

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

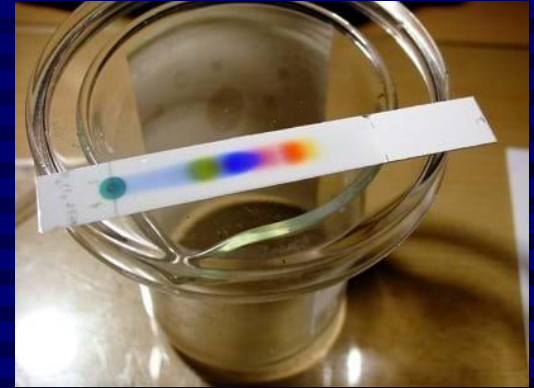
ΜΕΘΟΔΟΙ
ΕΝΟΡΓΑΝΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ
ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Η. ΒΥΝΙΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

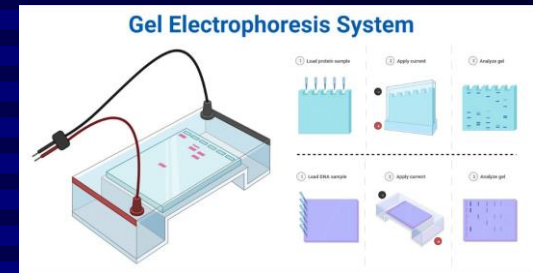
ΠΑΤΡΑ 2023

Μέθοδοι ανάλυσης βιομορίων

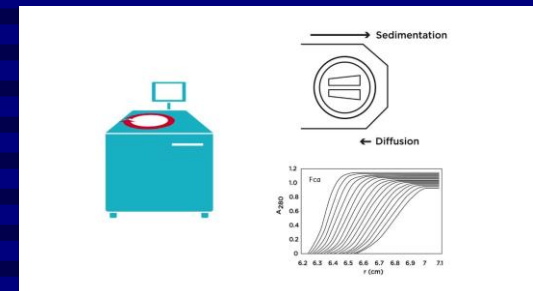
- Χρωματογραφία



- Ηλεκτροφόρηση



- Φυγοκέντρηση

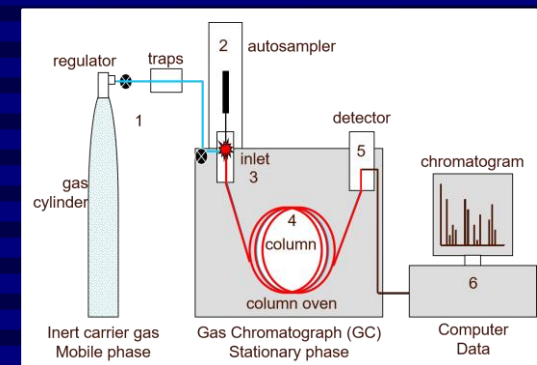
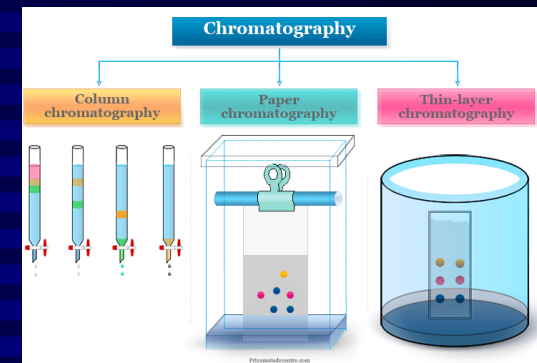


Χρωματογραφία – Ταξινόμηση

❖ Ανάλογα με τη φυσική κατάσταση της κινητής φάσης

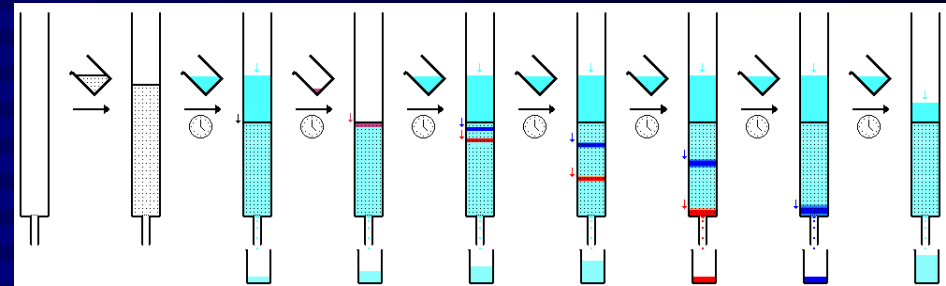
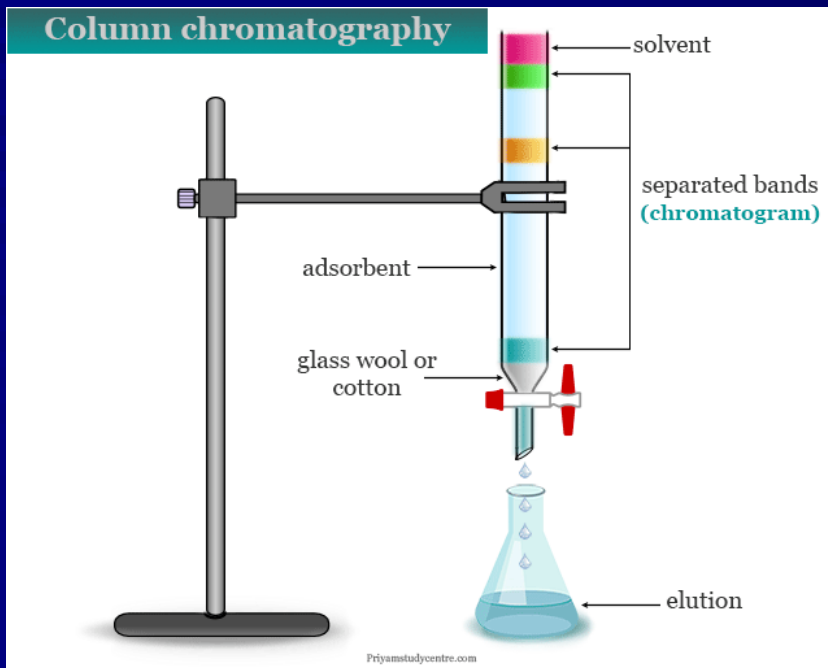
❖ Υγρή χρωματογραφία

❖ Αέρια χρωματογραφία



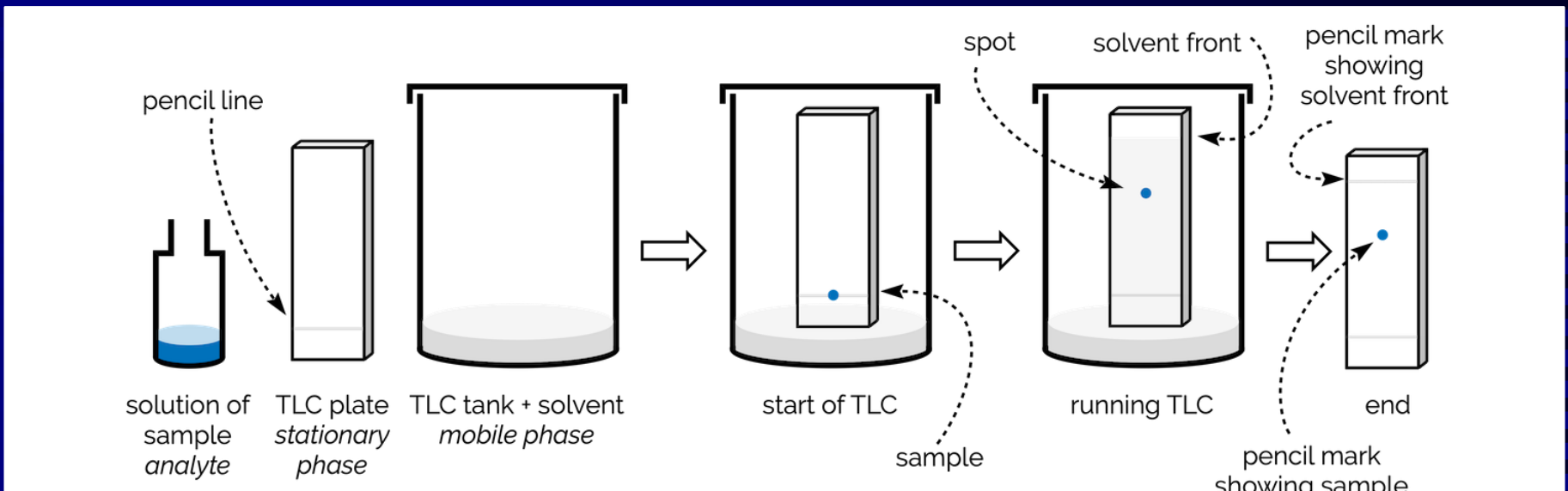
Χρωματογραφία – Ταξινόμηση

- ❖ Ανάλογα με τη μορφή της στατικής φάσης
 - ❖ Χρωματογραφία στήλης



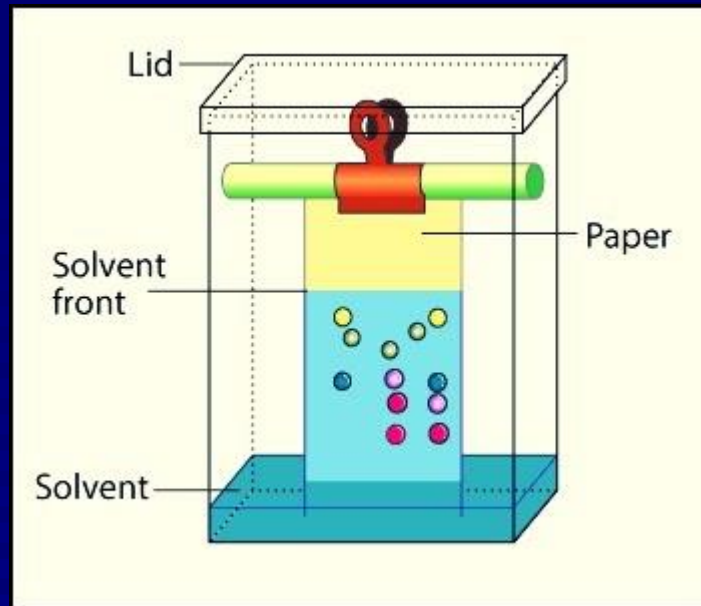
Χρωματογραφία – Ταξινόμηση

- ❖ **Ανάλογα με τη μορφή της στατικής φάσης**
 - ❖ Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (επίπεδη χρωματογραφία)



Χρωματογραφία – Ταξινόμηση

- ❖ **Ανάλογα με τη μορφή της στατικής φάσης**
 - ❖ Χρωματογραφία επί χάρτου (επίπεδη χρωματογραφία)



Χρωματογραφία – Ταξινόμηση

- ❖ **Ανάλογα με το φαινόμενο που παρατηρείται μεταξύ της στατικής φάσης και των προς διαχωρισμό μορίων**
 - ❖ **Χρωματογραφία προσρόφησης**
 - ❖ Η στατική φάση έχει **προσροφητικές** ιδιότητες
 - ❖ **Χρωματογραφία κατανομής**
 - ❖ Η στατική φάση δεν έχει προσροφητικές ιδιότητες, αλλά εμφανίζει **διαφορετικές ιδιότητες ως προς τον διαλύτη**
 - ❖ **Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων**
 - ❖ Η στατική φάση είναι μια ρητίνη, οπότε πραγματοποιείται **ανταλλαγή ιόντων** ίδιου φορτίου ανάμεσα στο μίγμα προς διαχωρισμό και στη ρητίνη

Διαδικασία Χρωματογραφικού Διαχωρισμού

- ❖ Κάθε συστατικό του δείγματος διαμοιράζεται στις δύο φάσεις (κινητή και στατική, οι οποίες δεν αναμιγνύονται) και αποκαθίσταται μια ισορροπία
- ❖ Η κατανομή κάθε συστατικού στις δύο φάσεις εξαρτάται από τις ιδιότητες του συστατικού σε σχέση με τις δύο φάσεις
- ❖ Η συνεχής ροή της κινητής φάσης (διαλύτης) προκαλεί μετακίνηση των συστατικών κατά μήκος της ακίνητης φάσης
- ❖ Ο διαχωρισμός των επί μέρους συστατικών του μίγματος επιτυγχάνεται λόγω της διαφορετικής ταχύτητας μετακίνησης κάθε συστατικού

Χρωματογραφία

□ Λεπτής στοιβάδας

- Διαχωρισμός μορίων μικρής μοριακής μάζας
- Κίνηση μέσα σε στρώμα αδρανούς υλικού υπό την επίδραση διαλύτη ειδικού για τα προς διαχωρισμό μόρια
 - Διοξείδιο του πυριτίου, κυτταρίνη (απλή ή τροποποιημένη)

□ Χάρτου

- Διαχωρισμός μορίων μικρής μοριακής μάζας
- Κίνηση υπό την επίδραση διαλύτη ειδικού για τα προς διαχωρισμό μόρια

□ Στήλης

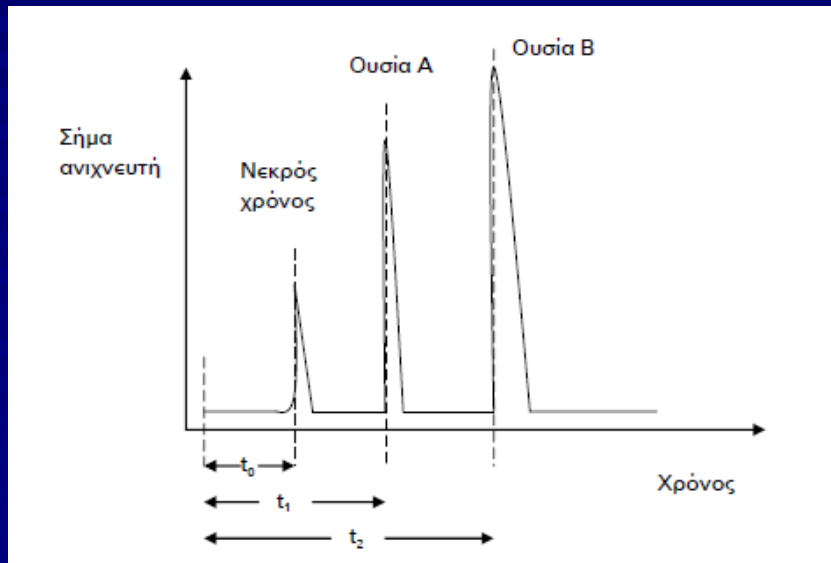
- Διαχωρισμός μορίων εύρους μοριακών μαζών
- Διαχωρισμός μορίων διαφορετικού φορτίου
- Διαχωρισμός μορίων με εξειδικευμένες ιδιότητες (ένζυμα, αντισώματα, κλπ)

□ HPLC

□ Αέρια

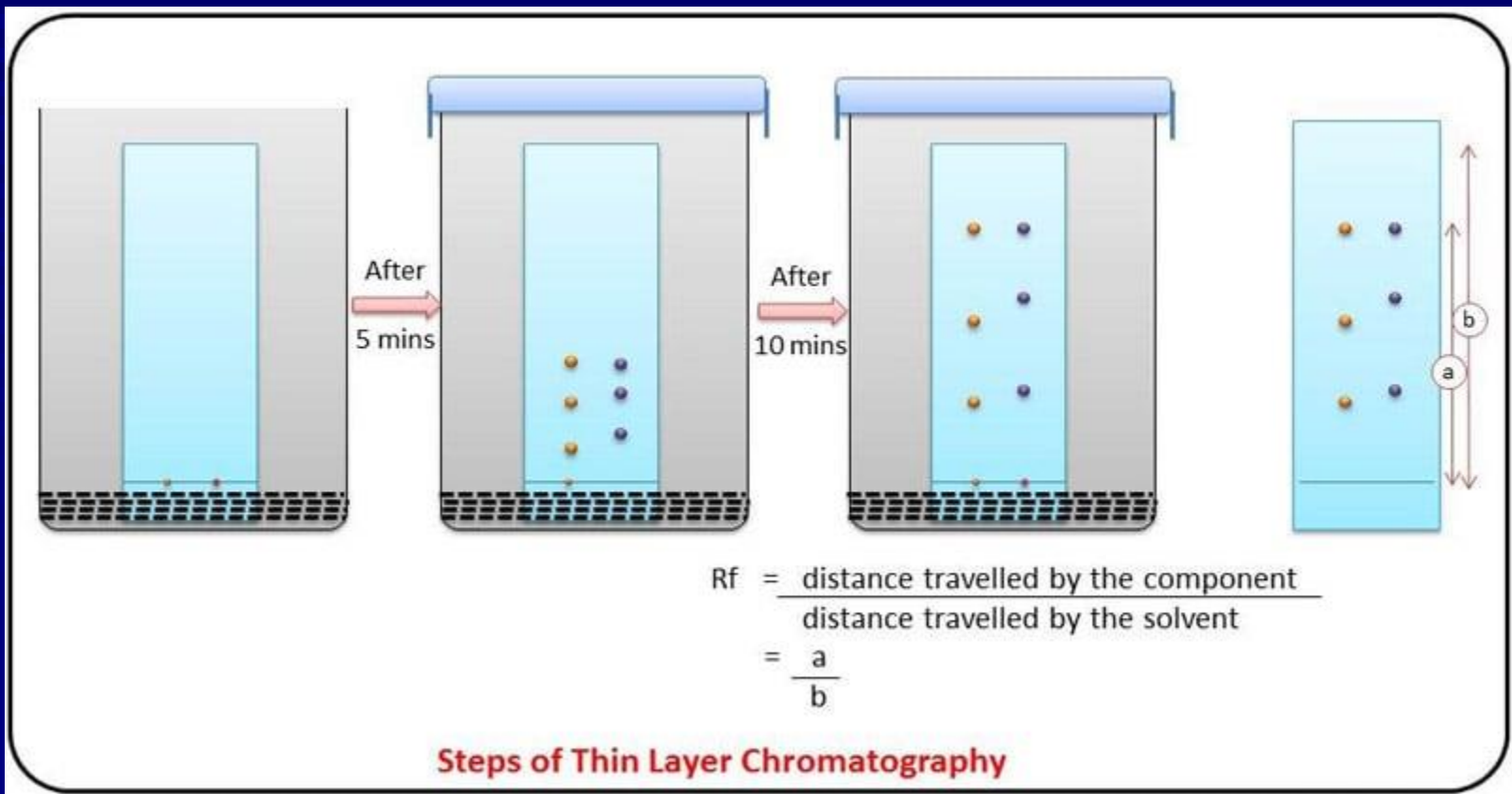
- Οποιαδήποτε συστατικά μπορούν να ατμοποιηθούν

Μεγέθη και Ορισμοί στη Χρωματογραφία



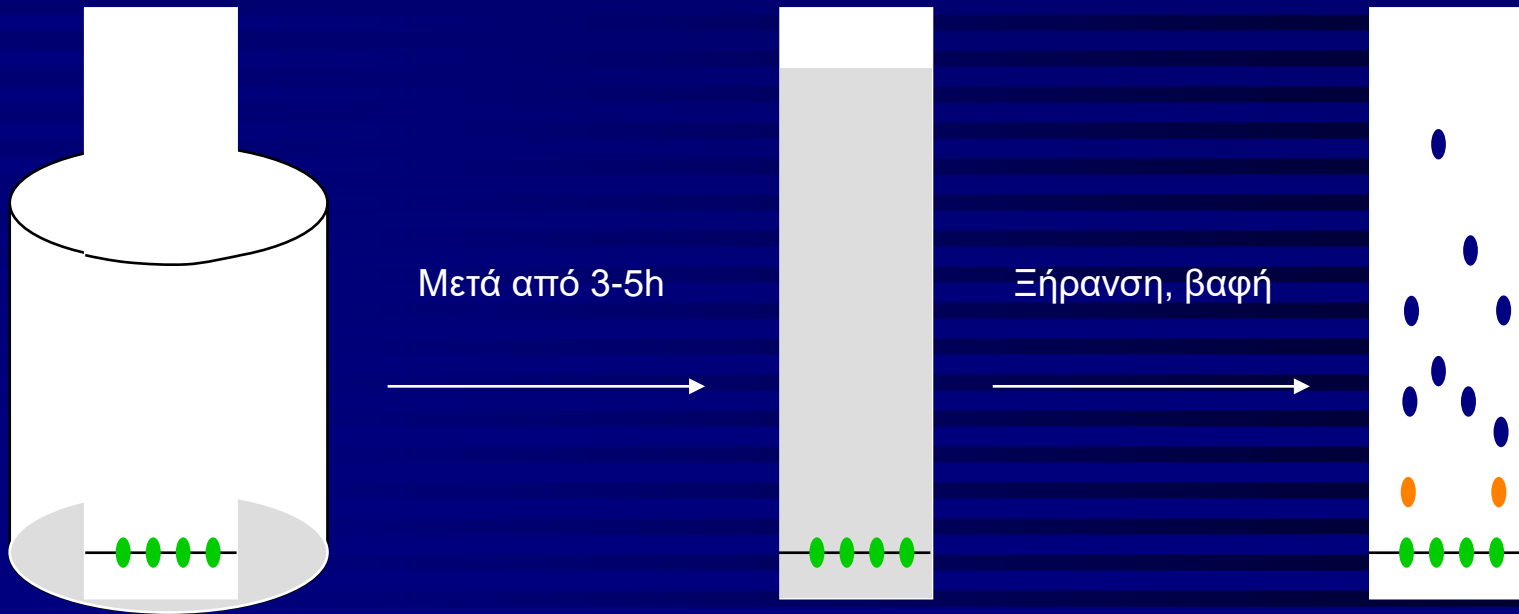
- **Χρόνος ανάσχεσης:** ο χρόνος που απαιτείται για την έξοδο ή καταγραφή του αναλύομένου συστατικού
- **Νεκρός χρόνος:** ο χρόνος που απαιτείται για την έξοδο ή καταγραφή συστατικού που δεν κατακρατείται
- **Συντελεστής διαχωρισμού** $\alpha = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0}$ δύο συστατικών: εκφράζει το μέτρο της ευκολίας ή δυσκολίας διαχωρισμού κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες
- **Διαχωριστικότητα:** εκφράζει $R_s = \frac{2 \cdot (t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}$ το μέτρο διαχωρισμού δύο συστατικών και σχετίζεται με το εύρος της βάσης κάθε κορυφής – όταν $R_s = 1,5$ υπάρχει πλήρης διαχωρισμός

Χρωματογραφία χάρτου/λεπτής στοιβάδας



Χρωματογραφία χάρτου/λεπτής στοιβάδας

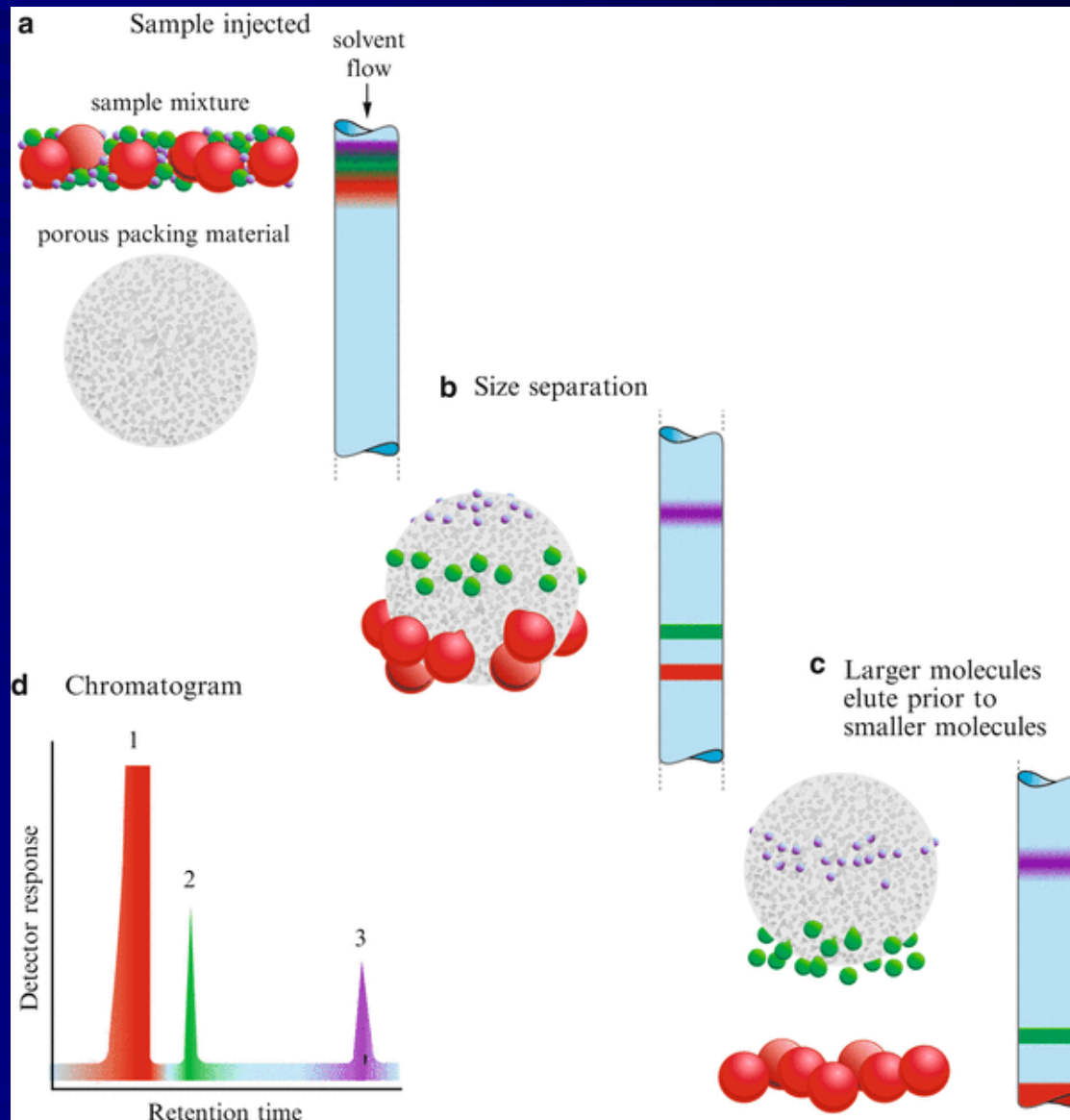
Εφαρμογές: Ανάλυση αμινοξέων σε υδρολύματα πρωτεϊνών



Χρωματογραφία στήλης

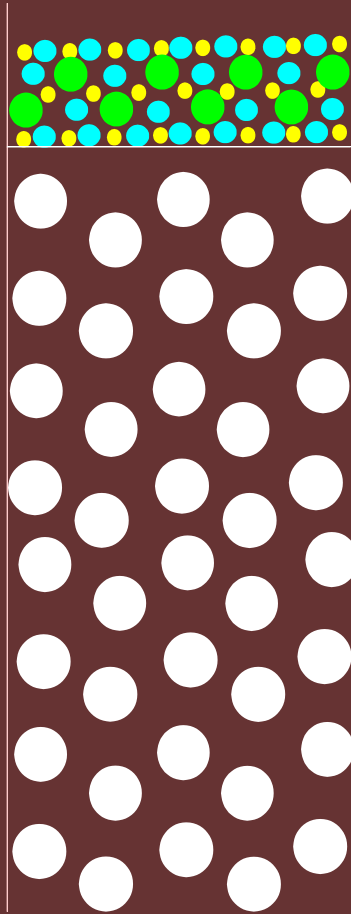
- Πρόκειται για τις καλύτερες και αποτελεσματικότερες μεθοδολογίες
 - Μοριακής διήθησης ή μοριακής εισχώρησης
 - Με χρήση δυσδιάλυτων πορωδών πολυμερών
 - Ιοντικής ανταλλαγής
 - Κυρίως υποκατεστημένες κυτταρίνες ή δεξτράνια. Απαραίτητη η σωστή ρύθμιση του pH και της ιονικής ισχύος
 - Προσρόφησης
 - Συνήθως υδροξυαπατίτης
 - Αγχιστείας
 - Το στερεό υπόστρωμα φέρει ως συνδέτη μια ουσία που αλληλοεπιδρά (υποδοχέας/συνδέτης, ανάλογο του υποστρώματος, αναστολέας, κ.α.) με τα προς ανάλυση μόρια

Χρωματογραφία μοριακής διήθησης



Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

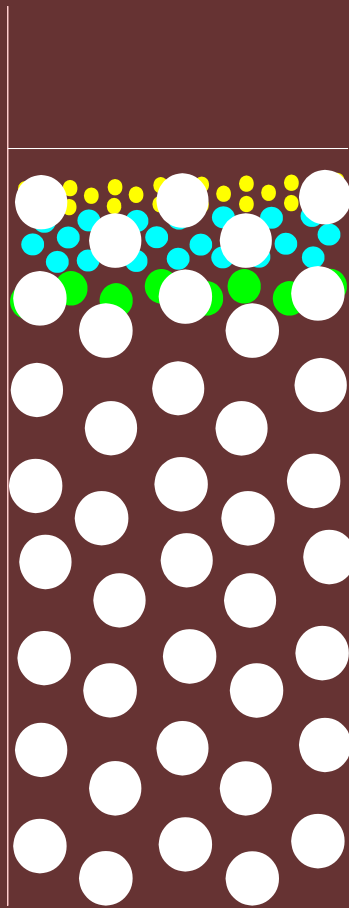
Χρωματογραφία μοριακής εισχώρησης



Το δείγμα (μίγμα
μορίων διαφορετικού
υδροδυναμικού όγκου)
τοποθετείται στη στήλη

Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

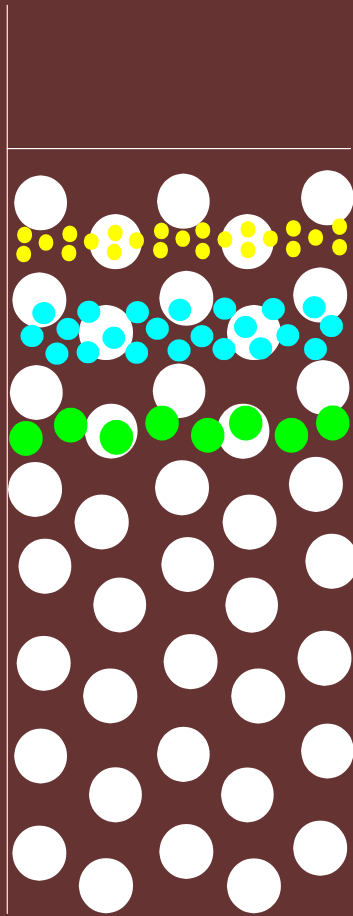
Χρωματογραφία μοριακής εισχώρησης



Η χρωματογραφία αναπτύσσεται και το μίγμα των μορίων αρχίζει να διαχωρίζεται

Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

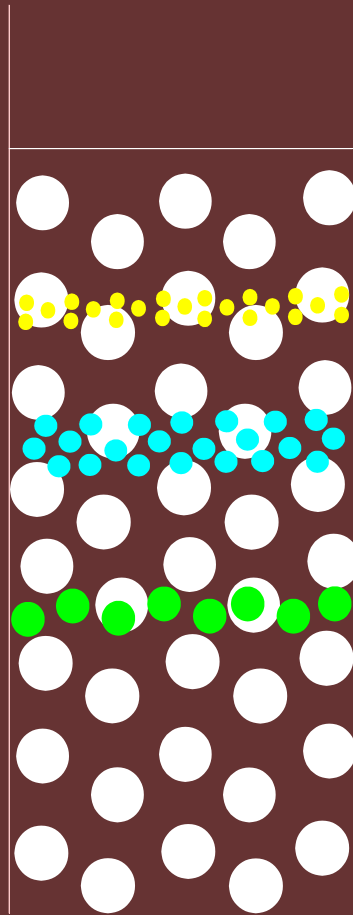
Χρωματογραφία μοριακής εισχώρησης



Η χρωματογραφία αναπτύσσεται και το μίγμα των μορίων αρχίζει να διαχωρίζεται

Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Χρωματογραφία μοριακής εισχώρησης

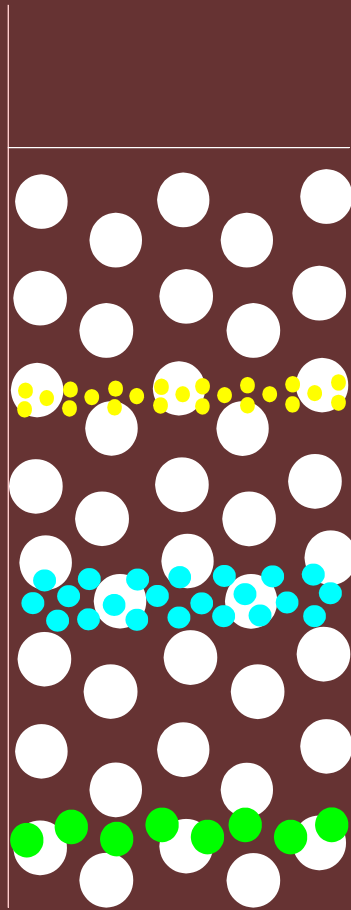


Κατά την ανάπτυξη της χρωματογραφίας, τα διαχωριζόμενα μόρια κινούνται υπό τη μορφή ζώνης

Τα μεγαλύτερου υδροδυναμικού μεγέθους μόρια κινούνται ταχύτερα, ακολουθούμενα από τα υπόλοιπα μόρια σε σειρά μειούμενου υδροδυναμικού μεγέθους

Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

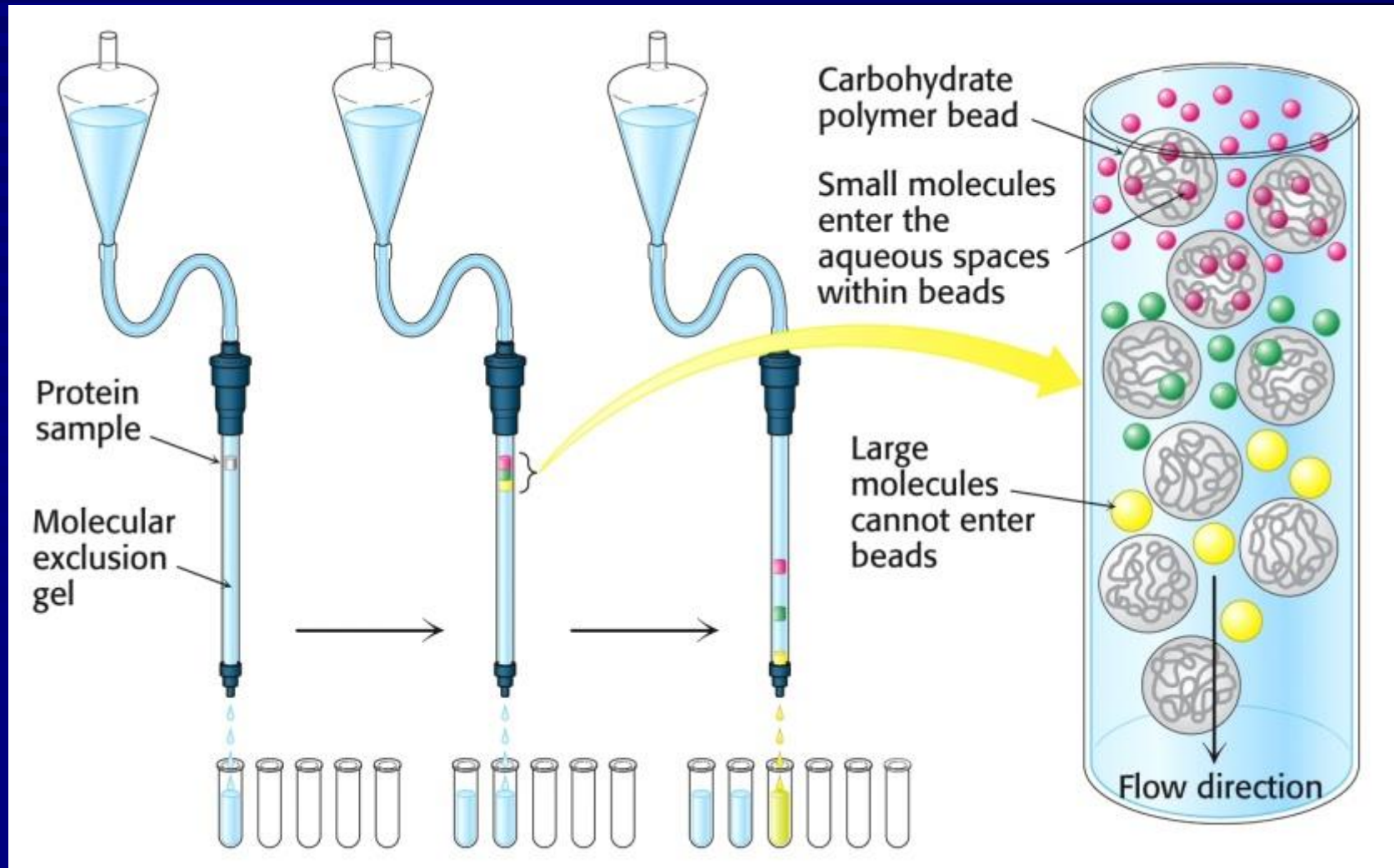
Χρωματογραφία μοριακής εισχώρησης



Κατά την ανάπτυξη της χρωματογραφίας, τα διαχωριζόμενα μόρια κινούνται υπό τη μορφή ζώνης

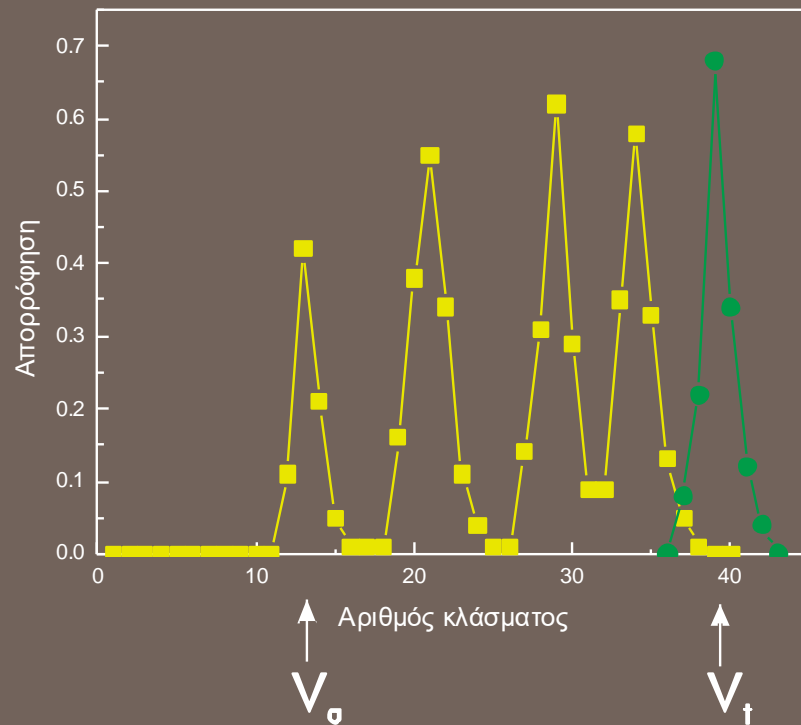
Τα μεγαλύτερου υδροδυναμικού μεγέθους μόρια κινούνται ταχύτερα, ακολουθούμενα από τα υπόλοιπα μόρια σε σειρά μειούμενου υδροδυναμικού μεγέθους

Χρωματογραφία μοριακής διήθησης



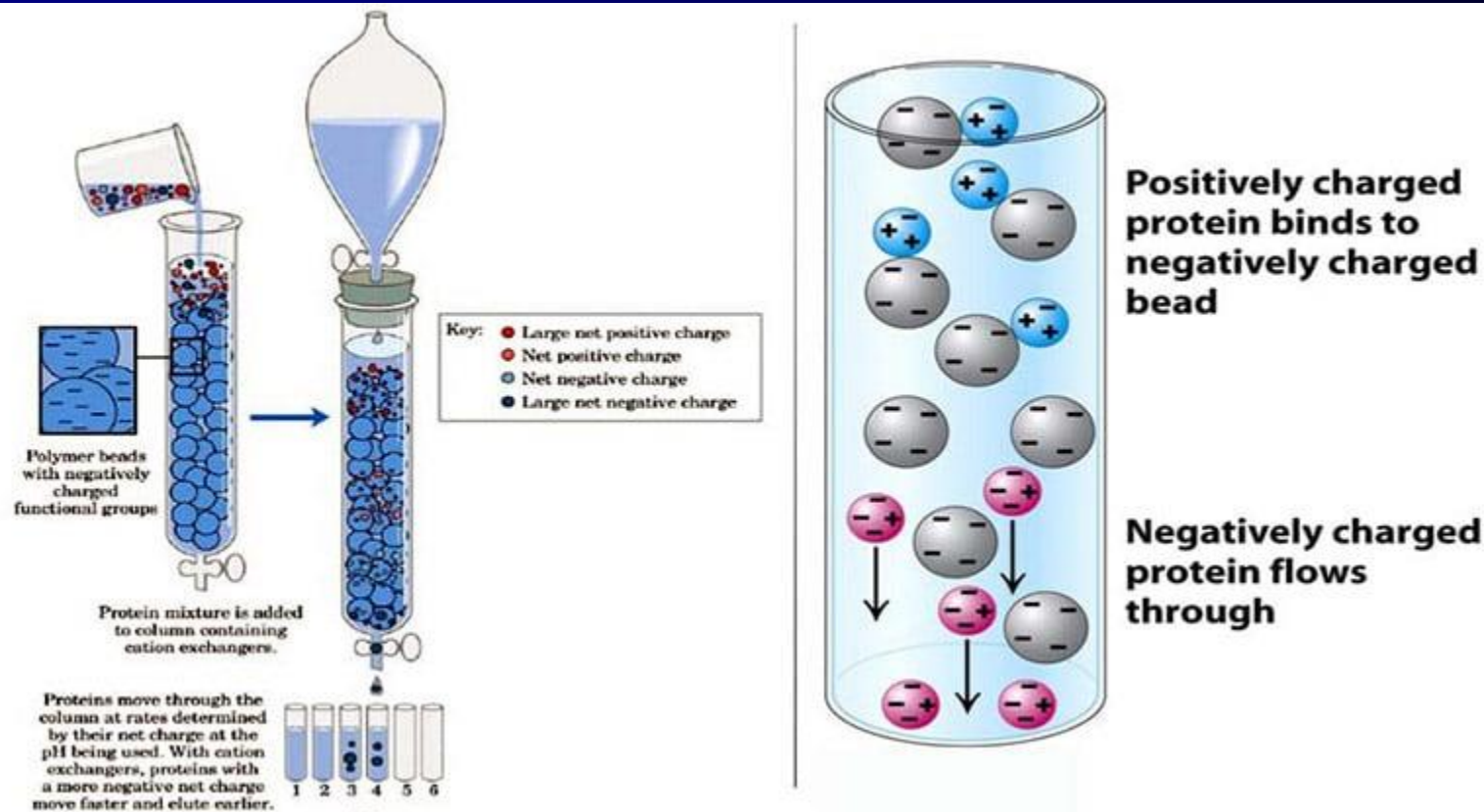
Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Χρωματογραφία μοριακής εισχώρησης



Τα αποτελέσματα παρίστανται γραφικά

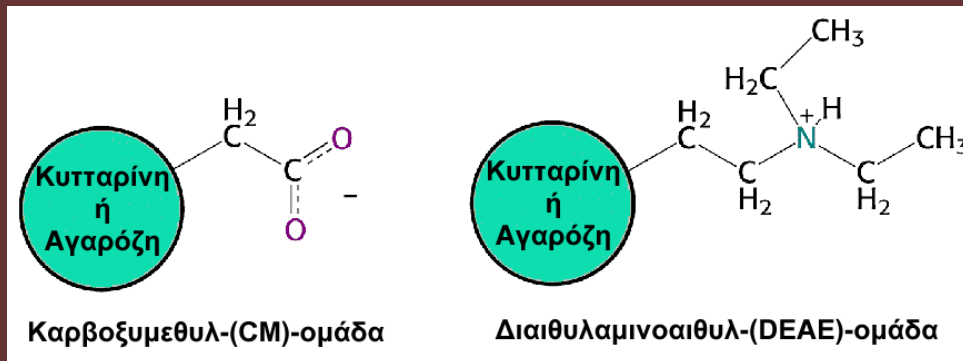
Χρωματογραφία ιονανταλλαγής



Χρωματογραφία ιονανταλλαγής

Χρωματογραφία ιονανταλλαγής

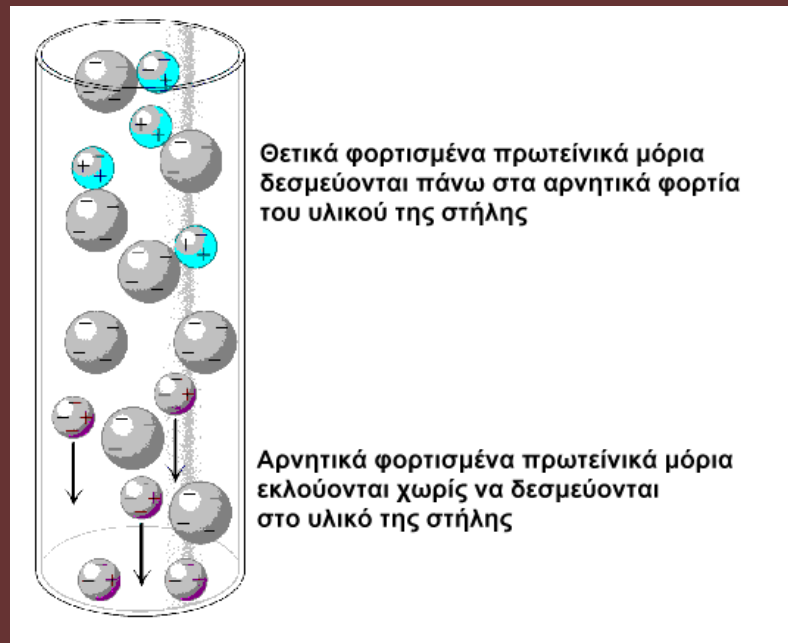
Τυπικά παραδείγματα ιονανταλλακτών που χρησιμοποιούνται στη Βιοχημεία



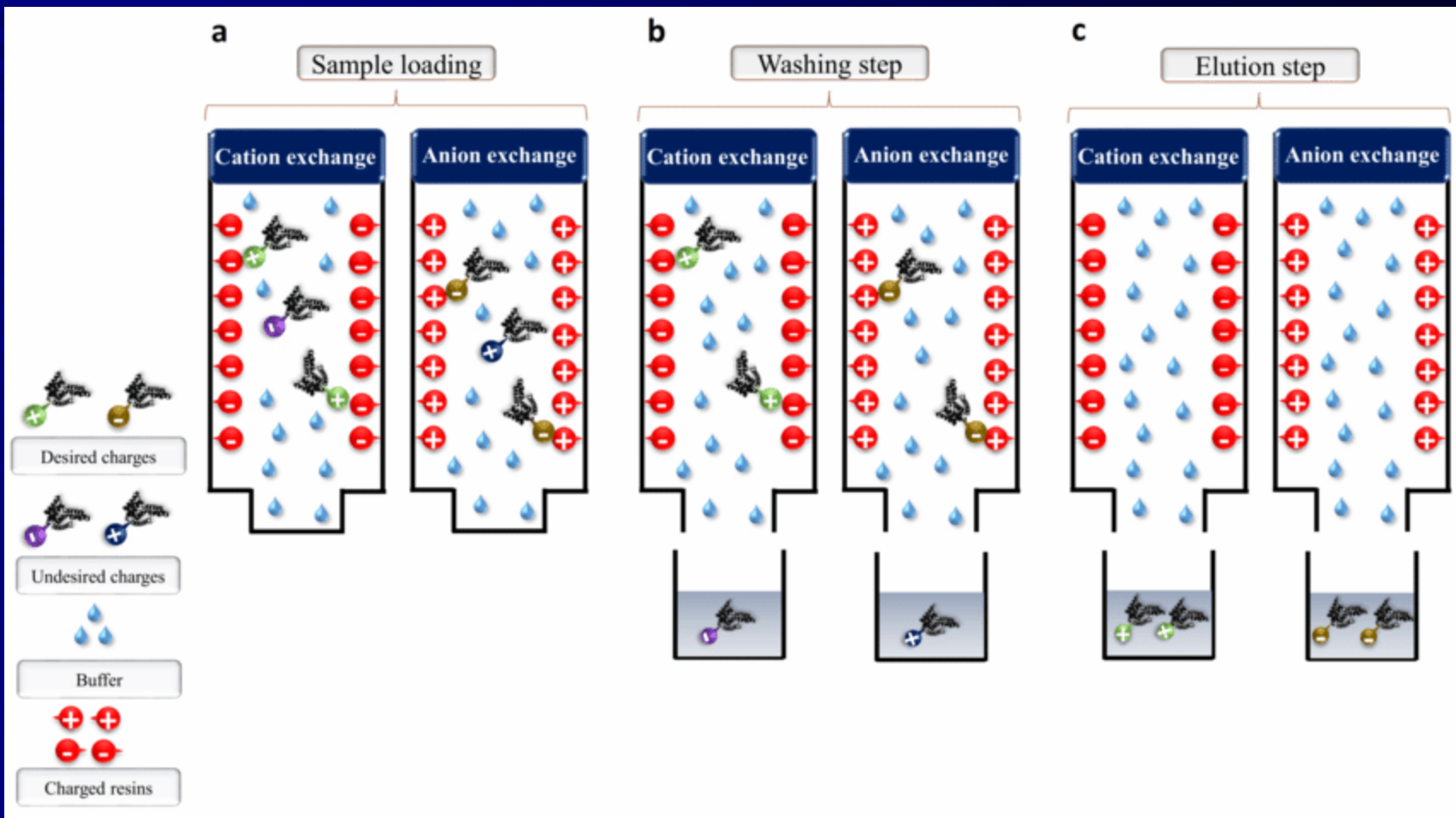
Χρωματογραφία ιονανταλλαγής

Χρωματογραφία ιονανταλλαγής

Η γενική αρχή των μεθόδων διαχωρισμού στηρίζεται στο διαφορετικό φορτίο των προς διαχωρισμό συστατικών ενός μίγματος



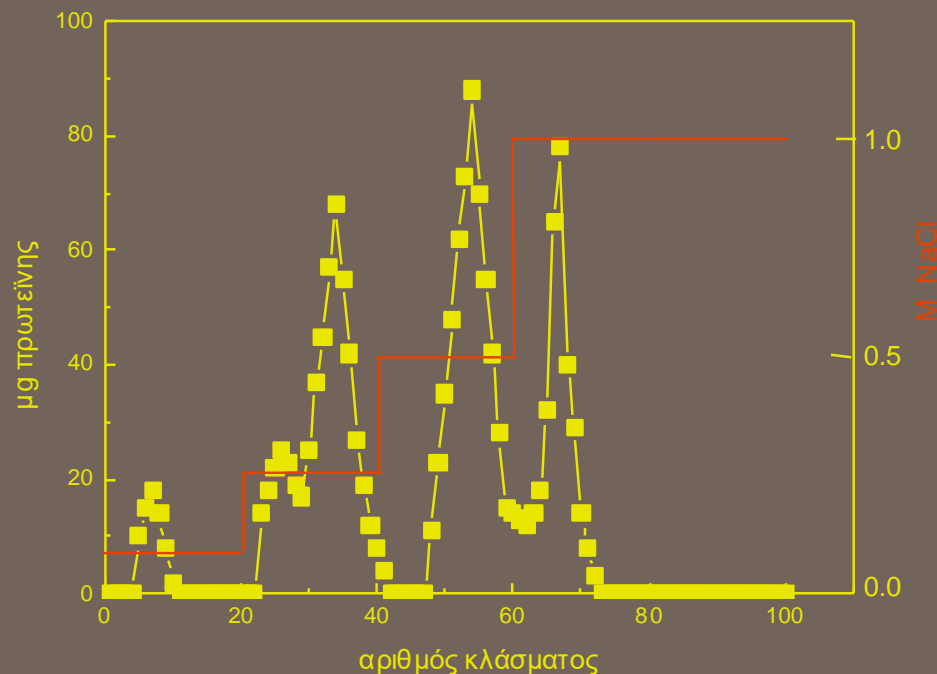
Χρωματογραφία ιονανταλλαγής



Χρωματογραφία ιονανταλλαγής

Χρωματογραφία ιονανταλλαγής

Διαχωρισμός πρωτεϊνών σε DEAE-κυτταρίνη

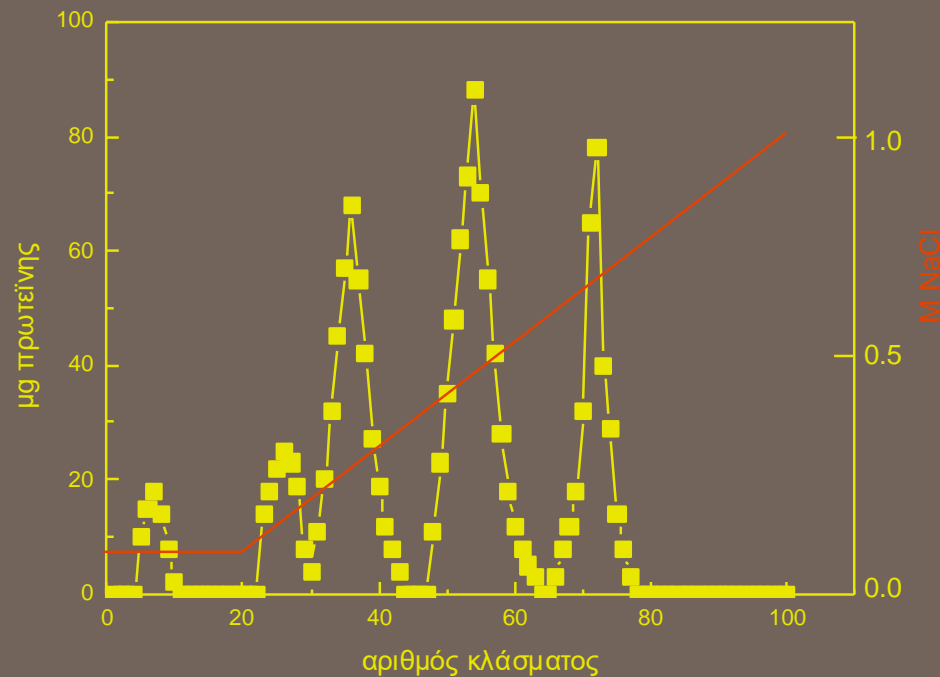


Α' περίπτωση: Η έκλυση γίνεται με βαθμιδωτή αύξηση της ιονικής ισχύος

Χρωματογραφία ιονανταλλαγής

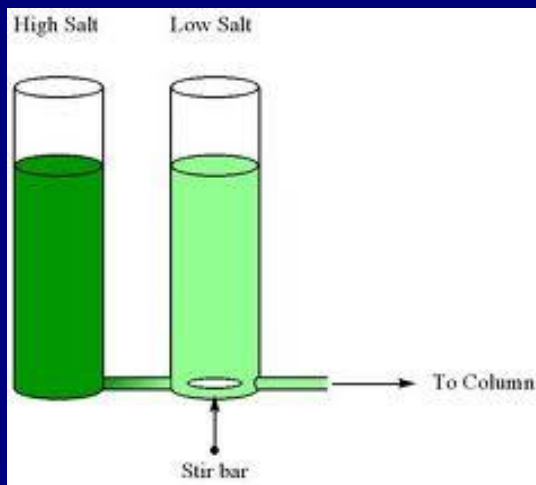
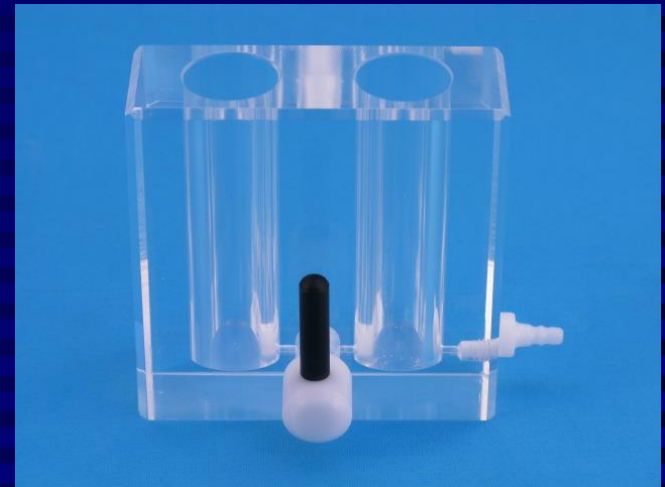
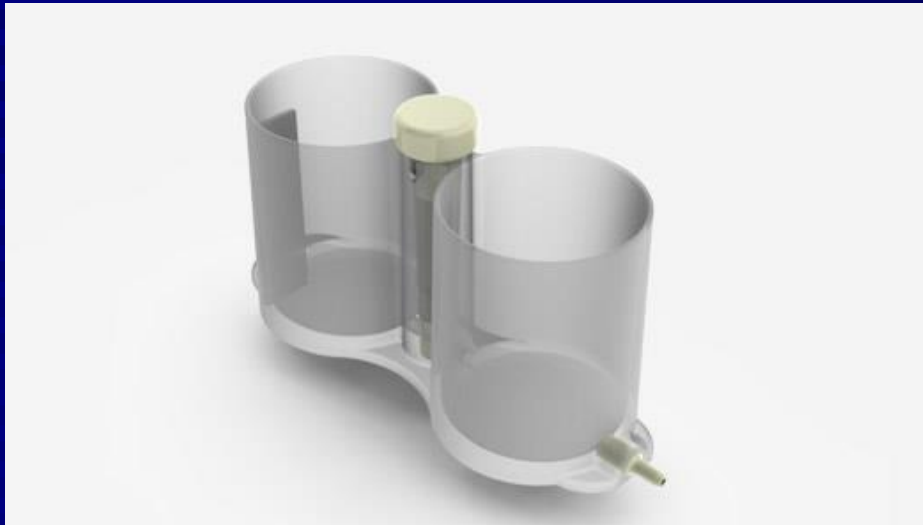
Χρωματογραφία ιονανταλλαγής

Διαχωρισμός πρωτεϊνών σε DEAE-κυτταρίνη



Β' περίπτωση: Η έκλουση γίνεται με συνεχή αύξηση της ιονικής ισχύος

Παρασκευή εκλουστικού μέσου συνεχόμενα αυξανόμενης ιονικής ισχύος



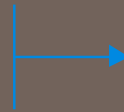
Χρωματογραφία συγγενείας (αγχιστείας)

Χρωματογραφία συγγενείας

Οι προσθετικές ομάδες
μπορεί να είναι:

Θα διαχωριστούν
ή θα καθαριστούν:

αντιγόνα
αντιγονικά πεπτίδια
δομικά ανάλογα αυτών



αντισώματα

ενζυμικά υποστρώματα
ενζυμικοί αναστολείς
δομικά ανάλογα αυτών



ένζυμα

λεκτίνες



γλυκοπρωτεΐνες

αντισώματα



πρωτεϊνικά αντιγόνα

υδατάνθρακες



λεκτίνες

Χρωματογραφία συγγενείας (αγχιστείας)

Χρωματογραφία συγγενείας

Η έκλουση των δεσμευμένων μορίων γίνεται

- συνήθως με την προσθήκη εξειδικευμένης ουσίας στον εκλούτη, η οποία αναγνωρίζει την προσθετική ομάδα του υλικού χρωματογραφίας και απομακρύνει το δεσμευμένο συστατικό
- σπανίως με μεταβολή του pH ή της ιονικής ισχύος

Χρωματογραφία συγγενείας (αγχιστείας)

Χρωματογραφία συγγενείας

Είδος δεσμευμένου συστατικού

Πορεία έκλουσης
ή προστιθέμενη ουσία

αντιγόνο
αντιγονικό πεπτίδιο
δομικό ανάλογο αντιγόνου



δομικό ανάλογο του αντιγόνου
ή pH 2.2
ή μεταβολή της ιονικής ισχύος

ενζυμικό υπόστρωμα
ενζυμικός αναστολέας
δομικό ανάλογο
ενζύμου/αναστολέα



διαλυτό υπόστρωμα

λεκτίνη



υδατάνθρακας ή γλυκοζίτης

αντίσωμα



pH 2.2
ή μεταβολή της ιονικής ισχύος

υδατάνθρακας



υδατάνθρακας ή γλυκοζίτης

Χρωματογραφία συγγενείας (αγγιστείας)

Χρωματογραφία συγγενείας



Παράδειγμα διαχωρισμού λεκτίνης που δεσμεύει γλυκόζη, από μίγμα πρωτεϊνών, με τη χρήση υλικού πλήρωσης που φέρει ακινητοποιημένη γλυκόζη

HPLC

High

Performance

Liquid

Chromatography

HPLC

High

Pressure

Liquid

Chromatography

HPLC

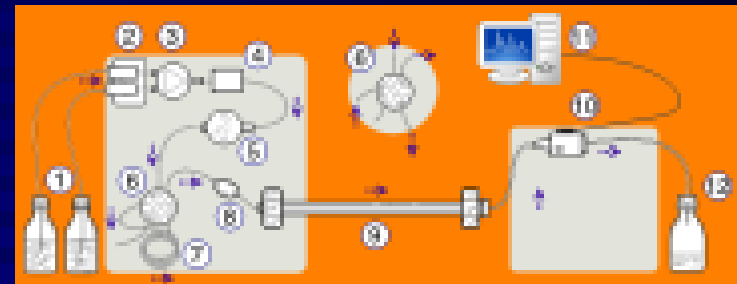
High

Pressure

Liquid

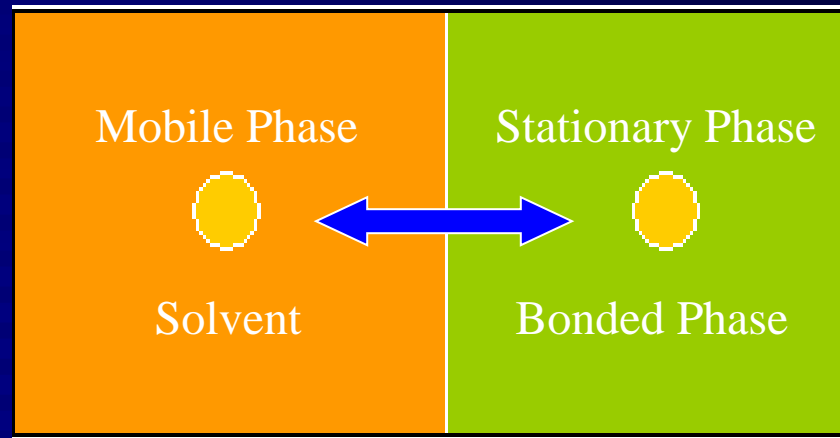
Chromatography

HPLC



HPLC κατανομής

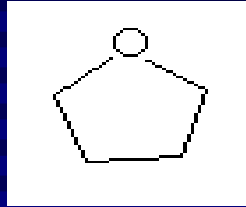
- Ο διαχωρισμός στηρίζεται στη σχετική διαλυτότητα του αναλυόμενου συστατικού σε δύο διαφορετικές φάσεις



HPLC - Μορφές

- Κανονικής φάσης
 - πολική στατική φάση και άπολος διαλύτης
- Ανάστροφης φάσης
 - άπολη στατική φάση και πολικός διαλύτης

Συνήθεις διαλύτες (εκκλούτες) στην HPLC ανάστροφης φάσης

- μεθανόλη CH_3OH
- ακετονιτρίλιο CH_3CN
- τετραϋδροφουράνιο 
- νερό H_2O

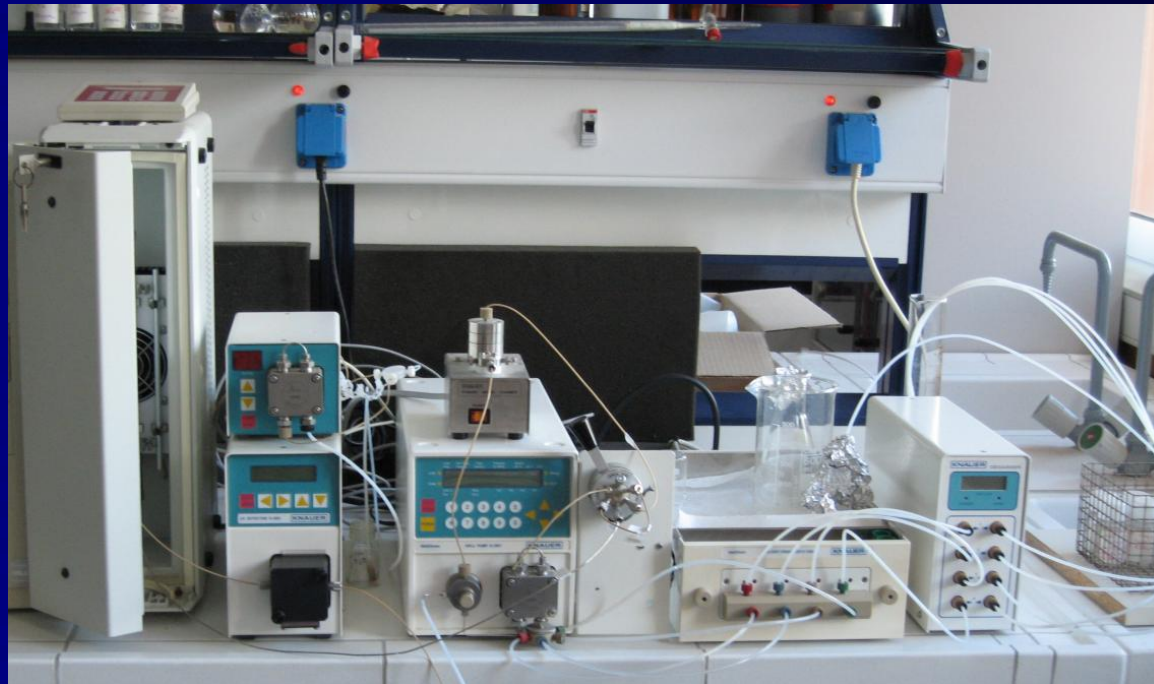
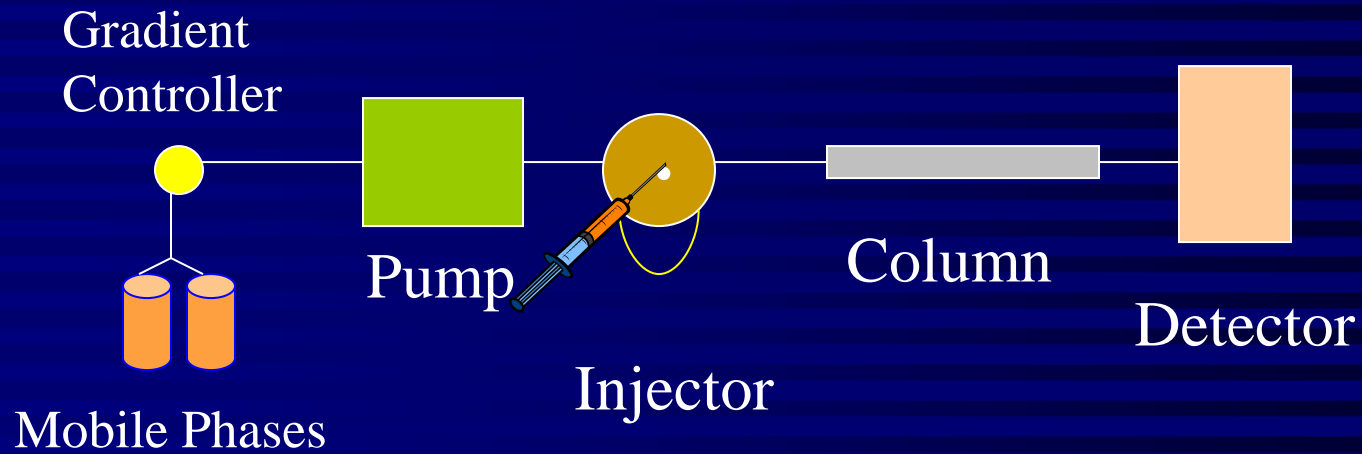
Στήλες HPLC

- Αναλυτική στήλη – πραγματοποιεί το διαχωρισμό
- Στήλη φύλακας – προσφέρει προστασία στην αναλυτική στήλη
 - Συγκρατεί σωματίδια
 - Απομακρύνει ουσίες που παρεμβάλλουν στο διαχωρισμό
 - Επιμηκύνει τη ζωή της αναλυτικής στήλης
- Στερεό υπόστρωμα – συνήθως υποκατεστημένο
 - Συνήθως 10μ, 5μ ή 3μ σίλικα ή πολυμερές
- Υποκατεστημένες φάσεις – οι λειτουργικές ομάδες έχουν εισαχθεί με χημική αντίδραση στο στερεό υλικό
 - Εκτεταμένη σταθερότητα
 - Αναπαραγωγιμότητα

Υποκατεστημένες φάσεις

- C-2 Ethyl Silyl $-\text{Si}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
- C-8 Octyl Silyl $-\text{Si}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$
- C-18 Octadecyl Silyl $-\text{Si}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$
- CN Cyanopropyl Silyl $-\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{CN}$

Οργανολογία



Ανιχνευτές

□ UV

- Απλό μήκος κύματος
- Κάθε μήκος κύματος (μονοχρωμάτορας)
- Πολλαπλά μήκη κύματος

□ Φθορισμού

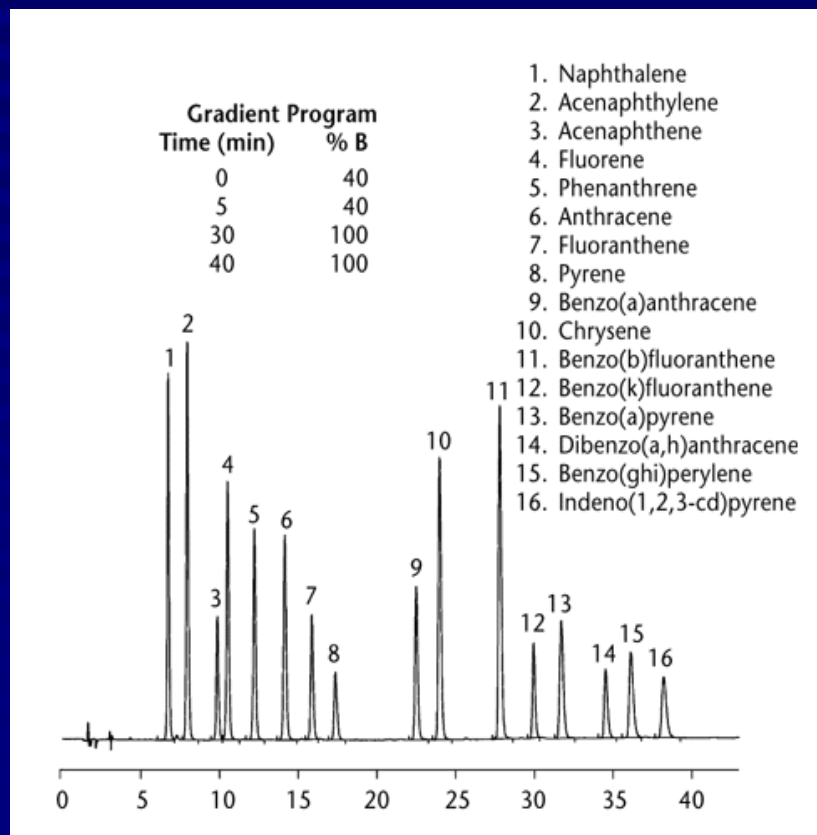
□ Ηλεκτροχημικός

□ Φασματογράφος μάζας

Εφαρμογές

- ❖ Ποσοτική ανάλυση φαρμάκων σε σκευάσματα
 - ❖ αντιφλεγμονώδη
 - ❖ αγχολυτικά
 - ❖ ναρκωτικά
- ❖ Προσδιορισμός συντηρητικών σε καλλυντικά, τρόφιμα και ποτά
- ❖ Προσδιορισμός φυτοφαρμάκων, εντομοκτόνων, διοξινών ή άλλων τοξικών ουσιών σε περιβαλλοντικά δείγματα
- ❖ Προσδιορισμός αναβολικών και των μεταβολιτών τους σε βιολογικά υγρά
- ❖ Προσδιορισμός φαρμάκων (ναρκωτικών, καρδιοτονωτικών) σε βιολογικά υγρά ασθενών
- ❖ Διαχωρισμός ουσιών σε παρασκευαστικό επίπεδο

Χρωματογραφήματα

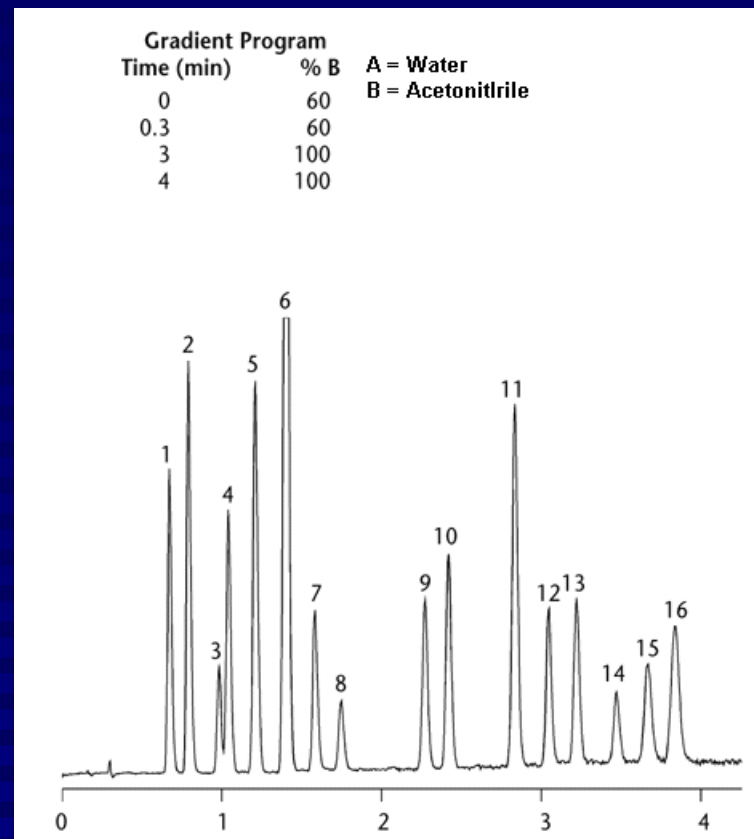


A

Supelcosil LC-PAH Columns.

Conditions: A: 150mm x 4.6mm, 5 μ .

Flow Rate: 1.5 mL/min



B

Conditions: B: 50mm x 4.6mm, 3 μ .

Flow Rate: 3.0 mL/min

Αέρια Χρωματογραφία

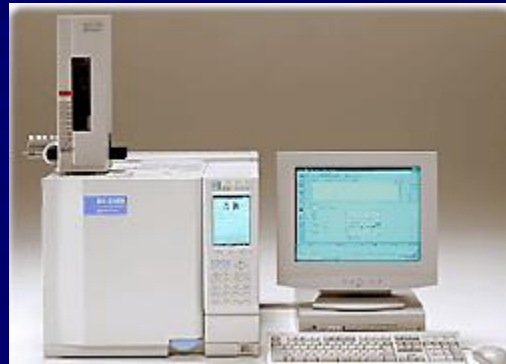
- ❖ Επιτρέπει το διαχωρισμό αερίων μιγμάτων
- ❖ με μια διαδοχική σειρά που αποκαθίστανται μεταξύ μιας αέριας κινητής φάσης και μιας υγρής ή στερεής φάσης
- ❖ που περιέχεται μέσα στη στήλη

- ❖ Αν η ακίνητη φάση είναι υγρό πρόκειται για χρωματογραφία κατανομής
- ❖ Αν η ακίνητη (στατική) φάση είναι στερεό πρόκειται για χρωματογραφία προσρόφησης

Αέρια Χρωματογραφία

- ❖ Με την αέρια χρωματογραφία διαχωρίζονται
 - ❖ Ουσίες, που στη φυσική τους μορφή είναι αέρια
 - ❖ Ουσίες, που στη φυσική τους μορφή είναι στερεά ή υγρά, αλλά που μετατρέπονται εύκολα σε αέρια με άνοδο της θερμοκρασίας
 - ❖ αρκεί να μην καταστρέφονται με την άνοδο της θερμοκρασίας
 - ❖ Ουσίες που μπορούν, με παραγωγοποίηση, να μετατραπούν σε αέρια ή σε πτητικές ενώσεις
- ❖ Η μετατροπή ενώσεων σε άλλες αυξάνει τον χρόνο ανάλυσης και το σφάλμα της ανάλυσης

Οργανολογία Αέριας Χρωματογραφίας



Ένα σύστημα αέριας χρωματογραφίας αποτελείται από:

- **Πηγή (φιάλη) αερίου** (κινητή φάση). Το αέριο που θα επιλεγεί θα πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας, χημικά αδρανές και συμβατό με τον ανιχνευτή. Τα πλέον χρησιμοποιούμενα αέρια είναι το αργό, το ήλιο, το υδρογόνο και το άζωτο.
- **Σύστημα έγχυσης** (εισαγωγής) του δείγματος. Το δείγμα εισάγεται με κατάλληλη σύριγγα, η οποία διασχίζει μια μεμβράνη από ελαστικό.
- **Χρωματογραφική στήλη**, η οποία βρίσκεται μέσα σε ένα **θάλαμο θέρμανσης** (φούρνο). Η στήλη της αέριας χρωματογραφίας περιέχει όπως και στην υγρή χρωματογραφία κατάλληλο υλικό, αλλά έχει πολύ μικρότερη διάμετρο και μεγαλύτερο μήκος (1-4 μέτρα συνήθως) και για να χωράει στον φούρνο έχει ελικοειδές σχήμα. Ο φούρνος μπορεί να λειτουργεί σε κατάλληλη θερμοκρασία που επιλέγεται από τον αναλυτή ανάλογα με την ανάλυση που θα πραγματοποιήσει.
- **Ανιχνευτή**, ο οποίος συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή για την λήψη και επεξεργασία των μετρήσεων.

Εφαρμογές Αέριας Χρωματογραφίας

- Αναλύσεις αερίων παντός τύπου
 - ❖ καύσιμα
 - ❖ αέρια παραγόμενα από ΧΥΤΑ
 - ❖ καυσαέρια μηχανών
 - ❖ κινητική πυρόλυσης διαφόρων ουσιών, π.χ. πλαστικών
- Έλεγχος ατμοσφαιρικής ρύπανσης
 - ❖ υδρογονάνθρακες
 - ❖ CO, CO₂, H₂S, NO_x, κλπ
- Ανάλυση αερίων εκπνοής ανθρώπων
- Προσδιορισμός αλκοολών (αιθανόλη, μεθανόλη) στο αίμα

Εφαρμογές Αέριας Χρωματογραφίας

- ❑ Αναλύσεις σε κολώνιες-αρώματα
- ❑ Έλεγχος ρύπανσης νερών, φρούτων, λαχανικών, εδαφών (μετά από την κατάλληλη εκχύλιση και επεξεργασία) από φυτοφάρμακα και εντομοκτόνα
- ❑ Έλεγχος ποιότητας αιθερίων ελαίων
- ❑ Διαχωρισμός και απομόνωση ενώσεων σε πολύ καθαρή μορφή και μεγάλες ποσότητες (παρασκευαστική χρωματογραφία)

Σύγκριση GC και HPLC

Ποσοτική Ανάλυση στη Χρωματογραφία

- Το % εμβαδό της κορυφής της ουσίας, σε σχέση με το άθροισμα των εμβαδών όλων των κορυφών των ουσιών που διαχωρίζονται, εκφράζει το % ποσοστό της ουσίας στο μίγμα
- Υπολογισμός συσχέτισης σήματος – συγκέντρωσης: $A = f \cdot C$ για κάθε ουσία και εφαρμογή της σχέσης

$$C_x \% = \frac{f_x \cdot C_x}{f_1 \cdot C_1 + f_2 \cdot C_2 + \dots + f_x \cdot C_x}$$

- Μέθοδος εξωτερικού προτύπου
 - ❖ Πρότυπο διάλυμα της προς ανάλυση ουσίας συγκρίνεται με την αναλυόμενη ουσία στο διαχωριζόμενο μίγμα
- Μέθοδος εσωτερικού προτύπου
 - ❖ Μια ουσία που ΔΕΝ υπάρχει στο αναλυόμενο μίγμα, προστίθεται σ' αυτό και αναλύεται μαζί με τις υπόλοιπες ουσίες, π.χ., Νορλευκίνη σε μίγμα αμινοξέων

$$C_x = C \cdot \frac{A_x}{A}$$

Ηλεκτροφόρηση

Ηλεκτροφόρηση είναι μια τεχνική διαχωρισμού, χαρακτηρισμού και ανάλυσης βιομορίων και βασίζεται στο ότι μακρομόρια όπως το DNA, RNA και πρωτεΐνες φέρουν ηλεκτρικά φορτία που τους προσδίδουν την ικανότητα να κινούνται μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο.

Η κίνηση των βιομορίων κατά την ηλεκτροφόρηση γίνεται πάνω σε πορώδες υπόστρωμα. Το υπόστρωμα χρειάζεται γιατί το ηλεκτρικό ρεύμα που περνά μέσα από το διάλυμα της ηλεκτροφόρησης προκαλεί παραγωγή θερμότητας, η οποία προκαλεί διάχυση και επικάλυψη των ζωνών απουσία ενός μέσου σταθεροποίησης.

Ηλεκτροφόρηση

Το υπόστρωμα μπορεί να αποτελείται από ένα αριθμό υλικών όπως:

- Χαρτί
- Οξική κυτταρίνη
- Πήκτωμα από αγαρόζη, πολυακρυλαμίδιο κ.α

Ηλεκτροφόρηση

Ηλεκτροφόρηση μπορεί να πραγματοποιηθεί:

α) οριζόντια

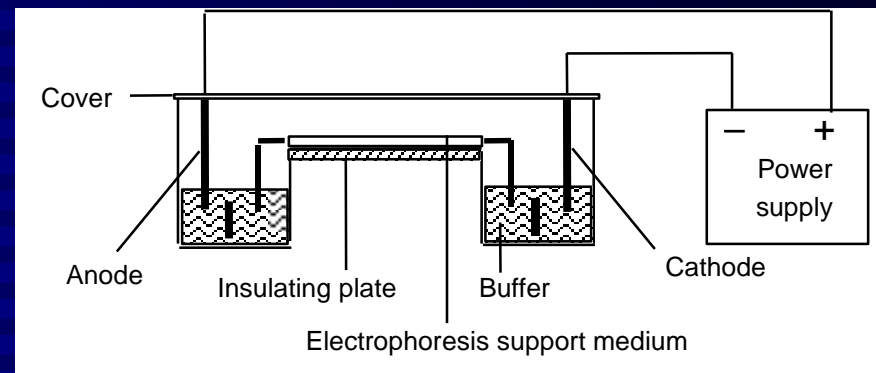
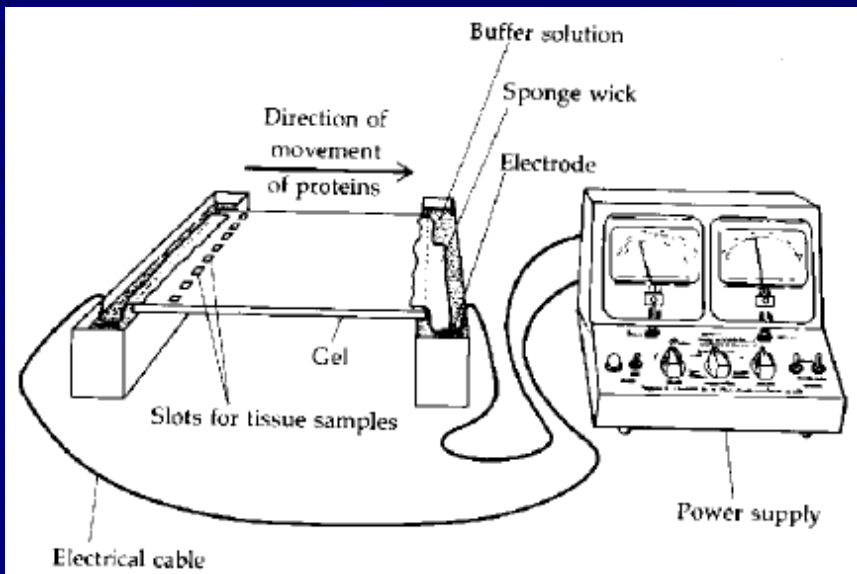
τα υποστρώματα που συνήθως χρησιμοποιούνται σε αυτή τη περίπτωση είναι χαρτί, οξική κυτταρίνη και αγαρόζη



Ηλεκτροφόρηση DNA

- Πραγματοποιείται πάντα σε αγαρόζη
- Η περιεκτικότητα σε αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος των αναλυόμενων πολυνουκλεοτιδίων
 - RFLP (αναιμίες, νέες μορφές ιών)
 - Θραύσματα από ενδονουκλεάσες περιορισμού (πλασμίδια, γενετική μηχανική)
 - Προϊόντα PCR

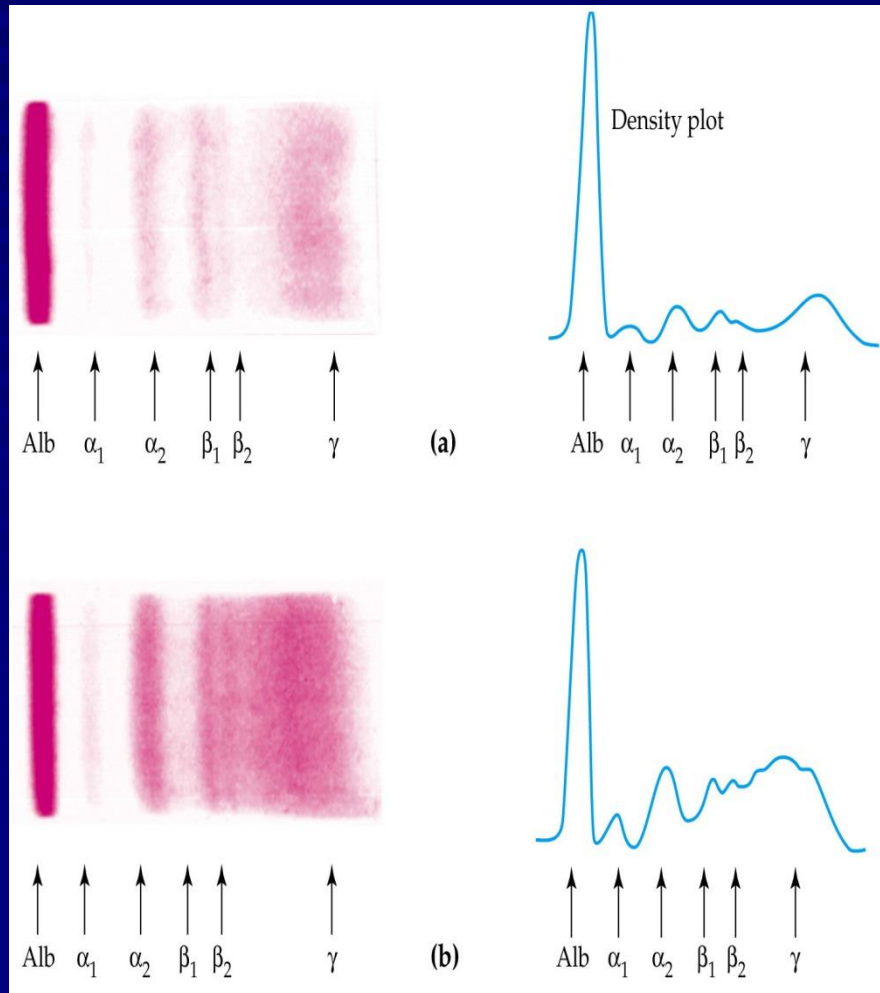
Ηλεκτροφόρηση σε οξική κυτταρίνη



Ηλεκτροφόρηση σε οξική κυτταρίνη

- Ακολουθεί η εφαρμογή ρεύματος – στην αρχή με σταδιακή αύξηση ώστε να μην υπάρξει υπερθέρμανση – για 45 λεπτά
- Μετά το πέρας του χρόνου οι λωρίδες απομακρύνονται από τη συσκευή και τοποθετούνται στο υγρό εμφάνισης πρωτεϊνών

Ηλεκτροφόρηση σε οξική κυτταρίνη



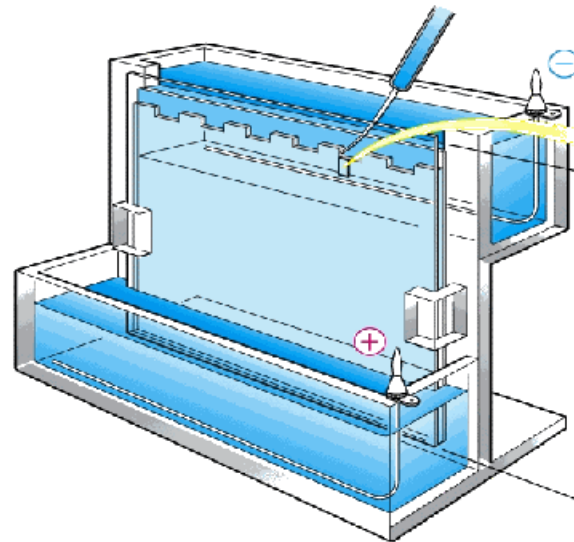
Η ηλεκτροφόρηση του ορού σε οξική κυτταρίνη καταλήγει στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε πέντε ζώνες

Ηλεκτροφόρηση

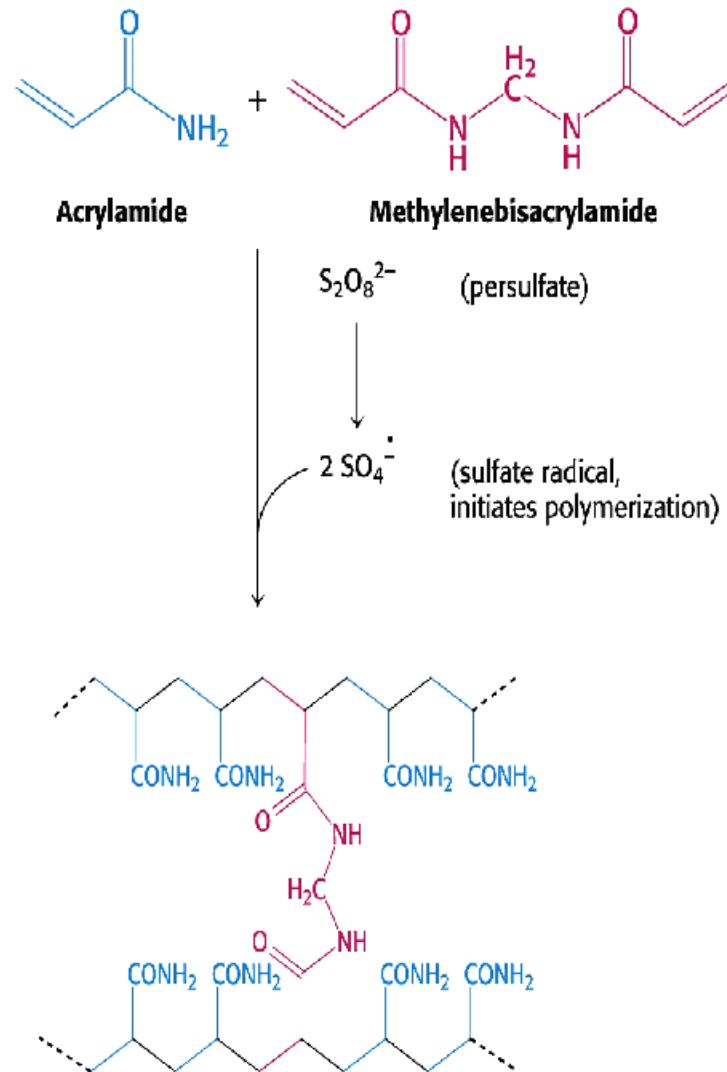
Ηλεκτροφόρηση μπορεί να πραγματοποιηθεί:

β) κάθετα

όπου συνήθως χρησιμοποιείται πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

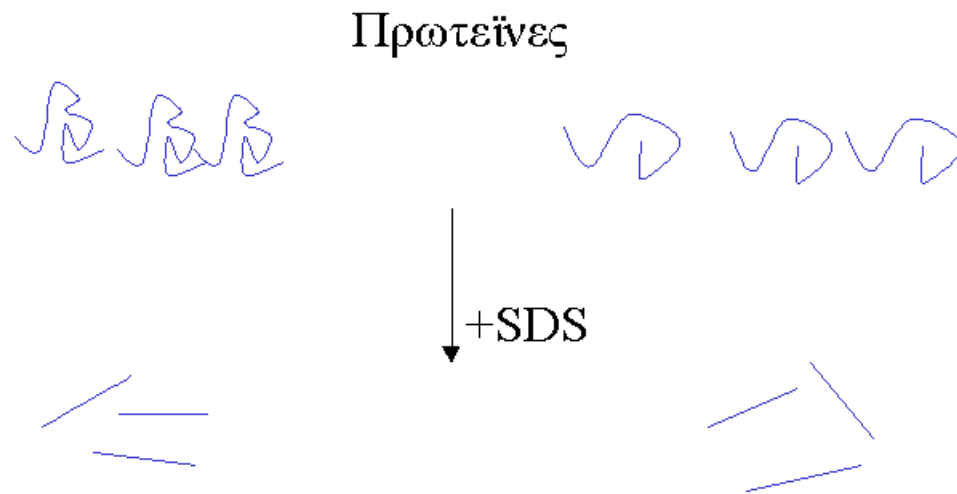


Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών πολυμερισμός ακρυλαμιδίου



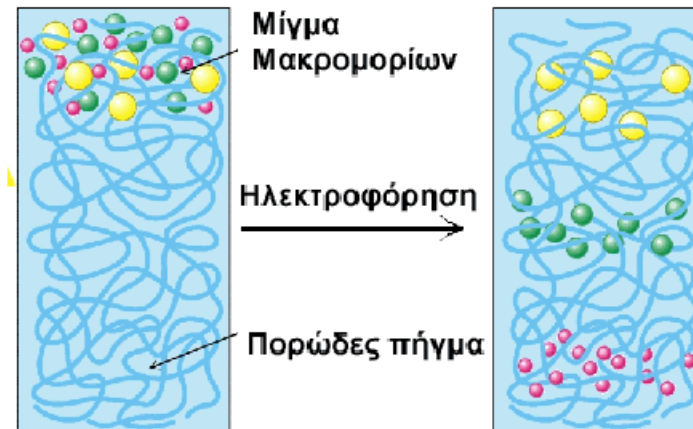
Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου με SDS

- Το κατιονικό απορρυπαντικό θειικό δωδεκυλικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) χρησιμοποιείται ως αποδιατακτικός παράγοντας. Δεσμεύεται στις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και τις αποδιατάσσει.



Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου με SDS

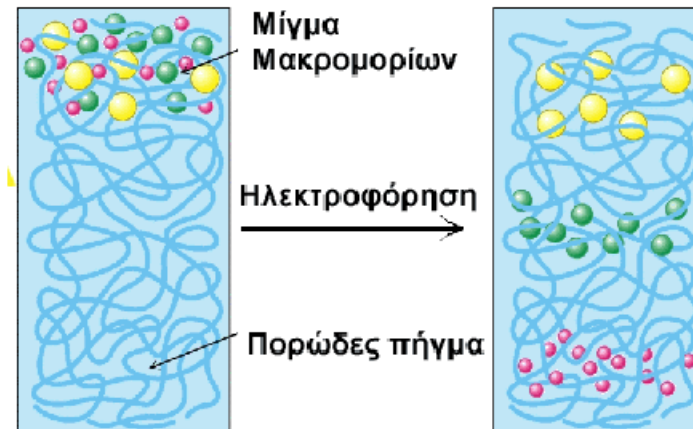
- Επειδή το ποσό του SDS που δεσμεύεται στις περισσότερες πρωτεΐνες είναι σταθερό ανά gr πρωτεΐνης, οι πεπτιδικές αλυσίδες αποκτούν την ίδια πυκνότητα φορτίου και ομοιόμορφο σχήμα, με αποτέλεσμα η κινητικότητά τους εντός του πηγματος να είναι ανάλογη του μοριακού τους βάρους. Έτσι όσο πιο μικρό είναι ένα μόριο τόσο ευκολότερα κινείται μέσα από τους πόρους του πηγματος.



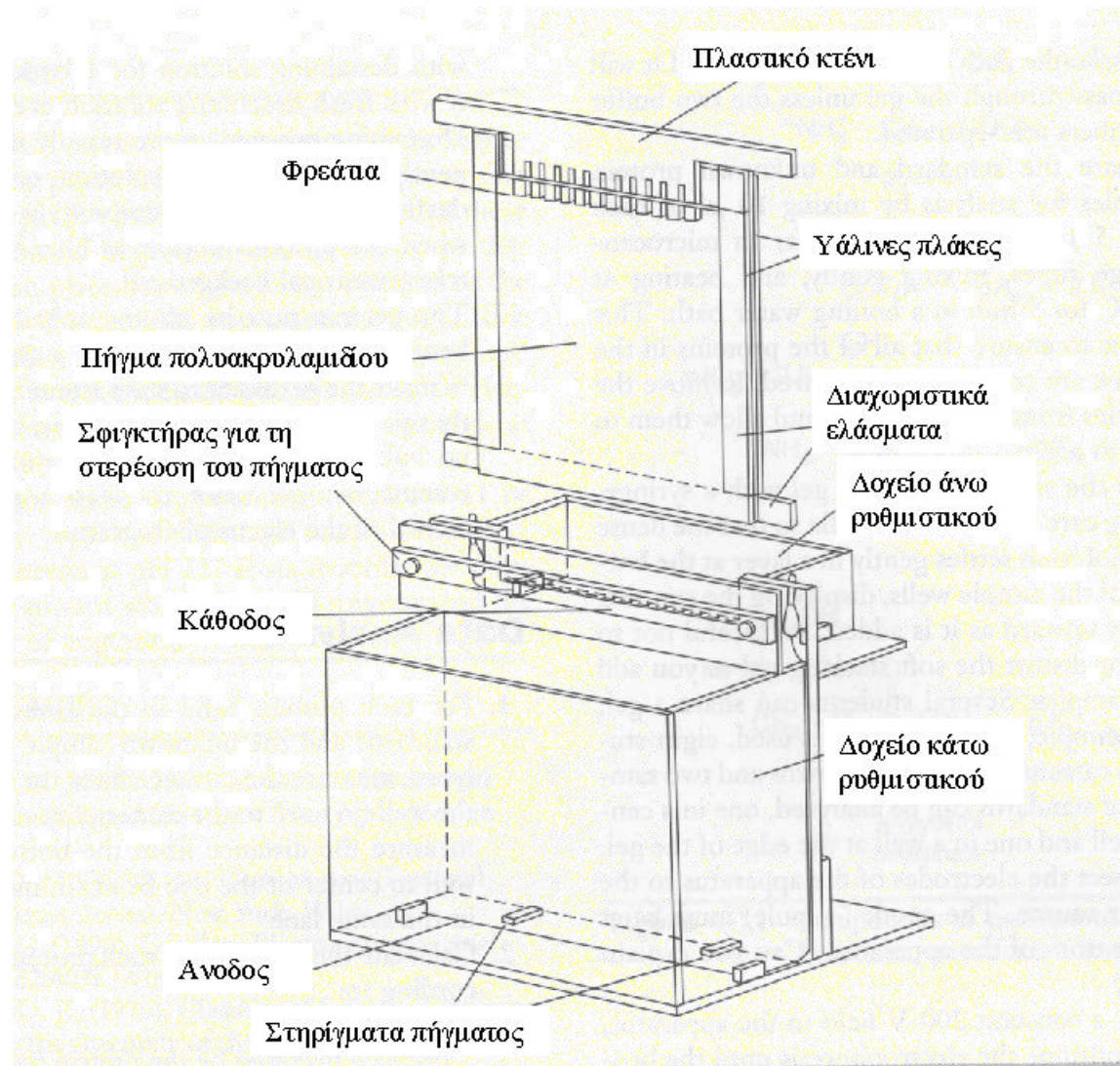
Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Ο ρόλος της γλυκίνης

- Το τριαδικό ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στην ηλεκτροφόρηση (τρεις-υδροξυμεθυλοαμινομεθάνιο, γλυκίνη, HCl) είναι αυτό που επιβάλλει τη συμπύκνωση των ζωνών, γιατί οι πρωτεΐνες, έχοντας σχετικά υψηλό αρνητικό φορτίο λόγω της σύνδεσής τους με το SDS, υποχρεώνονται να κινηθούν μεταξύ των υψηλά φορτισμένων χλωριοανιόντων και των μετρίως φορτισμένων ανιόντων γλυκίνης

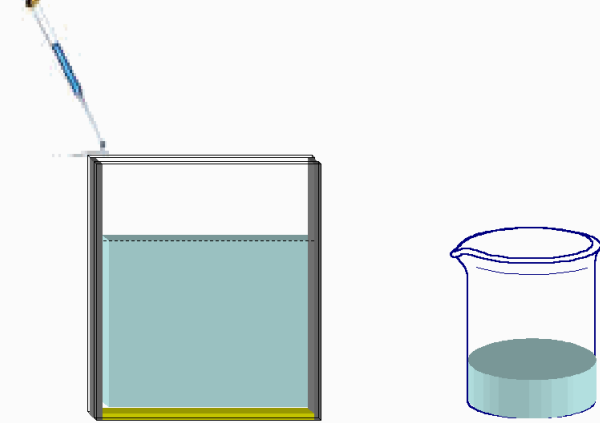


Προετοιμασία της συσκευής

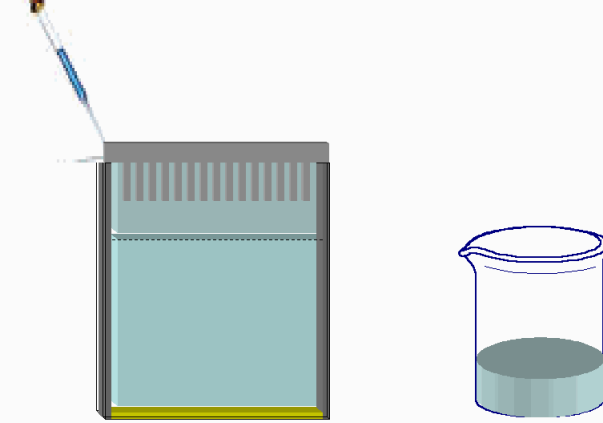


Πειραματική πορεία ηλεκτροφόρησης

Δημιουργία πηγματος διαχωρισμού

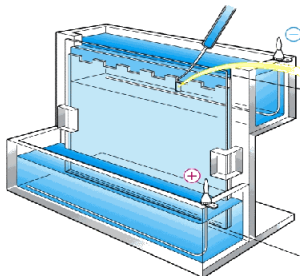


Δημιουργία πηγματος επιστοίβαξης



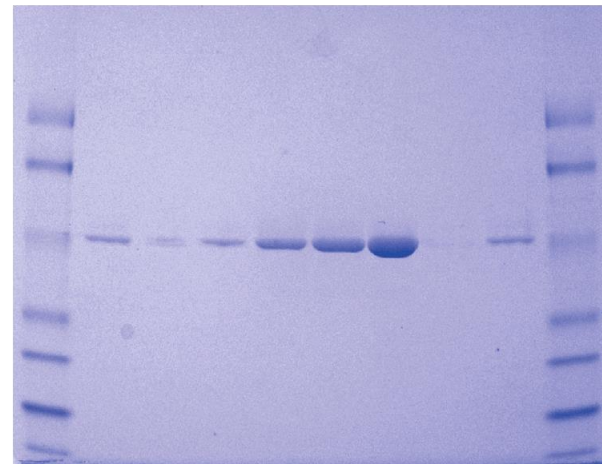
Πορεία ηλεκτροφόρησης

- Τα δείγματα επεξεργάζονται με θέρμανση για 5min στους 100°C και τοποθετούνται στα φρεάτια του πηγματος επιστοίβαξης (15-20μl/φρεάτιο)

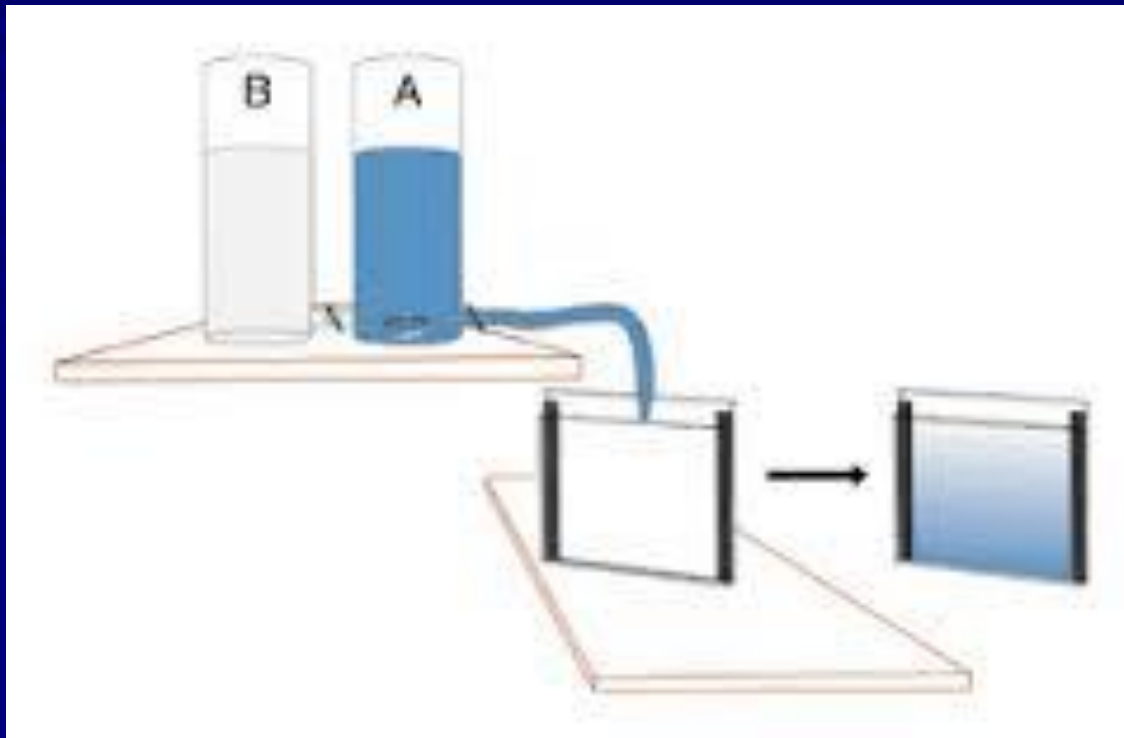


- Παράλληλα, ηλεκτροφορείται μίγμα σφαιρικών πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, για να υπολογιστεί το μοριακό βάρος των πρωτεϊνικών μορίων

Εμφάνιση των διαχωρισμένων πρωτεϊνικών ζωνών



Πειραματική πορεία προετοιμασίας gradient gels



Επεξεργασία αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης

Προσδιορισμός του MB των πρωτεϊνικών ζωνών

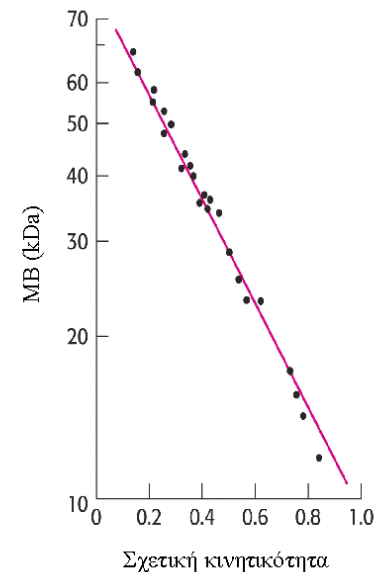
- Μετά τον χρωματισμό και αποχρωματισμό του πηγματος και την εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών μετράται η απόσταση από την αρχή του πηγματος διαχωρισμού που κινήθηκε η κάθε ζώνη και η απόσταση που κινήθηκε η χρωστική και υπολογίζεται η κινητικότητα της κάθε ζώνης

$$\mu = \frac{\text{απόσταση κίνησης ζώνης}}{\text{απόσταση κίνησης χρωστικής}}$$

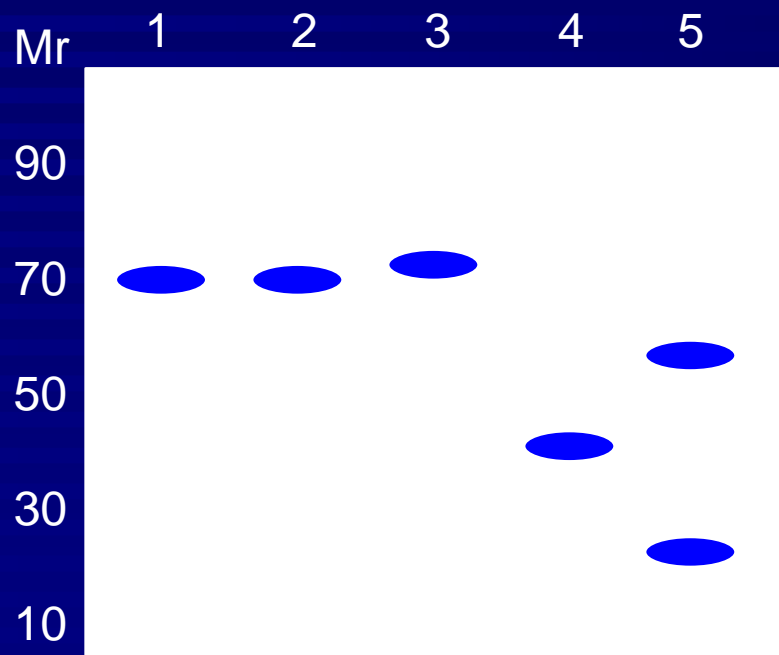
Προσδιορισμός του MB των πρωτεϊνικών ζωνών

- Γραφική παράσταση της κινητικότητας μ έναντι του $\log MB$ δίδει ευθεία γραμμή

- Αν δείγμα άγνωστης πρωτεΐνης ηλεκτροφορηθεί κατά τον ίδιο τρόπο, μετά τον υπολογισμό της κινητικότητάς της με τη χρήση της παραπάνω γραφικής παράστασης, μπορεί να προσδιοριστεί το μοριακό της βάρος



Επεξεργασία αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης παρουσία SDS & MOH



1. Δείγμα – μόνο SDS
2. Δείγμα – SDS & MOH
3. Δείγμα – SDS & MOH
4. Δείγμα – SDS & MOH
5. Δείγμα – SDS & MOH

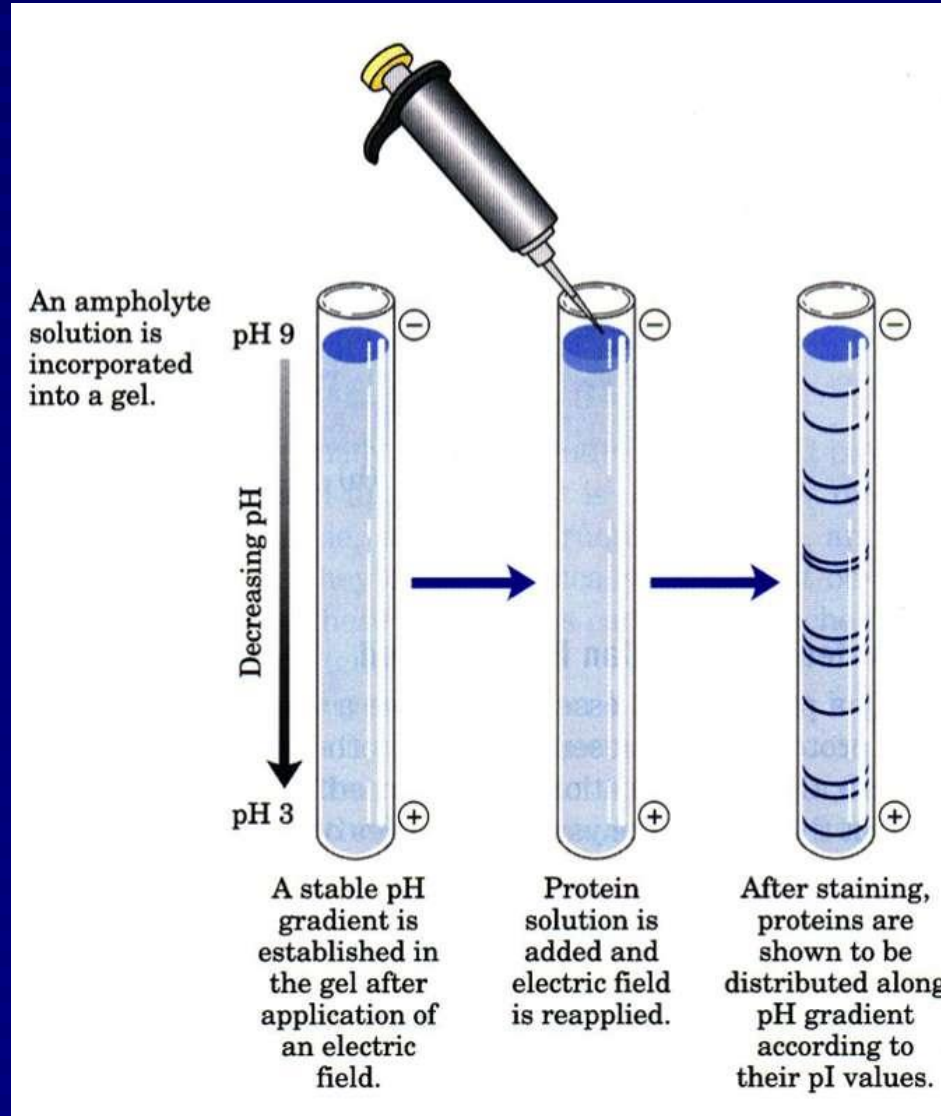
ΕΡΜΗΝΕΙΑ

2. Δεν υπάρχουν S-S
3. Οι S-S σε μια αλυσίδα
4. Ομοδιμερής πρωτεΐνη
5. Ετεροδιμερής πρωτεΐνη

Ισοηλεκτρική εστίαση

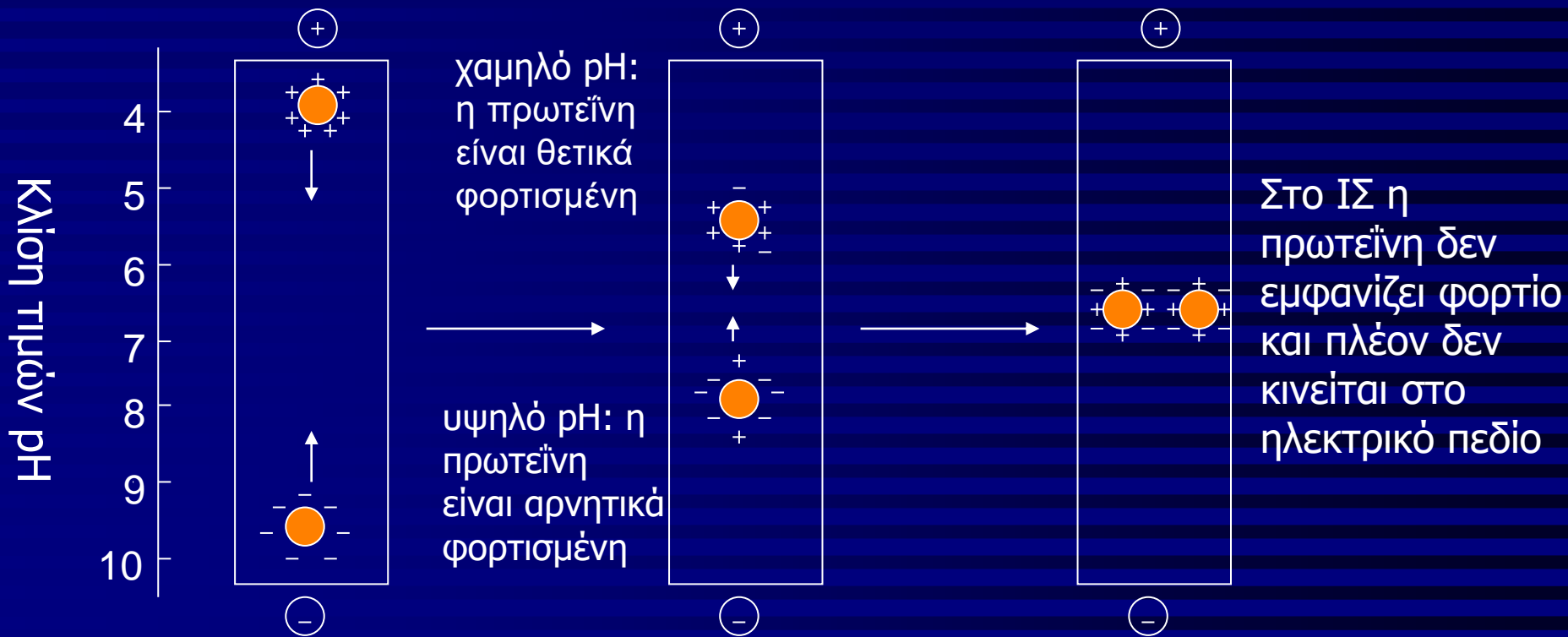
- Πρόκειται για τεχνική αναλυτικού διαχωρισμού πρωτεϊνών σύμφωνα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο (απουσία SDS)
- Στο πηγάμα διαχωρισμού διαμορφώνεται κλίμακα τιμών διαφορετικού pH
- Κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, οι πρωτεΐνες κινούνται και σταματούν όταν φτάσουν σε περιοχή με τιμή $pH = pI$

Ισοηλεκτρική εστίαση



Ισοηλεκτρική εστίαση

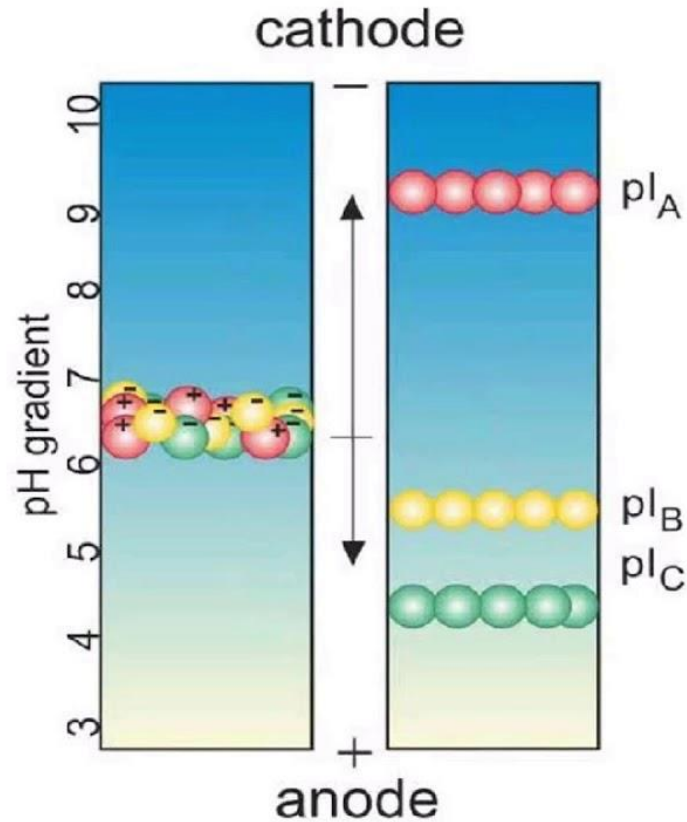
- Διαχωρισμός σύμφωνα με το φορτίο



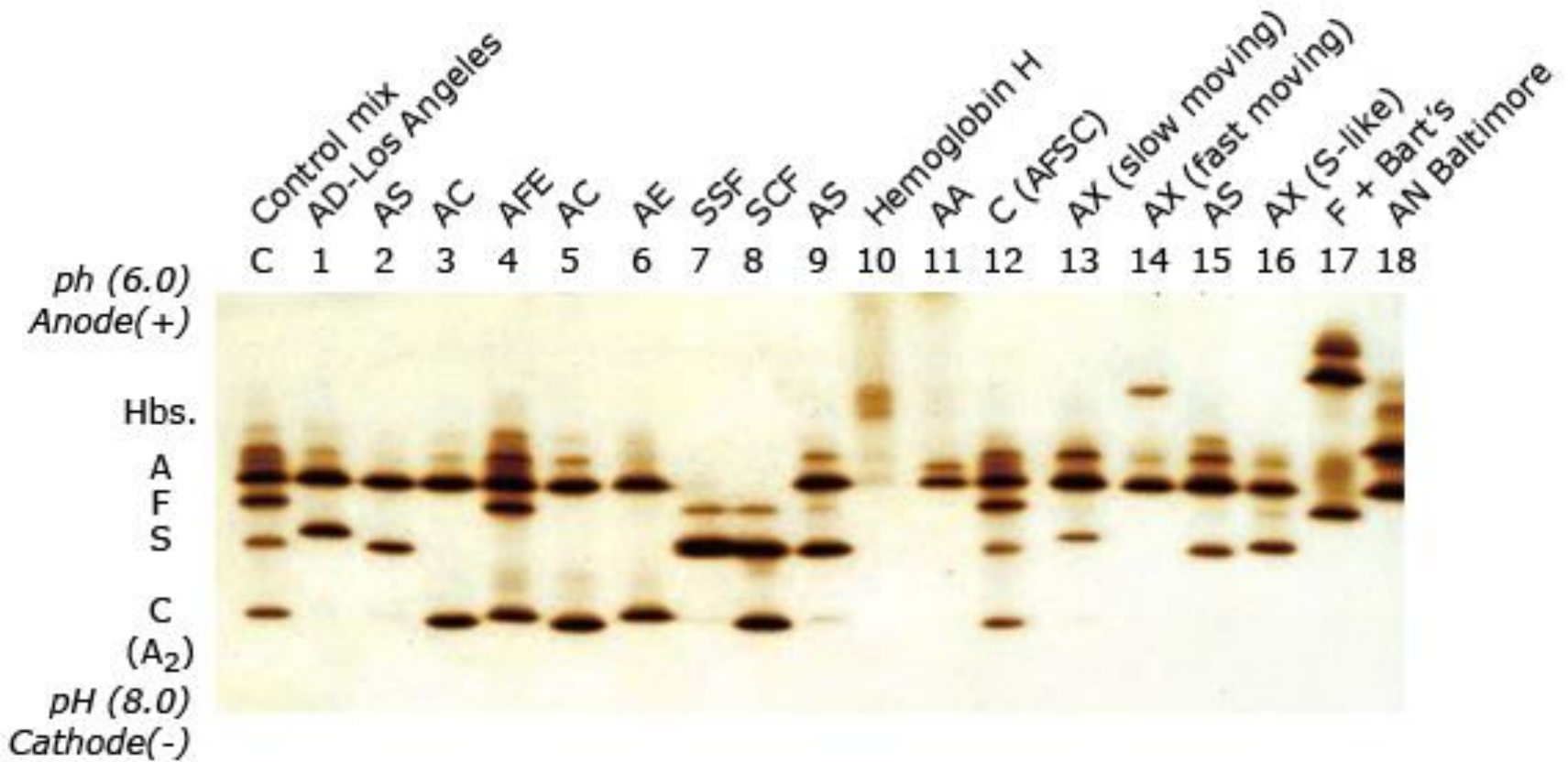
Ισοηλεκτρική εστίαση

● = A
● = B
● = C

amphoteric
sample
components



Ισοηλεκτρική εστίαση

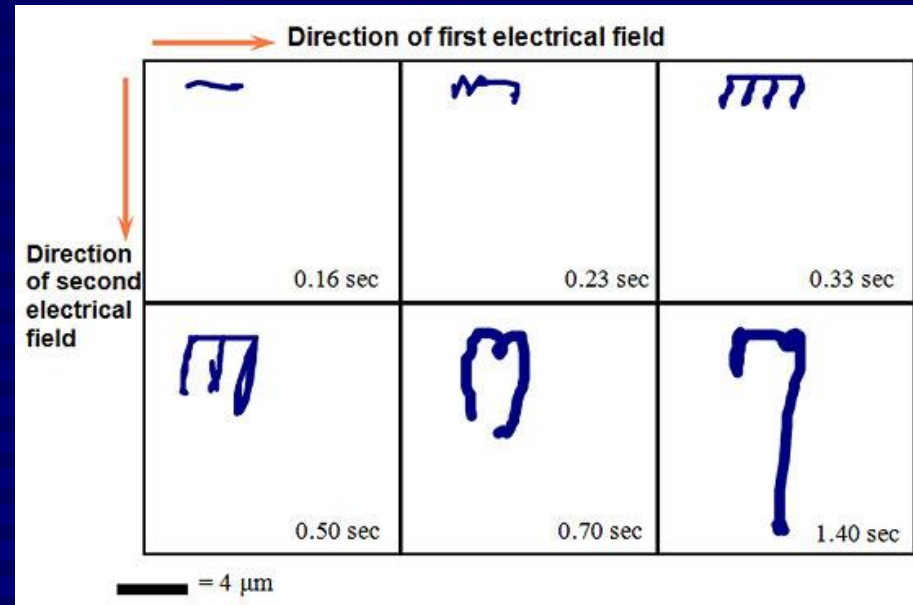


Pulse-Field Gel Electrophoresis

- ❖ Στη συμβατική ηλεκτροφόρηση εφαρμόζεται απλό ηλεκτρικό πεδίο για να υποχρεωθούν τα βιομόρια να κινηθούν στο υλικό διαχωρισμού σύμφωνα με την πυκνότητα φορτίου και η κίνησή τους είναι χαρακτηριστικό της μοριακής μάζας ή του μεγέθους τους (Klotz and Zimm 1972)
- ❖ Επιτυγχάνεται διαχωρισμός θραυσμάτων DNA < 20 kb
- ❖ Τα μεγαλύτερα θραύσματα δεν διαχωρίζονται, αλλά εμφανίζονται ως μια ευρεία ζώνη στην κορυφή του πήκτωματος
- ❖ Το 1984, οι Schwartz και Cantor εφηύραν την **PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS** (PFGE) για επίλυση του προβλήματος
- ❖ Η PFGE διαχωρίζει το DNA εναλλάσσοντας το χώρο εφαρμογής του ηλεκτρικού πεδίου
- ❖ Το αποτέλεσμα είναι ο ικανός διαχωρισμός θραυσμάτων DNA ~10 Mb μέσω αναπροσανατολισμού και κίνησης με διαφορετική ταχύτητα στο πήκτωμα

Λειτουργία της PFGE

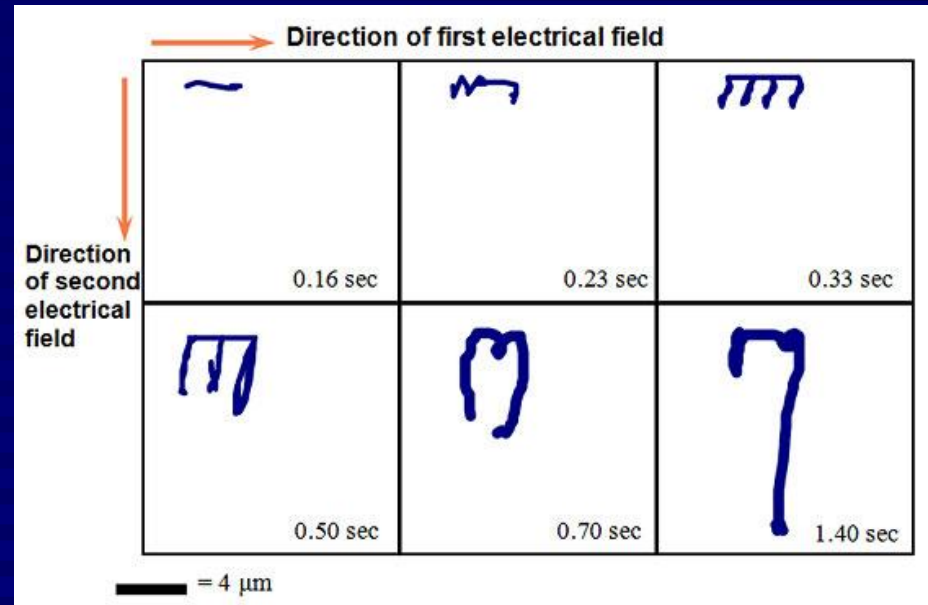
- Η PFGE προέκυψε από την παρατήρηση ότι τα μόρια DNA **επιμηκύνονται** κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου και επιστρέφουν στην αρχική κατάσταση κατά την αφαίρεση του ηλεκτρικού πεδίου
- Αυτός ο ρυθμός χαλάρωσης εξαρτάται από το μέγεθος του DNA



- Όταν ο προσανατολισμός του ηλεκτρικού πεδίου αλλάζει κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, τα μόρια DNA πρέπει να επιστρέψουν στην επιμήκη μορφή τους πριν από τον επαναπροσανατολισμό, επηρεάζοντας έτσι το ρυθμό μετανάστευσης
- Αυτή παρατήρηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να επεκταθεί σε μεγάλο βαθμό το εύρος μεγεθών που επιτρέπεται ο διαχωρισμός DNA με ηλεκτροφορητικές τεχνικές

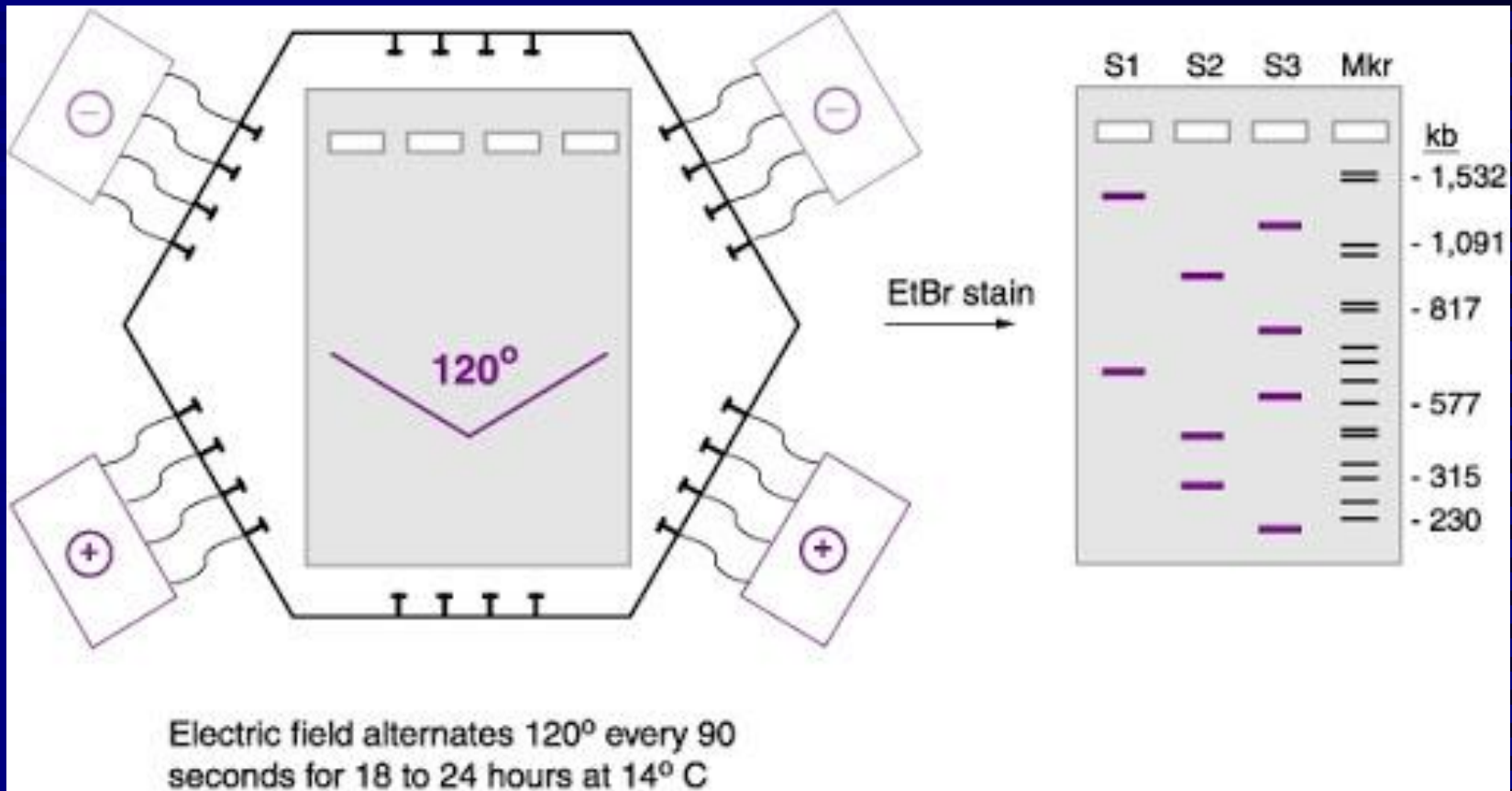
Λειτουργία της PFGE

- Όταν το ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται στο πήκτωμα, τα μόρια DNA επιμηκύνονται στην κατεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου
- Το πρώτο ηλεκτρικό πεδίο μεταφέρεται τότε στο δεύτερο πεδίο σύμφωνα με τις προδιαγραφές λειτουργίας



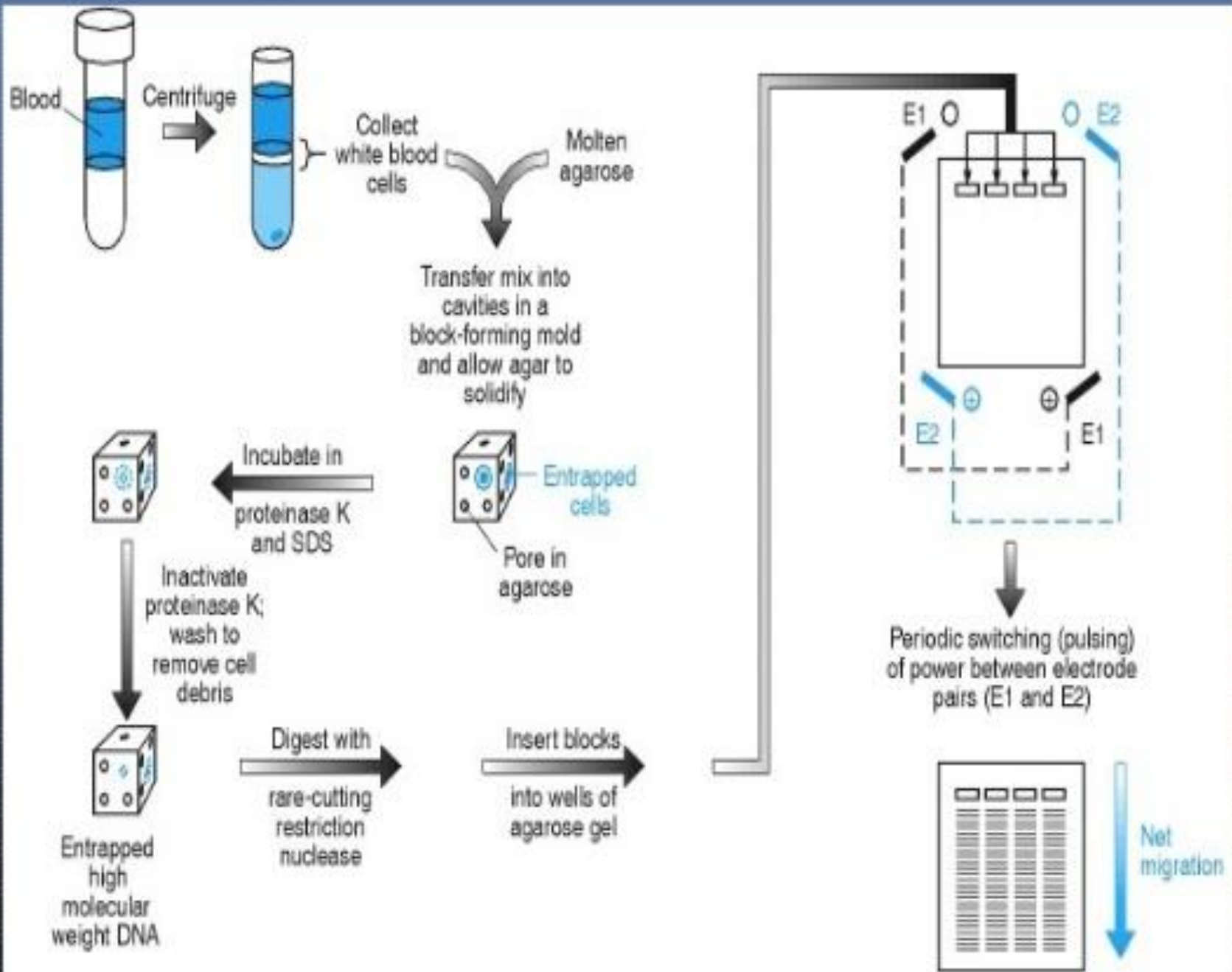
- Το DNA πρέπει να αλλάξει τη διαμόρφωση και να επαναπροσανατολιστεί, προτού μεταναστεύσει προς την κατεύθυνση αυτού του πεδίου
- Όσο τα εναλλασσόμενα πεδία είναι ίσα σε σχέση με τη διάρκεια της τάσης και του παλμού, το DNA θα μεταναστεύει σε μια ευθεία διαδρομή κάτω από το πήκτωμα

Λειτουργία της PFGE



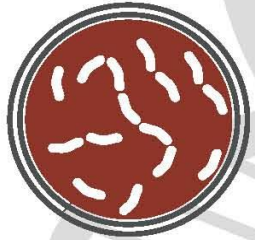
Προετοιμασία δείγματος για PFGE

- Το μεγάλο μέγεθος μορίων DNA που πρόκειται να διαχωριστούν με PFGE επιβάλλει ορισμένους περιορισμούς στην προετοιμασία και τον χειρισμό του δείγματος
- Το μεγαλομοριακό DNA διασπάται εύκολα μέσω διάτμησης και προσδίδει πολύ υψηλό ιξώδες στο διάλυμα
- Για αυτούς τους λόγους, δείγματα DNA για PFGE γενικά παρασκευάζονται με ενσωμάτωση σε μέσο πηκτώματος
- Το κυτταρικό υλικό εναιωρείται σε αгарόζη χαμηλής συγκέντρωσης και το ζελατινοποιημένο εναιώρημα χύνεται σε ειδικά καλούπια
- Όλοι οι επόμενοι χειρισμοί (κυτταρική λύση, απομάκρυνση πρωτεϊνών και περιοριστική πέψη) εκτελούνται με διάχυση αντιδραστηρίων στα καλούπια
- Τα επεξεργασμένα καλούπια στη συνέχεια φορτώνονται προσεκτικά στα φρεάτια του πηκτώματος αгарόζης της PFGE



The Pulsed-Field Gel Electrophoresis Process

Bacterial Culture

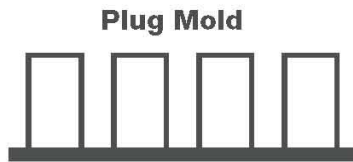


- 1 The scientist takes bacterial cells from an agar plate.

Mix bacteria with Agarose



- 2 The scientist mixes bacterial cells with melted agarose and pours into a plug mold.



DNA is now in Plugs

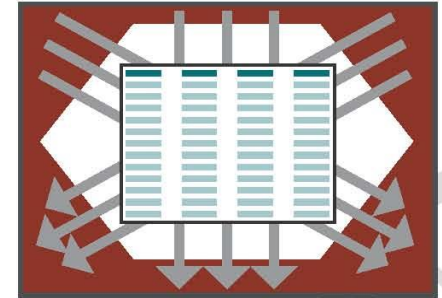


Lyse Cells and Wash Plugs

- 3 The bacterial cells are broken open with biochemicals, or lysed, so that the DNA is free in the agarose plugs.

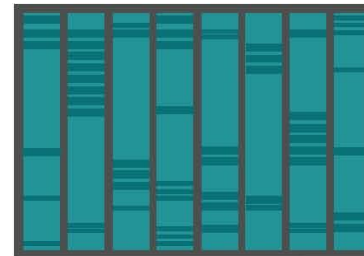
Cut DNA with Restriction Enzyme

Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)



- 4 The scientist loads the DNA gelatin plug into a gel, and places it in an electric field that separates DNA fragments according to their size.

Data Analysis (BioNumerics)



- 5 The gel is stained so that DNA can be seen under ultraviolet (UV) light. A digital camera takes a photograph of the gel and stores the picture in the computer.

Εφαρμογές της PFGE

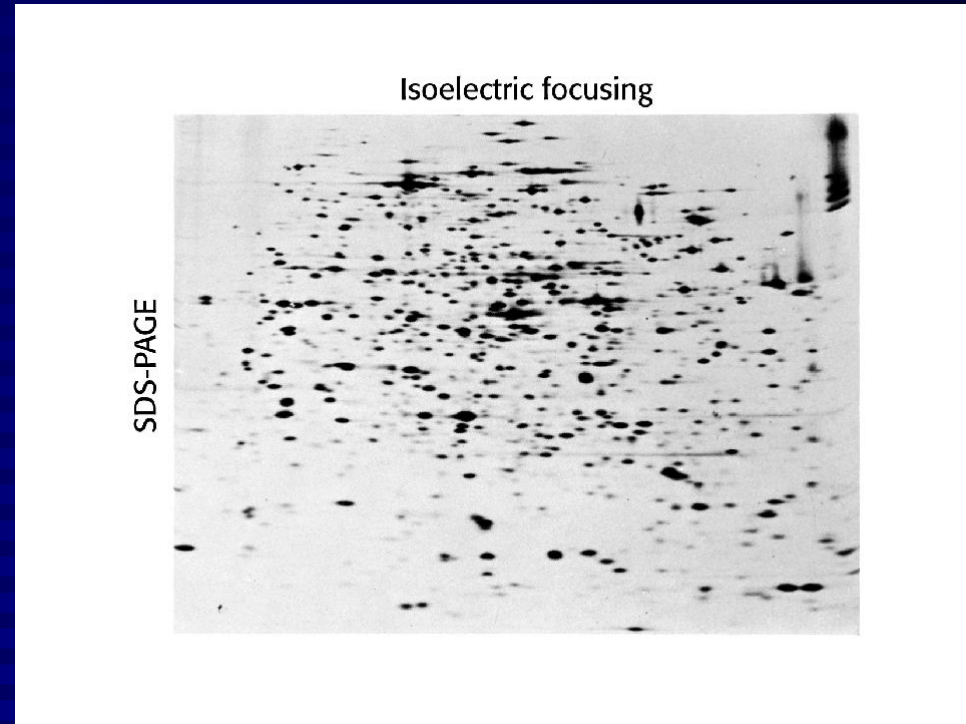
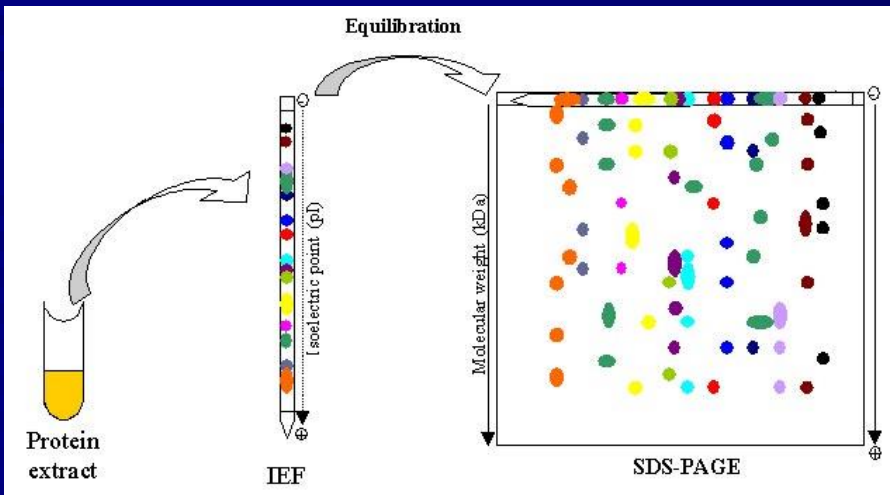
- Διαχωρισμός DNA θηλαστικών
- Προσδιορισμός μοριακού καρυότυπου
- Σύγκριση DNA μικροοργανισμών

Συνδυασμένες ηλεκτροφορητικές τεχνικές

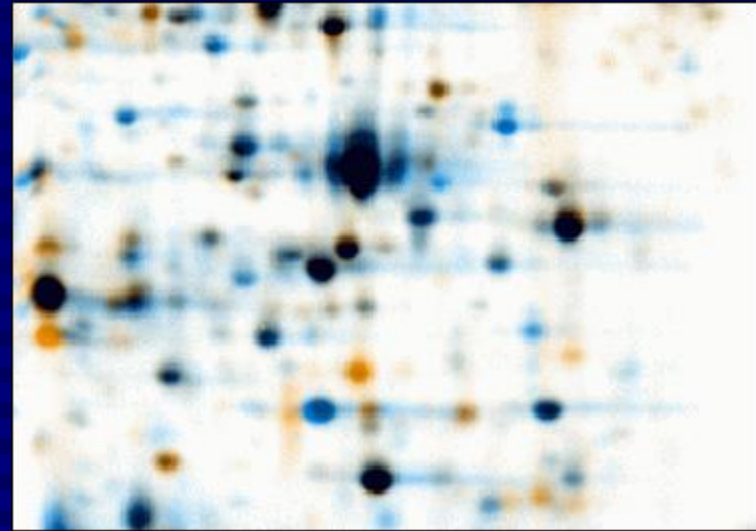
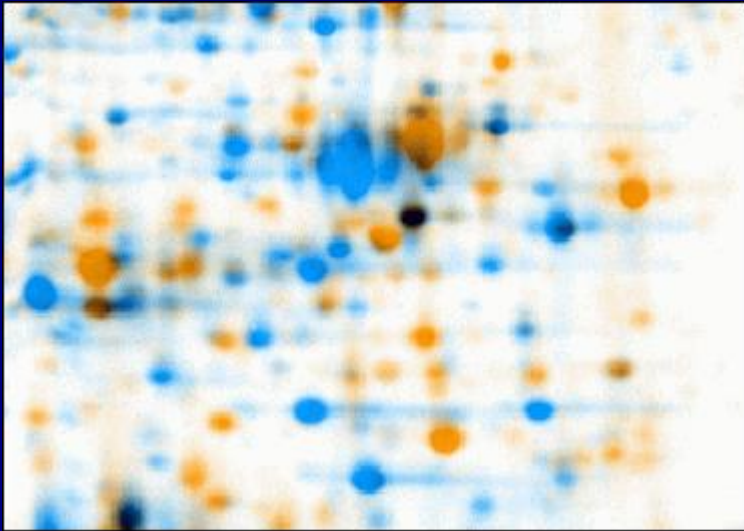
Δισδιάστατη Ηλεκτροφόρηση

- Στην SDS ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες κινούνται σε μία διάσταση, έτσι όταν διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες έχουν ίδιο ή παρόμοιο μοριακό βάρος δεν είναι δυνατό να διακριθούν
- Γι' αυτό εφαρμόζεται η ηλεκτροφόρηση 2-διαστάσεων
- Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ισοεστίαση και στην SDS ηλεκτροφόρηση
- Η ισοεστίαση είναι μια τεχνική που διαχωρίζει πρωτεΐνες σύμφωνα με το pI τους
- Με την ηλεκτροφόρηση 2-διαστάσεων μπορεί κανείς να διακρίνει πάνω από 1000 κηλίδες που αντιπροσωπεύουν διαφορετικά πολυπεπτίδια

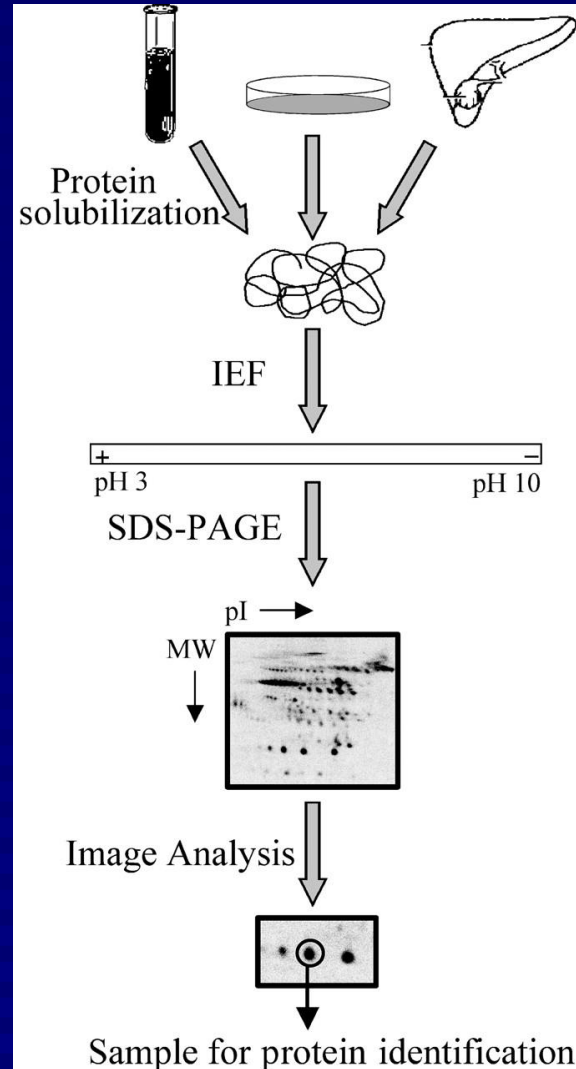
Συνδυασμένες ηλεκτροφορητικές ΤΕΧΝΙΚΕΣ



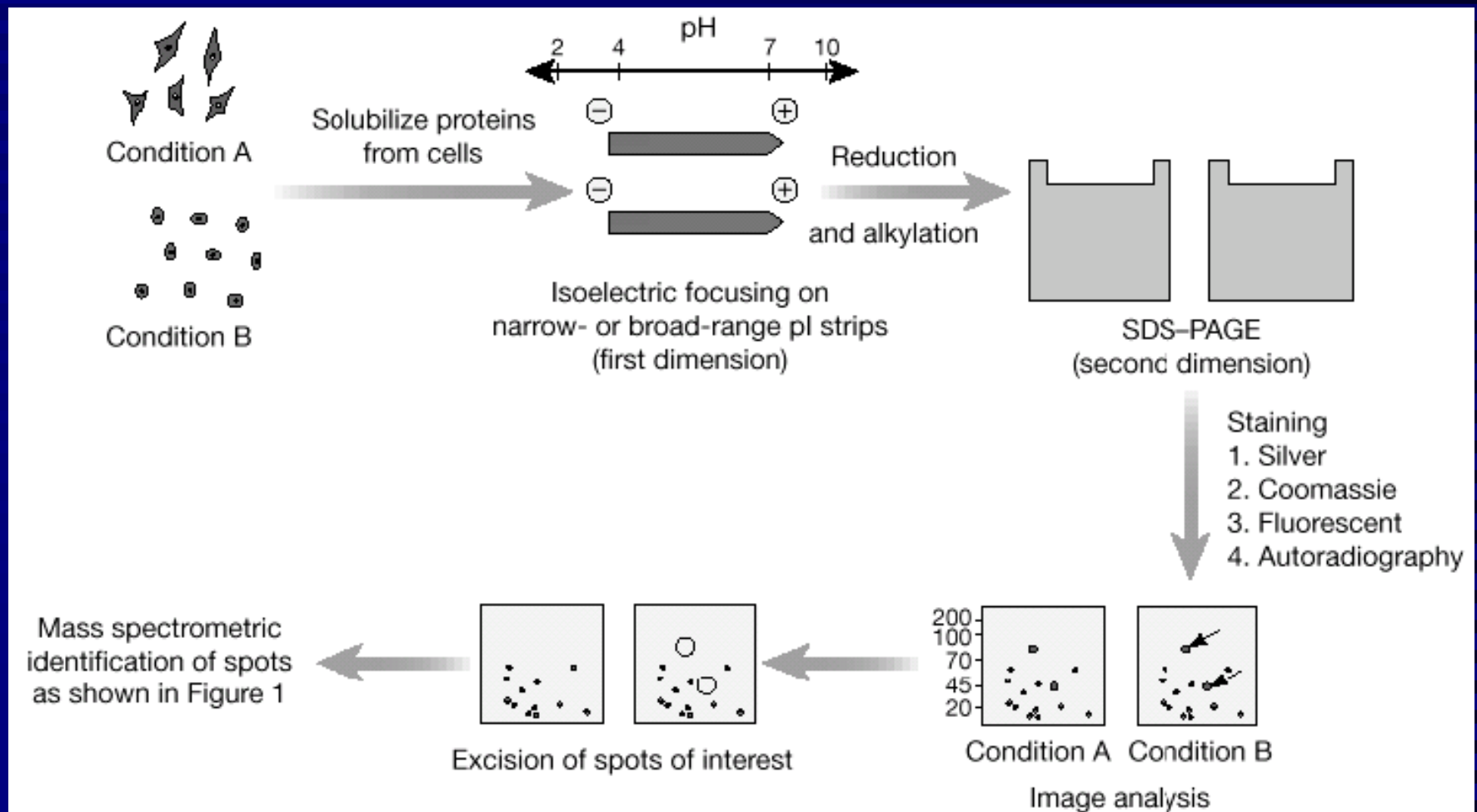
Συνδυασμένες ηλεκτροφορητικές ΤΕΧΝΙΚΕΣ



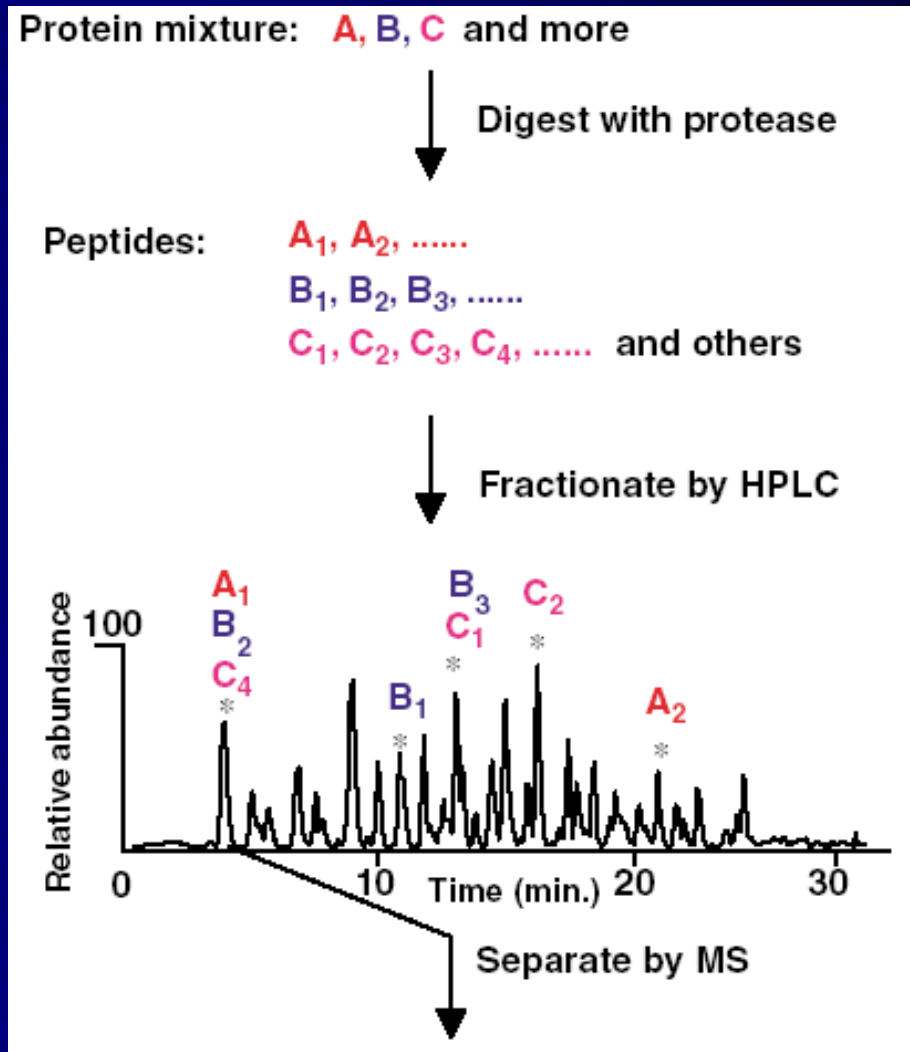
Συνδυασμένες ηλεκτροφορητικές ΤΕΧΝΙΚΕΣ



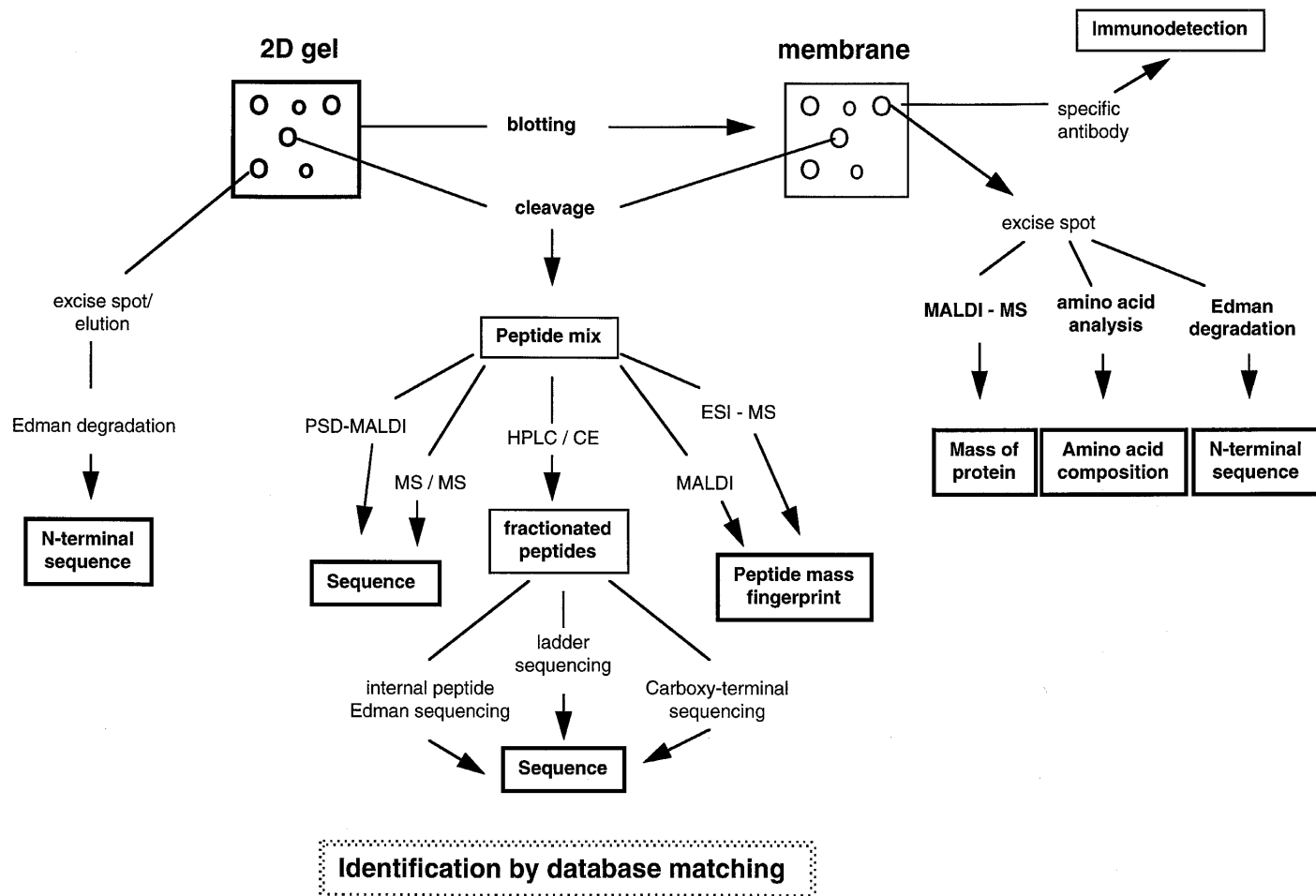
Συνδυασμένες ηλεκτροφορητικές ΤΕΧΝΙΚΕΣ



Συνδυασμένες Τεχνικές

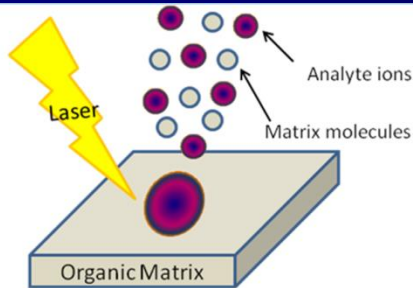


Συνδυασμένες τεχνικές shotgun - proteomics

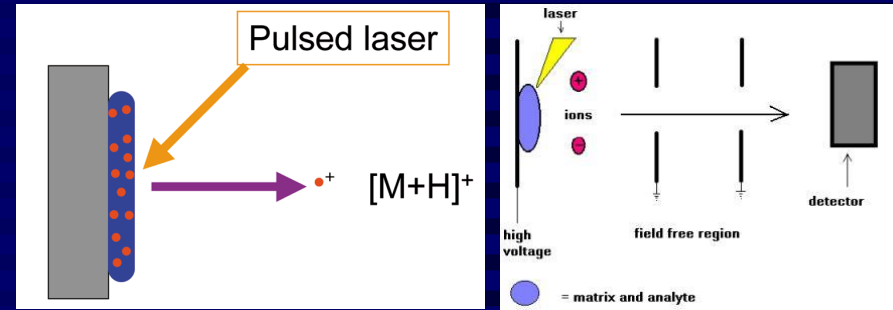
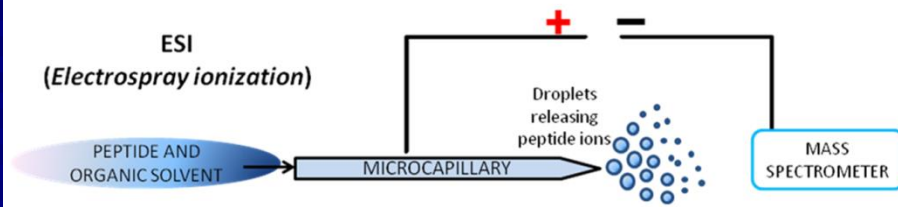


Ανίχνευση με MS

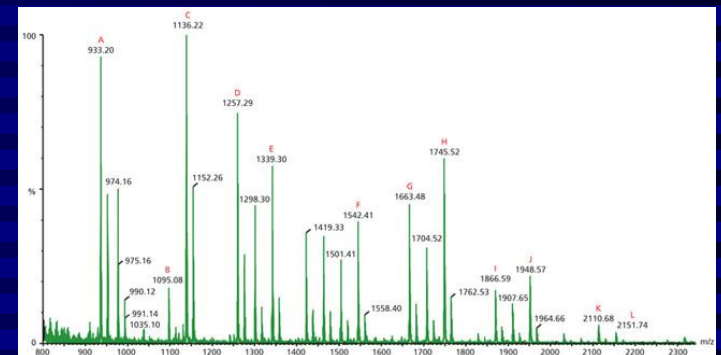
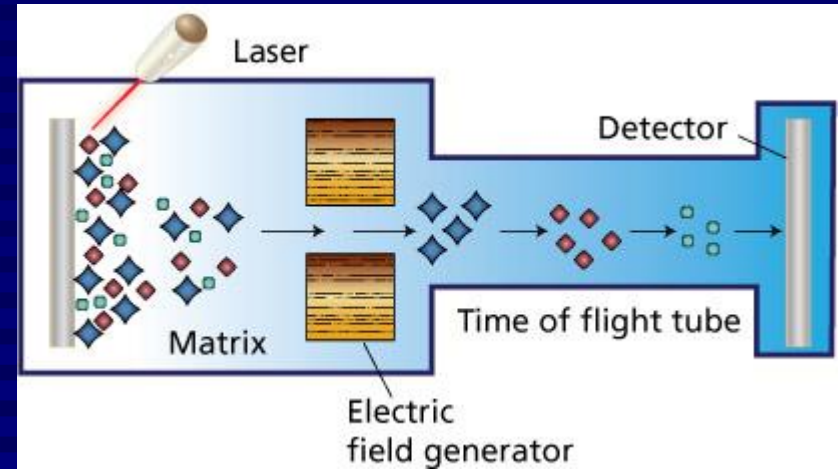
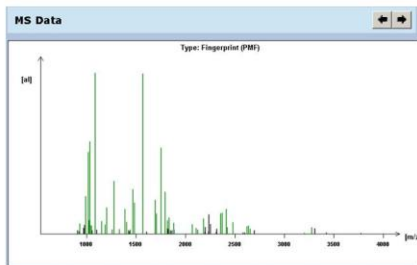
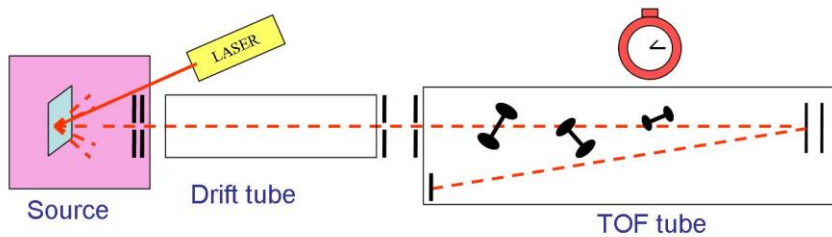
A)
MALDI
(Matrix-assisted laser desorption/ionization)



B)
ESI
(Electrospray ionization)



MALDI - TOF



Συνδυασμένες τεχνικές

2D - system



MS



Φυγοκέντρηση

- Διακρίνονται δύο μορφές
- Αναλυτική
 - Προσδιορισμός φυσικοχημικών σταθερών (μοριακή μάζα, συντελεστής διάχυσης, σταθερά καθίζησης)
- Παρασκευαστική
 - Απομόνωση και καθαρισμός ουσιών

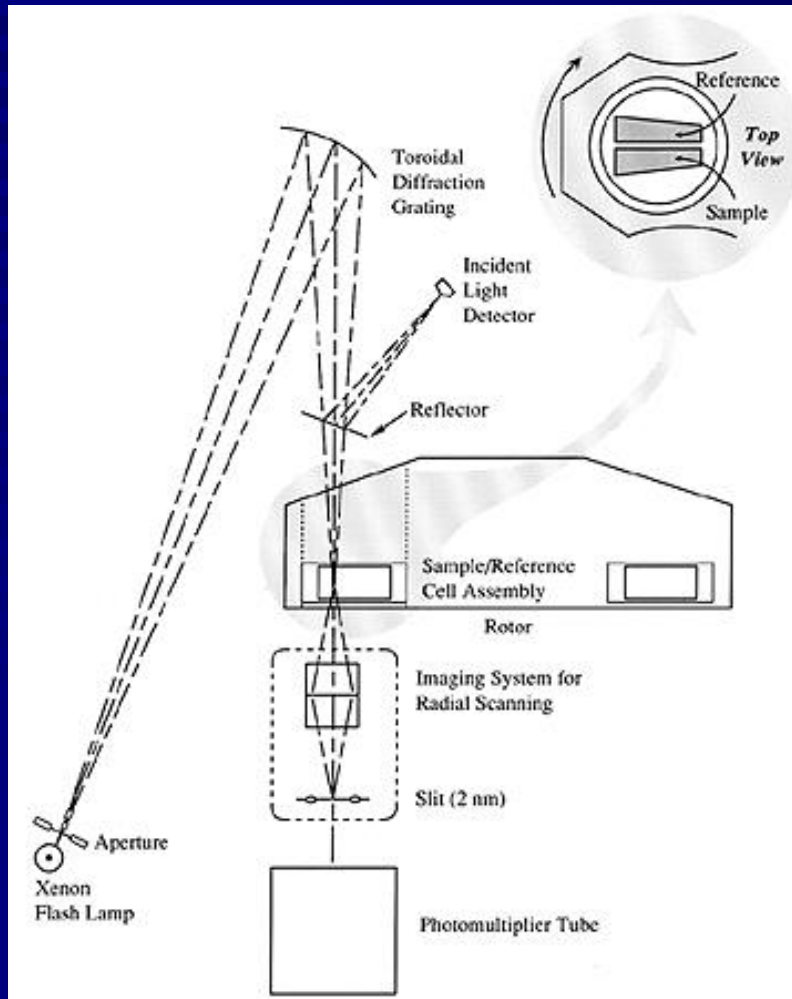
Αναλυτική φυγοκέντρωση

- Σκοπός είναι μόνον η εύρεση των φυσικοχημικών σταθερών του μορίου (μοριακή μάζα, συντελεστής διάχυσης, κτλ)
- Επιτυγχάνεται με την **καταγραφή της κίνησης** του κάθε σωματιδίου στην διάρκεια του χρόνου της φυγοκέντρωσης
 - απαραίτητη η απόλυτος καθαρότητα των υπό φυγοκέντρωση σωματιδίων
 - για να πραγματοποιηθεί πρέπει ο σωλήνας φυγοκέντρωσης είναι υάλινος

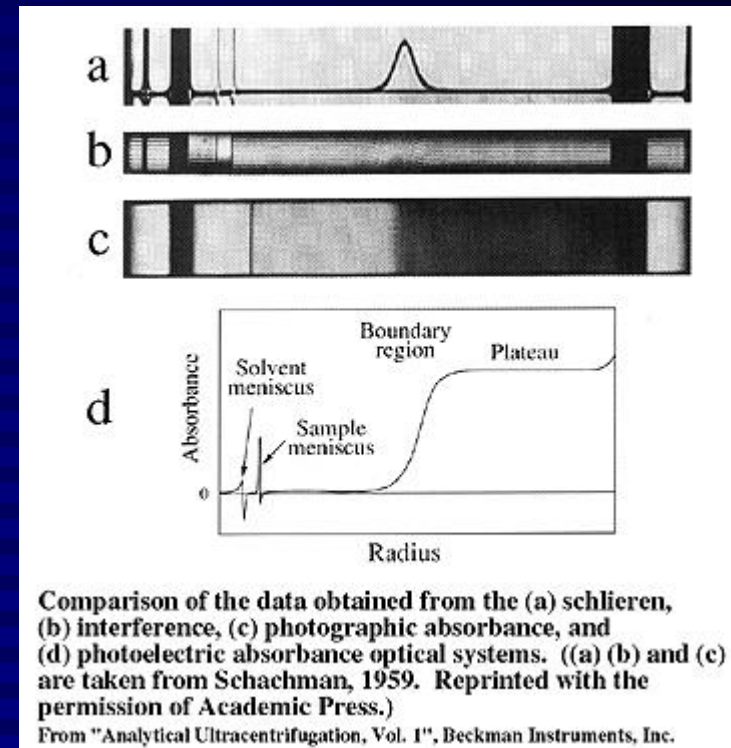
Αναλυτική φυγοκέντρωση

- Η καταγραφή της κίνησης των σωματιδίων πραγματοποιείται με μέτρηση είτε στο UV ή του δείκτη διάθλασης και αποτυπώνεται είτε σε καταγραφέα ή σε φωτογραφικό φιλμ
- Η ανάπτυξη της ΑΥ έχει προχωρήσει σε τρεις τομείς:
 - Μηχανικές βελτιώσεις των συσκευών
 - ανάπτυξη μεγαλύτερης ταχύτητας, μείωση των κινδύνων ατυχήματος, κτλ
 - Βελτιώσεις των οπτικών συστημάτων καταγραφής
 - Μαθηματική εξέλιξη

Αναλυτική φυγοκέντρωση



Schematic diagram of the optical system of the Beckman Optima XL-A Analytical Ultracentrifuge From "Analytical Ultracentrifugation, Vol. 1", Beckman Instruments, Inc.



Comparison of the data obtained from the (a) schlieren, (b) interference, (c) photographic absorbance, and (d) photoelectric absorbance optical systems. ((a) (b) and (c) are taken from Schachman, 1959. Reprinted with the permission of Academic Press.)

From "Analytical Ultracentrifugation, Vol. 1", Beckman Instruments, Inc.

Αναλυτική φυγοκέντρωση

- Καθώς η κεφαλή της φυγοκέντρου περιστρέφεται, εφαρμόζεται φυγόκεντρος δύναμη σε κάθε ουσία του διαλύματος και αυτό θα καθιζάνει με ταχύτητα ανάλογη της φυγοκέντρου δυνάμεως
- Το ιξώδες του διαλύματος και οι φυσικές ιδιότητες της ουσίας επηρεάζουν την ταχύτητα της καθίζησης
- Κάτω από συγκεκριμένες τιμές φυγοκέντρου δυνάμεως και ιξώδους του διαλύματος, η ταχύτητα καθίζησης μιας ουσίας θα είναι ανάλογη του μεγέθους της (μοριακή μάζα) και της διαφοράς των πυκνοτήτων (ουσίας και διαλύματος)

Αναλυτική φυγοκέντρωση

- Η κίνηση της ουσίας θα είναι σταθερή όταν εξισωθούν η φυγόκεντρος δύναμη και η άνωση:

$$\frac{1}{6} \pi d^3 (\rho_p - \rho_1) g = 3 \pi d \mu v \quad (1)$$

v = ταχύτητα (καθίζησης) της ουσίας

d = διάμετρος της σφαίρας

ρ_p = πυκνότητα ουσίας

ρ_1 = πυκνότητα υγρού

μ = ιξώδες διαλύτη

g = βαρύτητα

- που οδηγεί στην:

$$v = \frac{d^2 (\rho_p - \rho_1)}{18 \mu} x g \quad (2)$$

Αναλυτική φυγοκέντρηση

□ Δηλαδή η ταχύτητα καθίζησης:

- Είναι ανάλογη του μεγέθους (όγκου) της ουσίας
- Είναι ανάλογη της διαφοράς πυκνοτήτων ουσίας-διαλύματος (μηδενίζεται όταν εξισωθούν)
- Μειώνεται με αύξηση του ιξώδους του διαλύματος
- Αυξάνεται με αύξηση της φυγοκέντρου δυνάμεως

Αναλυτική φυγοκέντρωση

Θεωρώντας ότι $\frac{dr}{dt} = v$ (σε cm/sec)

τότε ανά μονάδα φυγοκεντρικής δύναμης:

$$\frac{dr}{dt} = s\omega^2 r \quad (3)$$

s = συντελεστής καθίζησης εκφρασμένος σε sec

r = απόσταση της ουσίας από το κέντρο της
στροφής (cm)

ω = γωνιακή ταχύτητα

Αναλυτική φυγοκέντρωση

- Με συνδυασμό των εξισώσεων 2 και 3 εξάγεται η σύνδεση μεταξύ **συντελεστή καθίζησης** και **μοριακής μάζας**

$$\frac{v}{\omega^2 r} = \frac{M(1-V\rho)}{f}$$

$$s = \frac{M(1-V\rho)}{Nf}$$

$$\frac{s}{D} = \frac{M(1-V\rho)}{RT}$$

(4)

M = μοριακή μάζα

V = 1/ρ_p

f = μοριακός συντελεστής τριβής

N = αριθμός Avogadro

D = συντελεστής διάχυσης

R = σταθερά αερίων

T = απόλυτη θερμοκρασία

- Η εξίσωση 4 πρέπει να διορθωθεί για ιδανικές καταστάσεις διαλύματος και θερμοκρασίας, δηλαδή να υπολογιστεί το $s_{20,w}$ το οποίο μετά θα διορθωθεί για άπειρη αραιώση της ουσίας και θα προκύψει η “πραγματική” τιμή του $s^0_{20,w}$

R = 0,082 L·atm / mol·K ή R = 8,314 [joule](#) / mol·K.

Η σταθερά R ή σταθερά Rutherford είναι σταθερή ανεξάρτητα το αέριο και της συνθήκες

Παρασκευαστική Φυγοκέντρηση

- Διακρίνονται δύο μορφές
- Διαφορική: πορεία διαχωρισμού σωματιδίων
 - Διαχωρισμός στερεών συστατικών
 - Διαχωρισμός κυττάρων
 - Διαχωρισμός υποκυτταρικών οργανιδίων
- Φυγοκέντρηση διαχωρισμού διαλυτών μορίων: αναγνωρίζονται δύο μορφές
 - Φυγοκέντρηση ταχύτητας – καθίζησης
 - Φυγοκέντρηση καθίζησης – εξισορρόπησης

Παρασκευαστική Φυγοκέντρηση

ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

- Η μέθοδος που θ' ακολουθηθεί εξαρτάται πάντα από το είδος των μορίων των οποίων ζητείται ο διαχωρισμός
- Για να έχει επιτυχία η φυγοκέντρηση ταχύτητας-καθίζησης πρέπει η πυκνότητα της ουσίας να είναι μεγαλύτερη από την πυκνότητα οποιουδήποτε σημείου του διαλύματος
- Η φυγοκέντρηση σταματά πριν κάποια από τις διαχωριζόμενες ζώνες φθάσει στον πυθμένα
- Στην φυγοκέντρηση καθίζησης-εξισορρόπησης ο διαχωρισμός των ζωνών στηρίζεται μόνο στην διαφορετική πυκνότητα των ουσιών, ανεξάρτητα της διάρκειας της φυγοκέντρησης

Παρασκευαστική Φυγοκέντρηση

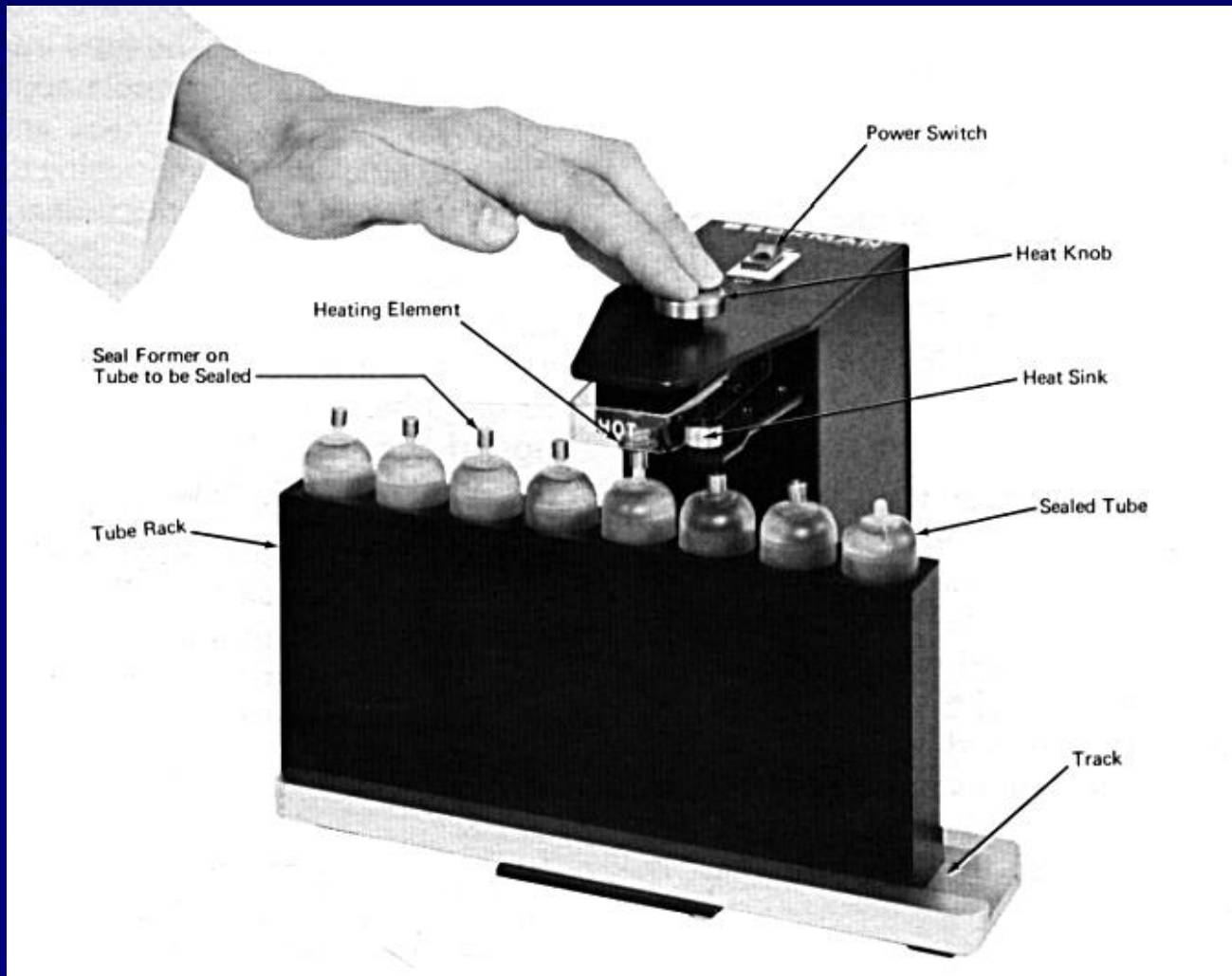
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΚΛΙΣΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΩΝ

- Τρεις μεθοδολογίες
 - Ειδική συσκευή
 - Γραμμική κλίση
 - Τοποθέτηση διαλυμάτων (σουκρόζης ή CsCl) διαφορετικής συγκέντρωσης
 - Δημιουργία της κλίσης κατά τη φυγοκέντρηση (σε ειδικές περιπτώσεις)



Παρασκευαστική Φυγοκέντρηση

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΣΩΛΗΝΩΝ



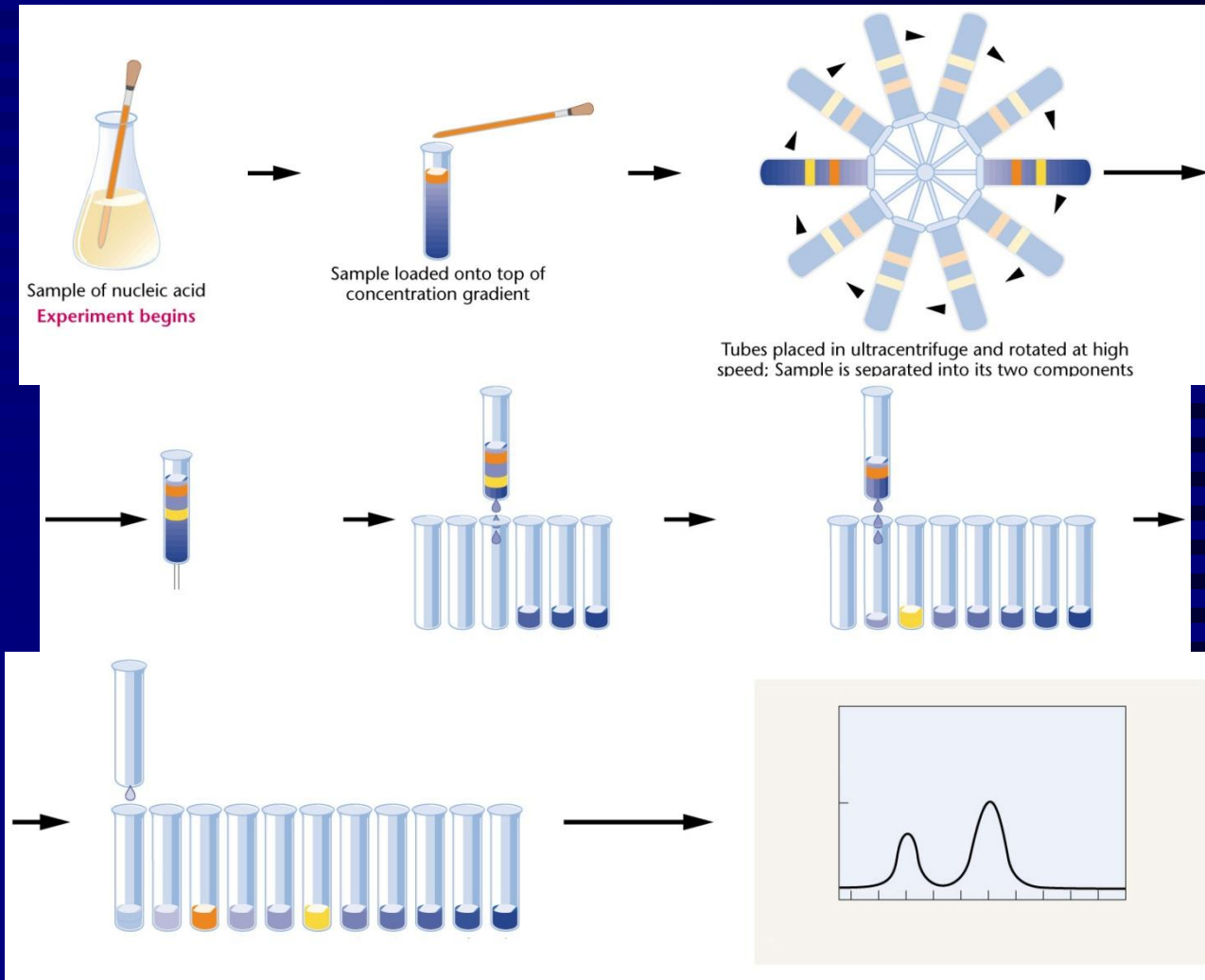
Παρασκευαστική Φυγοκέντρηση

ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΘΕΙΣΩΝ ΖΩΝΩΝ

- Κλασμάτωση με:
- Ροή ελαφρού, μη αναμίξιμου υγρού (λάδι παραφίνης), από πάνω προς τα κάτω
- Ροή βαριού, μη αναμίξιμου υγρού (fluorinert), από κάτω προς τα πάνω (είναι η πλέον σωστή διαδικασία)
- Ψύξη του σωλήνα και κοπή, με πριόνι των ζωνών
 - Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιείται κλασματοσυλλέκτης
- Τα δείγματα, αμέσως μετά, αναλύονται ως προς το προς μελέτη συστατικό, για να διαπιστωθεί ή όχι ο διαχωρισμός
- Επίσης, πραγματοποιείται και η μέτρηση της πυκνότητας για να επιβεβαιωθεί η τελειότητα της πορείας που ακολουθήθηκε

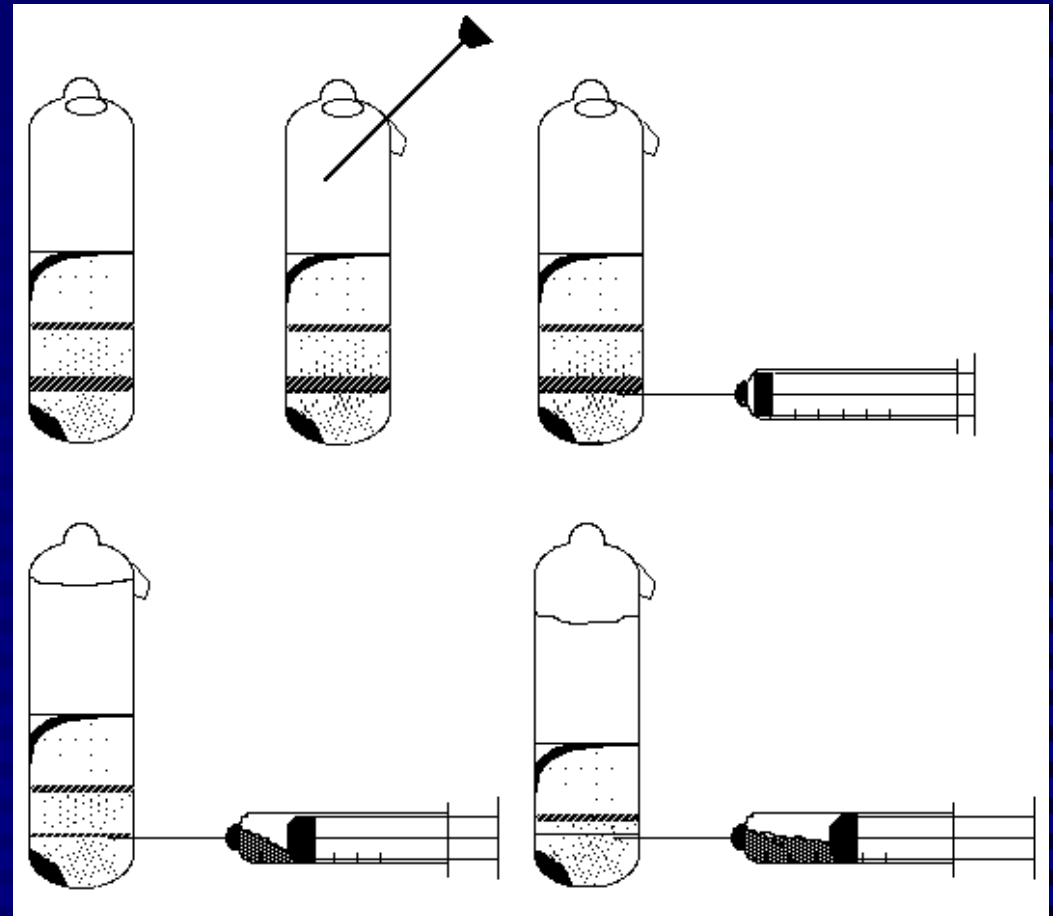
Παρασκευαστική Φυγοκέντρηση

ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΘΕΙΣΩΝ ΖΩΝΩΝ



Παρασκευαστική Φυγοκέντρηση

ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΘΕΙΣΩΝ ΖΩΝΩΝ



ΤΡΟΠΟΙ ΓΙΑ ΝΑ ΜΕΙΩΘΕΙ Η ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗΣ

- Προπαρασκευή της κλίσης πυκνοτήτων με ένα από τους δύο προαναφερθέντες τρόπους
- Χρήση κεφαλής σταθερής γωνίας (μέχρι μηδενικής γωνίας)
- Σμίκρυνση του ύψους του σωλήνα φυγοκέντρησης
- Ο παράγων που καθορίζει την διάρκεια της φυγοκέντρησης (clearance factor, k και k'') χρησιμοποιείται ευρύτατα για την άμεση σύγκριση της διαχωριστικής ικανότητας των διαφόρων κεφαλών φυγοκέντρου και συνεπώς την εύρεση της καταλλήλου κεφαλής, αλλά και του απαιτούμενου χρόνου για την επιτέλεση του συγκεκριμένου διαχωρισμού

ΤΡΟΠΟΙ ΓΙΑ ΝΑ ΜΕΙΩΘΕΙ Η ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗΣ

- Στην ουσία, ο παράγοντας k παρέχει κάποια εκτίμηση του χρόνου (σε ώρες) που απαιτείται για την καθίζηση (στη μορφή ιζήματος) ενός σωματιδίου γνωστού συντελεστή καθίζησης, s (σε μονάδες Svedberg), στη μέγιστη ταχύτητα της κεφαλής

$$t = \frac{k}{s}$$

και υπολογίζεται από την εξίσωση

$$k = \frac{\ln(r_{\max}/r_{\min})}{\omega^2} \times \frac{10^{13}}{3600}$$

$$\omega = 0.10472 \times \text{RPM}$$

r_{\max} = μέγιστη ακτινική απόσταση (σε cm) από τον άξονα φυγοκέντρωσης

r_{\min} = ελάχιστη ακτινική απόσταση (σε cm) από τον άξονα φυγοκέντρωσης

- Όσο μικρότερος είναι ο παράγοντας k , τόσο μικρότερος είναι ο χρόνος φυγοκέντρωσης

ΤΡΟΠΟΙ ΓΙΑ ΝΑ ΜΕΙΩΘΕΙ Η ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗΣ

- Ο παράγοντας k'' χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του χρόνου που απαιτείται, ώστε ένα σωματίδιο να φτάσει στον πυθμένα του σωλήνα φυγοκέντρησης που περιέχει διαβαθμισμένη (5-20 %) συγκέντρωση σουκρόζης, κάτω από την μέγιστη ταχύτητα της κεφαλής

$$k' = \frac{(I_{Z_2} - I_{Z_1})}{\omega^2} \times \frac{10^{13}}{3600}$$

Z_2 = μέγιστη συγκέντρωση σουκρόζης

Z_1 = ελάχιστη συγκέντρωση σουκρόζης

I = τιμές που προκύπτουν από πίνακες μετά από τον υπολογισμό του Z_0 από την εξίσωση

$$Z_0 = \frac{Z_1 r_{\max} - Z_2 r_{\min}}{r_{\max} - r_{\min}}$$

- Οι παράγοντες k και k'' χρησιμοποιούνται για την εύρεση του χρόνου φυγοκέντρησης σε κεφαλή διαφορετική από εκείνη με την οποία συνήθως πραγματοποιείται ο διαχωρισμός, μέσω της σχέσης

$$t_1 = \frac{k_1 t_2}{k_2}$$

ΚΕΦΑΛΕΣ ΖΩΝΗΣ - ΚΕΦΑΛΕΣ ΣΥΝΕΧΟΥΣ ΡΟΗΣ

- Πρόκειται για κεφαλές φυγοκέντρου που δεν περιέχουν “θήκες” για σωλήνες, αλλά ολόκληρη η κεφαλή είναι ο “σωλήνας φυγοκέντρου”
- Δύο είναι οι διαφορές τους:
 - Το σχήμα τους
 - Οι πρώτες χρησιμοποιούνται μόνο για φυγοκέντρηση ταχύτητας-καθίζησης, ενώ οι δεύτερες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμα και για διαφορική φυγοκέντρηση

ΚΕΦΑΛΕΣ ΖΩΝΗΣ

ΚΕΦΑΛΕΣ ΣΥΝΕΧΟΥΣ ΡΟΗΣ



ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ-Α

1. Ποια είδη χρωματογραφίας στήλης γνωρίζετε; Ποια χαρακτηριστικά στοιχεία των αναλυόμενων μακρομορίων λαμβάνονται από καθεμιά από αυτές;
2. Να αναφέρετε συνοπτικά τις διαφορές των τεχνικών: αναλυτική φυγοκέντρηση, παρασκευαστική φυγοκέντρηση, διαφορική φυγοκέντρηση.
3. Ποιες είναι οι ομοιότητες και οι διαφορές και ποια είναι τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα μεταξύ των HPLC κανονικής φάσης και ανάστροφης φάσης; Πως επιλέγεται η μια έναντι της άλλης;
4. Ποιες παράμετροι επηρεάζουν την ταχύτητα καθίζησης μακρομορίου κατά την αναλυτική φυγοκέντρηση;
5. Ποιος είναι ο ρόλος των χρωστικών στην ανάπτυξη της χρωματογραφίας συγγενείας; Ποιες είναι οι εφαρμογές της στην ανάλυση;
6. Θέλετε να πραγματοποιήσετε ανάλυση των πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης μέσω HPLC. Ποιες συνθήκες θα εφαρμόσετε και γιατί; Να αναφερθείτε συνοπτικά.
7. Σε ποιες περιπτώσεις θα χρησιμοποιήσετε την αναλυτική φυγοκέντρηση για τον προσδιορισμό της μοριακής μάζας ενός μακρομορίου; Ποια άλλα χαρακτηριστικά του μακρομορίου μπορείτε επίσης να προσδιορίσετε; Να εξηγήσετε.
8. Με ποια κριτήρια θα αποφασιστεί η χρήση ηλεκτροφόρησης σε αγαρόζη ή σε πολυακρυλαμίδιο για την ανάλυση βιολογικών μακρομορίων; Ποιος είναι ο ρόλος του SDS και του τριαδικού ρυθμιστικού διαλύματος στην ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου;
9. Με ποιες μεθοδολογίες ή συνδυασμό μεθοδολογιών μπορείτε να προσδιορίσετε τη μοριακή μάζα ενός πρωτεϊνικού μορίου; Με ποιες μεθοδολογίες ή συνδυασμό μεθοδολογιών μπορείτε να προσδιορίσετε τη μοριακή μάζα του DNA; Να εξηγήσετε.
10. Ποια στοιχεία μπορούν να ληφθούν από την αναλυτική ηλεκτροφόρηση παρουσία SDS ενός πρωτεϊνικού μορίου; Ποια πρόσθετα στοιχεία μπορούν να ληφθούν από την ηλεκτροφόρηση του ίδιου μορίου σε δύο διαστάσεις; Να εξηγήσετε.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ-Β

1. Για ποιο λόγο ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των νουκλεϊνικών οξέων γίνεται συνήθως σε αγαρόζη και των πρωτεϊνών σε πολυακρυλαμίδιο; Γιατί η ηλεκτροφόρηση αγαρόζης γίνεται σε οριζόντια συσκευή, ενώ η αντίστοιχη πολυακρυλαμιδίου σε κατακόρυφη; Τι θα μπορούσε να συμβεί αν γινόταν ανάποδα;
2. Θέλετε να προχωρήσετε στην ανάλυση ενός μεμβρανικού ενζύμου. Ποια μέθοδο θα προτιμήσετε και γιατί;
3. Ποιά είναι η προτιμότερη μέθοδος για τον διαχωρισμό και την ανάλυση των πρωτεϊνών ενός κυτταρικού εκχυλίσματος. Να εξηγήσετε.
4. Σας ζητείται να διαπιστώσετε την ύπαρξη συγκεκριμένου πρωτεϊνικού μορίου σε ένα κυτταρικό εκχύλισμα. Ποιά μέθοδο ή ποιο συνδυασμό μεθόδων θα ακολουθήσετε; Να εξηγήσετε.
5. **Με ποιες μεθοδολογίες ή συνδυασμό μεθοδολογιών μπορείτε να ταυτοποιήσετε μια πρωτεΐνη; Να εξηγήσετε.**
6. Η ανάλυση των πρωτεϊνών ενός κυτταρικού εκχυλίσματος με ηλεκτροφόρηση έδειξε την ύπαρξη μιας ευρείας ζώνης μοριακής μάζας 50 kDa. Ποιες μεθοδολογίες ή συνδυασμό μεθοδολογιών μπορείτε να εφαρμόσετε ώστε να διαπιστώσετε αν η ευρεία ζώνη αντιστοιχεί σε μια ή παραπάνω πρωτεΐνες; Να αναφερθείτε διεξοδικά.
7. Κατά την ηλεκτροφορητική ανάλυση κυτταρικών πρωτεϊνών διαπιστώσατε ότι υπάρχει συσσώρευση μικρομοριακών πρωτεϊνών στο μέτωπο της χρωστικής. Τι θα κάνετε για να αναλύσετε τα συγκεκριμένα συστατικά; Πως θα σκεφτείτε και ποιες μεθοδολογίες θα χρησιμοποιήσετε;
8. Σας δίνεται ένα εμπορικό σκεύασμα πρωτεΐνης προερχόμενης από το αίμα. Υποψιάζεστε ότι περιέχει ως πρόσμιξη αλβουμίνη του αίματος. Ποιες αναλυτικές μεθοδολογίες μπορείτε να εφαρμόσετε για να διευκρινίσετε την υποψία σας. Να εξηγήσετε λεπτομερώς.
9. **Γιατί η ανάλυση των πρωτεϊνών του ορού δεν πραγματοποιείται με SDS-ηλεκτροφόρηση;**
10. Να δώσετε τους ορισμούς: α. χρόνος ανάρθεσης, β. συντελεστής διαχωρισμού, γ. διαχωριστότητα. Τι εκφράζουν αυτοί οι όροι και πως χρησιμοποιούνται στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς;

ΕΡΓΑΣΙΕΣ-Α

1. Σε ένα μπιφτέκι μοσχαρίσιο υποψιάζεστε ότι υπάρχει πρόσμιξη κρέατος αλόγου. Ποιες αναλυτικές μεθοδολογίες μπορείτε να χρησιμοποιήσετε σε συνδυασμό ή όχι για να διευκρινίσετε την υποψία σας; Να αναφερθείτε επιγραμματικά σε όλες τις μεθοδολογίες που έχετε διδαχθεί και θα αναπτύξετε διεξοδικά τις μεθοδολογίες που αφορούν την ύλη ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.
2. Κατά την ηλεκτροφορητική ανάλυση κυτταρικών πρωτεϊνών διαπιστώσατε ότι υπάρχει συσσώρευση μικρομοριακών πρωτεϊνών στο μέτωπο της χρωστικής. Τι θα κάνετε για να αναλύσετε τα συγκεκριμένα συστατικά; Να αναφερθείτε διεξοδικά στις μεθοδολογίες ή συνδυασμό μεθοδολογιών που θα ακολουθήσετε.
3. Τι συνδυασμό ή συνδυασμούς κινητής και ακίνητης φάσης θα χρησιμοποιήσετε σε χρωματογραφία HPLC, ώστε να αναλύσετε τα στεροειδή σε αίμα ή ούρα αθλητών και γιατί; Ποια θα είναι κατά τη γνώμη σας η πλήρης πορεία που πρέπει να ακολουθήσετε κατά την ανάλυση, από τη στιγμή που λαμβάνεται το βιολογικό υγρό;
4. Σε μια ασθένεια έχει παρατηρηθεί εκτεταμένη φωσφορυλίωση των υδροξυαμινοξέων ενός πρωτεϊνικού μορίου των αιμοσφαιρίων, πριν γίνουν ορατά τα συμπτώματα της νόσου. Ποια αναλυτική μεθοδολογία ή συνδυασμό μεθοδολογιών θα εφαρμόζατε προκειμένου να πιστοποιήσετε τη φυσιολογική ή εκτεταμένη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης, ώστε να γίνεται έγκαιρα η διάγνωση της νόσου;
5. Σας δίνεται ένα εμπορικό σκεύασμα πρωτεΐνης προερχόμενης από το αίμα. Υποψιάζεστε ότι περιέχει ως πρόσμιξη αλβουμίνη του αίματος. Ποιες αναλυτικές μεθοδολογίες μπορείτε να εφαρμόσετε για να διευκρινίσετε την υποψία σας. Να εξηγήσετε λεπτομερώς.
6. Με ποιες μεθοδολογίες ή συνδυασμό μεθοδολογιών μπορείτε να προσδιορίσετε τη μοριακή μάζα ενός πρωτεϊνικού μορίου; Με ποιες μεθοδολογίες ή συνδυασμό μεθοδολογιών μπορείτε να προσδιορίσετε τον αριθμό και το είδος των υπομονάδων ενός πρωτεϊνικού μορίου; Να εξηγήσετε διεξοδικά.
7. Θέλετε να πραγματοποιήσετε ανάλυση των πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης μέσω HPLC. Ποιες συνθήκες (κινητή φάση, στατική φάση, κλπ) θα εφαρμόσετε και γιατί; Να αναφερθείτε διεξοδικά.

ΕΡΓΑΣΙΕΣ-B

1. Σας ζητείτε να προσδιορίσετε τις συγκεντρώσεις φυτοφαρμάκων σε περιβαλλοντικά δείγματα (π.χ. πόσιμα ύδατα, χώμα, κλπ). Ποια ή ποιες αναλυτικές μεθοδολογίες θα προτείνετε να χρησιμοποιηθούν και γιατί; Ποια θα είναι η πορεία που θα ακολουθήσετε για την ανάλυση από τη στιγμή που λαμβάνετε το κάθε διαφορετικό δείγμα;
2. Σας ζητείται να διαπιστώσετε την ύπαρξη συγκεκριμένου πρωτεϊνικού μορίου σε ένα κυτταρικό εκχύλισμα. Ποια μέθοδο ή ποιο συνδυασμό μεθόδων θα ακολουθήσετε; Να εξηγήσετε επιγραμματικά όλες τις μεθόδους που μπορείτε να χρησιμοποιήσετε και να αναφερθείτε λεπτομερώς στις μεθοδολογίες που αφορούν την ύλη ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.
3. Η ανάλυση των πρωτεϊνών ενός κυτταρικού εκχυλίσματος με ηλεκτροφόρηση έδειξε την ύπαρξη μιας ευρείας ζώνης μοριακής μάζας 50 kDa. Ποιες μεθοδολογίες ή συνδυασμό μεθοδολογιών μπορείτε να εφαρμόσετε ώστε να διαπιστώσετε αν η ευρεία ζώνη αντιστοιχεί σε μια ή παραπάνω πρωτεΐνες; Να αναφερθείτε διεξοδικά.
4. Πως ερμηνεύεται το φαινόμενο της παρουσίας πολλών πρωτεϊνικών ζωνών κατά την ανάλυση με ισοεστιακή ηλεκτροφόρηση καθαρής πρωτεΐνης; Να εξηγήσετε. Ποια/ες μεθοδολογία/ες θα εφαρμόσετε για να επιβεβαιώσετε την εξήγηση που θα δώσετε;
5. Με ποια κριτήρια θα αποφασιστεί η χρήση ηλεκτροφόρησης σε αγαρόζη ή σε πολυακρυλαμίδιο για την ανάλυση βιολογικών μακρομορίων; Θα αναφερθείτε σε όλα τα βιολογικά μακρομόρια. Ποιος είναι ο ρόλος του SDS και του τριαδικού ρυθμιστικού διαλύματος στην ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου; Να εξηγήσετε λεπτομερώς. Ποιες είναι οι ομοιότητες και οι διαφορές και ποια είναι τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα μεταξύ των HPLC κανονικής φάσης και ανάστροφης φάσης;
6. Ποια είδη χρωματογραφίας στήλης γνωρίζετε; Ποια χαρακτηριστικά στοιχεία (φυσικοχημικά, βιοχημικά, βιολογικά, κλπ) των αναλυόμενων μορίων ή μακρομορίων λαμβάνονται από καθεμιά από αυτές;
7. Ποιες είναι οι προϋποθέσεις για την εφαρμογή της αέριας χρωματογραφίας στην ανάλυση μορίων βιολογικού ενδιαφέροντος; Να αναφέρετε πέντε τουλάχιστον διαφορετικά παραδείγματα (ως προς το είδος των αναλυόμενων συστατικών) εφαρμογής μεθόδων αέριας χρωματογραφίας για την ανάλυση μορίων βιολογικού ενδιαφέροντος.

ΕΡΓΑΣΙΕΣ-Γ

1. Ποια στοιχεία μπορούν να ληφθούν από την αναλυτική ηλεκτροφόρηση απουσία ή παρουσία SDS ενός πρωτεϊνικού μορίου; Ποια στοιχεία μπορούν να ληφθούν από την αναλυτική ηλεκτροφόρηση απουσία ή παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης ενός πρωτεϊνικού μορίου; Ποια πρόσθετα στοιχεία μπορούν να ληφθούν από την ηλεκτροφόρηση του ίδιου μορίου σε δύο διαστάσεις, σε συνδυασμό ή όχι με άλλες αναλυτικές μεθοδολογίες; Να εξηγήσετε λεπτομερώς.
2. Ενδιαφέρεστε να απομονώσετε τα εξειδικευμένα αντισώματα έναντι συγκεκριμένου ιού από τον ορό ανοσοποιημένου ζώου. Ποια μεθοδολογία ή συνδυασμό μεθοδολογιών θα επιλέξετε; Με ποια αναλυτική μεθοδολογία θα ελέγξετε την καθαρότητα του παρασκευάσματος; Να εξηγήσετε λεπτομερώς.
3. Σε μια ασθένεια έχει παρατηρηθεί εκτεταμένη γλυκοζυλίωση ενός πρωτεϊνικού μορίου των αιμοσφαιρίων, πριν γίνουν ορατά τα συμπτώματα της νόσου. Ποια αναλυτική μεθοδολογία ή συνδυασμό μεθοδολογιών θα εφαρμόζατε προκειμένου να πιστοποιήσετε τη φυσιολογική ή εκτεταμένη γλυκοζυλίωση της πρωτεΐνης, ώστε να γίνεται έγκαιρα η διάγνωση της νόσου;
4. Σας ζητείτε να προσδιορίσετε αιθανόλη σε αίμα ανθρώπου. Ποια ή ποιες αναλυτικές μεθοδολογίες θα προτείνετε να χρησιμοποιηθούν και γιατί; Να περιγράψετε ολόκληρη την πορεία της ανάλυσης από τη στιγμή της λήψης του αίματος.
5. Κατά την απομόνωση ετερόλογης πρωτεΐνης από βακτήρια, υποψιάζεστε ότι, λόγω της διαφοράς του συστήματος των συνοδών πρωτεϊνών, δημιουργείται διαμοριακός δισουλφιδικός δεσμός. Ποια αναλυτική μεθοδολογία θα εφαρμόσετε και πως για να διαλευκάνετε την υποψία σας. [Σημειώνεται ότι έχετε στη διάθεσή σας τη φυσική πρωτεΐνη ως πρότυπο για τη μεθοδολογία που θα προτείνετε].
6. Ποια ή ποιες αναλυτικές μεθοδολογίες θα προτείνετε να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της ποιότητας αιθέριων ελαίων και γιατί; Να εξηγήσετε λεπτομερώς.
7. Ποια είναι η πορεία που ακολουθείται για την ανάλυση των πρωτεϊνών του ορού; Γιατί αυτή δεν πραγματοποιείται με SDS-ηλεκτροφόρηση; Να εξηγήσετε λεπτομερώς με εικόνες και παραδείγματα.
8. Κατά την ανάλυση καθαρού πρωτεϊνικού μορίου με SDS-ηλεκτροφόρηση, η μοριακή του μάζα υπολογίστηκε στα 50 kDa. Όταν η ηλεκτροφόρηση διεξήχθη παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης, η κινητικότητα της πρωτεϊνικής ζώνης αντιστοιχούσε σε μοριακή μάζα 25 kDa. Κατά την ανάλυση άλλου πρωτεϊνικού μορίου με SDS-ηλεκτροφόρηση, η μοριακή του μάζα υπολογίστηκε και πάλι στα 50 kDa. Όμως, στη δεύτερη περίπτωση, όταν η ηλεκτροφόρηση διεξήχθη παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης, η κινητικότητα της πρωτεϊνικής ζώνης αντιστοιχούσε σε μοριακή μάζα 55 kDa. Πως ερμηνεύονται τα αποτελέσματα αυτά; Ποιες μεθοδολογίες και πως, για να επιβεβαιώσετε την ερμηνεία που προτείνετε;