
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ



ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΤΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ**

**Απομόνωση και χαρακτηρισμός πρωτεΐνης από τον φυτικό οργανισμό
Pancratium Maritimum**

ΠΑΠΑΔΑΚΗ ΑΡΙΑΔΝΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2009

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΑΠΟ ΤΟΝ
ΦΥΤΙΚΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ PANCRACTIUM MARITIMUM**

ΠΑΠΑΔΑΚΗ ΑΡΙΑΔΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : Δ. ΓΑΝΩΤΑΚΗΣ

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΤΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2009

**ISOLATION AND IDENTIFICATION PROTEIN FROM PLANT
ORGANISM PANCRATIUM MARITIMUM**

PAPADAKI ARIADNE

SUPERVISOR: D. GHANOTAKIS

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

UNIVERSITY OF CRETE

HERAKLIO 2009

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
Συντομογραφίες	11
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	12
- Γεώφυτα	12
- Οικολογία φυτών	13
- Ιστορική αναδρομή	14
-Βοτανική ταξινόμηση	15
- <i>Pancreatium Maritimum</i>	17
-Μορφολογία	18
-Φύλλα	18
-Άνθη και ταξιανθίες	19
-Καρπός και σπέρματα	19
-Ριζικό σύστημα	20
-Βολβοί	21
-Λήθαργος	22
-Άνθηση- παράγοντες που επηρεάζουν άνθηση	23
-Πολλαπλασιασμός	24
-Κυριότερα συστατικά <i>Pancreatium</i> που έχουν μελετηθεί	25
-Ιατρικές χρήσεις - Εφαρμογές	28
ΣΚΟΠΟΣ	29
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	30
- Φυγοκέντρηση	30
- Διαπίδυση	30
- Υγρή Χρωματογραφία κατιονανταλλαγής S-Sepharose	31
- Ηλεκτροφόρηση πηκτών πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	33
- Χρώση πηκτών πολυακρυλαμιδίου	37
- Ηλεκτροφόρηση πηκτών πολυακρυλαμιδίου για MALDI-TOF-MS	40
- Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού Bradford	42
- Κατακρήμνιση πρωτεϊνών	44

- πολυμερές PEG	44
- θειϊκό αμμώνιο	45
- οργανικό διαλύτη ακετόνη	46
- TCA	46
Φασματοσκοπία μάζας MALDI-TOF-MS	46
Βιοπληροφορική	52
Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)	53
Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης (RP-HPLC)	55
Φασματοσκοπία μάζας ESI- παγίδα ιόντων	56
Καλλιέργεια κυττάρων HeLa	59
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	61
A ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	61
Απομόνωση πρωτεϊνών από βολβούς <i>Pancreatium Maritimum</i>	61
Διαπίδυση	63
Διαχωρισμός πρωτεϊνών με υγροχρωματογραφία S-Sepharose	64
Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου	65
Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά πρωτεϊνών (UV-Vis)	68
Κατεργασία πρωτεϊνών με PEG	71
Κατεργασία πρωτεϊνών με TCA	73
Κατεργασία πρωτεϊνών με ακετόνη	74
Ανάλυση πρωτεϊνών με MS (MALDI-TOF-MS)	75
Φάσματα MS	78
Αντιστοιχίες πεπτιδίων με ομόλογες πρωτεΐνες	85
Λειτουργίες ομόλογων πρωτεϊνών	86
B ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	88
Απομόνωση αλκαλοειδών από βολβούς <i>Pancreatium Maritimum</i>	88
Χρωματικός έλεγχος σύστασης σακχάρων Molisch's test	89
Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά αλκαλοειδών (UV-Vis)	90
Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)	91
Χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης (RP-HPLC)	96
Φασματοσκοπία MS κλασμάτων (ESI-ion trap)	99
Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά κλασμάτων (UV-Vis)	107

Έλεγχος κυτταροτοξικότητας αλκαλοειδών _____	108
<i>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ</i> _____	116
<i>ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ</i> _____	118
<i>ΒΙΒΛΙΟΤΡΑΦΙΑ</i> _____	119

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η μελέτη του φυτού *Panocratium Maritimum*, το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Amaryllidaceae*, είναι ένα βολβώδες, αμμόφιλο, αυτοφυές φυτό που ζει και ολοκληρώνει τον βιολογικό του κύκλο στα παράλια της Μεσογείου και της Ιβηρικής χερσονήσου. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η απομόνωση πρωτεϊνών από τους βολβούς του φυτού με χρήση της κατιονανταλλακτικής χρωματογραφίας με υλικό πλήρωσης S-Sepharose, με αυτό τον τρόπο διαχωρίστηκαν οι πρωτεΐνες από το μίγμα πρωτεϊνών. Δυο από αυτές τις πρωτεΐνες που απομονώθηκαν μας ενδιαφέρουν, των οποίων το μοριακό βάρος είναι περίπου στα 12kDa το οποίο υπολογίστηκε με βάση πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους μετά την ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). Ακολούθησε καταβύθιση των πρωτεϊνών με διάφορους τρόπους, όπως με χρήση του τριχλωρικού οξέος (TCA) και οργανικού διαλύτη ακετόνη. Για την ταυτοποίηση έπειτα των πρωτεϊνών αυτών, εφαρμόστηκε φασματοσκοπία μάζας με μέθοδο ιοντισμού MALDI και αναλυτή μαζών χρόνου πτήσης TOF, όπου με τη βοήθεια της βιοπληροφορικής αναγνωρίστηκαν κάποιες αλληλουχίες πεπτιδίων, από ομόλογες πρωτεΐνες φυτικών οργανισμών, όπως *Vitis vinifera*, *Oryza sativa*, *Zea mays*. Οι περισσότερες ομόλογες πρωτεΐνες που προέκυψαν από τα φάσματα MS/MS των κύριων κορυφών είναι υποθετικές, παρόλα αυτά είναι γνωστές κάποιες λειτουργίες τους στο κύτταρο, όπως συμμετοχή σε μεταβολικές διαδικασίες, πρωτεΐνες δέσμευσης είτε άλλων μακρομορίων είτε ιόντων.

Επίσης το φυτό *Panocratium Maritimum* όπως και όλα τα φυτά της οικογένειας *Amaryllidaceae* θεωρείται φαρμακευτικό φυτό, λόγω πληθώρας ιδιοτήτων, οι οποίες οφείλονται στην περιεκτικότητά τους στις οργανικές ενώσεις αλκαλοειδή. Τα αλκαλοειδή σε μικρές ποσότητες εμφανίζουν αντικαρκινική, αντική, αντιβιοτική, αναλγητική, αντιχολινεργική δράση καθώς και ιδιότητες φυτορμονών. Όμως σε μεγάλες ποσότητες θεωρούνται τοξικά για τον ανθρώπινο οργανισμό μέχρι και δηλητηριώδη. Έτσι πραγματοποιήθηκε απομόνωση των αλκαλοειδών ενώσεων από τους βολβούς του φυτού, σε μεθανολικό εκχύλισμα. Έπειτα σύμφωνα με το Molisch test διαπιστώθηκε ότι το μεθανολικό εκχύλισμα περιέχει γλυκοζίτες αλκαλοειδών και πιθανών και ελεύθερα σάκχαρα. Με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του μίγματος, και σε σύγκριση με τα βιβλιογραφικά

δεδομένα αποκτήσαμε μια πρώτη εικόνα για τη σύσταση του μίγματος. Έπειτα ακολούθησε διαχωρισμός του μίγματος με τη χρήση της χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης (PR-HPLC). Στα κύρια δυο κλάσματα που ελήφθησαν από την υδροχρωματογραφία, πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπία MS, με πηγή ιοντισμού τον ηλεκτροψεκασμό (ESI) και αναλυτή μαζών την παγίδα ιόντων. Από τα φάσματα MS διαπιστώσαμε ότι το πρώτο κλάσμα περιέχεται ένας διγλυκοζίτης ενός υποκατεστημένου μορίου του αλκαλοειδούς Tazettine, της hydroxyl-O-methylotazettine και στο δεύτερο κλάσμα ένας διγλυκοζίτης του ενός υποκατεστημένου μορίου του αλκαλοειδούς Lycorine, της acetyllycorine. Επόμενος στόχος μας ήταν να ελέγξουμε την κυτταροτοξική και κατ' επέκταση αντικαρκινική δράση του μεθανολικού διαλύματος που περιέχει μίγμα αλκαλοειδών, που έχουν απομονωθεί από τους βολβούς του φυτού *Panocratium Maritimum*, καθώς και τον δυο γλυκοζυλιωμένων αλκαλοειδών που ελήφθησαν μετά τον διαχωρισμό με τη χρήση της HPLC.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the plant *Pancreatium Maritimum*, which belongs in the family Amaryllidaceae, is a bulbous, perennial, uncultivated plant that lives and completes its biological cycle in the coasts of Mediterranean and Iberian Peninsula. Initially the isolation of proteins from the bulbs of plant was performed with use of cation exchange chromatography S-Sepharose, with this procedure the proteins were separated from the mix of proteins. Two of these proteins that were isolated are of interest to us, of which the molecular weight is approximately 12kDa which was calculated based on proteins of known molecular weight after their electrophoresis in polyacrylamide gel (SDS-PAGE). Followed by precipitation of proteins with various ways, such as using trichloroacetic acid (TCA) and organic solvent acetone. Then, for the identification of these proteins, mass spectroscopy was applied, with matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) and time of flight masses analyser (TOF), at which point with the help of bioinformatics certain sequence of peptides were recognized, from homologous proteins of plant organisms, as *Vitis vinifera*, *Oryza sativa*, *Zea mays*. Most homologous proteins that resulted from MS/MS spectra of the main tops are hypothetical, nevertheless we know certain operations they perform in the cell, such as participation in metabolic processes, binding proteins of other macromolecules or ions.

Also the plant *Pancreatium Maritimum* as all plants of family Amaryllidaceae is considered a pharmaceutical plant, because of an abundance of properties, which are owed to their content of the organic chemical compounds alkaloids. Alkaloids in small quantities have anticancer, antiviral, antibiotic, analgesic and anticholinesterase activities as well as phytohormonic attributes. However in large quantities they are considered toxic or even poisonous for the human organism. Thus isolation of the alkaloid compounds from the bulbs of plant was performed, in methanol extract. Then according to Molisch test it was realized that the methanol extract contains glycosides alkaloids and possibly free sugars. With the use of thin layer chromatography (TLC) separation of the mixture was performed, and with comparison to the bibliographic data we acquired a first picture for the constitution of mixture. Then followed

separation of mix with the use of reversed phase high performance liquid chromatography (PR-HPLC). In the main two fractions that were received from HPLC, spectroscopy MS was performed, with electron spray ionization (ESI) and as a masses analyser, a trap of ions. From the MS spectra we realized that the first fraction contained a diglucoside of a substituted molecule of alkaloid Tazettine, of hydroxyl-O-methylotazettine and in the second fraction, a diglucoside of a substituted molecule of alkaloid Lycorine, of acetyllycorine. Our next objective was to check cytotoxic and at extension anticancer action of the methanolic solution that contains a mix of alkaloid, as well as the two alkaloids that were received after separation using of HPLC.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

kDa : kilodalton

PAGE : ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

SDS : δωδεκυλοθειικό νάτριο

EDTA : αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ

PMSF : φαινυλο- μεθυλ- σουλφονυλο –φοθρίδιο (phenylmethylsulphonyl fluoride)

Tris : Τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο

Tricine : N-τρις (υδροξυμέθυλο-) μέθυλο-γλυκίνη

TEMED : N, N, N', N'-τετραμεθυλενοδιαμίνη

CBB : Coomassie Brilliant Blue

TCA : τριχλωροξικό

PEG : πολυαιθυλενο-γλυκόζη

HeLa : κύτταρα από καρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας

DMSO: διμεθυλο-σουλφοξείδιο

IC₅₀ : Ανασταλτική Συγκέντρωση που προκαλεί 50% αναστολής κυτταρικής ανάπτυξης

CO₂ : διοξείδιο του άνθρακα

MS : Φασματοσκοπία μάζας

MALDI : ιονισμός με laser απόπτωση, υποβοηθούμενη με υπόστρωμα (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*)

MTT: (3-(4,5-διμεθυλτριαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλτετραζολικό βρωμίδιο

ESI : ιονισμός με ηλεκτροψεκασμός (*Electron Spray Ionization*)

TOF : αναλυτής μαζών “χρόνου πτήσης” (*Time Of Flight*)

ATP : αδενόσινο-5-τριφωσφορικός εστέρας

HPLC : υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (*High Performance Liquid Chromatography*)

RP-HPLC : υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσεως (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*)

TLC : χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (*thin layer chromatography*)

Rf : συντελεστής επιβράδυνσης, συντελεστής καθυστέρησης

UV : υπεριώδης ακτινοβολία (*ultra violet*)

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Γεώφυτα

Ο οργανισμός *Pancratium Maritimum* είναι βολβώδες φυτό. Τα βολβώδη φυτά ανήκουν σε μια ευρύτερη κατηγορία φυτών τα **γεώφυτα**. Με τον όρο γεώφυτα εννοούμε όλα εκείνα τα φυτά που εκτός από το σπόρο, επιβιώνουν με πολυετή, υπόγεια αποθησαυριστικά όργανα και διατηρούν τη βλαστική τους ικανότητα σε λανθάνουσα κατάσταση και μετά τη βλαστική περίοδο. Από τα μοναδικά όργανα των καλλωπιστικών φυτών, είναι οι βολβοί, οι κόνδυλοι και τα ριζώματα, γιατί στην πραγματικότητα είναι ολοκληρωμένα φυτά που δίνουν άνθη με ελάχιστες καλλιεργητικές φροντίδες.



Εικόνα 1. Ο οργανισμός *Pancratium Maritimum*

Στην κατηγορία των γεωφύτων περιλαμβάνονται μονοκοτυλήδονα και δικοτυλήδονα είδη, τα οποία διακρίνονται σε δυο κύριες κατηγορίες τους βολβούς και τους κόνδυλους. Τα καλλωπιστικά γεώφυτα είναι κοινώς γνωστά σαν ανθοφόροι βολβοί.

Ο σημαντικότερος σκοπός των υπόγειων ιστών είναι η αποθήκευση θρεπτικών στοιχείων και υγρασίας, έτσι ώστε να καλύπτονται οι ανάγκες του φυτού για την σωστή ανάπτυξή του καθ' όλη τη διάρκεια του έτους.

Τόσο τα μονοκοτυλήδονα όσο και τα δικοτυλήδονα φυτά περιλαμβάνουν έναν αριθμό οικογενειών με καλλωπιστικά φυτά βολβών και κορμών. Αριθμητικά όμως, η μεγαλύτερη πλειοψηφία βολβωδών είναι μονοκοτυλήδονα και ανήκουν σε λίγες οικογένειες: στην τάξη των

Asparagales ανήκουν στις οικογένειες των *Alliaceae*, *Amaryllidaceae* και *Hyacinthaceae* και στην τάξη των *Liliales* στις οικογένειες *Alstroemeriaceae*, *Iridaceae* και *Liliaceae*. Επίσης γεώφυτα παρουσιάζονται σε πολλές άλλες οικογένειες μονοκοτυλήδων όπως: *Agavaceae*, *Araceae*, *Asphodelaceae*, *Colchicaceae*, *Convulsiaceae*, *Hemerocallidaceae* και *Tecophilaeaceae*.

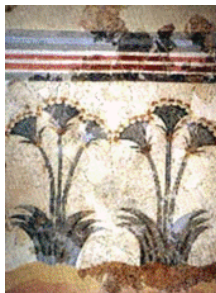
Οι βολβοί είναι σχεδόν αποκλειστικό γνώρισμα των *Liliflorae* και περιορίζονται στις *Liliales* και *Asparagales*. Τα *Liliaceae* έχουν πολλά βολβώδη είδη, σε αντίθεση με τα *Iridaceae* που έχουν λίγα. Στις *Asparagales* τα περισσότερα μέλη των *Alliaceae*, *Amaryllidaceae* και *Hyacinthaceae* είναι βολβώδη και δεν έχουν κονδυλώδεις ρίζες. Οι κορμοί είναι από τα κύρια χαρακτηριστικά στα *Iridaceae* τα οποία περιλαμβάνουν και γένη με ριζώματα.

Οικολογία φυτών

Τα βολβώδη φυτά αναπτύσσονται σε όλες σχεδόν τις χώρες του κόσμου ακόμα και σε κλίματα που δεν είναι κατάλληλα για αυτά. Μπορούν να προσαρμοστούν σε ποικιλία περιβαλλόντων έτσι ώστε να αναπτυχθούν και να ανθίσουν. Οι χώρες του βόρειου ημισφαιρίου έχουν μεγαλύτερη παραγωγή βολβών. Ωστόσο υπάρχουν και χώρες στην τροπική ζώνη που συναντώνται βολβώδη φυτά σε μεγάλο υψόμετρο. Ένας μεγάλος αριθμός βολβωδών συναντάται σε μια πλατιά γεωγραφική ζώνη που εκτείνεται από την Ισπανία και τη Νότια Αφρική μέχρι τη Μεσογειακή περιοχή, ανατολικά μέχρι την Τουρκία και το Ιράν και δυτικά μέχρι την Κίνα. Οι καλοκαιρινές και χειμερινές θερμοκρασίες στις περιοχές αυτές παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις. Οι περιοχές αυτές χαρακτηρίζονται από χειμώνες με βροχή και χιόνια και καλοκαίρια με ζέστη και ξηρασία. Οι χώρες αυτές είναι γενέτειρα ενός μεγάλου αριθμού διεθνώς καλλιεργούμενων βολβών.

Ιστορική αναδρομή

Η πολιτιστική αξία των βολβών είναι πολύ παλιά. Οι Κρητικές νωπογραφίες και τα αγγεία που χρονολογούνται από το 1.600 π.Χ. είναι αναμφισβήτητα διακοσμημένα με ίριδες και μοτίβα Λίλιουμ. Οι τοιχογραφίες της Σαντορίνης επίσης παρουσιάζουν μοτίβα από *Pancratium*.



Εικόνα 2. Τοιχογραφία *Panocratium Maritimum*

Τέχνη και γραφή μαρτυρούν ότι οι πρώτοι Αιγύπτιοι καλλιεργούσαν διάφορους βολβούς για διακοσμητικούς και τελετουργικούς σκοπούς όπως ανεμώνες, ίριδες, λίκιουμ και νάρκισσους.

Οι Έλληνες έδειξαν μεγάλο ενδιαφέρον για την καλλωπιστική αξία των βολβών και αυτό μαρτυρείτε από έγγραφα του φιλοσόφου – βοτανολόγου Θεόφραστου (περίπου το 340 π.Χ.), τα οποία αναφέρουν φυτά που είναι γνωστά σήμερα ως Άλιουμ, Ανεμόνα, Κρόκος, Κυκλάμινο, Γλαδίολος, Υάκινθος (κοινώς ζουμπούλι), Λίκιουμ και Νάρκισσος.

Ρωμαϊκά έγγραφα και ποίηση επισημαίνουν τη χρησιμότητα των διαφόρων βολβών σε θρησκευτικές τελετουργίες και εξυμνούν τις ιδιαίτερες ομορφιές των ανθέων τους.

Βιβλικές αναφορές σε βολβούς, κρίνα και κρόκους, αφθονούν στην Παλαιά και Καινή Διαθήκη της Αγίας Γραφής.

Επίσης οι βολβοί σήμερα αποτελούν απαραίτητο συμπλήρωμα των πάρκων και κυρίως των κήπων. Βρίσκουν άπειρες εφαρμογές στην Αρχιτεκτονική Τοπίου, λόγω της μεγάλης ποικιλίας του φυλλώματός τους, των ανθέων τους και του μεγάλου εύρους άνθησής τους σε όλη τη διάρκεια του χρόνου. Πολλά από αυτά εμφανίζονται και ως δρεπτά όπως η Τουλίπα, ο Γλαδίολος, ο Νάρκισσος, το Λίκιουμ, η Ίριδα, ο Υάκινθος με αυτή τη σειρά παραγωγής.

Τέλος σημαντική είναι η συμβολή τους στην ιατρική, αφού πολλά φυτά χρησιμοποιούνται για την παρασκευή φαρμακευτικών σκευασμάτων.

Βοτανική ταξινόμηση

Το γένος *Pancratium* του φυτικού βασιλείου ανήκει στην κλάση των *Liliflorae* (Λειριανθών) και πιο συγκεκριμένα στην τάξη *Asparagales*, στην οικογένεια *Amaryllidaceae*.

Ταξινόμηση του <i>Pancratium maritimum</i>	
Kingdom – Βασίλειο	Φυτό
Division – Άθροισμα	Spermatophyta
Super division – Υποάθροισμα	Magnoliophyta or Angiospermopsida
Class – Κλάση	Liliales (Liliiflorae) monocotyledons
Order – Τάξη	Asparagales
Family – Οικογένεια	Amaryllidaceae
Genus – Γένος	Pancratium
Species – Είδος	Pancratium maritimum

Πίνακας 1. Βοτανική ταξινόμηση φυτικού οργανισμού *Pancratium Maritimum*

Τα *Liliflorae* (Λειριανθή ή Λιλιφλόρες) είναι μια τάξη που περιλαμβάνει φυτά ριζωματώδη ή βολβόριζα, κυρίως ποώδη, σπάνια θαμνώδη ή δενδρώδη, με φύλλα κανονικά, δερματώδη ή σαρκώδη, μαλακά ή τραχιά, αγκαθωτά στα χείλη, χωρίς μίσχο ή με μίσχο, κατά το πλείστο παράρριζα, άνθη ακτινωτά, ζυγόμορφα και καρπό κάψα τρίχωρη με ένα ή πολλά σπέρματα σε κάθε χώρο και σπάνια ράγα σαρκώδη.

Η οικογένεια *Amaryllidaceae*, αναφέρεται συχνά και με την κοινή ονομασία Amaryllids, το όνομα της προέρχεται από το γένος Amaryllis. Στην οικογένεια αυτή ανήκουν κυρίως ποώδη, πολυετή, βολβώδη ανθοφόρα φυτά, με γραμμοειδή φύλλα και με την πλέον τυπική για τα μονοκότυλα κατασκευή ανθέων. Τα άνθη φύονται κατά σκιάδια που φέρουν στη βάση τους μία μεμβρανώδη σπάθη. Τα εντυπωσιακά άνθη αυτής της οικογένειας ποικίλουν στο σχήμα και χρώματα τους που μπορεί να είναι κόκκινο, πορτοκαλί, κίτρινο, μπλε, ροζ και λευκό. Όλα τα γένη της οικογένειας φέρουν υπόγειο βλαστό, βολβό, με τον οποίο διατηρούνται στη ζωή κατά την δυσμενή περίοδο. Είναι ερμαφρόδιτα, ακτινόμορφα ή ελαφρά ζυγόμορφα, με εξαμερές περιγόνιο που ξεκινάει από την κορυφή της ωοθήκης ή από τον υπανθιακό σωλήνα. Καρπός κάψα (μερικές φορές με σαρκώδες περίβλημα). Πολλαπλασιάζονται ανάλογα με το είδος με σπόρο, μοσχεύματα βολβού, διαίρεση και παραφυάδες που αναπτύσσονται γύρο από τον μητρικό βολβό.

Τα μέλη της οικογένειας *Amaryllidaceae* έχουν παρόμοια μορφή με τα μέλη της οικογένειας κρεμμυδιών (*Alliaceae*) όπου διαφέρουν στην κατοχή μιας ανώτερης ωοθήκης και της παρουσίας αλλυλικών ενώσεων σουλφιδίου που τους δίνουν τη χαρακτηριστική μυρωδιά τους.

Η οικογένεια *Amaryllidaceae* απαριθμεί, πάνω από **800** είδη (species) από πολυετή φυτά με βολβό και σπάνια φυτά με ριζώματα, με παγκόσμια διανομή, τα οποία κατανέμονται στα κάτωθι **58** γένη (genera).

1	Amaryllis	21	Habranthus	41	Phycella
2	Ammocharis	22	Haemanthus	42	Placea
3	Apodolirion	23	Halmyra	43	Plagiolirion
4	Braxireon	24	Hannonia	44	Proiphys
5	Brunsvigia	25	Hessea	45	Pseudostenomesson
6	Caliphruria	26	Hippeastrum	46	Queltia
7	Calostemma	27	Hymenocallis	47	Rauhia
8	Carregnoa	28	Ismene	48	Rhodophiala
9	Chianthemum	29	Lapiedra	49	Scadoxus
10	Clivia	30	Leptochiton	50	Stenomesson
11	Cooperia	31	Leucojum	51	Sternbergia
12	Corbularia	32	Lycoris	52	Strumaria
13	Crinum	33	Mathieua	53	Tapeinanthus
14	Cyrtanthus	34	Narcissus	54	Ungernia
15	Eucharis	35	Nerine	55	Urceolina
16	Eucrosia	36	Oporanthus	56	Vagaria
17	Eurycles	37	Pamianthe	57	Worsleya
18	Galanthus	38	Pancratium	58	Zephyranthes
19	Gethyllis	39	Paramongaia		
20	Griffinia	40	Phaedranassa		

Πίνακας 2. Τα 58 γένη της οικογένειας *Amaryllidaceae*

Panocratium maritimum

Το φυτό *Panocratium maritimum* είναι ένα βολβώδες, αμμόφιλο, αυτοφυές φυτό που ζει και ολοκληρώνει τον βιολογικό του κύκλο στα παράλια της Μεσογείου και της Ιβηρικής χερσονήσου, από την πλευρά του Ατλαντικού από το Γιβραλτάρ μέχρι και τον Βискаϊκό κόλπο, τον Εύξεινο Πόντο και την Κασπία Θάλασσα. Επίσης πληθυσμοί συναντώνται σε εκβολές ποταμών και χειμάρρων.

Στην Ελλάδα συναντάται σε παραλιακές περιοχές, όπως στην Κρήτη όπου το βρίσκουμε στην Ιεράπετρα, στα Μάλια, στη Χερσόνησο, στο Δραπανία Χανίων καθώς επίσης και σε περιοχές της Αττικής όπως το Φάληρο, το Λαύριο και το Σούνιο. Πιθανόν όμως η χρησιμοποίηση της άμμου ως οικοδομικό υλικό και η αύξηση του τουρισμού να είχε αρνητικές επιπτώσεις στην επιβίωση του, έτσι δυστυχώς στις μέρες μας, οι πληθυσμοί του φυτού αυτού συνεχώς μειώνονται (είδος προς εξαφάνιση).

Το *Panocratium maritimum* αρχίζει να ανθίζει από τον Αύγουστο έως τον Οκτώβριο, όταν τα μεγάλα, ταινιοειδή φύλλα του έχουν ξεραθεί. Τα άνθη του που έχουν χρώμα λευκό είναι μεγάλα, σχήματος χοανοειδές, 3-15 σε κάθε σκιάδιο, τα οποία είναι εύοσμα με μια απαλή ευχάριστη οσμή κρίνου που γίνεται αντιληπτή σε συνθήκες άπνοιας τις καλοκαιρινές νύχτες. Οι ανθήρες είναι κίτρινοι σε 6 μακρούς και λευκούς στήμονες. Μετά την άνθηση σχηματίζονται χοντρές κάψες, που έχουν τους σπόρους. Όταν σκάσουν οι κάψες, οι μαύροι ανάλαφροι σπόροι (που μοιάζουν με κομμάτια κάρβουνου) διασκορπίζονται με τον αέρα στην θάλασσα, μεταφέρονται επιπλέοντας με τα κύματα και διασπείρονται στις ακτές για να δώσουν νέα φυτά. Ο κρίνος αυτός, που ευδοκμεί εκεί που τελειώνει το χειμέριο κύμα, είναι γνωστός από αρχαίες εικονογραφήσεις και πασίγνωστος από τις τοιχογραφίες της υστεροκυκλαδικής Θήρας.

Σύμφωνα με τους Gutterman (1997) και Fragman και Shmida (1996), η ικανότητα του φυτού να επιβιώνει σε αντίξοες συνθήκες, όπως υψηλή θερμοκρασία, ξηρασία, περιορισμένη υγρασία και αυξημένη αλατότητα, το όμορφο και αρωματικό άνθος του και η πιθανότητα χρήσης του σαν φαρμακευτικό φυτό, καθιστούν το *P. Maritimum* ικανό για έρευνα τόσο από άποψη φυσιολογίας όσο και από την δυνατότητα καλλιέργειας σαν ανθοκομικό φυτό. Ακόμα η παρουσία του σε αμμόλοφους καθιστά το γεωγραφικό ανάγλυφο της περιοχής ανθεκτικότερο στην αιολική διάβρωση.

Η ονοματολογία του φυτού *Pancratium* που αναφέρεται στο γένος του φυτού, είναι ελληνική λέξη που σημαίνει δύναμη, πιθανώς αναφέρεται στην αντοχή των φυτών αυτών που αναπτύσσονται σε ακραία κλίματα όπως στην ξηρασία και την καυτή άμμο του καλοκαιριού. Η λέξη *Maritimum* που αναφέρεται στο είδος του φυτού, είναι λατινική λέξη και σημαίνει αυτός που σχετίζεται με τη θάλασσα, επειδή το φυτό βρίσκεται συνήθως σε αμμώδεις περιοχές δίπλα στη θάλασσα. Το φυτό *Pancratium Maritimum* έχει κ άλλες γενικές ονομασίες όπως Sea Daffodil, Sea Lily, Sand Lily ενώ στα ελληνικά πολλές φορές αναφέρεται ως κρινάκι της θάλασσας ή θαλασσόκρινος.

Στο *Pancratium* ανήκουν 15 είδη της Μεσογείου, της τροπικής Αφρικής και της τροπικής Ασίας (Hickey και King, 1994).

Μορφολογία

Φύλλα

Τα φύλλα του *Pancratium* βγαίνουν αντίθετα στο ίδιο επίπεδο και σε μεγάλους αριθμούς, συνήθως 4-10 μαζί, όπου μερικές φορές φτάνουν και τα 18 φύλλα ανά φυτό. Είναι γκριζοπράσινα, σαρκώδη, ταινιοειδή, άτριχα με πλάτος 1,5-3 cm και μήκος που φτάνει τα 35 cm.



Εικόνα 3. Φύλλα του *Pancratium Maritimum*

Στην Κρήτη και σε άλλα ξηρά μέρη της Μεσογείου τα φύλλα αρχίζουν να μειώνονται από τον Απρίλιο. Μέχρι τα τέλη Ιουνίου λόγω των υψηλών θερμοκρασιών και της έλλειψης υγρασίας όλα τα φύλλα έχουν ξεραθεί. Επανεμφανίζονται από την τελευταία βδομάδα του

Σεπτεμβρίου έως τα τέλη Οκτωβρίου ανάλογα με τις ημερομηνίες εμφάνισης των τελευταίων και των πρώτων βροχών αντίστοιχα. Σημαντική μείωση των φύλλων παρατηρείται στα φυτά γλάστρας ή σε καλά αρδευόμενο έδαφος όχι όμως πλήρης εξαφάνιση.

Άνθη και ταξιανθίες

Τα άνθη του *Pancreatium* χρώματος λευκό, φέρονται σε ταξιανθία σκιαδίου με μικρό μίσχο, 3-15 άνθη μαζί, στην κορυφή ενός ισχυρού βλαστού. Το μήκος της ταξιανθίας κυμαίνεται από 10 έως 26 cm. Είναι εύοσμα, μεγάλα με μήκος 10-15 cm, με σωλήνα κωνικό μήκους 60-80 mm, ερμαφρόδιτα, ακτινόμορφα με περιάνθιο χοανοειδές που αποτελείται από 6 ενωμένα τέπαλα, τους στήμονες, σε δυο σειρές (3+3) με δίχωρους ανθήρες και με υποφυή τρίχωρη ωοθήκη αποτελούμενη από τρία ενωμένα καρπόφυλλα, μήκους περίπου 2 cm. Το άνθος έχει μόνο στύλο και πολλές ανάστροφες σπερματικές βλάστες.



Εικόνα 4. Άνθη *Pancreatium Maritimum*

Η περίοδος της άνθησης καθώς και η διάρκειά της διαφέρει στις διάφορες περιοχές της Κρήτης αλλά και της Μεσογείου. Σε κάποιες περιοχές η άνθηση αρχίζει τέλη Αυγούστου έως τέλη Σεπτεμβρίου και διαρκεί 30-40 ημέρες και σε κάποιες άλλες αρχίζει αρχές Ιουλίου και συνεχίζεται έως τα μέσα Αυγούστου. Η διαφορά αυτή στην περίοδο της άνθησης οφείλεται στην διαφορά της διαθέσιμης υγρασίας που υπάρχει ανάμεσα στις περιοχές αυτές. Η άνθηση αρχίζει πριν ή λίγο μετά το μεσημέρι και η διαδικασία ολοκληρώνεται σε 2-3 ώρες. Τα άνθη κάθε ταξιανθίας ανθίζουν ένα κάθε φορά και σπανιότερα δύο ή περισσότερα.

Καρπός και σπέρματα

Ο καρπός είναι κάψα ωοειδής, τρίχωρη, με μήκος 30 mm, πάχος 15 mm και βάρος 10 g. Κάθε κάψα περιέχει 20 σπέρματα που είναι ανισομεγέθη και περιβάλλονται από ελαφρό, ξηρό και σπογγώδες μαύρο σπερματικό περίβλημα. Η εξωτερική επιδερμίδα του περιβλήματος αποτελείται από ένα συμπαγές μαύρο προστατευτικό στρώμα. Στο εσωτερικό του αποτελείται από μια περιοχή με μεγάλα ακανόνιστου σχήματος λεπτότοιχα και γεμάτα αέρα νεκρά κύτταρα, με μεγάλους μεσοκυττάριους χώρους, μηχανισμός ο οποίος βοηθάει τα σπόρια να παρασυρθούν από τον άνεμο σε μακρινές αποστάσεις και να επιπλέουν στην θάλασσα.



Εικόνα 5. Καρπός *Pancratium Maritimum*

Τα σπέρματα ελευθερώνονται από τα τέλη Οκτωβρίου έως τα μέσα Ιανουαρίου ανάλογα με την ημερομηνία άνθησης και τις συνθήκες υγρασίας. Η βλαστική ικανότητα των σπερμάτων είναι αρκετά υψηλή, παρουσιάζει όμως διακυμάνσεις από χρονιά σε χρονιά. Μόλις παρασυρθούν τα σπέρματα από τον άνεμο και βρεθούν σε κατάλληλες συνθήκες τότε αρχίζει και η βλάστησή τους.

Υπόγειο μέρος

Ριζικό σύστημα

Οι βολβοί έχουν γενικά 3 τύπους ριζικών συστημάτων. Στον πρώτο τύπο έχουμε ένα σταθερό αριθμό ριζών χωρίς διακλαδώσεις, στο δεύτερο τύπο έχουμε ένα σταθερό αριθμό διακλαδιζόμενων ριζών και στο τρίτο τύπο σχηματίζονται συνεχώς ρίζες κατά τη διάρκεια της

ανάπτυξης (Kawa και De Hertogh, 1992). Οι ρίζες του *Pancratium* ανήκουν στον τρίτο τύπο ριζικού συστήματος και είναι διακλαδιζόμενες σε μικρό βαθμό. Έχουν ριζικά τριχίδια και συσταλτικές ρίζες όπου ο ρόλος τους είναι να τοποθετούν τα αποθηκευτικά όργανα του φυτού σε σωστό βάθος και να μην τα αφήνουν να βγουν πάνω από το έδαφος (Putz, 1996).

Το ριζικό σύστημα του *Pancratium* είναι βαθύ (μπορεί να φτάσει και το 1,5 m). Οι ρίζες 10-15 στον αριθμό φύονται περιμετρικά της βάσης του βολβού, με πάχος 0,5 cm περίπου και πολύ σκληρό αιχμηρό άκρο.

Βολβοί

Ο βολβός του *Pancratium* είναι πολυετής, χιτωνωτός με περίμετρο έως 19 cm. Αποτελείται από τις βάσεις των φύλλων (παχύνσεις) όπου περικλείουν ολόκληρο το βολβό (Rees, 1972).



Εικόνα 6. Βολβός φυτού *Pancratium Maritimum*

Ανάπτυξη βολβών

Κάθε βολβός ακολουθεί ένα χαρακτηριστικό κύκλο ανάπτυξης. Αρχίζει σαν μερίστωμα και τελειώνει με την άνθηση και την παραγωγή σπόρων. Αυτός ο κύκλος περιλαμβάνει δυο στάδια: α) το βλαστικό και β) το αναπαραγωγικό.

Στο βλαστικό στάδιο ο βολβός μεγαλώνει σε μέγεθος που να μπορεί να ανθίσει και να επιτυγχάνεται το μέγιστο βάρος του. Στο αναπαραγωγικό στάδιο έχουμε την επαγωγή και έναρξη της άνθησης, την διαφοροποίηση των ανθικών μερών, την επιμήκυνση του ανθοφόρου βλαστού και τέλος την άνθηση.

Λήθαργος και περιοδικότητα

Η λέξη «λήθαργος» έχει ερμηνευτεί κατά καιρούς από διάφορους επιστήμονες, οι οποίοι έχουν δώσει και τον δικό τους ορισμό. Σύμφωνα με τον Rees, λήθαργος είναι η παρεμπόδιση της αύξησης (που συχνά δεν είναι πλήρης), εξαιτίας κάποιου εξωτερικού παράγοντα που δρα μέσω ενός εσωτερικού μηχανισμού (αληθής λήθαργος), ή αποκλειστικά εξαιτίας κάποιου εσωτερικού μηχανισμού ή εξαιτίας κάποιου εξωτερικού παράγοντα μόνο (επιβαλλόμενος λήθαργος). Ο Δραγασάκη λέει ότι είναι η προσωρινή διακοπή της ορατής αύξησης των μεριστωματικών δομών. Τέλος οι Le Nard, De Hertogh, προτείνουν τον ακόλουθο ορισμό: είναι μία περίπλοκη και δυναμική φυσιολογική, μορφολογική και βιοχημική κατάσταση, στη διάρκεια της οποίας δεν συμβαίνουν εμφανείς μορφολογικές μεταβολές και αύξηση. Ωστόσο εσωτερικά συμβαίνουν πολλές φυσιολογικές ή μορφολογικές μεταβολές.

Η έναρξη του λήθαργου είναι ορατή από την εμφάνιση μορφολογικών μεταβολών σε οποιοδήποτε μέρος του φυτού πραγματοποιούνται. Ελέγχεται όμως από διαφορετικούς παράγοντες ή συνδυασμό παραγόντων οι οποίοι δεν είναι εύκολο να καθοριστούν γιατί στην φύση η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα του νερού και η φωτοπερίοδος δεν μεταβάλλονται ανεξάρτητα η μία από την άλλη. Επίσης έχει αναφερθεί από ερευνητές ότι ο λήθαργος μπορεί να ελεγχθεί με ενδογενείς φυτορμόνες.

Το *Panocratium* παρουσιάζει θερινό λήθαργο στην Κρήτη και στο Ισραήλ, το τέλος του λήθαργου είναι ορατό από την εμφάνιση της ταξιανθίας στις αρχές του Ιουλίου έως τα τέλη του Σεπτεμβρίου. Οι παράγοντες που ευθύνονται για το λήθαργο είναι εξωτερικοί και κυρίως είναι η υγρασία, αλλά ευθύνη έχει και η υψηλή ή χαμηλή θερμοκρασία επίσης μπορεί να ευθύνονται και εσωτερικοί παράγοντες.

Άνθηση

Η διαδικασία της άνθησης σύμφωνα με τον Rees (1972, 1992) περιλαμβάνει πέντε στάδια:

1. Έναρξη της άνθησης
2. Δημιουργία των ανθικών μερών
3. Οργανογένεση και διαφοροποίηση των ανθικών μερών
4. Ωρίμανση και ανάπτυξη των ανθικών μερών
5. Άνθηση

Ο χρόνος της δημιουργίας της ανθικής καταβολής διαφέρει ανάμεσα στα γένη των βολβωδών φυτών αλλά και ανάμεσα στα είδη του ίδιου γένους.

Στο *Pancratium maritimum* η ανθική καταβολή σχηματίζεται στη διάρκεια ή αμέσως μετά την άνθηση. Η συγκεκριμένη καταβολή θα ανθίσει μετά από δύο χρόνια. Έτσι στον βολβό υπάρχουν το στέλεχος της ταξικαρπίας του τρέχοντος έτους, η καταβολή της ταξιανθίας του επόμενου και του μεθεπόμενου έτους καθώς και η βλαστική κορυφή που τη συγκεκριμένη περίοδο παράγει φύλλα.

Τα άνθη της ταξιανθίας του φυτού διαφοροποιούνται αργά, κυρίως τον πρώτο χρόνο, ενώ τον δεύτερο χρόνο τα περισσότερα άνθη έχουν φτάσει στο τελικό στάδιο διαφοροποίησης.

Στο *Pancratium maritimum* (Slabbert, 1997) η διαφοροποίηση των ανθέων συμβαίνει σταδιακά και ο χρόνος διάρκειας είναι πιθανότατα μεγάλος αφού πρέπει να σχηματιστεί ταξιανθία με πολλά άνθη. Τα άνθη που δεν έχουν προλάβει να διαφοροποιηθούν πλήρως το πιο πιθανό είναι να απορριφθούν πριν ανθίσουν φαινόμενο συχνό για το *Pancratium* καθώς και σε άλλα είδη.

Παράγοντες που επηρεάζουν την άνθηση

Εσωτερικοί παράγοντες

Όπως όλα τα φυτά, έτσι και οι βολβοί πρέπει να φτάσουν σε ένα κατάλληλο στάδιο για να ανθίσουν. Το στάδιο αυτό είναι κάποιο στάδιο νεανικότητας το οποίο διαρκεί από ένα έως επτά χρόνια.

Το μέγεθος είναι ένας βασικός παράγοντας ο οποίος καθορίζει την ικανότητα ενός βολβού να ανθίσει. Οι βολβοί που είναι μικρότεροι από ένα μέγεθος δεν ανθίζουν. Το οριακό

αυτό μέγεθος διαφέρει από γένος σε γένος, από είδος σε είδος και από ποικιλία σε ποικιλία. Το μέγεθος ίσως να σχετίζεται με την παρουσία αποθεμάτων που είναι διαθέσιμα για την άνθηση.

Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Ένταση φωτός και φωτοπερίοδου

Οι βολβοί, με μερικές εξαιρέσεις, δεν επηρεάζονται από την ένταση του φωτός και τη φωτοπερίοδο.

Θερμοκρασία

Είναι ο σπουδαιότερος παράγοντας που επηρεάζει τη δημιουργία και τη διαφοροποίηση των ανθέων. Η ανάγκη των βολβών για την κατάλληλη θερμοκρασία είναι ποσοτική και ποιοτική (Rees, 1972).

Πολλαπλασιασμός

Το *Pancratium Maritimum* είναι ένα φυτό το οποίο μπορεί να πολλαπλασιαστεί και εγγενώς (με σπόρο) και αγενώς (με βολβούς). Παρακάτω ακολουθεί αναλυτική περιγραφή των δύο αυτών τρόπων.

Εγγενής πολλαπλασιασμός – με σπόρο

Το *Pancratium Maritimum* είναι ένα φυτό το οποίο πολλαπλασιάζεται με σπόρο. Αν και σε περιοχές όπου δεν υπάρχουν πολλοί επισκέπτες και τα φυτά συμπληρώσουν τον βιολογικό τους κύκλο, ο σπόρος του ελευθερώνεται σε μεγάλες ποσότητες και μεταφέρεται σε μεγάλες αποστάσεις με την βοήθεια του ανέμου και της θάλασσας, τα σπορόφυτα που θα δημιουργηθούν είναι λίγα.

Γενικά ο πολλαπλασιασμός των γεώφυτων με σπόρο είναι δύσκολος για τους ερασιτέχνες και τους επαγγελματίες ανθοκόμους. Χρησιμοποιείται κυρίως από τους ερευνητές επιστήμονες γεωπόνους για τη δημιουργία νέων ποικιλιών. Επιπλέον ο σημαντικότερος λόγος που καθιστά τον πολλαπλασιασμό με σπόρο σαν την λιγότερο χρησιμοποιούμενη μέθοδο πολλαπλασιασμού, είναι ότι τα φυτά χρειάζονται αρκετά χρόνια για να ανθίσουν (Κανταρτζής, 1992).

Αγγεής πολλαπλασιασμός – με βολβό

Ο φυσικός αγγεής πολλαπλασιασμός έχει πολλά πλεονεκτήματα, έχει όμως και μειονεκτήματα, όπως η μικρή παραγωγή βολβιδίων. Ο μητρικός βολβός ανθίζει μόνο μια φορά και στη συνέχεια αντικαθίσταται από έναν ή περισσότερους δευτερεύοντες βολβούς, οι οποίοι αν δεν έχουν το κατάλληλο μέγεθος μπορούν να καλλιεργηθούν μέχρι να το αποκτήσουν, έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν για πολλαπλασιασμό.

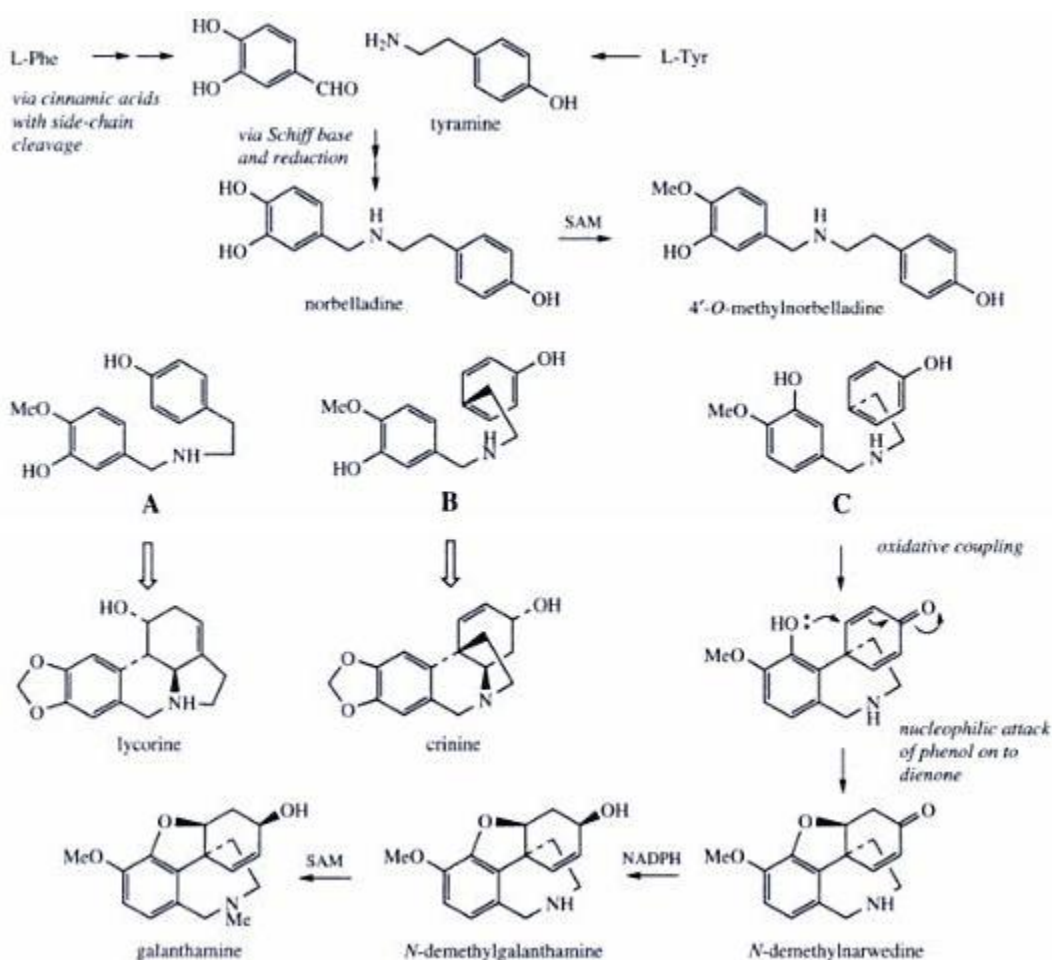
Οι βολβοί του *Pancreatum* είναι πολυετείς και η βλαστική κορυφή παράγει φύλλα και ταξιανθίες συνεχώς. Το νέο βολβίδιο αναπτύσσεται πριν την ταξιανθία και ακριβώς στο ίδιο σημείο. Τα ενήλικα (ανθίζοντα) φυτά έχουν πολύ αργούς ρυθμούς αναπαραγωγής. Έρευνα έχει δείξει ότι μόνο το 5% των βολβών με περίμετρο πάνω από 13 cm περιέχει ένα μόνο βολβό. Εξαιτίας του γεγονότος αυτού, έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές που αυξάνουν το ρυθμό παραγωγής νέων βολβιδίων από τους μητρικούς βολβούς.

Κυριότερα συστατικά του φυτού *Pancreatum Maritimum* που έχουν μελετηθεί

Η χημική σύσταση του φυτού *Pancreatum Maritimum* δεν είναι πλήρως ξεκάθαρη. Παλιότερες μελέτες έχουν ασχοληθεί κυρίως στην απομόνωση αλκαλοειδών από τους βολβούς του *Pancreatum Maritimum*. Τα λεγόμενα **αλκαλοειδή**, (Alkaloids), οπού το όνομα προέρχεται από τη λέξη αλκαλικός, αποτελούν ιδιαίτερη κατηγορία οργανικών ενώσεων, πολύ διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο, ενώ σπάνια εντοπίζονται στα ζώα. Πρόκειται για αλκαλικές ουσίες, (βάσεις που εξουδετερώνουν οξέα), των οποίων κύρια στοιχεία δομής τους είναι άτομα άνθρακα, οξυγόνου και αζώτου. Βρίσκονται σε ορισμένες τάξεις φυτών κυρίως σαν άλατα με οξέα, όπως και σαν εστέρες και γλυκοζίτες. Είδη αλκαλοειδών είναι η νικοτίνη, η καφεΐνη, η κινήνη, η κοκαΐνη, η μορφίνη, η στριχνίνη.

Στα φυτά της οικογένειας *Amaryllidaceae* περιέχονται αλκαλοειδή, στα οποία το βασικό ενδιάμεσο είναι το Norbelladine, το οποίο σχηματίζεται μέσω του συνδυασμού της 3,4 διυδροξυβενζαλδεΐδης με την τυραμίνη, αυτά τα δύο πρόδρομα σχηματίζονται από την φαινυλαλανίνη και την τυροσίνη αντίστοιχα [1-2]. Υπάρχουν τρεις κύριοι δομικοί τύποι αλκαλοειδών αυτού του είδους, όπου διαμορφώνονται με το σχηματισμό δακτυλίων, και με

ακολουθούμενη τροποποίηση του μεθυλιωμένου πρόδρομου μορίου Norbelladine 4-O-methylnorbelladine με διαφορετικούς τρόπους ευθυγράμμισης των φαινολικών δακτυλίων, επιτρέποντας την σύζευξη ηλεκτρονίων είτε para-ortho (A), para-para (B) ή ortho-para. Ο πρώτος τύπος δομής (A) περιλαμβάνει ενώσεις όπως τα αλκαλοειδή Lycorine, Norpluviine, Lycorenine, Homolycorine, τα οποία υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες στο *Pancretium Maritimum*. Ο δεύτερος τύπος (B), οδηγεί στο σχηματισμό του αλκαλοειδούς Haemanthamine, Tazettine και Pretazettine. Ο τρίτος τύπος (Γ) των *Amaryllidaceae* αλκαλοειδών οδηγεί σε αλκαλοειδή όπως Narwedine, Galanthamine. [3]



Από τους βολβούς του *Pancretium Maritimum* που έχει συλλεχθεί από την Αίγυπτο έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί τα ακόλουθα αλκαλοειδή : Lycorine, Tazettine, Pancracine,

Pancreatistatine, Lycorenine, Galanthamine, Sickenbergine, Homolycorine, Haemanthidine, Hippadine, Demethylhomolycorine, Narciclacine, Margetine, Tripheridine, Haemanthamine, Pseudolycorine, Ungermine, Ungiminorine, Zefbetaine αλλά και ένα γλυκοζιτικό παράγωγο της Narciclacine, που είναι ένας ευρέως διαδεδομένος μεταβολίτης στην οικογένεια *Amaryllidaceae* [4-9]

Επίσης από βολβούς που έχουν συλλεχθεί από τη Βουλγαρία έχουν απομονωθεί ακόμα περισσότερα αλκαλοειδη, εκτός από αυτά που προαναφέρθηκαν είναι τα ακόλουθα: Dihydrolycorine, Norpluviine, Hippeastrine, Hordenine, Harbanthine, Vittatine, Bobhanisine, Crinine, Marithidine, Lycoramine, Pancritamine, N-Formylgalanthamine, Demethylmarithidine [10]

Πρέπει να σημειωθεί ότι από τα παραπάνω αλκαλοειδή αυτά που απομονώθηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό από τους βολβούς του φυτού είναι τα εξής : Haemathamine, Tazettine, Pancracine, Lycorine, Galanthamine, N-Formylgalanthamine, Demethylmarithidine, Crinine, Buphanisine και Trisperidine. [10]

Haemanthidine (bulb)	Lycorine (bulb)	Hippeastrine (bulb)	Homolycorenine (bulb)
Galanthamine (bulb)	Tazettine (bulb)	Pancreatine (bulb)	Hordenine (shoot)
Vittatine (plant)	Demethylhomolycorine (bulb)	Lycorenine (bulb)	Trisperidine (bulb)
Homolycorine (bulb)	Sickenbergine (bulb)	Poetaricine (bulb)	Pancracine (plant)
Gracine (roots)	Buphanisine (leaves)	Crinine (bulbs)	Haemanthidine(bulb)
Ungeremine (bulbs)	Zefbetaine (bulb)	Pseudolycorine (bulb)	Narciclasine (bulb)
Hippadine (leaves)	Pretazettine (bulb)	Harbadine (bulb)	Homolycorine (bulb)
Galanthane(roots)	Crinane (leaves)	Demethylmarithidine (bulbs)	Dihydrocaranine (roots)

Πίνακας 2. Κυριότερα αλκαλοειδή που έχουν αναφερθεί για το *Pancreatium Maritimum* από το βολβό, βλαστό, φύλλα και ρίζα φυτού (πηγή www.maltawildplants.com)

Ιατρικές χρήσεις και εφαρμογές

Γενικά οι ενώσεις αλκαλοειδών παρουσιάζουν ενδιαφέρον κυρίως λόγω της φυσιολογικής τους δράσης με μακρόχρονη ιστορία επί φαρμακευτικών ιδιοτήτων διότι τα υδατοδιαλυτά άλατα ορισμένων αλκαλοειδών χρησιμοποιούνται σε μικρά ποσά στα φάρμακα επίσης δρουν και ως ναρκωτικά ή παραισθησιογόνα. Ενώ σε μεγάλα ποσά είναι τοξικά και προκαλούν βλάβες στον ανθρώπινο οργανισμό, οπότε σε μεγαλύτερη δόση χαρακτηρίζονται δηλητηριώδη. Στην Ιατρική, τα αλκαλοειδή ταξινομούνται ανάλογα της φυσιολογικής τους δράσης σε: δηλητήρια αλκαλοειδή, ναρκωτικά, αναλγητικά, καρδιοτονωτικά, διεγερτικά αναπνευστικού, αγγειοσυσταλτικά, τοπικά αναισθητικά, μυοχαλαστικά και ψυχεδελικά.

Το *P. Maritimum* θεωρείται φαρμακευτικό φυτό και διεξάγεται αρκετή έρευνα για την απομόνωση από τους βολβούς του ουσιών με πιθανές φαρμακευτικές ιδιότητες. Το γλυκοζιτικό παράγωγο της Narciclaicine, που είναι ένας ευρέως διαδεδομένος μεταβολίτης στην οικογένεια *Amaryllidaceae* με ισχυρή αντιμυτωτική δράση, έχει απομονωθεί και από βολβούς του *Pan.Maritimum*. Η Ungerimine και Zefbetaine παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες βιολογικές δράσεις, και συγκεκριμένα εμφανίζουν κυττοτοξική και αντιβιοτική δράση καθώς και ιδιότητες φυτορμονών, δηλαδή αποτελούν ρυθμιστές της ανάπτυξης του φυτού [8]. Επίσης από πρόσφατες μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι τα αλκαλοειδή Pancratistatine και Ungiminorine παρουσιάζουν αντικαρκινικές ιδιότητες, το Lycogine παρουσιάζει ισχυρή αντική δραστηριότητα ενάντια στον ιό της πολιομυελίτιδας, της ιλαράς και στον ιό του έρπητα, ισχυρή αντιμυτωτική και κυττοτοξική δράση καθώς επίσης έχει και αναλγητικές ιδιότητες. Το αλκαλοειδές Galanthamine εκτός από τις αναλγητικές ιδιότητες (παρόμοιες με μορφίνη), λειτουργεί και ως αντιχολινεργικό, όπως και το Haemanthamine αλλά με μικρότερη δραστηριότητα. Δηλαδή τα αλκαλοειδή Galanthamine και Haemanthamine δρουν κυρίως ως αντιστρεπτοί παρεμποδιστές της ακετυλοχολινεστεράσης, η οποία εντείνει την λειτουργίες της ασθένειας Alzheimer και άλλων νευρολογικών ασθενειών [10-14].

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του φυτικού οργανισμού *Pancreatium Maritimum*, που είναι ένα βολβώδες, αυτοφυές, αμμόφιλο φυτό που ανήκει στην οικογένεια Amaryllidaceae. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε απομόνωση και χαρακτηρισμός δυο πρωτεϊνών, από τους βολβούς του φυτού. Η απομόνωση και ο καθαρισμός των πρωτεϊνών έγινε με χρήση της υδροχρωματογραφίας κατιονανταλλαγής. Ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών αυτών με τη χρήση της φασματοσκοπίας μάζας, έγινε με βάση την ομολογία που παρουσιάζουν στην αλληλουχία των πεπτιδίων τους με άλλους φυτικούς οργανισμούς, των οποίων το γονιδίωμα είναι γνωστό και κατ'επέκταση και η αλληλουχίες των πρωτεϊνών. Έτσι μπορεί να γίνει μια πρώτη εκτίμηση και για το προσδιορισμό της λειτουργίας των πρωτεϊνών στο κύτταρο.

Επίσης σκοπός της εργασίας είναι και η απομόνωση αλκαλοειδών ενώσεων από τους βολβούς του φυτού *Pancreatium Maritimum* σε μεθανολικό εκχύλισμα, οι ενώσεις αυτές είναι γνωστές για την ποικιλία των φαρμακευτικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν. Με χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας έγινε μια πρώτη εκτίμηση για την σύσταση του μίγματος των αλκαλοειδών, και έπειτα με την χρήση της χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης, πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός του μίγματος. Από τα κλάσματα της χρωματογραφίας HPLC, στα δυο κύρια πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπία μάζας για τον χαρακτηρισμό τους. Ενώ έγινε και έλεγχος της κυτταροτοξικότητας του μεθανολικού εκχυλίσματος του μίγματος των αλκαλοειδών καθώς και των δυο ταυτοποιημένων κλασμάτων, σε καρκινικά κύτταρα σειράς HeLa.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Φρέσκοι βολβοί του φυτού *Pancreatium Maritimum* μαζεύτηκαν από την αμμώδη παραλία του Δραπανιά Κισσάμου Χανίων.

Φυγοκέντρωση

Η φυγοκέντρωση είναι μία σημαντική και εύκολη μέθοδος διαχωρισμού και ανάλυσης βιομορίων. Τα σωματίδια μετακινούνται (καταβυθίζονται) ανάλογα με τη μάζα τους, γι' αυτό όσο μεγαλύτερο μοριακό βάρος έχει μια πρωτεΐνη τόσο πιο γρήγορα μετακινείται. Επίσης, γρηγορότερα μετακινούνται οι πρωτεΐνες με μεγαλύτερη πυκνότητα και πιο συμπαγή δομή. Τέλος, όσο λιγότερο πυκνό είναι το διάλυμα με το μείγμα των σωματιδίων, τόσο πιο εύκολη είναι η καταβύθισή τους.

Οι φυγοκεντρήσεις πραγματοποιήθηκαν με την φυγόκεντρο Heraeus Sepatech, τύπου Suprafuge 22, χρησιμοποιώντας κεφαλή HFA 21.94, 21500rpm, No. 5156.

Απομόνωση και χαρακτηρισμός πρωτεϊνών από βολβούς *Pancreatium Maritimum*

Διαπίδυση

Πολλές φορές είναι απαραίτητο να απομακρυνθούν μικρομοριακές ουσίες που συνοδεύουν το δείγμα ή να αλλάξει εντελώς το ρυθμιστικό διάλυμα της πρωτεΐνης ώστε να επιτευχθεί μετάβαση από το ένα στάδιο του καθαρισμού στο επόμενο. Αυτό επιτυγχάνεται υποβάλλοντας το δείγμα σε διαπίδυση. Στη διαπίδυση, ένα πρωτεϊνικό διάλυμα τοποθετείται μέσα σε μια ημιπερατή μεμβράνη. Η μεμβράνη με το δείγμα τοποθετείται μέσα στο επιθυμητό ρυθμιστικό διάλυμα. Το ρυθμιστικό διάλυμα αναδεύεται αργά και αλλάζεται μια ή δυο φορές. Έπειτα η πρωτεΐνη αφαιρείται από το εσωτερικό της μεμβράνης και είναι έτοιμη να χρησιμοποιηθεί.

Προετοιμασία μεμβρανών

Οι μεμβράνες διαπίδυσης αρχικά ξεπλένονται με άφθονο νερό για την απομάκρυνση της γλυκερίνης και έπειτα με υδατικό διάλυμα 0,3% w/v θειώδους νατρίου για 1 λεπτό στους 80°C.

Στη συνέχεια ξεπλένονται για δύο λεπτά με νερό στους 60°C και οξινίζονται με διάλυμα 0,2%v/v θεικού οξέος. Στο τέλος γίνεται πλύση με θερμό νερό για την απομάκρυνση του οξέος.

Διαδικασία

Το δείγμα, μέσα στην ημιπερατή μεμβράνη, παραμένει για 16 ώρες υπό ανάδευση στο επιθυμητό διάλυμα στους 4°C, μετά τις δυο πρώτες ώρες γίνεται αλλαγή του διαλύματος.

Για την διαδικασία της διαπίδυσης χρησιμοποιήθηκαν σωληνοειδείς μεμβράνες (Sigma) με ικανότητα διαπερατότητας μορίων μοριακού βάρους έως 10kDa και χωρητικότητας 100ml/ft.

Υγρή χρωματογραφία

Με την υγρή χρωματογραφία είναι δυνατός ο διαχωρισμός και ο ποσοτικός προσδιορισμός πολικών, μη πτητικών ή θερμοευαίσθητων ενώσεων. Η υγρή χρωματογραφία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για δείγματα με μεγάλα μόρια ή ιονισμένα σωματίδια με χαμηλές τάσεις ατμών, και για θερμικά ασταθείς ενώσεις που δε μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπαστούν.

Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

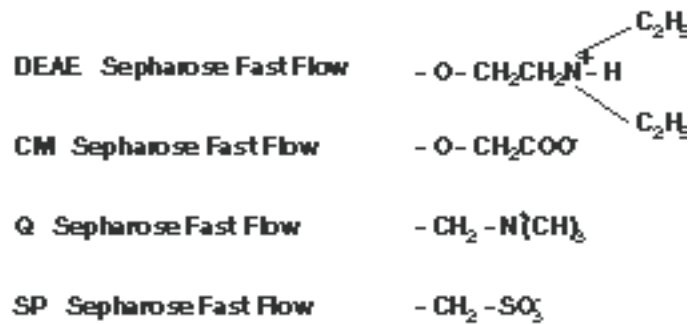
Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι από τις πιο συνηθισμένες χρωματογραφικές τεχνικές για τον διαχωρισμό καθώς και τον καθαρισμό πρωτεϊνών, ακόμα και σε βιομηχανική κλίμακα. Η αμφοτερική φύση του πρωτεϊνικού μορίου καθιστά βέβαιο ότι κάθε τέτοιο μόριο μπορεί, υπό ορισμένες συνθήκες, να προσροφηθεί με αντιστρέψιμο τρόπο σε κατάλληλο ιοντοανταλλάκτη. Οι χρωματογραφικοί ιοντοανταλλάκτες εξασφαλίζουν τη διατήρηση της ακεραιότητας και δραστηριότητας της αλληλεπιδρώντας πρωτεΐνης. Το πρωτεϊνικό μόριο αποτελείται από αμινοξέα καθένα από τα οποία φέρει χαρακτηριστική πλευρική ομάδα. Ανάλογα με το pH του διαλύματος, αυτή είναι φορτισμένη θετικά, αρνητικά ή είναι ηλεκτροστατικά ουδέτερη. Από την άλλη πλευρά, ο ιοντοανταλλάκτης φέρει φορτισμένες ομάδες πχ καρβοξυλομάδες ή τριτοταγείς αμινομάδες, χημικά δεσμευμένες στο πολυμερές υλικό των σφαιριδίων. Κάθε ομάδα εμφανίζεται εξουδετερωμένη, αφού φέρει ηλεκτροστατικά δεσμευμένο ιόν αντιθέτου φορτίου του διαλύματος, γνωστό ως αντισταθμιστικό ιόν (πχ Na^+ ή Cl^- αντίστοιχα). Περιοχές του πρωτεϊνικού μορίου με φορτίο αντίθετο προς το φορτίο των ομάδων του ιοντοανταλλάκτη έχουν

την ικανότητα να συναγωνίζονται και να απομακρύνουν το αντίστοιχο αντισταθμιστικό ιόν, με αποτέλεσμα την δέσμευση (προσρόφηση) της πρωτεΐνης στον ιοντοανταλλάκτη με ιοντικές αλληλεπιδράσεις. Οι κολώνες ιονανταλλαγής κατηγοριοποιούνται σε κατιονανταλλακτικές και σε ανιονανταλλακτικές ανάλογα με το αν δεσμεύουν πρωτεΐνες θετικά και αρνητικά φορτισμένες αντίστοιχα. Μη προσροφημένα μόρια ή πρωτεΐνες που κατακρατήθηκαν με αλληλεπιδράσεις άλλης φύσης απομακρύνονται από την στήλη με έκπλυση. Ακολούθως η προσροφημένη πρωτεΐνη εκλύεται είτε με αύξηση της ιοντικής ισχύος (οπότε μειώνονται οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις) είτε με μεταβολή του pH (οπότε μεταβάλλεται το ηλεκτρικό φορτίο της πρωτεΐνης).

Υγρή χρωματογραφία S - Sepharose

Η χρωματογραφική μέθοδος που χρησιμοποιούμε για το διαχωρισμό πρωτεϊνών από το crude που παρασκευάσαμε από τους βολβούς του *Pancreatium Maritimum* είναι η κατιονανταλλακτική χρωματογραφία με υλικό πλήρωσης την S-Sepharose. Το χρωματογραφικό υλικό της S-Sepharose βασίζεται στην αγαρόζη (agarose), το οποίο είναι σημαντικό φυσικό πολυμερές και αποτελείται από πολυσακχαρικές αλυσίδες. Η αλυσίδα της αγαρόζης αποτελείται δισακχαρίτες αγαροβιόζης συνδεμένους μέσω γλυκοζιτικών δεσμών α -1,3. Σε κάθε μονάδα αγαροβιόζης η D-γαλακτόζη συνδέεται με την 3,6-ανυδρο-L-γαλακτόζη μέσω γλυκοζιτικού δεσμού β -1,4. Πηκτές αγαρόζης σε μορφή σφαιριδίων (beads), συγκέντρωσης 2-10%, ονομάζονται Sepharose. Οι αλυσίδες πολυσακχαριτών sepharose για τους ιονικούς ανταλλάκτες τακτοποιούνται μέσα σε δέσμες .

Αυτές οι δέσμες ενισχύονται περαιτέρω από τους διαφορετικούς βαθμούς διασύνδεσης των αλυσίδων που παρέχουν μια υψηλή ακαμψία μητρών. Οι ιονικοί ανταλλάκτες Sepharose ανέχονται τις ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας, pH και χημικών παραγόντων καθώς επίσης είναι σταθεροί στο ύδωρ, στα διαλύματα αλάτων, και τους οργανικούς διαλύτες.



Εικόνα 7. Χαρακτηριστικές ομάδες των υλικών πλήρωσης της υγρής χρωματογραφίας S-Sepharose

Στην παραπάνω εικόνα απεικονίζονται οι χαρακτηριστικές ομάδες των υλικών πλήρωσης Sepharose. Το υλικό της υγρής χρωματογραφικής στήλης S Sepharose που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία έχει χαρακτηριστική ομάδα την $-CH_2-SO_3^-$.

Για την διαδικασία της χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκε το σύστημα υγρής χρωματογραφίας της Pharmacia, που αποτελείται από δύο περισταλτικές αντλίες τύπου P1, ανιχνευτή UV (280nm), καταγραφικό και μονάδα προγραμματισμού GP250. Η ροή των διαλυμάτων ήταν 1 ml/min. Όλα τα διαλύματα είχαν φιλτραριστεί με φίλτρα μεγέθους πόρων 0.45μm της PALL τύπου Supor® 200 και στη συνέχεια απαερωθεί.

Βιοχημικές μέθοδοι για χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών

Ο χαρακτηρισμός της απομονωμένων πρωτεϊνών πραγματοποιείται με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου και με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού. Ο ποσοτικός προσδιορισμός τους πραγματοποιείται με τη μέθοδο Bradford [15].

Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε πηκτές πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού μορίων ή σωματιδίων με πολλές εφαρμογές στην μοριακή βιολογία, βιοχημεία, πρωτεϊνική χημεία, φαρμακολογία, εγκληματολογία κ.α. Χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό της καθαρότητας ενός

δείγματος, ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο, προσδιορισμό μοριακού βάρους (M.B.) ενώ ως δείγματα μπορεί να είναι οτιδήποτε μπορεί να κουβαλάει φορτίο – από ολόκληρα κύτταρα έως πρωτεΐνες, πεπτίδια, νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA), αμινοξέα, φαρμακευτικές ουσίες, οργανικά οξέα και βάσεις και πολλά άλλα.

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (SDS-PAGE) είναι η πιο αξιόπιστη μέθοδος για τον διαχωρισμό και ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων ενώ παράλληλα συνδυάζεται εύκολα και αποτελεσματικά με άλλες μεθόδους (π.χ. western blotting, mass spectrometry).

Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου είναι χημικά αδρανής και διάφανες με πόρους που δημιουργούνται από τον πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμιδίου με το αντιδραστήριο N,N'-methylenebisacrylamide. Το μίγμα (Ακρυλαμίδιο, Tris-base, SDS, APS, TEMED) χύνεται μέσα σε καλούπια και οι πηκτές είναι επίπεδες (ανάμεσα σε 2 επίπεδα γυαλιά με σφραγισμένα τα πλαϊνά άκρα τους) ενώ τα δείγματα τοποθετούνται σε οπές (wells), στο πάνω μέρος της πηκτής.

Οι πηκτές κατασκευάζονται με τη δημιουργία ενός 'συγκεντρωτικού gel (stacking gel) ακριβώς πάνω από το 'αναλυτικό' gel (resolving, running ή separation gel). Το stacking gel έχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου (4%) και συνεπώς μεγαλύτερους πόρους από το running gel (10%), στο οποίο γίνεται και ο διαχωρισμός του δείγματος. Η διαφορετική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου επιτρέπει δείγματα με μεγάλους όγκους να συγκεντρωθούν στην πρώτη πηκτική (stacking gel) πριν εισέλθουν στη δεύτερη πηκτική όπου και θα διαχωριστούν. Αυτό βελτιώνει κατά πολύ την ανάλυση καθώς όλο το δείγμα ξεκινάει να αναλύεται από το ίδιο σημείο. Με την βοήθεια του ηλεκτρικού ρεύματος και της πηκτής οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση την μάζα τους.

Οι πρωτεΐνες στην παρούσα μελέτη αναλύονταν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου υπό αναγωγικές συνθήκες.

Η σύσταση των πηκτών stacking και running αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

	Stacking	Running
ABmix	1 ml	6 ml
Gel Buffer	3 ml	10 ml
Urea	-	5.5 gr
APS	120 μ l	300 μ l
TEMED	15 μ l	20 μ l
Βτελ.	12 ml	30 ml

Πίνακας 3. Σύσταση stacking και running πηκτών για την αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Τα stock διαλύματα ή χημικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των πηκτών είναι τα εξής :

Διάλυμα **ABmix**: 49.5% Ακρυλαμίδιο/ 3% Bis-ακρυλαμίδιο,

Διάλυμα πηκτής **Gel Buffer**: 3 M Tris base, 0.3% SDS pH 8.45

10% **APS** διαλυμένο σε H₂O (Ammonium PerSulfate) (NH₄)₂S₂O₈

TEMED (TEtraMthylethyleneDiamine) (CH₃)₂NCH₂CH₂N(CH₃)₂

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου, που προκύπτει από το ριζικό πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και του N-N'-μεθυλένο-δις-ακρυλαμιδίου, χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών (Laemmli, 1970). Η χημική διάσπαση του υπερθειϊκού αμμωνίου δίνει τις ελεύθερες ρίζες που προκαλούν την έναρξη του πολυμερισμού: S₂O₈²⁻ → 2SO₄⁻. Η σταθεροποίηση των ριζών πραγματοποιείται με την προσθήκη τετραμέθυλο-αίθυλο-διαμίνη (TEMED). Το αντιδραστήριο APS είναι ένας ισχυρός φορέας οξειδωσης, χρησιμοποιείται μαζί με tetramethylethylenediamine (TEMED) για να καταλύσει τον πολυμερισμό ακρυλαμιδίου στην παραγωγή του πολυακρυλαμιδικού πηκτώματος. Μετά την προσθήκη των δυο αυτών αντιδραστηρίων, τα διαλύματα ανακινήθηκαν ελαφριά ώστε ο καταλύτης και ο εκκινητής να δράσουν σε όλο τον όγκο του διαλύματος, με αποτέλεσμα να υπάρχει ομοιομορφία στον πολυμερισμό.

Προετοιμασία του δείγματος

Οι πρωτεΐνες πριν ηλεκτροφορηθούν διαλύθηκαν σε διάλυμα **sample buffer** (διάλυμα μετουσίωσης) σε αναλογία 1:1. Η προετοιμασία του δείγματος είναι πολύ σημαντική και από μόνη της μπορεί να κρίνει την επιτυχία της ηλεκτροφόρησης.

Το διάλυμα **sample buffer** έχει την εξής σύνθεση:

Διάλυμα sample buffer	
Tris- HCl (pH 7)	150mM
SDS	12% w/v
Γλυκερόλη	30% w/v
Serva Blue G	0.09% w/v
b-mercaptoethanol	6% v/v

Πίνακας 4. Σύσταση διαλύματος **sample buffer** (διάλυμα μετουσίωσης)

Το SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) είναι ένα ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο δεσμεύεται με τις πρωτεΐνες (1,4g ανά g πρωτεΐνης). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποδιάταξη της τεταρτοταγούς και δευτεροταγούς δομής και την πρόσδοση αρνητικού φορτίου σε όλες τις πρωτεΐνες. Το τελευταίο εξαλείφει την επιρροή του φορτίου στην κινητικότητα και οι πρωτεΐνες κινούνται μόνο με βάση το M.B. Επίσης η χρήση του εκμηδενίζει όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης και την δημιουργία συμπλόκων.

Η γλυκερόλη είναι παχύρρευστο υγρό και βοηθάει το δείγμα να βυθιστεί στον πάτο της οπής του gel καθώς και την πορεία της πρωτεΐνης στο gel.

Η χρήση της οργανικής ουσίας Tris, είναι απαραίτητη γιατί προσδίδει το κατάλληλο pH για τη διατήρηση των πρωτεϊνών.

Η 2-mercaptoethanol είναι αναγωγική ουσία και διασπάει τους δισουλφιδικούς δεσμούς ανάμεσα στις κυστεΐνες των πρωτεϊνών και αποδιατάσει τις πρωτεΐνες, άρα συμβάλει στην πλήρη μετουσίωσή τους.

Το Serva Blue G (μπλε βρωμοφαινόλης) είναι χρωστική με αρνητικά φορτισμένα μόρια (άρα θα μετακινηθεί προς την άνοδο) και χρησιμοποιείται ως ένδειξη για την πορεία της ηλεκτροφόρησης.

Στη συνέχεια το δείγμα πριν τη φόρτωση τους στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου είτε θερμαίνεται στους 90-100°C για μερικά λεπτά, ώστε το SDS να δεθεί με τις πρωτεΐνες και να δράσει η αναγωγική ουσία (2-mercaptoethanol) ή αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Τέλος, το δείγμα φυγοκεντρείται ώστε να απομακρυνθούν οι αδιάλυτες ουσίες (καθώς επηρεάζουν αρνητικά την ανάλυση).

Η **ηλεκτροφόρηση** έγινε με τα διαλύματα:

Διάλυμα Ανόδου : 1 M Tris base, pH = 8.9

Διάλυμα Καθόδου : 1 M Tris base, 1 M Tricine και 1% SDS, pH = 8.25

και η διάρκειά της ηλεκτροφόρησης ήταν 3-4 ώρες σε συνθήκες ρεύματος στα 30 mA και σε σταθερή μέγιστη τάση στα 150 V. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν η Vertical Slab gel Unit Model SE 400 (Hoefer Scientific Instruments) και το τροφοδοτικό EPS500/400 (Pharmacia).

Χρώση πηκτών πολυακρυλαμιδίου

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες δεν φαίνονται και το αποτέλεσμα είναι ένα διάφανο gel. Η απεικόνιση των πρωτεϊνών επιτρέπεται με τη χρήση διαφόρων χρωστικών, οι οποίες δίνουν την δυνατότητα ανίχνευσης από 2-300 ng πρωτεΐνης. Η επιλογή της κατάλληλης χρωστικής εξαρτάται από την ευαισθησία που απαιτείται αλλά κυρίως από την συμβατότητα της χρωστικής με τεχνικές που θα ακολουθήσουν την ηλεκτροφόρηση. Οι χρωστικές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι οι :

1. Χρώση με κυανούν του Coomassie (Coomassie Brilliant Blue), όπου οι ποσότητες πρωτεϊνών που απαιτούνται για ανίχνευση είναι περίπου 0.1 μg ($\approx 2 \text{ pmol}$) και

2. Χρώση αργύρου (Silver stain) – όπου οι ποσότητες των πρωτεϊνών που απαιτούνται για ανίχνευση είναι ακόμα μικρότερες περίπου 0,02 μg.

Χρώση πηκτής με διάλυμα CBB

Η χρώση με διάλυμα Coomassie Brilliant Blue (CBB) χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό πρωτεϊνών.

Διαδικασία:

Αρχικά, προστίθεται στην πηκτή διάλυμα χρώσης και παραμένει υπό ανάδευση για μία περίπου ώρα. Έπειτα το διάλυμα χρώσης απομακρύνεται και προστίθεται το διάλυμα αποχρωματισμού. Η πηκτή παραμένει υπό ανάδευση μέχρι την απομάκρυνση του διαλύματος, όταν είναι πλέον ορατές μόνο οι πρωτεΐνες. Τέλος η πηκτή διατηρείται σε υδατικό διάλυμα 5% v/v οξικού οξέος.

Διάλυμα χρώσης		Διάλυμα αποχρωματισμού	
45% v/v	Μεθανόλη	40% v/v	Μεθανόλη
10% v/v	Οξικό οξύ	10% v/v	Οξικό οξύ
45% v/v	H ₂ O	50% v/v	H ₂ O
0,1% w/v	CBB R250		

Πίνακας 5. Διαλύματα χρώσης και αποχρωματισμού των πηκτών πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Χρώση πηκτής με άργυρο

Η χρώση αργύρου είναι μία ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση πρωτεϊνών πολύ μικρής συγκέντρωσης. Ο Ag^{2+} ανάγεται μέσω διαλύματος φορμαλδεΐδης σε Ag^0 . Ο μεταλλικός άργυρος προσδένεται στις ιστιδίνες των πρωτεϊνών οι οποίες αποκτούν μαύρο χρώμα.

Διαδικασία:

- 1) Η πηκτή τοποθετείται για 30 λεπτά υπό ανάδευση σε 100 ml διαλύματος:

30% v/v	Αιθανόλης
10% v/v	Οξικού οξέος
60% v/v	H_2O

- 2) Στο επόμενο στάδιο η πηκτή τοποθετείται για 30 λεπτά υπό ανάδευση σε αδιαφανές δοχείο, με 100 ml διαλύματος:

30% v/v	Αιθανόλης
0,4M	Οξικού νατρίου pH=6,5
0,5% v/v	γλουταραλδεΐδης
0,1% w/v	θειοθειϊκού νατρίου

- 3) Πραγματοποιούνται τρεις εικοσάλεπτες πλύσεις με νερό.

- 4) Η αναγωγή του αργύρου και η πρόσδεσή του στις πρωτεΐνες της πηκτής γίνεται με την τοποθέτησή της για 45 λεπτά σε 100 ml διαλύματος:

0,1% w/v	Νιτρικού αργύρου
0,025% v/v	φορμαλδεΐδης

- 5) Η εμφάνιση των πρωτεϊνών γίνεται με την εισαγωγή της πηκτής σε 100 ml διαλύματος:

2,5% w/v	Ανθρακικού νατρίου
0,04% v/v	φορμαλδεΐδης

- 6) Διακοπή της αντίδρασης γίνεται με υδατικό διάλυμα 5% v/v οξικού οξέος.

Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου (Tricine - SDS) για ανάλυση σε φασματογράφο μάζας MALDI

Η σύσταση των πηκτών stacking και running αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

	Stacking	Running
ABmix	3 ml	12 ml
Gel Buffer	3 ml	20 ml
Glycerol	-	6 ml
APS	270 μ l	300 μ l
TEMED	27 μ l	30 μ l
Υτελ.	36 ml	58 ml

Πίνακας 6. Σύσταση stacking και running πηκτών για την αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Tricine - SDS) για ανάλυση σε φασματογράφο μάζας MALDI

Το stacking gel έχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου (4%) και συνεπώς μεγαλύτερους πόρους από το running gel (10%), στο οποίο γίνεται και ο διαχωρισμός του δείγματος.

Τα stock διαλύματα ή χημικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των πηκτών είναι τα εξής :

Διάλυμα **ABmix**: 48% Ακρυλαμίδιο/ 1.5% Bis-ακρυλαμίδιο,

Διάλυμα πηκτής **Gel Buffer** : 3 M Tris base, 0.3% SDS pH 8.45

10% **APS** διαλυμένο σε H₂O (Ammonium PerSulfate) (NH₄)₂S₂O₈

TEMED (TEtraMthylethyleneDiamine) (CH₃)₂NCH₂CH₂N(CH₃)₂

Το διάλυμα **sample buffer** (διάλυμα μετουσίωσης) έχει την εξής σύνθεση:

150mM Tris- HCl (pH 7)

12% w/v SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)

30% w/v Γλυκερόλη

0.02% w/v Bromophenole blue

6% b-mercaptoethanol

Η ηλεκτροφόρηση έγινε με τα διαλύματα:

Διάλυμα Ανόδου : 1 M Tris base, pH = 8.9

Διάλυμα Καθόδου: 1 M Tris base, 1 M Tricine και 1% SDS, pH = 8.25

και η διάρκειά της ηλεκτροφόρησης ήταν 3-4 ώρες σε συνθήκες ρεύματος στα 30 mA και σε σταθερή μέγιστη τάση στα 150 V. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν η Vertical Slab gel Unit Model SE 400 (Hoefer Scientific Instruments) και το τροφοδοτικό EPS500/400 (Pharmacia).

Σημείωση:

Όλα τα παραπάνω διαλύματα και όλες οι διαδικασίες έγιναν με τη χρήση H₂O nanopure, φοράμε γάντια κατά όλη τη διάρκεια προετοιμασίας της πηκτής πολυακρυλαμιδίου διότι η φασματοσκοπία μάζας είναι παρουσιάζει ευαισθησία στην κερατίνη και πριν τη χρήση των καλουπιών (τζαμάκια) για την κατασκευή των πηκτών, τα καθαρίζουμε με 3% οξικό οξύ.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης και πριν τη χρώση της πηκτής, τοποθετούμε την πηκτή στο ακόλουθο διάλυμα, υπό ήπια ανάδευση κατά τη διάρκεια της νύχτας (overnight):

Methanol	450 ml
Acetic acid	10 ml
H ₂ O	540 ml

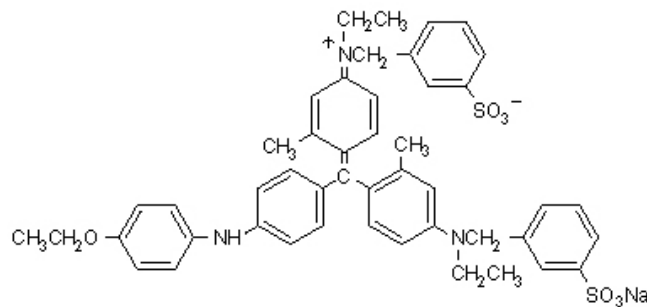
Έπειτα ακολουθεί η χρώση της πηκτής (Colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250):

Διάλυμα χρώσης	
Ammonium sulfate	17% w/v
Methanol	34% v/v
Acetic acid	0.5 v/v
Coomassie blue G250	0.1% w/v

Ο αποχρωματισμός της πηκτής πραγματοποιείται με nanopure H₂O

Μέθοδος προσδιορισμού πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας ενός δείγματος σε πρωτεΐνη σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford, βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής σε όξινο περιβάλλον, τη μεταβολή του μεγίστου απορρόφησης μετά τη συμπλοκοποίηση και τη μέτρηση της απορρόφησης του συμπλόκου αυτού. Η άμεση σχέση της απορρόφησης στα 595nm με την συγκέντρωση της πρωτεΐνης οφείλεται στον δεσμό που δημιουργείται μεταξύ της πρωτεΐνης και του Serva Blue G (εικόνα 7). Ο δεσμός του Serva Blue G με μια πρωτεΐνη προκαλεί μια μετατόπιση της απορρόφησης της βαφής από τα 465nm στα 595nm.



Εικόνα 7. Η δομή της χρωστικής Serva Blue G.

Για να υπολογιστεί η συγκέντρωση μιας πρωτεΐνης χρησιμοποιείται μια άλλη γνωστή συγκέντρωση πρωτεΐνη, με την βοήθεια της οποίας κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη. Αναλυτικότερα, το διάλυμα “working solution” προστίθεται σε αρκετά δείγματα της γνωστής πρωτεΐνης που ανά δύο είναι της ίδιας συγκέντρωσης, και λαμβάνονται οι απορροφήσεις στο φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος $\lambda=595\text{nm}$. Στην συνέχεια κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη, όπου ο κατακόρυφος άξονας είναι η απορρόφηση και ο οριζόντιος είναι ο όγκος της πρωτεΐνης (μl) που χρησιμοποιήθηκε (ο οποίος αντιστοιχεί σε συγκέντρωση $\mu\text{g/ml}$). Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με την πρότυπη πρωτεΐνη αλβουμίνη BSA, όπου η συγκέντρωση της είναι $C=1\text{mg/ml}$.

Ακολουθεί η λήψη των απορροφήσεων στο ίδιο μήκος κύματος των διαλυμάτων της προς μέτρηση πρωτεΐνης αυξανόμενου όγκου.

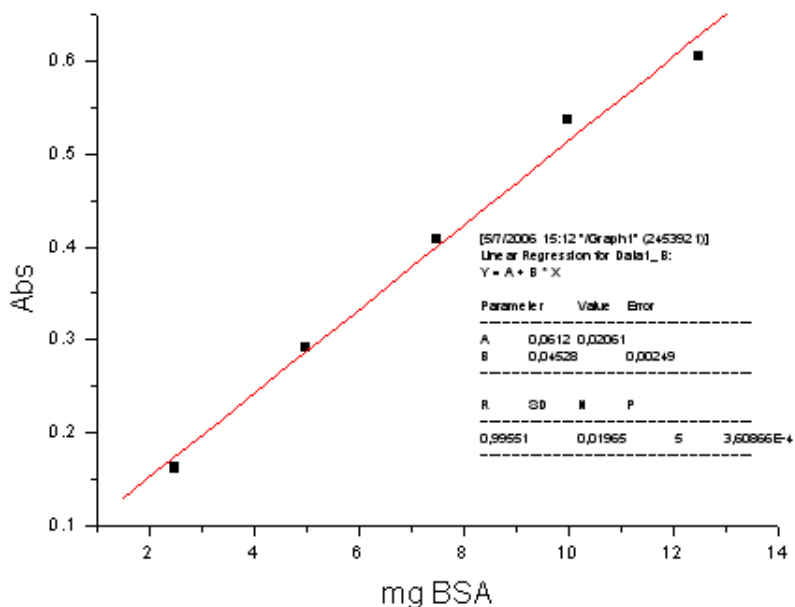
Διαλύματα:

Stock Solution	
100ml	95%v/v αιθανόλης
200ml	88%v/v φωσφορικού οξέος
350mg	Serva Blue G

Working Solution	
15ml	95%v/v αιθανόλης
30ml	88%v/v φωσφορικού οξέος
30ml	stock solution
425ml	H ₂ O

Πίνακας 7. Σύσταση διαλυμάτων stock και working solution για τη μέθοδο Bradford

Μετά την ανάμιξη του πρωτεϊνικού δείγματος και του αντιδραστηρίου, το σχηματιζόμενο σύμπλοκο απορροφά στα 595 nm. Με βάση την απορρόφηση αυτή και την αναγωγή της σε συγκέντρωση πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη (BSA), προσδιορίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη.



Εικόνα 8. Πρότυπη καμπύλη με πρωτεΐνη BSA (C=1 mg/ml)

Καταβύθιση πρωτεϊνών

Η προσπάθεια καταβύθισης των πρωτεϊνών και κατά συνέπεια αύξησης της συγκέντρωσής τους, από τους βολβούς του *Pancratium Maritimum*, έγινε με διάφορους τρόπους. Πραγματοποιήθηκε κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με τη χρήση αυξανόμενης ποσότητας του μη ιοντικού υδρόφιλου πολυμερούς PEG-πολυαιθυλενο-γλυκόζη, κατακρήμνιση με άλας θειϊκού αμμωνίου, κατακρήμνιση με οργανικό διαλύτη ακετόνη και κατακρήμνιση με τριχλωροξικό οξύ (TCA).

Κατακρήμνιση με πολυμερές υλικό PEG

Τα πολυμερή όπως είναι η πολυαιθυλενο-γλυκόζη (PEG) και η δεξτράνη (dextran), χρησιμοποιούνται συχνά στην καταβύθιση πρωτεϊνών γιατί είναι λιγότερο πιθανό να μετουσιωθούν οι πρωτεΐνες σε σύγκριση με άλλους τρόπους καταβύθισης. Αυτά τα πολυμερή σε

ένα διάλυμα προσελκύουν τα μόρια νερού και έτσι απομακρύνονται από τις υδρόφοβες περιοχές της επιφάνειας των πρωτεϊνών. Έτσι οι πρωτεΐνες είναι ελεύθερες να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους, σχηματίζοντας σύμπλοκα, τα οποία κατακρημνίζονται. Έχει παρατηρηθεί ότι υδρόφοβες πρωτεΐνες είναι αυτές που καταβυθίζονται με τη χρήση της PEG.

Κατακρήμιση με άλατα (θειϊκό αμμώνιο)

Ένα τυπικό μόριο πρωτεΐνης εμφανίζει υδρόφοβες περιοχές, οι οποίες σχηματίζονται από τις πλευρικές ομάδες αμινοξέων όπως Phe, Tyr, Trp, Met και άλλα αμινοξέα. Μόρια νερού τα οποία εντοπίζονται στο άμεσο περιβάλλον υδρόφοβων περιοχών της επιφάνειας μιας πρωτεΐνης, δηλαδή των πλευρικών ομάδων των αντίστοιχων αμινοξέων, παρουσιάζουν υψηλό βαθμό τάξεως (χαμηλή εντροπία) και θεωρούνται ως μόρια «σταθεροποιημένα» με παρόμοιο προσανατολισμό έναντι της επιφάνειας της πρωτεΐνης. Σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του διαλυμένου άλατος, συνεπάγεται ενυδάτωση των αντίστοιχων ιόντων και σταδιακή μείωση των ελεύθερων μορίων νερού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τελικά, να απομακρύνονται και «σταθεροποιημένα» μόρια νερού από τις υδρόφοβες περιοχές της επιφάνειας της πρωτεΐνης με σκοπό την ενυδάτωση ιόντων. Οι πρωτεΐνες είναι πλέον ελεύθερες να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους, σχηματίζοντας σύμπλοκα, τα οποία και κατακρημνίζονται (salting out). Το φαινόμενο της κατακρήμισης πρωτεϊνών σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος οφείλεται κυρίως σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και όσο περισσότερες υδρόφοβες περιοχές έχει μια πρωτεΐνη τόσο το φαινόμενο της κατακρήμισης είναι εντονότερο. Τα πιο αποτελεσματικά ανιόντα είναι τα φωσφορικά, θειϊκά και κιτρικά, ενώ τα πιο αποτελεσματικά κατιόντα είναι του αμμωνίου, του καλίου και νατρίου. Πρέπει να αναφερθεί ότι η μεταβολή της θερμοκρασίας σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, επηρεάζει έντονα τη διαλυτότητα των υδρόφοβων πρωτεϊνών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η θερμοκρασία επηρεάζει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, συγκεκριμένα η αύξηση της θερμοκρασίας, οδηγεί σε αύξηση των αλληλεπιδράσεων, οπότε ο σχηματισμός συμπλόκων είναι ευκολότερος και μειώνεται η διαλυτότητα των πρωτεϊνών. Γενικά με την αύξηση της θερμοκρασίας επιτυγχάνεται η ίδια έκταση κατακρημνίσεως πρωτεϊνών με παρουσία μικρότερης συγκέντρωσης άλατος. Στη συγκεκριμένη προσπάθεια κατακρήμισης με άλας χρησιμοποιήθηκε το θειϊκό αμμώνιο.

Κατεργασία πρωτεϊνών με οργανικό διαλύτη- ακετόνη

Η προσθήκη ορισμένων υδατοσυμβατών οργανικών διαλυτών (όπως ακετόνη, αιθανόλη) σε υδατικό πρωτεϊνικό διάλυμα ελαττώνει εφ' ενός την διηλεκτρική σταθερά και αφ' ετέρου τον βαθμό ενυδατώσεως των πρωτεϊνικών μορίων. Αυτό οδηγεί στην ανάπτυξη ισχυρότερων ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (δυνάμεων Coulomb) μεταξύ των αντίθετα φορτισμένων πρωτεϊνικών μορίων, με αποτέλεσμα την κατακρήμνιση τους.

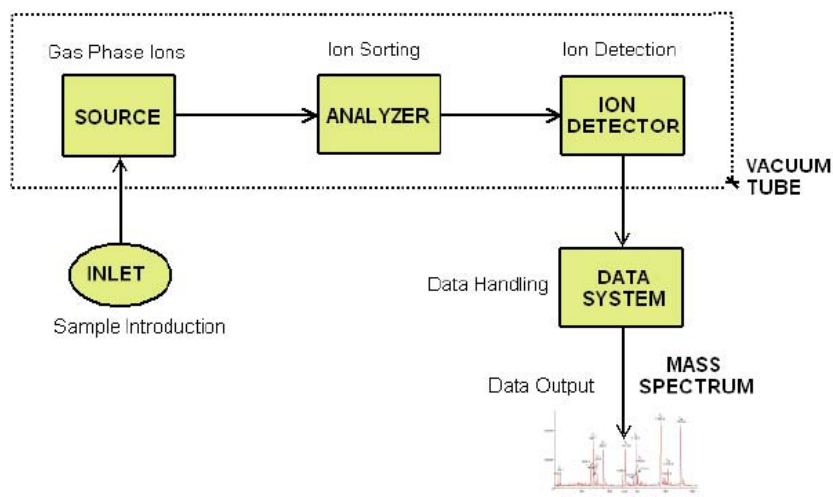
Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με τριχλωροξικό οξύ (TCA)

Το TCA (τριχλωροξικό οξύ) χρησιμοποιείται για καταβύθιση γιατί μπορεί να διατηρήσει ένα πολύ όξινο pH σε αραιή υδατική μορφή (<7%). Επιπλέον δεν είναι ισχυρό οξύ και έτσι δεν υδρολύει τους πεπτιδικούς δεσμούς, οι οποίοι πρέπει να μείνουν ανέπαφοι καθώς θα ακολουθήσει ηλεκτροφόρηση και πρέπει να πάρουμε την ίδια κατανομή μεγέθους όπως συνήθως. Τα οξέα καταβυθίζουν τις πρωτεΐνες αλλάζοντας τις σφαίρες ενυδάτωσης. Η πρωτεΐνη αφυδατώνεται, δηλαδή απομακρύνονται τα μόρια νερού από τις υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνών, όπως ακριβώς και με την προσθήκη αλκοόλης. Το πρόβλημα με αυτή τη μέθοδο είναι ότι δεν καταβυθίζονται όλες οι πρωτεΐνες εξίσου και μερικές φορές οι μικρές πρωτεΐνες δεν καταβυθίζονται καθόλου. Σε περίπτωση μεγάλων συγκεντρώσεων πρωτεϊνών (>1mg/ml) η μέθοδος αυτή δεν είναι η καταλληλότερη για την ανάκτηση τους.

Φασματογραφία μάζας

Ο φασματογράφος μάζας είναι το όργανο εκείνο που μετρά τις μάζες μορίων που έχουν μετατραπεί σε ιόντα. Για τη μέτρηση τέτοιων μικρών μαζών οι επιστήμονες χρησιμοποιούν ως μονάδα μέτρησης το dalton (Da), όπου 1 Da ισούται με το 1/12 της μάζας ενός ατόμου του ισότοπου το ^{12}C . Στην πραγματικότητα, ένας φασματογράφος μάζας δε μετρά απευθείας το μοριακό βάρος, αλλά λόγο μάζας προς φορτίο (mass to charge ratio) των ιόντων που πηγάζουν από τα προς ανάλυση μόρια. Ο λόγος m/z αντιστοιχεί σε Daltons ανά θεμελιώδες φορτίο (πολλαπλάσια φορτίου ηλεκτρονίου). Σε πολλές περιπτώσεις στη φασματοσκοπία μάζας τα

ιόντα που συναντώνται χαρακτηρίζονται από $z=1$. Υπάρχουν πολλά είδη φασματογράφων μάζας αλλά όλοι περιγράφονται από το δομικό μοτίβο της εικόνας 9.



Εικόνα 9. Τμήματα ενός φασματογράφου μάζας

Όπως φαίνεται και από το σχήμα της εικόνας 9 το δείγμα το οποίο μπορεί να είναι σε στερεά, υγρή ή αέρια μορφή, εισάγεται στο σωλήνα κενού και μετά τον ιοντισμό του παράγονται τα ιόντα αέριας φάσης. Το σύστημα εισαγωγής συχνά περιλαμβάνει και ένα σύστημα εξαέρωσης στερεών ή υγρών δειγμάτων. Ο σχηματισμός ιόντων αέριας φάσης (συνήθως θετικών ιόντων) είναι απαραίτητο βήμα για τις διαδικασίες ανίχνευσης και ταξινόμησης που πραγματοποιούνται σε ένα φασματογράφο μάζας. Τα ιόντα ταξινομούνται στον αναλυτή μάζας ως προς το λόγο μάζας προς φορτίου (m/z) και συλλέγονται από τον ανιχνευτή. Εκεί η προσπίπτουσα ιοντική ροή μετατρέπεται σε ένα ανάλογο ηλεκτρικό ρεύμα το οποίο καταγράφεται ως συνάρτηση του m/z και η πληροφορία αυτή μετατρέπεται σε αυτό που ονομάζουμε φάσμα (mass spectrum). Πρέπει να τονιστεί ότι στα φασματόμετρα μαζών απαιτείται η λειτουργία ενός πολύπλοκου συστήματος κενού για να διατηρεί χαμηλή πίεση ($10^{-4} - 10^{-8}$ torr), το υψηλό κενό είναι απαραίτητο, επειδή τα φορτισμένα σωματίδια, συμπεριλαμβανομένων και των ηλεκτρονίων, αλληλεπιδρούν με τα συστατικά της ατμόσφαιρας και καταστρέφονται.

Ανάλυση πρωτεϊνών με φασματοσκοπία μάζας

Η φασματοσκοπία μάζας (MS) είναι μια εξελισσόμενη τεχνική που εμφανίστηκε στις αρχές του προηγούμενου αιώνα. Ανάμεσα στις αναλυτικές τεχνικές η MS έχει ξεχωριστή θέση λόγω του ότι μετράει μία φυσική ιδιότητα των μορίων, τη μάζα τους, με πολύ μεγάλη ακρίβεια. Αρχικά την δεκαετία του 1980 και σε μεγαλύτερο εύρος την δεκαετία του 1990 έπαιξε σπουδαίο ρόλο στην εξέλιξη των βιολογικών επιστημών [16]. Η φασματοσκοπία μάζας άργησε να βρει εφαρμογή στα βιολογικά συστήματα κυρίως λόγω της δυνατότητας ανάλυσης μόνο φορτισμένων και πτητικών μορίων. Τα βιομόρια είναι μεγάλα και πολικά μόρια που δεν μεταφέρονται και δεν ιονίζονται εύκολα στην αέρια φάση. Ο ηλεκτροψεκασμός (ES) [17] και η απόπτωση με laser υποβοηθούμενη από υπόστρωμα (MALDI) [18] είναι οι τεχνικές ιονισμού στις οποίες οφείλεται η επιτυχημένη χρήση της φασματοσκοπίας μάζας σε βιολογικά μόρια.

MALDI – TOF – MS

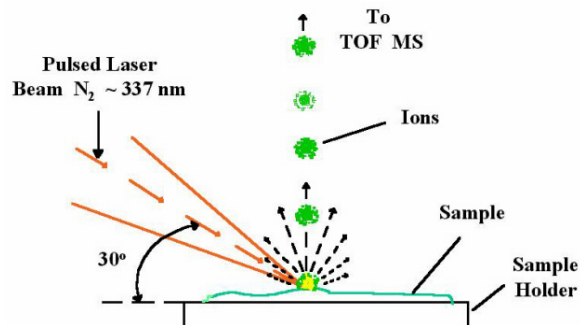
MALDI

Δύο είναι οι μέθοδοι ήπιου ιονισμού που χρησιμοποιούνται στη ανάλυση πρωτεϊνών, MALDI, απόπτωση με laser υποβοηθούμενη από υπόστρωμα (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*) και ο ηλεκτροψεκασμός (ES *Electron Spray Ionization*). Το MALDI αναπτύχθηκε ταυτόχρονα από τους Karas & Hillenkamp 1988 τον Tanaka το 1988. Στην τεχνική αυτή ένα υδατικό/αλκοολικό διάλυμα του δείγματος αναμιγνύεται με μεγάλη περίσσεια ενός υλικού μήτρας που απορροφά ακτινοβολία. Στη συνέχεια για να δημιουργηθεί η απαραίτητη αέρια φάση, το διάλυμα εξατμίζεται στην επιφάνεια ενός μεταλλικού δειγματολήπτη (εικόνα 10), που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή του δείγματος στο φασματόμετρο μαζών. Έτσι τα μόρια του υποστρώματος συνκρυσταλλώνονται με μόρια του αναλύτη πάνω στη μεταλλική επιφάνεια.



Εικόνα 10. Μεταλλική πλάκα MALDI

Στη συνέχεια οι το στερεό δείγμα (κρύσταλλοι) εκτίθεται σε ακτίνα παλμικού laser, συνήθως αζώτου με μήκος κύματος 337 nm, με αποτέλεσμα την εξάχνωση του αναλύτη και μετατροπή του σε ιόντα. Το υπόστρωμα είναι συνήθως μικρό οργανικό μόριο, τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα υποστρώματα είναι το α-κυάνο-4-κινναμινικό οξύ και το διυδροξυβενζοϊκό οξύ (DHB). Πρέπει να τονιστεί ότι η μήτρα είναι απαραίτητο να είναι διαλυτή σε διάλυμα με τον αναλύτη, να έχει μεγάλο συντελεστή απορρόφησης στο συγκεκριμένο μήκος κύματος λειτουργίας του laser, να μην εμφανίζει χημική δραστηριότητα με τον αναλύτη και να έχει μικρή τάση εξάχνωσης. Ο σκοπός χρησιμοποίησης της μήτρας είναι η ισχυρή απορρόφηση στο μήκος κύματος λειτουργίας του laser, στο οποίο ο αναλύτης παρουσιάζει μικρή απορρόφηση στο μήκος αυτό, η ελαχιστοποίηση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων πέρα από αυτές μήτρας – αναλύτη, άρα μείωση ενέργειας εξάερωσης, ενώ επίσης συμμετέχει στην δημιουργία των ιόντων είτε σαν μέσο πρωτονίωσης (ανίχνευση κατιόντων) ή μέσο αποπρωτονίωσης (ανίχνευση ανιόντων). Τα υποστρώματα διαφέρουν στην ενέργεια που μεταφέρουν στο βιομόριο κατά την απόπτωση και τον ιονισμό και έτσι καθορίζουν το βαθμό θραυσματοποίησης του αναλύτη. Η διαδικασία ιονισμού που επιτυγχάνεται στο MALDI παραμένει ως ένα μεγάλο βαθμό ακόμα άγνωστη και η ένταση του σήματος εξαρτάται από την ποσότητα των πεπτιδίων στον κρύσταλλο, την δυνατότητα του βιομορίου να προσλάβει ή να δώσει ένα πρωτόνιο κατά τη διαδικασία της απόπτωσης και ένα μεγάλο αριθμό άλλων παραγόντων γνωστών και αγνώστων. Για το λόγο αυτό είναι δύσκολη η αντιστοιχία της κορυφής του πεπτιδίου με την ποσότητα του δείγματος που αναλύεται.

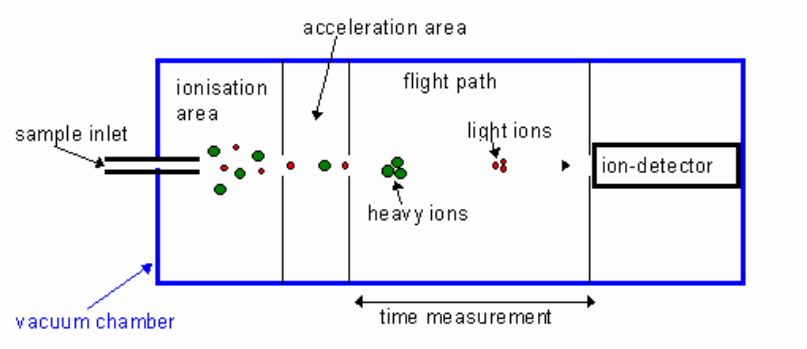


Εικόνα 11. Ιοντισμός δείγματος με χρήση laser

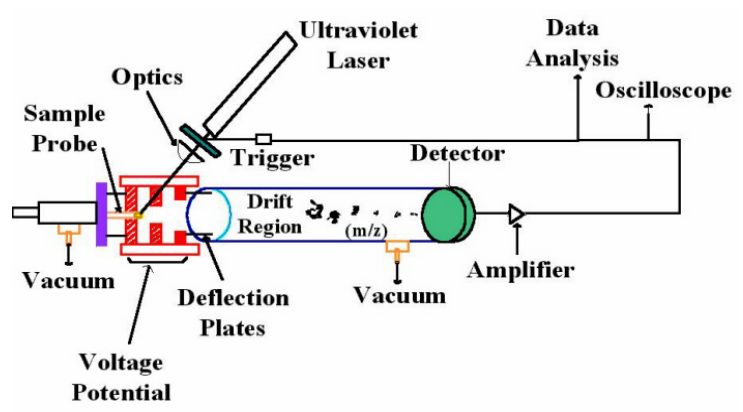
Αναλυτής μαζών “χρόνου πτήσης” TOF

Τρεις είναι οι βασικές αρχές διαχωρισμού μαζών: διαχωρισμός στηριζόμενος στο χρόνο πτήσης των ιόντων (time of flight, TOF), διαχωρισμός από τετραπολικό ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται από μεταλλικούς ράβδους (quatropole MS), ή από επιλεκτική εισαγωγή ιόντων σε τρισδιάστατο πεδίο παγίδευσης (ion trap). Για δομική ανάλυση, όπως προσδιορισμός αλληλουχίας αμινοξέων των πεπτιδίων, χρησιμοποιείται φασματοσκοπία μάζας σε σειρά (MS/MS), η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί εφαρμόζοντας δύο φορές την ίδια αρχή διαχωρισμού των ιόντων ή συνδυάζοντας δύο διαφορετικές αρχές.

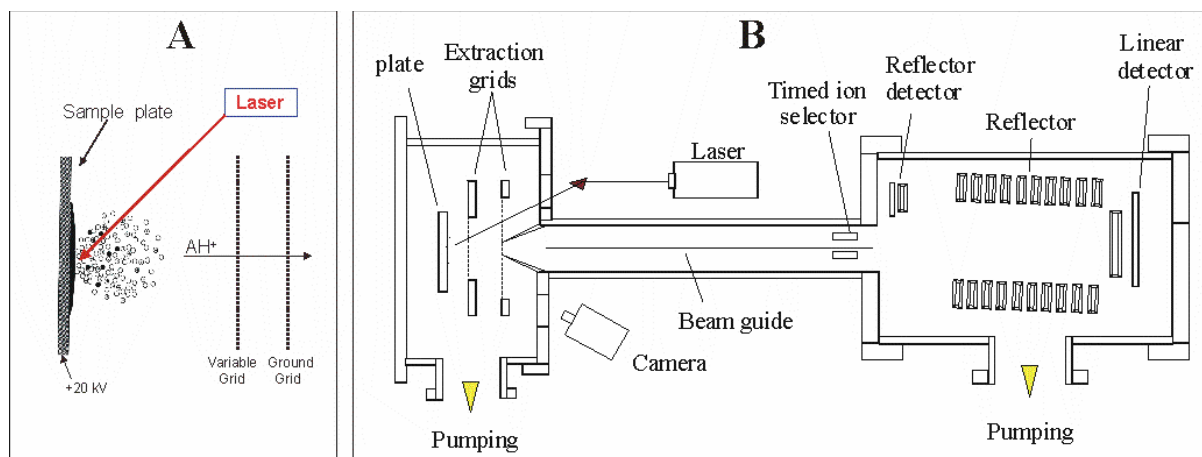
Στο διαχωρισμό με τον αναλυτή μαζών TOF τα παραγόμενα ιόντα από τον βομβαρδισμό με παλμικό laser, επιταχύνονται προς ένα ελεύθερο από πεδία σωλήνα με ένα ηλεκτρικό παλμό 10^3 ως 10^4 V. Ο διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με τη μάζα πραγματοποιείται κατά την “πτήση” των ιόντων προς τον ανιχνευτή που βρίσκεται στο τέλος του σωλήνα. Επειδή όλα τα ιόντα που εισέρχονται στο σωλήνα έχουν την ίδια κινητική ενέργεια, οι ταχύτητες τους κατά τη διαδρομή τους στο σωλήνα είναι αντιστρόφως ανάλογη προς τη μάζα τους, οπότε τα ελαφρότερα σωματίδια φθάνουν στον ανιχνευτή γρηγορότερα από τα βαρύτερα. Οι χρόνοι πτήσης ποικίλουν συνήθως από 1 έως 30 μ s.



Εικόνα 12. Αναλυτής μαζών TOF “χρόνου πτήσης”



Εικόνα 13. Φασματογράφος μάζας MALDI-TOF MS



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας ενός φασματογράφου μάζας MALDI-TOF-MS. Στην Εικόνα 14B φαίνεται ένας φασματογράφος μάζας που συνδυάζει τη μέθοδο ιονισμού MALDI με τη μέθοδο διαχωρισμού TOF. Κατά τη διαδικασία αυτή τα δείγματα αρχικά συνκρυσταλλώνονται με μόρια του αναλύτη πάνω σε μεταλλική επιφάνεια που μπορεί να χωρέσει μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών στιγμάτων (Εικόνα 14A). Τα δείγματα στη συνέχεια ακτινοβολούνται από παλμό laser, δημιουργώντας μία μικρή δέσμη ιόντων. Τα ιόντα επιταχύνονται με καθορισμένο ποσό κινητικής ενέργειας και στη συνέχεια ταξιδεύουν στο σωλήνα πτήσης (Εικόνα 14B). Τα μικρότερα ιόντα έχουν μεγαλύτερη ταχύτητα και φτάνουν στον ανιχνευτή πριν από τα μεγαλύτερα ιόντα, παράγοντας το φάσμα του χρόνου πτήσης.

Βιοπληροφορική

Η βιοπληροφορική είναι ένα νέο και ραγδαία αναπτυσσόμενο πεδίο το οποίο είναι απαραίτητο για την ανάλυση πρωτεϊνών. Δημιουργήθηκε για να αναπτύξει μια βάση δεδομένων χρησιμοποιώντας τον τεράστιο αριθμό δεδομένων που προκύπτουν από τις υψηλής απόδοσης αναλυτικές μεθόδους. Συνδυάζει τα αποτελέσματα της γονιδιακής ανάλυσης με πειραματικά αποτελέσματα και με την χρήση εξαιρετικών λογισμικών μπορεί να δημιουργήσει βάσεις πειραματικών και θεωρητικών δεδομένων. Μόνο με την ανάπτυξη και την χρήση της βιοπληροφορικής είναι δυνατή η αξιόπιστη αξιολόγηση του τεράστιου αριθμού των πειραματικών δεδομένων. Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μεγάλος αριθμός λογισμικών για

την μελέτη των πειραματικών και θεωρητικών δεδομένων καθώς και διάφορα μοντέλα για την πρόβλεψη της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών. Έχουν αναπτυχθεί μοντέλα για την πρόβλεψη της θέσης των πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο (SignalP [19]). Τα προγράμματα αυτά καθώς και μία πληθώρα άλλων προγραμμάτων, είναι διαθέσιμα στο διαδίκτυο οπότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν από όλη την επιστημονική κοινότητα (<http://www.expasy.org>).

Απομόνωση και χαρακτηρισμός αλκαλοειδών από βολβούς *Pancreatium Maritimum*

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (thin layer chromatography, TLC) ανήκει στις μεθόδους επίπεδης χρωματογραφίας μαζί με τη χρωματογραφία χάρτου (paper chromatography, PC). Τυπικοί διαχωρισμοί λεπτής στιβάδας γίνονται με επίπεδες μεταλλικές, υάλινες ή πλαστικές πλάκες, που καλύπτονται με ένα λεπτό και ισχυρά προσκολλημένο στρώμα από λεπτοκοκιοποιημένα σωματίδια, που παίζουν τον ρόλο της στατικής φάσης. Ως υλικά επίστρωσης είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διοξείδιο του πυριτίου (Silica gel), τριοξείδιο του αργιλίου (Alumina), κυτταρίνη σε μορφή σκόνης ή ακόμα και ρητίνες με όξινες ή βασικές ομάδες. Η κινητή φάση διέρχεται μέσα από τη σταθερή φάση με τριχοειδή φαινόμενα. Συνήθως η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας προηγείται της υγρής χρωματογραφίας, πριν τον διαχωρισμό ουσιών.

Στα πειράματα της χρωματογραφίας TLC χρησιμοποιήθηκαν πλακίδια αλουμινίου επιστρωμένα με silica gel 60 F₂₅₄ (Merck 5554).

Οι διαλύτες ανάπτυξης που χρησιμοποιούνται για το μίγμα των αλκαλοειδών είναι διαφορετικά ποσοστά μεθανόλης MeOH (10, 20, 40%) σε τριχλωρομεθάνιο CHCl₃, 10% MeOH σε διχλωρομεθάνιο CH₂Cl₂ και AcOEt : EtOH : H₂O (με αναλογία όγκων 10:2:1)

Το διάλυμα του υπό εξέταση δείγματος τοποθετείται υπό τη μορφή κηλίδας στην αρχή της πλάκας σε απόσταση περίπου 2 cm. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται όρθια εντός αεροστεγούς θαλάμου στον οποίο έχει ήδη εισαχθεί κατάλληλο σύστημα διαλυτών σε ύψος κάτω από αυτό της κηλίδας. Ο εκάστοτε διαλύτης ανάπτυξης μετακινείται προς το επάνω μέρος της πλάκας ανυψούμενος με τη βοήθεια της τριχοειδούς δράσης των λεπτότατων σωματιδίων

της στατικής φάσης. Όταν ο διαλύτης ανάπτυξης μετακινείται από το σημείο τοποθέτησης του δείγματος, το διαλύει και το μεταφέρει προς το επάνω μέρος της πλάκας, ενώ το δείγμα κατανέμεται μεταξύ του κινούμενου διαλύτη και της στατικής φάσης. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα μετακινούνται επί της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητά τους και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φθάσει λίγα εκατοστά πριν το πάνω μέτωπο της πλάκας και ύστερα, η πλάκα αποσύρεται και στεγνώνεται με ρεύμα αέρα ή σε φούρνο.

Για τον εντοπισμό της θέσης των διαφόρων συστατικών του δείγματος πάνω στη πλάκα TLC μετά τον διαχωρισμό τους εφαρμόζεται βαφή, η οποία περιέχει ανισαλδεύδη.

Ποιοτικός προσδιορισμός

Για κάθε κηλίδα που εμφανίζεται στην πλάκα TLC, υπολογίζεται η τιμή του συντελεστή R_f . Ο βαθμός συγκράτησης μιας ουσίας στην επίπεδη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας εκφράζεται με τον *παράγοντα επιβράδυνσης* R_f , ο οποίος ορίζεται ως ο λόγος της αποστάσεως που κινήθηκε η ουσία προς την απόσταση που κινήθηκε ο διαλύτης. Η απόσταση που κινήθηκε ο διαλύτης μετρείται από τη θέση του μετώπου, ενώ η απόσταση του δείγματος μετρείται από το κέντρο της κηλίδας ή από το σημείο που αντιστοιχεί στη μέγιστη πυκνότητά της.

$$R_f = (d_R / d_M) , \text{ όπου}$$

d_M είναι η απόσταση μετακίνησης στην πλάκα TLC του διαλύτη από την γραμμή ανάπτυξης d_R είναι η απόσταση μετακίνησης του εκάστοτε συστατικού του προς εξέταση δείγματος από την γραμμή ανάπτυξης.

Οπότε ο παράγοντας R_f παίρνει τιμές από $0 \leq R_f \leq 1$.

Η τιμή του R_f επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως από τη σύσταση του διαλύτη αναπτύξεως και από τη φύση του υλικού επίστρωσης. Σε καθορισμένες όμως συνθήκες αποτελεί χαρακτηριστική σταθερά και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση μιας άγνωστης ουσίας, συγκρίνοντας την τιμή του R_f αυτής με τις τιμές των R_f γνωστών ουσιών στις ίδιες συνθήκες.

Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Οι βασικοί τύποι χρωματογραφίας, στους οποίους η κινητή φάση είναι ένα υγρό είναι τέσσερις: χρωματογραφία κατανομής, χρωματογραφία προσρόφησης, χρωματογραφία ιονανταλλαγής και η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Στο τέλος της δεκαετίας του 1960 αναπτύχθηκε η τεχνολογία της HPLC (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*), όπου τα υλικά πλήρωσης των στηλών είναι σωματίδια μεγέθους 3-10 μm . Η τεχνολογία αυτή απαιτεί εξελιγμένα όργανα, με δυνατότητα λειτουργίας σε υψηλές πιέσεις. Η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι η πιο διαδεδομένη από όλες τις αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού, διότι χαρακτηριστικά της μεθόδου αποτελούν η ευαισθησία, η εύκολη προσαρμογή της σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς, η καταλληλότητα της για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών και κυρίως η εφαρμοσιμότητα της σε προσδιορισμούς ουσιών πρώτιστου ενδιαφέροντος για τη βιομηχανία και πολλά επιστημονικά πεδία. Παραδείγματα εφαρμογών διαχωρισμών με τη χρήση HPLC αποτελούν τα αμινοξέα, οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα, οι υδρογονάνθρακες, τα φαρμακευτικά, τα τερπενοειδή, τα φυτοφάρμακα, τα αντιβιοτικά, τα στεροειδή, οι οργανομεταλλικές ενώσεις και μια ποικιλία ανόργανων ενώσεων.

Η χρωματογραφία κατανομής (partition chromatography) είναι ο περισσότερο χρησιμοποιούμενος τύπος από τους τέσσερις τύπους υγροχρωματογραφίας με βάση τη σχετική πολικότητα της κινητής και τις στατικής φάσης διακρίνονται δυο τύποι χρωματογραφίας κατανομής, την χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal-phase chromatography) και τη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (reverse-phase chromatography). Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, η στατική φάση είναι μη πολική, συχνά ένας υδρογονάνθρακας και η κινητή φάση είναι ένας σχετικά πολικός διαλύτης (όπως ύδωρ, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο) συνήθως μίγματα οργανικών διαλυτών-νερού. Οπότε το πολικότερο συστατικό του δείγματος που αναλύεται θα εκλούεται πρώτο αφού είναι το περισσότερο διαλυτό στην κινητή φάση.

Η πιο αποδοτική μέθοδος για τον βέλτιστο διαχωρισμό των αλκαλοειδών από το μεθανολικό διάλυμα όπου υπάρχουν σαν μίγμα μέσω της χρωματογραφίας HPLC είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης (RP-HPLC *Reversed Phase High*

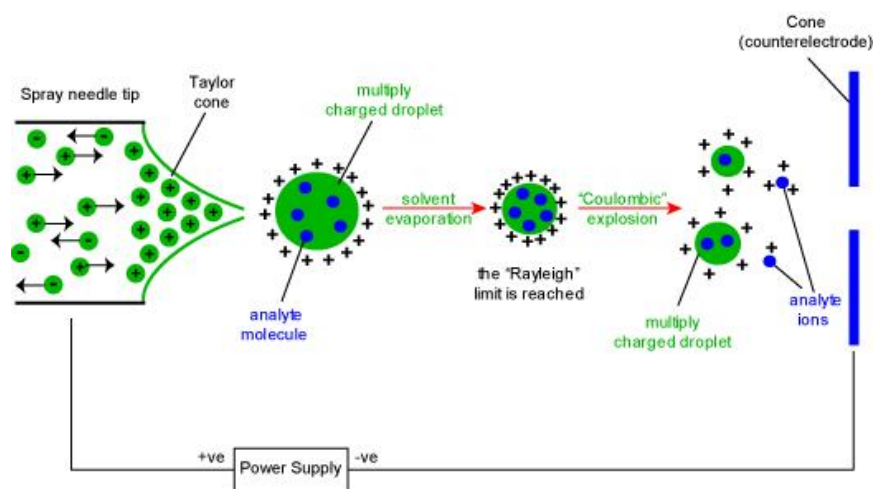
Performance Liquid Chromatography) [20-21]. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ως στήλη διαχωρισμού, μια Kromasil C₁₈ στήλη, διαστάσεων 250x4.0 mm, και διάμετρο πόρων του υλικού πλήρωσης της αντίστροφης φάσης μήτρας 5 μm. Η στήλη συνδέεται με μια τετρακάναλη αντλία υψηλής ακρίβειας (υψηλής πίεσης μέχρι και 6000 psi (~ 400 Atm) μέσα στη στήλη) Gunkotek 480 και με έναν ανιχνευτή UV, Linear UVIS 200, που τον έχουμε ρυθμίσει σε μήκος κύματος 290 nm. Η κινητή φάση για την απομόνωση αλκαλοειδών με τη χρήση RP-HPLC αποτελείται από ακετονιτρίλιο και νερό σε αναλογία **MeCN: H₂O (25:75)**, σταθερής σύστασης και ο ρυθμός ροής (flow rate) της κινητής φάσης είναι 800 μl/min

Φασματογράφος μάζας (ESI-MS)

Με βάση την δειγματοληψία από την χρωματογραφία RP-HPLC, όπου ήταν η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των αλκαλοειδών από το μεθανολικό εκχύλισμα, καθώς και από τα στοιχεία που λάβαμε από την φασματοσκοπία UV για τα κλάσματα που λάβαμε από τον διαχωρισμό, επιλέγουμε τα κλάσματα που παρουσιάζουν ενδιαφέρον και πραγματοποιούμε φασματοσκοπία μάζας.

Ο φασματογράφος που χρησιμοποιήθηκε είναι ο ThermoFinnigan LCQ Advantage και η μέθοδος ιοντισμού των μορίων που εξετάστηκαν επιτεύχθηκε μέσω της τεχνικής του ηλεκτροψεκασμού ESI (*Electron Spray Ionization*) [22]. Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI) πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία, σε μία συσκευή όπως στην εικόνα 15. Το διάλυμα του δείγματος αντλείται μέσω μιας ανοξειδωτής τριχοειδούς βελόνας με ταχύτητα ροής από 0.1 – 10 μl/min. Η βελόνα βρίσκεται σε δυναμικό αρκετών (2-5) kV ως προς ένα κυλινδρικό ηλεκτρόδιο που περιβάλλει τη βελόνα. Το δυναμικό αυτό είναι ικανό να παράγει το ηλεκτρικό πεδίο που επιδρά στα φορτία του διαλύματος διαχωρίζοντας τα και συσσωρεύοντας τα θετικά ή τα αρνητικά φορτία (ανάλογα με το πρόσημο της τάσης που εφαρμόζεται στον τριχοειδή) στην άκρη του τριχοειδούς σχηματίζοντας τον “κώνο του Taylor”. Αυτός ο κώνος είναι τμήμα του διαλύματος που προεξέχει από τον τριχοειδή και φέρει συσσωρευμένο φορτίο ή αλλιώς περίσσεια φορτίου δηλαδή το φορτίο που διαχωρίστηκε, στην επιφάνειά του. Καθώς το δυναμικό αυξάνει, το διάλυμα που σχηματίζει τον κώνο του Taylor ξεπερνά το σημείο Rayleigh, δηλαδή το σημείο εκείνο που η πίεση από τις απωστικές δυνάμεις μεταξύ των ιόντων εξισορροπείται από την επιφανειακή τάση του διαλύματος με συνέπεια ο

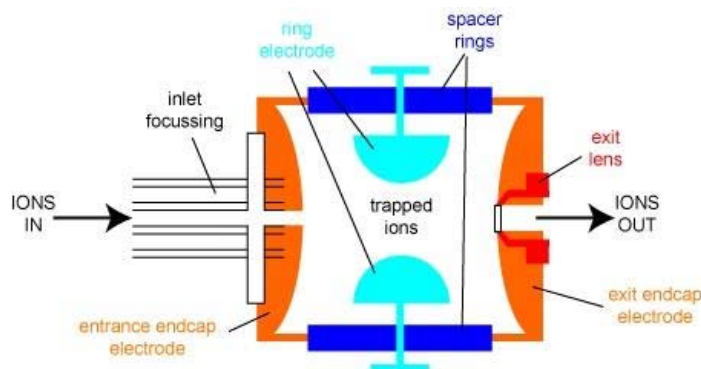
κόνος να υφίστανται σχάση και να παράγονται φορτισμένα σταγονίδια. Οι δημιουργούμενες φορτισμένες μικρές σταγόνες διέρχονται μέσω ενός τριχοειδούς, όπου ο διαλύτης εξατμίζεται και φορτίζονται τα μόρια του αναλύτη. Καθώς οι σταγόνες μικραίνουν λόγω της εξαέρωσης του διαλύτη, η πυκνότητα φορτίου αυξάνει και πραγματοποιείται εκρόφηση των ιόντων στο περιβάλλον αέριο. Σύμφωνα με την θεωρία της σχάσης Coulomb, τα σταγονίδια εξαιτίας της συνεχούς εξάτμισης του διαλύτη από αυτά, συρρικνώνονται αυξάνοντας έτσι τις απωστικές δυνάμεις μεταξύ των ιόντων τόσο ώστε να υφίστανται σχάση, παράγοντας έτσι μικρότερα σταγονίδια. Αυτά τα νέα μικρότερα σταγονίδια συρρικνώνονται και υφίστανται περαιτέρω σχάση. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές μέχρι το σημείο που το κάθε σταγονίδιο να περιέχει μόνο ένα ιόν και έτσι με την εξάτμιση και των τελευταίων μορίων του διαλύτη παράγονται ιόντα στην αέρια φάση. Κατά την διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού εκτός από τα ιόντα του αναλύτη παράγονται και ένα πλήθος άλλων ιόντων από συσσωματώματα ιόντων του αναλύτη με μόρια του διαλύτη αλλά και συσσωματώματα μορίων του διαλύτη. Για να γίνει αποδοτικότερος ο ιονισμός έχουν αναπτυχθεί τεχνικές όπου με την βοήθεια αερίων διασπώνται τα συσσωματώματα. Έτσι υπάρχει αέριο άζωτο στην περιοχή γύρω από το τριχοειδή (βοηθητικό αέριο, auxiliary gas) που βοηθά στην εξάτμιση του διαλύτη και επίσης αέριο άζωτο υπό πίεση να απελευθερώνεται γύρω από την άκρη του τριχοειδούς (εκνεφωτικό αέριο, sheath gas) βοηθώντας κατά αυτό τον τρόπο την σχάση του κώνου.



Εικόνα 15. Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)

Αναλυτής μαζών “παγίδα ιόντων” (ion trap)

Ο αναλυτής μαζών στο φασματομέτρο μάζας που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των κλασμάτων από την PR-HPLC από το μίγμα των αλκαλοειδών είναι αναλυτής “παγίδας ιόντων”. Η παγίδα ιόντων (ion trap) είναι μια διάταξη, όπου δημιουργούνται ανιόντα ή κατιόντα σε αέρια κατάσταση και περιορίζονται για αρκετό χρονικό διάστημα με ένα ηλεκτρικό ή/και μαγνητικό πεδίο. Μια παγίδα ιόντων αποτελείται από ένα κεντρικό δακτυλοειδές ηλεκτρόδιο και δύο πλευρικά ηλεκτρόδια - κάλυπτρα. Στο δακτυλοειδές ηλεκτρόδιο εφαρμόζεται ένα μεταβλητό δυναμικό ραδιοσυχνότητας, ενώ τα πλευρικά ηλεκτρόδια είναι γειωμένα. Ιόντα κατάλληλης τιμής m/z περιστρέφονται σε σταθερή τροχιά μέσα στη κοιλότητα που περιβάλλεται από το δακτύλιο. Καθώς το δυναμικό ραδιοσυχνότητας αυξάνει, οι τροχιές των βαρύτερων ιόντων σταθεροποιούνται, ενώ αυτές των ελαφρότερων ιόντων αποσταθεροποιούνται και προσκρούουν στα τοιχώματα του δακτυλοειδούς ηλεκτροδίου. Η δέσμη ιόντων του αναλυτή, προερχόμενη από την πηγή ιοντισμού, εισάγεται μέσω ενός πλέγματος στο επάνω κάλυπτρο. Στη συνέχεια το δυναμικό ραδιοσυχνότητας σαρώνεται και τα παγιδευμένα ιόντα, αφού αποσταθεροποιηθούν, εγκαταλείπουν την κοιλότητα του κυκλικού ηλεκτροδίου μέσω ανοιγμάτων στο κάτω κάλυπτρο και στη συνέχεια προσπίπτουν σε ένα μεταλλάκτη (ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή).



Εικόνα 16. Αναλυτής μαζών “παγίδα ιόντων”

Καλλιέργεια κυττάρων HeLa

Τα κύτταρα HeLa ή HDC, που είναι η συντομογραφία του όρου “ανθρώπινα διπλοειδή κύτταρα” – Human Diploid Cells είναι καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα (αδενοκαρκίνωμα τραχήλου μήτρας ανθρώπου). Η ονομασία HeLa προέρχεται απ’ τα αρχικά του ονόματος Henrietta Lacks μιας Αμερικανίδας, απ’ την οποία προέρχονται αυτά τα καρκινογόνα κύτταρα.

Για την καλλιέργεια των κυττάρων HeLa, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium), που περιείχε 2mM L-γλουταμίνη, 10% v/v FBS (Fetal bovine serum- ορός αίματος βόειου εμβρύου), 0.1M Sodium Pyruvate, 0.15 % w/v NaHCO₃ και 0.1mM non-essential amino-acids (μη απαραίτητα αμινοξέα). Για την προστασία των καλλιιεργειών από μικροβιακούς παράγοντες, χρησιμοποιήθηκαν αντιβιοτικά σε συγκεντρώσεις των 100 U/mL πενικιλίνη, 100 µg/mL στρεπτομυκίνη.

Θρεπτικό υλικό DMEM για κύτταρα HeLa	
MEM	10% v/v
FBS	10% v/v
Sodium Pyruvate	0.1M
NaHCO ₃	0.15 % w/v
non-essential amino-acids	0.1mM
Πενικιλίνη	100 U/mL
Στρεπτομυκίνη	100 µg/mL

Πίνακας 8. Σύσταση θρεπτικού υλικού DMEM για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων HeLa

Για την ανάπτυξη των κυττάρων απαιτείται η επώαση τους γίνεται σε ειδικό θάλαμο κυτταρικών καλλιιεργειών ελεγχόμενης ροής αερίων (incubator), σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη 5% CO₂. Η αλλαγή του θρεπτικού υλικού είναι απαραίτητη για κάθε 24-48 ώρες. Οι πλήρεις καλλιιεργειες (~80%) εκπλύθηκαν με HBSS και τα κύτταρα συλλέχθησαν μετά από ενζυμική κατεργασία με διάλυμα θρυψίνης διαλυμένο σε HBSS. Η συλλογή των κυττάρων έγινε με φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές για 3 λεπτά. Όταν τα κύτταρα

χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη νέας καλλιέργειας, επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό και τοποθετήθηκαν σε νέες φιάλες κυτταρικών καλλιεργειών.

Στον ακόλουθο πίνακα αναγράφεται η σύσταση διαλύματος HBSS:

Διάλυμα HBSS	
KCl	0.1 M
KH ₂ PO ₄	$5 \cdot 10^{-3}$ M
NaCl	1.4 M
NaHPO ₄ · 2 H ₂ O	$4 \cdot 10^{-3}$ M

Πίνακας 9. Σύσταση διαλύματος HBSS

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α' Πειραματικό μέρος

Απομόνωση πρωτεϊνών από *Pancreaticum Maritimum*

Άλεσμα

Επιλέγουμε βολβούς από φρεσκοκομμένα κρινάκια *Pancreaticum Maritimum*. Καθαρίζουμε προσεκτικά το εξωτερικό προστατευτικό υμένιο και τεμαχίζουμε το εσωτερικό των βολβών σε μικρά κομμάτια. Λαμβάνουμε περίπου 150 gr κομμάτια βολβών τα οποία ψύχουμε στους 4° C και ακολουθεί ομογενοποίηση τους για 2 λεπτά σε μίξερ χρησιμοποιώντας 200 ml διαλύματος αλέσεως (buffer αλέσεως), το οποίο προηγουμένως έχει τοποθετηθεί στο ψυγείο. Το διάλυμα αλέσεως παρασκευάζεται με ανάμιξη των παρακάτω αντιδραστηρίων:

Διάλυμα Α(αλέσεως)

- 50mM Na₂HPO₄ pH=5
- 150mM NaCl
- 5% v/v γλυκερόλη
- 1mM EDTA
- 1mM PMSF

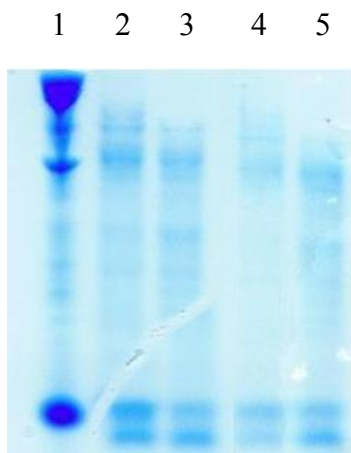
Στη συνέχεια το ομογενοποιημένο διάλυμα διηθείται με οκταπλό φύλλο γάζας, όπου η κωνική που τοποθετείται το μίγμα μετά το φιλτράρισμα είναι απαραίτητα σε πάγο. Έπειτα το διήθημα φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στα 20.000 g διατηρώντας τη θερμοκρασία σταθερή στους 4°C. Με τη διαδικασία αυτή απομακρύνονται τα άθραυστα κύτταρα. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα και ξαναφυγοκεντρείται στα 30.000 g για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο διηθείται υπό κενό δυο φορές με φίλτρο πόρων 0.45 μm ώστε να μην περιέχονται κομμάτια που θα εμποδίζουν την ροή του δείγματος από την κολώνα. Το διάλυμα αυτό περιέχει μίγμα πρωτεϊνών (crude), από το οποίο θα απομονώσουμε τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας.

Σημείωση:

Το αντιδραστήριο PMSF (φαινυλο-μεθυλ-σουλφονυλο-φθορίδιο, phenylmethylsulphonyl fluoride) αποτελεί αναστολέα πρωτεασών και συγκεκριμένα των πρωτεασών σερίνης. Το αντιδραστήριο EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) αποτελεί επίσης αναστολέα των μεταλλοπρωτεασών. Επίσης η γλυκερόλη προστίθεται στο διάλυμα αλέσεως διότι τις προστατεύει από τυχόν διασπάσεις τους, διατηρώντας την υδροφοβικότητα τους

Απομόνωση πρωτεϊνών από κορμό του *Pancreatium Maritimum*

Επίσης, πρωτεΐνες απομονώθηκαν και από τον κορμό του *Pancreatium Maritimum*, μετά τη διαδικασία της άλεσης που έγινε με τον ίδιο τρόπο όπως αναφέρεται παραπάνω, τα δείγματα φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Από το gel της εικόνας 14 επιβεβαιώνεται η ύπαρξη των ίδιων πρωτεϊνών όχι μόνο στον βολβό του φυτού αλλά και στο κορμό του. Από την ένταση της χρώσης Coomassie (που αποτελεί και ποσοτικό προσδιορισμό) διαπιστώνουμε ότι στον βολβό η συγκέντρωση των πρωτεϊνών είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με τον κορμό.



Εικόνα 14. Πηκτή πολυακρυλαμίδιου με πρωτεΐνες από βολβό και κορμό του φυτού *Pancreatium Maritimum*

Στην ζώνη 2 και 3 εμφανίζεται το μίγμα πρωτεϊνών (crude) από το βολβό του *Panocratium Maritimum*, ενώ στις ζώνες 4 και 5 εμφανίζεται το μίγμα πρωτεϊνών (crude) από το κορμό του *Panocratium Maritimum*. Έτσι η διαδικασία διαχωρισμού και καθαρισμού των πρωτεϊνών γίνεται από τους βολβούς από το κρινάκι της θάλασσας.

Διαπίδυση (Dialysis)

Ακολουθεί η διαδικασία της διαπίδυσης, που είναι απαραίτητη διαδικασία πριν τη φόρτωση του δείγματος μας (crude) στην κολώνα. Η μεμβράνη διαπίδυσης είναι ένα ημιπερατό διάφραγμα που επιτρέπει στον διαλύτη και σε μικρά ιόντα να εξισορροπηθούν, αλλά δεν διαπερνάται από τα μόρια της πρωτεΐνης. Παράγονται από σελοφάν ή κυτταρίνη και έχουν πόρους διαφορετικών διαστάσεων, που κάθε φορά επιλέγονται με κριτήριο το μέγεθος της πρωτεΐνης που θα διαχωριστεί. Για την διαδικασία της διαπίδυσης στο πείραμα μας, χρησιμοποιήθηκαν σωληνοειδείς μεμβράνες (Sigma) με ικανότητα διαπερατότητας μορίων μοριακού βάρους έως 10kDa και χωρητικότητας 100ml/ft.

Η ιοντική ισχύς και το pH του πρωτεϊνικού διαλύματος που περιέχεται σε μια τέτοια μεμβράνη ρυθμίζεται με εξισορρόπηση έναντι του ελεύθερου πρωτεΐνης διαλύματος

Διάλυμα διαπίδυσης

- 20 mM Tris ultra pure $C_4H_{11}NO_3$, pH = 6
- 10 mM NaCl
- Vτελ = 2 ltr

Το παραπάνω διάλυμα τοποθετείται στο ψυγείο για να διατηρείται κρύο. Παίρνουμε μια ημιδιαπερατή μεμβράνη διαπίδυσης που διατηρείται σε MeOH την ξεπλένουμε με απιονισμένο νερό και προσθέτουμε το δείγμα μας (crude). Χωρίζουμε το διάλυμα διαπίδυσης σε 1 ltr και τοποθετούμε τη μεμβράνη με το δείγμα μας για δύο ώρες στο ψυγείο (4°C) υπό ανάδευση. Έπειτα μεταφέρουμε τη μεμβράνη με το δείγμα στο άλλο 1 ltr του διαλύματος διαπίδυσης και το αφήνουμε κατά τη διάρκεια της νύχτας υπό ανάδευση.

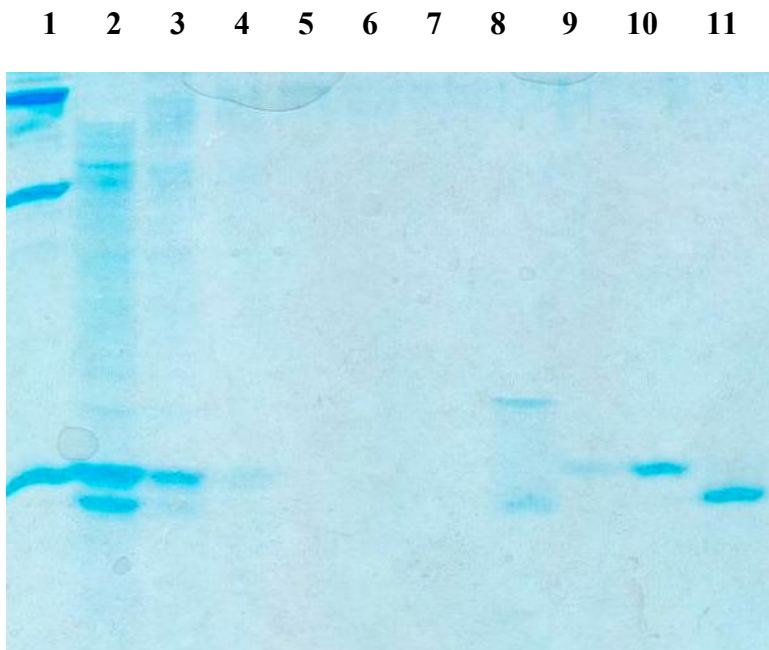
Η διαδικασία της διαπίδυσης πραγματοποιείται για να απομακρύνουμε το NaCl από το crude, πριν τη φόρτωση του στην κολώνα για να μην υπάρχει κίνδυνος δέσμευσης των ιόντων του NaCl από την κολώνα, η οποία είναι ιονανταλλακτική.

Υγρή χρωματογραφία κατιονανταλλαγής με υλικό πλήρωσης S - Sepharose

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών από το μίγμα των πρωτεϊνών στο διάλυμα crude του *Pancreaticum Maritimum*, πραγματοποιείται κατιονανταλλακτική χρωματογραφία με υλικό πλήρωσης την S-Sepharose που έχει εξισορροπηθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Na₂HPO₄, 150mM NaCl, pH=5. Κατά τη διαδικασία της σταθεροποίησης, διέρχεται το διάλυμα με ροή 1ml/min από τη στήλη και αφήνεται να διέλθει όγκος περίπου 10 φορές μεγαλύτερος σε σχέση με τον όγκο της στήλης. Κατά τη διάρκεια της εξισορρόπησης όπως και καθ' όλη τη διαδικασία η θερμοκρασία διατηρείται στους 4°C. Όταν ολοκληρωθεί η σταθεροποίηση της στήλης, φορτώνεται το δείγμα (crude) όγκου 20-40 ml με ροή 1 ml/min, κατά τη φόρτωση του δείγματος παρατηρείται ένδειξη στο καταγραφικό. Ο ανιχνευτής που έχει τοποθετηθεί στην έξοδο της στήλης έχει λάμπα UV, όπου ανιχνεύει τις πρωτεΐνες που απορροφούν στα 260-280 nm και καταγράφεται το σήμα στο καταγραφικό σαν απορρόφηση σε συνάρτηση με το χρόνο (όγκο έκλουσης). Έπειτα ακολουθεί έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να απομακρυνθούν τα μη προσδεδεμένα μόρια από την στήλη. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η έκλυση της στήλης με σκοπό την παραλαβή των προσροφημένων πρωτεϊνών, με σκοπό τον διαχωρισμό τους, αυτό επιτυγχάνεται με σταδιακή αύξηση της ιοντικής ισχύς μέχρι 1 M NaCl. Κρατάμε δείγματα καθ' όλη τη διάρκεια της έκλυσης όταν παρατηρούμε ένδειξη στο καταγραφικό παρατηρώντας και την συγκέντρωση του NaCl σε κάθε δειγματοληψία.

Αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τη στήλη φορτώνονται σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου και μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης λαμβάνονται τα ακόλουθα αποτελέσματα

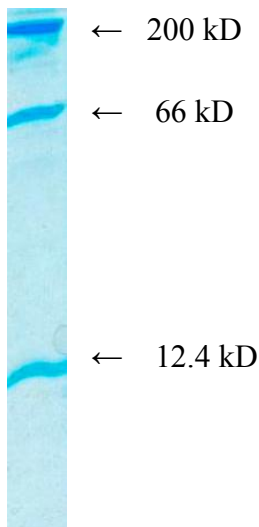


Εικόνα 15. Πηκτική πολυακρυλαμιδίου με πρωτεΐνες από το βολβό του *Pancratium Maritimum* μετά από το διαχωρισμό τους με υδροχρωματογραφία S-Sepharose

Στο παραπάνω gel (εικόνα 15) στη ζώνη 2 εμφανίζεται το δείγμα μας (crude) που αποτελείται από μίγμα πρωτεϊνών και φορτώθηκε στη κολώνα μετά την σταθεροποίηση της. Στη ζώνη 3 εμφανίζεται το δείγμα της φόρτωσης, δηλαδή το κλάσμα που συλλέγεται κατά την φόρτωση του crude, όπου συγκριτικά με το crude μπορούμε να διαπιστώσουμε πόσο ποσοστό των πρωτεϊνών κατακρατείται από την στήλη. Στις υπόλοιπες ζώνες του gel έχουν φορτωθεί τα κλάσματα των καθαρών πρωτεϊνών που ελήφθησαν από την κολώνα (ζώνες 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11). Όπως παρατηρείται στο gel, από τις ζώνες 10 και 11 διαπιστώνουμε ότι στα κλάσματα αυτά περιέχονται απομονωμένες δυο πρωτεΐνες του crude και είναι οι πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν για την παρούσα εργασία. Στη ζώνη 10 όπου το κλάσμα συλλέχθηκε κατά την έκλυση στα 248

mM NaCl και τη ζώνη 11 στα 337 mM NaCl. Στη ζώνη 1 περιέχεται ο μάρτυρας (marker), όπου περιέχει πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους. Το gel της εικόνας 14 για το χρωματισμό του χρησιμοποιήθηκε βαφή Coomassie blue, η οποία είναι και ποσοτική μέθοδος δηλαδή όσο μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης τόσο πιο έντονη η μπάντα της πρωτεΐνης.

Δείκτης (marker) πρωτεϊνών (συγκέντρωση πρωτεϊνών C = 4 mg/ml)

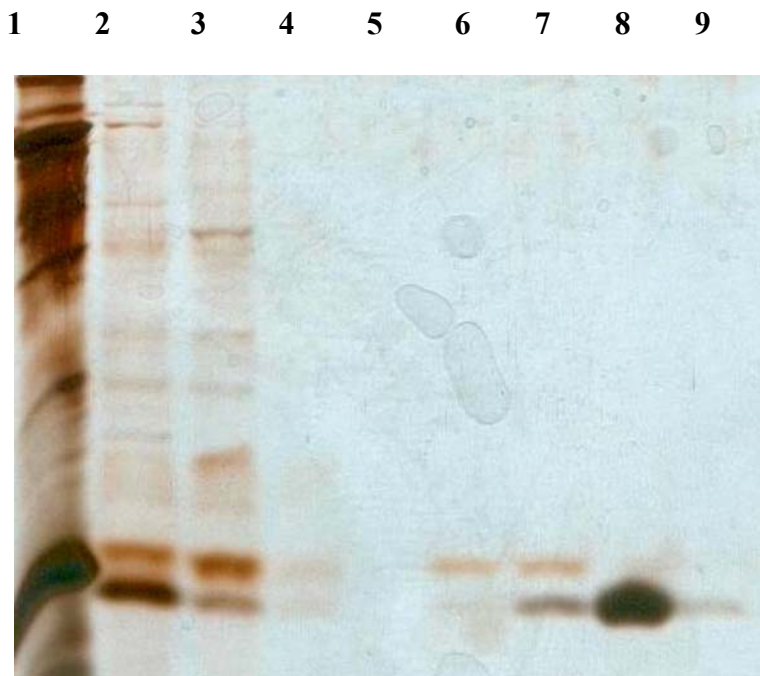


Εικόνα 16. Απεικόνιση των πρωτεϊνών με γνωστό μοριακό βάρος (marker)

Οπότε σύμφωνα με το marker οι δυο πρωτεΐνες που απομονώθηκαν από την στήλη S-Sepharose έχουν μοριακό βάρος κοντά στην μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνη του μάρτυρα στα 12,4 kD. Η πρωτεΐνη A (ζώνη 11) έχει μοριακό βάρος 12,4 kD και η πρωτεΐνη B (ζώνη 10) έχει μοριακό βάρος λίγο χαμηλότερο περίπου στα 12 kD.

Αυτή η διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού των πρωτεϊνών με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας με υλικό πλήρωσης την S-Sepharose επαναλήφθηκε αρκετές φορές ώστε να διαπιστωθεί εάν η μέθοδος παρουσιάζει επαναληψιμότητα.

Ακόμη μια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου από τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τη στήλη με ανάλογη πειραματική διαδικασία. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης απεικονίζονται στο παρακάτω gel.



Εικόνα 17. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου (βαφή αργύρου) με πρωτεΐνες από το βολβό του *Pancreatium Maritimum* μετά από το διαχωρισμό τους με υδροχρωματογραφία S-Sepharose

Στο παραπάνω gel (εικόνα 17) στη ζώνη 2 εμφανίζεται το δείγμα μας (crude) που φορτώθηκε στη κολώνα. Στη ζώνη 3 εμφανίζεται το δείγμα της φόρτωσης, δηλαδή το κλάσμα που συλλέγεται κατά την φόρτωση του crude. Στις υπόλοιπες ζώνες του gel έχουν φορτωθεί τα κλάσματα των καθαρών πρωτεϊνών που ελήφθησαν από την κολώνα (ζώνες 4, 5, 6, 7, 8, 9). Όπως παρατηρείται στο gel, από τις ζώνες 6, 8 και 9 διαπιστώνουμε ότι στα κλάσματα αυτά περιέχονται απομονωμένες δυο πρωτεΐνες του crude. Στη ζώνη 6 (πρωτεΐνη A) όπου το κλάσμα συλλέχθηκε κατά την έκλουση στα 214 mM NaCl και τη ζώνη 8 και 9 (πρωτεΐνη B) στα 367 mM NaCl. Στη ζώνη 1 περιέχεται ομοίως ο μάρτυρας (marker), όπου περιέχει πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους. Στο gel της εικόνας 17 για την χρώση των πρωτεϊνών αρχικά

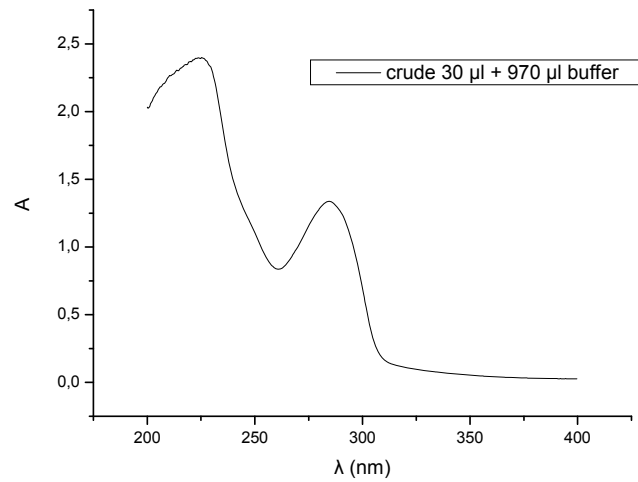
χρησιμοποιήθηκε βαφή Coomassie blue και επειδή δεν εμφανίστηκαν οι μπάντες των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε χρώση αργύρου (silver stain), η συγκεκριμένη μέθοδος χρώσης πρωτεϊνών δεν είναι ποσοτική και δε μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για την σχετική ποσότητα των πρωτεϊνών.

Από τα αποτελέσματα των δυο παραπάνω ηλεκτροφορήσεων καθώς και με το γενικό μοτίβο των επαναλήψεων της διαδικασίας απομόνωσης των πρωτεϊνών από το crude του *Pancreaticum Maritimum* συμπεραίνουμε ότι η διαδικασία είναι σχετικά επαναλήψιμη. Η πρωτεΐνη A εκλύεται από την κολώνα στα 200-250 mM NaCl και η πρωτεΐνη B εκλύεται στα 320-370 mM NaCl.

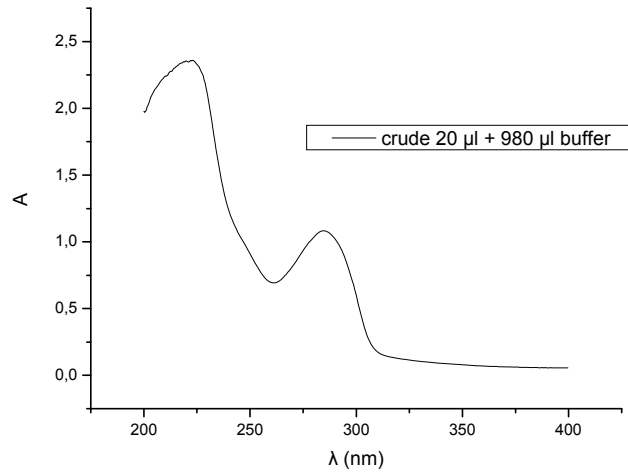
Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά πρωτεϊνών

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω για τον χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται και η φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού. Η χαρακτηριστική απορρόφηση των πρωτεϊνών είναι στα 280 nm. Η ιδιότητα των πρωτεϊνών να παρουσιάζουν απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή του υπεριώδους με μέγιστο τα 280 nm λόγω της παρουσίας αρωματικών δακτυλίων στο μόριο των αμινοξέων τυροσίνη και θρυπτοφάνη, αποτελεί τη βάση του προσδιορισμού τους με τη μέθοδο αυτή. Η ταχύτητα της μεθόδου και η μη καταστροφή του δείγματος κατά τον προσδιορισμό συνιστούν τα βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου. Από την ένταση της απορρόφησης των δειγμάτων μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για την ποσότητα των πρωτεϊνών που υπάρχουν στα δείγματα.

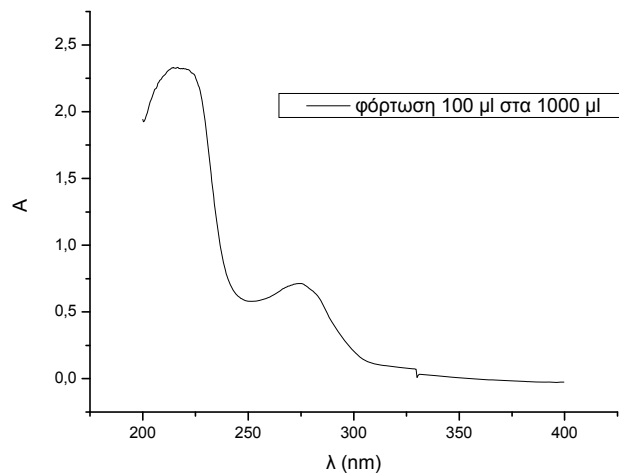
Στις παρακάτω εικόνες 18 και 19 απεικονίζονται τα φάσματα του μίγματος πρωτεϊνών (crude) πριν από την εισαγωγή του στην στήλη με διαφορετικό ποσοστό αραιώσης με το διάλυμα αλέσεως. Στην εικόνα 20 απεικονίζεται η φόρτωση (πρωτεΐνες που δεν κατακρατούνται από την κολώνα), Στις εικόνες 21 και 22 απεικονίζονται τα φάσματα των κορυφών 251 mM και 337 mM NaCl, κατά την έκλυση των πρωτεϊνών από την στήλη S-Sepharose με αύξηση της ιοντικής ισχύος, που αντιστοιχούν στις απομονωμένες πρωτεΐνες A και B αντίστοιχα. Όλες οι μετρήσεις φασματοσκοπίας UV-Vis έγιναν σε φασματοφωτόμετρο ορατού υπεριώδους SIM-AMINC0 DW-2000.



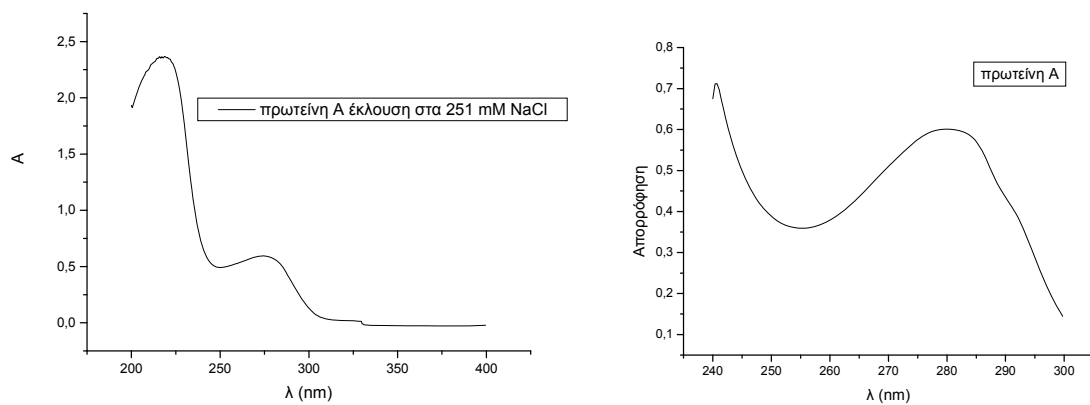
Εικόνα 18. Φάσμα του μίγματος πρωτεϊνών με αραιώση 30 μ l στα 1000 μ l διαλύματος



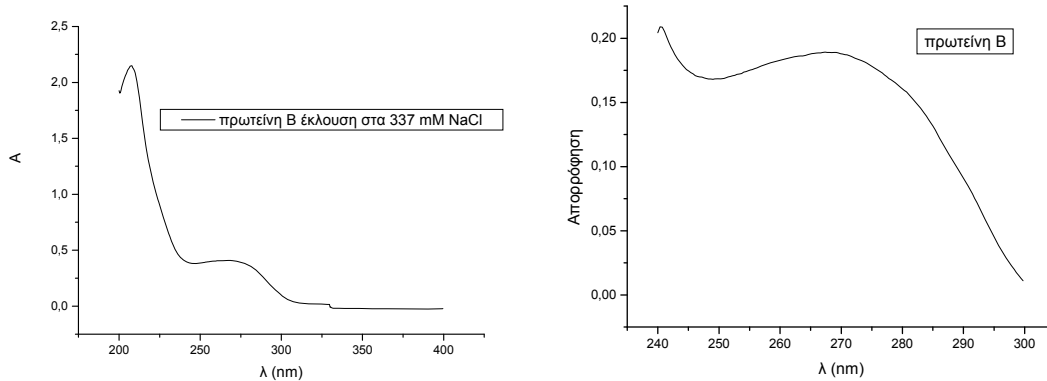
Εικόνα 19. Φάσμα του μίγματος πρωτεϊνών με αραιώση 20 μ l στα 1000 μ l διαλύματος



Εικόνα 20. Φάσμα της φόρτωσης του μίγματος πρωτεϊνών με αραιώση 100 μl στα 1000 μl διαλύματος



Εικόνα 20. Φάσματα UV της απομονωμένης πρωτεΐνης A έπειτα από διαχωρισμό του μίγματος των πρωτεϊνών με χρωματογραφία S-Sepharose, έκλουση πρωτεΐνης στα 251 mM NaCl



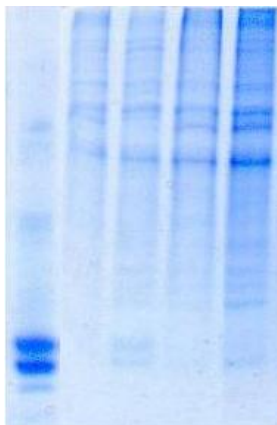
Εικόνα 21. Φάσματα UV της απομονωμένης πρωτεΐνης Β έπειτα από διαχωρισμό του μίγματος των πρωτεϊνών με χρωματογραφία S-Sepharose, έκλουση πρωτεΐνης στα 337 mM NaCl

Μέθοδοι συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Κατεργασία μίγματος πρωτεϊνών με peg

Για την συγκέντρωση των πρωτεϊνών που διαπιστώσαμε ότι υπάρχουν στο υπερκείμενο που λάβαμε μετά το άλεσμα και τις δυο φυγοκεντρήσεις (crude) , πραγματοποιούμε κατεργασία με PEG (8000). Το υπερκείμενο φιλτράρεται και στο προκύπτον διάλυμα προστίθεται σιγά-σιγά πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG 8000) ώστε η τελική συγκέντρωση στο διάλυμα να είναι 10 % w/v. Το διάλυμα αφήνεται υπό ήπια ανάδευση για 20 λεπτά σε παγόλουτρο ώστε η θερμοκρασία να διατηρείται περίπου στους 4°C. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 25.000 g για 30 λεπτά. Στο υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης προστίθεται PEG ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος που προκύπτει να είναι 20% w/v. Η προσθήκη γίνεται σιγά-σιγά διατηρώντας το διάλυμα σε πάγο και με ήπια ανάδευση για 20 λεπτά επιπλέον. Στη συνέχεια το διάλυμα φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στα 25.000g. Έπειτα ακολουθείται η ίδια διαδικασία ώστε να προκύπτουν διαλύματα που η τελική συγκέντρωσή τους να είναι 30% και 40 % PEG. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τις συγκεντρώσεις των υπερκείμενων από τις φυγοκεντρήσεις είναι διάλυμα PEG 60% w/v με διαλύτη το διάλυμα Sodium Phosphate Na_2HPO_4 10 mM, pH = 5.

1 2 3 4 5



Εικόνα 22. Πηκτική πολυακρυλαμιδίου με πρωτεΐνες από το βολβό του *Pancreaticum Maritimum* μετά από κατεργασία με PEG από 10- 40%

Τα ιζήματα που συλλέχθηκαν από τη όλες τις συγκεντρώσεις PEG 10-40% w/v φορτώνονται σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου και μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης λαμβάνονται τα αποτελέσματα της εικόνας 22

Τα δείγματα με σειρά φόρτωσης είναι τα ακόλουθα:

Ζώνη 1 – μείγμα πρωτεϊνών πριν την προσθήκη PEG

Ζώνη 2 – ίζημα μετά από φυγοκέντρηση με προσθήκη 10% w/v PEG

Ζώνη 3 – ίζημα μετά από φυγοκέντρηση με προσθήκη 20% w/v PEG

Ζώνη 4 – ίζημα μετά από φυγοκέντρηση με προσθήκη 30% w/v PEG

Ζώνη 5 – ίζημα μετά από φυγοκέντρηση με προσθήκη 40% w/v PEG

Οπότε για τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν δεν παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης τους μετά από κατεργασία PEG, άλλα πρωτεΐνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Επίσης πρέπει να αναφερθεί ότι κατακρήμνιση πρωτεϊνών με τη χρήση της PEG, συνήθως οδηγεί σε καταβύθιση των υδρόφοβων πρωτεϊνών, οπότε ο λόγος που δεν παρατηρήθηκε κατακρήμνιση των πρωτεϊνών A και B πιθανών να σημαίνει ότι είναι υδρόφιλες πρωτεΐνες.

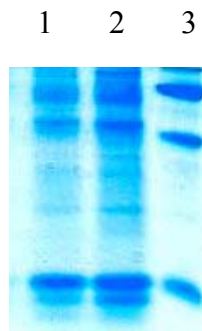
Κατεργασία πρωτεϊνών με TCA (Trichloroacetic acid)

Για την συγκέντρωση των πρωτεϊνών που διαπιστώσαμε ότι υπάρχουν στο υπερκείμενο που λάβαμε μετά το άλεσμα και τις δυο φυγοκεντρήσεις (crude) , πραγματοποιούμε κατεργασία με τριχλωροξικό οξύ (TCA). Το διάλυμα TCA που χρησιμοποιούμε είναι 100% και για την παρασκευή του απαιτείται η διάλυση 500 gr κρυστάλλων TCA σε 227 ml απιονισμένο H₂O, το οποίο διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος.

Στο πρωτεϊνικό διάλυμα που θέλουμε την συγκέντρωση των πρωτεϊνών, προσθέτουμε το τριχλωροξικό οξύ (TCA) 100% για να έχουμε τελική συγκέντρωση 10-13%.

Στο 1 ml του δείγματος πρωτεϊνών προσθέτουμε 150 μl TCA 100%, έτσι η τελική συγκέντρωση στο διάλυμα είναι 13% TCA. Το μίγμα στη συνέχεια τοποθετείτε στον πάγο, δηλαδή σε θερμοκρασία περίπου 4° C για 10-15 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στα 15.000 g με διατήρηση της θερμοκρασίας σταθερή στους 4° C, απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο, ξεπλένουμε με απιονισμένο H₂O και ξαναφυγοκεντρούμαι για 10 λεπτά όπου απομακρύνουμε το υπερκείμενο και κρατάμε το ίζημα, το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες. [23-24]

Για την ηλεκτροφόρηση του πρωτεϊνικού αυτού ιζήματος σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου απαιτείται η διαλυτοποίηση του στο διάλυμα μετουσίωσης sample buffer (2X) και η θέρμανση του δείγματος για 10' λεπτά στους 95° C πριν φορτωθεί το δείγμα στο gel.



Εικόνα 23. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου με μίγμα πρωτεϊνών από το βολβό του *Pancreaticum Maritimum* μετά από κατεργασία με TCA

Στην εικόνα 23 απεικονίζεται πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπου έχει γίνει χρώση Coomassie, στη ζώνη 1 αντιστοιχεί το υπερκείμενο που περιέχει το μίγμα των πρωτεϊνών πριν τη συγκέντρωση του με TCA και στη ζώνη 2 το ίδιο μίγμα μετά την κατεργασία του με TCA. Είναι εμφανείς η πιο έντονη χρώση της δεύτερης ζώνης, οπότε και η συγκέντρωση των πρωτεϊνών αυξήθηκε, και των πρωτεϊνών A και B που μας ενδιαφέρουν. Ενώ στη ζώνη 3 περιέχεται ο δείκτης (μάρτυρας) που περιέχει πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους.

Κατεργασία πρωτεϊνών με οργανικό διαλύτη- ακετόνη

Η πειραματική διαδικασία κατακρήμνισης των πρωτεϊνών με τον οργανικό διαλύτη ακετόνη είναι η εξής: Το υπερκείμενο που έχουμε λάβει από την τους βολβούς του *Pancreatium Maritimum*, που περιέχει μίγμα πρωτεϊνών το αραιώνουμε με ακετόνη, σε αναλογία ακετόνη:πρωτεϊνικό διάλυμα (3:1). Το μίγμα στη συνέχεια τοποθετείτε στον πάγο, για 3 ώρες. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15-20' λεπτά στα 15.000 g με διατήρηση της θερμοκρασίας σταθερή στους 4° C, απομακρύνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο, ξεπλένουμε με απιονισμένο H₂O και ξαναφυγοκεντρούμαι για 15' λεπτά όπου απομακρύνουμε το υπερκείμενο και κρατάμε το ίζημα, το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες. [3]

Για την ηλεκτροφόρηση του πρωτεϊνικού αυτού ιζήματος σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου απαιτείται η διαλυτοποίηση στο διάλυμα μετουσίωσης και η θέρμανση του δείγματος για 10 λεπτά στους 95° C πριν φορτωθεί το δείγμα στο gel.



Εικόνα 24. Πηκτή πολυακρυλαμιδίου με μίγμα πρωτεϊνών και της απομονωμένης πρωτεΐνης A, από το βολβό του *Pancreatium Maritimum* μετά από κατεργασία με οργανικό διαλύτη, την ακετόνη

Στην εικόνα 24 απεικονίζεται πηκτή πολυακρυλαμιδίου όπου έχει γίνει χρώση Coomassie, στη ζώνη 1 αντιστοιχεί η πρωτεΐνη A, η οποία έχει υποστεί κατεργασία με ακετόνη. Στη ζώνη 2 αντιστοιχεί πάλι η απομονωμένη πρωτεΐνη A, πριν την κατακρήμνιση της με ακετόνη. Στη ζώνη 3 αντιστοιχεί στο υπερκείμενο που περιέχει το μίγμα των πρωτεϊνών χωρίς κατεργασία και στη ζώνη 4 το ίδιο μίγμα μετά την κατεργασία του με ακετόνη. Είναι εμφανές ότι τα δείγματα μετά την κατεργασία τους με τον οργανικό διαλύτη ακετόνη εμφανίζουν πιο έντονη χρώση, οπότε συμπεραίνουμε ότι και η συγκέντρωση των πρωτεϊνών αυξήθηκε.

Σημείωση:

Πραγματοποιήθηκε και καταβύθιση πρωτεϊνών με τη χρήση άλατος και συγκεκριμένα του θειϊκού αμμωνίου $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, αλλά δεν μπορέσαμε να δούμε ποιες πρωτεΐνες κατακρημνίζονται μετά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Ως πιθανή αιτία είναι ότι μετά την προσθήκη του άλατος αυξάνει το ιζώδες του δείγματος και έτσι δεν έχει ομαλή πορεία στην πηκτή.

Ανάλυση πρωτεϊνών με φασματοσκοπία μάζας MALDI – TOF – MS

Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο υλικά- μέθοδοι βασικά στάδια της μεθόδου MALDI-TOF-MS αποτελούν (α) ο ιονισμός μακρομορίων, στη συγκεκριμένη περίπτωση των πρωτεϊνών (β) η επιτάχυνση των ιόντων προς την περιοχή του ανιχνευτή κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες και σε περιβάλλον κενού και, τέλος, (γ) η ανίχνευση και η ανάλυση των προκυπτουσών φασμάτων μάζας που οδηγεί στην ταυτοποίηση των μακρομορίων μέσω του προσδιορισμού του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z).

Πρωτεολυτική διάσπαση πρωτεϊνών

Η θρυψίνη είναι το περισσότερο χρησιμοποιούμενο ένζυμο το οποίο διασπάει στο C-τερματικό των πεπτιδικών δεσμών αργινίνης ή λυσίνης. Οι πρωτεολύσεις των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκαν απευθείας στην πηκτή του πολυακρυλαμιδίου έπειτα από αποδιατακτική

(Tricine-SDS-PAGE) ηλεκτροφόρηση και χρώση με μπλε colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250. Τα στίγματα των πρωτεϊνών αποκόπηκαν από τις βαμμένες με μπλε Coomassie πηκτές και αποχρωματίστηκαν με ένα υδατικό διάλυμα 40% v/v Μεθανόλη και 10% οξικό οξύ, pH 8.0. Τα κομμάτια της πηκτής αφυδατώθηκαν με ακετονιτρίλιο CH₃CN και ξηράθηκαν σε φυγοκεντρικό ξηραντήρα. Αναγωγή των ξηραμένων πηκτών πραγματοποιήθηκε με 10 mM DTT (Dithiothreitol C₄H₁₀O₂S₂) σε 50 mM διττανθρακικό αμμώνιο για 1 ώρα στους 56° C. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αλκυλίωση με 55 mM ιωδοακεταμίδιο σε 50 mM διττανθρακικό αμμώνιο για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Τα κομμάτια της πηκτής πλύθηκαν με 50 mM διττανθρακικό αμμώνιο, αφυδατώθηκαν με ACN και ξηράθηκαν σε έναν φυγοκεντρικό ξηραντήρα. Στα ξηραμένα κομμάτια της πηκτής προστέθηκε 20 μl από το ρυθμιστικό διάλυμα της πρωτεόλυσης θρυψίνης (10.125 gr θρυψίνη σε 1 μl HCl (1mM), 19 μl 40 mM διττανθρακικό αμμώνιο σε 9% ακετονιτρίλιο και αφέθηκαν για 12 ώρες στους 40° C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και αντικαταστάθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεόλυσης χωρίς θρυψίνη. Πραγματοποιήθηκε ολονύχτια πρωτεόλυση στους 37° C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε έπειτα από φυγοκέντρηση για 20 min στα 15.000 g. Τα πεπτίδια από τα κομμάτια της πηκτής εκχυλίστηκαν με 50% v/v ACN / 5% v/v Φορμικό οξύ (TFA) και το εκχύλισμα συλλέχθηκε και ενώθηκε με το υπερκείμενο. Το συνολικό διάλυμα που προέκυψε ξηράθηκε σε φυγοκεντρικό ξηραντήρα [25].

Ανάλυση πρωτεϊνών με φασματοσκοπία μάζας (MS)

Τα ξηρά δείγματα, μετά την πρωτεόλυση, επαναδιαλύθηκαν σε 20 μl 70% ACN / 0.5% v/v TFA και 0.5 μL από κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε πλακίδιο 100 θέσεων MALDI (Εικόνα 7) Τα δείγματα αφέθηκαν να ξηραθούν σε θερμοκρασία δωματίου και το πλακίδιο τοποθετήθηκε στο φασματογράφο μάζας Voyager-DE STR instrument (Applied Biosystems).

Όλα τα φάσματα MS και MS/MS επεξεργάστηκαν με το λογισμικό Data Explorer V4.8 για την εξομάλυνση τους, το φιλτράρισμα του θορύβου και την επιλογή μόνο των μονο-ισοτοπικών κορυφών. Προσδιορίστηκε αυτόματα το μοριακό βάρος των μονο-ισοτοπικών κορυφών από το λογισμικό και τα πεπτίδια που προέκυψαν από την αυτόλυση της θρυψίνης χρησιμοποιήθηκαν για την εσωτερική βαθμονόμηση των φασμάτων. Η ανάλυση των φασμάτων γίνεται με τη

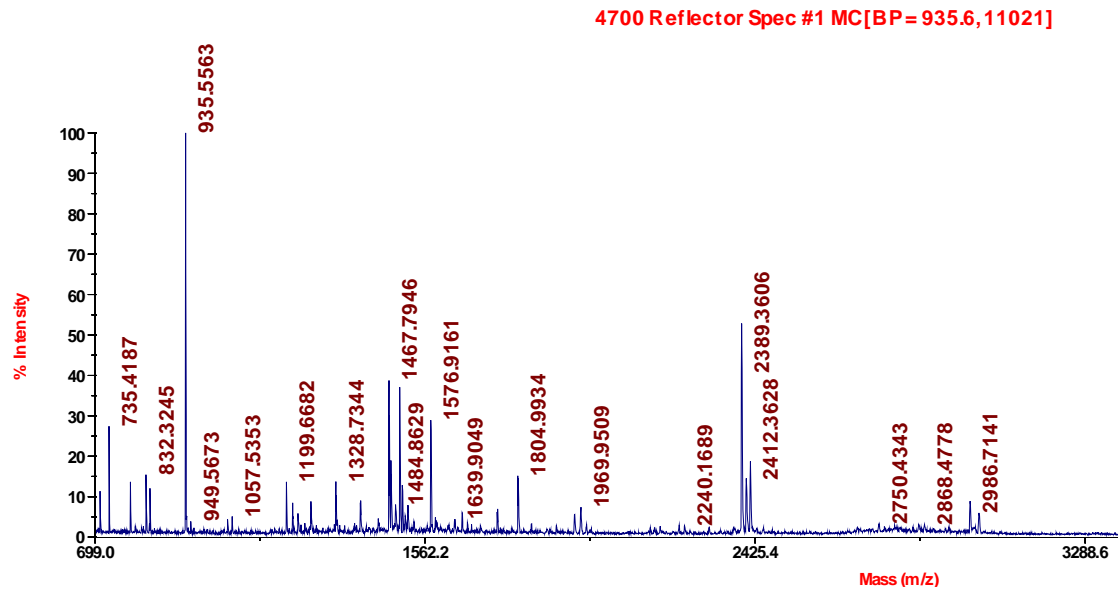
βοήθεια της βιοπληροφορικής (www.matrixscience.com), για τον υπολογισμό της μάζας των πεπτιδίων που προκύπτουν από την πρωτεολυτική δράση του ενζύμου θρυψίνη, καθώς και για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που βασίζεται στα MS/MS δεδομένα από ένα ή περισσότερα πεπτίδια. Η βάση δεδομένων για την ταυτοποίηση των απομονωμένων πρωτεϊνών από το φυτό *Pancreaticum Maritimum*, που χρησιμοποιήθηκε για την συγκεκριμένη αναζήτηση είναι η Viridiplantae, αφού μας ενδιαφέρουν μόνο τα φυτά. Οι ακόλουθοι παράμετροι χρησιμοποιήθηκαν για την αναζήτηση στην βάση δεδομένων είναι ο ελάχιστος αριθμός πεπτιδίων που ταιριάζουν 4, ανοχή πεπτιδικής μάζας ± 50 ppm, μέγιστος αριθμός αποτυχημένων πρωτεολύσεων 1, πιθανές τροποποιήσεις αμινοξέων, καρβαμιδομεθυλίωση των κυστεϊνών και οξείδωση των μεθειονινών.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής ανάλυσης με μεθόδους

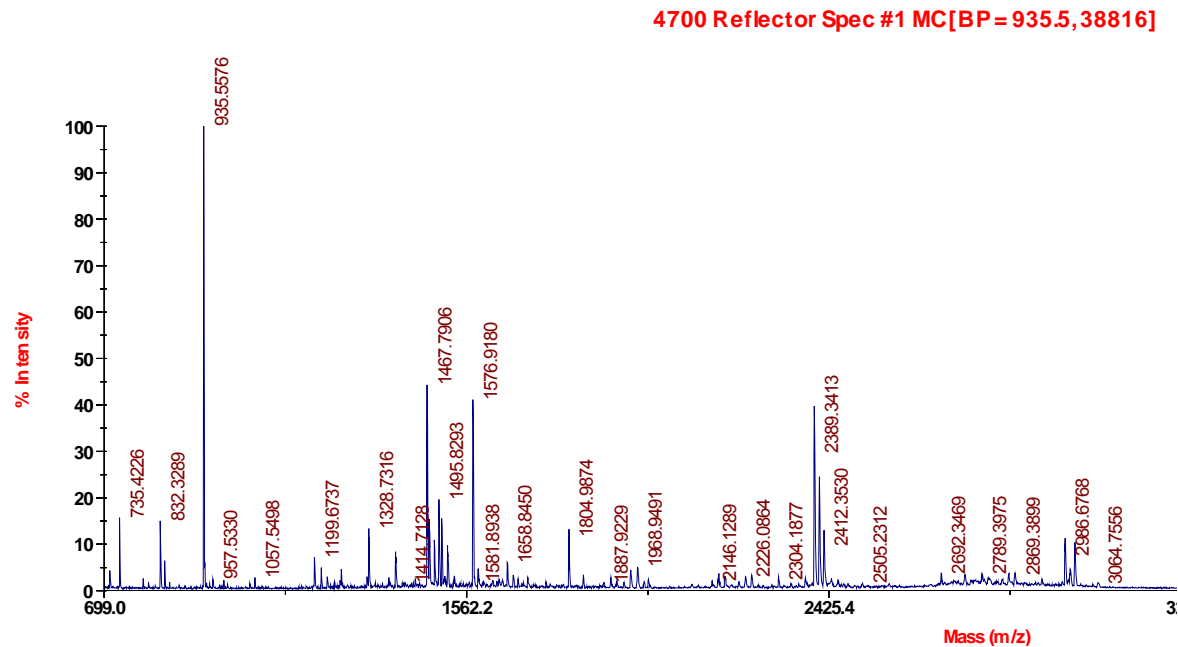
Βιοπληροφορικής

Οι ταυτοποιημένες πρωτεΐνες που προέκυψαν από κάθε μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε επεξεργάστηκαν με διάφορα προγράμματα που είναι διαθέσιμα στο δίκτυο για τον προσδιορισμό διαφόρων ιδιοτήτων τους. Η θέση και λειτουργία των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών, το ισοηλεκτρικό σημείο, το μοριακό βάρος καθώς και η τιμή GRAVY κάθε πρωτεΐνης προσδιορίστηκαν με το πρόγραμμα ProtParam (<http://expasy.org>).

Φάσματα MS από απομονωμένες πρωτεΐνες A και B



Εικόνα 25. Φάσμα MS απομονωμένης πρωτεΐνης A



Εικόνα 26. Φάσμα MS απομονωμένης πρωτεΐνης B

Από τα παραπάνω φάσματα MS διαπιστώνουμε ότι οι κύριες κορυφές είναι αυτές που εμφανίζονται στις τιμές m/z **935**, **1467** και **1576** και **735** (κυρίως στο φάσμα εικόνας 25). Η ανάλυση MS/MS έγινε για όλες τις κορυφές των φασμάτων MS, αλλά η αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων που έγινε από τα φάσματα MS/MS εστιάστηκε μόνο σε αυτές τις τέσσερις κύριες κορυφές. Από τις αναλύσεις των φασμάτων MS/MS των κύριων κορυφών, παρατηρήσαμε ότι οι πρωτεΐνες που εμφανίζονται πρώτες στη λίστα αναζήτησης, δηλαδή οι πρωτεΐνες με τα περισσότερα πεπτίδια είναι υποθετικές. Αυτό συμβαίνει διότι οι βάσεις δεδομένων περιέχουν αλληλουχίες γονιδίων για όλα τα φυτά, και κάνουν *in silico*, υποθετικά στον υπολογιστή, μετάφραση και βγάζουν ακολουθίες πρωτεϊνών που θα κωδικοποιούνταν αν τα γονίδια αυτά εκφράζονταν. Επειδή όμως πολλές πρωτεΐνες οι οποίες εκφράζονται δεν έχουν μελετηθεί ακόμα, ή μπορεί και να μην εκφράζονται γι' αυτό ονομάζονται υποθετικές. Η αντιστοίχιση με αυτές τις υποθετικές πρωτεΐνες που υπάρχουν στις βάσεις δεδομένων έγινε με βάση την ομολογία και την ομοιότητα με την δική μας πρωτεΐνη. Επίσης το score (sequence coverage) που είναι το ποσοστό που ταιριάζουν τα θραύσματα (πεπτίδια) της αναλυόμενης πρωτεΐνης με τις ακολουθίες των πρωτεϊνών που βρίσκονται στις βάσεις δεδομένων στην ανάλυση μας είναι πολύ χαμηλά γιατί δεν υπάρχει βάση δεδομένων που να έχει ακριβώς την αλληλουχία της πρωτεΐνης. Για το λόγο ότι το γονιδίωμα του συγκεκριμένου οργανισμού ή κάποιου πολύ συγγενικού, δεν έχει δημοσιευθεί, δεν μπορούμε να κάνουμε ταυτοποίηση ακόμα. Με αυτά τα φάσματα όμως μπορούμε να αναγνωρίσουμε την πρωτεΐνη μόλις βγει το γονιδίωμα κάποιου πολύ συγγενικού είδους. Προς το παρόν η αναζήτηση γίνεται για να βρούμε κάποια ομόλογη πρωτεΐνη από κάποιο άλλο φυτικό οργανισμό.

Amino acid	Three-letter abbreviation	One-letter abbreviation	Amino acid	Three-letter abbreviation	One-letter abbreviation
Alanine	Ala	A	Methionine	Met	M
Arginine	Arg	R	Phenylalanine	Phe	F
Asparagine	Asn	N	Proline	Pro	P
Aspartic Acid	Asp	D	Serine	Ser	S
Cysteine	Cys	C	Threonine	Thr	T
Glutamine	Gln	Q	Tryptophan	Trp	W
Glutamic Acid	Glu	E	Tyrosine	Tyr	Y
Glycine	Gly	G	Valine	Val	V
Histidine	His	H	Asparagine or aspartic acid	Asx	B
Isoleucine	Ile	I	Glutamine or glutamic acid	Glx	Z
Leucine	Leu	L			
Lysine	Lys	K			

Πίνακας 10. Τα αμινοξέα και η συντομογραφία τους με τρία ή ένα γράμμα

Από τα MS/MS της κορυφής **935** τα πεπτίδια που αντιστοιχούν στα μεγαλύτερα score για το φάσμα της απομονωμένης πρωτεΐνης A (εικόνα 25) καθώς και οι οργανισμοί που ανήκουν παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

hypothetical protein [Vitis vinifera]	46(34)	R.VKELSFGR.N	370 - 377
homoserine kinase [Zea mays]	41(28)	K.AVDALFGSR.L	171 - 179
maturase K [Ornithocephalus inflexus]	41(25)	K.SSMVLVKR.L	22 - 29
hypothetical protein [Lotus japonicus]	37(24)	R.LSTPAQYR.W	971 - 978
unknown protein [Arabidopsis thaliana]	40(23)	R.VVGTLFGSR.R	90 - 98

Πίνακας 11. Πεπτίδια από MS/MS κορυφής 935 για πρωτεΐνη A

Από τα MS/MS της κορυφής **935** τα πεπτίδια που αντιστοιχούν στα μεγαλύτερα score για το φάσμα της απομονωμένης πρωτεΐνης B (εικόνα 26) καθώς και οι οργανισμοί που ανήκουν παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

hypothetical protein [Vitis vinifera]	52(47)	R.VKELSFGR.N	866 - 873
hypothetical protein [Vitis vinifera]	51(47)	R.VKELSFGR.N	370 - 377
unknown protein [Arabidopsis thaliana]	36(31)	R.VVGTLFGSR.R	90 - 98
[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	40(31)	K.VTRPGSYR.L	1423 - 1430
ribosomal protein L20 [Silene samia]	47(30)	R.VTRGYIAR.R	4 - 11
ribosomal protein L20 [Silene littorea]	47(30)	R.VTRGYIAR.R	4 - 11
ribosomal protein L20 [Silene uniflora]	47(30)	R.VTRGYIAR.R	4 - 11
predicted protein [Populus trichocarpa]	48(26)	M.RISLSGMR.S	2 - 9
tir-nbs-lrr resistance protein [Populus trichocarpa]	42(26)	K.VLGSSLFGR.T	388 - 396

Πίνακας 12. Πεπτίδια από MS/MS κορυφής 935 για πρωτεΐνη B

Από τα MS/MS της κορυφής **1467** τα πεπτίδια που αντιστοιχούν στα μεγαλύτερα score για το φάσμα της απομονωμένης πρωτεΐνης A (εικόνα 25) καθώς και οι οργανισμοί που ανήκουν παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

hypothetical protein [Vitis vinifera]	38(32)	K . SPVIVDTRALQIR . I	1066 - 1078
predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens]	42(25)	R . LHATSFSLYICR . L	52 - 63
predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens]	33(23)	R . IQRDSTALPVVIR . E	249 - 261
disease resistance gene analog [Zizania latifolia]	40(21)	R . IEIVRGCGGLPLAL .	157 - 170
predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens]	34(20)	R . IELPASVGRGAELR . L	160 - 173
DNA-directed RNA polymerase [Glycine max]	30(20)	K . IETNMLTEMTLR . G	475 - 486

Πίνακας 13. Πεπτίδια από MS/MS κορυφής 1467 για πρωτεΐνη A

Από τα MS/MS της κορυφής **1467** τα πεπτίδια που αντιστοιχούν στα μεγαλύτερα score για το φάσμα της απομονωμένης πρωτεΐνης B (εικόνα 26) καθώς και οι οργανισμοί που ανήκουν παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

hypothetical protein [Vitis vinifera]	27(42)	K . SPVIVDTRALQIR . I	1066 - 1078
unknown protein [Arabidopsis thaliana]	41(22)	R . ILLRDYIYSGVR . G	1699 - 1710
predicted protein [Populus trichocarpa]	38(22)	R . LAPLTDTLALQRR . L	69 - 81

maturase [Davidsonia pruriens]	40(21)	R . IYFYGKIDHLAK . V	37 - 48
maturase K [Davidsonia pruriens]	35(21)	R . IYFYGKIDHLAK . V	201 - 212

Πίνακας 14. Πεπτίδια από MS/MS κορυφής 1467 για πρωτεΐνη B

Από τα MS/MS της κορυφής **1576** και για τα δύο φάσματα για τις πρωτεΐνες A και B μας έδωσαν κοινά αποτελέσματα από την ανάλυση στις βάσεις δεδομένων τα πεπτίδια που αντιστοιχούν στα μεγαλύτερα score καθώς και οι οργανισμοί που ανήκουν παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

hypothetical protein [Oryza sativa Japonica Group]	23(22)	R . RDVPPGGDTALHLAVR . L	85 - 99
protein binding protein [Zea mays]	21(20)	R . RDVPPGGDTALHLAVR . L	88 - 102

Πίνακας 14. Πεπτίδια από MS/MS κορυφής 1576 για πρωτεΐνες A και B

Από τα MS/MS της κορυφής **735** του φάσματος της απομονωμένης πρωτεΐνης A (εικόνα 25), τα πεπτίδια που αντιστοιχούν στα μεγαλύτερα score καθώς και οι οργανισμοί που ανήκουν παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

T24P13.14 [Arabidopsis thaliana]	24(23)	K . LEFQAK . T	581 - 586
(SET DOMAIN PROTEIN 35) binding [Arabidopsis thaliana]	24(23)	K . LEFQAK . T	157 - 162
PttA-like transposon protein [Arabidopsis thaliana]	24(21)	R . LEFKAK . L	153 - 158

Cucumisin precursor, putative [Ricinus communis]	24(21)	K . LEFKAK . N	711 - 716
TIR-NBS type disease resistance protein [Populus trichocarpa]	24(21)	R . LEMAAGK . Y	312 - 318
predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens]	24	K . LEMAKK . T	153 - 158
predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens]	24	K . LEMAKK . D	1010 - 1015

Πίνακας 15. Πεπτίδια από MS/MS κορυφής 735 για πρωτεΐνες A

Οι παραπάνω φυτικοί οργανισμοί που παρουσιάζουν ομολογία στην ακολουθία πεπτιδίων με το φυτό *Panocratium Maritimum* ανήκουν όλοι στο ίδιο υποάθροισμα (Division) Magnoliophyta, και κάποια από αυτά στην ίδια κλάση Liliopsida όμως διαφέρουν ως προς την τάξη και την οικογένεια.

Panocratium Maritimum

Eukaryota › Viridiplantae › Streptophyta › Embryophyta › Tracheophyta › Spermatophyta › Magnoliophyta › Liliopsida › Asparagales › Amaryllidaceae

Ομόλογοι φυτικοί οργανισμοί με *Panocratium Maritimum* που ανήκουν στο υποάθροισμα Magnoliophyta

- *Vitis vinifera* (grape vine- αμπέλι)
- *Arabidopsis thaliana* (thale cress, mouse-ear cress ή *Arabidopsis* - Αραβίδουψης)
- *Populus trichocarpa* (Western balsam poplar)
- *Lotus japonicus*
- *Silene littorea, uniflora, samia*

- Glycine max (Soybean)
- Ricinus communis (Castor bean)
- Davidsonia pruriens

Ομόλογοι φυτικοί οργανισμοί με *Panocratium Maritimum* που ανήκουν στο υποάθροισμα Magnoliophyta και στη κλάση Liliopsida.

- Oryza sativa (Asian rice- ρύζι)
- Zea mays (Maize) – σιτάρι
- Ornithocephalus inflexus
- Zizania latifolia

Αντιστοιχίες πεπτιδίων με ομόλογες πρωτεΐνες

Από τα παραπάνω στοιχεία που λάβαμε από τα MS/MS της κορυφής **935** και για τα δυο φάσματα MS, διαπιστώνουμε ότι οι υποθετικές πρωτεΐνες με το μεγαλύτερο score που παρουσιάζουν ομολογία με τις πρωτεΐνες A και B τις οποίες έχουμε απομονώσει από τους βολβούς του *Panocratium Maritimum* είναι πρωτεΐνες που ανήκουν στον οργανισμό **Vitis vinifera**. Οπότε η πρωτεΐνη μας πιθανότατα να έχει κοινές αλληλουχίες με αυτές τις υποθετικές πρωτεΐνες, το πεπτίδιο που έχει βρεθεί από το MS/MS της κορυφής 935 είναι το **R.VKELSFGR.N**

Ενώ επίσης από την ανάλυση με MS/MS της κορυφής **1467** το μεγαλύτερο score και για τις δύο πρωτεΐνες του Pan. Maritimum αντιστοιχεί πάλι σε υποθετική πρωτεΐνη του φυτικού οργανισμού *Vitis vinifera* και το πεπτίδιο που βρέθηκε είναι το **K.SPVIVDTRALQIR.I**.

Από την ανάλυση της κορυφής **1576** με MS/MS και με τη χρήση της βάσης δεδομένων διαπιστώθηκε ότι αντιστοιχεί στο πεπτίδιο **R.RDVPGGDTALHLAVR.L**, όπου αυτή η ακολουθία αμινοξέων βρέθηκε στους οργανισμούς *Oryza sativa Japonica Group* και *Zea mays*.

Κατά την ανάλυση της κορυφής **735** του φάσματος της πρωτεΐνης A, παρατηρήθηκαν αντιστοιχήσεις με διάφορα πεπτίδια από τους οργανισμούς *Arabidopsis thaliana*, *Ricinus*

communis, *Populus trichocarpa* και *Physcomitrella patens* με το ίδιο ποσοστό αντιστοίχισης (score). Οι ακολουθίες αμινοξέων που είναι πιθανόν να είναι κοινές με τις πρωτεΐνες του *Pancreaticum Maritimum* είναι οι εξής: K.LEFQAK.T, R.LEFKAK.L, R.LEMAAGK.Y, K.LEMAKK.T.

Λειτουργίες ομόλογων πρωτεϊνών με πρωτεΐνες από *Pancreaticum Maritimum*

Η υποθετική πρωτεΐνη από τον οργανισμό του αμπελιού *Vitis vinifera* που βρέθηκε να έχει ομολογία με τις πρωτεΐνες A και B από την ανάλυση με MS/MS των κορυφών 935 και 1467, η μοριακή της λειτουργία είναι να δρα ως πρωτεΐνη δέσμησης άλλων πρωτεϊνών και ιόντων ψευδαργύρου Zn. Οπότε αλληλεπιδρά επιλεκτικά και μη ομοιοπολικά με οποιαδήποτε πρωτεΐνη ή πρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο μπορεί να περιλαμβάνει και μη πρωτεϊνικά μόρια, και επίσης έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά επιλεκτικά και μη ομοιοπολικά με ιόντα ψευδαργύρου (Zn).

Από τα στοιχεία που λάβαμε από τα MS/MS της κορυφής 935 της πρωτεΐνης A (εικόνα 24) διαπιστώνουμε ότι αρκετές πρωτεΐνες εκτός από την πρωτεΐνη του φυτού *Vitis vinifera* παρουσιάζουν ομολογία με την πρωτεΐνη A. Η πρωτεΐνη maturase K του φυτού *Ornithocephalus inflexus* συμμετέχει στο μάτισμα του RNA, στη διαδικασία ωρίμανσης mRNA. Η πρωτεΐνη homoserine kinase του οργανισμού *Zea mays*, οι βιολογικές της λειτουργίες είναι η φωσφορυλίωση, η συμμετοχή στην μεταβολική διαδικασία της θρεονίνης, η δέσμηση του ATP, η κατάλυση της αντίδρασης $ATP + L\text{-homoserine} = ADP + O\text{-phospho-L-homoserine}$, ενώ επίσης λειτουργεί και σαν τρανσφεράση. Μια ακόμα ομόλογη πρωτεΐνη του φυτού *Lotus japonicus* συμμετέχει στην ενοποίηση τμημάτων DNA, στην πρωτεόλυση, διάσπαση πρωτεϊνών με υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών τους και έχει δραστηριότητα DNA πολυμεράσης

Από την ανάλυση της κορυφής 935 με MS/MS της πρωτεΐνης B (εικόνα 25), παρατηρήσαμε ότι ομόλογες πρωτεΐνες της πρωτεΐνης B με χαμηλότερο score από την πρωτεΐνη του *Vitis Vinifera* είναι ριβοσωμικές πρωτεΐνες από τον οργανισμό *Silene* διαφόρων ειδών *samia*, *littorea*, *uniflora*, που συμμετέχουν στη διαδικασία της μετάφρασης, συνδέονται επιλεκτικά και μη ομοιοπολικά με το rRNA και συμβάλουν στην ακεραιότητα του ριβοσώματος. Ενώ επίσης μια ομόλογη πρωτεΐνη του οργανισμού *Oryza sativa* έχει βιολογικές δράσεις την ενοποίηση τμημάτων DNA, DNA πολυμεράση, και δραστηριότητα ριβονουκλεάσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ομολογία του

γενετικού υλικού μεταξύ των ειδών *Pancreatium* και *Oryza* είναι ήδη γνωστή από βιβλιογραφικά δεδομένα. [26]

Από τα στοιχεία που λάβαμε από τα MS/MS της κορυφής 1467 της πρωτεΐνης A (εικόνα 24) διαπιστώνουμε εκτός από την υποθετική πρωτεΐνη από τον οργανισμό *Vitis vinifera* κι άλλες ομόλογες πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη disease resistance του οργανισμού *Zizania latifolia* επιτελεί λειτουργίες απόπτωσης των κυττάρων, αμυντικής απόκρισης του οργανισμού σε ξενιστή και ικανότητα δέσμευσης ATP. Η πρωτεΐνη από τον οργανισμό *Glycine max* είναι RNA πολυμεράση.

Από τις αναλύσεις της κορυφής 1467 της πρωτεΐνης B (εικόνα 25), ομολογία εκτός από την πρωτεΐνη του *Vitis vinifera* εμφανίζει μια πρωτεΐνη του φυτού *Populus trichocarpa* που συμμετέχει στην ενοποίηση τμημάτων DNA και στον ανασυνδυασμό γονιδίων στο DNA. Επίσης η πρωτεΐνη maturase K, από τον οργανισμό *Davidsonia pruriens*, της οποίας η λειτουργία όπως αναφέρθηκε και παραπάνω είναι το μάτισμα του RNA, στη διαδικασία ωρίμανσης του mRNA.

Από τις αναλύσεις των φασμάτων MS/MS της κορυφής 1576 και των δυο πρωτεϊνών (εικόνας 24 και 25), οι ομόλογες πρωτεΐνες δεν έχουν γνωστή λειτουργία, η μόνη πρωτεΐνη με γνωστή βιολογική δράση είναι η πρωτεΐνη που ανήκει στον οργανισμό *Zea mays*, η οποία συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών.

Από την αναζήτηση με βάση τα φάσματα MS/MS της κορυφής 735 για την πρωτεΐνη B (εικόνα 25) οι ομόλογες πρωτεΐνες παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία ως προς την βιολογική τους λειτουργία. Η δράση της πρωτεΐνης TIR-NBS type resistance του φυτού *Populus trichocarpa* είναι η απόπτωση, η μεταγωγή σημάτων και η έμφυτη ανοσοαπάντηση. Η ομόλογη πρωτεΐνη από τον οργανισμό *Ricinus communis* (Castor bean) συμμετέχει στη διαδικασία της οξειδοαναγωγής, στην πρωτεόλυση, ενώ έχει και άλλες λειτουργίες όπως δραστηκότητα ενδονουκλεάσης τύπου-σερίνης και απενεργοποίηση ή μείωση της δραστηκότητας ενός ενζύμου. Ενώ η πρωτεΐνη του φυτού *Physcomitrella patens* έχει δραστηκότητα υδρολάσης.

Β' Πειραματικό μέρος

Διαδικασία απομόνωσης αλκαλοειδών από *Pancreatium Maritimum*

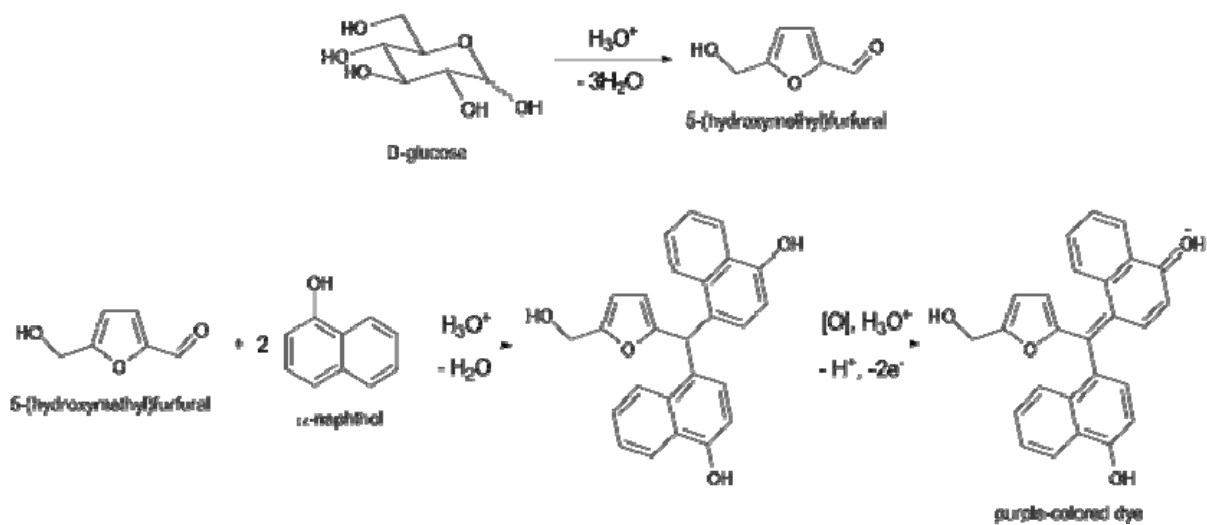
Επιλέγουμε βολβούς από φρεσκοκομμένα κρινάκια *Pancreatium Maritimum*. Καθαρίζουμε προσεκτικά το εξωτερικό προστατευτικό υμένιο και τεμαχίζουμε το εσωτερικό των βολβών σε μικρά κομμάτια. Λαμβάνουμε περίπου 160 gr κομμάτια βολβών τα οποία ψύχουμε στους 4° C και ακολουθεί ομογενοποίηση τους για 2' λεπτά σε μίξερ χρησιμοποιώντας 500 ml διαλύματος αλέσεως 10 mM φωσφορικού νατρίου (Na₂HPO₄), 100 mM NaCl, pH=5, το οποίο έχει τοποθετηθεί στο ψυγείο. Στη συνέχεια το ομογενοποιημένο διάλυμα διηθείται με οκταπλό φύλλο γάζας, έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα άσπαστα τμήματα του φυτού, η κωνική που τοποθετείται το μίγμα μετά το φιλτράρισμα είναι απαραίτητα σε πάγο. Έπειτα το φιλτραρισμένο εκχύλισμα φυγοκεντρείται για 30' λεπτά στα 20.000 g διατηρώντας τη θερμοκρασία σταθερή στους 4°C. Με τη διαδικασία αυτή απομακρύνονται τα μη θραυσμένα κύτταρα. Από τη φυγοκέντρωση αυτή το ίζημα όπου το διαλυτοποιήθηκε σε μεθανόλη (MeOH).

Έπειτα το υπερκείμενο διάλυμα φυγοκεντρείται ξανά στα 33.000 g για 30 λεπτά στους 4° C και το υπερκείμενο διάλυμα που λαμβάνουμε είναι διαυγές. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης, μετά από διήθηση από απλό χάρτινο ηθμό, υποβλήθηκε σε διαδικασία πρωτεϊνικής καταβύθισης με τη χρήση θειικού αμμωνίου (NH₄)₂SO₄. Συγκεκριμένα, στο διαυγές διάλυμα που λάβαμε από την διαδικασία των διαδοχικών φυγοκεντρήσεων προστίθεται σταδιακά στερεό θειικό αμμώνιο, ενώ το διάλυμα βρίσκεται υπό συνεχή ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα στο ψυγείο. Η τελική συγκέντρωση του θειικού αμμωνίου στο διάλυμα είναι 60 % w/v, το μίγμα του υπερκείμενου με το θειικό αμμώνιο αφήνεται υπό ανάδευση στους 4° C για 24 ώρες. Αρχικά συλλέγουμε τη ποσότητα της πρωτεΐνης που συσσωματώνεται άμεσα η οποία ξεπλένεται προσεκτικά με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα θειικού αμμωνίου και τυχόν ανεπιθύμητες προσμίξεις. Έπειτα, το υπόλοιπο μίγμα φυγοκεντρείται στα 20.000 g για 30 λεπτά, με σταθερή τη θερμοκρασία στους 4° C, για να συλλεχθεί η καταβυθισμένη πρωτεΐνη, που πέφτει σαν ίζημα στα τοιχώματα των σωλήνων φυγοκέντρωσης, το ίζημα αυτό συλλέγεται και ομοίως ξεπλένεται με το ρυθμιστικό διάλυμα.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται η εκχύλιση των ουσιών που δεσμεύονται με τις καταβυθισμένες πρωτεΐνες. Η εκχύλιση γίνεται με μεθανόλη όπου έχουμε διαλυτοποιήσει το ίζημα της τελευταίας φυγοκέντρωσης, ο λόγος που χρησιμοποιούμε την μεθανόλη είναι ότι η μεθανόλη είναι ο κύριος διαλύτης έκχυσης των αλκαλοειδών. Έτσι το στο διάλυμα της μεθανόλης πραγματοποιούμε εκχύλιση reflux στους 40° C για 24 ώρες. Έπειτα το μεθανολικό διάλυμα φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στα 8.000 g, το υπερκείμενο διάλυμα διηθείται με χάρτινο ηθμό. Το μεθανολικό διάλυμα που λαμβάνεται, απαλλαγμένο από το μίγμα των πρωτεϊνών περιέχει τις προς εξέταση ουσίες, τα αλκαλοειδή.

Χρωματικός έλεγχος σύστασης σακχάρων στα μεθανολικά δείγματα των αλκαλοειδών

Λαμβάνουμε δείγμα από το μεθανολικό διάλυμα και πραγματοποιούμε **Molisch's test** για τον έλεγχο παρουσίας σακχάρων στο διάλυμα. Ο έλεγχος πραγματοποιείται παρουσία θειικού οξέος (H₂SO₄) και αιθανολικού διαλύματος ναφθόλης. Το θειικό οξύ αφυδατώνει την πεντόζη σε φουρφουράλη και την εξόζη σε υδροξυμεθυλ-φουρφουράλη, αλδεϋδικές ενώσεις, που όταν ενωθούν με τα μόρια της ναφθόλης, δίνουν ένα έγχρωμο, ιώδες προϊόν.



Εικόνα 27. Αντίδραση της α-ναφθόλης με την υδροξυμεθυλ-φουρφουράλη

Λαμβάνουμε 0.5 ml από το προς εξέταση μεθανολικό διάλυμα και προσθέτουμε 5 ml παγωμένου 75 % H₂SO₄ και έπειτα ρίχνουμε 3 σταγόνες από το 3% αιθανολικό διάλυμα της ναφθόλης. Με την προσθήκη της ναφθόλης σχηματίζεται ένα κίτρινο χρώμα στο διάλυμα, στη

συνέχεια το μίγμα θερμαίνεται στους 80° C σε υδατόλουτρο και το διάλυμα γίνεται ιώδες. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ανάλογα με τη χημική δομή και την συγκέντρωση των σακχάρων που περιέχονται στο διάλυμα το χρώμα ποικίλει από ιώδες μέχρι και μπλε-βιολετί. [27]

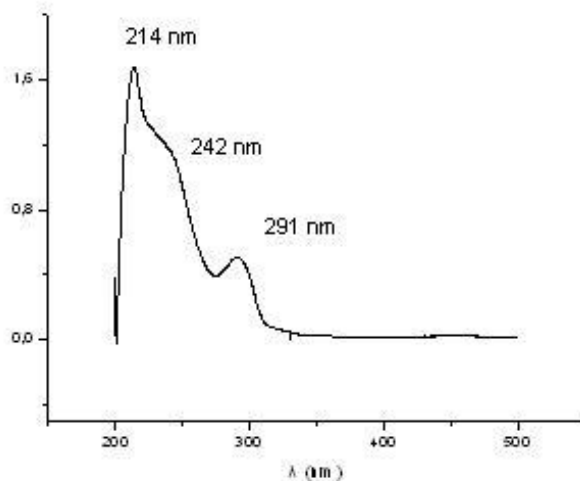
Πράγματι το test μας έδωσε θετικό αποτέλεσμα, γεγονός που μαρτυρά την παρουσία γλυκοζιτών ή ελεύθερων σακχάρων στο μεθανολικό διάλυμα που περιέχει τα αλκαλοειδή.



Εικόνα 28. Χρωματισμός μεθανολικού διαλύματος αλκαλοειδών

Χαρακτηρισμός αλκαλοειδών με φασματοσκοπία UV-Vis

Στο μεθανολικό διάλυμα που περιέχει μίγμα αλκαλοειδών, λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης του στη φασματική περιοχή 200-500 nm. Παρόλο που στα βιβλιογραφικά δεδομένα υπάρχουν μικρές διαφορές στα μήκη κύματος που τα αλκαλοειδή εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση, υπάρχουν τρεις χαρακτηριστικές περιοχές απορροφήσεων στα $\lambda= 208-220 \text{ nm}$, στα $\lambda=230-250$ και στα $\lambda= 280-290 \text{ nm}$. [28-29]



Εικόνα 29. Φάσμα UV μίγματος αλκαλοειδών

Παρατηρούμε ότι στο μήκος κύματος 214 nm εμφανίζεται μια απορρόφηση υψηλής έντασης, η οποία οφείλεται στις $n \rightarrow \pi^*$ μετατοπίσεις των ατόμων με ελεύθερα ζεύγη ηλεκτρονίων, όπως αζώτου και οξυγόνου που αποτελούν στοιχεία της δομής των αλκαλοειδών ενώσεων. Στο μήκος κύματος 242 nm παρατηρούμε μια πεπλατισμένη κορυφή η οποία ανήκει σε α, β μη κορεσμένη καρβονυλική ομάδα ($\pi \rightarrow \pi^*$ μετατόπιση ηλεκτρονίων). Ενώ επίσης παρατηρούμε και μια κορυφή απορρόφησης στα 290 nm μικρότερης έντασης, η οποία οφείλεται σε αρωματικούς δακτυλίους που περιέχονται στις ενώσεις των αλκαλοειδών και δημιουργούν συζυγιακό σύστημα (χρωμοφόρες ομάδες) στις οποίες τα π ηλεκτρόνια απεντοπίζονται λόγω του συζυγιακού φαινομένου με αποτέλεσμα τα τροχιακά π^* να έχουν χαμηλότερη ενέργεια και έτσι οι μεταπτώσεις $\pi \rightarrow \pi^*$ να εμφανίζονται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος [30].

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) αποτελεί από τις πιο απλές μεθόδους κυρίως για την απομόνωση, ταυτοποίηση καθώς και ποσοτικό προσδιορισμό, αν και σε μικρότερο βαθμό, μικρού μοριακού βάρους οργανικών και ανόργανων ουσιών.

Στο μεθανολικό εκχύλισμα που περιέχει μίγμα των αλκαλοειδών ενώσεων, πραγματοποιείται χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε πλακίδια αλουμινίου επιστρωμένα με silica gel 60 F₂₅₄ (Merck 5554). Ως διαλύτες έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω συστήματα διαλυτών:

1. AcOEt : EtOH : H₂O (10:2:1) [32]
2. 10% MeOH σε CHCl₃
3. 20% MeOH σε CHCl₃
4. 40% MeOH σε CHCl₃ [31]
5. 10% MeOH σε CH₂Cl₂ [33-34]

Το μέσο εμφάνισης που χρησιμοποιήθηκε είναι η βαφή :

- 97% MeOH (παγωμένη)
- 2% H₂SO₄
- 1% Ανισαλδεΐδη

Οι πλάκες της χρωματογραφίας TLC μετά την εφαρμογή του μέσου εμφάνισης θερμαίνονται για 5' λεπτά στους 100° C (ή με τη βοήθεια στεγνωτήρα) για την απομάκρυνση του μεγαλύτερου ποσοστού της υγρασίας και η παρατήρηση των αποτελεσμάτων (spots) πραγματοποιείται στο ορατό και έπειτα σε λάμπα UV 365 nm.

Αποτελέσματα από τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Μια πρώτη εκτίμηση για τη σύσταση του μεθανολικού εκχυλίσματος (αλκαλοειδή) από τους βολβούς του φυτού, απομακρύνοντας το πρωτεϊνικό μίγμα, πραγματοποιήθηκε με τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, με την χρήση διαφόρων συστημάτων έκλουσης. Από το κάθε σύστημα έκλουσης μετά την εφαρμογή του μέσου εμφάνισης (διάλυμα ανισαλδεΐδης), το οποίο εμφανίζει σχετικά υψηλή εκλεκτικότητα στη χρωματική εμφάνιση των αλκαλοειδών, αποκαλύφθηκαν ορισμένα σημεία (spots), τόσο στην ορατή, όσο και στην υπεριώδη ακτινοβολία (365 nm). Έπειτα υπολογίσαμε τις τιμές του παράγοντα επιβράδυνσης $R_f = (d_R/d_M)$ που αποτελεί μέτρο ταχύτητας μετακίνησης, όπου το d_M είναι η απόσταση μετακίνησης στην πλάκα

TLC του διαλύτη από την γραμμή ανάπτυξης και το d_R είναι η απόσταση μετακίνησης του εκάστοτε συστατικού του προς εξέταση δείγματος από την γραμμή ανάπτυξης. Οπότε ο παράγοντας R_f παίρνει τιμές από $0 \leq R_f \leq 1$.

Υπολογίζοντας λοιπόν τον παράγοντα R_f για τα σημεία που παρατηρούμε στις πλάκες TLC, και συγκρίνοντας τα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα έχουμε μια σημαντική ένδειξη για το είδος των αλκαλοειδών που περιέχονται στο μεθανολικό διάλυμα.

1. Σύστημα διαλύτη AcOEt : EtOH : H₂O (10:2:1)

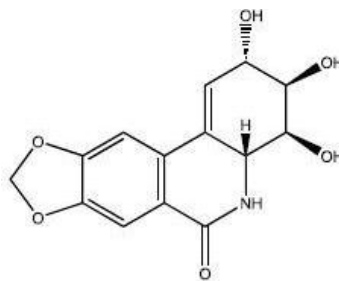


Όταν ο διαλύτης έκλουσης στην TLC στο μεθανολικό μίγμα αλκαλοειδών είναι AcOEt:EtOH:H₂O (10:2:1), σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα στο σημείο όπου ο παράγοντας είναι $R_f=0.55$ ανιχνεύεται το αλκαλοειδές **Narciclacine**, ενώ στο σημείο όπου $R_f=0.4$ το αλκαλοειδές **Margetine (Lycoricidine)**, το οποίο υπάρχει σε πολύ μικρές ποσότητες στο φυτό *Pancreatium Maritimum* [32].

Εικόνα 30. TLC



Δομή Narciclacine



Δομή Margetine (Lycoricidine)

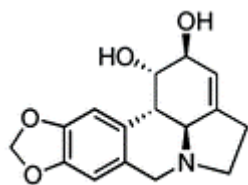
Εικόνα 31. Δομές αλκαλοειδών Narciclacine και Margetine

2. Σύστημα διαλύτη 10% MeOH σε CHCl₃

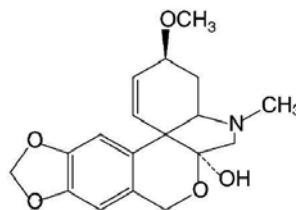


Επίσης όταν ο διαλύτης έκλουσης είναι 10% MeOH σε CHCl₃ στο σημείο $R_f=0.5$ ανιχνεύεται το αλκαλοειδές **Lycorine** και στο σημείο $R_f=0.6$ το αλκαλοειδές **Tazettine** [31] [36].

Εικόνα 32. TLC



Δομή Lycorine



Δομή Tazettine

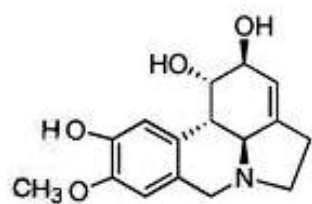
Εικόνα 33. Δομές αλκαλοειδών Lycorine και Tazettine

3. Σύστημα διαλύτη 20% MeOH σε CHCl₃

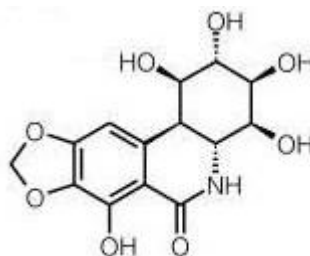


Ενώ όταν ο διαλύτης έκλουσης στην TLC για το μεθανολικό μίγμα αλκαλοειδών είναι CHCl₃:CH₃OH (4:1), σύμφωνα με τη βιβλιογραφία στο σημείο $R_f=0.4$ ανιχνεύεται το αλκαλοειδές **Pancreatistatine** [35] και στο σημείο $R_f=0.44$ το αλκαλοειδές **Pseudolycorine** [31].

Εικόνα 34. TLC



Δομή Pseudolycorine



Δομή Pancratistatine

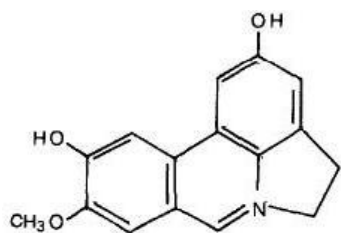
Εικόνα 35. Δομές αλκαλοειδών Pseudolycorine και Pancratistatine

4. Σύστημα διαλύτη 40% MeOH σε CHCl₃

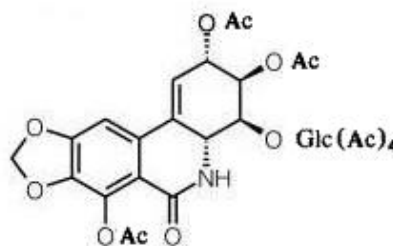


Όταν το σύστημα του διαλύτη είναι 40% MeOH σε CHCl₃, στο σημείο $R_f=0.39$ ανιχνεύεται ένα γλυκοζιτικό παράγωγο της Narciclacine, **Narciclacine-4-O-β-D-Glucopyranoside**, ενώ στο $R_f=0.3$ το αλκαλοειδές **Zefbetaine** [31].

Εικόνα 36. TLC



Δομή Zefbetaine



Δομή Narciclacine-4-O-β-D-Glucopyranoside

Εικόνα 37. Δομές αλκαλοειδών Zefbetaine και γλυκοζιτικού παραγώγου Narciclacine-4-O-β-D-Glucopyranoside

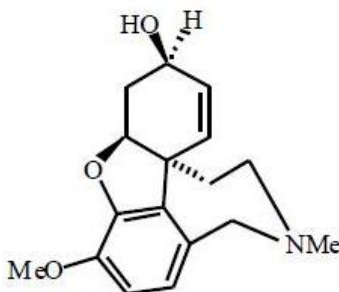
5. Σύστημα διαλύτη 10% MeOH σε CH₂Cl₂



Τέλος όταν φορτώσουμε μίγμα αλκαλοειδών σε πλάκες TLC με διαλύτη έκλουσης 10% MeOH σε CH₂Cl₂, το σημείο $R_f=0.3$ αντιστοιχεί στο αλκαλοειδές **Galanthamine** [33].

Εικόνα 38. TLC

Επίσης το σημείο όπου $R_f = 0.16$ αντιστοιχεί σε ένα μίγμα των αλκαλοειδών: Pancratistatine, Narciclacine, και Trans-Dihydronarciclasine. [34].



Εικόνα 39. Δομή αλκαλοειδούς Galanthamine

Από τα παραπάνω αποτελέσματα όσο αυξάνεται η πολικότητα του διαλύτη, δηλαδή το ποσοστό μεθανόλης, αυξάνεται και η πολικότητα των αλκαλοειδών που ανιχνεύονται. Δηλαδή τα λιγότερο πολικά αλκαλοειδή **Lycorine** και **Pseudolycorine** παρατηρούνται σε συστήματα διαλύτη 10% και 20% μεθανόλη σε τριχλωρομεθάνιο αντίστοιχα, ενώ τα αλκαλοειδή **Zefbetaine** και το γλυκοζιτικό παράγωγο **Narciclacine-4-O-β-D Glucopyranoside** σε διαλύτη 40% μεθανόλη σε τριχλωρομεθάνιο.

Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Όπως περιγράψαμε και στο κεφάλαιο υλικά- μέθοδοι, η πιο αποδοτική μέθοδος για τον βέλτιστο διαχωρισμό των αλκαλοειδών από το μεθανολικό διάλυμα όπου υπάρχουν σαν μίγμα, είναι η

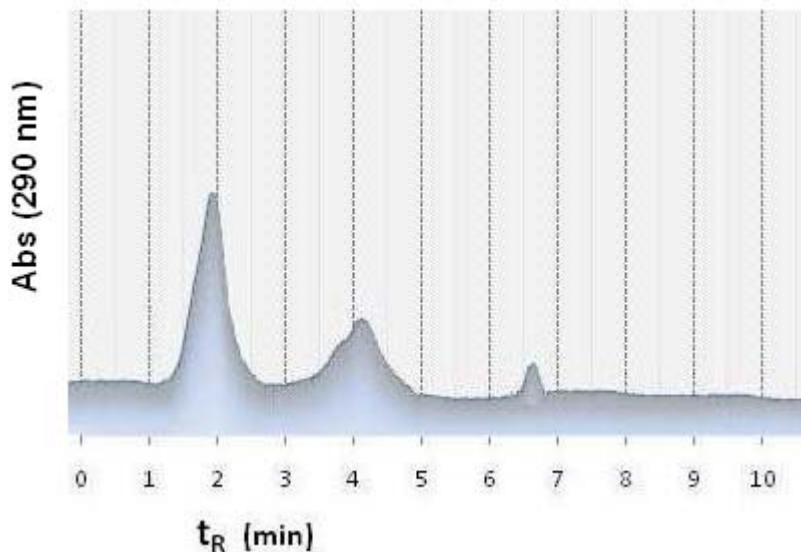
υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης (RP-HPLC) [37]. Στη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης, η οποία ανήκει στην χρωματογραφία κατανομής, η στατική φάση είναι μη πολική, συχνά ένας υδρογονάνθρακας και η κινητή φάση είναι ένας σχετικά πολικός διαλύτης (όπως ύδωρ, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο). Οπότε το πολικότερο συστατικό του δείγματος που αναλύεται θα εκλούεται πρώτο αφού είναι και το περισσότερο διαλυτό στην κινητή φάση. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ως στήλη διαχωρισμού, μια Kromasil C₁₈ στήλη, που επιτρέπει τον βέλτιστο διαχωρισμό των αλκαλοειδών, που απομονώνονται από φυτικούς οργανισμούς. Η στήλη είναι διαστάσεων 250x4.0 mm, με διάμετρο πόρων του υλικού πλήρωσης της ανάστροφης φάσης 5 μm. Η στήλη συνδέεται με μια τετρακάναλη αντλία υψηλής ακρίβειας (υψηλής πίεσης μέχρι και 6000 psi (~ 400 Atm) μέσα στη στήλη) Gunkotek 480 και με έναν ανιχνευτή UV, Linear UVIS 200, που έχει ρυθμιστεί σε μήκος κύματος 290 nm.

Η κινητή φάση της χρωματογραφίας αποτελείται από ακετονιτρίλιο και νερό σε αναλογία **MeCN: H₂O (25:75)** και περιέχει 0.3 % v/v οξικό οξύ CH₃COOH. Η κινητή φάση πριν περάσει από τη στήλη διηθείται χρησιμοποιώντας φίλτρα με μέγεθος πόρων 0.45 μm, για την απομάκρυνση της σκόνης και αιωρούμενων σωματιδίων του διαλύτη, για να προληφθούν πιθανές βλάβες στις αντλίες ή στα συστήματα έκχυσης, όπως και πιθανή έμφραξη της στήλης. Επίσης τοποθετείται και στους υπερήχους για 20 λεπτά ώστε να απομακρυνθούν τα διαλυμένα αέρια, κυρίως το οξυγόνο, για την αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων στη στήλη και στον ανιχνευτή του συστήματος, και για να διατηρείται σταθερή η πίεση στο κύκλωμα ροής.

Στην εργασία αυτή, η έκλυση είναι ισοκρατική (isocratic elution) καθώς ο διαλύτης είναι σταθερής σύστασης **MeCN: H₂O (25:75)**. Ο ρυθμός ροής (flow rate) της κινητής φάσης είναι 800 μl/min. Η έκχυση του δείγματος προς ανάλυση, γίνεται διαμέσου βαλβίδας εισαγωγής υψηλής πίεσης με βρόγχο, όπου εισάγονται 100 μl δείγματος.

Από τη σειρά έκλυσης των συστατικών μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για την πολικότητα τους, τα συστατικά του μίγματος εκλούνται με σειρά μειωμένης πολικότητας, δηλαδή το πρώτο κλάσμα θα περιέχει το πολικότερο συστατικό. Γιατί όπως προαναφέρθηκε στη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης, η στατική φάση είναι μη πολική C₁₈, και η κινητή φάση είναι ένας σχετικά πολικός διαλύτης MeCN:H₂O (25:75). Τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας παρουσιάζονται στο παρακάτω χρωματογράφημα (εικόνα 40), όπου στον

άξονα y είναι το σήμα που δίνει το κάθε συστατικό του μίγματος που ανιχνεύεται από τον ανιχνευτή UV (απορρόφηση στα 290 nm) και στον άξονα x είναι ο χρόνος έκλουσης (χρόνος κατακράτησης στην στήλη) των συστατικών αυτών.



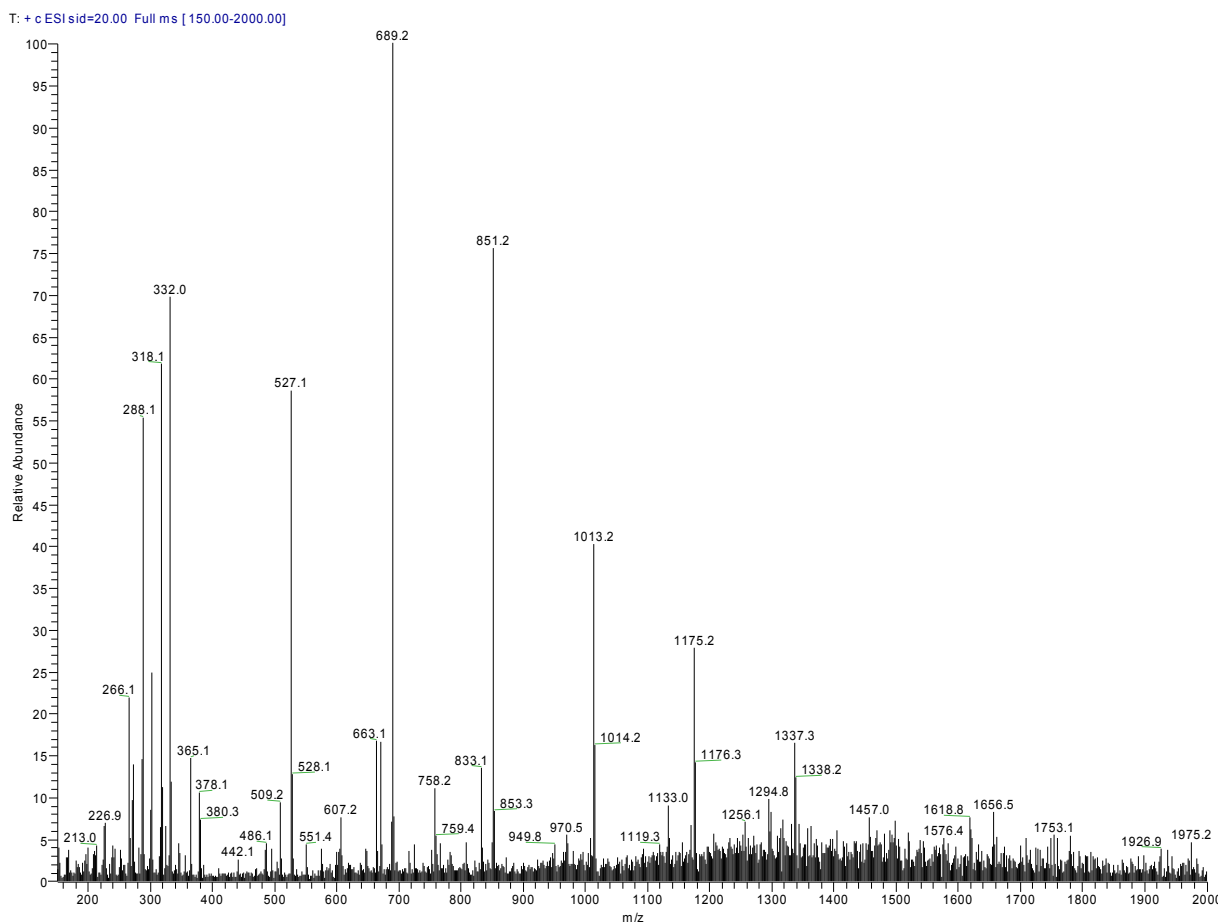
Εικόνα 40. Χρωματογράφημα RP-HPLC

Κορυφή HPLC	t_R (min)	Abs (290 nm)
1 ^ο κλάσμα	1.9	0.55
2 ^ο κλάσμα	4.2	0.23
3 ^ο κλάσμα	6.7	0.11

Πίνακας 16. Κορυφές χρωματογραφήματος με χρόνους έκλουσης και ένδειξη απορρόφησης ανιχνευτή UV (290 nm)

Φασματοσκοπία MS-ESI για δείγματα αλκαλοειδών μετά από διαχωρισμό με RP-HPLC

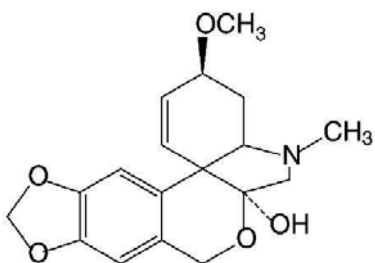
Ανάλυση 1^ο κλάσματος



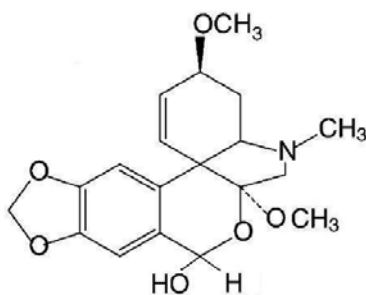
Εικόνα 41. Φάσμα MS για 1^ο κλάσμα

Το μοριακό ιόν με την υψηλότερη σχετική αφθονία στο φάσμα MS της εικόνας 41 είναι το ιόν με μάζα 689.2 άρα $[MH]^+ = 689.2$. Το μοριακό βάρος των αλκαλοειδών που έχουν απομονωθεί από τους βολβούς του *Pancreatium Maritimum* κυμαίνεται μεταξύ 200-500. Συνεπώς, ένα ιόν με μοριακό βάρος 698 πιθανά να αντιστοιχεί σε κάποιο συμπλοκοποιημένο μόριο αλκαλοειδούς. Ωστόσο από το φάσμα MS παρατηρούμε ότι οι κύριες κορυφές του φάσματος 1337, 1175, 1013, 851, 689, 527, 365 διαφέρουν μεταξύ τους κατά 162 μονάδες. Το προϊόν θραυσματοποίησης με απώλεια 162 μονάδων είναι χαρακτηριστική των γλυκοζυλιωμένων ενώσεων, και συγκεκριμένα

δηλώνει την παρουσία στο άκρο του αρχικού ιόντος μίας εξόζης, όπου στα αλκαλοειδή συνήθως είναι μόριο γλυκόζης. Στο συγκεκριμένο μόριο παρατηρούμε διαδοχικές απώλειες από μόρια γλυκόζης, οπότε αποτελεί ένα πολύ-γλυκοζυλιωμένο παράγωγο του αλκαλοειδούς. Το μοριακό ιόν μάζας 332 στο φάσμα MS είναι χαρακτηριστικό του αλκαλοειδούς **Tazettine** για το μοριακό ιόν $[MH]^+$, επίσης οι κορυφές των ιόντων με μάζες 318, 288, 270, 266 και 226 συμπίπτουν επιβεβαιώνονται και από τις τιμές της βιβλιογραφίας [38-44]. Το αλκαλοειδές **Tazettine** έχει μοριακό τύπο $C_{18}H_{22}NO_5$ και μοριακό βάρος 331. Η κορυφή στα 365 πιθανόν να οφείλεται σε υποκατεστημένο μόριο Tazettine και επειδή η διαφορά από το μοριακό ιόν 332 είναι στις 33 μονάδες υποθέτουμε ότι είναι υποκατεστημένο με ένα υδροξύλιο και μια μεθυλομάδα. Άρα αντιστοιχεί στην ένωση hydroxyl-O-methylotazettine.



Εικόνα 42. Δομή αλκαλοειδούς Tazettine



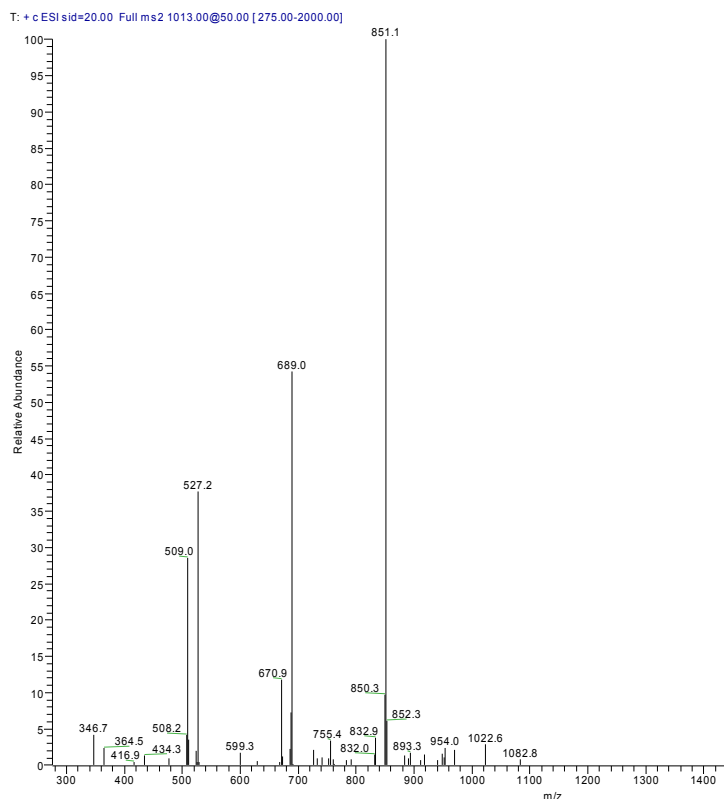
Εικόνα 43. Δομή αλκαλοειδούς hydroxyl-O-methylotazettine

Η κορυφή 318 συμπεραίνουμε ότι πρόκειται για το θραύσμα του ιόντος που προκύπτει από την απώλεια ενός μεθυλίου $[MH - CH_3]^+$, ενώ η κορυφή 288 συμπεραίνουμε ότι προκύπτει από την απώλεια μιας καρβοξυλομάδας $[MH - \text{COOH}]^+$. Η κορυφή 270 οφείλεται σε απομάκρυνση ενός μορίου νερού από το θραύσμα μάζας 288 $[MH - \text{COOH} - H_2O]^+$. Τέλος, η κορυφή στα 226

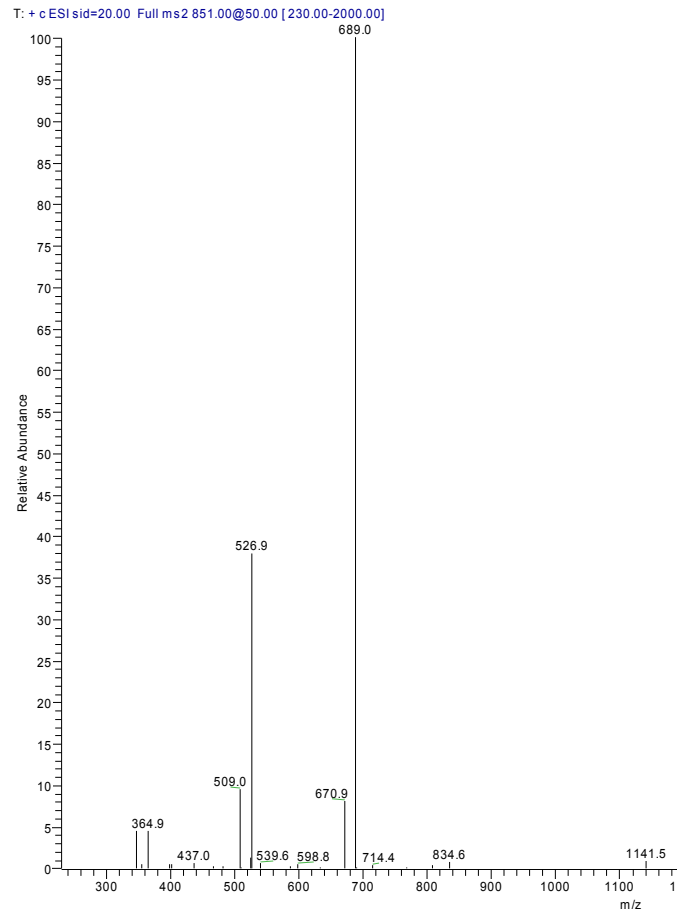
αντιστοιχεί στο ιόν του θραύσματος 270 με την περαιτέρω θραυσματοποίηση $[MH - \text{C}_6\text{H}_5 - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_2\text{-N-CH}_3]^+$

Το αλκαλοειδές Tazettine σε πολλές έρευνες αλκαλοειδών έχει απομονωθεί από τους βολβούς του φυτού *Pancreatum Maritimum* και σε σχετικά μεγάλη ποσότητα. Η ομοιότητα του φάσματος MS με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, το γεγονός ότι το ανιχνεύσαμε και με τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC (διαλύτης έκλουσης 10% MeOH σε CHCl₃) με παράγοντα επιβράδυνσης Rf=0.6 [36], καθώς και ότι το **Molisch's test** για τον έλεγχο παρουσίας σακχάρων στο δείγμα το οποίο βγήκε θετικό. Ο συνδυασμός όλων των παραπάνω αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι το απομονωμένο αλκαλοειδές από τους βολβούς του φυτού είναι γλυκοζυλιωμένο παράγωγο της Tazettine.

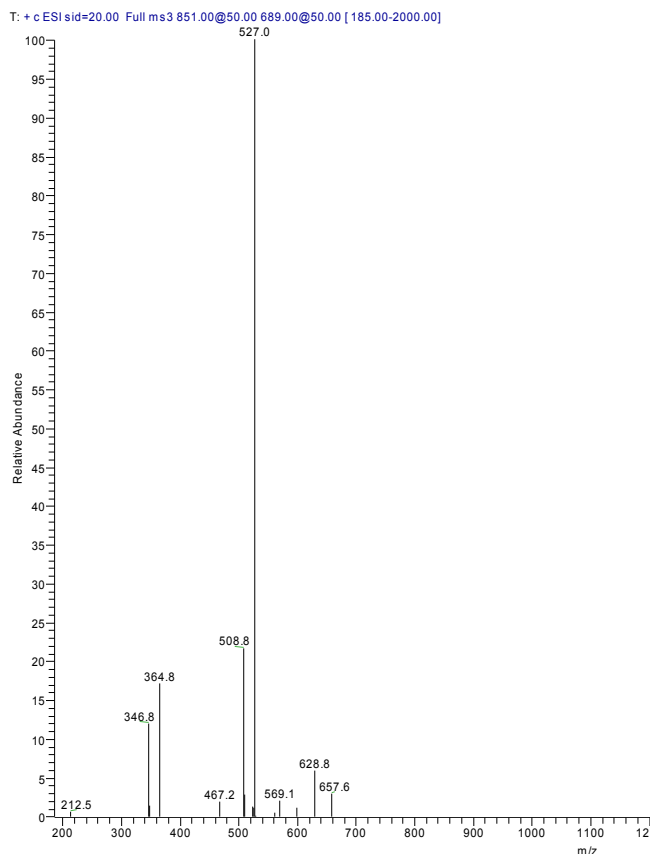
Παρακάτω παρουσιάζονται και τα φάσματα MS για της κύριες κορυφές στα 1013, 851 και 689:



Εικόνα 44. Φάσμα MS κορυφής 1013

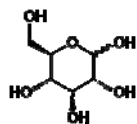


Εικόνα 45. Φάσμα MS κορυφής 851



Εικόνα 46. Φάσμα MS κορυφής 698

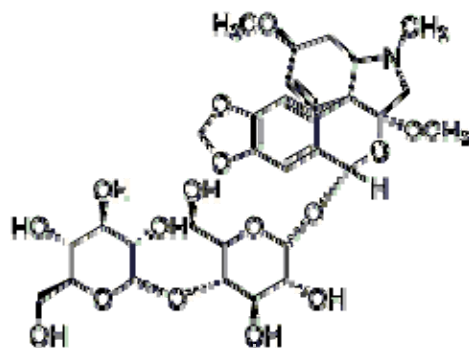
Από το φάσμα MS των κορυφών 1013, 851 και 689 εμφανίζεται πάλι η χαρακτηριστική απώλεια των 162 μονάδων ανάμεσα στις κύριες κορυφές, οπότε έχουμε την σταδιακή θραύση των μορίων γλυκόζης από το γλυκοζυλιωμένο παράγωγο του αλκαλοειδούς Tazettine. Η γλυκόζη ή δεξτρόζη έχει μοριακό τύπο $C_6H_{12}O_6$ και είναι ένα πολύ σημαντικό σάκχαρο, και το περισσότερο διαδεδομένο. Η γλυκόζη ανήκει στις εξόζες με δομή αλδόζης και η δομή της παρουσιάζεται



στην παρακάτω εικόνα.

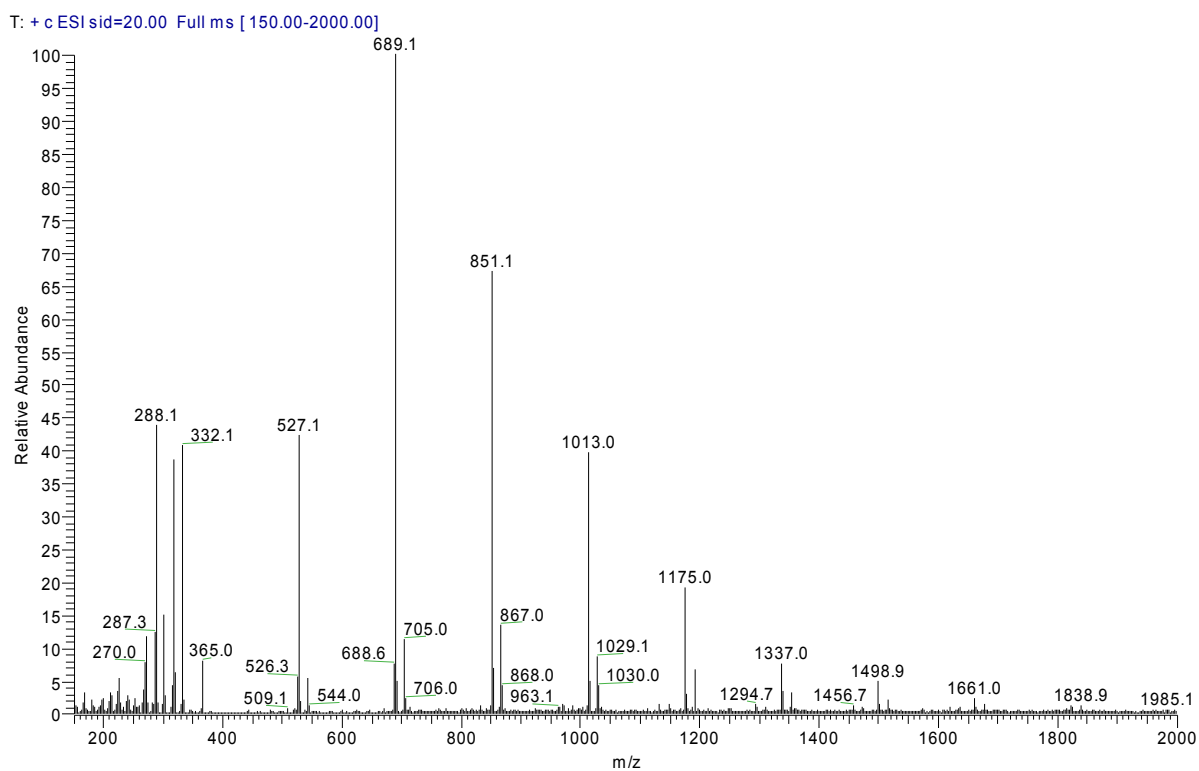
Επίσης από τα φάσματα MS των κύριων κορυφών χαρακτηριστική είναι και η απώλεια 18 μονάδων από τις κύριες κορυφές, που αντιστοιχεί σε απώλεια ενός μόριου νερού.

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω δεδομένα στην εικόνα 48 παρουσιάζεται το μοριακό ιόν που αντιστοιχεί στην κύρια κορυφή του φάσματος MS 689, που είναι ο διγλυκοζίτης του hydroxyl-O-methylotazettine:



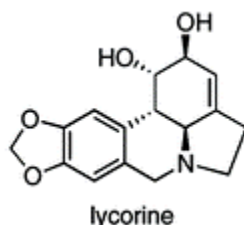
Εικόνα 47. Δομή του διγλυκοζίτη hydroxyl-O-methylotazettine

Ανάλυση 2^{ου} κλάσματος

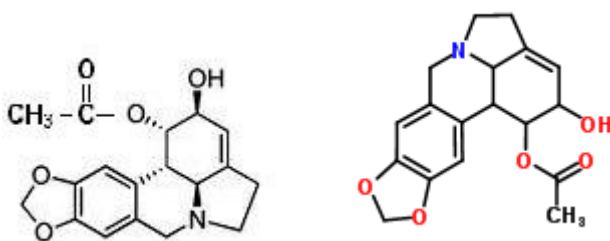


Εικόνα 48. Φάσμα MS 2^{ου} κλάσματος

Το φάσμα MS του δεύτερου κλάσματος της χρωματογραφίας RP-HPLC είναι πανομοιότυπο με το φάσμα του πρώτου κλάσματος (εικόνα 48). Το μοριακό ιόν με την υψηλότερη σχετική αφθονία είναι το ιόν με μάζα 689.1 άρα $[MH]^+ = 689.2$. Συνεπώς, ένα ιόν με μοριακό βάρος 698 πιθανά να αντιστοιχεί σε κάποιο συμλοκοποιημένο μόριο αλκαλοειδούς. Παρατηρείται και σε αυτή την περίπτωση ότι οι κύριες κορυφές του φάσματος 1175, 1013, 851, 689, 527, 365 διαφέρουν μεταξύ τους κατά 162 μονάδες. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η απώλεια 162 μονάδων οφείλεται στην απώλεια μιας εξόζης, και συγκεκριμένα της γλυκόζης. Οι διαδοχικές απώλειες γλυκόζης οφείλονται στο πολυγλυκοζυλιωμένο παράγωγο του αλκαλοειδούς. Το μοριακό ιόν στα 288 είναι χαρακτηριστικό για το αλκαλοειδές **Lycorine** για το μοριακό ιόν $[MH]^+$, επίσης οι κορυφές των ιόντων με μάζες 287, 270 συμπίπτουν με τις τιμές της βιβλιογραφίας [38, 40, 42, 43, 44]. Το αλκαλοειδές **Lycorine** έχει μοριακό τύπο $C_{16}H_{17}NO_4$ και μοριακό βάρος 287. Η κορυφή στα 332 πιθανόν να οφείλεται σε υποκατεστημένο μόριο Lycorine και επειδή η διαφορά από το μοριακό ιόν 288 είναι στις 44 μονάδες υποθέτουμε ότι είναι υποκατεστημένο με ακετυλομάδα. Άρα αντιστοιχεί στην ένωση 1-O-acetyllycorine.



Εικόνα 49. Δομή αλκαλοειδούς Lycorine

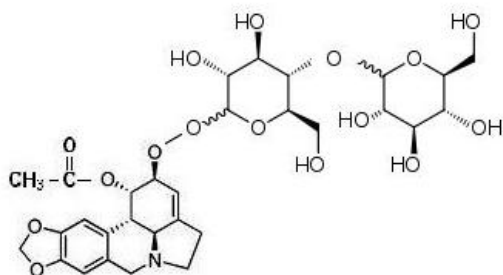


Εικόνα 50. Δομή αλκαλοειδούς 1-O-acetyllycorine

Από την κορυφή 170 συμπεραίνουμε ότι είναι το θραύσμα του ιόντος που προκύπτει από την απώλεια ενός μορίου νερού $[MH - H_2O]^+$,

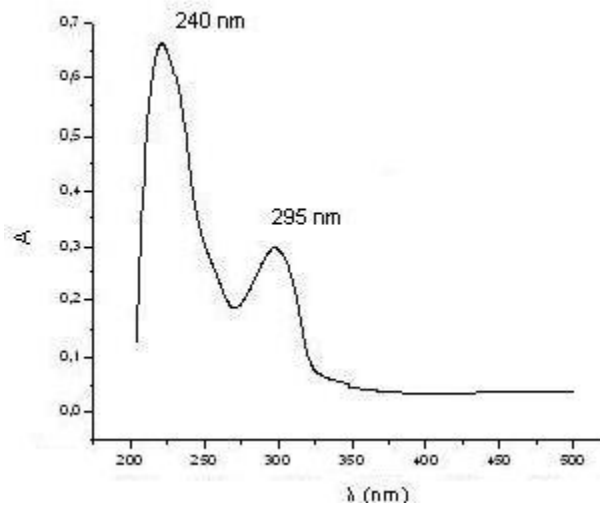
Το αλκαλοειδές Lycorine σε πολλές έρευνες αλκαλοειδών έχει απομονωθεί από τους βολβούς του φυτού *Pancreatium Maritimum* και σε σχετικά μεγάλη ποσότητα. Συγκεκριμένα στην Ισπανία διαπιστώθηκε ότι η Lycorine είναι το κύριο συστατικό του κλάσματος των αλκαλοειδών απομονωμένα από τους βολβούς [40]. Η ομοιότητα του φάσματος MS με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, το γεγονός ότι το ανιχνεύσαμε και με τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC (διαλύτης έκλουσης 10% MeOH σε CHCl₃) με παράγοντα επιβράδυνσης Rf=0.5 [36], καθώς και ότι το **Molisch's test** για τον έλεγχο παρουσίας σακχάρων στο δείγμα το οποίο βγήκε θετικό. Ο συνδυασμός όλων των παραπάνω αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι το απομονωμένο αλκαλοειδές από τους βολβούς του φυτού είναι γλυκοζυλιωμένο παράγωγο της Lycorine.

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω δεδομένα στην εικόνα 48 παρουσιάζεται το μοριακό ιόν που αντιστοιχεί στην κύρια κορυφή του φάσματος MS 689, που είναι ο διγλυκοζίτης του 1-O-acetyllycorine:

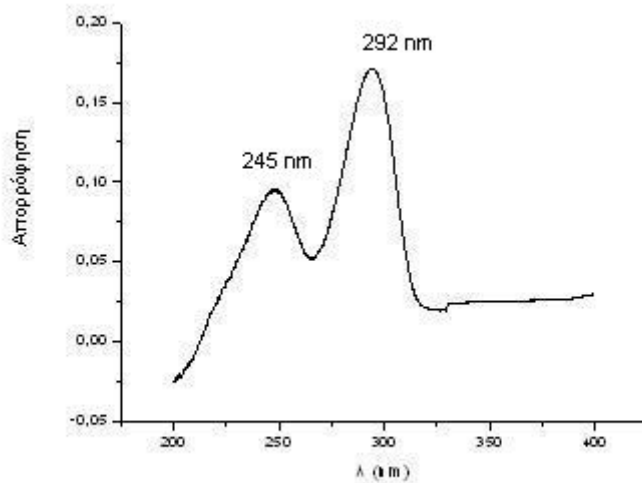


Εικόνα 51. Δομή του διγλυκοζίτη 1-O-acetyllycorine

Φασματοσκοπία UV για κλάσματα από χρωματογραφία RP-HPLC



Εικόνα 52. Φάσμα UV 1^{ου} κλάσματος (Tazettine)



Εικόνα 53. Φάσμα UV 2^{ου} κλάσματος Φάσμα UV (Lycorine)

Από τα παραπάνω φάσματα UV, παρατηρούμε ότι και τα δυο κλάσματα που λάβαμε από την υγρή χρωματογραφία RP-HPLC παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης σε μήκη κύματος στα 240 nm και 290 nm. Συγκεκριμένα στο πρώτο κλάσμα που όπως θα δούμε και παρακάτω περιέχει το

αλκαλοειδές Tazettine τα μέγιστα της απορρόφησης είναι σε μήκη κύματος 240 και 295 nm, και για το δεύτερο κλάσμα που περιέχει το αλκαλοειδές Lycorine στα 245 και 292 nm. Τα στοιχεία αυτά που λάβαμε από τη φασματοσκοπία υπεριώδους συμπίπτουν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου για τα αλκαλοειδή τύπου Lycorine καθώς και για τα αλκαλοειδή τύπου Crinine, στα οποία ανήκει και η Tazettine, εμφανίζουν απορροφήσεις στα μήκη κύματος 240 και 280-290 nm. Η απορρόφηση στα 240 nm οφείλεται στην μεθειλενοδιοξυ αρυλομάδα που περιέχεται στις ενώσεις, και η απορρόφηση στα 290 nm οφείλεται σε αρωματικούς δακτυλίους που περιέχονται στις ενώσεις των αλκαλοειδών και δημιουργούν συζυγιακό σύστημα (χρωμοφόρες ομάδες) [43].

Έλεγχος κυτταροτοξικότητας του μεθανολικού διαλύματος αλκαλοειδών από το φυτό *Pancreatium Maritimum*

Γενικά όπως αναφέρθηκε και στην θεωρία οι ενώσεις αλκαλοειδών παρουσιάζουν ενδιαφέρον κυρίως λόγω της φυσιολογικής βιολογικής τους δράσης και των φαρμακευτικών ιδιοτήτων τους και έτσι χρησιμοποιούνται στη φαρμακοβιομηχανία επί σειρά ετών. Κάποιες από τις βιολογικές ιδιότητες των αλκαλοειδών που έχουν μελετηθεί είναι φυτορμονικές (ρυθμιστές ανάπτυξης φυτού), αντικές, αντιβιοτικές, αναλγητικές και αντικαρκινικές. Η κυτταροτοξική δράση των αλκαλοειδών είναι ευρέως γνωστή και έχει αποδειχθεί από αρκετές μελέτες. Στόχος μας είναι να ελέγξουμε την κυτταροτοξική και κατ' επέκταση αντικαρκινική δράση του μεθανολικού διαλύματος που περιέχει μίγμα αλκαλοειδών, από τους βολβούς του φυτού *Pancreatium Maritimum*, καθώς και των απομονωμένων γλυκοζιτικών παραγώγων αλκαλοειδών που απομονώθηκαν από το μίγμα με τη βοήθεια της RP-HPLC. Για το σκοπό αυτό εφαρμόσαμε διάφορες συγκεντρώσεις από το μεθανολικό εκχύλισμα και τα απομονωμένα κλάσματα, σε καλλιέργεια καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων (αδενοκαρκίνωμα τραχήλου μήτρας ανθρώπου) σειράς **HeLa**. Τα κύτταρα HeLa ή HDC, που είναι η συντομογραφία του όρου “ανθρώπινα διπλοειδή κύτταρα” – Human Diploid Cells. Η ονομασία HeLa προέρχεται απ' τα αρχικά του ονόματος Henrietta Lacks μιας Αμερικανίδας, απ' την οποία προέρχονται αυτά τα καρκινικά κύτταρα.

Για την καλλιέργεια των κυττάρων HeLa, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium), που περιείχε 2mM L-γλουταμίνη, 10% v/v FBS (Fetal bovine

serum- ορός αίματος βόειου εμβρύου), 0.1M Sodium Pyruvate, 0.15 % w/v NaHCO₃ και 0.1mM non-essential amino-acids (μη απαραίτητα αμινοξέα). Για την προστασία των καλλιιεργειών από μικροβιακούς παράγοντες, χρησιμοποιήθηκαν αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη σε σευγκεντρώσεις των 100 U/mL και 100 μg/mL αντίστοιχα.

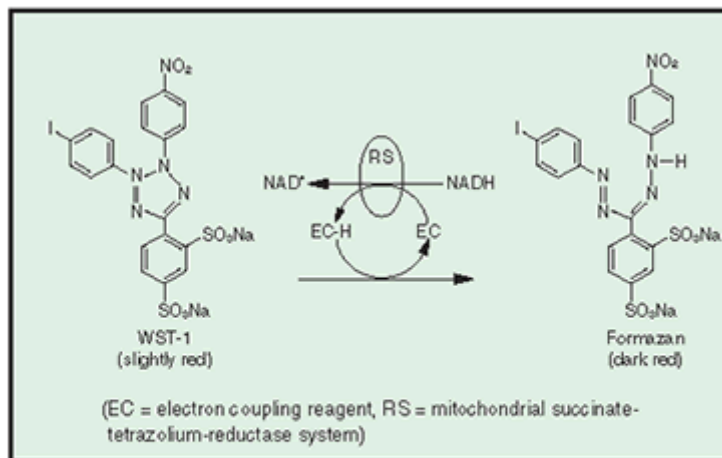
Για την ανάπτυξη των κυττάρων απαιτείται η επώαση τους γίνεται σε ειδικό θάλαμο κυτταρικών καλλιιεργειών ελεγχόμενης ροής αερίων (incubator), σε σταθερή θερμοκρασία 37°C και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂. Η αλλαγή του θρεπτικού υλικού είναι απαραίτητη για κάθε 24-48 ώρες. Οι πλήρεις καλλιιεργειες (~80%) εκπλύθηκαν με HBSS και τα κύτταρα συλλέχθησαν μετά από ενζυμική κατεργασία με διάλυμα θρυψίνης διαλυμένο σε HBSS. Η συλλογή των κυττάρων έγινε με φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές για 3 λεπτά. Όταν τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη νέας καλλιιεργειας, επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό και τοποθετήθηκαν σε νέες φιάλες κυτταρικών καλλιιεργειών. Όταν χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή πειραμάτων κυτταρικού πολλαπλασιασμού μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων σε πλάκα Neubauer και συγκεκριμένοι αριθμοί κυττάρων τοποθετήθηκαν σε μικροπλάκες καλλιιεργειας. Η πυκνότητα των επιθηλιακών κυττάρων HeLa σε κάθε πηγαδάκι είναι περίπου $3 \cdot 10^4$.

Τα καρκινικά κύτταρα τοποθετούνται σε μια μικροπλάκα καλλιιεργειας κυττάρων που περιέχει 24 πηγαδάκια (24-well micro titer plate) και αφήνονται να αναπτυχθούν για 24 ώρες μαζί με θρεπτικό υλικό, μέχρι να δημιουργηθεί ένας ευκρινώς σχηματιζόμενος κυτταρικός τάπητας σε κάθε πηγαδάκι της μικροπλάκας καλλιιεργειας.

Στη συνέχεια, εφαρμόζουμε σε κάθε οριζόντια σειρά διαφορετικές συγκεντρώσεις του μεθανολικού μίγματος αλκαλοειδών, ενώ η κάθε συγκέντρωση εφαρμόζεται συνολικά τρεις φορές (κάθετη σειρά) σε κάθε πιάτο καλλιιεργειας, ώστε να χρησιμοποιήσουμε το μέσο όρο των αποτελεσμάτων για κάθε συγκέντρωση. Επίσης σε μια τριάδα πηγαδάκια εφαρμόζουμε και το διαλύτη μεθανόλη που είναι διαλυμένο το μίγμα των αλκαλοειδών, για να διαπιστώσουμε την κυτταροτοξικότητα του. Αφήνουμε τα κύτταρα για επώαση στο incubator για 24 ώρες για να δράσει η ουσία μας, ακριβώς στις ίδιες συνθήκες που έγινε και η ανάπτυξη τους. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για 48 ώρες δράσης της ουσίας.

Μέτρηση κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Ο ρυθμός επιβίωσης των κυττάρων υπολογίζεται με τη χρωματογραφική μέθοδο MTT. Η μέθοδος MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] βασίζεται στην ενζυμική διάσπαση του κίτρινου άλατος του τετραζολίου και στον επαγόμενο σχηματισμό αδιάλυτων στο νερό κρυστάλλων φορμαζανίου χρώματος κυανού [45]. Αυτή η διάσπαση λαμβάνει χώρα μόνο σε ζωντανά κύτταρα, καθώς υποκινείται από το μιτοχονδριακό ένζυμο αφυδρογονάση του σουκινικού οξέος. Οι υδατικά αδιάλυτοι κρύσταλλοι του φορμαζανίου διαλυτοποιούνται σε κατάλληλο οργανικό διαλύτη (DMSO). Η οπτική πυκνότητα του διαλυόμενου υλικού μετράται φασματοφωτομετρικά λόγω απορρόφησης της χρώσης του διαλυμένων κρυστάλλων (μωβ) σε μήκος κύματος 556 nm. Η απορρόφηση μπορεί να συσχετιστεί άμεσα με τον αριθμό των μεταβολικά ενεργών κυττάρων (ζωντανών) της καλλιέργειας.



Cleavage of the tetrazolium salt (WST-1) to formazan

EC = electron coupling reagent

RS= mitochondrial succinate-tetrazolium-reductase system

Εικόνα 54. Ενζυμική διάσπαση του κίτρινου άλατος του τετραζολίου και στον επαγόμενο σχηματισμό αδιάλυτων στο νερό κρυστάλλων φορμαζανίου χρώματος κυανού

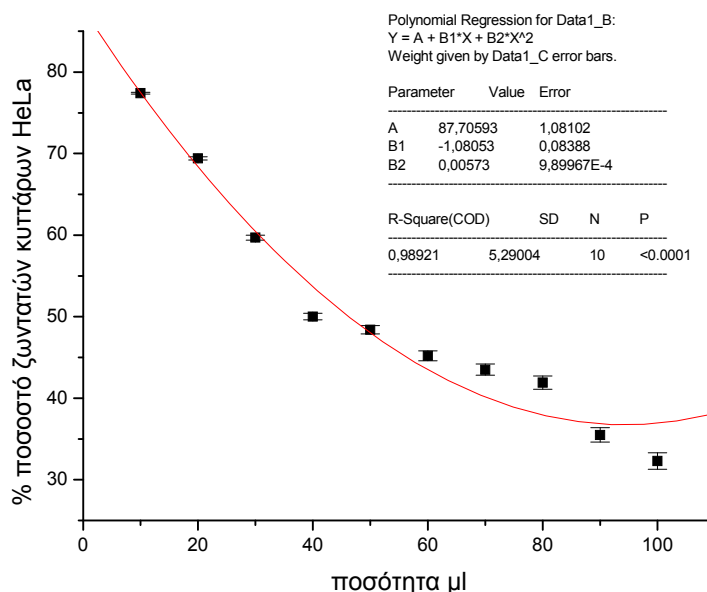
Μετά από 24 ώρες ή 48 ώρες που θα έχει εφαρμοστεί το μεθανολικό εκχύλισμα στα πηγαδάκια των κυττάρων, αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό προσεκτικά και προστίθεται το διάλυμα του αντιδραστήριου MTT. Η παρασκευή του αντιδραστήριου MTT (5 mg MTT/mL PBS) πριν την προσθήκη του στα πηγαδάκια γίνεται με αραιώση στο θρεπτικό μέσο ώστε η τελική

συγκέντρωση να είναι 0.5 mg/mL. Μετά την επώαση και έλεγχο με το μικροσκόπιο, απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο με το MTT, τα κύτταρα εκπλένονται με PBS και διαλυτοποιούνται στον οργανικό διαλύτη DMSO. Έτσι κατασκευάζουμε μια πρότυπη καμπύλη, με τη βοήθεια της οποίας θα υπολογίσουμε τον αριθμό των κυττάρων που επιζούν μετά την εφαρμογή, στις καλλιέργειες των καρκινικών κυττάρων, των ουσιών του μεθανολικού εκχυλίσματος.

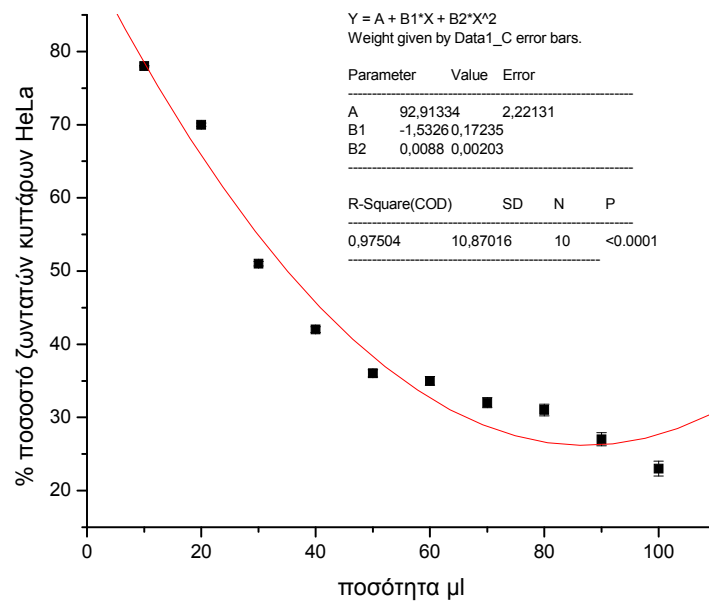


Εικόνα 55. κύτταρο- καλλιέργεια μετά την προσθήκη ουσίας, με διαλύτη DMSO

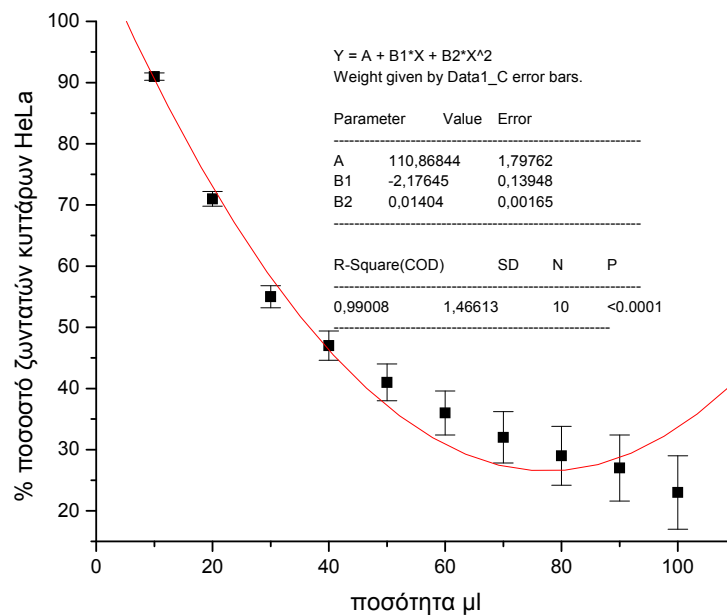
Παρακάτω αναπαριστούνται διαγραμματικά οι ποσότητες των ουσιών και το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων HeLa, μετά την επίδραση των ουσιών κατά 24 και 48 ώρες. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι το μίγμα αλκαλοειδών μετά την απομόνωση τους από τους βολβούς του φυτού, καθώς και τα δυο κλάσματα που λάβαμε μετά την απομόνωση των αλκαλοειδών με χρωματογραφία HPLC.



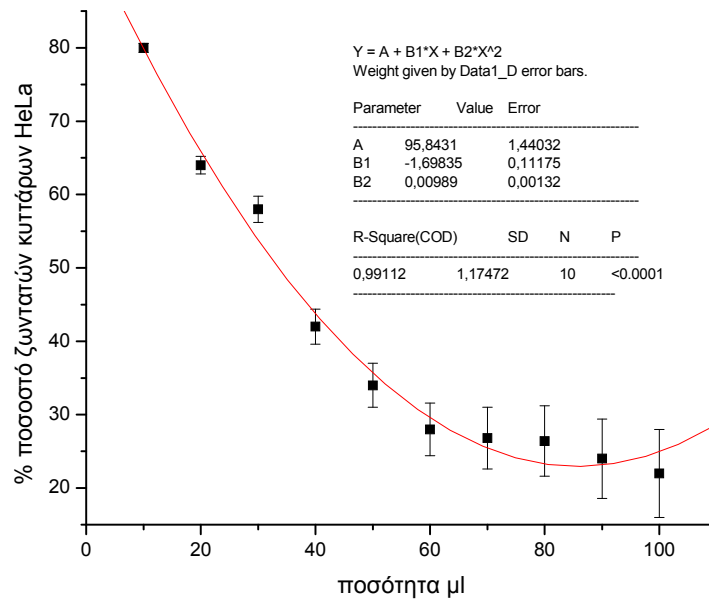
Εικόνα 56. Διάγραμμα για επίδραση μίγματος αλκαλοειδών για 24 ώρες



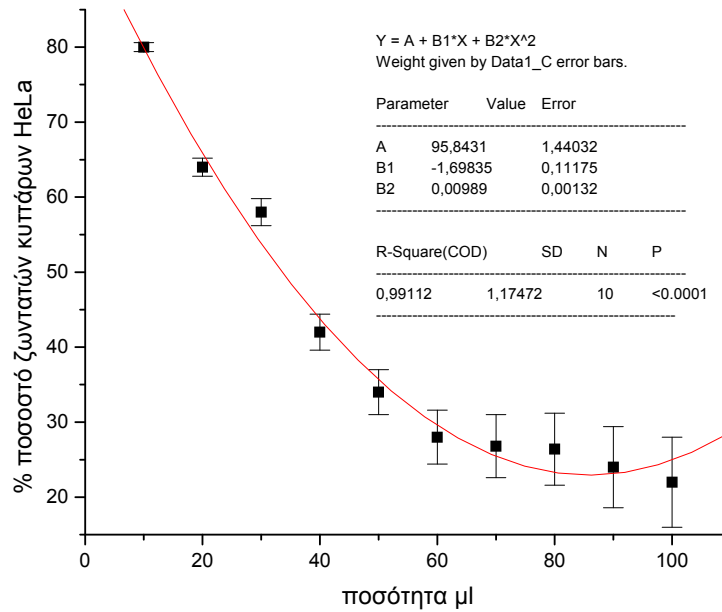
Εικόνα 57. Διάγραμμα για επίδραση μίγματος αλκαλοειδών για 48 ώρες



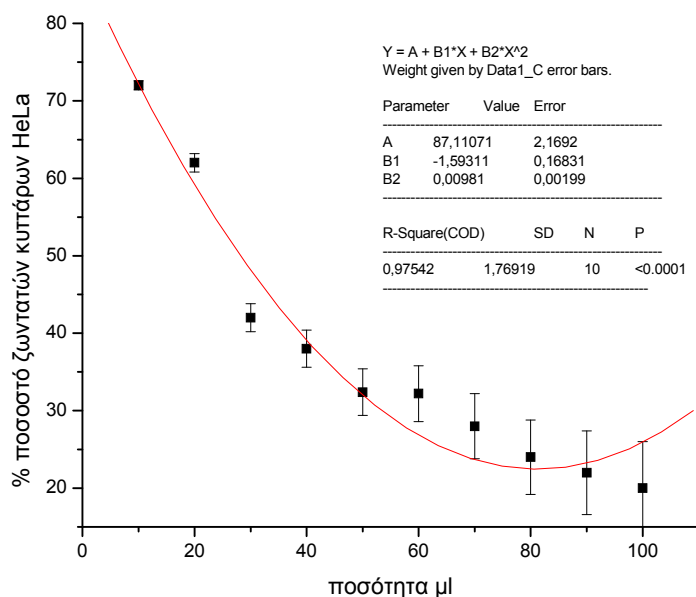
Εικόνα 58. Διάγραμμα για επίδραση απομονωμένου αλκαλοειδούς Tazettine για 24 ώρες



Εικόνα 60. Διάγραμμα για επίδραση απομονωμένου αλκαλοειδούς Tazettine για 48 ώρες



Εικόνα 61. Διάγραμμα για επίδραση απομονωμένου αλκαλοειδούς Lycotrine για 24 ώρες



Εικόνα 62. Διάγραμμα για επίδραση απομονωμένου αλκαλοειδούς Lycorine για 48 ώρες

Ο έλεγχος κυτταροτοξικότητας του μεθανολικού εκχυλίσματος από τους βολβούς του φυτού *Pancreaticum Maritimum*, αποκάλυψε πως το μίγμα των γλυκοζιτών των αλκαλοειδών είναι ιδιαίτερα δραστικό, όσο αφορά τις αντικαρκινικές του ιδιότητες. Το ίδιο συμπεράναμε και για τα απομονωμένα αλκαλοειδή Tazettine και Lycorine. Συγκεκριμένα, διαδοχικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων εφαρμόστηκαν σε καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων HeLa και υπολογίστηκε σε κάθε περίπτωση ο συντελεστής αναστολής κυτταρικής ανάπτυξης IC_{50} . Ο συντελεστής IC_{50} αποτελεί μέτρο της αποτελεσματικότητας της αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης, και είναι η συγκέντρωση του προς εξέταση δείγματος που αντιστοιχεί στο 50% της αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης (100% είναι τα κύτταρα στα οποία δεν εφαρμόστηκε καμία ουσία απλά αναπτύχθηκαν στις ίδιες συνθήκες).

Για το μίγμα των αλκαλοειδών στις 24 ώρες η τιμή του συντελεστή αναστολής είναι $IC_{50} = 5.57$ $\mu\text{g/ml}$ και στις 48 ώρες $IC_{50} = 4.46$ $\mu\text{g/ml}$. Για το αλκαλοειδές Tazettine στις 24 ώρες έχουμε $IC_{50} = 4.87$ $\mu\text{g/ml}$ και στις 48 ώρες $IC_{50} = 4.62$ $\mu\text{g/ml}$. Για το αλκαλοειδές Lycorine στις 24 ώρες έχουμε $IC_{50} = 4.12$ $\mu\text{g/ml}$ και στις 48 ώρες $IC_{50} = 3.5$ $\mu\text{g/ml}$.

Συγκρίνοντας με τα βιβλιογραφικά δεδομένα το αλκαλοειδές Tazettine έχει συντελεστή αναστολής $IC_{50} = 4.5-5.4 \mu\text{g/ml}$, ενώ για το αλκαλοειδές Lycorine $IC_{50} = 0.6-1.2 \mu\text{g/ml}$ [46-50]. Οι διαφορές στις τιμές του συντελεστή IC_{50} είναι πολύ πιθανό να οφείλονται στο γεγονός ότι τα αλκαλοειδή είναι σε μορφή γλυκοζιτών, παρόλο τις διαφορές είναι εμφανές ότι το αλκαλοειδές Lycorine εμφανίζει πιο έντονη αντικαρκινική δράση από το αλκαλοειδές Tazettine. Επίσης στο μεθανολικό εκχύλισμα είναι πολύ πιθανό να περιέχονται και άλλες δραστικές ουσίες που απομονώθηκαν μαζί με τα αλκαλοειδή, όπως φλαβονοειδή καθώς και ένα σύνολο συμλοκοποιημένων μορίων και τροποποιημένων καταλοίπων, των οποίων η συνεπικουρική ή ανασταλτική αντικαρκινική δράση αγνοείται. Ακόμα πρέπει να αναφερθεί ότι ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δραστικών ουσιών του μίγματος καθώς και των κλασμάτων από την χρωματογραφία, έγινε με βάση την απορρόφηση στα 290 nm. Έτσι οι τιμές του συντελεστή IC_{50} που υπολογίσαμε μπορεί να ληφθεί υπ' όψιν μόνο ως ένδειξη για τη δυνητική αντικαρκινική δράση των δειγμάτων. Η πλήρης απομόνωση και ο καθαρισμός των αλκαλοειδών που περιέχονται σε αυτά είναι αναγκαίος για την τεκμηρίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων.

ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Απομόνωση και χαρακτηρισμός πρωτεϊνών από βολβό φυτικού οργανισμού *Panocratium Maritimum*

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό των δυο πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν από το βολβό του φυτού *Panocratium Maritimum*, οι πρωτεΐνες αυτές Α και Β, έχουν μοριακό βάρος 12.4 και 12 kDa αντίστοιχα. Η απομόνωση των πρωτεϊνών έγινε με υδροχρωματογραφία κατιονανταλλαγής. Η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών αυτών επιτεύχθηκε με τη χρήση οργανικού διαλύτη ακετόνη και του τριγλωροξικού οξέος (TCA).

Από την ανάλυση των πρωτεϊνών με φασματοσκοπία μάζας, έγινε περαιτέρω θραυσματοποίηση με MS/MS των πεπτιδίων που ανήκουν στις κύριες κορυφές των φασμάτων MS. Από την αναζήτηση στη βάση δεδομένων έγινε αντιστοίχιση των πεπτιδίων των πρωτεϊνών Α και Β με πεπτίδια πρωτεϊνών ομόλογων φυτικών οργανισμών. Οι βάσεις δεδομένων περιέχουν τις αλληλουχίες γονιδίων των φυτών και με μετάφραση *in silico*, περιέχουν και τις ακολουθίες πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται. Επειδή όμως το γονιδίωμα του συγκεκριμένου οργανισμού ή κάποιου πολύ συγγενικού, δεν έχει δημοσιευθεί, δεν μπορούμε να κάνουμε ταυτοποίηση ακόμα, προς το παρόν η αναζήτηση έγινε για να βρούμε ομόλογες πρωτεΐνες.

Για τις πρωτεΐνες Α και Β, η ανάλυση MS/MS οδήγησε στην αντιστοίχιση της κορυφής 935 με το πεπτίδιο **R.VKELSFGR.N**, μιας πρωτεΐνης του οργανισμού *Vitis vinifera*, της οποίας η λειτουργία είναι να δρα ως πρωτεΐνη δέσμευσης και να δεσμεύει ιόντα ψευδαργύρου Zn. Από την ανάλυση της κορυφής 1467 προέκυψε το πεπτίδιο **K.SPVIDTRALQIR.I**, πρωτεΐνης του ίδιου οργανισμού. Η ανάλυση της κορυφής 1576 οδήγησε στο πεπτίδιο **R.RDVPGGDTALHLAVR.L**, που ανήκει σε πρωτεΐνες διαφόρων φυτικών οργανισμών. Η ομόλογη πρωτεΐνη του οργανισμού *Zea mays* έχει λειτουργία την πρωτεϊνική δέσμευση. Επίσης βρέθηκαν ομόλογες πρωτεΐνες με χαμηλότερο score στην αναζήτηση, των οποίων οι βιολογικές τους λειτουργίες στο κύτταρο είναι συμμετοχή σε μεταβολικές διεργασίες (όπως δέσμευση ATP), πρωτεόλυση, φωσφορυλίωση, ριβοσωμικές πρωτεΐνες, RNA και DNA πολυμεράσες, συμμετοχή στο μάτισμα του RNA, απόπτωση και μεταγωγή σημάτων.

Απομόνωση και χαρακτηρισμός αλκαλοειδών από τους βολβούς του φυτού *Pancreatium Maritimum*

Όπως διαπιστώσαμε από τα αποτελέσματα, το μεθανολικό εκχύλισμα που λάβαμε από τους βολβούς του φυτού *Pancreatium Maritimum* περιλαμβάνει κυρίως τα αλκαλοειδή Tazettine και Lycorine και συγκεκριμένα γλυκοζίτες των υποκατεστημένων μορίων hydroxyl-O-methylotazettine και O-acetyllycorine. Τα αλκαλοειδή απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα με τη βοήθεια της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης. Το Molisch test που πραγματοποιήθηκε, μας έδωσε θετικό αποτέλεσμα, γεγονός που μαρτυρά την παρουσία γλυκοζιτών ή ελεύθερων σακχάρων στο μεθανολικό διάλυμα των αλκαλοειδών, καθώς και στα κλάσματα της χρωματογραφίας. Είναι πιθανό, το μεθανολικό μίγμα των ουσιών να περιέχει κι άλλα αλκαλοειδή, που όμως η χαμηλή τους συγκέντρωση στο μίγμα να έκανε δυσχερή τον διαχωρισμό τους, ή η ικανότητα τους να ιοντίζονται να είναι αισθητά χαμηλότερη από τα κυρίαρχα ιόντα που παράγονται κατά την τεχνική της ESI-MS. Επίσης, από την εξέταση του μίγματος των αλκαλοειδών και των απομονωμένων δειγμάτων σε καρκινικά κύτταρα σειράς HeLa, διαπιστώθηκε η κυτταροτοξικότητα των ενώσεων αυτών. Ο δείκτης αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης IC_{50} είναι αντίστοιχος με εκείνο των κυτταροτοξικών αλκαλοειδών.

ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Όσο αφορά το κομμάτι της εργασίας για την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό των απομονωμένων πρωτεϊνών από το βολβό του φυτού *Pancratium Maritimum*, από τα αποτελέσματα της ανάλυσης το score ήταν χαμηλό, το οποίο οφείλεται στο γεγονός ότι στη βάση δεδομένων που γίνεται η αναζήτηση, δεν υπάρχει το γονιδίωμα του οργανισμού. Προς το παρόν η αναζήτηση έγινε για να βρούμε τις ομόλογες πρωτεΐνες από φυτικούς οργανισμούς. Μελλοντικά με αυτά τα φάσματα MS και MS/MS των απομονωμένων πρωτεϊνών, μπορεί να γίνει πλήρης ταυτοποίηση των πρωτεϊνών μόλις βγει το γονιδίωμα του *Pancratium Maritimum* ή κάποιου πολύ συγγενικού είδους.

Το δεύτερο μέρος της εργασίας αφορά την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό των αλκαλοειδών ενώσεων από τους βολβούς του φυτού. Ο περαιτέρω καθαρισμός, η πλήρης απομόνωση των συστατικών του μίγματος των αλκαλοειδών και ο χαρακτηρισμός τους με τεχνικές πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), είναι οι μελλοντικοί στόχοι του ερευνητικού εγχειρήματος. Τέλος η παρασκευή σκευασμάτων με βάση το μίγμα των γλυκοζιτών που περιέχεται στο μεθανολικό εκχύλισμα, αποτελούν μια ερευνητική προοπτική με στόχο το σχεδιασμό και τη σύνθεση νέων αντικαρκινικών φαρμάκων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mann J. D., Fales H.M., and S. Mudd S.H (1963) Laboratory of Cellular Pharmacology, National Institute of Mental Health and Laboratory of Metabolism. National Heart Institute, United States Public Health Service, Maryland
2. Treu M., Fröhlich J. and Jordis U. (2002) Institute of Applied Synthetic Chemistry, Vienna University of Technology, A-1060 Vienna, Austria
3. Natural products, a biosynthetic approach, second edition, Paul M Dewick (2004)
4. Ahmed Z, Rizk A and Hamouda F (1964) Lloydia 27,115
5. El Tohamy D. (1988) Master Degree Thesis. Faculty of Pharmacy, University of Assiut, Egypt
6. Ali A.A, Mesbah M.K and Mohamed M.H (1984) Bull. Pharm. Sci. Assiut University 7, Egypt
7. Gaber M, (1990) Master Degree Thesis. Faculty of Pharmacy, University of Alexandria, Egypt
8. Amina H, Abdel- Azim A, Ahmed S, Antonio E, Mohsen G and Antonio S (1991) Faculty of Pharmacy, University of Alexandria, Egypt
9. Amina H, Alfonso D, Antonio E, Mohsen G, Abdel- Azim H, Rosa L and Ahmed A (1991) University of Alexandria, Egypt
10. Strahil B, Luba E, Simeon P (2003) Institute of Botany, Bulgarian Academy of Science and Institute of Organic Chemistry with Centre of Photochemistry, Bulgarian Academy of Science, Sofia, Bulgaria
11. Orhan and B. Sener (2003) Department of Pharmacognocny, Faculty of Pharmacy, Gazi University, Ankara, Turkey
12. Juan C.C, Juan C.O, Ana E.B, Angel G.R, Marcelino D.A and Matias L (2008) Instituto Universitario de Bio- Organica, Tenerife, Spain

13. Ivanov I., Berkov S. and Pavlov A., Department of Microbial Biosynthesis and Biotechnologies, Bulgarian Academy of Sciences, Plovdiv, Bulgaria, Departament de Productes Naturals, Biologia Vegetal i Edafologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain
14. Khalid A., Zaheer H., Nabeel M.G., Feroz F., Rahman A., Gilani A.H., Iqbal M. C., Dr. Panjwani Center for Molecular Medicine and Drug Research, International Center for Chemical Sciences, University of Karachi, Karachi, Pakistan and Department of Biological & Biomedical Sciences, The Aga Khan University, Pakistan
15. M.M Bradford, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248
16. Mann, M., R.C. Hendrickson, and A. Pandey, *Annual Rev Biochemistry*, 2001. 70: p.437 -73
17. Fenn, J., et al., *Science*, 1989. 246: p. 64-71.
18. Karas, M. and F. Hillenkamp, *Analytical chemistry*, 1988. 60: p. 299-301
19. Bendtsen, J.D., et al., Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, 2004. 340(4): p. 783-95.
20. Mroczek T. and Mazurek J. (2008) Department of Pharmacognosy with Medicinal Plant Laboratory Unit, Medical University, Lublin, Poland
21. Diop M. F. , Hehn A., Ptak A., Chrétien F., Doerper S., Gontier E., Bourgaud F., Henry M., Chapleur Y. and Laurain-Mattar D. (2007) Groupe S.U.C.R.E.S., Université Henri, Poincaré-Nancy, Nancy-Vandoeuvre, France, Laboratoire Agronomie et Environnement, France, and Laboratoire de Botanique, Faculté de Pharmacie, France, and Department of Plant Breeding and Seed Science, Agricultural University, Krakow, Poland
22. Gotti R., Fiori J., Bartolini M. and Cavrini V. (2006) Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Via Belmeloro 6, 40126 Bologna, Italy
23. Luis Sanchez (2001) TCA protein precipitation protocol
24. Wessel, D. and Flugge, U. I. *Anal. Biochem.* (1984) 138, 141-143
25. Gazanchian A., Hajheidari M., Khoshkholgh N.S. and Salekdeh G.H., (2006_ Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), PO Box 31535-1897, Karaj, Iran

26. Zahreddine H., Clubbe C., Baalbaki R., Ghalayini A., Talhouk S.N. (2004) Faculty of Agricultural and Food Sciences, The American University of Beirut, Beirut, Lebanon, Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, UK

27. Foulger J.H, (1931) Department of Pharmacology, University of Cincinnati, College of Medicine, Cincinnati

28. Shibnath G., Kulwant S. S and Sushma R (1984) Maceutical Chemistry Research Laboratory, Department of Pharmaceutics, Banaras Hindu University, India

29. Voloshchuk T.P., Patskovsky Yu.V. and Zayika L.A. (2006) Institute of Molecular Biology and Genetics, Ukraine

30. Farmana Noor-E-Ain, (1996) H.E.J. Research institute of chemistry university of Karachi, Karachi

31. Amina H. Abqu-Donia, De Giulio A., Evidente A., Gaber M., Abdel-Azim Habib, Lanzetta R. and Ahmed A. Seif El Din (1991) Department of Pharmacolognocy, University of Alexandria, Alexandria, Egypt, Istituto per la Chimica di Molecole di Interesse Biologico, Italy, Dipartimento di Scienze Chomico- Agrarie, Universita di Naroli, Italy

32. Plozzi F, Marino M.L., Fuganti C, Martino A, (1969) Istituto di Chimica, Palermo, Italy, Istituto di Chimica, Milano, Italy, Istituto di Botanica, Palermo, Italy

33. Barry M.T, and Weiping T, Supporting Information for *Angew. Chem. Int. Ed.* Z19040 (2002), Weinheim, Germany

34. Sherwood B.I, Bruse A.K, George R.P, Lynnette C.G, George R.P and Ralph A.B, (2000) U.S. Water Conservation Laboratory, Phoenix, Arizona USA and Cancer Research Institute, Arizona State University, Tempe, Arizona USA

35. Xinrong T., Tomas H. and Kurt K., (1994) Department of Chemistry, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia
36. Fu-Min Zhang, Yong-Qiang Tu, Jian-Dong Liu, Xiao-Hui Fan, Lei Shi, Xiang-Dong Hu, Shao-Hua Wang and Yong-Qiang Zhang (2006) State Key Laboratory of Applied Organic Chemistry and Department of Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou, PR China
37. I. Ivanov, S. Berkov and A. Pavlov (2009) Department of Microbial Biosynthesis and Biotechnologies – Laboratory in Plovdiv, The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Plovdiv, Bulgaria, Departament de Productes Naturals, Biologia Vegetal i Edafologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain
38. Strahil B., Borjana S., Luba E. and Simeon P. (2003) Institute of botany, Bulgarian Academy of Science, Sofia, Bulgaria and Institute of Organic Chemistry of phytochemistry, Bulgarian Academy of Science, Sofia, Bulgaria
39. Gotti R., Fiori J., Bartolini M. and Cavrini V. (2006) Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Via Belmeloro 6, 40126 Bologna, Italy
40. Strahil B., Luba E., and Simeon P. (2003) Institute of Botany, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria and Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria
41. Fu-Min Zhang, Yong-Qiang Tu, Jian-Dong Liu, Xiao-Hui Fan, Lei Shi, Xiang-Dong Hu, Shao-Hua Wang and Yong-Qiang Zhang (2006) State Key Laboratory of Applied Organic Chemistry and Department of Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou, PR China
42. Zhong Jin (2003) Institute and State Key Laboratory of Elemento-organic Chemistry, Nankai University, China

43. Shibnath G., Kulwant S. and Sushma R. (1984) Maceutical Chemistry Research Laboratory, Department of Pharmaceutics, Banaras Hindu University, India
44. Shibnath G., Yatendra K. and Shripati S. (1983) Pharmaceutical Chemistry Research Laboratory, Department of Pharmaceutics, Ranaras Hindu University, Varanasi, India
45. Premixed WST-1 Cell proliferation reagent (2007)
46. Bilge T., Ilkay O. and Jutamad S. (2003) Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Gazi University, Ankara, Turkey and Chulabhorn Research Institute, Vipavadee Rangsit Highway, Bangkok, Thailand
47. . Kirandeep K., Meenakshi J., Tarandeep K. and Rahul Jain (2009) Department of Medicinal Chemistry, National Institute of Pharmaceutical Education and Research, India
48. Orhan and B. Sener (2003) Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Gazi University, 06330 Ankara, Turkey
49. Istv Z., Borba R., Judit H., Joseph M., Imre O. and George F. (2009) Departments of 1Pharmacodynamics and Biopharmacy, Pharmacognosy, Biochemistry, Institute of Microbiology and Immunobiology, University of Szeged, Szeged, Hungary
50. Ilkay O. and Bilge F. (2003) Gazi University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Ankara, Turkey