

Π. ΙΩΑΝΝΟΥ-ΑΜΑΡΑΝΤΙΔΟΥ
Καθηγήτρια Χημείας

ΒΙΟΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΠΑΡΑΔΟΣΕΩΝ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2014

ΒΙΟΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

- **Βιοαναλυτικές τεχνικές**, όλες οι τεχνικές ή διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση, διαχωρισμό, καθαρισμό, ανίχνευση και προσδιορισμό, καθώς και τη μελέτη φυσικών, χημικών και βιολογικών ιδιοτήτων των βιολογικών μορίων
- **Βιολογικά μόρια**, ουσίες που ανήκουν σε μια από τις παρακάτω γενικές κατηγορίες: **υδατάνθρακες, αμινοξέα – πεπτιδία - πρωτεΐνες (ένζυμα), νουκλεοτίδια και νουκλεϊνικά οξέα, λιπίδια, στεροειδή**
- Οι **βιοαναλυτικές τεχνικές**, όπως γενικά οι αναλυτικές τεχνικές, ταξινομούνται βάση της φυσικοχημικής αρχής στην οποία στηρίζονται και έτσι διακρίνονται σε ηλεκτροχημικές, οπτικές και ειδικές τεχνικές
- Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές στην ανάλυση βιομορίων είναι οι εξής:
 - **Ηλεκτροχημικές**
 - Ποτενσιομετρία
 - Αμπερομετρία
 - **Οπτικές**
 - Φασματοφωτομετρία Ορατού-Υπεριώδους
 - Φθορισμομετρία
 - Χημειοφωταύγεια
 - Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους
 - Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού
 - Νεφελομετρία
 - Θολωσιμετρία
 - Πολωσιμετρία

ΒΙΟΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Ειδικές

- **Κινητικές-Ενζυμικές**
- Ραδιοχημικές
- Φασματομετρία μαζών
- **Ανοσοχημικές**
- **Υβριδοποίηση DNA**

Τεχνικές διαχωρισμού

- καθίζηση
- εκχύλιση
- **υπερδιήθηση**
- διαπίδυση
- ηλεκτροδιαπίδυση
- προσρόφηση
- **ηλεκτροφορητικές τεχνικές**

Χρωματογραφικές τεχνικές

- χρωματογραφία προσρόφησης (adsorption)
- χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (thin-layer chromatography)
- χρωματογραφία κατανομής σε χάρτη (paper chromatography)
- χρωματογραφία ιονανταλλαγής (ion-exchange chromatography)
- **χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (molecular exclusion liquid chromatography)**
- **χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography)**

ΠΡΟΒΛΗΜΑ (1)

ΑΝΑΛΥΤΗΣ DNA

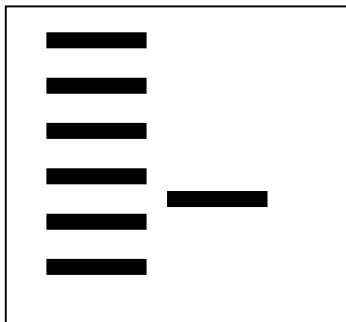
ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

↓
Απομόνωση DNA (Λύση κυττάρων – Εκχύλιση)

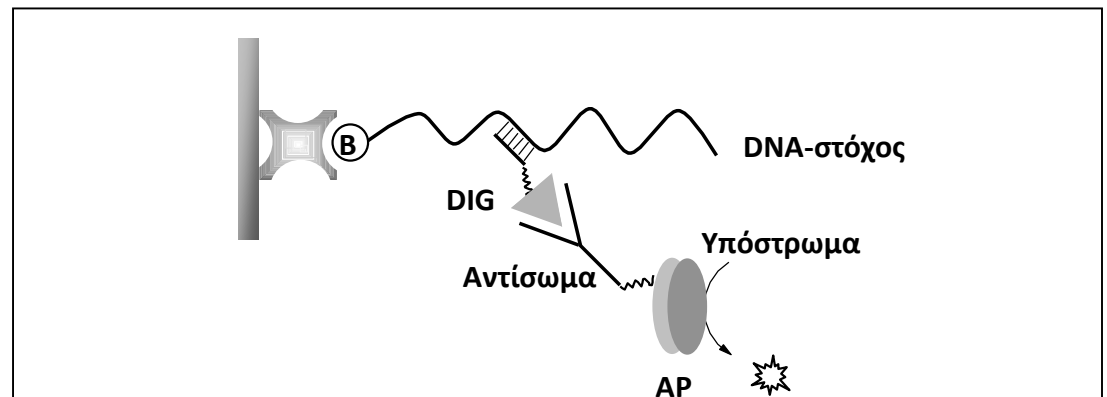
↓
Πολλαπλασιασμός γενωμικού DNA με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, **PCR**)

↓
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ – ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ - ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ

←
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ



→
ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΛΑΚΙΔΙΑ ΜΙΚΡΟΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ



ΠΡΟΒΛΗΜΑ (2)

ΑΝΑΛΥΤΗΣ RNA

ΔΕΙΓΜΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ (ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ)



Απομόνωση ολικού RNA (Λύση κυττάρων – Εκχύλιση – Καταβύθιση –
Επιδιαλυτοποίηση)



ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ RNA ΣΕ cDNA



Πολλαπλασιασμός DNA με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης
(Polymerase chain reaction, **PCR**)



ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ – ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ - ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ

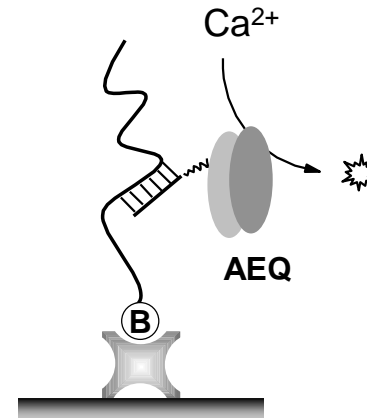


ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΛΑΚΙΔΙΑ ΜΙΚΡΟΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ

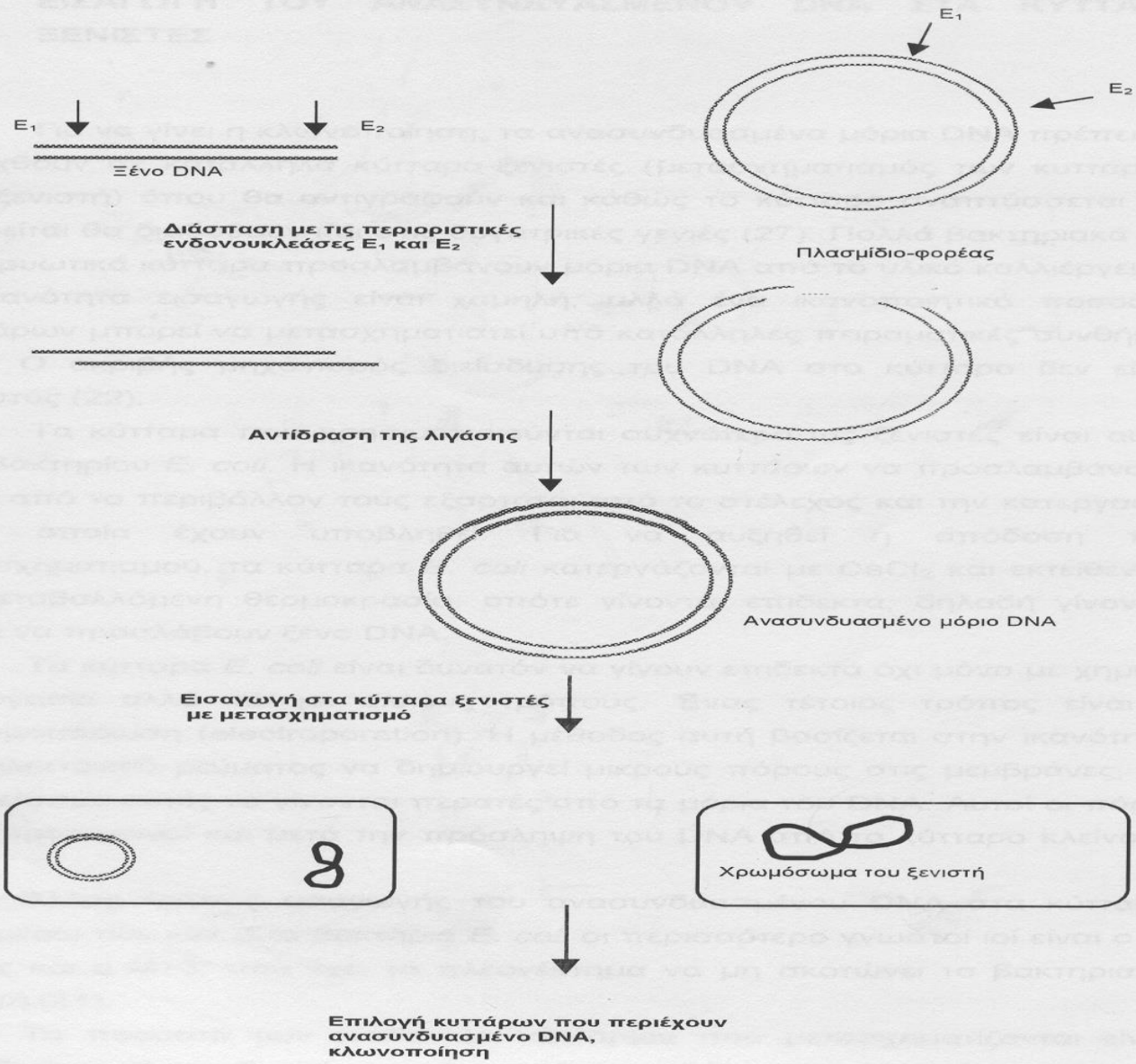
ΠΡΟΒΛΗΜΑ 3

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΟΥ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

(ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ – ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ ΓΙΑ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ DNA ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΟΥΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥΣ)



- Κόστος εμπορικού προϊόντος απογορευτικό!!! (25μg > 250 \$)
- Πορεία:
- Γονίδιο της πρωτεΐνης
- Πολλαπλασιασμός DNA πρωτεΐνης με PCR με ταυτόχρονη εισαγωγή αλληλουχιών:
 - ✓ δράσης περιοριστικών ενζύμων
 - ✓ κωδικονίων ιστιδίνης (απαραίτητων για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης)
- Πλασμίδιο φορέας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με ίδιες θέσεις δράσης περιοριστικών ενζύμων, ρυθμιστική περιοχή, θέσεις ελέγχου και δομικά γονίδια ενός οπερονίου για τη ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης και τον έλεγχο εισαγωγής του ξένου DNA στο φορέα
- Εισαγωγή του DNA της πρωτεΐνης στο πλασμίδιο (περιοριστικά ένζυμα και DNA λιγάση)
- Μετασχηματισμός βακτηρίων με το φορέα της πρωτεΐνης
- Πρωτεϊνοσύνθεση
- Απομόνωση – καθαρισμός πρωτεΐνης



Κατασκευή ανασυνδυασμένων μορίων DNA



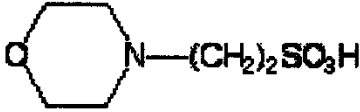
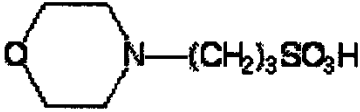
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

- Βιολογικά δείγματα - Βιολογικά Παρασκευάσματα
- Χειρισμός βιολογικών δειγμάτων - ουσιών
- Λύση κυττάρων
- Διήθηση
- Φυγοκέντριση
- Μέθοδοι απομόνωσης-καθαρισμού-ανίχνευσης-ποσοτικού προσδιορισμού βιολογικών μακρομορίων
- Α. Πρωτεΐνες
- Β. Νουκλεϊκά οξέα
- Ένζυμα-Ενζυματική Ανάλυση

Αμφολυτικά Ρυθμιστικά Διαλύματα (Good's buffers)

- ✓ pK_a στην περιοχή 6.0 – 8.0, περιοχή των περισσότερων βιολογικών αντιδράσεων
- ✓ Μεγάλη διαλυτότητα στο νερό
- ✓ Ελάχιστη διαπερατότητα βιολογικών μεμβρανών
- ✓ Ελάχιστη επίδραση ιονικής ισχύος επί του pH
- ✓ Ελάχιστη επίδραση θερμοκρασίας
- ✓ Ελάχιστη αλληλεπίδραση με ανόργανα κατιόντα
- ✓ Ελάχιστη απορρόφηση στην περιοχή 240-700 nm
- ✓ Ελάχιστη συμμετοχή σε βιοχημικές διεργασίες

Zwitterionic Buffer				
Buffer	Structure and Name	MW	pKa at 20 °C (D/°C)	useful pH range
ACES	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{NCCH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H} \end{array}$ N-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid	182.2	6.88 (-0.020)	6.4 - 7.4
ADA	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{NCCH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2 \end{array}$ N-(2-acetamido)iminodiacetic acid	190.2	6.62 (-0.011)	6.4 - 7.4
BES	$\text{HO}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid	213.3	7.17 (-0.016)	6.6 - 7.6
Bicine	$\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2$ N,N-bis(2-hydroxyethyl)glycine	163.2	8.35 (-0.018)	7.8 - 8.8
CAPS	$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{H}$ 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid	221.3	10.4 (0.032)	9.7 - 11.1

CHES	$C_8H_{11}NH(CH_2)_2SO_3H$ 2-(cyclohexylamino)-1-ethanesulfonic acid	207.1	9.55 (-0.011)	9.0 - 10.1
HEPES	 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid	238.3	7.55 (-0.014)	7.0 - 8.0
HEPPS (EPPS)	 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-propanesulfonic acid	252.3	8.0 (-0.011)	7.6 - 8.6
MES	 2-morpholinoethanesulfonic acid monohydrate	213.3	6.15 (-0.011)	5.8 - 6.5
MOPS		209.3	7.2 (-0.011)	6.5 - 7.9

	3-morpholinopropanesulfonic acid			
PIPES	$\text{HO}_3\text{S}(\text{H}_2\text{C})_2\text{-N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \diagdown \quad \diagup \\ \diagup \quad \diagdown \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} \text{N} \text{-(CH}_2\text{)}_2\text{SO}_3\text{H}$ <p>piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)</p>	302.4	6.82 (-0.009)	6.4 - 7.2
TAPS	$(\text{HOH}_2\text{C})_3\text{CNH}(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{H}$ <p>N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropanesulfonic acid</p>	243.3	8.4 (0.018)	7.7-9.1
TES	$(\text{HOH}_2\text{C})_3\text{CNH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$ <p>N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-2-aminoethanesulfonic acid</p>	229.3	7.5 (-0.020)	7.0 - 8.0
Tricine	$(\text{HOH}_2\text{C})_3\text{CNHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ <p>N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-glycine</p>	179.2	8.15 (-0.021)	7.6 - 8.8
Tris	$(\text{HOH}_2\text{C})_3\text{CNH}_2 \cdot \text{HCl}$ <p>tris(hydroxymethyl)aminomethane</p>	121.1 (157.6)	8.08 (-0.028)	7.0 - 9.0

Non-Zwitterionic Buffer

Compound	Formula	MW	Solubility	pKa at 20 °C		
				1	2	3
			g/100 mL of H ₂ O at 20 °C			
Boric Acid	H ₃ BO ₃	61.8	6.4	9.14	12.74	13.8
Citric Acid, anhydrous tri sodium salt	C ₆ H ₈ O ₇	192.4	146.0	3.14	4.77	6.39 (18 ° C)
	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (H ₂ O) ₂	294.1	72.0	3.09	4.75	5.41 (18 ° C)
Imidazole	C ₄ H ₄ N ₂	68.1	very soluble	6.95 (25 ° C)		
Potassium Phosphate, monobasic	KH ₂ PO ₄	136.1	136.1	2.12	7.21	12.67 (25 ° C)
Potassium Phosphate, dibasic	K ₂ HPO ₄	174.2	174.2	2.12	7.21	12.67 (25 ° C)
Potassium Hydrogen <i>Phthalate</i>	C ₈ H ₅ KO ₄	204.2	204.2	2.89	5.51 (25 °	

Sodium Acetate, anhydrous	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$	82.0	119.0 (0 °C)	4.75 (25 °C)		
trihydrate	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ (H_2O) ₃	136.1	76.2 (0 °C)			
Sodium Cacodylate	$(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na}$ (H_2O) ₃	214.0	200	6.21		
Sodium Carbonate, anhydrous	Na_2CO_3	106.0	7.1 (0° C)	6.37		
decahydrate	Na_2CO_3 (H_2O) 10	286.1	21.5 (0° C)			
Sodium Phosphate, monobasic	NaH_2PO_4 (H_2O) ₂	156.0	very soluble	2.12	7.21	12.67
Sodium Phosphate, dibasic, anhydrous	Na_2HPO_4	142.0	---			
dihydrate	Na_2HPO_4 (H_2O) ₂	178.0	60.0	2.12	7.21	12.67 (25° C)
dodecahydrate	Na_2HPO_4 (H_2O) ₁₂	358.1	4.2			
Sodium Hydrogen Carbonate	NaHCO_3	84.0	9.6	6.37	10.25	
Sodium Tetraborate, anhydrous	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	201.2	1.1 (0° C)	9.14	12.74	13.80
decahydrate	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (H_2O) 10	381.4	2.0 (0° C)			

ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ-ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ

ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

ΚΛΙΝΙΚΑ ΥΓΡΑ (ολικό αίμα, ορός, πλάσμα, ούρα) , **ΙΣΤΟΙ, ΟΡΓΑΝΑ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

- Ο χημικός χαρακτηρισμός (ποιοτική και ποσοτική ανάλυση) αποτελεί αντικείμενο της κλινικής εργαστηριακής χημείας
- Ο προσδιορισμός φαρμάκων και μεταβολιτών – σημαντικό στάδιο της φαρμακευτικής ανάλυσης (κλινική φαρμακευτική ανάλυση)

ΚΑΜΜΙΕΡΓΕΙΕΣ

- ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ (ΒΑΚΤΗΡΙΑ, ΜΥΚΗΤΕΣ, ΖΥΜΗ)
- ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΙΣΤΩΝ, ΟΡΓΑΝΩΝ (ΣΥΝΗΘΩΣ ΖΩΩΝ)

ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ

- Προϊόντα που απομονώνονται από μονοκύτταρους οργανισμούς, κύτταρα οργάνων και ιστών φυτικών και ζωικών οργανισμών
- Οργανίδια ή μέρη κυττάρων, όπως μεμβράνες, ριβοσώματα, μιτοχόνδρια, χλωροπλάστες κ.λ.π.
- Βιολογικά μόρια, όπως πρωτεΐνες (ένζυμα), υδατάνθρακες, νουκλεϊνικά οξέα, λιπίδια.

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ (ΕΝΖΥΜΑ)

- Βιοαναλυτικά αντιδραστήρια*
- ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ (DNA, RNA)**
- Μοριακή Διάγνωση, Γενετική Μηχανική*

ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ-ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ

ΦΥΛΑΞΗ- ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ-ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ-ΟΥΣΙΩΝ

- Περιέκτες- γυάλινοι ή πλαστικοί (πολυστερενίου)

Αντιπηκτικά και συντηρητικά κλινικών βιολογικών δειγμάτων

- Πλάσμα (EDTA, οξαλικά άλατα, φθοριούχα άλατα, κιτρικά, ηπαρίνη)
- Ούρα (Υδροχλωρικό οξύ, τολουόλιο, διοξική χλωρεξιδίνη, οξικό οξύ)
- Διαλύματα-παρασκευάσματα που αναπτύσσουν εύκολα μικροοργανισμούς (νατραζίδιο)

Αποθήκευση (κλινικών) βιολογικών δειγμάτων

Με τρόπο ώστε να αποκλείονται πιθανές αλλοιώσεις στη χημική σύσταση και βιολογική συμπεριφορά

- Ψύξη (0 -4 °C)
Ολιγοήμερη αποθήκευση βιολογικών δειγμάτων (περίπου μία εβδομάδα)
- Κατάψυξη (-20 °C)
Μεγάλα χρονικά διαστήματα
- Βαθιά κατάψυξη (-70-80 °C)
Μεγάλα χρονικά διαστήματα (χρόνια)

ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ-ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ

Αποθήκευση βιολογικών πρώτων υλών και παρασκευασμάτων

Καλλιέργειες

- Βαθεία κατάψυξη (-80 °C)
(με προσθήκη 10% γλυκερόλης)- αποφυγή λύσης κυττάρων
- Λυοφιλίωση (καταψυκτική εξάτμιση)

Πρωτεΐνες (ένζυμα)

- Ψύξη (0 -4 °C)
Κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, συγκέντρωση άλατος, παρουσία αναγωγικών ουσιών, αναστολέων πρωτεασών
- Κατάψυξη (-20 °C)
(με προσθήκη γλυκερόλης 20-50%)
- Αποφυγή πολλαπλών επαναλαμβανόμενων ψύξεων-αποψύξεων

Νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA)

- DNA- Γενικά σταθερά μόρια (φύλαξη για χρόνια σε ξηρή μορφή)
- Κίνδυνος διάσπασης από νουκλεάσες του περιβάλλοντος
(προσθήκη EDTA-δεσμεύει ιόντα Mg^{2+} απαραίτητα για τη δράση των νουκλεασών)
- RNA- πιο ασταθές σε σχέση με το DNA (RNA-σες θερμοσταθερές)
- αποστείρωση σκευών
- κατεργασία διαλυμάτων με DEPC (diethylpyrocarbonate)
- προσθήκη αναστολέων νουκλεασών

Σε φυσιολογικό πλάσμα, ιστούς και άλλα υγρά – το μεγαλύτερο ποσοστό της μάζας διαλυμένων ουσιών – πρωτεΐνες

Πλάσμα – ορός – 66-82 g/l

Ούρα - 0,25 – 1,0 g/l

Οι πρωτεΐνες δεσμεύουν όλες τις χημικές ουσίες

✓ Για προσδιορισμό μη πρωτεϊνικών συστατικών – **αποπρωτεΐνωση**

Φυσικές μέθοδοι

- ✓ Θέρμανση > 65 °C (συσσωμάτωση)
- ✓ Προσρόφηση σε αδρανή υλικά (μη ιοντικές ρητίνες)
- ✓ Διαπίδυση
- ✓ Υπερδιήθηση
- ✓ Αφυδάτωση (αλκοόλες, ακετονιτρίλιο, DMF)
- ✓ Εξαλάτωση (Na_3PO_4 , Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

Χημικές μέθοδοι

- ✓ Τριχλωροξικό οξύ – 0,3 M (~ 5%)
- ✓ Υπερχλωρικό οξύ – 10 M

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ-ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ

ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ

- Λύση κυττάρων (cell lysis)
- Διήθηση-Φυγοκέντριση (filtration-centrifugation)
- Καθίζηση με άλας ή οργανικό διαλύτη (salt or solvent precipitation)
- Διαπίδυση (dialysis)
- Χρωματογραφικές τεχνικές (chromatographic techniques)
- Συμπύκνωση με μοριακή διήθηση (molecular filtration or ultrafiltration)
- Λυοφιλίωση (freeze drying or lyophilization)

ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η μέθοδος επιλογής για τη λύση κυττάρων εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του δείγματος και από τη θέση του βιομορίου στο κύτταρο

Κυτταρόπλασμα – λύση κυττάρου

Ζωϊκά κύτταρα (ήπιες τεχνικές)

✓ Οσμωτική λύση – αναδιασπορά σε υποτονικό διάλυμα (NaCl < 0,15 M)

Φυτικά κύτταρα, βακτήρια (έχουν κυτταρικό τοίχωμα) (βίαιες τεχνικές)

Φυσικά μέσα

✓ Μηχανικό σπάσιμο κυττάρων (πρέσσες, συσκευή υπερήχων κα)

Χημικά μέσα

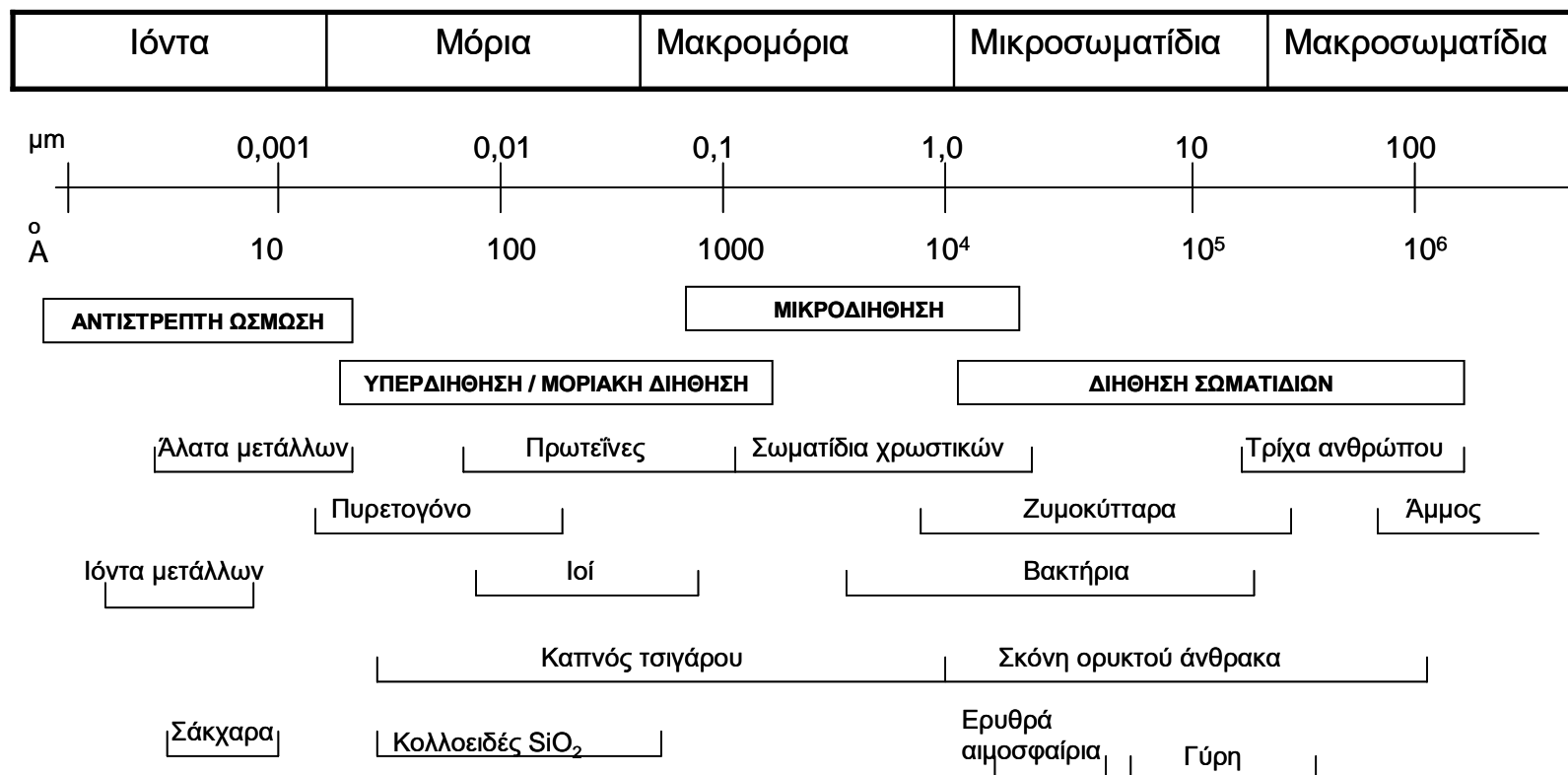
✓ Λυσοζύμη (διαλύει την κυτταρική μεμβράνη)

✓ Επιφανειοδραστικά, οργανικοί διαλύτες

ΔΙΗΘΗΣΗ

- **Διήθηση (Filtration)** – Φυσική ή μηχανική διεργασία διαχωρισμού στερεών σωματιδίων σε ένα διφασικό σύστημα υγρού-στερεών η αερίου-στερεών
- ✓ Συμπληρώνει τις διάφορες διεργασίες διαχωρισμού
- ✓ Ηθμός (πορώδες υλικό) - βασικό στοιχείο της διήθησης
- ✓ Δυνατός ο διαχωρισμός όλου του φάσματος μεγεθών διαφόρων σωματιδίων

ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΤΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ



ΔΙΗΘΗΣΗ

ΑΝΤΙΣΤΡΕΠΤΗ ΩΣΜΩΣΗ (*reverse osmosis*)

- Διαχωρίζονται διαλύτες από ουσίες σχετικά χαμηλού μοριακού βάρους (MB 200-400 dalton), με τη βοήθεια ημιπερατής μεμβράνης (ηθμού) και εφαρμογή υψηλής πίεσης
- Μέγεθος πόρων ηθμών από 5 έως 20 Å (10^{-10} m)
- **Ωσμωση** – μετακίνηση μορίων ύδατος μεταξύ δύο διαλυμάτων διαφορετικής συγκέντρωσης μέσω ημιπερατής μεμβράνης από το αραιό διάλυμα στο πυκνό μέχρι εξίσωσης συγκεντρώσεων (ωσμωτικών πιέσεων)
- **Αντιστρεπτή ώσμωση** – με εφαρμογή πίεσης (μεγαλύτερης της ωσμωτικής, 1000 psi (pounds per square inch) ή 6,8-68 Atm) από την πλευρά του πυκνού διαλύματος επιτυγχάνεται αντιστροφή της ροής των μορίων του διαλύτη προς το αραιότερο διάλυμα
- **Εφαρμόζεται για:**
 - ✓ Αφαλάτωση θαλάσσιου ύδατος
 - ✓ Ανάκτηση ιόντων μετάλλων
 - ✓ Ανταλλαγή ρυθμιστικών διαλυμάτων κ.α.

ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗ (ULTRAFILTRATION)

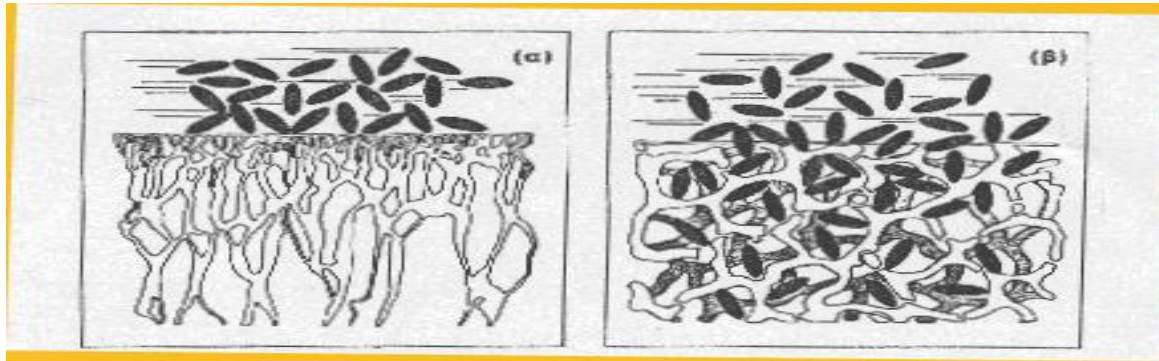
- **Υπερδιήθηση (ultrafiltration, UF) ή μοριακή διήθηση (Molecular filtration)**
 - Τεχνική διαχωρισμού υπό πίεση (με τη χρήση ειδικών ημιπερατών μεμβρανών) σωματιδίων με βάση το μοριακό τους βάρος, το σχήμα ή/και το φορτίο τους
- Απλή και ήπια τεχνική για διαχωρισμό, συμπύκνωση και καθαρισμό
- Απαιτείται ελάχιστη ενέργεια (πιέσεις από 0,68 – 3,4 Atm), όχι μεταβολές φάσης (π.χ. εξάτμιση) ή προσθήκη αντιδραστηρίων
- Διαχωρίζονται ουσίες με MB από 500 – 500.000 D ή έχουν διαστάσεις από **10 A μέχρι 0,2 μm** (διάμετρος πόρων ηθμών από 10 A° μέχρι 0,1 μm)

Διάκριση από:

- **Μικροδιήθηση (Microfiltration, MF)**– Διαχωρισμός σωματιδίων διαστάσεων $10^3 – 10^4 A$ (μακρομόρια χρωστικών, αιωρούμενα σωματίδια, βακτήρια, ιοί, κολλοειδή συσσωματώματα) από ηθμούς με μέγεθος πόρων 0,1 – 2 μm και πιέσεις της τάξης 0,07 – 0,68 Atm
- **Μεμβράνες – Ηθμοί Υπερδιήθησης**
 - Έχουν ειδική ανισότροπη (anisotropic) δομή και δερματοειδή (skinned) υφή
 - Δύο ευδιάκριτες στοιβάδες:
 - α) λεπτή συμπαγή (δερματοειδή) (0,1-1,5 μm) προς την ενεργή πλευρά της μεμβράνης
 - β) μεγαλύτερου πάχους (50-250 μm) σπογγώδη στοιβάδα προς την περατή πλευρά της μεμβράνης

ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗ (ULTRAFILTRATION)

- Οι μεμβράνες υπερδιήθησης κατακρατούν τα σωματίδια στην επιφάνειά τους (α), ενώ οι μικροπορώδεις ηθμοί συγκρατούν τα σωματίδια στο εσωτερικό τους (β)



α) Τομή ανισότροπης μεμβράνης για την υπερδιήθηση, UF

β) Μικροπορώδης ηθμός για μικροδιηθήσεις, MF

Οι μεμβράνες UF ταξινομούνται με βάση το ονομαστικό βάρος αποκοπής (nominal molecular weight cut-off, NMWC) – “το μοριακό βάρος στο οποίο το 90% σωματιδίων (με το ίδιο MB) κατακρατείται από τη μεμβράνη»

Διατίθενται μεμβράνες με NMWC από 500 μέχρι 500.000 dalton

Υλικά μεμβρανών – υδρόφιλα, ανενεργά, μη τοξικά (πολυσουλφονικά πολυμερή, πολυπροπυλένιο, κυτταρίνη)

ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ

Διεργασία κατακρήμνισης σωματιδίων κατά τη διάρκεια ταχείας περιστροφής λόγω αύξησης του πεδίου βαρύτητας

Δύο βασικές εφαρμογές:

✓ Διαχωρισμός στερεών σωματιδίων (κατακρήμνισμα) από τα διαλυτά συστατικά (υπερκείμενο υγρό) – **ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ**

✓ Διαχωρισμός ευδιάλυτων μακρομορίων διαφορετικής μάζας ή πυκνότητας – **ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ**

(Προσδιορισμός φυσικών παραμέτρων: μοριακά βάρη, συντελεστής κατακρήμνισης κλπ)

✓ Χρησιμοποιείται επίσης και για την εκτέλεση άλλων διεργασιών όπως η **ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗ**

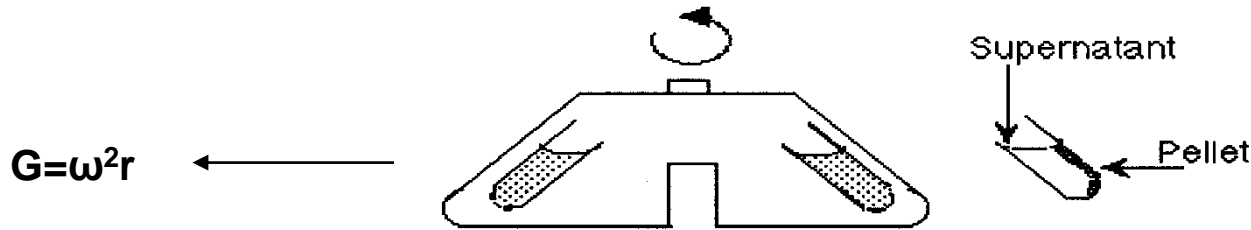
•Φυγόκεντροι

•Ψυχόμενες φυγόκεντροι (ειδικές για παραγωγή βιολογικών παρασκευασμάτων, 3.000-100.000 rpm)

ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ

Το βασικότερο τμήμα μιας φυγοκέντρου - ΡΟΤΩΡΑΣ

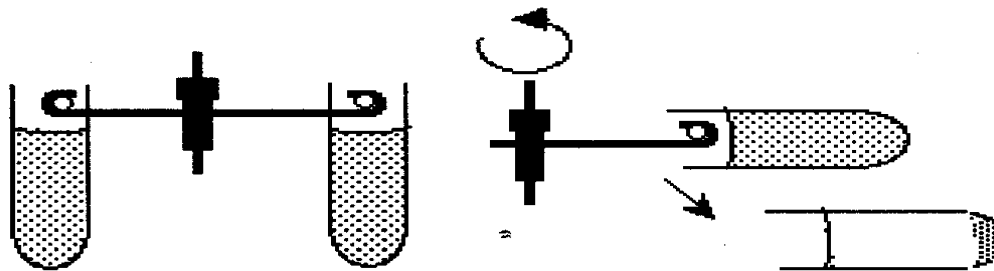
A. Ρότωρας σταθερής γωνίας (Fixed angle rotor)



Πλεονέκτημα: Τα σωματίδια διανύουν μικρή διαδρομή πριν την κατακρήμνιση – ΣΥΝΤΟΜΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗΣ

- Ο συχνότερα χρησιμοποιούμενος τύπος ρότωρα

B. Κεφαλή αιωρούμενων υποδοχείων (Swinging bucket rotor)



Πλεονέκτημα: Τα σωματίδια διανύουν μεγαλύτερη διαδρομή πριν την κατακρήμνιση - επιτρέπει καλύτερο διαχωρισμό, π.χ. στη φυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνότητας

Ευκολότερη η παραλαβή του υπερκείμενου υγρού χωρίς τη διατάραξη του κατακρημνίσματος

ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ

Φυγοκεντρικό πεδίο (Centrifugal field)

$$G = \omega^2 r = \left[\frac{2\pi RPM}{60} \right]^2 \times r \quad (1)$$

ω – γωνιακή ταχύτητα (radians/sec)

r - απόσταση σωματιδίου (ακτίνα) από τον άξονα περιστροφής (cm)

RPM – περιστροφές ανά λεπτό (revolutions/min)

Σχετικό φυγοκεντρικό πεδίο (Relative centrifugal field), RCF

$$RCF = \frac{G}{g} = \left[\frac{2\pi RPM}{60} \right]^2 \times \frac{r}{g} \quad (2)$$

και για $g = 980 \text{ cm/sec}^2$, $r = \text{cm}$,

$$RCF = 1,12 \times 10^{-5} (RPM)^2 \times r \quad (3)$$

Η σχέση (3) ορίζει πόσες φορές το φυγοκεντρικό πεδίο είναι μεγαλύτερο της επιτάχυνσης βαρύτητας (g)

ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ

Παραδείγματα:

α) Για ρότωνα ακτίνας 7 cm που περιστρέφεται με ταχύτητα 6.000 RPM, το RCF θα είναι:

$$\text{RCF} = 1,12 \times 10^{-5} \times (6.000)^2 \times 7 = 2822,4 \text{ g}$$

β) Για ρότωνα ακτίνας 15 cm:

$$\text{RCF} = 1,12 \times 10^{-5} \times (6.000)^2 \times 15 = 6.000 \text{ g}$$

γ) Αύξηση ταχύτητας σε 10.000 RPM:

$$\text{RCF} = 1,12 \times 10^{-5} \times (10.000)^2 \times 7 = 8.000 \text{ g}$$

Η μόνη παράμετρος που είναι σταθερή και ανεξάρτητη του τύπου του ρότωνα είναι η τιμή του RCF και όχι του RPM (αριθμός στροφών, γωνιακή ταχύτητα)

ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ

Ταχύτητα κατακρήμνισης σωματιδίου – ανάλογη της φυγόκεντρης δύναμης που αναπτύσσεται με την περιστροφή του ρότωνα

• εξαρτάται από το μέγεθος του σωματιδίου (μοριακό βάρος), τη διαφορά πυκνότητας σωματιδίου και μητρικού υγρού:

$$V = \frac{d^2(\rho_p - \rho_s)}{18\mu} \times g = \frac{\omega^2 r M v (\rho_p - \rho_s)}{Nf} \quad (4)$$

Όπου: V - ταχύτητα κατακρήμνισης, d - διάμετρος σωματιδίου, ρ_p - πυκνότητα σωματιδίου, ρ_s - πυκνότητα μητρικού υγρού, μ - ιξώδες μητρικού υγρού, g - επιτάχυνση βαρύτητας, M – γραμμομοριακή μάζα σωματιδίου, N – αριθμός Avogadro, f – συντελεστής τριβής, v – μερικός ειδικός όγκος σωματιδίου

Συντελεστής κατακρήμνισης, s , - ταχύτητα κατακρήμνισης ανά μονάδα φυγοκεντρικού πεδίου, G , εκφράζεται σε sec ή σε μονάδες Svedberg, S (10^{-13} sec)

$$s = \frac{V}{\omega^2 r} = \frac{M(1 - v\rho_s)}{Nf} = \frac{Mv(\rho_p - \rho_s)}{Nf} \quad (5)$$

Συμπεράσματα:

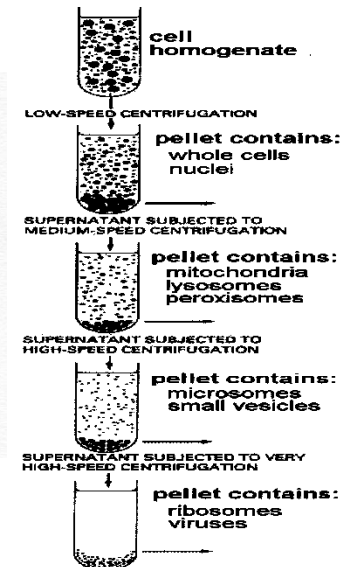
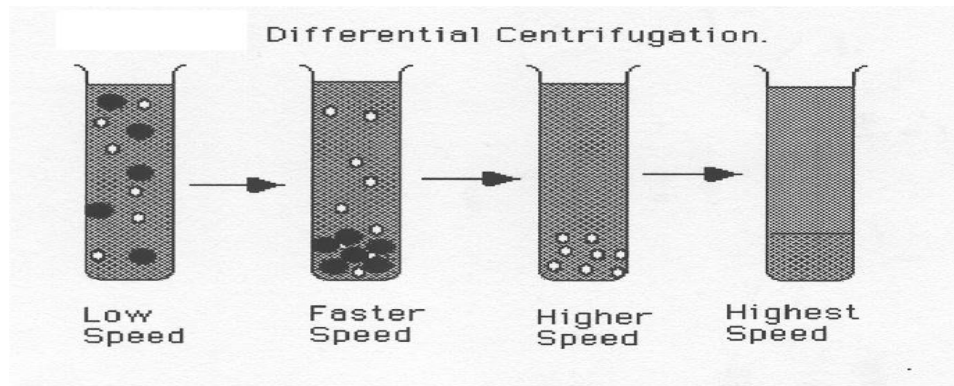
1. Μεγαλύτερη μάζα σωματιδίου – ταχύτερη κίνηση εντός φυγοκεντρικού πεδίου
2. Μεγαλύτερη πυκνότητα σωματιδίου (μικρότερος ειδικός όγκος) – ταχύτερη κίνηση εντός φυγοκεντρικού πεδίου
3. Μεγαλύτερη πυκνότητα μητρικού υγρού – βραδύτερη κίνηση σωματιδίου
4. Μεγαλύτερος συντελεστής τριβής (ιξώδες μητρικού υγρού, σχήμα σωματιδίου κλπ) – βραδύτερη κίνηση σωματιδίου
5. Όταν $\rho_s \geq \rho_p$ – ταχύτητα σωματιδίου = 0
6. Μεγαλύτερο φυγοκεντρικό πεδίο – ταχύτερη κίνηση σωματιδίου

ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗΣ

A) Διαφορική φυγοκέντριση- η συνηθέστερη τεχνική διαχωρισμού – Διαχωρισμός κατακρημνίσματος (pellet) από το υπερκείμενο υγρό (supernatant)

Οι δύο φάσεις χωρίζονται με απόχυση (decantation) του υπερκείμενου υγρού. Το στερεό κατακρημνισμα παραλαμβάνεται με κατάλληλο διαλύτη



B) Φυγοκέντριση βαθμίδωσης πυκνότητας (Density Gradient)

Χρησιμοποιείται υγρή φάση η πυκνότητα της οποίας αυξάνει βαθμιδωτά από το στόμιο προς τον πυθμένα του φυγοκεντρικού σωλήνα. Επιτυγχάνεται ο πλήρης διαχωρισμός διαφορετικών σωματιδίων καθώς και η εκτέλεση αναλυτικών φυγοκεντρίσεων.

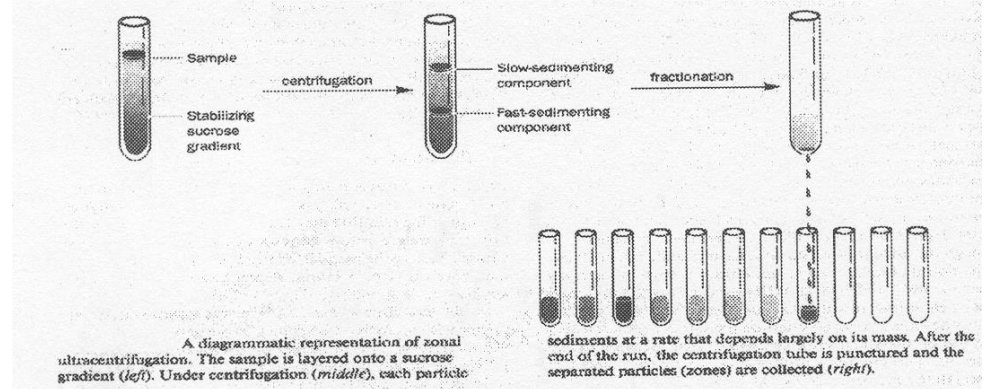
Υπάρχουν δύο τεχνικές φυγοκέντρισης βαθμίδωσης πυκνότητας:

ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ

•Τεχνική ζωνικής ταχύτητας (rate zonal technique)

Το δείγμα τοποθετείται στην επιφάνεια της υγρής φάσης βαθμιδωτής πυκνότητας. Κατά τη φυγοκέντριση, τα σωματίδια κατακρημνίζονται μέσω της υγρής φάσης κατά ζώνες ανάλογα με την ταχύτητα κατακρήμνισης τους V .

(πυκνότητα δείγματος > της πυκνότερης ζώνης)



$$V = \frac{\omega^2 r M v (\rho_p - \rho_s)}{N f}$$

Φυγοκέντριση ζωνικής ταχύτητας

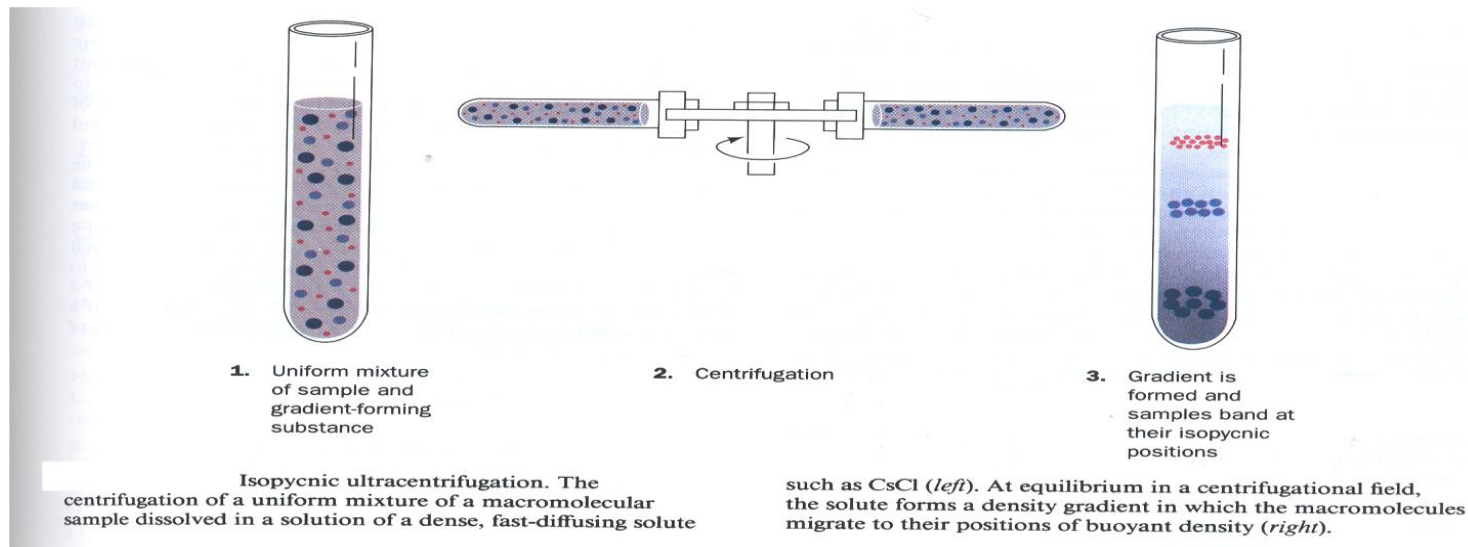
- ✓ Χρονοεξαρτώμενη τεχνική- διακοπή πριν οποιοδήποτε συστατικό φτάσει στον πυθμένα του σωλήνα
- ✓ Ήπια, μη αποδιατακτική διεργασία – χρήσιμη για καθαρισμό πρωτεϊνών, κυττάρων και οργανιδίων

ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ

- **Τεχνική ισόπυκνης βαθμίδωσης (isopycnic gradient technique)**
$$V = \frac{\omega^2 r M v (\rho_p - \rho_s)}{N f}$$

Η υγρή φάση εμπεριέχει όλη την περιοχή πυκνοτήτων και βρίσκεται ως ομογενές μίγμα με το δείγμα.

Κατά τη φυγοκέντρωση, η υγρή φάση μετατρέπεται σε φάση βαθμιδωτής πυκνότητας μέσα στην οποία τα σωματίδια του δείγματος κατακρημνίζονται και κατανέμονται σε ζώνες ίσης πυκνότητας με τη δική τους.

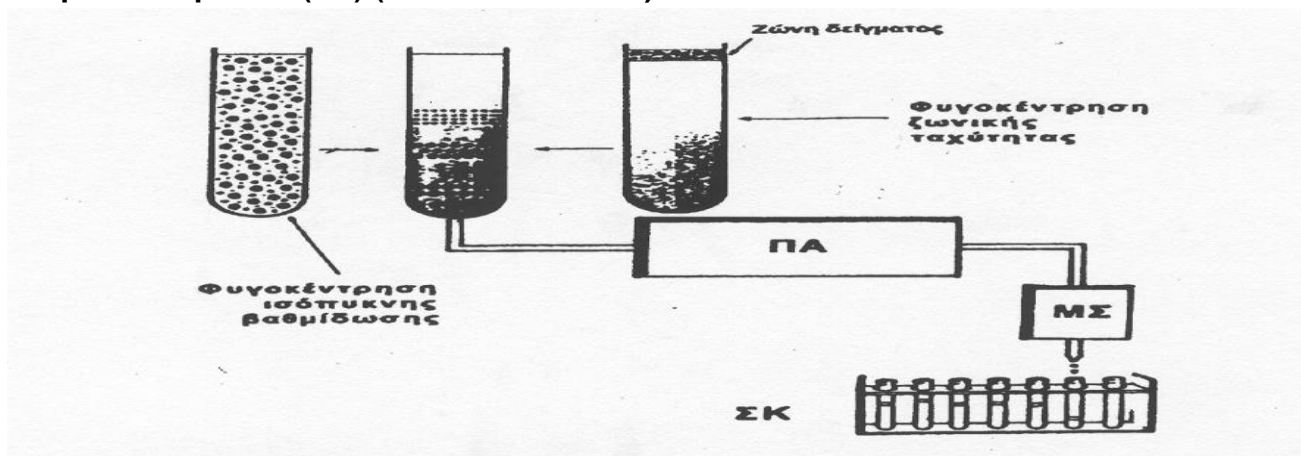


- ✓ Δεν απαιτείται προπαρασκευασμένο διάλυμα βαθμιδωτής πυκνότητας. Χρησιμοποιείται διάλυμα χλωριούχου καισίου (CsCl, 6M) το οποίο αναμιγνύεται με το παρασκεύασμα των μακρομορίων που πρόκειται να διαχωριστούν
- ✓ Φυγοκέντρωση μέχρι κατάστασης ισορροπίας
- ✓ Χρονοβόρα τεχνική (36-48 h για διαχωρισμό DNA)
- ✓ Χρήσιμη για καθαρισμό ΝΟ διαφορετικής πυκνότητας

ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ

ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ

Η παραλαβή κλασμάτων ή ζωνών που διαχωρίστηκαν με μία από τις τεχνικές βαθμίδωσης πυκνότητας γίνεται με διαβίβαση των ζωνών του μητρικού υγρού και των διαχωρισθέντων συστατικών από τον πυθμένα του φυγοκεντρικού σωλήνα μέσω περισταλτικής αντλίας (ΠΑ) σε συλλογέα κλασμάτων (ΣΚ) (fraction collector).



Σχηματικό διάγραμμα διάταξης παραλαβής ζωνών

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗΣ ΒΑΘΜΙΔΩΣΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ

- Απομόνωση και καθαρισμός βιολογικών οργανιδίων, τμημάτων κυττάρων και μορίων
- Προσδιορισμός πυκνότητας η/και συντελεστών κατακρήμνισης βιομορίων, μοριακών βαρών
- Μελέτη επίδρασης χημικών, φυσικών ή βιολογικών παραγόντων στα βιολογικά προϊόντα ή μικροοργανισμούς από τους οποίους παράγονται

ΓΕΝΙΚΗ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ

Πραγματοποιείται συνήθως με διεργασίες κλασμάτωσης με αξιοποίηση των φυσικο-χημικών ιδιοτήτων τους:

- Διαλυτότητα
- Ιοντικό φορτίο
- Ικανότητα προσρόφησης
- Εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια

Τρεις κατηγορίες μεθόδων διαχωρισμού με βάση:

- 1) Τις διαφορές ιδιοτήτων ουσιών σε μία φάση (υπερδιήθηση, διαπίδυση)
- 2) Τη δημιουργία 2 φάσεων κατά το διαχωρισμό (καθίζηση, εκχύλιση, απόσταξη, μηχανικός διαχωρισμός)
- 3) Την κατανομή μεταξύ 2 φάσεων (χρωματογραφικές τεχνικές)

ΓΕΝΙΚΗ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΤΕΧΝΙΚΗ
ΦΟΡΤΙΟ	1. Χρωματογραφία ιονανταλλαγής (ion exchange chromatography)
	2. Ηλεκτροφόρηση (electrophoresis)
	3. Ισοηλεκτρική εστίαση (isoelectric focusing)
ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ	1. Χρωματογραφία προσρόφησης (adsorption chromatography)
	2. Χρωματογραφία χάρτη (paper chromatography)
	3. Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (reverse-phase chromatography)
	4. Χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (hydrophobic interaction chromatography)
ΜΕΓΕΘΟΣ	1. Διαπίδυση (Dialysis)
	2. Ηλεκτροφόρηση πηκτής (gel electrophoresis)
	3. Χρωματογραφία διήθησης πηκτής (gel filtration chromatography)
	4. Υπερφυγοκέντριση (Ultracentrifugation)
ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ	1. Χρωματογραφία συγγένειας (Affinity chromatography)

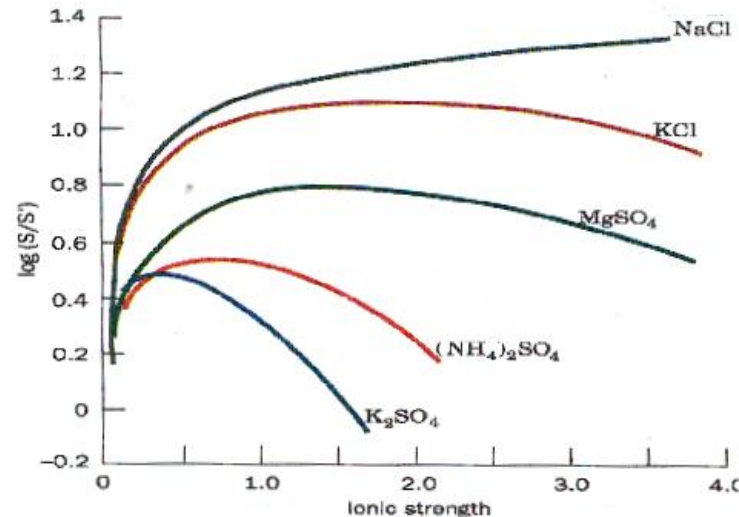
ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

- Εξαρτάται από τη συγκέντρωση αλάτων, πολικότητα διαλύτη, pH και θερμοκρασία
- Διαφέρει μεταξύ πρωτεϊνών (υπό τις ίδιες συνθήκες)

A. Επίδραση άλατος

- Σε διαλύματα χαμηλής ιονικής ισχύος η διαλυτότητα αυξάνει με τη συγκέντρωση του άλατος (εναλάτωση- salting in)
- Σε υψηλές τιμές ιονικής ισχύος η διαλυτότητα ελαττώνεται (εξαλάτωση- salting out)
- Με ρύθμιση της συγκέντρωσης του άλατος επιτυγχάνεται σταδιακός διαχωρισμός πρωτεϊνών
- Η εξαλάτωση – αρχικό στάδιο καθαρισμού πρωτεϊνών
- $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ – συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο αντιδραστήριο εξαλάτωσης (υψηλή διαλυτότητα, 3,9 M/ H_2O , 0 °C)
- Κατά την εξαλάτωση οι πρωτεΐνες διατηρούν τη φυσική τους δομή

$$\alpha = f \times C, \quad -\log f = Az^2\sqrt{\mu}, \quad f = 10^{-Az^2\sqrt{\mu}}$$
$$\mu = \frac{1}{2}(C_1 \times z_1^2 + C_2 \times z_2^2 + \dots)$$



Solubility of carboxy-hemoglobin at its isoelectric point as a function of ionic strength and ion type. Here S and S' are, respectively, the solubilities of the protein in the salt solution and in pure water. The logarithm of their ratios is plotted so that the solubility curves can be placed on a common scale. [After Green, A.A., *J. Biol. Chem.* 95, 47 (1932).]

ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

B. Επίδραση οργανικών διαλυτών

- Οργανικοί διαλύτες (ακετόνη, αιθανόλη, ακετονιτρίλιο κα) προκαλούν καταβύθιση πρωτεϊνών
- Τεχνική κλασμάτωσης πρωτεϊνών σε θερμοκρασία $< 0^{\circ}\text{C}$ (αποφυγή αποδιάταξης) βασίζεται στη διαφορετική διαλυτότητα πρωτεϊνών σε οργανικούς διαλύτες
- Εφαρμόζεται σε συνδυασμό με την εξαλάτωση

Γ. Επίδραση pH

- Οι πρωτεΐνες είναι πολυηλεκτρολύτες
- Μεγάλη διακύμανση τιμών pK
- Διαλυτότητα ελάχιστη σε τιμές pH πλησίον του pI (ισοηλεκτρικό σημείο) και δεν επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του άλατος
- **Τεχνική ισοηλεκτρικής καταβύθισης (isoelectric precipitation).** Το pH μίγματος πρωτεϊνών ρυθμίζεται στην τιμή pI της υπό διαχωρισμό ουσίας)
- Συνδυάζεται με την τεχνική εξαλάτωσης

THE ISOELECTRIC POINTS OF SEVERAL COMMON PROTEINS

Protein	Isoelectric pH
Pepsin	<1.0
Ovalbumin (hen)	4.6
Serum albumin (human)	4.9
Tropomyosin	5.1
Insulin (bovine)	5.4
Fibrinogen (human)	5.8
γ -Globulin (human)	6.6
Collagen	6.6
Myoglobin (horse)	7.0
Hemoglobin (human)	7.1
Ribonuclease A (bovine)	7.8
Cytochrome <i>c</i> (horse)	10.6
Histone (bovine)	10.8
Lysozyme (hen)	11.0
Salmine (salmon)	12.1

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

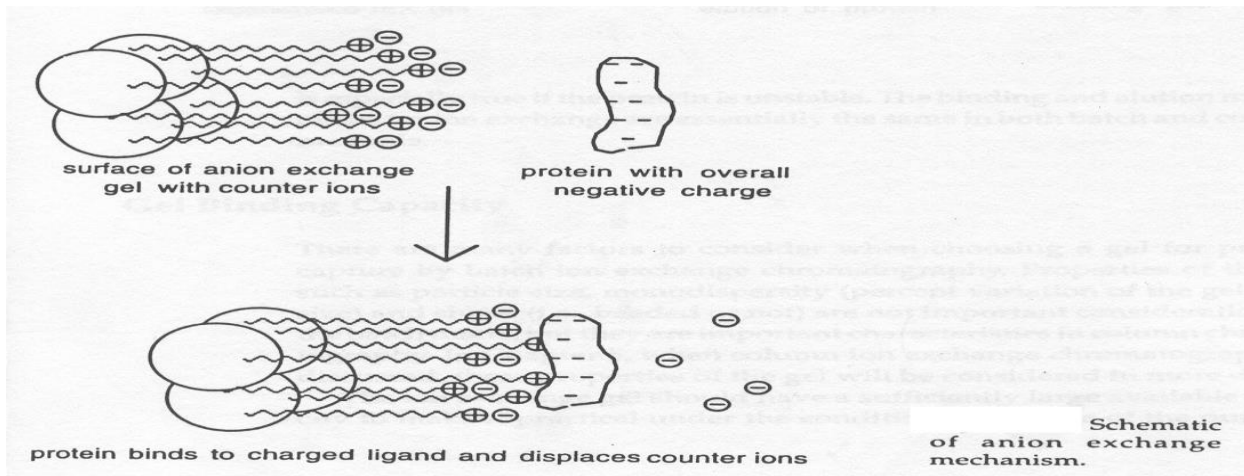
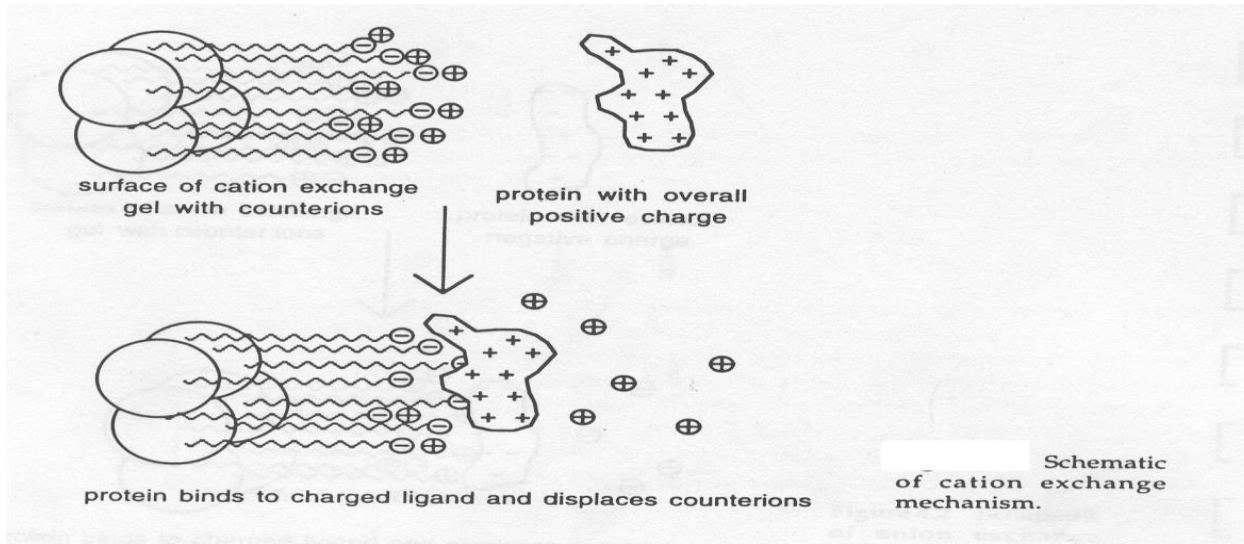
A. Χρωματογραφία ιονανταλλαγής



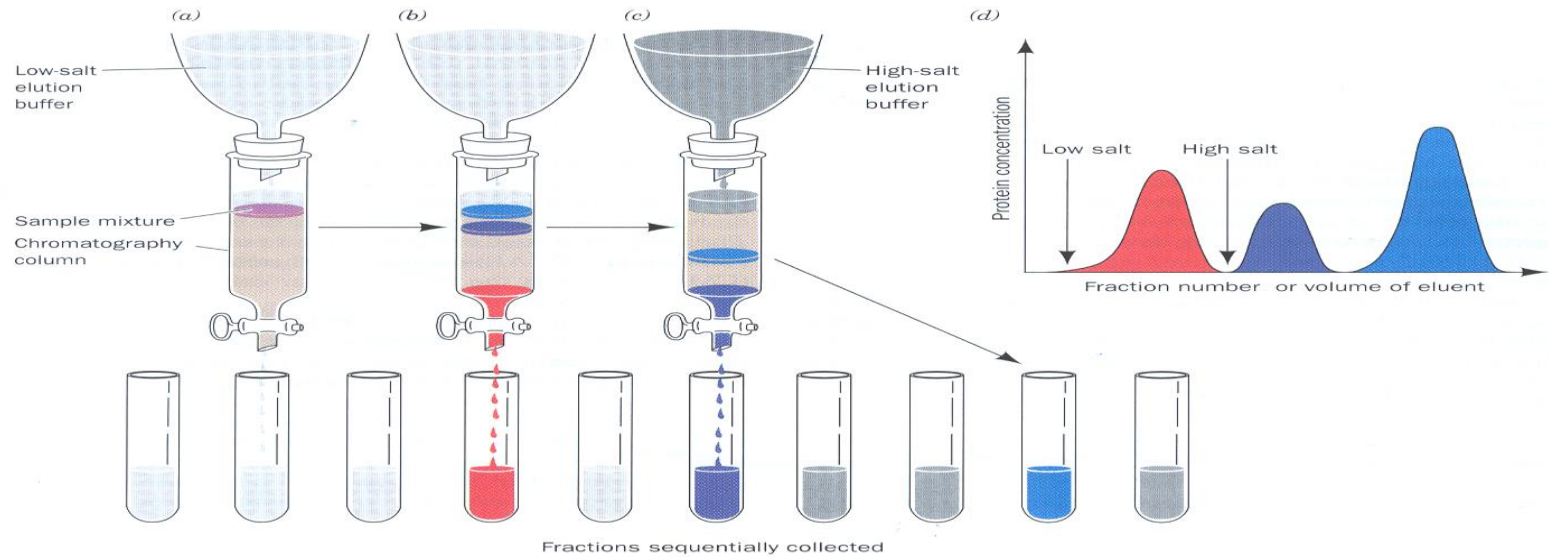
- Πρωτεΐνες-πολυηλεκτρολύτες (ανάλογα με το ολικό τους φορτίο μπορούν να συνδεθούν τόσο με ανιον- όσο και με κατιον-ανταλλακτικές ρητίνες)
- Η ικανότητα δέσμευσης τους εξαρτάται:
 - από το είδος και τη συγκέντρωση των άλλων αλάτων στο διάλυμα (ανταγωνιστική δράση)
 - από το pH

Στις δύο αυτές αρχές βασίζεται ο διαχωρισμός τους με τη χρωματογραφία ιονανταλλαγής

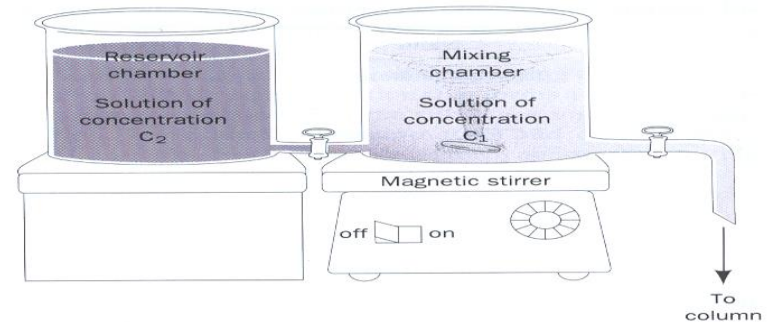
Χρωματογραφία ιονανταλλαγής



ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΟΝΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ



A schematic diagram illustrating the separation of several proteins by ion exchange chromatography using stepwise elution. Here the tan region of the column represents the ion exchanger and the colored bands represent the various proteins. (a) The protein mixture is bound to the topmost portion of the ion exchanger in the chromatography column. (b) As the elution progresses, the various proteins separate into discrete bands as a consequence of their different mobilities on the ion exchanger under the prevailing solution conditions. Here the first band of protein has passed through the column and been isolated as a separate fraction, whereas the remaining, less mobile, bands remain near the top of the column. (c) The salt concentration in the elution buffer is increased to elute the remaining bands. (d) The elution diagram of the protein mixture from the column.



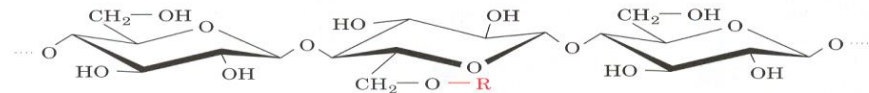
A device for generating a linear concentration gradient. Two connected open chambers, which have identical cross-sectional areas, are initially filled with equal volumes of solutions of different concentrations. As the solution of concentration c_1 drains out of the mixing chamber, it is partially replaced by a solution of concentration c_2 from the reservoir chamber. The concentration of the solution in the mixing chamber varies linearly from its initial concentration, c_1 , to the final concentration, c_2 , as is expressed by Eq. [5.2]

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΟΝΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ

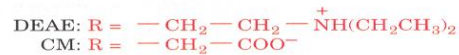
- Η διαδικασία έκλουσης βελτιώνεται σημαντικά με τη χρήση βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution)

Ιονανταλλάκτες

- Κυτταρίνη (πολυσακχαρίτης γλυκόζης)
- Πηκτές πολυακρυλαμιδίου, πολυδεξτράνης (πολυμερές γλυκόζης υπό επίδραση βακτηρίων)
 - Συνδυάζουν μηχανισμούς διαχωρισμού διήθησης πηκτής και ιονανταλλαγής
 - Έχουν μεγαλύτερη χωρητικότητα σε σχέση με αυτή της κυτταρίνης



Schematic diagram of cellulose-based ion exchangers.



SOME COMMONLY USED ION EXCHANGERS

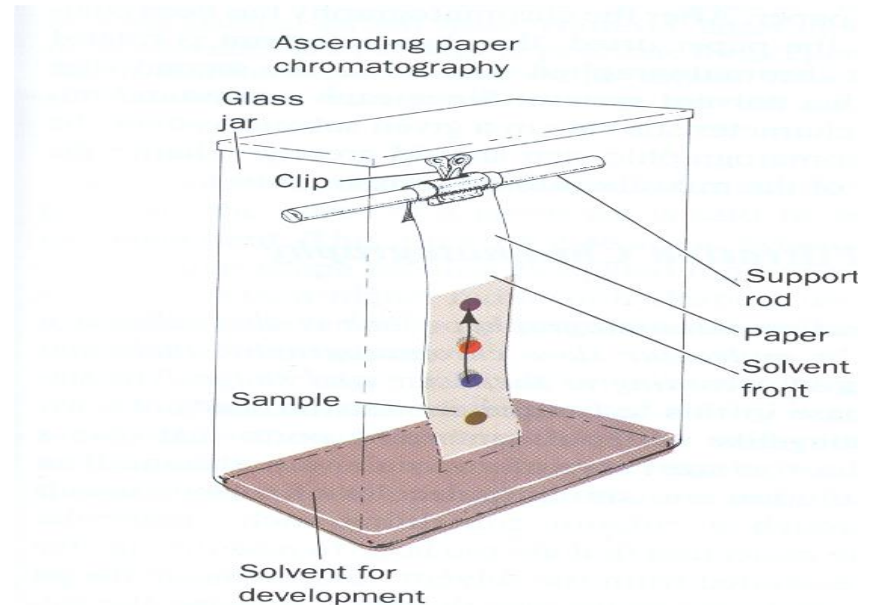
Name ^a	Type	Ionizable group	Remarks
DEAE-Cellulose	Basic	Diethylaminoethyl $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Used in fractionation of acidic and neutral proteins.
ECTEOLA-Cellulose	Basic	Mixed amines	Used for chromatography of nucleic acids.
CM-cellulose	Acidic	Carboxymethyl $-\text{CH}_2\text{COOH}$	Used for fractionation of basic and neutral proteins.
P-cellulose	Strongly and weakly acidic	$-\text{OPO}_3\text{H}_2$	Dibasic; binds basic proteins strongly.
DEAE-Sephadex	Basic cross-linked dextran gel	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Combined chromatography and gel filtration of acidic and neutral proteins.
CM-Sephadex	Acidic cross-linked dextran gel	$-\text{CH}_2\text{COOH}$	Combined chromatography and gel filtration of basic and neutral proteins.
Bio-Gel CM 100	Acidic cross-linked polyacrylamide gel	$-\text{CH}_2\text{COOH}$	Combined chromatography and gel filtration of basic and neutral proteins.

^a Sephadex gels are manufactured by Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden and Bio-Gels are manufactured by BioRad Laboratories, Richmond, California, USA.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΧΑΡΤΗ

Εμφάνιση χρωματογραφημάτων

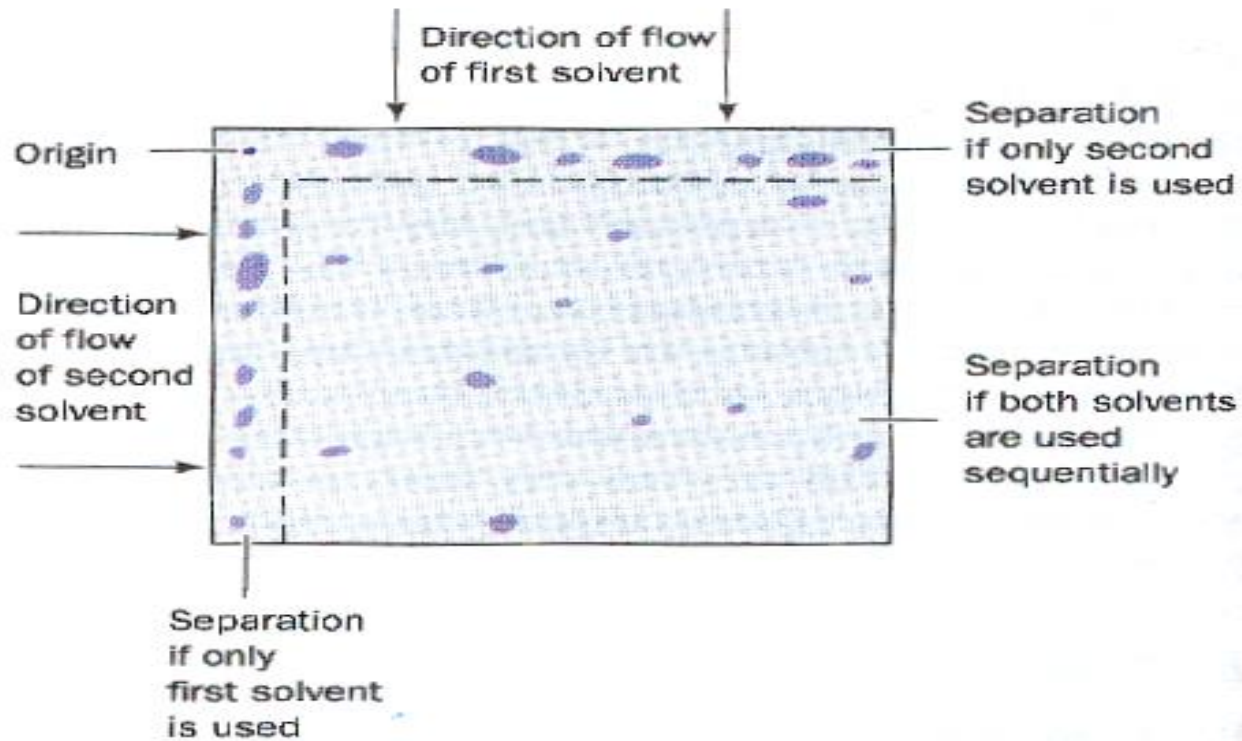
- Χρησιμοποίηση ραδιενεργών ιχνηθετών (σπάνια)
- Φθορισμός ή απόσβεση φθορισμού
- Σχηματισμός εγχρώμων ενώσεων (νινυδρίνη σχηματίζει προϊόντα πορφυρο-ιώδους χρώματος με πρωτοταγείς αμίνες και κίτρινου χρώματος με δευτεροταγείς



The experimental arrangement for chromatography.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΧΑΡΤΗ

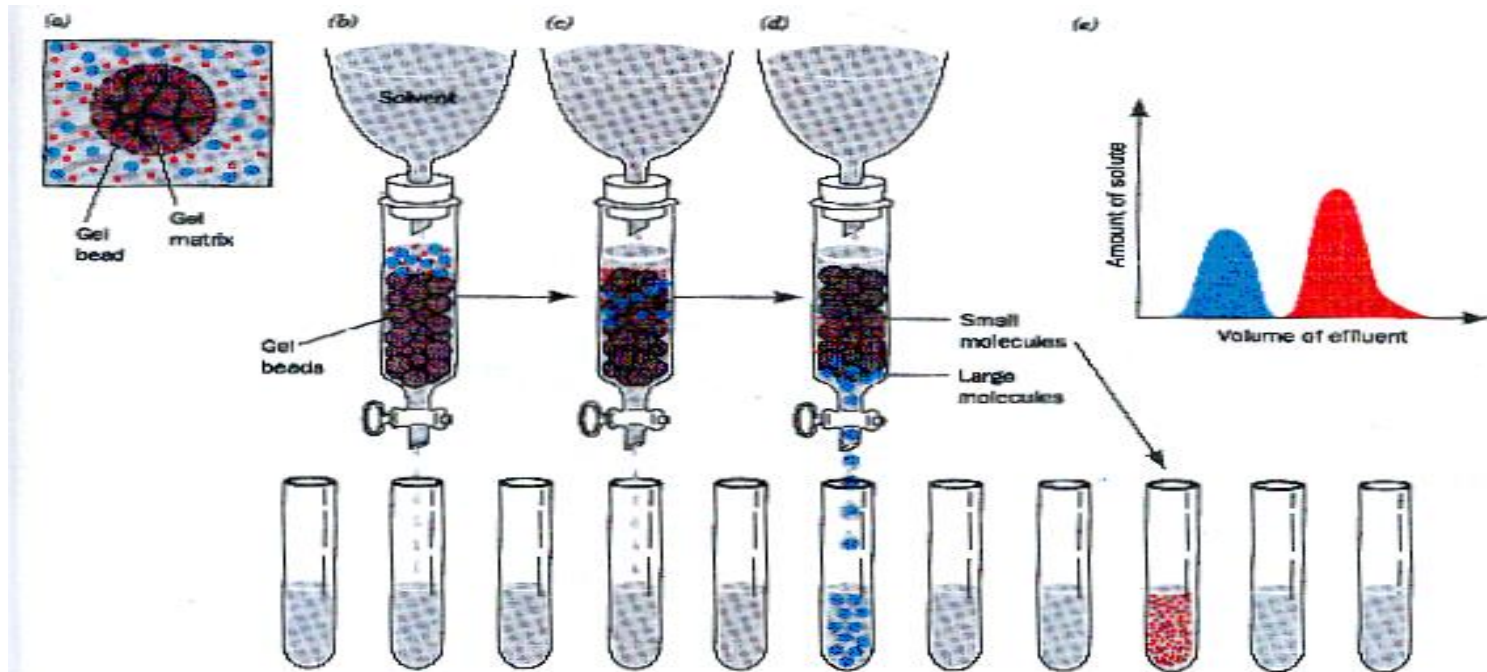
- Για σύνθετα μίγματα χρησιμοποιείται δισδιάστατη χρωματογραφία χάρτη



Two-dimensional paper chromatography.

Χρωματογραφία διήθησης πηκτής ή μοριακού αποκλεισμού (gel filtration chromatography, molecular exclusion liquid chromatography)

- Τα μόρια διαχωρίζονται βάση μεγέθους και σχήματος



A schematic illustration of gel filtration chromatography. (a) A gel bead, whose periphery is represented by a dashed line, consists of a gel matrix (wavy solid lines) that encloses an internal solvent space. Smaller molecules (small red dots) can freely enter the internal solvent space of the gel bead from the external solvent space. However, larger molecules (large blue dots) are too large to penetrate the gel pores. (b) The sample solution begins to enter the gel column (in which the gel beads are now represented by brown spheres). (c) The

smaller molecules can penetrate the gel and consequently migrate through the column more slowly than the larger molecules that are excluded from the gel. (d) The larger molecules emerge from the column to be collected separately from the smaller molecules, which require additional solvent for elution from the column. (e) The elution diagram of the chromatogram indicating the complete separation of the two components with the larger component eluting first.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΠΗΚΤΗΣ

Η συμπεριφορά ενός μορίου κατά τη διέλευση του μέσα από τη στήλη πηκτής μπορεί να εκτιμηθεί ποσοτικά

- V_o - όγκος κινητής φάσης ή κενός όγκος (void volume)
- V_t - ολικός όγκος στήλης
- $(V_t - V_o)$ - όγκος διαλύτη στη στατική φάση
- V_e - όγκος έκλουσης αναλύτη
- K_{av} - μέσος συντελεστής κατανομής

$$K_{av} = \frac{V_R - V_o}{V_t - V_o}$$

- Για μεγάλα μόρια που δεν εισέρχονται στο δίκτυο της πηκτής $V_R = V_o$ και επομένως $K_{av} = 0$
- Για ένα μικρό μόριο που διεισδύει ελεύθερα σε όλο το δίκτυο της πηκτής, $V_R \simeq V_t$ και $K_{av} \simeq 1$, όπου V_R - **όγκος συγκράτησης (ανάσχεσης)**
- Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους $0 < K_{av} < 1$
- Ο κενός όγκος (V_o) προσδιορίζεται με διαβίβαση αδρανούς μεγαλομορίου (κυανό δεξτράνης 2000, MB 2×10^6) και μέτρηση του όγκου συγκράτησης (V_R)
- Ο ολικός όγκος υπολογίζεται από τις διαστάσεις της στήλης,
 $V_t = \pi r^2 \times \text{μήκος στήλης}$
- V_e / V_o - σχετικός όγκος έκλουσης, χαρακτηριστικός για κάθε αναλύτη και ανεξάρτητος του μεγέθους της στήλης
- Μηχανισμός διαχωρισμού (σε ιδανικές συνθήκες)- διείσδυση μικρομορίων στο πορώδες σύμπλεγμα της πηκτής
- Στην πράξη, λαμβάνει χώρα και προσρόφηση

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΠΗΚΤΗΣ

Στατικές φάσεις:

Υδροφιλες πηκτές από διακλαδούμενα πολυμερή:

- δεξτράνης (Sephadex G) (προϊόντα πολυμερισμού γλυκόζης, παράγονται παρουσία βακτηριδίων)
- αγαρόζης (Sephacrose B) (προϊόντα πολυμερισμού γαλακτόζης)
- πολυακρυλαμιδίου (Bio-Gel P)
 - Πηκτές δεξτράνης και πολυακρυλαμιδίου παραγωγοποιούνται με ομάδες DEAE και CM.
 - Ο διαχωρισμός ουσιών σε αυτού του είδους στατικές φάσεις είναι συνάρτηση τόσο του φορτίου όσο και του μεγέθους του αναλύτη.

Εφαρμογές:

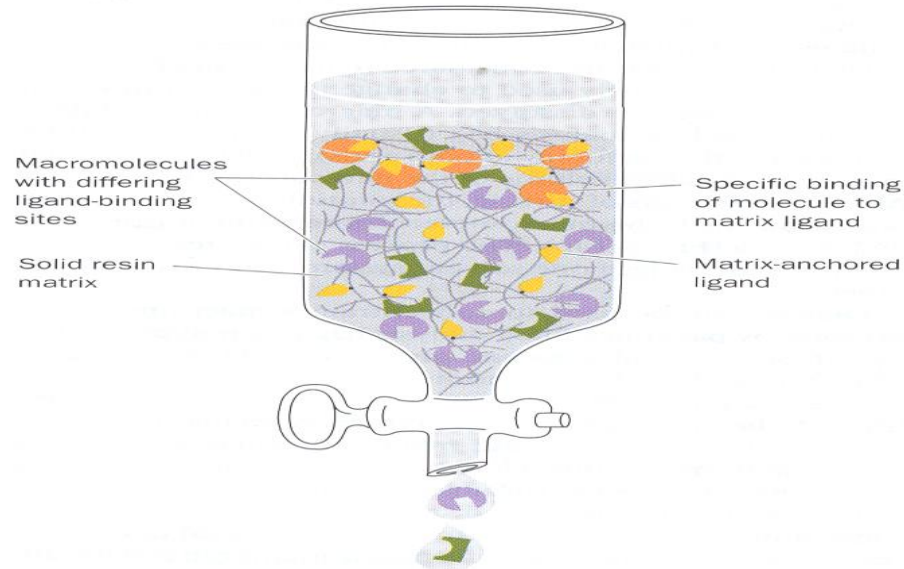
- Διαχωρισμός μειγμάτων μεγαλομορίων (πρωτεΐνες, πεπτίδια, νουκλεϊνικά οξέα, πολυσακχαρίτες, ένζυμα, ορμόνες κλπ)
- Αφαλάτωση διαλυμάτων μακρομορίων
- Αλλαγή συστατικών ρυθμιστικού διαλύματος
- Προσδιορισμός μοριακών βαρών μακρομορίων

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ (Affinity Chromatography)

Αξιοποιείται η ικανότητα ειδικής μη ομοιοπολικής δέσμευσης πρωτεϊνών με ορισμένα μόρια (υποκαταστάτες)

Οι υποκαταστάτες συνδέονται ομοιοπολικά με τη στατική φάση- υλικό χημικά αδρανές, με μεγάλο μέγεθος πόρων και μεγάλο αριθμό χαρακτηριστικών ομάδων

Μεγάλο πλεονέκτημα- αξιοποίηση μοναδικών ιδιοτήτων των μακρομορίων σε αντίθεση με τις μικρές διαφορές φυσικοχημικών ιδιοτήτων μεταξύ μορίων που αξιοποιούνται σε άλλες τεχνικές



The separation of macromolecules by affinity chromatography. The cutout squares, semicircles, and triangles are schematic representations of ligand-binding sites on macromolecules. Only those ligand-binding sites represented by the orange circles with triangle cutouts specifically bind to the chromatographic matrix-anchored ligands (yellow).

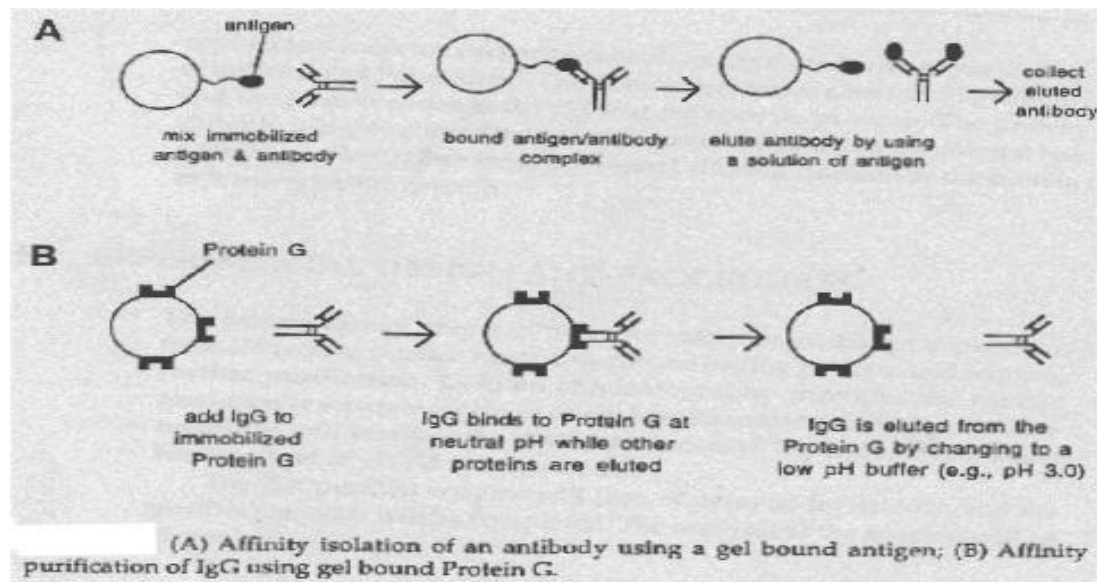
Έκλουση: Με αλλαγή pH του υγρού έκλουσης, ιονικής ισχύος, προσθήκη ένωσης που σχηματίζει ισχυρότερους δεσμούς με τον υποκαταστάτη, θερμοκρασία

Προσοχή στις συνθήκες έκλουσης- μπορούν να προκαλέσουν αποδιάταξη πρωτεϊνών

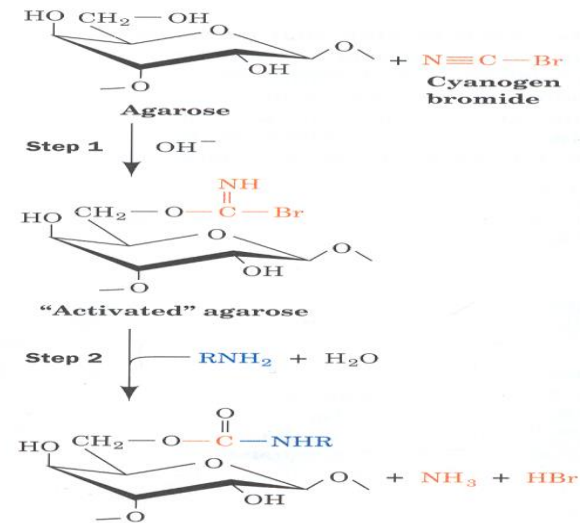
Εφαρμογές: απομόνωση ενζύμων (με υποστρώματα), αντισωμάτων (με αντιγόνα), υποδοχέων ορμονών (ινσουλίνη), μεμβρανών, ακόμη και κυττάρων

Μεγάλο πλεονέκτημα- απλοποίηση σχημάτων διαχωρισμού και μεγαλύτερες αποδόσεις

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ (Affinity Chromatography)



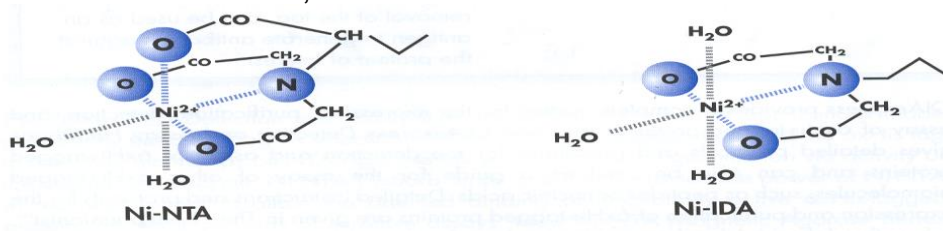
• Η παραγωγοποίηση της αγαρόζης με τους κατάλληλους υποκαταστάτες γίνεται συνήθως σε δύο στάδια σύμφωνα με το σχήμα



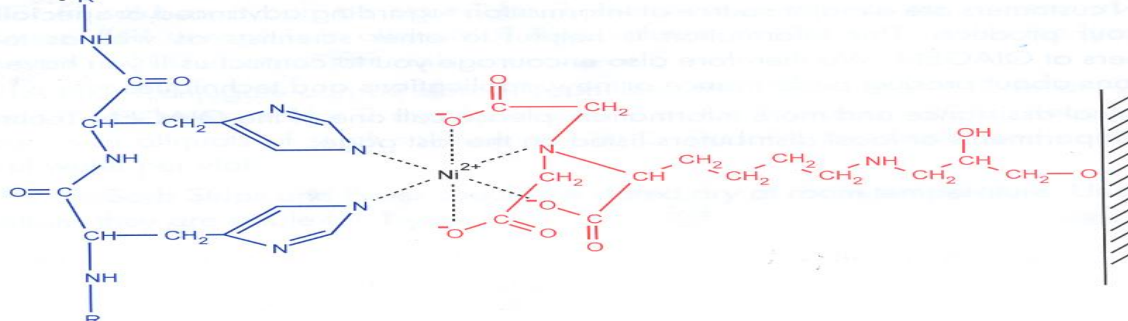
The formation of cyanogen bromide-activated agarose (*top*) and its reaction with a primary amine to form a covalently attached ligand for affinity chromatography (*bottom*).

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΜΕΤΑΛΛΟΥ

- ΙΔΙΑΙΤΕΡΗ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ
- Η ΣΥΝΔΕΣΗ ΔΕΝ ΕΙΝΑΙ ΒΙΟΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗ ΚΑΙ ΒΑΣΙΖΕΤΑΙ ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΑΣΘΕΝΩΝ ΕΤΕΡΟΠΟΛΙΚΩΝ ΔΕΣΜΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΙΟΝΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ (ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΣΕ ΣΤΕΡΕΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ) ΚΑΙ ΤΩΝ ΒΑΣΙΚΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ, ΚΥΡΙΩΣ ΙΣΤΙΔΙΝΩΝ
- ΣΤΕΡΕΑ ΦΑΣΗ- ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΕΝΟΙ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ (ΑΓΑΡΟΖΗ)
- ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΕΣ-ΙΜΙΝΟΔΙΟΞΕΙΚΟ ΟΞΥ, ΝΙΤΡΙΛΟΤΡΙΟΞΕΙΚΟ ΟΞΥ



ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΝΙΤΡΙΛΟΤΡΙΟΞΕΙΚΟΥ ΚΑΙ ΙΜΙΝΟΔΙΟΞΕΙΚΟΥ ΟΞΕΩΝ ΜΕ ΙΟΝΤΑ ΝΙΚΕΛΙΟΥ



ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΓΕΙΤΟΝΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΙΣΤΙΔΙΝΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΗ Ni-NTA ΑΓΑΡΟΖΗ

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΜΕΤΑΛΛΟΥ



ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΦΕΡΟΥΝ ΟΜΑΔΕΣ ΙΣΤΙΔΙΝΩΝ.

- ΕΑΝ Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ **A** ΕΙΝΑΙ ΑΣΘΕΝΗΣ – ΔΕΝ ΥΠΑΡΧΕΙ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ
- ΕΑΝ Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ **A** ΕΙΝΑΙ ΙΣΧΥΡΗ ΕΝΩ Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ **B** ΑΣΘΕΝΗΣ – ΑΠΩΛΕΙΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΛΟΓΩ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΗ-ΙΟΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΚΠΛΥΣΗ
- ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΝΤΑ ΚΑΙ ΝΙΚΕΛΙΟΥ ΟΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΕΙΝΑΙ ΑΡΚΕΤΑ ΙΣΧΥΡΕΣ ΩΣΤΕ ΝΑ ΕΠΙΤΕΥΧΘΕΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

ΑΛΛΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ

- Τα μόρια κατακρατούνται με φυσική προσρόφηση (δυνάμεις van der Waals (έλξη-απώθηση μεταξύ διπόλων, δεσμοί υδρογόνου) στην επιφάνεια αδιάλυτων ουσιών, όπως:
 - alumina (Al_2O_3)
 - γη διατόμων (πυριτικά απολιθώματα μονοκύτταρων οργανισμών)
 - σακχαρόζη (sucrose)
 - πυριτικό οξύ (silica gel)
- Εκλουση: οργανικοί διαλύτες ή μίγματα τους (χλωροφόρμιο, εξάνιο, διαιθυλαιθέρας)
- Μηχανισμός διαχωρισμού – Κατανομή μεταξύ πολικής στατικής φάσης και μη πολικής κινητής φάσης
- Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μη πολικών ενώσεων

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ (Thin-Layer Chromatography, TLC)

- *Στατική φάση* – επιστρωμένη σε στερεά υλικά (ύαλος, πλαστικό κλπ)
- *Υλικό στατικής φάσης* – ιονανταλλάκτες, υδρόφιλες πηκτές, φυσικά προσροφητικά υλικά
- *Μηχανισμός διαχωρισμού* – ποικίλλει ανάλογα με τη φύση της στατικής φάσης και το διαλύτη
- Τεχνική διαχωρισμού ρουτίνας για οργανικά μόρια

ΑΛΛΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

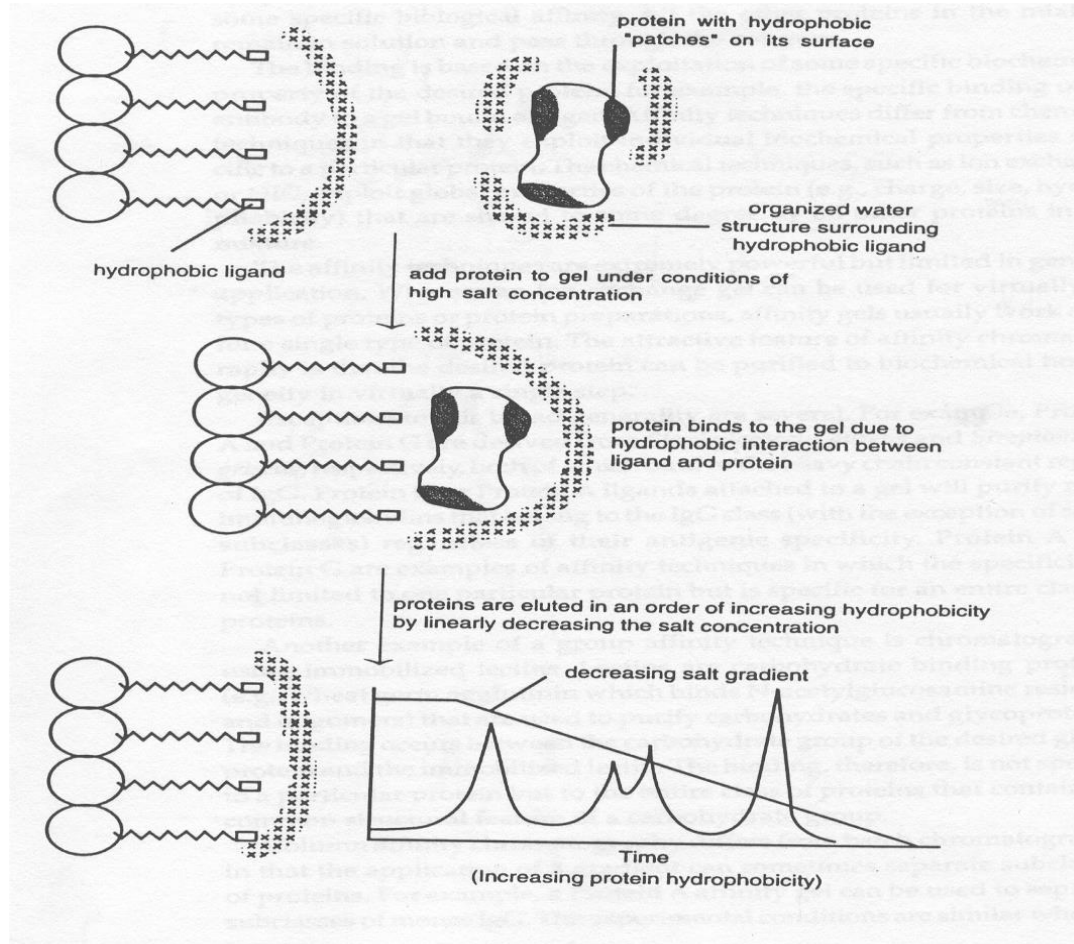
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ (Reverse phase chromatography, RPC)

- Υγρή-υγρή χρωματογραφία κατανομής με μη πολική στατική φάση (ακίνητοποιημένη σε στερεό αδρανές υπόστρωμα) και πολική κινητή φάση
- Πρώτες εφαρμογές - στο διαχωρισμό μίγματος μη πολικών ενώσεων, όπως λιπίδια
- Αποτελεσματική τεχνική για το διαχωρισμό και πολικών ενώσεων δεδομένου ότι διαθέτουν μη πολικές ομάδες, όπως ολιγονουκλεοτίδια και πρωτεΐνες
- Κίνδυνος αποδιάταξης πρωτεϊνών

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΔΡΟΦΟΒΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ (HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY, HIC)

- Βασίζεται, όπως και η RPC στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις
- Σε αντίθεση με την RPC (με ισχυρά υδρόφοβο χαρακτήρα) που προκαλεί αποδιάταξη πρωτεϊνών, στην HIC η στατική φάση είναι υδρόφιλη πηκτή αгарόζης μερικώς υποκατεστημένη με υδρόφοβες ομάδες (οκτυλο-, φαινυλο- υποκαταστάτες)
- Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι σχετικά ασθενείς και οι πρωτεΐνες διατηρούν τη φυσική τους κατάσταση
- Υγρά έκλουσης – υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα μειούμενης συγκέντρωσης άλατος (οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις αυξάνουν με την αύξηση της ιονικής ισχύος, αύξηση της συγκέντρωσης επιφανειοδραστικών και ελάττωση pH)
- Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάση του βαθμού της επιφανειακής τους υδροφοβικότητας

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΔΡΟΦΟΒΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ (HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY, HIC)



Mechanism for protein binding in HIC.

ΑΛΛΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

- **ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HIGH - PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, HPLC)**
- *Μηχανισμοί διαχωρισμού* – προσρόφηση, ιονανταλλαγή, μοριακού αποκλεισμού, HIC, RPC
- Σημαντική βελτίωση διαχωρισμών με τη χρήση στηλών υψηλής διαχωριστικής ικανότητας
- Σημαντική ελάττωση των χρόνων ανάλυσης ουσιών
- Η κινητή φάση προωθείται μέσω πυκνά πληρωμένων στηλών υπό πίεση που φτάνει τα 5.000 psi

1psi (pounds per square inch) = 0,068 atm

1MPa (Mega Pascal), 1 atm = 101,325 Pa

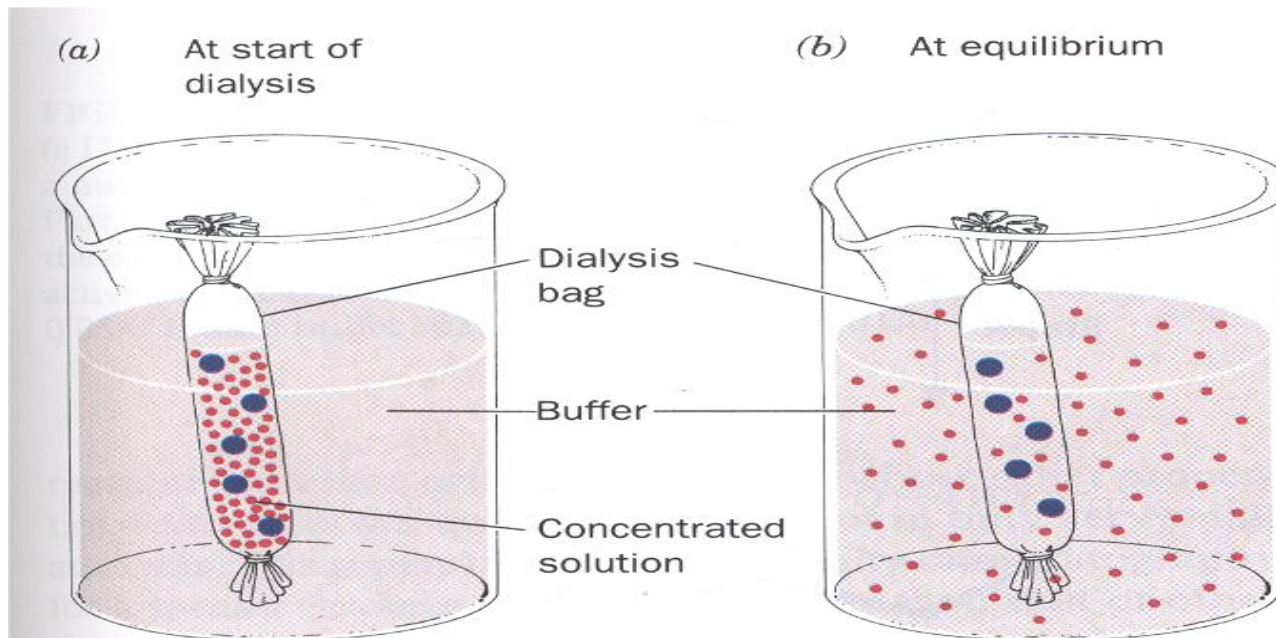
1 Pa = 0,145 psi

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

- ΥΨΗΛΗ ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ
- ΜΕΓΑΛΗ ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΩΝ
- ΥΨΗΛΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (< pmol)
- ΕΥΚΟΛΙΑ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ (Dialysis) μορφή μοριακής διήθησης

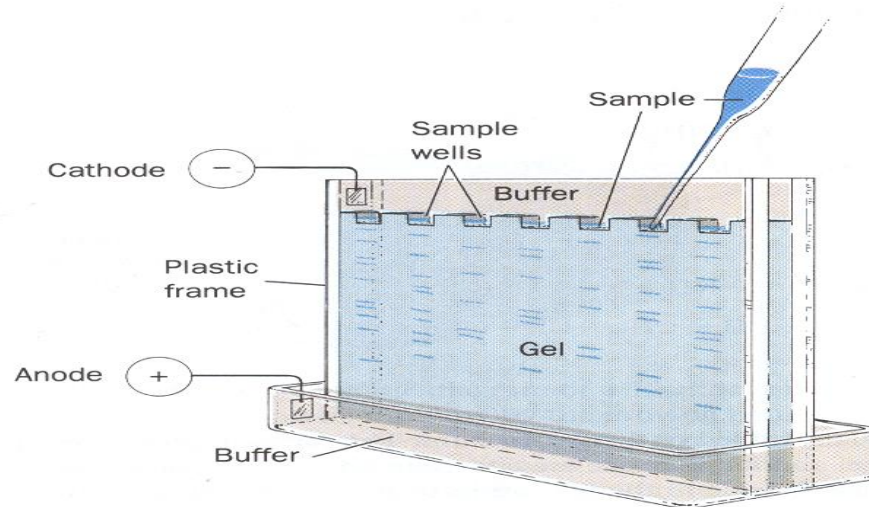
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για συμπύκνωση διαλυμάτων (με το πολυμερές ξηραντικό πολυαιθυλογλυκόλη)
- Ανάλογη τεχνική για το διαχωρισμό ή συμπύκνωση διαλυμάτων μακρομορίων είναι η υπερδιήθηση



The separation of small and large molecules by dialysis. (a) Only small molecules can diffuse through the pores in the bag. (b) At equilibrium the concentrations of small molecules are nearly the same inside and outside the bag, whereas the macromolecules remain in the bag.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

- Τεχνική διαχωρισμού που βασίζεται στη μετανάστευση ιόντων εντός ηλεκτρικού πεδίου
- Η ταχύτητα μετανάστευσης είναι συνάρτηση μάζας και φορτίου



Apparatus for slab gel electrophoresis.
Samples are applied in slots that have been cast in the top of the gel and electrophoresed in parallel lanes.

Είδη ηλεκτροφόρησης:

- Χάρτη
- Πηκτής ακρυλαμιδίου
- Ισοηλεκτρικής εστίασης
- Τριχοειδής

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ – ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ - ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

Σχηματισμός έγχρωμων προϊόντων των πρωτοταγών και δευτεροταγών αμινομάδων με σειρά αντιδραστηρίων, όπως

- **Νινυδρίνη** (κυανό ή κυανοιώδες χρώμα – εμφάνιση χρωματογραφημάτων)
- **Νινυδρίνη-Κολλιδίνη** (χρωματική διάκριση διαφόρων αμινοξέων – αργινίνη (ιώδες χρώμα), προλίνη (κίτρινο), τυροσίνη (κυανό)
- **Αντιδραστήριο Pauly** (σουλφανιλικό οξύ-νιτρώδες νάτριο) – ανίχνευση τυροσίνης και ιστιδίνης (ερυθρό χρώμα)
- **Αντιδραστήριο Ehrlich** (π-διμεθυλαμινοβενζαλδεΰδη σε HCl και ακετόνη) – ανίχνευση τρυπτοφάνης (πορφυρό χρώμα)

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

- Μέτρηση απορρόφησης στα 280 nm (υπολογισμός συγκέντρωσης βάσει του συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας της πρωτεΐνης, ϵ , και της απορρόφησης)
- Η απλούστερη μη καταστρεπτική για τις πρωτεΐνες μέθοδος ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών

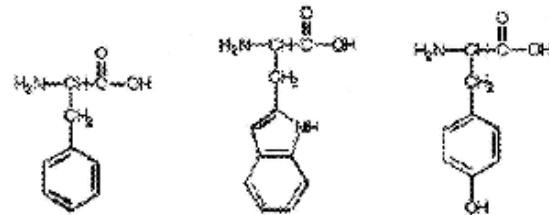
$$A = \epsilon b C, \quad C \text{ (mol/l)} = A/\epsilon b$$

ή

$$A = \alpha \text{ (ml mg}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times b \times C, \quad C \text{ (mg/ml)} = A/\alpha b$$

- Αν η α δεν είναι γνωστή, τότε ποιοτική εκτίμηση της ποσότητας της πρωτεΐνης γίνεται βάσει της σχέσης

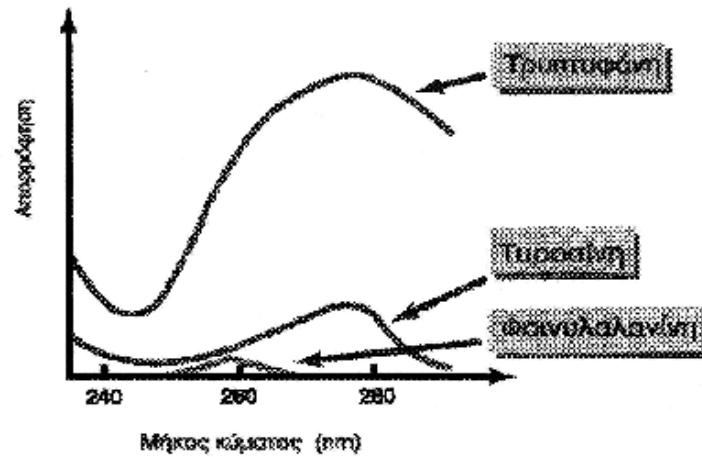
$$C \text{ (mg/ml)} = A_{280}$$



Φαινυλαλανίνη

Τρυπτοφάνη

Τυροσίνη



Χαρακτηριστικά της απορρόφησης των αρωματικών αμινοξέων.

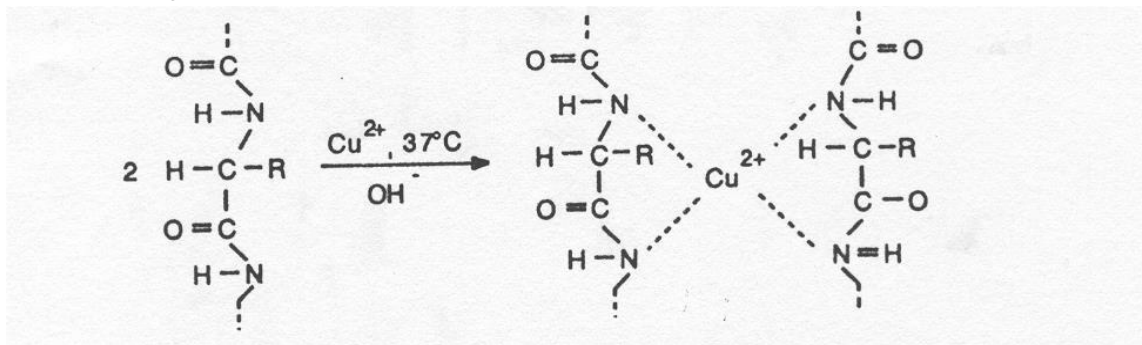
Αμινοξύ	Χρωμοφόρος ομάδα	$\lambda(\max)$ (nm)	ϵ ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
Φαινυλαλανίνη	Βενζολικός δακτύλιος	257	0.22
Τυροσίνη	Φαινόλη	274	1.44
Τρυπτοφάνη	Ινδόλιο	280	5.05

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ – ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ - ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

- **Μέθοδος Biuret** (αντίδραση ειδική για πεπτιδικούς δεσμούς)

Αντιδραστήριο διουρίας: $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ – τρυγικό κάλιο-νάτριο σε διάλυμα NaOH και KI – (πορφυρό χρώμα, λόγω σχηματισμού συμπλόκου του χαλκού με δύο πεπτιδικές αλυσίδες, μέτρηση απορρόφησης στα 540nm)



- **Μέθοδος Lowry** (τροποποίηση της μεθόδου Biuret)

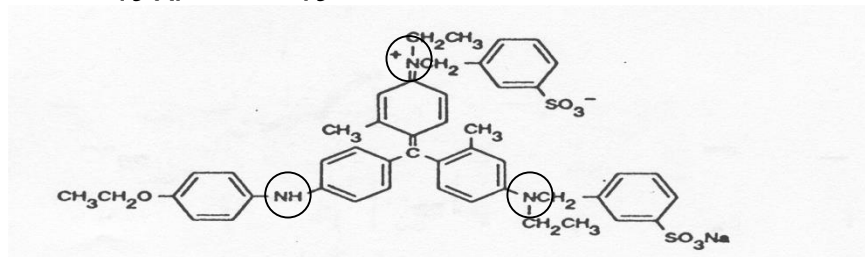
Στο παραπάνω σύμπλοκο της διουρίας προστίθεται το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ σε διάλυμα H_3PO_4 και HCl) – σχηματισμός προϊόντος ερυθρο-κυανού χρώματος ($A=600 \text{ nm}$).

100 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τη μέθοδο Biuret (γραμμική περιοχή, 20-400 $\mu\text{g/ml}$)

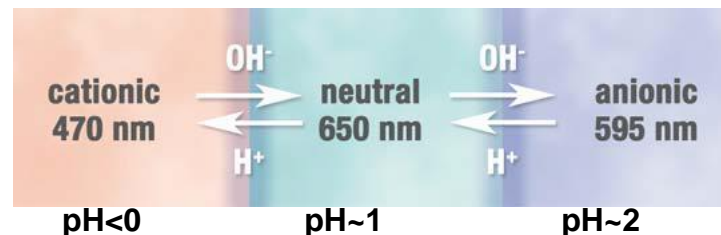
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ – ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ - ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

- Μέθοδος Bradford

Βασίζεται στο σχηματισμό κυανού ($\lambda = 595 \text{ nm}$) προϊόντος μεταξύ της χρωστικής ουσίας Coomassie Brilliant Blue G-250 και της πρωτεΐνης μέσω θετικών φορτίων της πρωτεΐνης και των αρνητικών φορτίων της χρωστικής



Η χρωστική υπάρχει σε τρεις μορφές (ανιονική, κατιονική και ουδέτερη ανάλογα με το pH του διαλύματος:

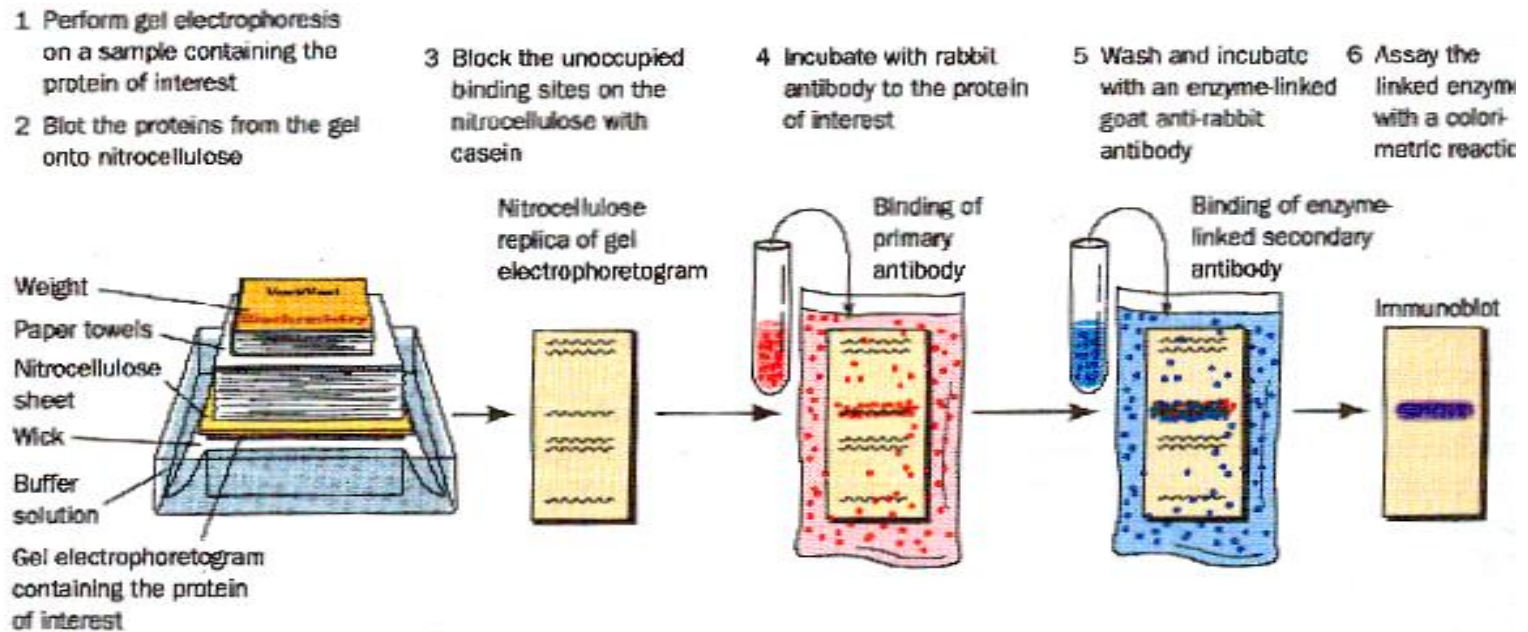


Η σύνδεση της πρωτεΐνης με τη χρωστική προκαλεί μετατόπιση της ισορροπίας προς τα δεξιά σταθεροποιώντας την κυανή ανιονική μορφή της χρωστικής. (Περιοχή γραμμικότητας 20-140 $\mu\text{g/ml}$ και 1-20 $\mu\text{g/ml}$)

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ – ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ - ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

- Μέτρηση βιολογικής δραστηρότητας πρωτεϊνών (ενζύμων)
- Μέθοδοι βασιζόμενες στην εξειδικευμένη δράση πρωτεϊνών με άλλα μόρια

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ ΚΑΤΑ WESTERN



The detection of proteins by immunoblotting.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ – ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ - ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

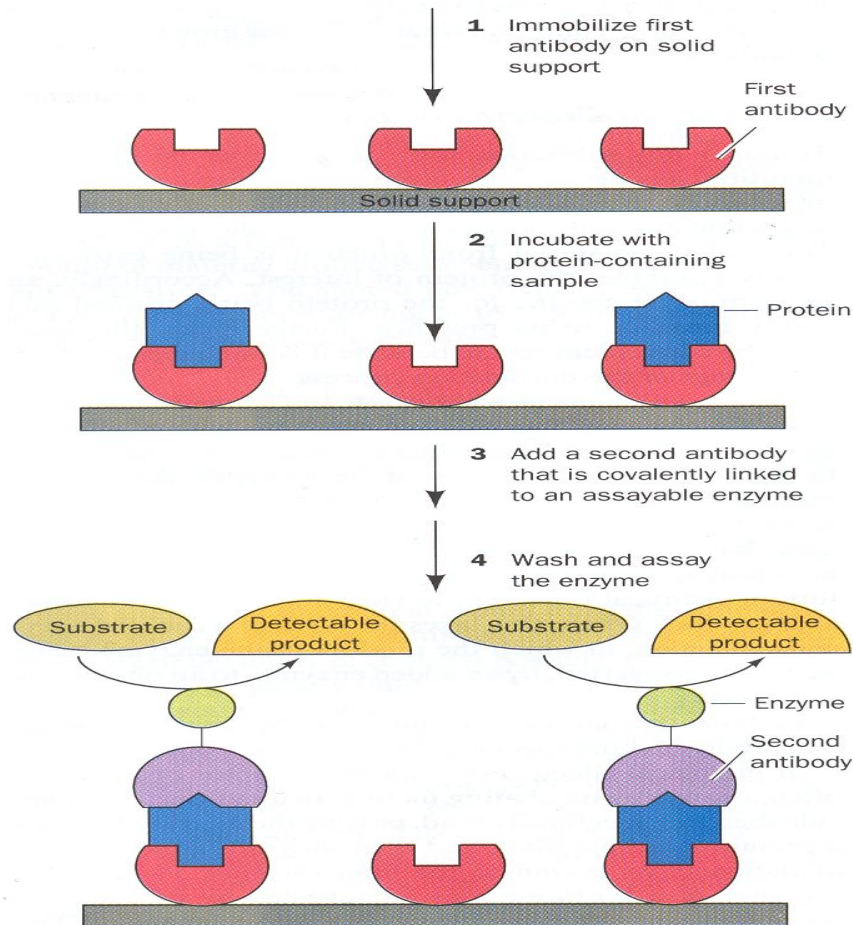
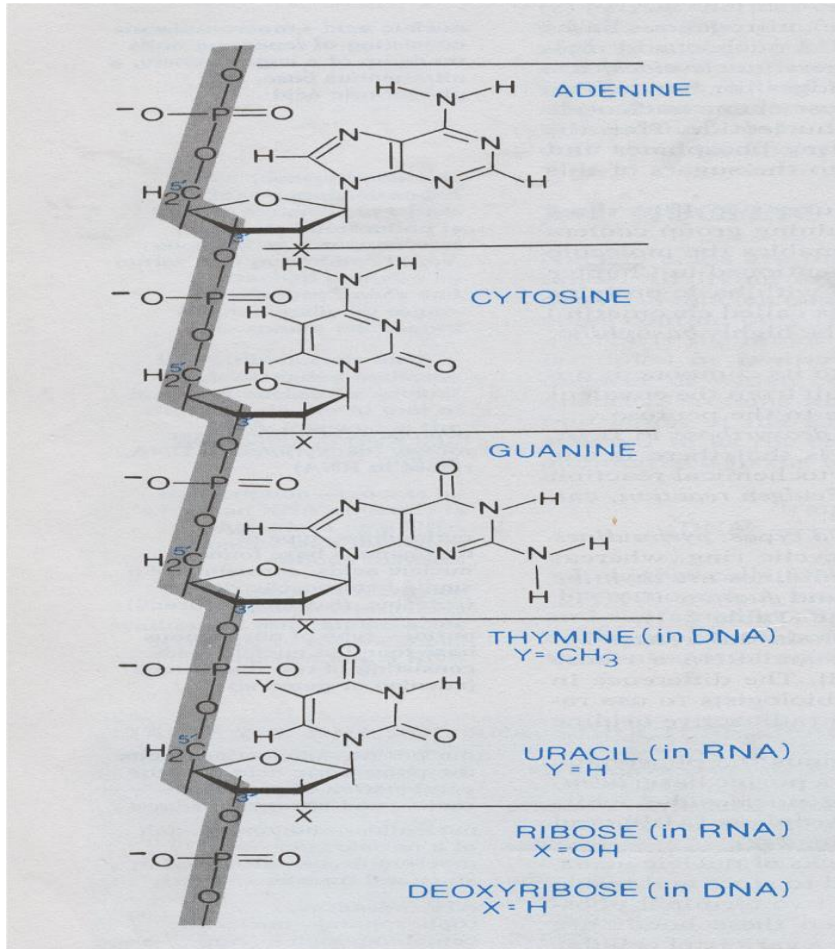
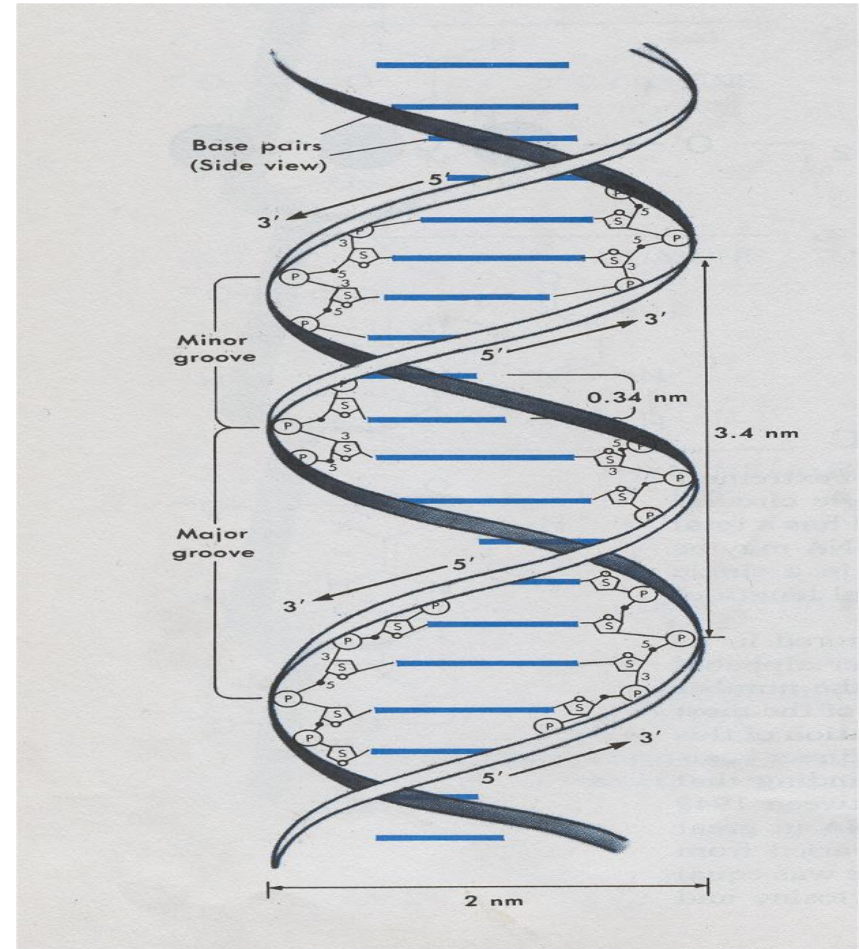


FIGURE 5-1. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ (DNA, RNA)

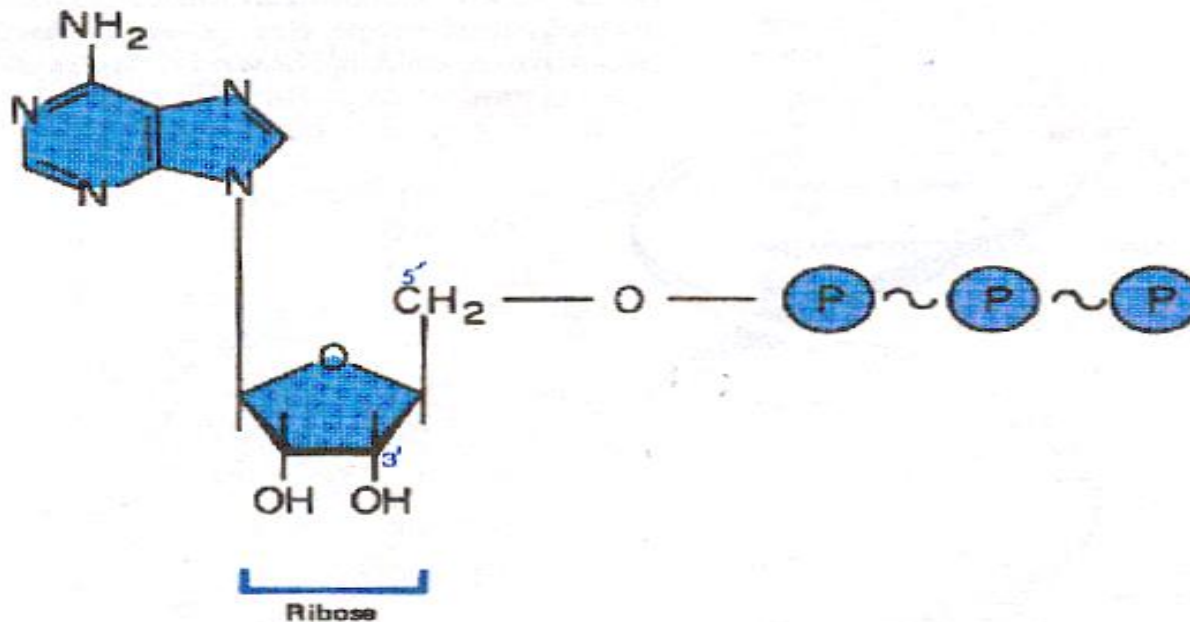
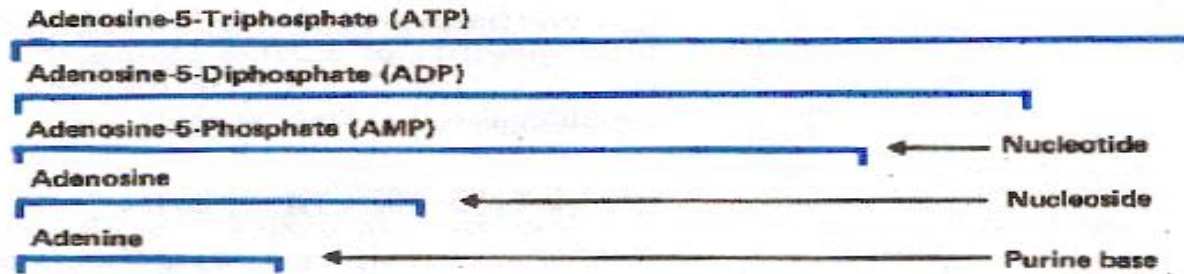


Τμήμα κλώνου υποθετικής αλυσίδας DNA



Διπλή έλικά DNA

ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΑ ΟΞΕΑ (DNA, RNA)



Δομή της τριφωσφορικής αδενοσίνης και των επιμέρους τμημάτων της

ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΑ ΟΞΕΑ (DNA, RNA)

DNA και RNA: Δομή, Αντιδράσεις και Ρόλος στο κύτταρο

	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ	Ριβονουκλεϊκό οξύ
Τοποθεσία	Κυρίως στον πυρήνα; Επίσης, μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες	Κυτταρόπλασμα, πυρηνίσκος, χρωμοσώματα
Βάσεις πυριμιδίνης	Κυτοσίνη Θυμίνη	Κυτοσίνη Ουρακίλη
Βάσεις πουρίνης	Αδενίνη γουανίνη	Αδενίνη γουανίνη
Πεντόζη	δεοξυριβόζη	ριβόζη
Κυτταροχημική αντίδραση	Feulgen	Βασεόφιλες χρωστικές και κατεργασία με ριβονουκλεάσες
Ένζυμα (υδρολυτικά)	Δεοξυριβονουκλεάση (DNAse)	Ριβονουκλεάση (RNAse)
Ρόλος στο κύτταρο	Γενετική πληροφορία	Σύνθεση πρωτεϊνών

ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ (DNA, RNA)

- Οι περισσότερες μέθοδοι απομόνωσης πρωτεϊνών με κάποιες τροποποιήσεις χρησιμοποιούνται και για την κλασμάτωση των νουκλεϊνικών οξέων
- Υπάρχουν και τεχνικές που χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για την απομόνωση και προσδιορισμό των νουκλεϊνικών οξέων

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

- Λύση κυττάρων
- Τα νουκλεϊνικά οξέα εντός κυττάρων βρίσκονται συνδεδεμένα με πρωτεΐνες
Αποπρωτεΐνωση νουκλεϊκών οξέων – εκχύλιση με μίγμα φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης
- **Υδατική στοιβάδα** – νουκλεϊνικά οξέα
- **Οργανική στοιβάδα** – πρωτεΐνες (αποδιαταγμένες)
- **Φυγοκέντρωση**
- **Καταβύθιση με αιθανόλη (ή ισοπροπανόλη)**
- **Παραλαβή RNA** μετά από κατεργασία με DN-άση
- **Παραλαβή DNA** μετά από κατεργασία με RN-άση
- **Εναλλακτικά- διαχωρισμός RNA-DNA με υπερφυγοκέντρωση**

ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ (DNA, RNA)

- **ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ** – ευπαθή στη δράση νουκλεασών

Μέτρα προστασίας:

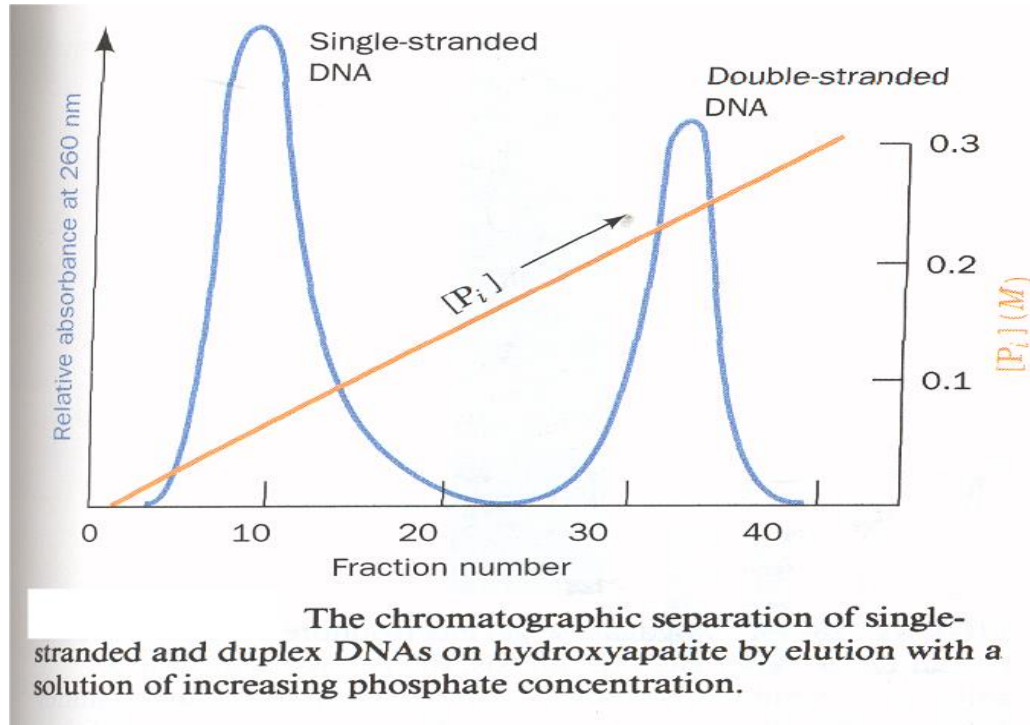
- Προσθήκη EDTA στα διαλύματα (δέσμευση δισθενών ιόντων απαραίτητων για τη δράση νουκλεασών)
- Αποστείρωση σκευών, χρήση πλαστικών γαντιών

- **ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ**

Συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές:

- HPLC αντίστροφης φάσης
- Χρωματογραφία ιονανταλλαγής και διήθησης πηκτής (για μεγαλύτερα μόρια)
Υδροξυαπατίτης, ΥΑ (μορφή φωσφορικού ασβεστίου)
- Πολύ χρήσιμος για το χρωματογραφικό διαχωρισμό του DNA
- Δεσμεύει ισχυρότερα δίκλωνο DNA από άλλα μόρια
- **Κυτταρόλυμα** διαβιβάζεται από στήλη ΥΑ
- **Έκπλυση** με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών χαμηλής συγκέντρωσης-απομάκρυνση RNA και πρωτεϊνών
- **Έκλυση** μονόκλωνου και δίκλωνου DNA με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αυξανόμενης συγκέντρωσης

ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΑ ΟΞΕΑ (DNA, RNA)



Θερμική χρωματογραφία – τεχνική διαχωρισμού μορίων DNA ανάλογα με τη σύσταση των βάσεων

- Αρχικά έκλυση μονόκλωνου DNA
- Σταδιακή αύξηση θερμοκρασίας στήλης – τήξη δίκλωνου DNA, μετατροπή σε μονόκλωνο και έκλυση
- Το σημείο τήξης του δίκλωνου DNA – συνάρτηση της αναλογίας G+C
- Αποτέλεσμα- κλασμάτωση δίκλωνου DNA ανάλογα με τη σύσταση του σε βάσεις

ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΑ ΟΞΕΑ (DNA, RNA)

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ mRNA

- Βασίζεται στην ύπαρξη αλληλουχίας πολυ-αδενινών [poly (A)] στο 3' άκρο των περισσότερων ευκαρυωτικών mRNAs.
- Στατική φάση – αгарόζη ή κυτταρίνη τροποποιημένη με ομάδες πολυ-ουρακιλών [poly (U)] συμπληρωματικών των αδενινών
- Δέσμευση σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης άλατος και χαμηλής θερμοκρασίας
- Έκλυση με αλλαγή συνθηκών

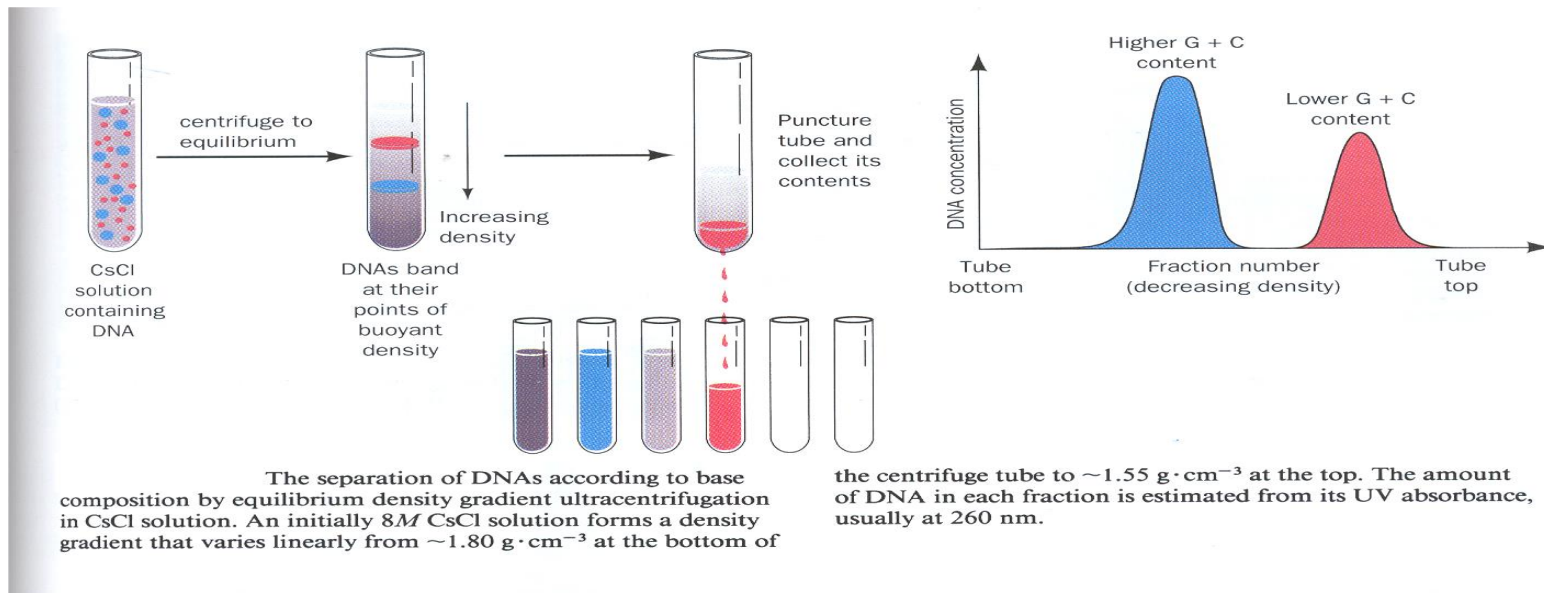
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

- Τα νουκλεϊκά οξέα μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης και πολυακρυλαμιδίου
- Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα- αντιστρόφως ανάλογη της μοριακής τους μάζας

ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ (DNA, RNA)

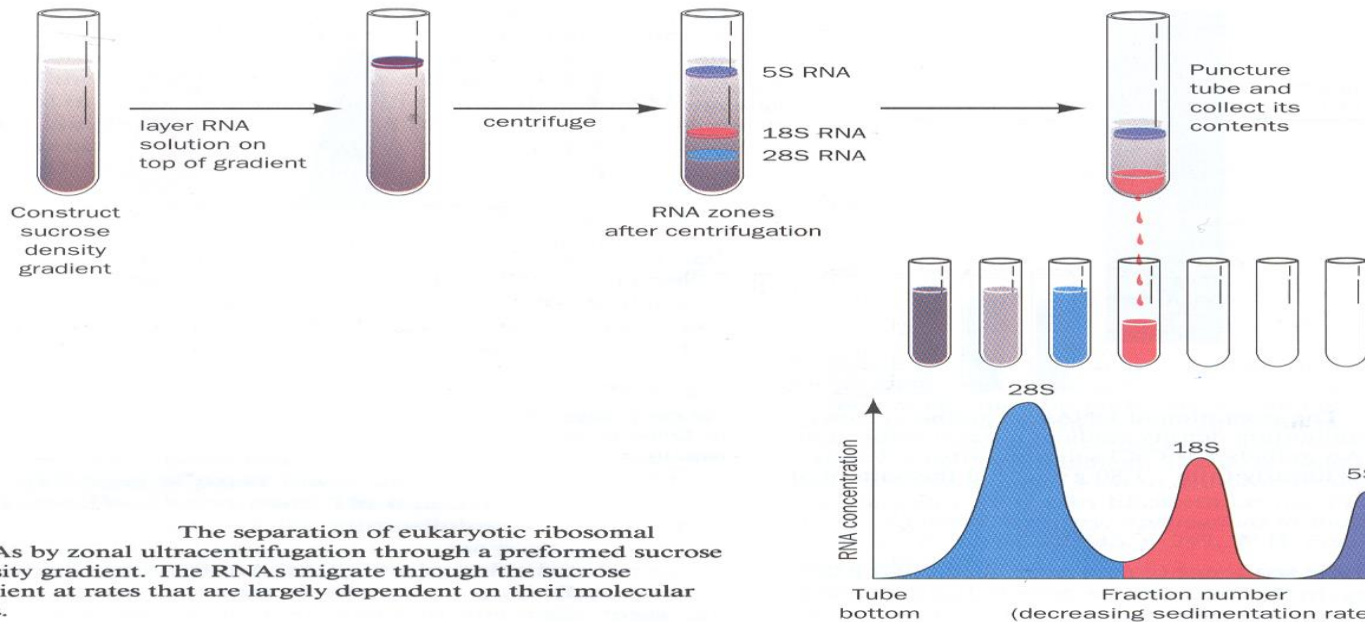
ΥΠΕΡΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ

- Τεχνική ισόπυκνης βαθμίδωσης – συχνότερα χρησιμοποιούμενη τεχνική κλασμάτωσης DNA
- Η πυκνότητα του δίκλωνου DNA εξαρτάται από τη σύσταση βάσεων
- Εντός φάσης βαθμιδωτής πυκνότητας CsCl το δίκλωνο DNA κατανέμεται ανάλογα με τη σύσταση των βάσεων του



ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ (DNA, RNA)

- Η κλασμάτωση του RNA γίνεται συνήθως με την τεχνική ζωνικής ταχύτητας σε υγρή φάση σακχαρόζης (sucrose) βαθμιδωτής πυκνότητας
- Τα RNAs κλασματούνονται κυρίως βάση μεγέθους τους



Τύπος	S (Συντ. κατακρ.)	MW	%
mRNA	6S – 25S	25.000-1x10 ⁶	~ 2%
tRNA	~ 4S	23.000-30.000	16%
rRNA	5S – 23S	35.000 – 1.1x10 ⁶	82%

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ – ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ - ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ

- **ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ (ΝΟ)**– αποτελούνται από τρία διαφορετικά χημικά συστατικά:
 - Βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης
 - D-ριβόζη και 2-δεσοξυ-D- ριβόζη
 - φωσφόρος

- **Οι μέθοδοι ανίχνευσης-ποσοτικοποίησης βασίζονται:**

Στην απορρόφηση στην περιοχή UV των βάσεων των νουκλεϊνικών οξέων

Τα ΝΟ απορροφούν ισχυρά στα 260 nm και λιγότερο ισχυρά στα 280 nm, (το αντίθετο με τα μόρια των πρωτεϊνών)

Οι γενικοί κανόνες ποσοτικοποίησης ΝΟ με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm (σε καθαρά διαλύματα) είναι οι εξής:

- ✓ Δίκλωνο DNA, 50 $\mu\text{g/ml}$, $A=1,0$
- ✓ Μονόκλωνο DNA, 33 $\mu\text{g/ml}$, $A=1,0$
- ✓ Μονόκλωνο RNA, 40 $\mu\text{g/ml}$, $A=1,0$

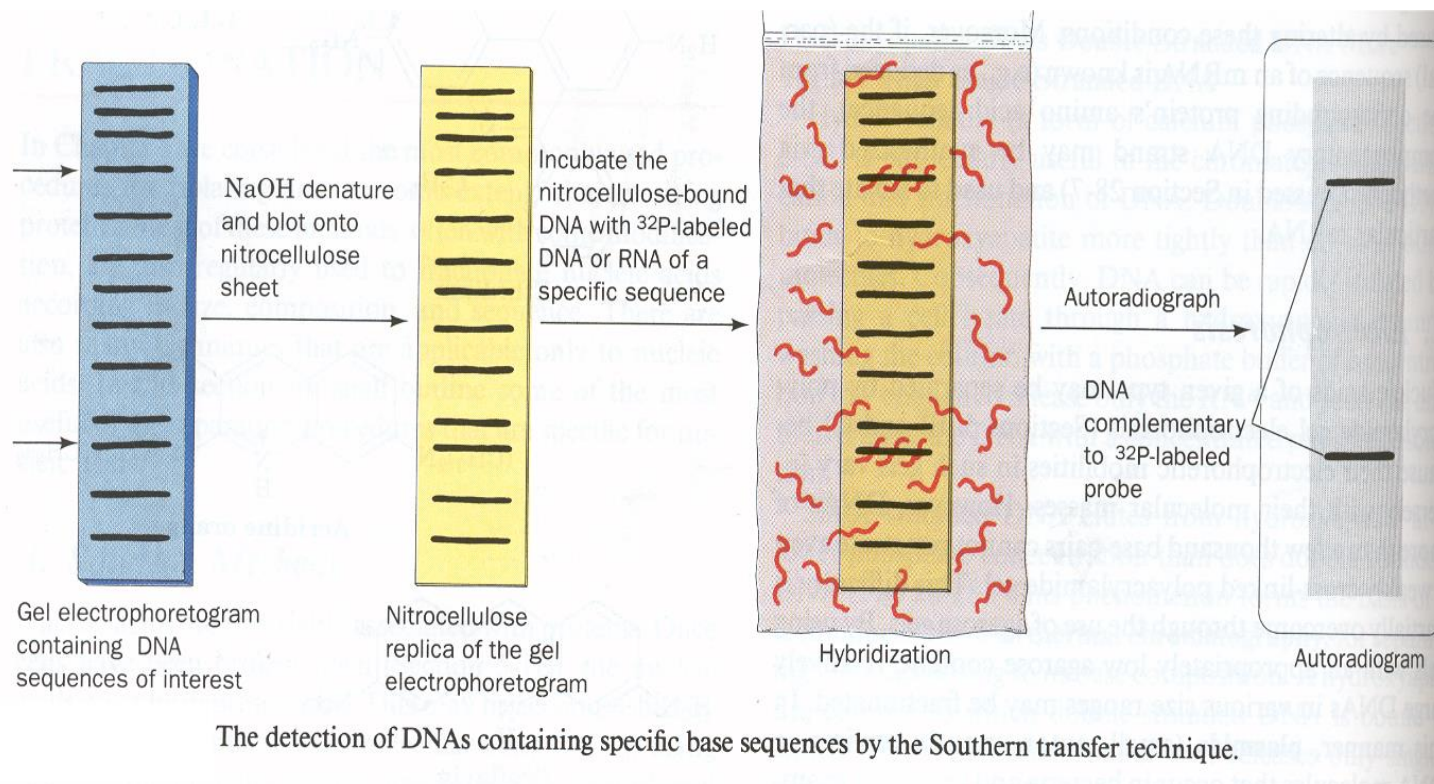
ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ – ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ - ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ

- Εκτίμηση καθαρότητας παρασκευασμάτων DNA γίνεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm και στα 280 nm. Σε καθαρά διαλύματα NO η A_{260} είναι περίπου διπλάσια της A_{280} . Πειραματικά ο λόγος A_{260}/A_{280} καθαρών διαλυμάτων DNA κυμαίνεται μεταξύ 1.8 και 2.0
- Στον φθορισμό προϊόντων παρεμβολής NO με ποικιλία αντιδραστηρίων (ειδικών για δίκλωνο, μονόκλωνο DNA και RNA)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (δίκλωνο DNA, όριο ανίχνευσης 5ng)
- PicoGreen (δίκλωνο DNA, όριο ανίχνευσης 25 pg/ml)
- OliGreen (μονόκλωνο DNA, όριο ανίχνευσης 1 ng/ml)
- RiboGreen, SYBR Green (RNA μετά από απομάκρυνση του DNA)
- Σε ειδικές αντιδράσεις των πεντοζών
- D-ριβόζη με ορκινόλη - σχηματισμός συμπλόκου κυανοπράσινου χρώματος
- 2-δεσοξυ-D-ριβόζη με διφαινυλαμίνη – σχηματισμός συμπλόκου κυανοπράσινου χρώματος
- Στον προσδιορισμό φωσφόρου

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ – ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ - ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ

- Η ταυτοποίηση ειδικών αλληλουχιών DNA και RNA γίνεται με δοκιμασίες υβριδοποίησης με ολιγονουκλεοτίδια - ανιχνευτές επισημασμένα με ποικιλία ιχνηθετών
- Ραδιοϊσότοπα
- Φθορίζουσες ενώσεις
- Ένζυμα σε συνδυασμό με υποστρώματα (χρωμογόνα, φθορίζοντα, χημειοφωταυγή)

ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ SOUTHERN – ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ



The detection of DNAs containing specific base sequences by the Southern transfer technique.

Ανάλυση προϊόντων πολλαπλασιασμού
νουκλεϊκών οξέων με μεθόδους
υβριδοποίησης σε στερεές επιφάνειες

ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Σημαντική συμβολή σε τομείς όπως:

- ✓ Μοριακή διάγνωση ασθενειών και αξιολόγηση της θεραπείας (ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων, ανίχνευση/ προσδιορισμός διαφόρων παθογόνων (HIV, ηπατίτιδες, φυματίωση, κλπ.)
- ✓ Ανάλυση τροφίμων
- ✓ Εγκληματολογία
- ✓ Περιβαλλοντική Ανάλυση

Χαρτογράφηση Ανθρώπινου γονιδιώματος:

- ✓ Αναγκαιότητα σε μεθόδους ανάλυσης DNA/RNA υψηλής προσπελασιμότητας για την επεξεργασία των συσσωρευμένων γενετικών πληροφοριών

Πρώτες μέθοδοι ανάλυσης:

Ηλεκτροφόρηση, αποτύπωση κατά Southern η northern, υβριδοποίηση με ραδιενεργούς ιχνηθέτες

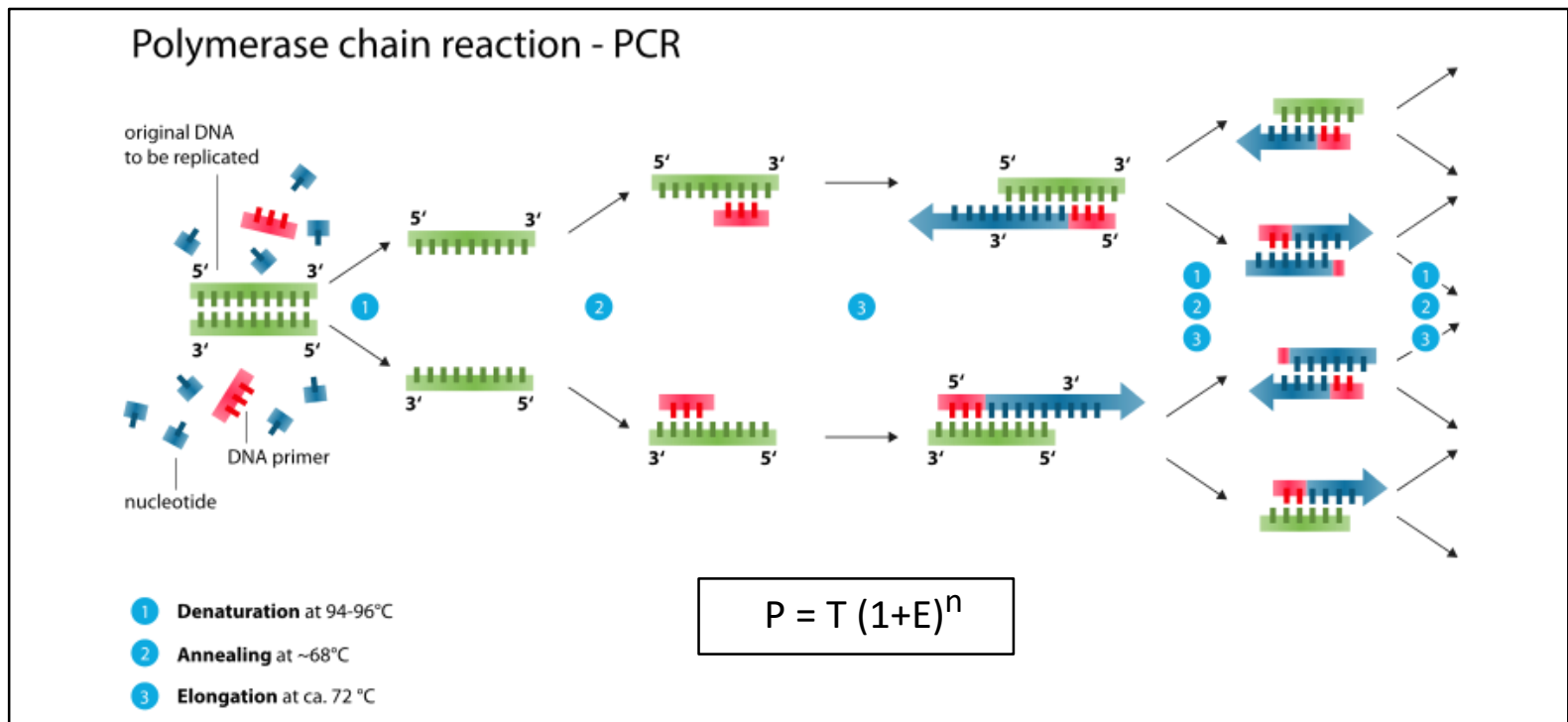
- ✓ χρονοβόρες μέθοδοι
- ✓ επικίνδυνες για την υγεία
- ✓ δεν επιδέχονται αυτοματοποίηση

Μέθοδοι Ενίσχυσης Νουκλεϊκών Οξέων

✓ Σημαντικό στάδιο των σύγχρονων τεχνικών ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων

100ng ~ 5×10^{-20} mol (~6 pg/cell)

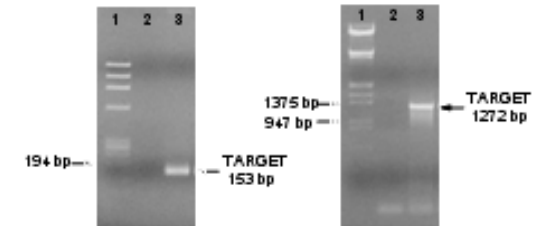
✓ Εκθετική ενίσχυση ιχνοποσοτήτων DNA και RNA αλληλουχιών από σύνθετα μίγματα με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR)



Μέθοδοι ανάλυσης προϊόντων PCR (1)

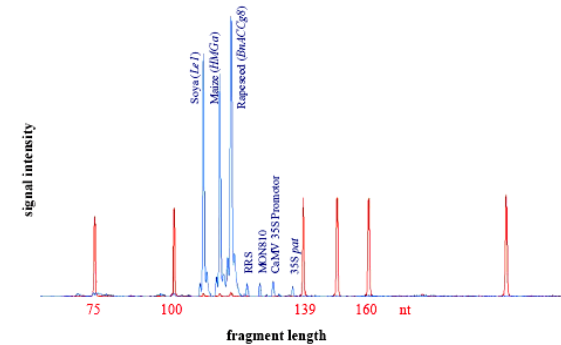
Μη ειδικές για συγκεκριμένη αλληλουχία

✓ Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός και χρώση Βρωμιούχου Αιθιδίου

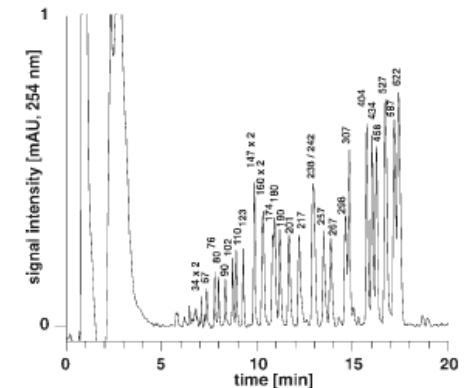


✓ Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση

- Προηγείται συνήθως διαχωρισμός των προϊόντων βάσει μεγέθους
- Τα προϊόντα της PCR επισημαίνονται με φθορίζοντες ιχνηθέτες κατά τη διάρκεια της αντίδρασης (επισημασμένα dNTP's) για επίτευξη μεγαλύτερης ευαισθησίας



✓ HPLC

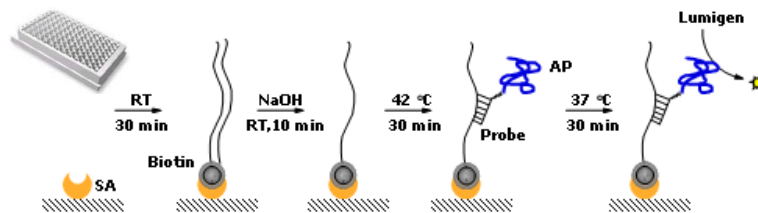


Μέθοδοι ανάλυσης προϊόντων PCR (2)

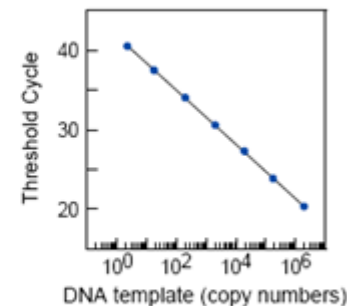
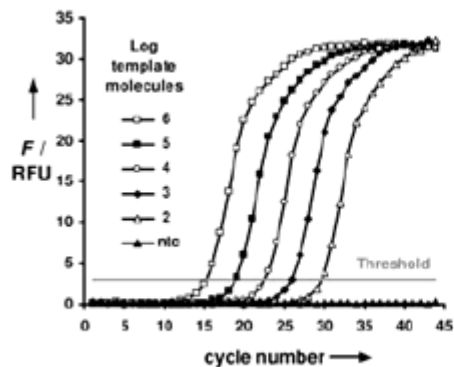
Ειδικές για συγκεκριμένη αλληλουχία

Ετερογενείς προσδιορισμοί

- ✓ Αποτύπωση κηλίδας (*dot-blot*)
- ✓ Δοκιμασίες υβριδοποίησης σε στερεές επιφάνειες (πλακίδια μικροτιτλοδότησης, μεμβράνες, ύαλος κ.α.)



- ✓ *Ομογενείς προσδιορισμοί με υβριδοποίηση* (παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της εκθετικής ενίσχυσης, *Real-Time PCR*)



ΜΕΘΟΔΟΙ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ

- ✓ Βασίζονται στους μηχανισμούς που ανέπτυξε η φύση ώστε να αναγνωρίζει και να ελέγχει τη λειτουργία κάθε μεμονωμένου βιομορίου μεταξύ εκατοντάδων χιλιάδων συγγενών μορίων
- ✓ Συμπληρωματικότητα πρωτοταγούς δομής δύο μορίων (αλληλουχίες βάσεων νουκλεϊκών οξέων - σχηματισμός δίκλωνου DNA)
- ✓ Συμπληρωματικότητα στερεοχημικής διαμόρφωσης (πρωτεϊνικά μόρια - σχηματισμός συμπλόκων αντιγόνου/αντισώματος)
- ✓ Η συμπληρωματικότητα αλληλουχίας βάσεων ή δομής μεταξύ ενός μορίου- ανιχνευτή (probe) και ενός μορίου-στόχου (target) έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό συμπλόκου ανιχνευτή-στόχου. Το σύμπλοκο στη συνέχεια μπορεί να μετρηθεί με κατάλληλα επισημασμένο ανιχνευτή (ραδιοϊσότοπα, ένζυμα, ή άλλοι ιχνηθέτες)

Υβρίδια διαφόρων τύπων: DNA/DNA, DNA/RNA, Antigen/Antibody

⇒ *Χαρακτηριστικές ιδιότητες του υβριδισμού*

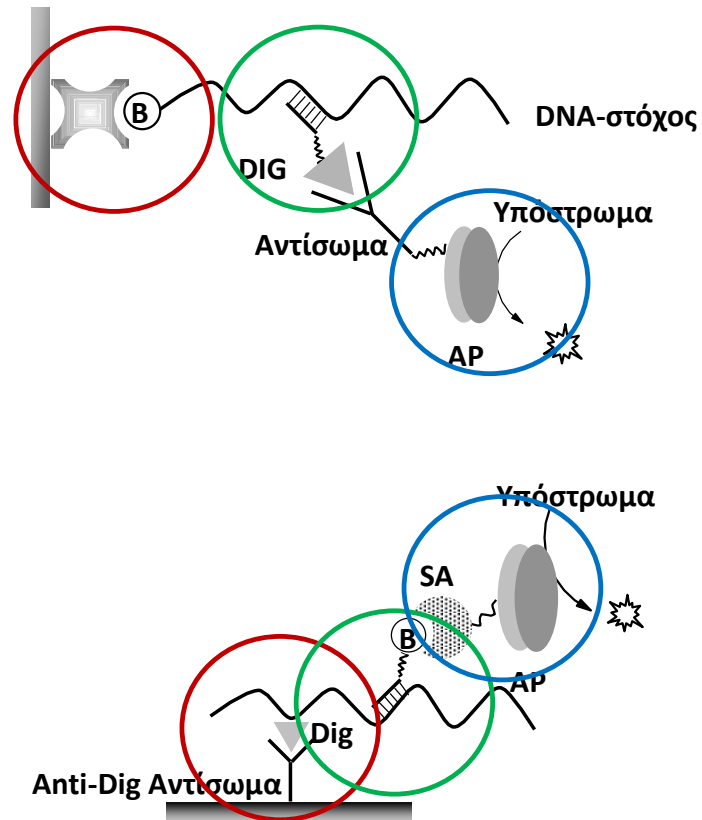
✓ Υψηλή εξειδίκευση - ο ανιχνευτής συνδέεται με μόρια στόχους που έχουν συμπληρωματική αλληλουχία (στην περίπτωση των αντισωμάτων, θέσεις με κατάλληλη τρισδιάστατη διαμόρφωση)

✓ Πραγματοποιούνται παρουσία μεγάλου αριθμού μορίων συγγενών αλλά όχι όμοιων με το μόριο-στόχο

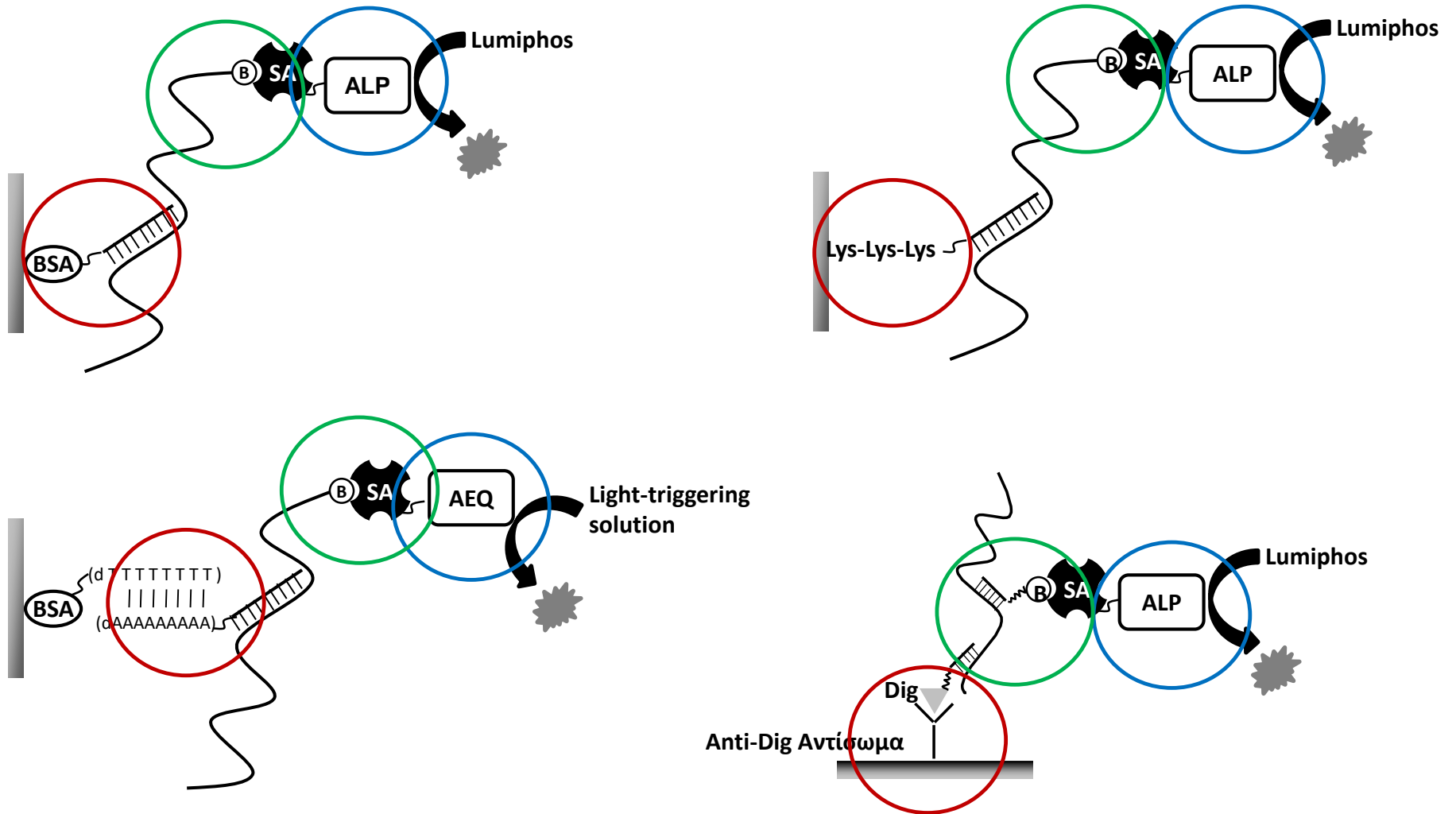
✓ Μεγάλες σταθερές σχηματισμού (10^{23} για νουκλεϊκά οξέα)

ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ ΣΕ ΣΤΕΡΕΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ

⇒ **Ακίνητοποίηση DNA-στόχου**

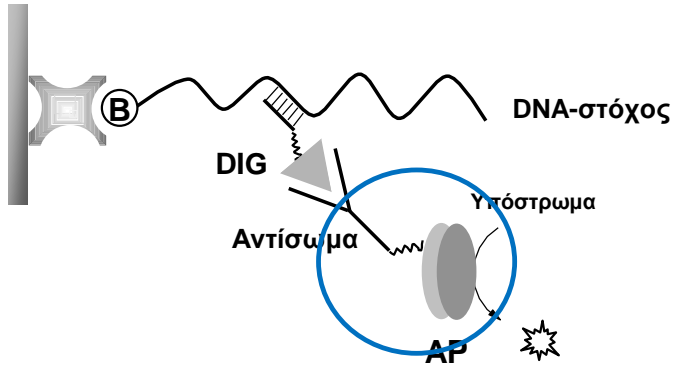


⇒ Ακίνητοποίηση ολιγονουκλεοτιδίου-ανιχνευτή

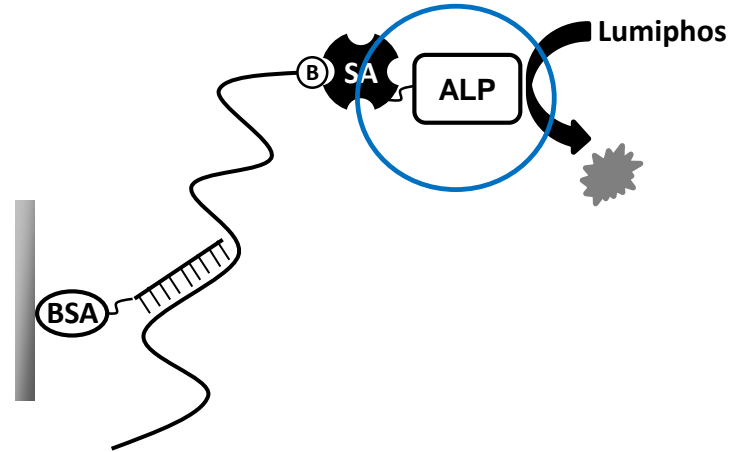


Μέθοδοι ανίχνευσης υβριδίων

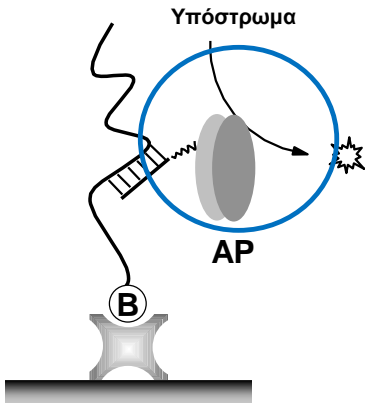
Χρονική διάρκεια ~ 2,5 h



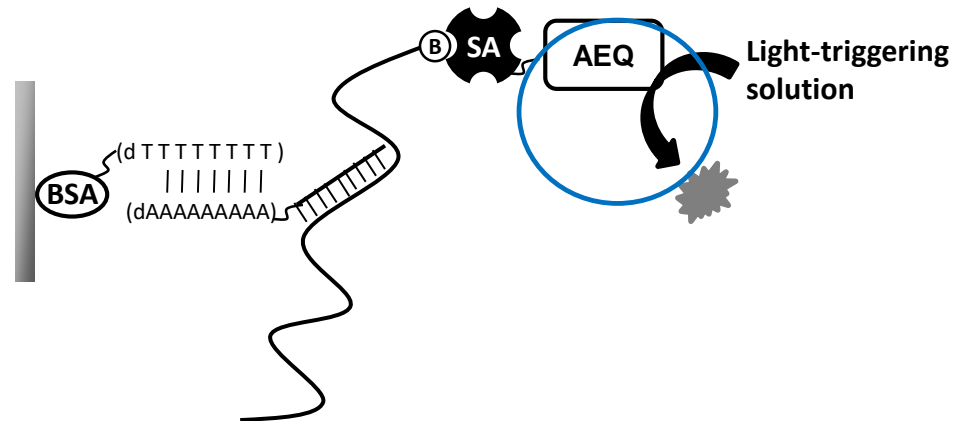
Χρονική διάρκεια ~ 1,5 h



Χρονική διάρκεια ~ 1,5 h

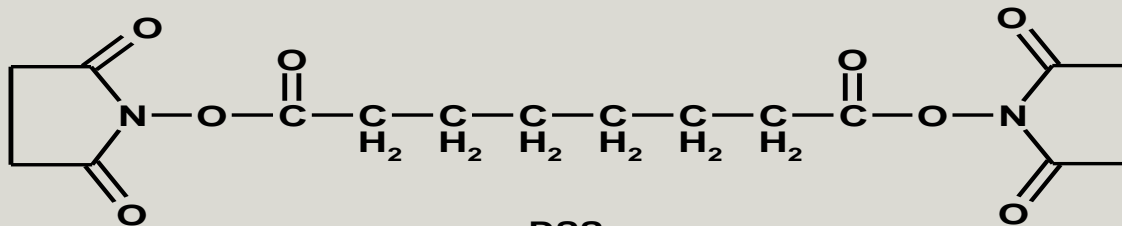


Χρονική διάρκεια ~ 1 h

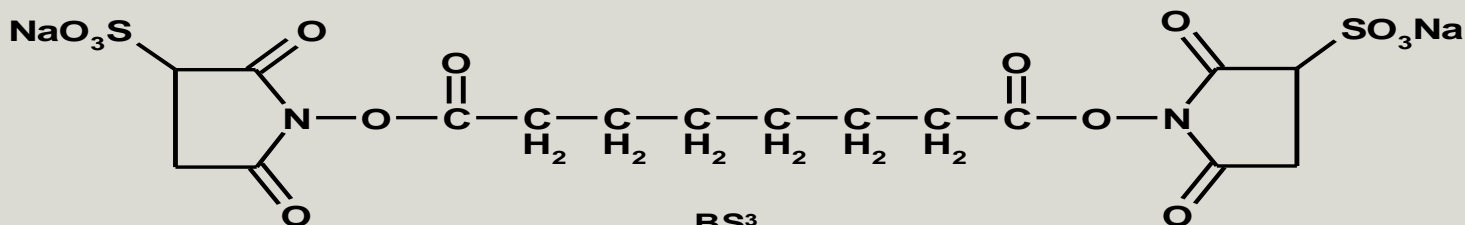


ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΣΥΖΕΥΞΗΣ

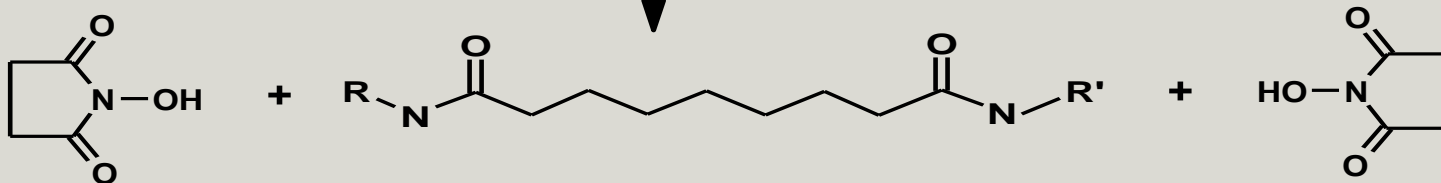
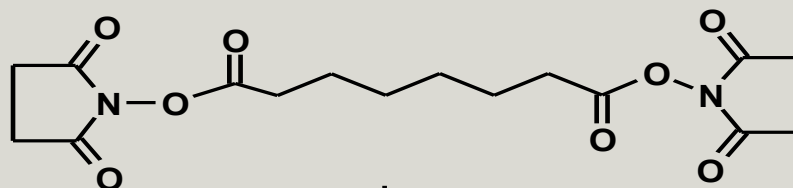
Ομοδιλεειτουργικά



DSS
Μήκος αλυσίδας 11.4 Å

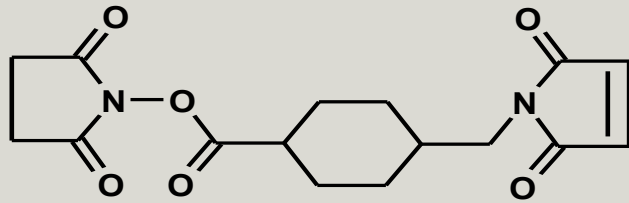


BS³
Μήκος αλυσίδας 11.4 Å

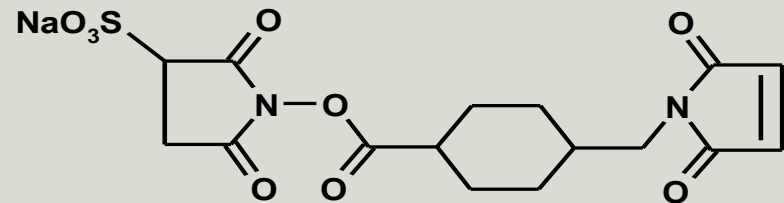


ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΣΥΖΕΥΞΗΣ

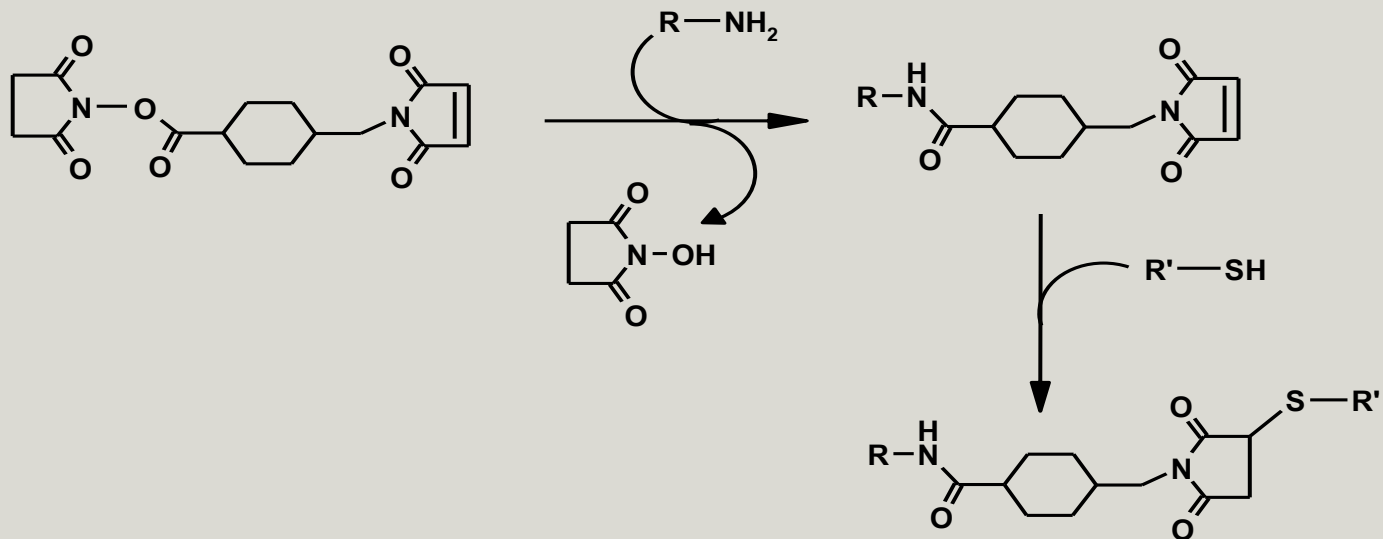
διλειτουργικά



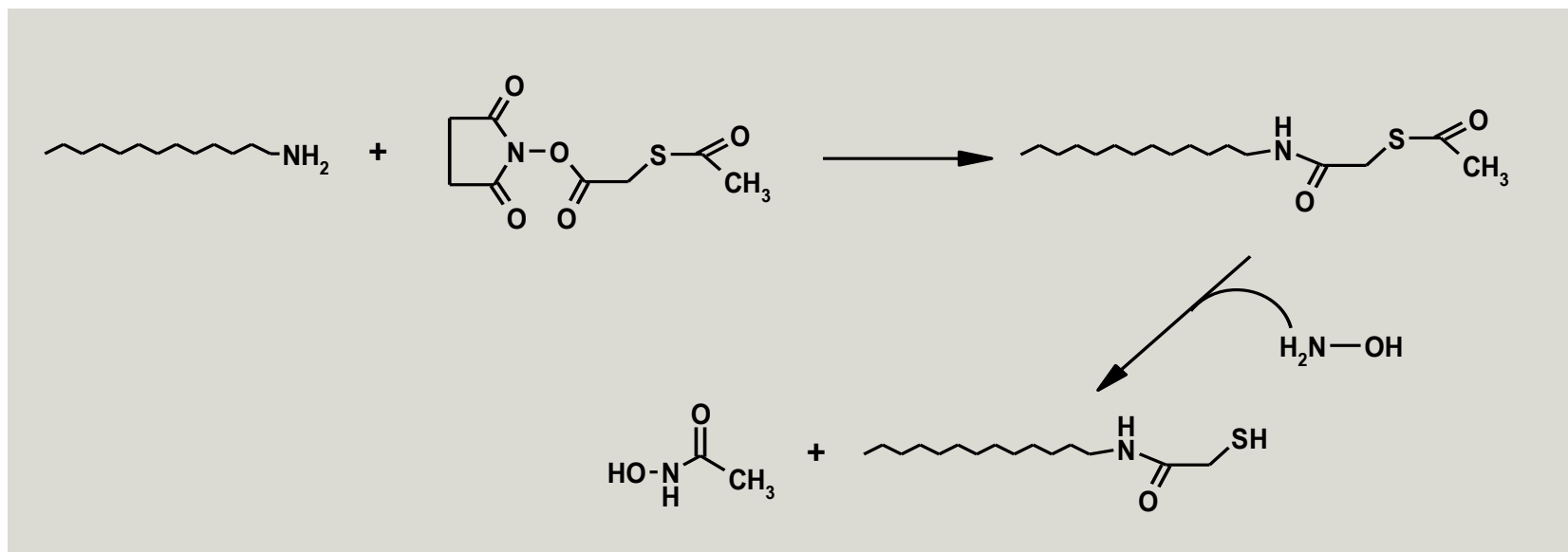
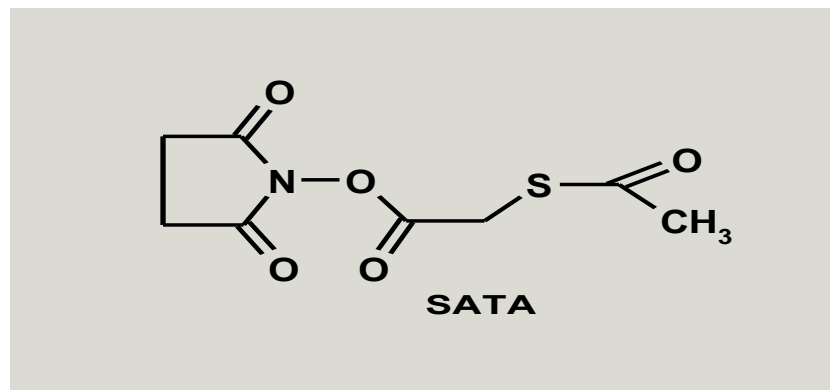
SMCC
11.6A



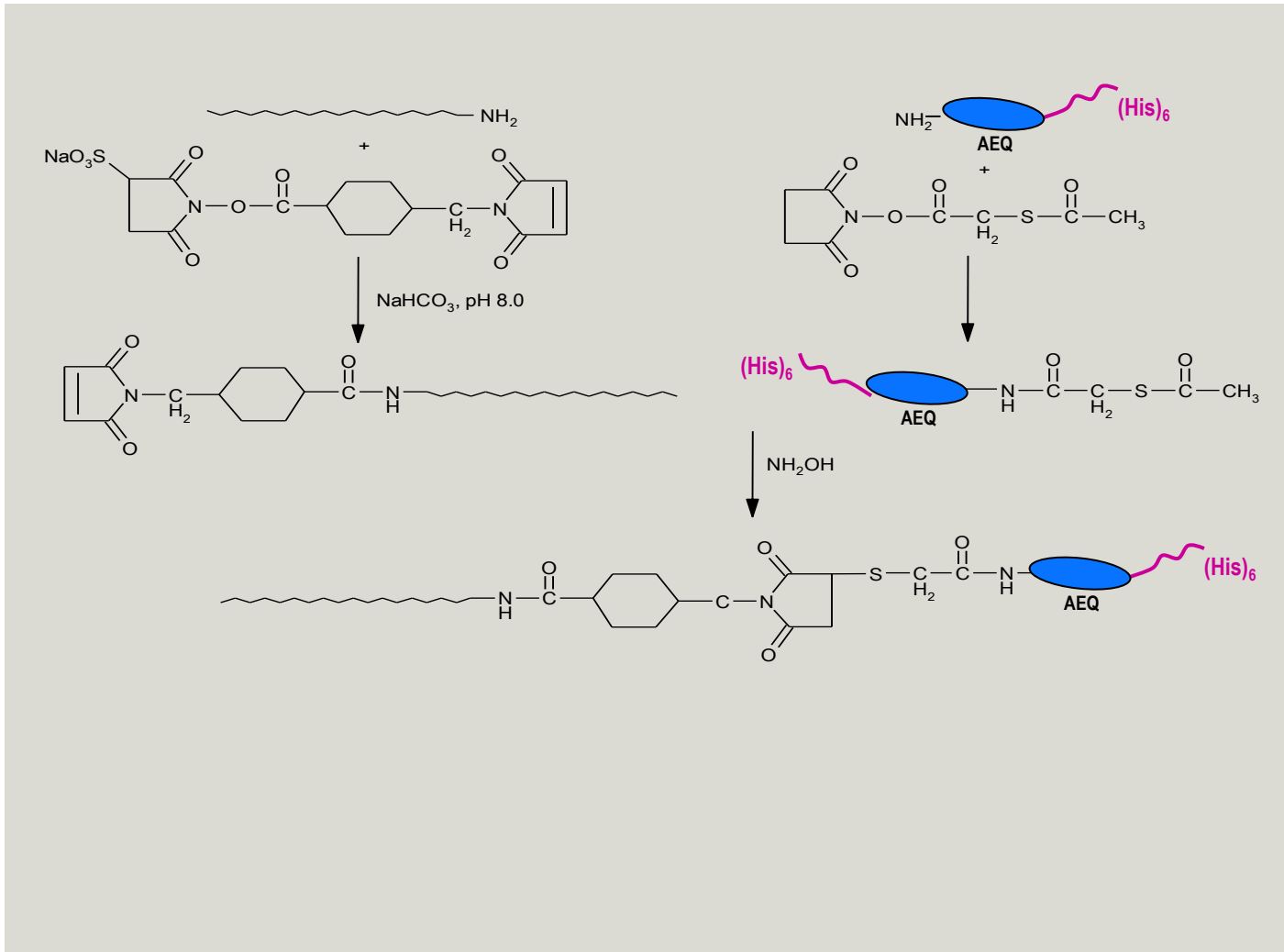
Sulfo - SMCC
11.6A



ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΣΥΖΕΥΞΗΣ

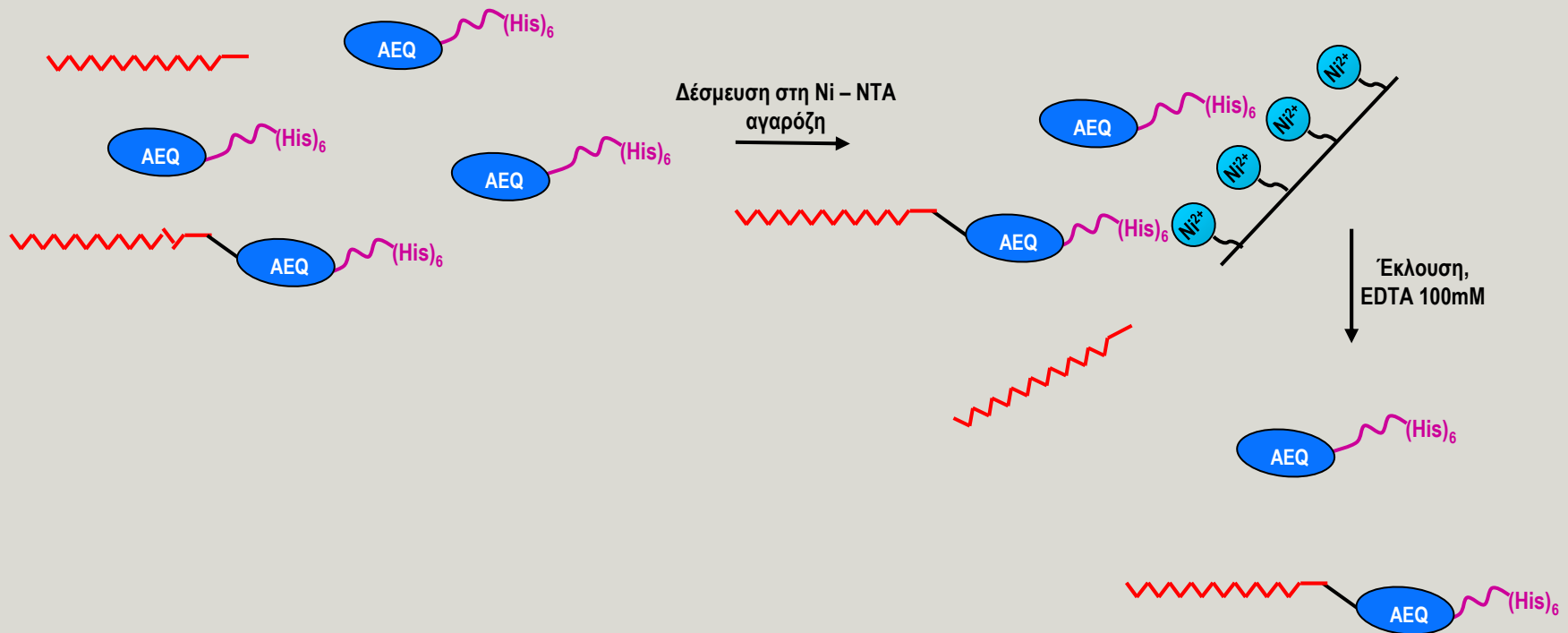


ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΥΖΕΥΞΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΕΤΕΡΟΔΙΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ SATA ΚΑΙ Sulfo-SMCC

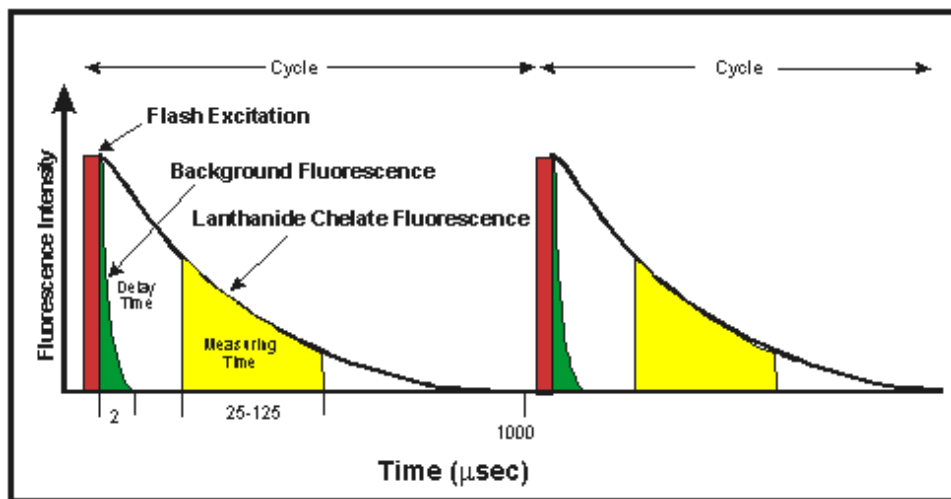


ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟΥ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΜΕΤΑΛΛΟΥ

Μίγμα αντίδρασης σύζευξης



✓ Φθορισμομετρία χρονικά διαχωριζόμενου φθορισμού (TRF)

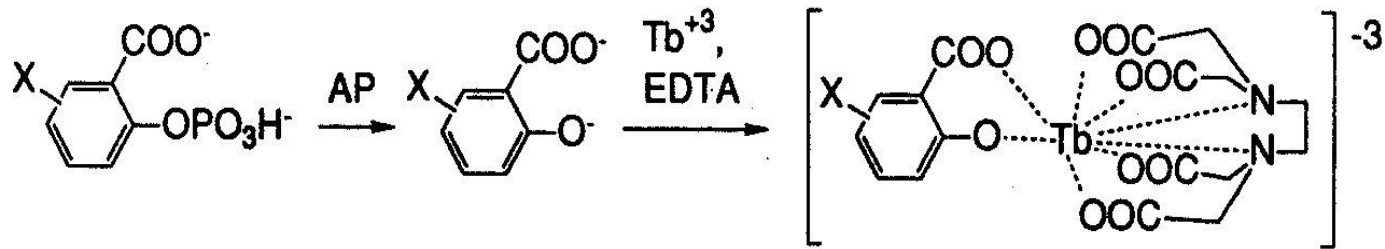


- ✓ Χρήση ιχνηθετών με μεγάλο χρόνο ζωής φθορισμού (ιόντα λανθανιδών)
- ✓ Διέγερση δείγματος με βραχύ παλμό ακτινοβολίας
- ✓ Μέτρηση μετά από απόσβεση βραχύβιου φθορισμού υποβάθρου

Απόσβεση φθορισμού συμπλόκων ενώσεων λανθανιδών

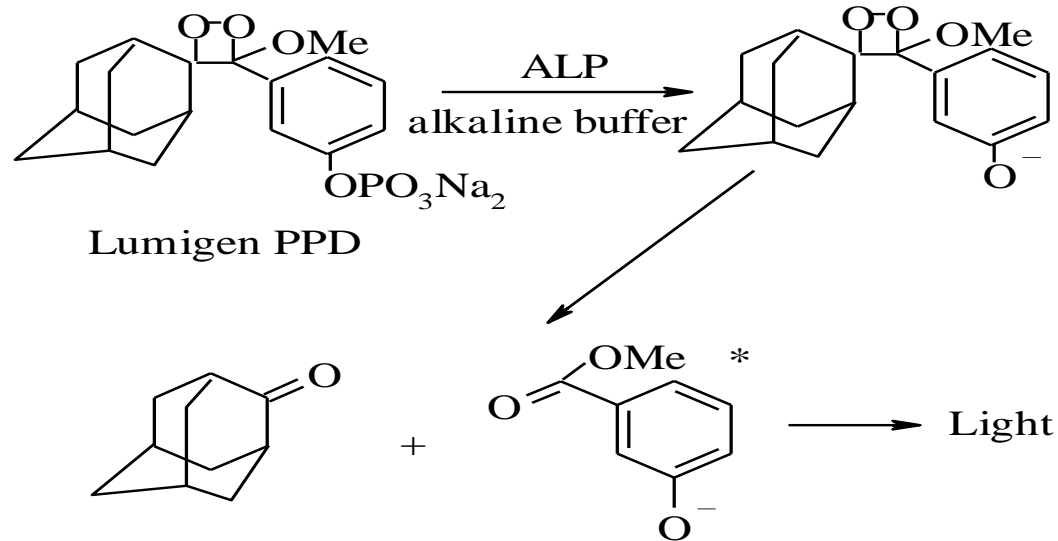
Chelate	Excitation(nm)	Emission (nm)	Fluorescence Lifetime (τ) (μ sec)	Suggested Emission Filter
Europium (Eu)	340	615	730	620/40
Samarium (Sm)	340	642	50	645/40
Terbium (Tb)	320	545	1050	545/40
*(Dyprosium (Dy)	320	572	16	575/15
*Ruthenium (Ru)	459	620	0.4	620/40

✓ Συνδυασμός ενζυμικής ιχνηθέτησης με TRF



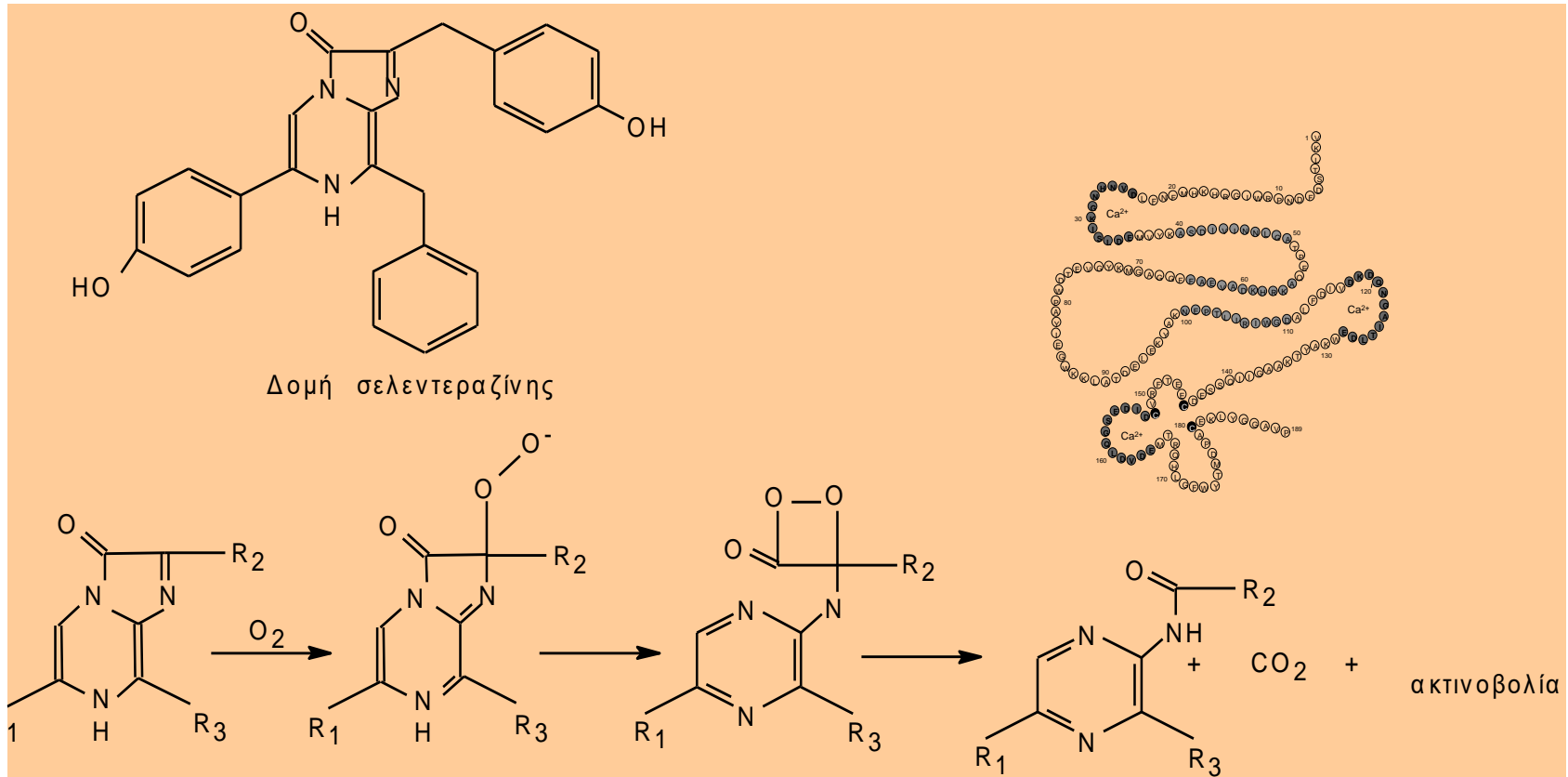
Ανίχνευση αλκαλικής φωσφατάσης με χρήση υποκατεστημένων σαλικυλικών εστέρων. Μετά από αποφωσφορυλίωση του εστέρα σχηματίζεται φθορίζον σύμπλοκο μεταξύ σαλικυλικού οξέος, ιόντων τερβίου και EDTA

✓ Συνδυασμός ενζυμικών ιχνηθετών με χημειοφωταύγεια



Ενζυμική αποφωσφορυλίωση και διάσπαση του υποστρώματος Lumigen

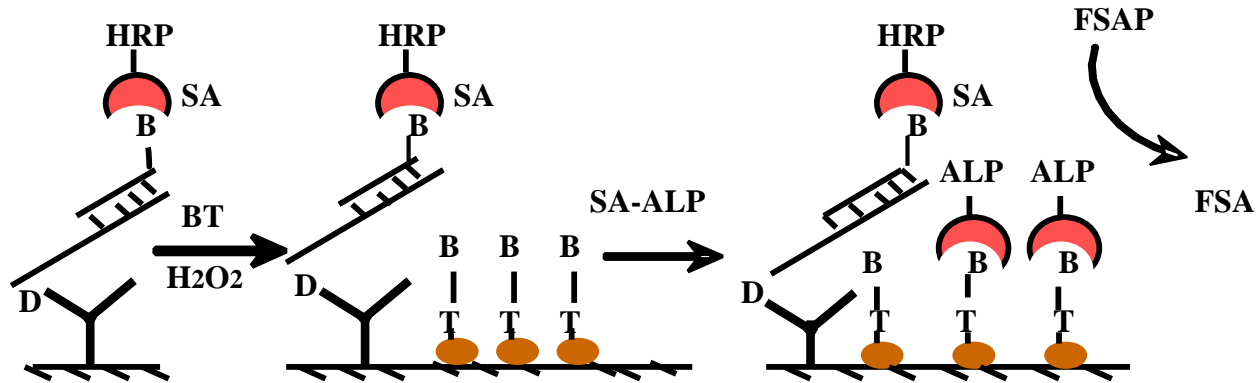
✓ Φωτοπρωτεΐνη αικουορίνη



- ✓ Σύμπλοκη ένωση αποαικουορίνης, συμπαράγοντα σελεντεραζίνη και μοριακού οξυγόνου
- ✓ Σύνδεση αικουορίνης με Ca²⁺
- ✓ Σχηματισμός αποαικουορίνης, σελεντεραμιδίου, CO₂ και ακτινοβολίας

ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ

✓ Δύο κύκλοι ενζυματικής δράσης

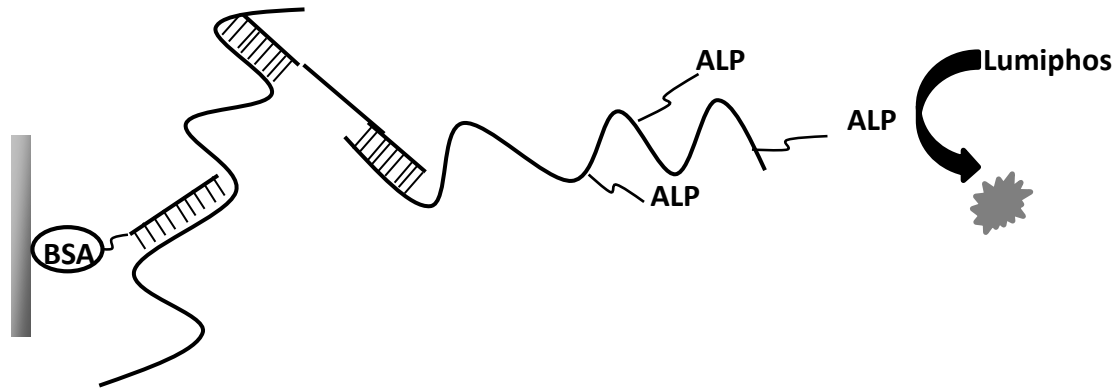


- ✓ Ακίνητοποίηση μονόκλωνου DNA, επισημασμένου μέσω PCR με DIG, στην επιφάνεια του φρεατίου μέσω γέφυρας DIG-antiDIG
- ✓ Υβριδισμός με ολιγονουκλεοτίδιο επισημασμένο με βιοτίνη (B)
- ✓ Επώαση με στρεπταβιδίνη (SA) επισημασμένη με HRP
- ✓ Καταλυτική ομοιοπολική πρόσδεση πολλαπλών μορίων βιοτυνιλιωμένης τυραμίνης (B-T) στην επιφάνεια του φρεατίου παρουσία H₂O₂
- ✓ Αντίδραση ακινητοποιημένων μορίων B με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με ALP (SA-ALP)
- ✓ Ενζυμική υδρόλυση του φωσφορικού εστέρα του FSAP και παραγωγή SAP
- ✓ Σχηματισμός ισχυρά φθορίζουσας σύμπλοκης ένωσης με Tb-EDTA σε αλκαλικό περιβάλλον

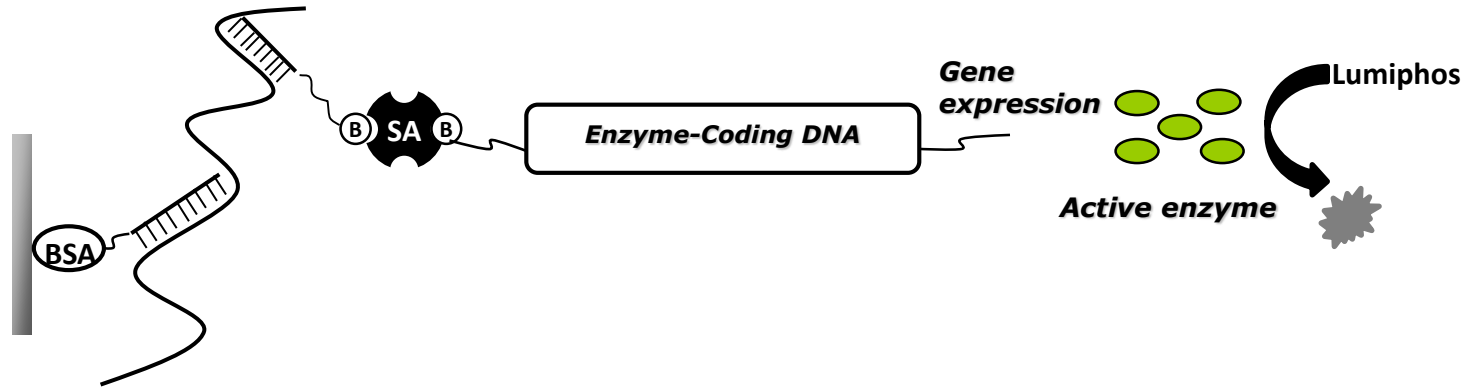
Βελτίωση ευαισθησίας ~ 10 φορές (300 amol target DNA)

ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ

✓ Branched DNA

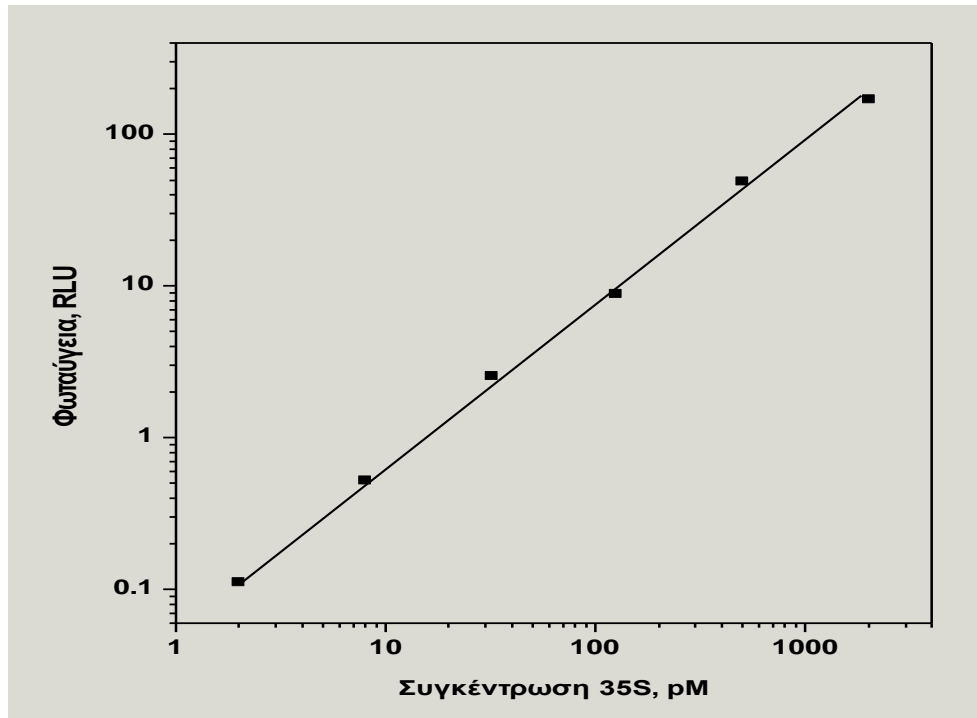


✓ Expressible DNA



*5 amol target DNA (100 amol με απευθείας
χρήση ενζύμου)*

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ 35S ΠΡΟΑΓΩΓΕΑ

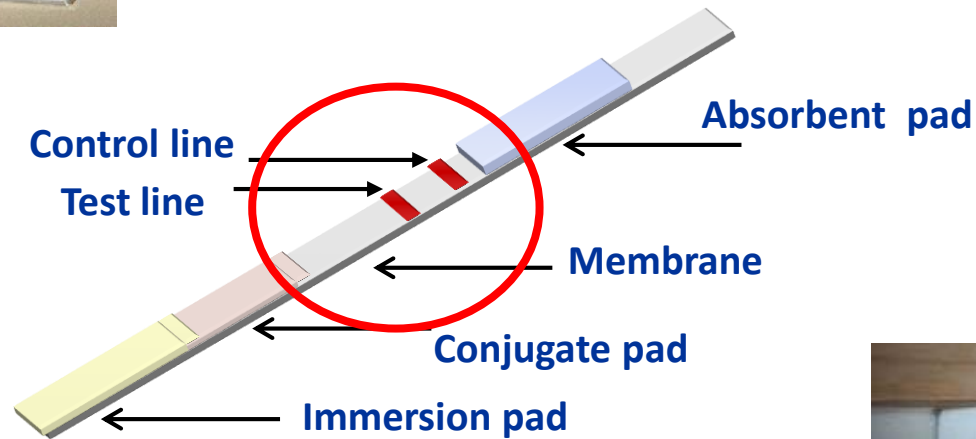
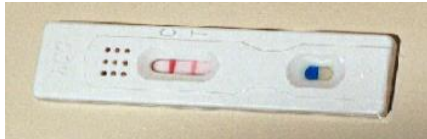


Περιοχή γραμμικότητας: 2-1.000 pM
2 pM (100 amol/well) (S/B~2,0)

Επαναληψιμότητα	
Συγκέντρωση (pM)	%CV
2	9,9
125	11,3
2.000	1,9

**Ταχείες δοκιμασίες προσδιορισμού νουκλεϊκών οξέων
με ταινίες ξηρών αντιδραστηρίων τύπου
εμβαπτιζόμενου χάρτη**

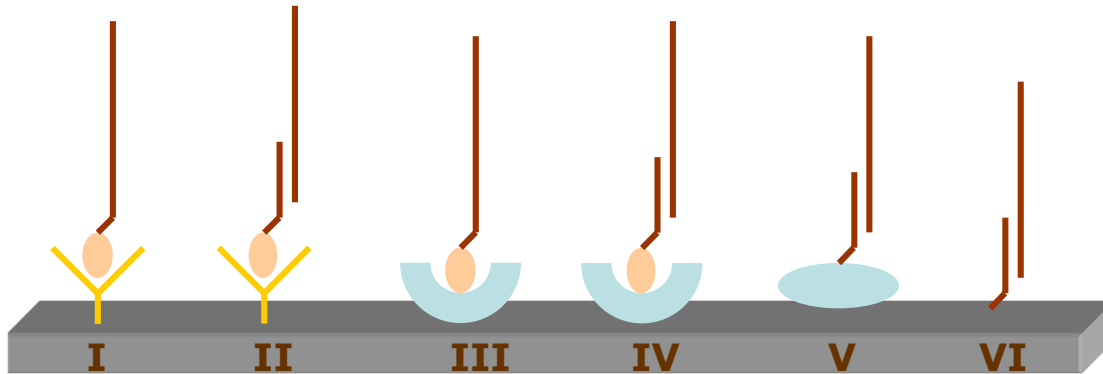
Ταινίες ξηρών αντιδραστηρίων – Βασικές αρχές



Lateral Flow Platform – Dipstick Format



Στρατηγικές ακινητοποίησης



- (I, II) Ακινητοποίηση μέσω αλληλεπίδρασης αντισώματος-αντιγόνου
- (III, IV) Ακινητοποίηση μέσω δεσμευτικών πρωτεϊνών (στρεπταβιδίνη-βιοτίνη)
- (V,VI) Απευθείας ακινητοποίηση (παθητική προσρόφηση συζευγμάτων BSA-ολιγονουκλεοτιδίου η απευθείας ολιγονουκλεοτιδίου

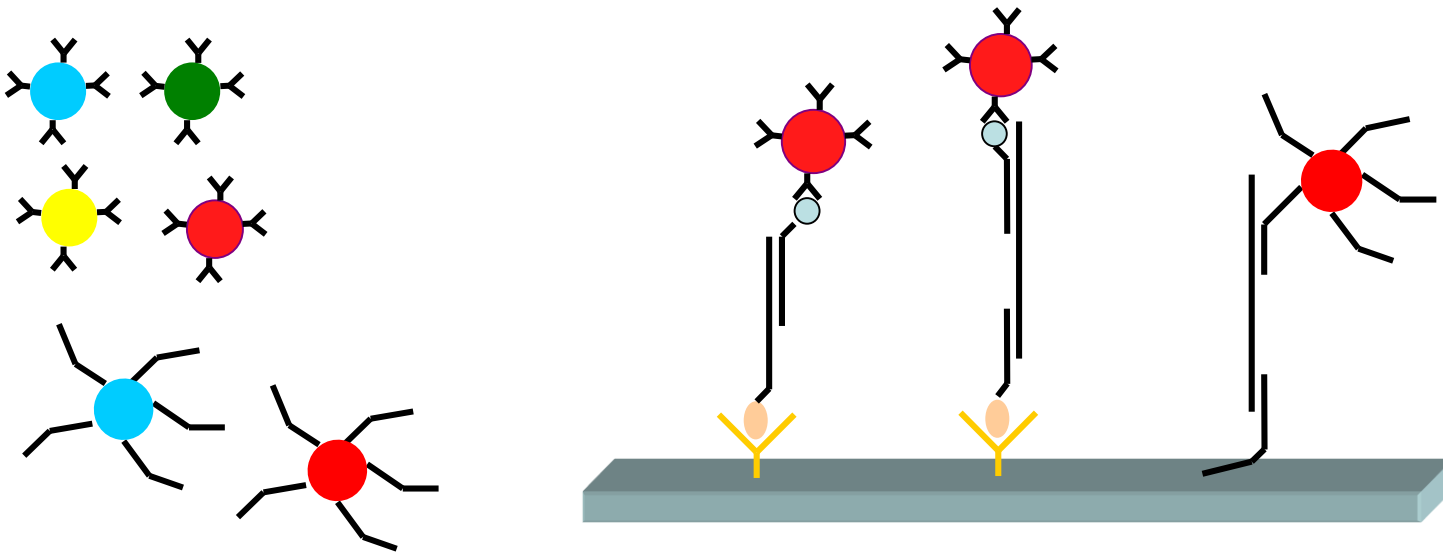
Ανίχνευση με έγχρωμα σφαιρίδια

✓ Έχρωμα σφαιρίδια χρυσού και latex κατάλληλα για ανίχνευση δια γυμνού οφθαλμού

✓ Τα σφαιρίδια latex παρασκευάζονται σε ποικιλία χρωμάτων

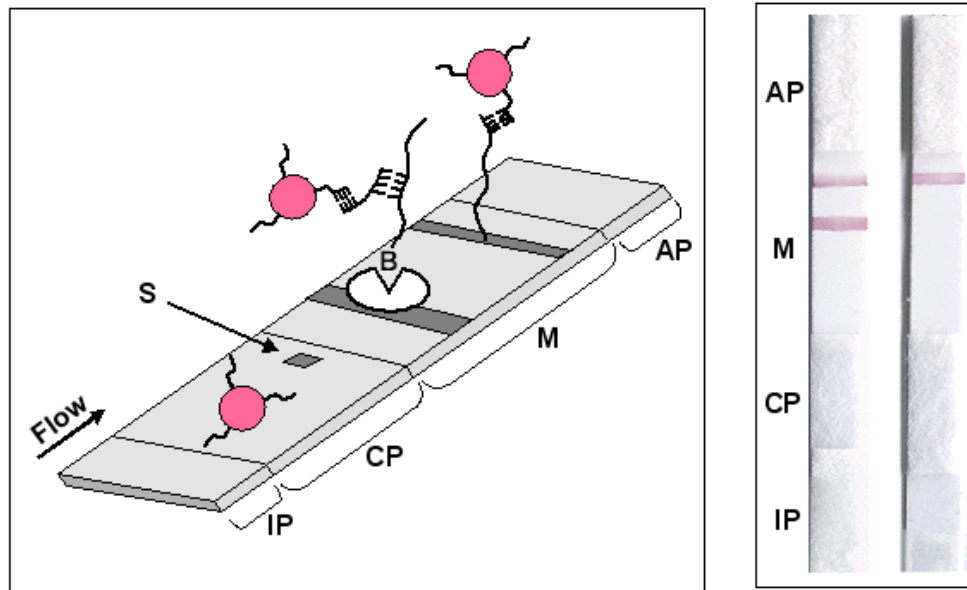
✓ Τα σφαιρίδια χρυσού έχουν χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα αποτέλεσμα συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων

✓ Τα σωματίδια εύκολα τροποποιούνται με σύζευξη τους με αντισώματα, αντιγόνα, ολιγονουκλεοτίδια



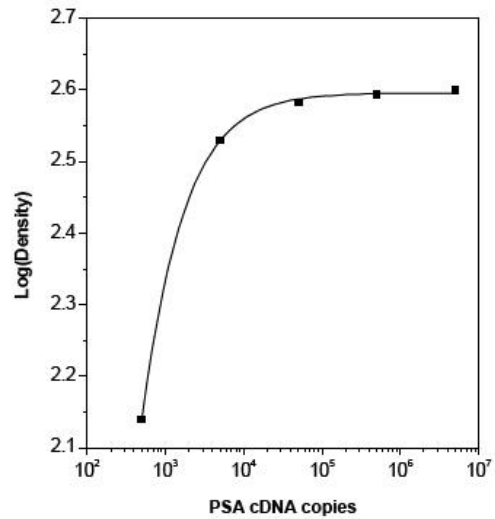
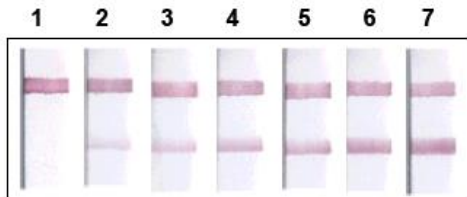
Ανίχνευση PCR προϊόντων

Glynou K et al: "Oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles as probes in a dry-reagent strip biosensor for DNA analysis by hybridization", Analytical Chemistry (2003) 75: 4155-4160



Left panel: Parts of the proposed dry-reagent strip and principle of the strip-based hybridization assay for target DNA.

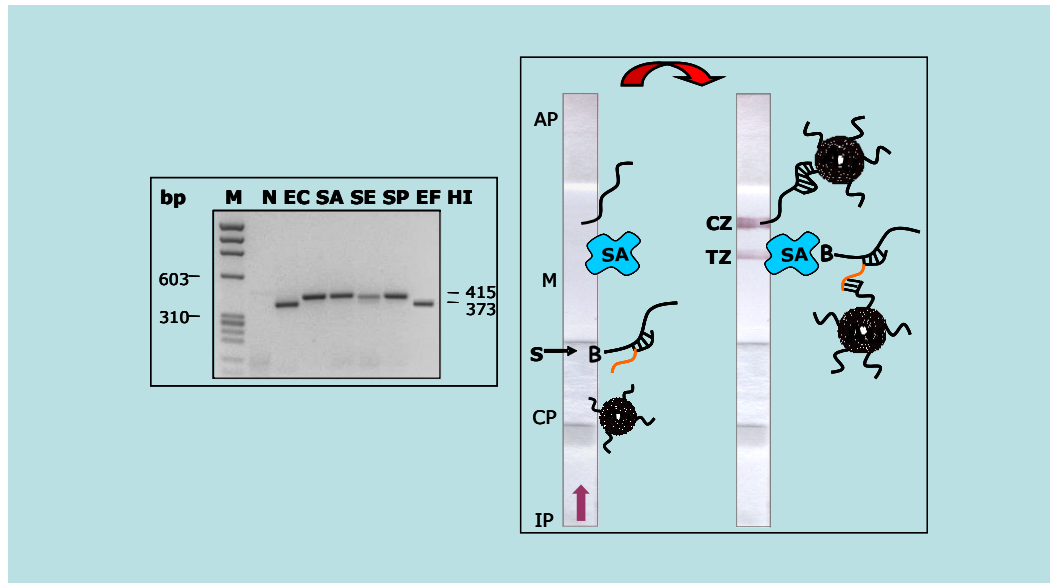
Right panel: A positive and a negative strip-test. In the absence of target DNA there is no observable signal in the test zone of the strip.



Strip results pertaining to the detection of PCR amplified prostate-specific antigen cDNA. PCR was performed for 35 cycles (500 - 5,000,000 copies)

Ανίχνευση Παθογόνων

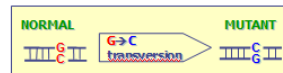
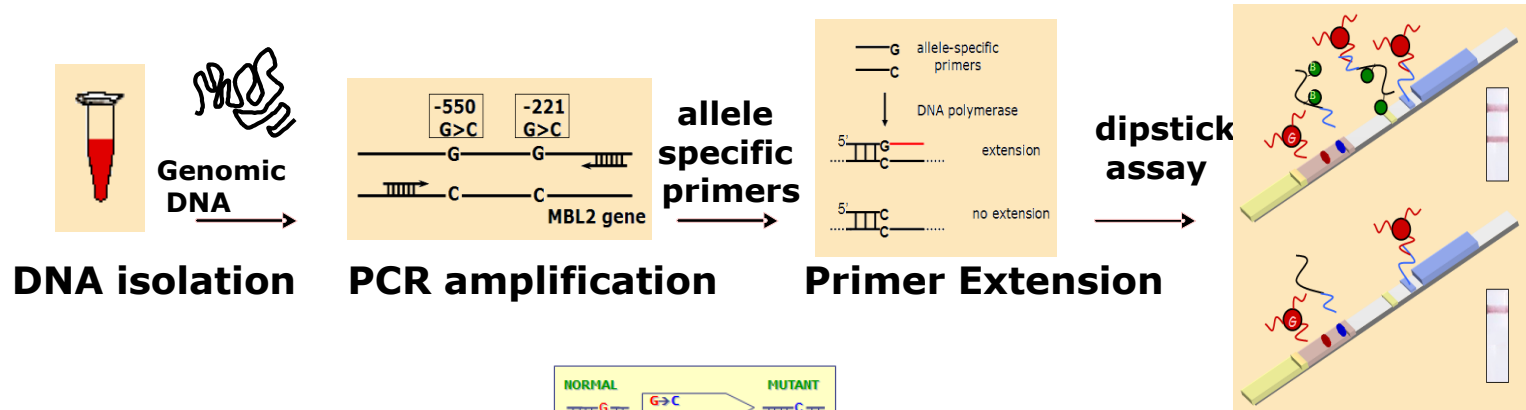
Universal primers are used to amplify highly conserved regions of the 23S rRNA gene. This region shows more variation between bacteria than 16S rRNA, thus allowing the identification of the bacterial species implicated in most cases of arthroplasty infections by hybridization.



Left panel: Agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining of amplified sequences of standard bacterial strains for the conserved area of the 23S rRNA gene using universal primers. EC: *E.coli*; SA: *Staphylococcus aureus*; SE: *Staphylococcus epidermidis*; EF: *Enterococcus faesium*; HI: *Haemophilus influenza*; SP: *Streptococcus pneumoniae*; M: DNA markers; N: PCR negative **Right panel:** Principle of the dry-reagent dipstick test

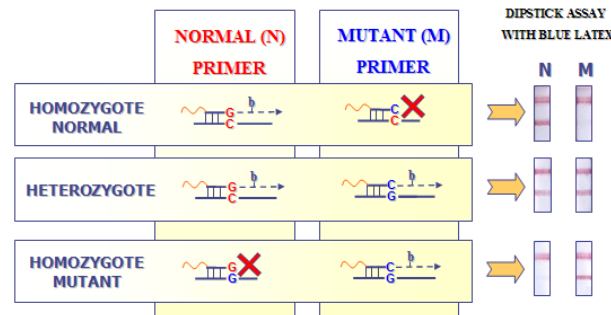
Kalogianni DP et al: "Dry-Reagent Dipstick Test Combined with 23S rRNA PCR for Molecular Diagnosis of Bacterial Infection in Arthroplasty", *Analytical Biochemistry* (2007) 361: 169-175

Ανίχνευση Σημειακών Μεταλλάξεων (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs)



PRIMER EXTENSION REACTION

5'-(dA)-tailed allele specific primers,
Vent (exo-) polymerase, dNTPs, Biotin-dUTP



Litos et al, "Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms by Primer Extension Reaction in a Dry-Reagent Dipstick Format (PEXT-Dipstick)", *Analytical Chemistry*, (2007) 79: 395-402, Accelerated Article

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ✓ «Nonisotopic DNA Probe Techniques”, edited by Larry J. Kricka, Academic Press, Inc., 1992
- ✓ Christopoulos TK, Bortolin S, “Time-resolved Immunofluorometric determination of specific mRNA sequences amplified by the polymerase chain reaction”, *Analytical Chemistry* (1994) 66: 4302-4307
- ✓ Laios E, Ioannou PC and Christopoulos TK: “Novel Hybridization Assay Configurations Based on In Vitro Expression of DNA Reporter Molecules”, *Clinical Biochemistry* (1998) 31: 151-158
- ✓ Ioannou PC and Christopoulos TK: “Two-round enzymatic amplification combined with time-resolved fluorometry of Tb³⁺ chelates for enhanced sensitivity in DNA hybridization assays”, *Analytical Chemistry* (1998) 70: 698-702
- ✓ Emmanouilidou E, Ioannou PC, Christopoulos TK and Polizois K: “Determination of prostate specific antigen mRNA in peripheral blood by RT-PCR and a simple chemiluminometric hybridization assay in a high-throughput format”, *Analytical Biochemistry* (2003) 213: 97-105
- ✓ Glynou K, Ioannou PC, Christopoulos TK: “Detection of transgenes in soybean by polymerase chain reaction and a simple bioluminometric assay based on a universal aequorin-labeled oligonucleotide probe”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2004) 378: 1748-1753
- ✓ Litos IK, Ioannou PC, Christopoulos TK, Traeger-Synodinos J and Kanavakis E: Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms by Primer Extension Reaction in a Dry-Reagent Dipstick Format (PEXT-Dipstick)”, *Analytical Chemistry* (2007) 79: 395-402
- ✓ Glynou K, Kastanis P, Boukouvala S, Tsaoussis V, Ioannou PC, Christopoulos TK, Traeger-Synodinos J, Kanavakis E: “High-Throughput Microtiter Well-Based Chemiluminometric Genotyping of 15 β -Globin Gene Mutations in a Dry-Reagent Format”, *Clinical Chemistry* (2007) 53:384-391
- ✓ Kalogianni DP, Bravou V, Christopoulos TK, Ioannou PC, and Zoumbos NC: “Dry-Reagent Disposable Dipstick Test for Visual Screening of Seven Leukemia-Related Chromosomal Translocations”, *Nucleic Acid Research* (2007) 35(4):e23. Epub 2007 Jan 23
- ✓ Kalogianni DP, Goura S, Aletras AJ, Christopoulos TK, Chanos MG, Christofidou M, Skoutelis A, Ioannou PC and Panagiotopoulos E: Dry-Reagent Dipstick Test Combined with 23S rRNA PCR for Molecular Diagnosis of Bacterial Infection in Arthroplasty, *Analytical Biochemistry* (2007) 361: 169-175

ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ – ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Ιδιότητες ενζύμων

- ✓ Δρουν αποτελεσματικά σε πολύ μικρές ποσότητες
- ✓ Παραμένουν αναλλοίωτα κατά η διάρκεια της αντίδρασης
- ✓ Σε μικρές (έναντι υποστρώματος) ποσότητες δεν επηρεάζουν τη θέση της χημικής ισορροπίας, αλλά αυξάνουν την ταχύτητά της μέχρι επίτευξης της κατάστασης ισορροπίας
- ✓ Παρουσιάζουν όλες τις χαρακτηριστικές ιδιότητες των πρωτεϊνών
- ✓ Η καταλυτική τους ικανότητα οφείλεται στην ειδική στερεοχημική τους δομή – ύπαρξη ενεργών κέντρων στα οποία επιτελείται ο μεταβολισμός της ύλης
- ✓ Η στερεοχημική τους δομή χαρακτηρίζεται από αστάθεια. Οποιαδήποτε μεταβολή στη στερεοχημική διάταξη (αποδιάταξη, μετουσίωση) ισοδυναμεί με μερική ή ολική απώλεια ενεργότητας

Οι ενζυματικές μέθοδοι ανάλυσης:

- Επιτρέπουν τον εξειδικευμένο (εκλεκτικό) προσδιορισμό ενός υποστρώματος ή της ενεργότητας ενός ενζύμου σε μίγμα
- Δεν είναι απαραίτητη η χρήση μεθόδων διαχωρισμού (χρονοβόρες και συνοδεύονται από μεγάλη απώλεια δείγματος)
- Καθιερώθηκαν ως μεθοδολογία σε προσδιορισμούς σε όργανα ζώϊκών και φυτικών οργανισμών, βιολογικά υγρά, θρεπτικά υλικά, τρόφιμα, φάρμακα

ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ – ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Πλεονεκτήματα

- ✓ Υψηλή ευαισθησία (από μmol σε συνήθεις φασματοφωτομετρικές τεχνικές σε nmol με καταλυτικές). Με φθορισμομετρική ανίχνευση επιτυγχάνεται 100 ως 1000 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία
- ✓ Υψηλή ακρίβεια (λόγω εκλεκτικότητας των ενζυμικών αντιδράσεων)
- ✓ Καλή επαναληψιμότητα
- ✓ Οικονομικές μέθοδοι (κυρίως μετά την εισαγωγή των ακινητοποιημένων ενζύμων)

Χρησιμοποιούνται:

- ✓ Ως εξειδικευμένοι καταλύτες για τον ποσοτικό προσδιορισμό υποστρωμάτων και για τη μέτρηση της ενεργότητας ενζύμων
- ✓ Για την ιχνηθέτηση (μέσω ομοιοπολικής πρόσδεσης) με ενζυμικά ανενεργές ουσίες (ανοσοσφαιρίνες, ολιγονουκλεοτίδια)
- ✓ Τεχνική ακινητοποίησης ενζύμων- προσέφερε σημαντικά στην εξέλιξη της ενζυματικής ανάλυσης

Ακινητοποιούνται ή εγκλείονται επί ή εντός αδρανούς υλικού (χωρίς απώλεια καταλυτικής δράσης)

Η χρήση των ακινητοποιημένων ενζύμων προσφέρει ιδιαίτερα στις αυτοματοποιημένες τεχνικές. Π.χ. – ακινητοποίηση της ουρεάσης ή οξειδάσης της γλυκόζης στο εσωτερικό τοίχωμα πλαστικού σωλήνα χρησιμοποιείται σε αυτόματους αναλυτές συνεχούς ροής για τον προσδιορισμό ουρίας και γλυκόζης στον ορό αίματος

Πλεονέκτημα – η επαναχρησιμοποίησή τους – μείωση κόστους αναλύσεων

ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ – ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Ένζυμα – ισχυρά διαγνωστικά εργαλεία στην Ιατρική

- ✓ Η συγκέντρωση διαφόρων ενζύμων στα κύτταρα παραμένει σε σχετικά σταθερά επίπεδα χάρη στην ισορροπία μεταξύ σύνδεσης και διάσπασης τους
- ✓ Μικρό ποσοστό από αυτά τα ένζυμα περνά στα υγρά του σώματος (αίμα, ούρα, κλπ)
- ✓ Στα υγιή άτομα οι ενεργότητες των ενζύμων μεταβάλλονται εντός στενών ορίων
- ✓ Σε παθολογικές καταστάσεις – η αποβολή ενζύμων αυξάνει ή ελαττώνεται χαρακτηριστικά
- ✓ Οι μεταβολές είναι ενδεικτικές για μια ασθένεια, βοηθούν στη διάγνωση, πρόγνωση και την αποτελεσματικότητα της θεραπείας

ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ – ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Μονάδες ενεργότητας ενζύμων (units of enzyme activity)

Ποσοτική έκφραση της ενεργότητας ενζύμων

- **Διεθνής Μονάδα (International unit, I.U.)**

Μία μονάδα (U) είναι η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει το μετασχηματισμό 1 micromole υποστρώματος ανά λεπτό υπό καθορισμένες συνθήκες (θερμοκρασία, pH, είδος ρυθμιστικού διαλύματος, συγκέντρωση υποστρώματος, παρουσία άλλων συστατικών, συνενζύμων κλπ)

- **Ειδική ενεργότητα (specific activity)**

Ο αριθμός μονάδων ενζύμου (U) ανά mg πρωτεΐνης

- **Μοριακή ενεργότητα (molecular activity)**

Ο αριθμός μορίων ενός υποστρώματος που μετασχηματίζονται από ένα μόριο ενζύμου ή ενεργού κέντρου ανά min

- **Katal (kat) (I.U.P.A.C.)**

Ποσότητα ενεργότητας ενζύμου η οποία μετατρέπει ένα γραμμομόριο (mol) υποστρώματος ανά δευτερόλεπτο (s) υπό ορισμένες συνθήκες

$1 \text{ kat} = 6 \times 10^7 \text{ IU}$ ή $1 \text{ IU} = 16,67 \text{ nkat}$

- **Στην κλινική Χημεία**

Μονάδες (U) ανά λίτρο (U/l ή mU/ml)

ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ – ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

(6 κατηγορίες, ανάλογα με το είδος των αντιδράσεων που καταλύουν)

1. ΟΞΕΙΔΟΡΕΔΟΥΚΤΑΣΕΣ (OXIDOREDUCTASES)	Οξειδώνουν ή ανάγουν τα αντίστοιχα υποστρώματα. Αφυδρογονάσες (δεϋδρογενάσες), οξειδάσες, υπεροξειδάσες, υδροξυλάσες, οξυγονάσες
2. ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΕΣ (TRANSFERASES)	Μεταφέρουν ομάδες (αμινομάδες, μεθυλομάδες, φωσφορικές ομάδες κλπ) από ένα δότη (συνένζυμο) σε ένα δέκτη (υπόστρωμα)
3. ΥΔΡΟΛΑΣΕΣ (HYDROLASES)	Υδρολύουν τα αντίστοιχα υποστρώματα. Ανάλογα με το είδος του δεσμού χαρακτηρίζονται ως: Εστεράσες, γλυκοσιδάσες, πεπτιδάσες κλπ.
4. ΛΥΑΣΕΣ (LYASES)	Αφαιρούν ομάδες από το υπόστρωμα χωρίς υδρόλυση με δημιουργία διπλών δεσμών ή προσθήκη ομάδων σε διπλούς δεσμούς. Καρβοξυλάσες, αμμωνιολυάσες (αποκαρβοξυλιώνουν ή απαμινώνουν, αντίστοιχα)
5. ΙΣΟΜΕΡΑΣΕΣ (ISOMERASES)	Καταλύουν ενδομοριακές μετακινήσεις ομάδων ή δεσμών
6. ΛΙΓΑΣΕΣ (ΣΥΝΘΕΤΑΣΕΣ) (LIGASES)	Συνθέτουν μόρια από απλούστερα υποστρώματα με δότη ενέργειας το ATP (συνένζυμο)

ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ – ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

- Κάθε ένζυμο χαρακτηρίζεται από ένα τετραψήφιο αριθμό (προς αποφυγή συγχύσεων λόγω εμπειρικών ονομασιών). Κάθε ψηφίο χαρακτηρίζει την κατηγορία, την τάξη, την ομάδα στην οποία ανήκει το ένζυμο, καθώς και τον αριθμό κατάταξης στην ομάδα.

Π.χ. ΟΥΡΕΑΣΗ – EC 3.5.1.5

EC (Enzyme Commission της IUB)

«3» – ανήκει στις υδρολάσες (είδος καταλυόμενης αντίδρασης)

«3.5» - υδρολύει δεσμούς C-N (όχι όμως πεπτιδικούς) (γενικός τύπος υποστρώματος η ομάδας)

«3.5.1» - υδρολύει αμίδια με γραμμική άλυσσο (ειδικός τύπος υποστρώματος η συνένζυμο)

«3.5.1.5» - σειρά κατάταξης στην ομάδα

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

- Θερμοκρασία
- pH
- Παρουσία άλλων ηλεκτρολυτών
- Αναστολείς, επιβραδυντές (inhibitors), π.χ. άλατα βαρέων μετάλλων

✓ Θερμοκρασία

Η επίδραση είναι πολύπλοκη και σχετίζεται και με άλλους παράγοντες

- Σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (20 -50 °C) - η αύξηση θερμοκρασίας κατά 1 °C αυξάνει την ενεργότητα κατά 4-10%

- Σε υψηλότερες θερμοκρασίες – βαθμιαία απενεργοποίηση του ενζύμου, λόγω αποδιάταξης της στερεοχημικής δομής

- Εμπειρική σχέση μεταξύ σταθεράς ταχύτητας και θερμοκρασίας

$$\log k = \frac{a - b}{T}$$

a και b – σταθερές για τη δεδομένη αντίδραση
T – απόλυτη θερμοκρασία

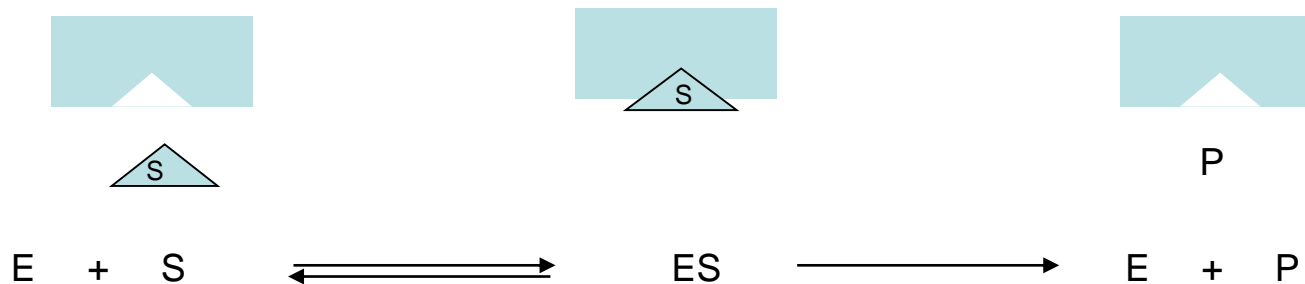
ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ – ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

- **30 °C** - η θερμοκρασία που ορίστηκε από την IUB (Διεθνής Ένωση Βιοχημείας) για τη μέτρηση της ενεργότητας ενζύμων
- **37 °C** – Μετρήσεις ενεργότητας στην κλινική ανάλυση (φυσιολογική θερμοκρασία ανθρώπινου σώματος)
- **pH – Ρυθμιστικά διαλύματα**
 - ✓ βέλτιστη καταλυτική δράση ενζύμων εντός στενής περιοχής τιμών pH-ασθενώς όξινο – ασθενώς αλκαλικό περιβάλλον (pH 6,0 – 10,0)
 - ✓ σπάνια, σε ισχυρά όξινο ή αλκαλικό περιβάλλον (πεψίνη – pH 1,5-2,5, δεσοξυριβονουκλεάση μεταξοσκώληκα – pH 11)
 - ✓ το βέλτιστο pH εξαρτάται: από το είδος και την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος

ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ – ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

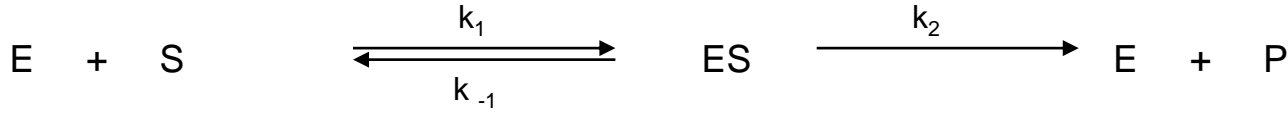
ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ (ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΕΝΖΥΜΟΥ-ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ)

- Η δράση των ενζύμων βασίζεται στο σχηματισμό ενδιάμεσου συμπλόκου με το υπόστρωμα
- Το σύμπλοκο στη συνέχεια διασπάται δίνοντας το τελικό προϊόν της αντίδρασης και το ελεύθερο ένζυμο
- Η σύνδεση ενζύμου υποστρώματος γίνεται στα «ενεργά κέντρα» του ενζύμου
- Η ταχύτητα της ενζυματικής αντίδρασης καθορίζεται από:
 - α) την ταχύτητα σχηματισμού του ES
 - β) την ταχύτητα σχηματισμού του προϊόντος P

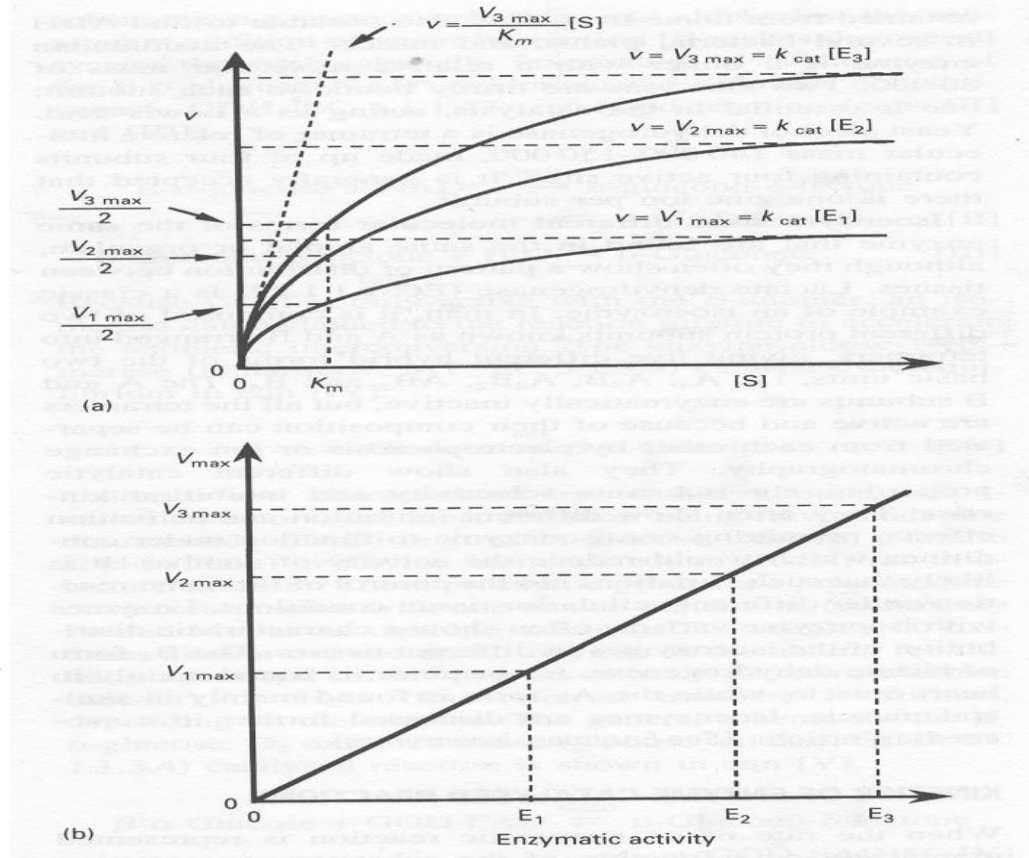


ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

Συγκέντρωση υποστρώματος



- (α) Επίδραση συγκέντρωσης υποστρώματος [S] επί της ενεργότητας του ενζύμου – ταχύτητα καταλυόμενης αντίδρασης $V = \Delta [S] / \Delta t$ (μmol/min ή U) (τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου)
- (Ορθογώνια υπερβολή)
- Τυπική καμπύλη ποσοτικοποίησης της ενζυμικής ενεργότητας



ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

- Η μαθηματική έκφραση της καμπύλης (α) αναπτύχθηκε στις αρχές του 1900 από τους γερμανούς βιοχημικούς **Michaelis και Menten**
- Σύμφωνα με τους **Michaelis και Menten**:
 Το σύμπλοκο, ES, βρίσκεται σε ισορροπία με το ελεύθερο ένζυμο, E και το υποστρώμα, S και ο σχηματισμός του προϊόντος P μπορεί να λάβει χώρα μόνο μέσω του συμπλόκου ES



Η εξίσωση **Michaelis – Menten** για την ταχύτητα της αντίδρασης έχει ως εξής:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_S + [S]} \quad (1)$$

Όπου, v – ταχύτητα αντίδρασης ($v = k_2 [ES]$)

$[S]$ – συγκέντρωση υποστρώματος

V_{\max} – μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης ($V_{\max} = k_2 [E_t]$)

K_S – σταθερά διάστασης $[ES]$ ($K_S = \frac{[E][S]}{[ES]}$)

ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

- Αρχή ισόρροπης κατάστασης (steady state) (Briggs και Haldane, 1925)

- αποκαθίσταται αμέσως μετά την ανάμιξη E και S
- η συγκέντρωση του ES είναι σχεδόν σταθερή
- το S είναι σε μεγάλη περίσσεια σε σχέση με το E
- η [S] είναι περίπου ίση με την αρχική
- η k_{-2} μπορεί να αγνοηθεί λόγω μικρής ποσότητας του [ES]

Οπότε για την ταχύτητα σχηματισμού, V_f του [ES] έχουμε:

$$V_f = k_1[E][S] = k_1([E_t] - [ES])[S] \quad (2)$$

όπου, E_t – η ολική συγκέντρωση ενζύμου
 $[E_t] - [ES]$ – η ελεύθερη συγκέντρωση του ενζύμου

Η ταχύτητα διάστασης V_d του ES είναι:

$$V_d = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (3)$$

Όταν $V_f = V_d$ ([ES] περίπου σταθερή), από (2) και (3) έχουμε:

$$k_1([E_t] - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (4)$$

και μετά από μετασχηματισμό:

ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

$$\frac{[S]([E_t] - [ES])}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m \quad (5)$$

Η σταθερά K_m ονομάζεται σταθερά **Michaelis**

Η εξίσωση των **Briggs – Haldane** για την ταχύτητα της αντίδρασης έχει ως εξής:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{ή} \quad K_m = [S] \left(\frac{V_{\max}}{v} - 1 \right) \quad (6)$$

Η αριστερή εξίσωση είναι ίδια με την εξίσωση (1) των **Michaelis-Menten** εκτός της αντικατάστασης της K_s (k_{-1}/k_1) με την πιο σύνθετη σταθερά K_m , $\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$

Ισχύει μόνο αν $k_{-1} \gg k_2$, διαφορετικά, K_m θα είναι $>$ της K_s

Όλα τα παραπάνω αναφέρονται στην απλούστερη περίπτωση ενός ενζύμου – ενός υποστρώματος.

Η μαθηματική ανάλυση σε συστήματα με δύο ή τρία υποστρώματα είναι πιο πολύπλοκη

ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΑΣ MICHAELIS, K_m

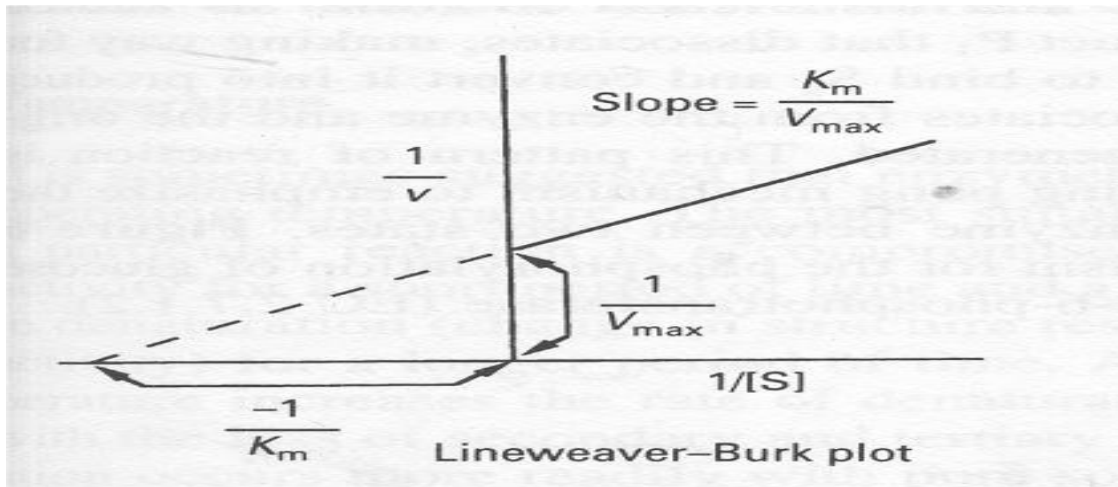
$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

- σημαντική παράμετρος της ενζυματικής ανάλυσης – δηλώνει συγγένεια μεταξύ ενζύμου – υποστρώματος
- σταθερά ενζύμου για δεδομένο υπόστρωμα υπό καθορισμένες συνθήκες και δεν επηρεάζεται από την ενεργότητα του ενζύμου
- υπολογίζεται από την εξίσωση (6) όταν $v = V_{\max}/2$
- έχει μονάδες συγκέντρωσης που κυμαίνονται μεταξύ $10^{-1} - 10^{-6}$ mol/l
- μικρή τιμή K_m δηλώνει μεγάλη συγγένεια ενζύμου υποστρώματος
- όταν $[S] \ll K_m$ – η ταχύτητα αντίδρασης είναι ευθέως ανάλογη της $[S]$ (αντίδραση πρώτης τάξης)
- όταν $[S] \gg K_m$ – η ταχύτητα αντίδρασης καθίσταται ανεξάρτητη της $[S]$ (αντίδραση μηδενικής τάξης)
- όταν $[S] = K_m$ – η ταχύτητα της αντίδρασης $v = V_{\max}/2$
- Η ενεργότητα του ενζύμου επηρεάζει την τιμή της V_{\max}

ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

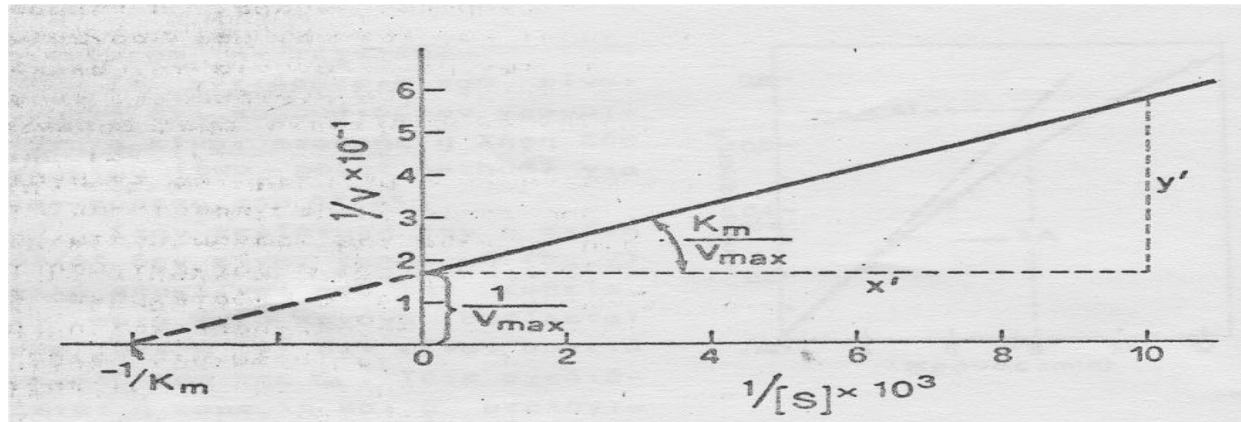
Η K_m και η V_{max} υπολογίζονται με ακρίβεια μετατρέποντας την εξίσωση (6) στην εξίσωση Lineweaver - Burk

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (7)$$



ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

Παραδείγματα υπολογισμών K_m , V_{max} , ταχύτητας αντίδρασης



Η V_{max} υπολογίζεται γραφικά από την $1/V_{max}=1,7 \times 10^{-1}$ και $V_{max}=5,9$ και $K_m = V_{max} y'/x' = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$

Γνωρίζοντας την K_m υπολογίζουμε την ταχύτητα της ενζυματικής αντίδρασης βάσει της εξίσωσης (6) για οποιαδήποτε συγκέντρωση υποστρώματος.

Έστω $K_m = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ και $[S] = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$, τότε για $V_{max} = 5,9$, βάσει εξίσωσης (6) $v = 5,4$, δηλαδή το 91,5% της μέγιστης ταχύτητας

Στο παραπάνω παράδειγμα το 91,5% επιτυγχάνεται με $[S] = 10 \times K_m = 10 \times 2,5 \times 10^{-4} = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$.

ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

Με μετασχηματισμό της εξίσωσης (7) λαμβάνεται η εξίσωση **Eadie – Hofstee**:

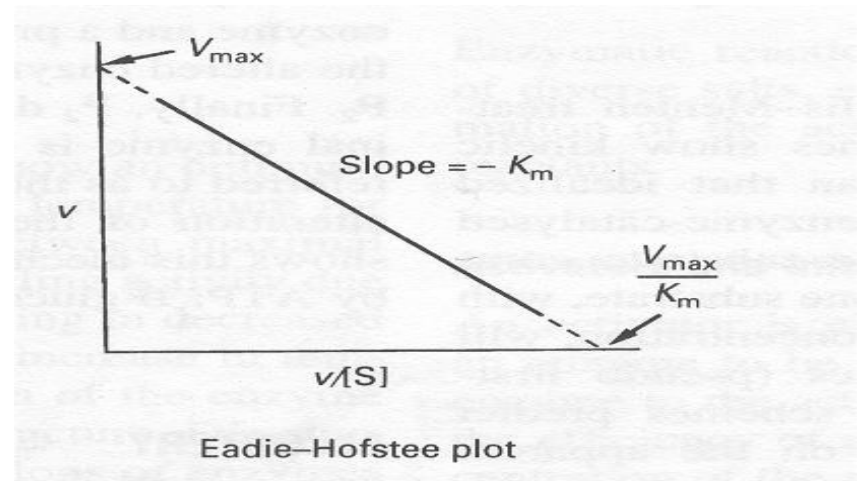
$$v = V_{\max} - \frac{K_m v}{[S]} \quad (8)$$

Αυτή η γραφική παράσταση πλεονεκτεί έναντι της γραφικής παράστασης **Lineweaver-Burk** στο ότι τα πειραματικά δεδομένα σε όλη την περιοχή συγκεντρώσεων έχουν τον ίδιο συντελεστή βαρύτητας.

Εκτός από την K_m και την V_{\max} , ο όρος αριθμός ανακύκλισης του ενζύμου, k_{cat} , δείχνει το μέγιστο αριθμό μορίων του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν σε κάθε ενεργό κέντρο ανά μονάδα χρόνου, ή πόσες φορές το ένζυμο ανακυκλώνεται ανά μονάδα χρόνου αν είναι κορεσμένο με το υπόστρωμα.

Τα περισσότερα ένζυμα *in vivo* δε λειτουργούν σε συνθήκες κορεσμού με το υπόστρωμα και ο λόγος k_{cat}/K_m ($\text{mol}^{-1} \text{l s}^{-1}$) αποτελεί άμεσο μέτρο της ταχύτητας της ενζυματικής αντίδρασης.

Ο λόγος k_{cat}/K_m ονομάζεται και **σταθερά εξειδίκευσης**.



ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

ΑΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

- Συνένζυμα, ενεργοποιητές (activators), επιβραδυντές (inhibitors)
- Επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά την ενεργότητα των ενζύμων
- Συνένζυμα- πρέπει να προστίθενται στην αντίδραση σε ικανοποιητικές ποσότητες και να είναι χημικώς καθαρά
- Επιβραδυντές (ιόντα βαρέων μετάλλων)
- Σε ορισμένες περιπτώσεις- απαραίτητη η παρουσία ιόντων μετάλλων για την ολοκλήρωση της ενζυματικής αντίδρασης (Mg^{2+} για αντιδράσεις φωσφατασών, Mn^{2+} για αντιδράσεις πεπτιδασών κλπ)

ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΕΝΖΥΜΩΝ

- Βασίζεται στον προσδιορισμό της ποσότητας υποστρώματος που μετατρέπεται στη μονάδα χρόνου υπό αυστηρά καθορισμένες συνθήκες
- Συνθήκες:
 - $[S] \gg K_m$
 - $v \sim V_{max}$ και $V = k [E] \sim V_{max}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}$)

Τεχνικές μέτρησης:

Φωτομετρία, Φθορισμομετρία (μεταβολή A ή F ανάλογη συγκέντρωσης υποστρώματος)

ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΕΝΖΥΜΩΝ

Έναρξη μέτρησης – με την προσθήκη υποστρώματος ή συνενζύμου

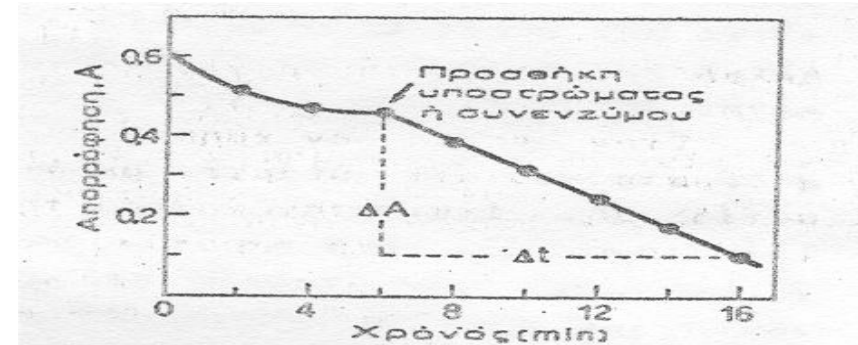
Μετρούμενη μονάδα – $\Delta A/\Delta t$

(Σχ. 1)

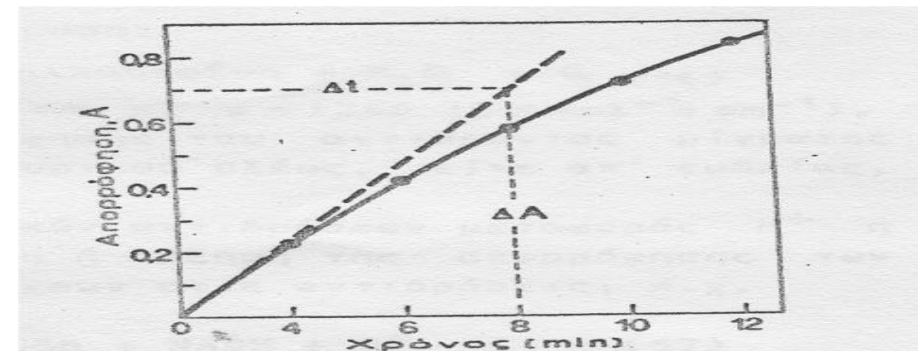
Μετρήσεις σε χρονικά διαστήματα 30 s ή 60 s (600 s και 1200 s για πολύ αργές αντιδράσεις). Συνολικός χρόνος μέτρησης 3 ως 20 min

Συνήθως επαρκεί η λήψη δύο σημείων (two-point method) για την εύρεση του $\Delta A/\Delta t$

Σε περίπτωση μη γραμμικής σχέσης ($[S]$ δεν είναι αρκετά μεγαλύτερη της K_m) – μέτρηση της αρχικής ταχύτητας (Σχ. 2)



Σχ. 1 Καμπύλη απορρόφησης – χρόνου για τον προσδιορισμό της ενεργότητας ενζύμου.



Σχ. 2 Καμπύλη απορρόφησης – χρόνου για ενζυματική αντίδραση με μικρή συγκέντρωση υποστρώματος.

ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

- Τελικός υπολογισμός της ενεργότητας (φωτομετρικά δεδομένα)

$$A = \varepsilon b C \quad \eta \quad C = \frac{A}{\varepsilon b} \quad (9)$$

A – απορρόφηση

ε – συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας ($\text{mmol}^{-1} \text{ l mm}^{-1}$)

b – πάχος κυψελίδας (mm)

C – συγκέντρωση ουσίας (mmol l^{-1})

Για μεταβολή συγκέντρωσης

$$\Delta C = C_1 - C_2 = \frac{\Delta A}{\varepsilon b} (\text{mmol l}^{-1}) \quad (10)$$

ενεργότητα ($\mu\text{mol min}^{-1}$, U) =

$$\frac{\Delta C \times V}{\Delta t} = \frac{\Delta A \times V \times 1000}{\varepsilon \times b \times \Delta t} \quad (11)$$

V – όγκος μετρούμενου διαλύματος σε l

ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Παράδειγμα:

Υπολογισμός ενεργότητας γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) σε ορό αίματος με πυροσταφυλικό οξύ και NADH

Βασίζεται στη μέτρηση ταχύτητας οξειδωσης του NADH σε NAD:

$$\lambda = 365 \text{ nm}, b=10\text{mm}, \epsilon = 0,340 \text{ l mmol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$$

$$\Delta A/\Delta t = 0,100 / 8 \text{ min}, V_{\text{κυψ}} = 3,0 \text{ ml και } V_{\text{δείγματος}} = 0,02 \text{ ml}$$

Να υπολογιστεί η ενεργότητα του LDH σε $\mu\text{mol}/\text{min}$ (U) και σε U/100ml ορού

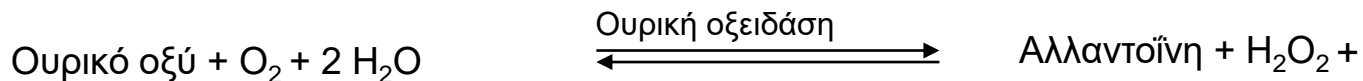
$$\text{βάση της σχέσης (11) η ενεργότητα LDH} = (0,100 \times 3,0 \times 10^{-3} \times 1000) / (0,34 \times 10 \times 8) = 0,011 \text{ U}$$

$$\text{ενεργότητα LDH σε 100 ml ορού} = 0,011 \times 100 / 0,02 = 55 \text{ U} / 100 \text{ ml}$$

ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

Μέθοδος τελικού σημείου (Μέτρηση μετά το πέρας της αντίδρασης)

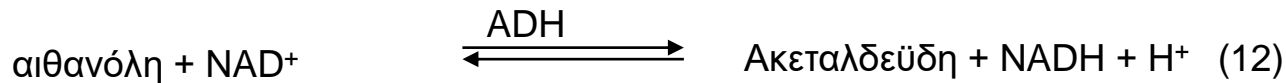


Ουρικό οξύ: $\lambda = 293 \text{ nm}$, $\epsilon = 1260 \text{ mol}^{-1} \text{ l mm}^{-1}$

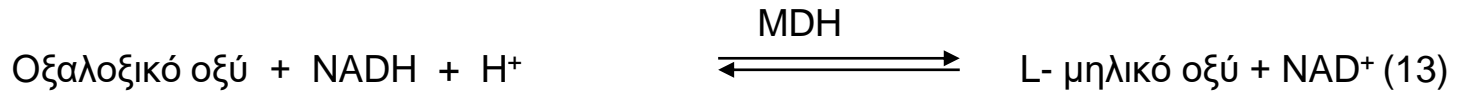
Μέτρηση συγκέντρωσης (μείωση απορρόφησης) απευθείας ή από καμπύλη αναφοράς

ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Σε ενζυμικές αντιδράσεις μεταφοράς H^+ μετράται η μείωση ή η αύξηση της απορρόφησης των συνενζύμων NAD ή $NADP$ που συμμετέχουν στην αντίδραση



(ADH – αλκοολική αφυδρογονάση)



(MDH – μηλική αφυδρογονάση)

Παράδειγμα:

Προσδιορισμός πυροσταφυλικού οξέος στο αίμα

Αποπρωτεΐνωση δείγματος

Προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος (τελική αραίωση δείγματος 2,5 φορές)

$V_s = 2,0 \text{ ml}$, $V_t = 2,1 \text{ ml}$, $b = 1 \text{ cm}$, $\lambda = 340 \text{ nm}$, $\Delta A = 0,150$, $\epsilon = 6,3 \text{ mmol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$, $MW = 88,06$

$$C = \frac{\Delta A}{\epsilon b} \times \frac{V_t}{V_s} \times 2,5 \times MW / 10 = 0,55 \text{ mg} / 100 \text{ ml}$$

ENZYMATIKH ANALYSEH

KINHΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Μέτρηση ταχύτητας αντίδρασης –

αντιδράσεις πρώτης ή ψευδοπρώτης τάξης οι πιο κατάλληλες για κινητικούς προσδιορισμούς

- Από την εξίσωση **Michaelis – Menten** και για $[S] \ll K_m$ προκύπτει ότι:

$$v = \frac{V_{\max}}{K_m} \times [S] = k' \times [S]$$

Σε μικρές συγκεντρώσεις υποστρώματος ($0,05 < [S] / K_m < 0,2$) οι ενζυματικές αντιδράσεις ενός υποστρώματος θεωρούνται ψευδοπρώτης τάξης και

$$- \frac{d[S]}{dt} = k[S] = k[S]_0 e^{-kt}$$

Με ολοκλήρωση προκύπτει:

$$[S]_0 = - \frac{\Delta[S]}{(e^{-kt_1} - e^{-kt_2})}$$

$[S]$ - συγκέντρωση υποστρώματος που μετασχηματίστηκε σε χρόνο t ,

$[S]_0$ – αρχική συγκέντρωση υποστρώματος

$\Delta [S]$ – μεταβολή συγκέντρωσης υποστρώματος στο διάστημα $\Delta t = t_2 - t_1$

k – σταθερά ταχύτητας

ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

- Υπό αυτές τις συνθήκες η μεταβολή συγκέντρωσης $\Delta[S]$ σε χρονικό διάστημα Δt είναι ευθέως ανάλογη της $[S]_0$ για δεδομένη σταθερά k και υπό αυστηρή μέτρηση των χρόνων t_1 και t_2 . Η τεχνική αυτή ονομάζεται μέθοδος **σταθερού χρόνου (fixed-time)** και απαιτεί τη χρήση ενός μόνο προτύπου για την εκτέλεση του προσδιορισμού.

Χρησιμοποιούνται επίσης:

Μέθοδος αρχικής ταχύτητας

(αυτόματη καταγραφή μιας φυσικοχημικής παραμέτρου που σχετίζεται με τη συγκέντρωση συναρτήσει χρόνου)

Μέθοδος σταθερής συγκέντρωσης ή μεταβλητού χρόνου

(αυτόματη καταγραφή του χρόνου που απαιτείται ώστε η συγκέντρωση να φτάσει μια καθορισμένη τιμή. Δηλαδή ο χρόνος είναι αντιστρόφως ανάλογος της συγκέντρωσης)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. D Voet, JG Voet, Biochemistry, 2nd Ed, J Wiley, New York, 1995
2. Κ Δημόπουλος, Σ Αντωνοπούλου, Βασική Βιοχημεία, Αθήνα, 2000
3. DW Burden, DB Whitney, Biotechnology: Proteins to PCR: A course in strategies and lab techniques, Birkhauser, Boston, 1995
4. Handbook, Protein Purification, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, 1999
5. Encyclopedia of Analytical Science, Vol. 2, p. 1171- , Academic Press, New York, 1995
6. A Cornish-Bowden and CW Wharton, Enzyme kinetics, IRL Press Ltd, New York, 1985
7. RL Dryer, GF Lata, Experimental Biochemistry, Oxford Univ Press, New York, 1989
8. RK Scopes, Protein Purification, Principles and Practice, 3d Ed, Springer, New York, 1994
9. JM Clark, Jr and RL Switzer, Πειραματική Βιοχημεία, Παν/μιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1992
10. ΘΠ Χατζηϊωάννου, ΜΑ Κουππάρης, Ενόργανη Ανάλυση, Αθήνα, 1990
11. ΕΦ Διαμαντής, ΠΑ Σίσκος, Α Παπαναστασίου-Διαμαντή, Μαθήματα Κλινικής Χημείας, Εκδόσεις Λύχνος, Αθήνα, 1987