequence-specific Endonuclease (*BamI*) from *Bacillus amyloliquefaciens* H**. *J. Mol. Biol.* (1975) **97**, 123-125

Wilson, G.G. **Type II restriction modification systems**. *TIG* (1988),**4**, 314-318

Παπανικολάου, Ι. **Ο ρόλος των μειωτών ιοντικής ισχύος στη διαλυτότητα των βιομορίων στα μικτά υδατικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα και εφαρμογές στην χρωματογραφία και στην κρυστάλλωση.** Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Κρήτης. Σχολή θετικών επιστημών. Τμήμα βιολογίας. **1995**

