

2<sup>Η</sup> ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ  
ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΑΡΔΙΤΣΑ

# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ- ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

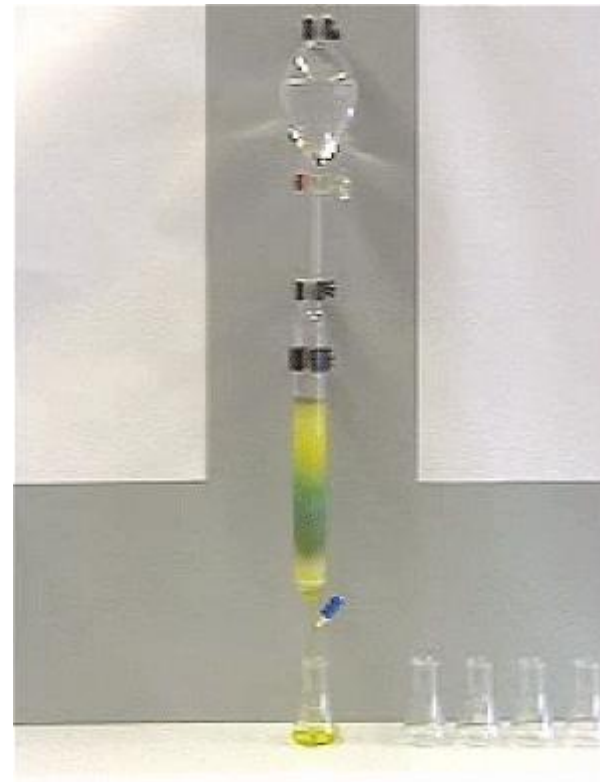
ΗΛΙΑΣ ΝΟΛΗΣ-ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΙΔΗΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ  
2012

# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Διαχωρίζει μεμονωμένα  
συστατικά μέσα σε ένα  
δείγμα:

Με βάση ορισμένα φυσικά  
χαρακτηριστικά τους, όπως:

- το μέγεθος του μορίου
- το σχήμα
- την πτητικότητα
- την διαλυτότητα κ.τ.λ.



# Χρωματογραφία

Όλα τα χρωματογραφικά συστήματα αποτελούνται από μια:

- **Κινητή φάση:** αυτή η φάση, στην οποία το προς ανάλυση δείγμα έχει διαλυθεί, μπορεί να είναι υγρή ή αέρια. Η κινητή φάση ρέει διαμέσου της στατικής φάσης.
- **Στατική φάση:** η φάση αυτή μπορεί να είναι στερεή, πηκτή (gel), υγρή ή ένα μείγμα στερεού-υγρού.
- Η επιλογή της στατικής και της κινητής φάσης γίνεται με τέτοιο τρόπο, ώστε οι ενώσεις που θέλουμε να διαχωριστούν να έχουν διαφορετικό χρόνο κατανομής στις δύο φάσεις.

# Συντελεστής κατανομής (Kd)

Η βάση όλων των τύπων χρωματογραφίας είναι ο λεγόμενος συντελεστής κατανομής (Kd), ο οποίος περιγράφει τον τρόπο με τον οποίο μια ένωση κατανέμεται ανάμεσα σε δυο μη αναμίξιμες φάσεις, όπως είναι η στατική και η κινητή φάση.

Ορισμός:

Συγκέντρωση του συστατικού A στη στατική φάση

---

Συγκέντρωση του συστατικού A στην κινητή φάση

Για να πετύχουμε το διαχωρισμό των προς ανάλυση συστατικών ενός δείγματος, εκμεταλλευόμαστε τη διαφορετική συγγένειά τους με τη στατική φάση.

# Τύποι χρωματογραφίας

Μπορούμε να πετύχουμε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς με δύο βασικές τεχνικές:

- Χρωματογραφία στήλης και
- Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) ή επίπεδη χρωματογραφία

# Χρωματογραφία στήλης

- Στατική φάση: βρίσκεται μέσα σε μια γυάλινη ή πλαστική ή μεταλλική στήλη, ενώ η
- Κινητή φάση: περνά μέσω της στήλης είτε λόγω βαρύτητας ή με τη χρήση περισταλτικής αντλίας, με τη διοχέτευση αερίου υπό πίεση.
- Είναι ο συνηθέστερος τύπος χρωματογραφίας.

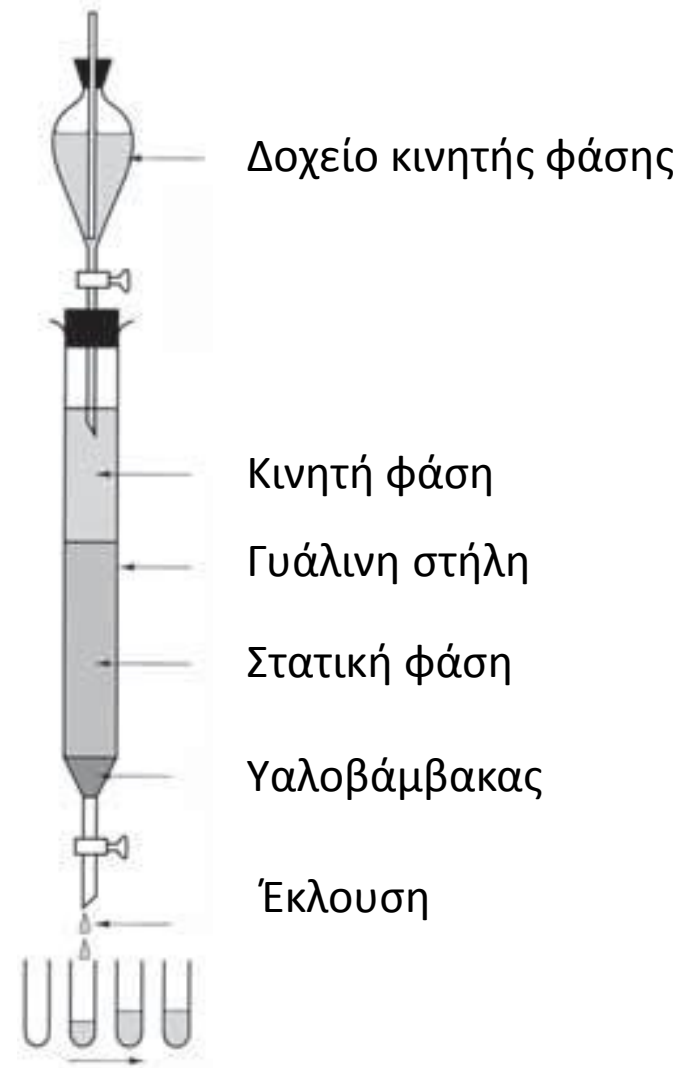
# Χρωματογραφία στήλης

- Το προς διαχωρισμό δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης, έτσι ώστε να δημιουργήσει μια διακριτή ζώνη.
- Το δείγμα διέρχεται από τη στατική φάση.
- Στη συνέχεια το δείγμα εκκλύεται από την κινητή φάση.

# Χρωματογραφία στήλης

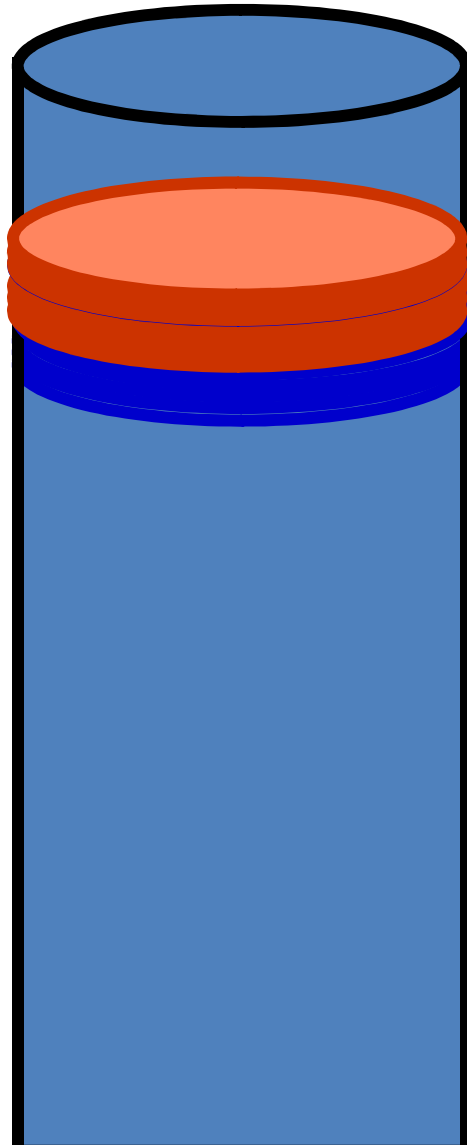
•Εάν οι διάφορες ουσίες του δείγματος έχουν διαφορετικούς συντελεστές κατανομής, τότε θα διαχωριστούν μέσα στη στήλη και θα εκλουστούν (θα εξέλθουν) σε διαφορετικούς χρόνους, όσο η κινητή φάση περνά μέσα από τη στήλη.

•Εάν κάτω από τη στήλη τοποθετηθεί κλασματοσυλλέκτης, τότε μπορούν να συλλεγούν τα διάφορα κλάσματα, καθώς βγαίνουν από τη στήλη.

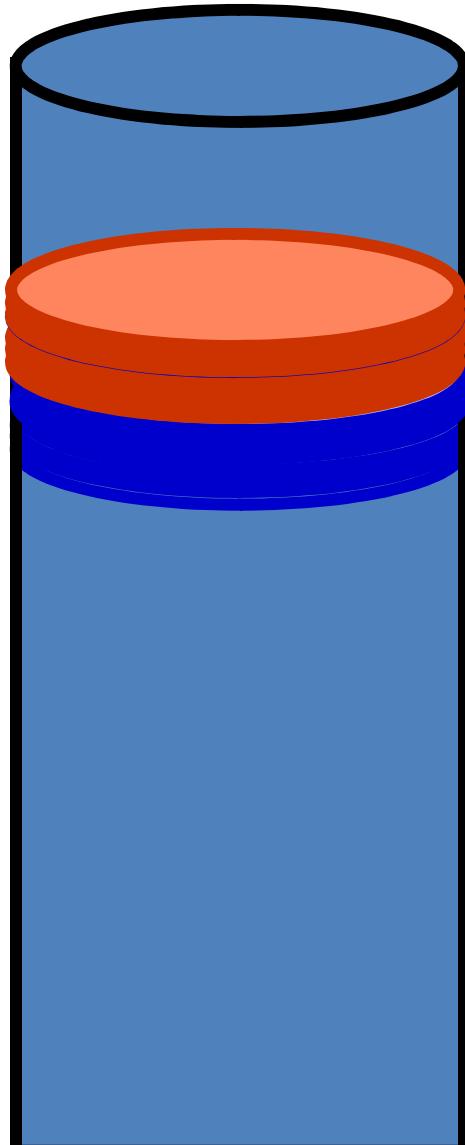




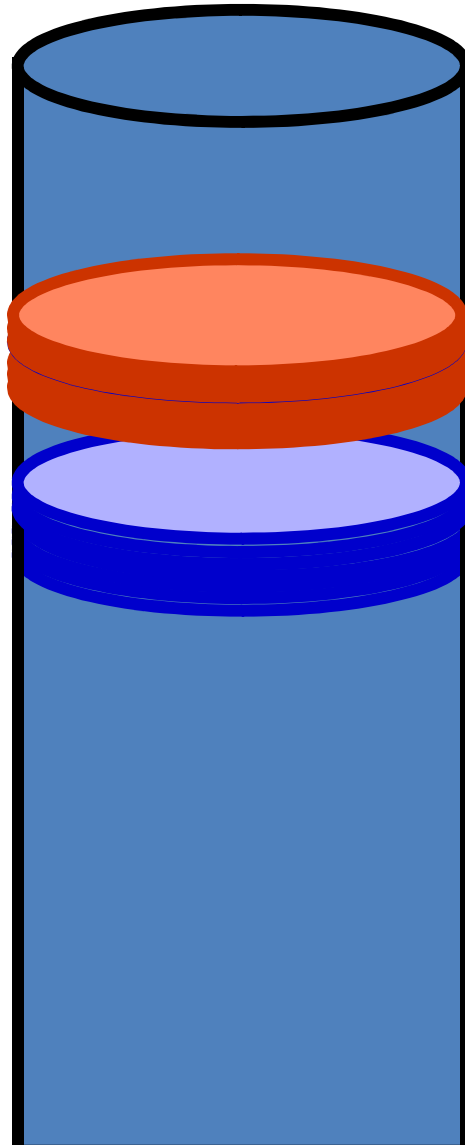
Η αρχή του διαχωρισμού



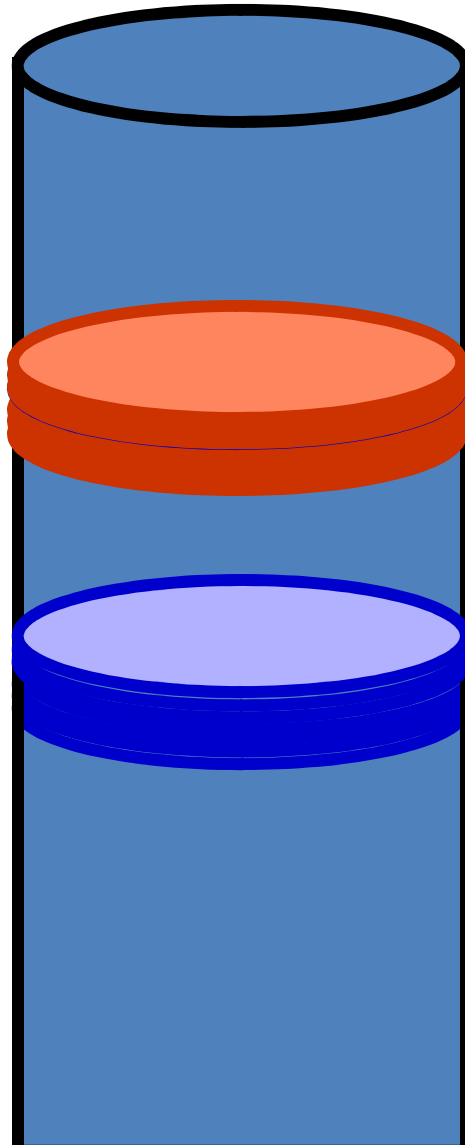
Η αρχή του διαχωρισμού



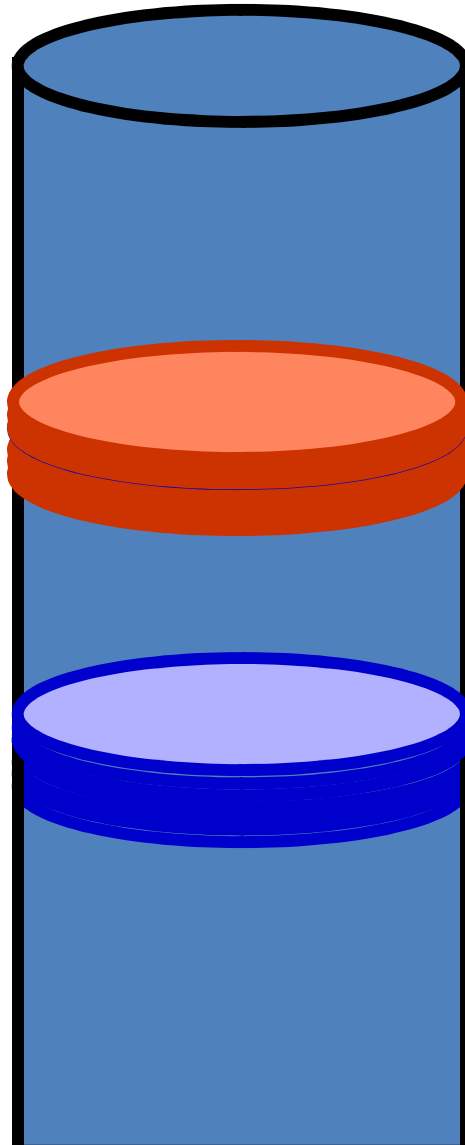
# Η αρχή του διαχωρισμού



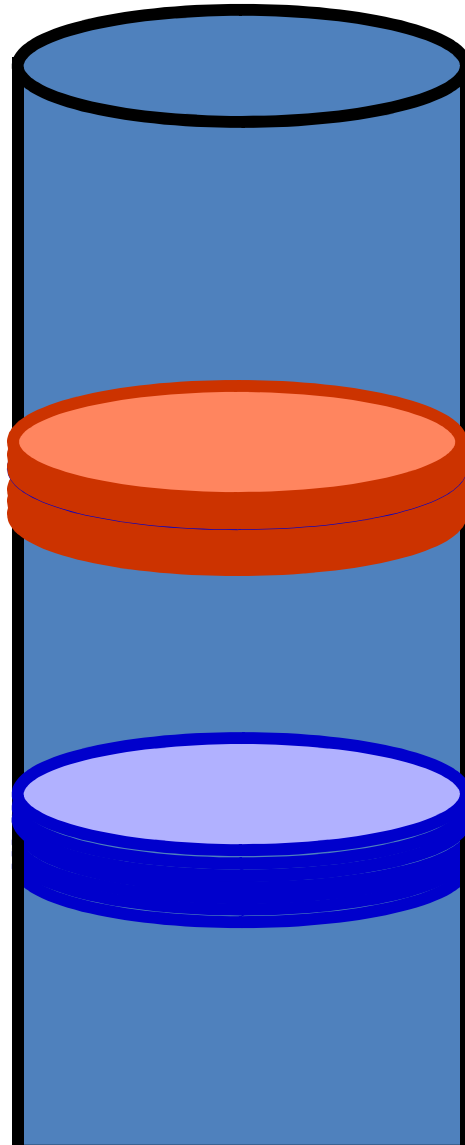
# Η αρχή του διαχωρισμού



# Η αρχή του διαχωρισμού



# Η αρχή του διαχωρισμού



# Χρωματογραφία στήλης

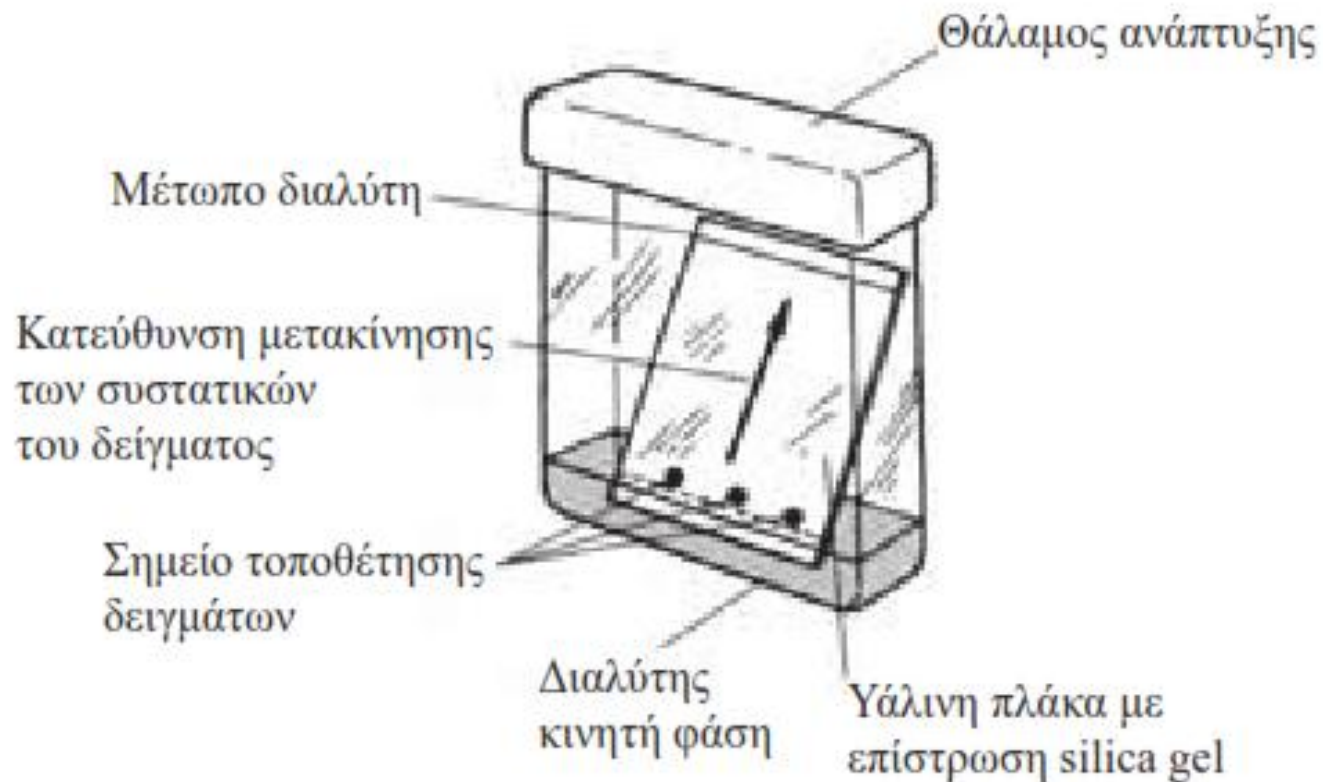
- **Χρόνος κατακράτησης ( $t_R$ = Retention time)**= ο χρόνος που χρειάζεται ένα συστατικό για να εξέλθει από τη στήλη.
- **Όγκος κατακράτησης ( $V_R$ = Retention Volume)** = ο όγκος της κινητής φάσης που απαιτείται για την έκλουση ενός συγκεκριμένου συστατικού από τη χρωματογραφική στήλη.

# Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) ή επίπεδη χρωματογραφία

- **Στατική φάση:** επιστρώνεται πάνω σε μια γυάλινη, πλαστική ή μεταλλική πλάκα.
- **Κινητή φάση:** Η κινητή υγρή φάση διαπερνά κατά μήκος την πλάκα της λεπτής στοιβάδας, που κρατιέται οριζόντια ή κατακόρυφα, από τριχοειδή φαινόμενα.
- Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνεται και η **χρωματογραφία χάρτου**, στην οποία η στατική υγρή φάση υποστηρίζεται από τις ίνες κυτταρίνης που περιέχει το χαρτί.



# Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) ή επίπεδη χρωματογραφία



# Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) ή επίπεδη χρωματογραφία

Μπορούμε να περιγράψουμε την κίνηση ενός συγκεκριμένου συστατικού του δείγματος, αναφερόμενοι στον παράγοντα συγκράτησης (RF), όπου:

$$RF = \frac{\text{Απόσταση που διανύθηκε από το συστατικό}}{\text{Απόσταση που διανύθηκε από το διαλύτη}}$$

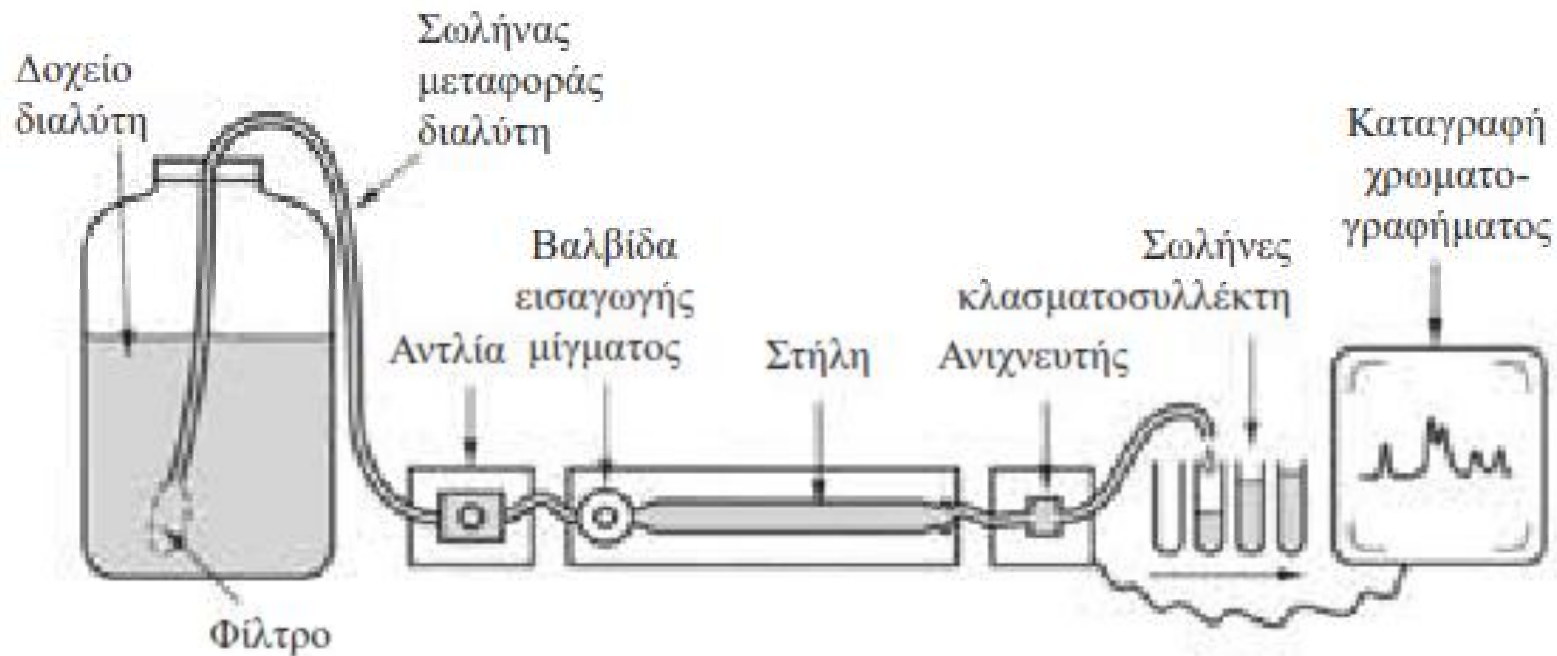
Η τιμή του RF είναι χαρακτηριστική για κάθε ένωση και συγκεκριμένο σύστημα διαλυτών.

# Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC, High Pressure Liquid Chromatography)

- **Μικρόκκοκα υλικά πλήρωσης**, που αντέχουν σε μεγάλες πιέσεις και ο σχεδιασμός **αντλιών** μεγάλης πίεσης και ροής είχε σαν αποτέλεσμα την εξέλιξη συστημάτων υψηλής απόδοσης, όπως η HPLC (High Pressure-Performance Liquid Chromatography).
- Τα συστήματα αυτά λειτουργούν και με πίεση που φτάνει το **10 MPa** → η κινητή φάση ρέει με μεγάλη ταχύτητα, οπότε μειώνεται ο χρόνος διέλευσης.
- Οι στήλες HPLC είναι κατασκευασμένες από **ανοξειδωτο ατσάλι**. Ανάλογα με την αρχή διαχωρισμού χρησιμοποιούνται και τα ανάλογα υλικά πλήρωσης.
- Η **ταχύτητα**, η **ευαισθησία** και η **πολλαπλή χρησιμότητα** της HPLC την καθιστούν ως την πιο κατάλληλη **μέθοδο διαχωρισμού μικρών μορίων βιολογικού ενδιαφέροντος**.

# Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)

Διάταξη HPLC:



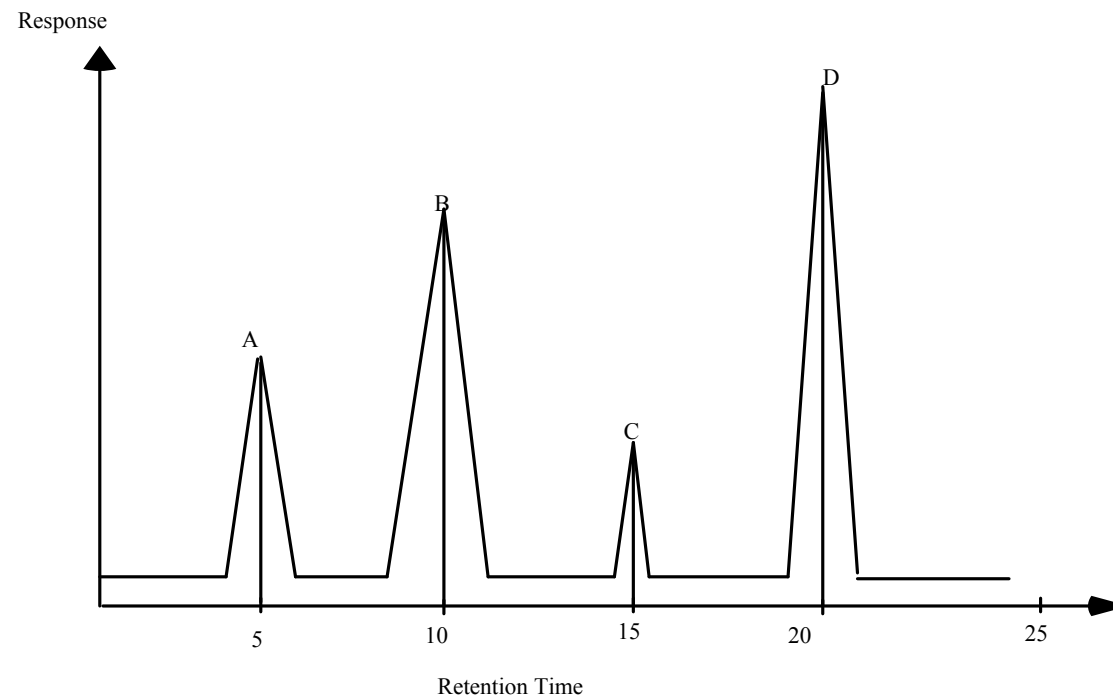
Οι στήλες στα HPLC συστήματα είναι συνδεδεμένες με έναν ανιχνευτή υψηλής ευαισθησίας.

# Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)

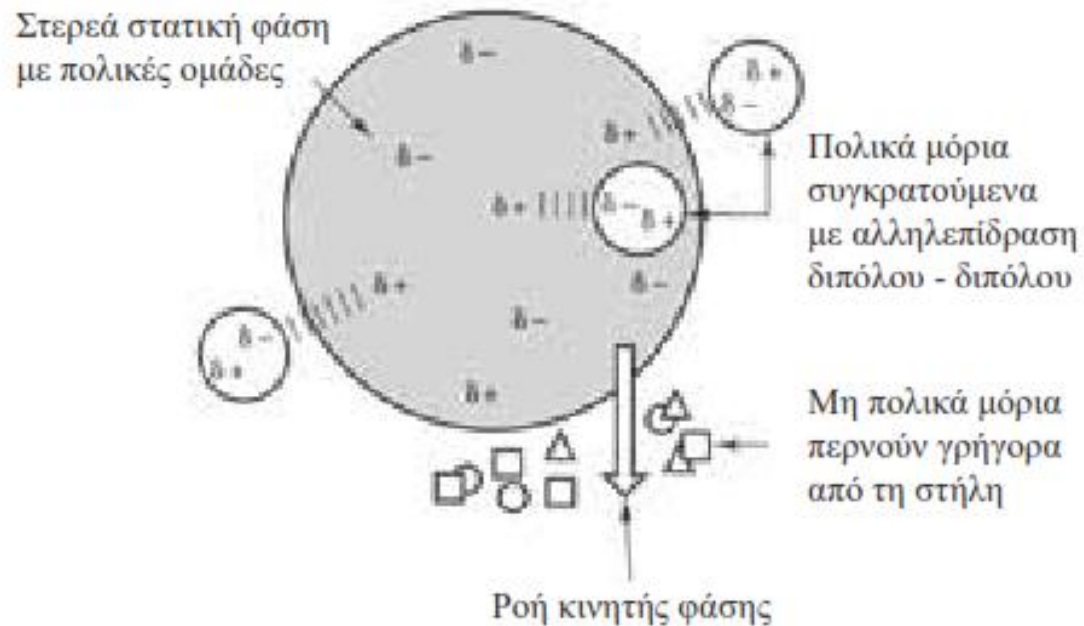


# Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)

Διάγραμμα χρόνου κατακράτησης:



# Χρωματογραφικοί μηχανισμοί διαχωρισμού- χρωματογραφία προσρόφησης



- Ο πιο κλασικός μηχανισμός χρωματογραφίας.
- Στηρίζεται στην ιδιότητα μερικών στερεών προσροφητικών μέσων (πολικών) να συγκρατούν πάνω στην επιφάνειά τους άλλα πολικά μόρια με ασθενείς **μη ιοντικές ελκτικές δυνάμεις διπόλου-διπόλου**, με **δεσμούς υδρογόνου** και δεσμούς **War Der Waals**.

# Χρωματογραφικοί μηχανισμοί διαχωρισμού- χρωματογραφία κατανομής

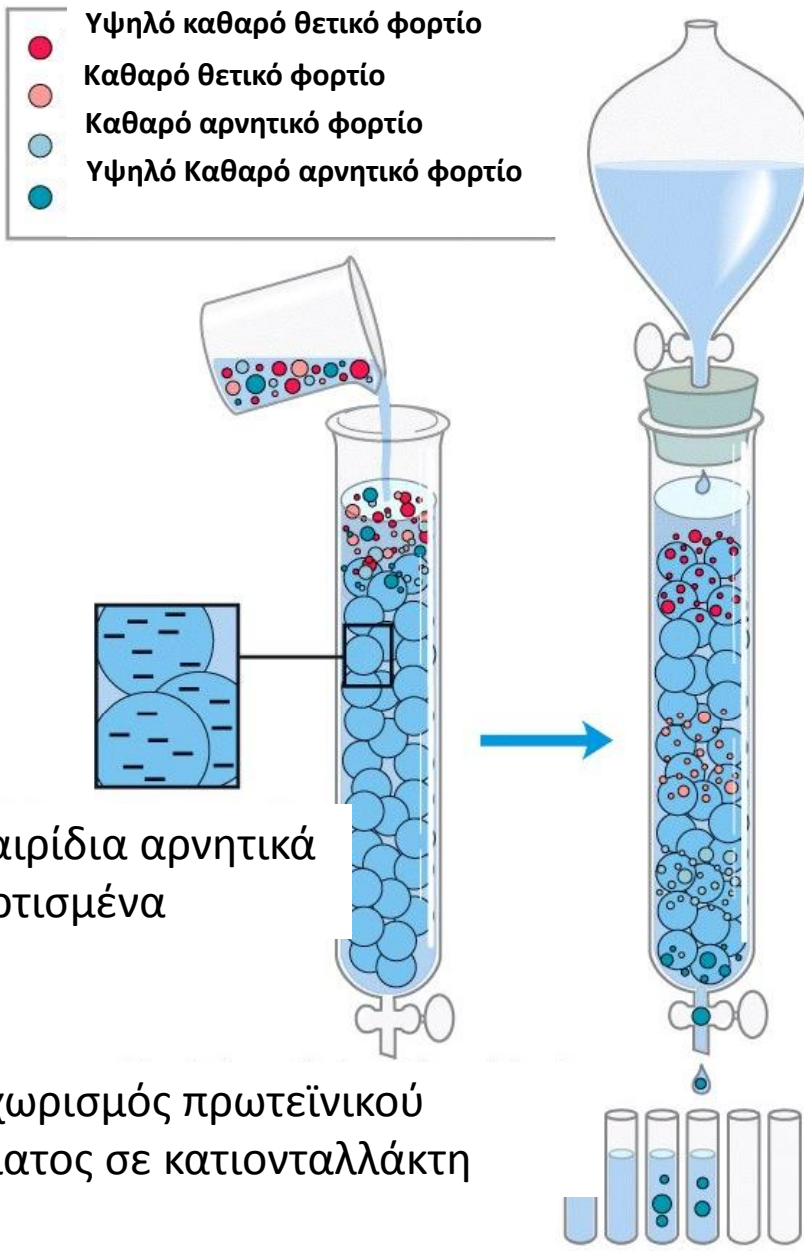


- Ο διαχωρισμός των μορίων θα γίνει με βάση τη συγγενειά τους για τη στατική φάση.
- Ενώσεις που είναι περισσότερο διαλυτές στην κινητή φάση θα εκλουστούν γρηγορότερα, ενώ εκείνες που προτιμούν περισσότερο τη στατική φάση θα καθυστερήσουν.



# Χρωματογραφικοί μηχανισμοί διαχωρισμού- χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

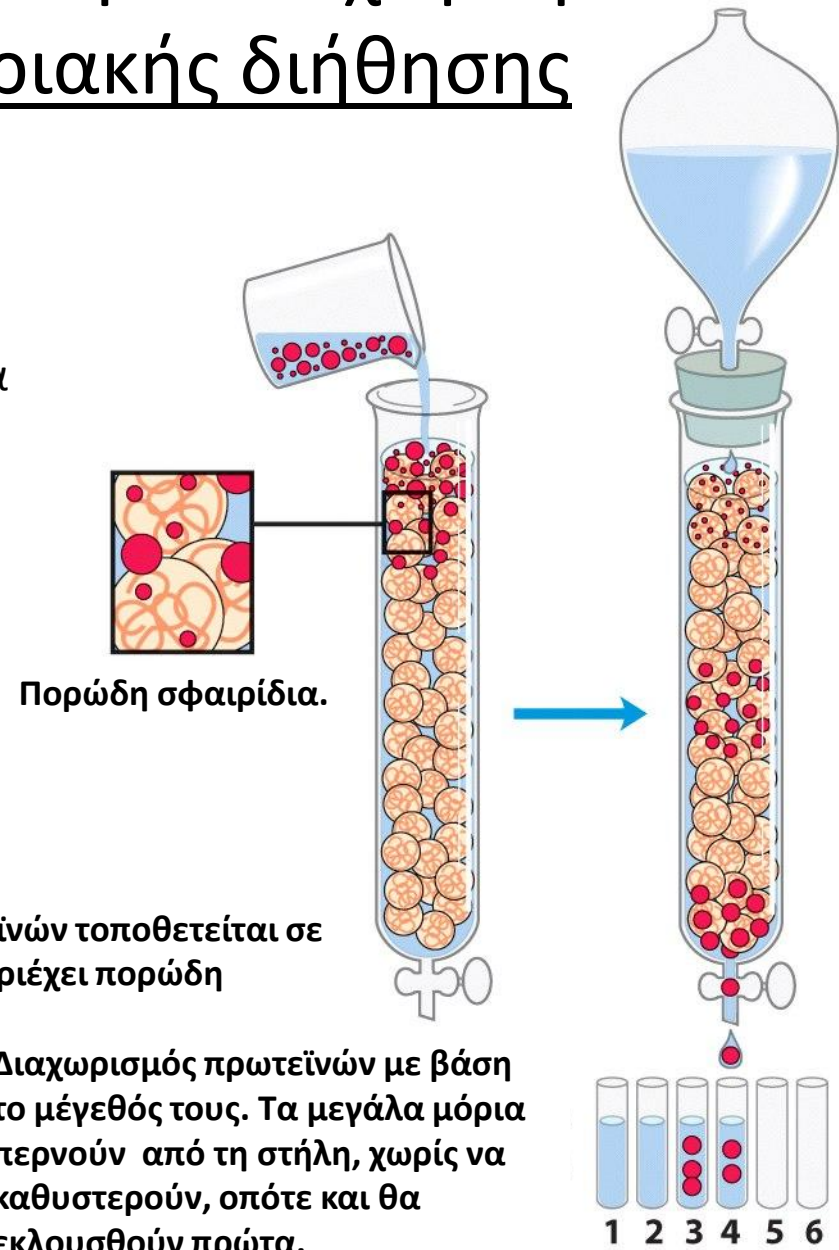
- Βασίζεται στην έλξη ανάμεσα σε αντίθετα φορτισμένα σωματίδια.
- Πολλά βιολογικά μόρια έχουν πάνω τους ομάδες που ιοντίζονται και το γεγονός ότι μπορούν να φέρουν ένα καθαρό θετικό ή αρνητικό φορτίο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό τους.
- Ο διαχωρισμός γίνεται σε στήλες γεμάτες με έναν ιοντοανταλλακτή (π.χ. ρητίνη).
- Υπάρχουν δυο τύποι ιοντοανταλλάκτη: ο **κατιοανταλλάκτης**, ο οποίος φέρει αρνητικά φορτισμένες ομάδες οι οποίες έλκουν θετικά φορτισμένα κατιόντα, και ο **ανιοανταλλάκτης**, ο οποίος φέρει θετικά φορτισμένες ομάδες που θα έλξουν αρνητικά φορτισμένα ανιόντα.
- Οι ενώσεις που συγκρατήθηκαν στη στήλη θα εκλουσθούν με διαλύματα που έχουν **αυξανόμενες ποσότητες άλατος**. Όσες ενώσεις συγκρατούνται ασθενώς θα εκλουσθούν πρώτα, ενώ όσες συγκρατούνται ισχυρά θα εκλουσθούν με υψηλότερες ποσότητες αλάτων.



Οι πρωτεΐνες κινούνται στη στήλη με ρυθμό ο οποίος καθορίζεται από το καθαρό τους φορτίο και το pH που χρησιμοποιούμε. Με τον ιοντοαντάλλακτη οι πρωτεΐνες με αρνητικό φορτίο θα κινηθούν γρήγορα και θα εκλουσθούν γρηγορότερα.

# Χρωματογραφικοί μηχανισμοί διαχωρισμού- χρωματογραφία μοριακής διήθησης

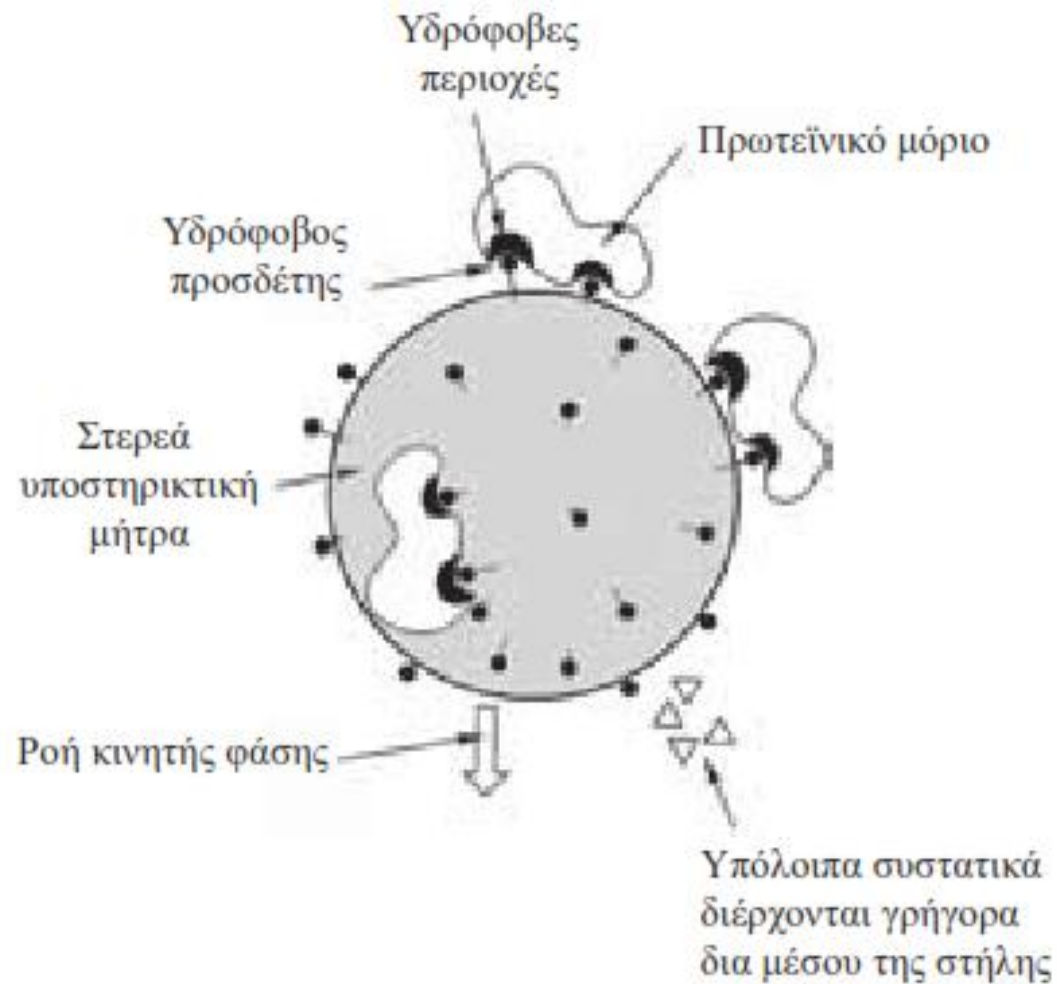
- Η στατική φάση περιλαμβάνει πορώδη σφαιρίδια
- Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μέγεθος και το σχήμα
- οι μεγάλες πρωτεΐνες αποκλείονται από τους μικρούς πόρους



# Χρωματογραφικοί μηχανισμοί διαχωρισμού- υδρόφοβη χρωματογραφία

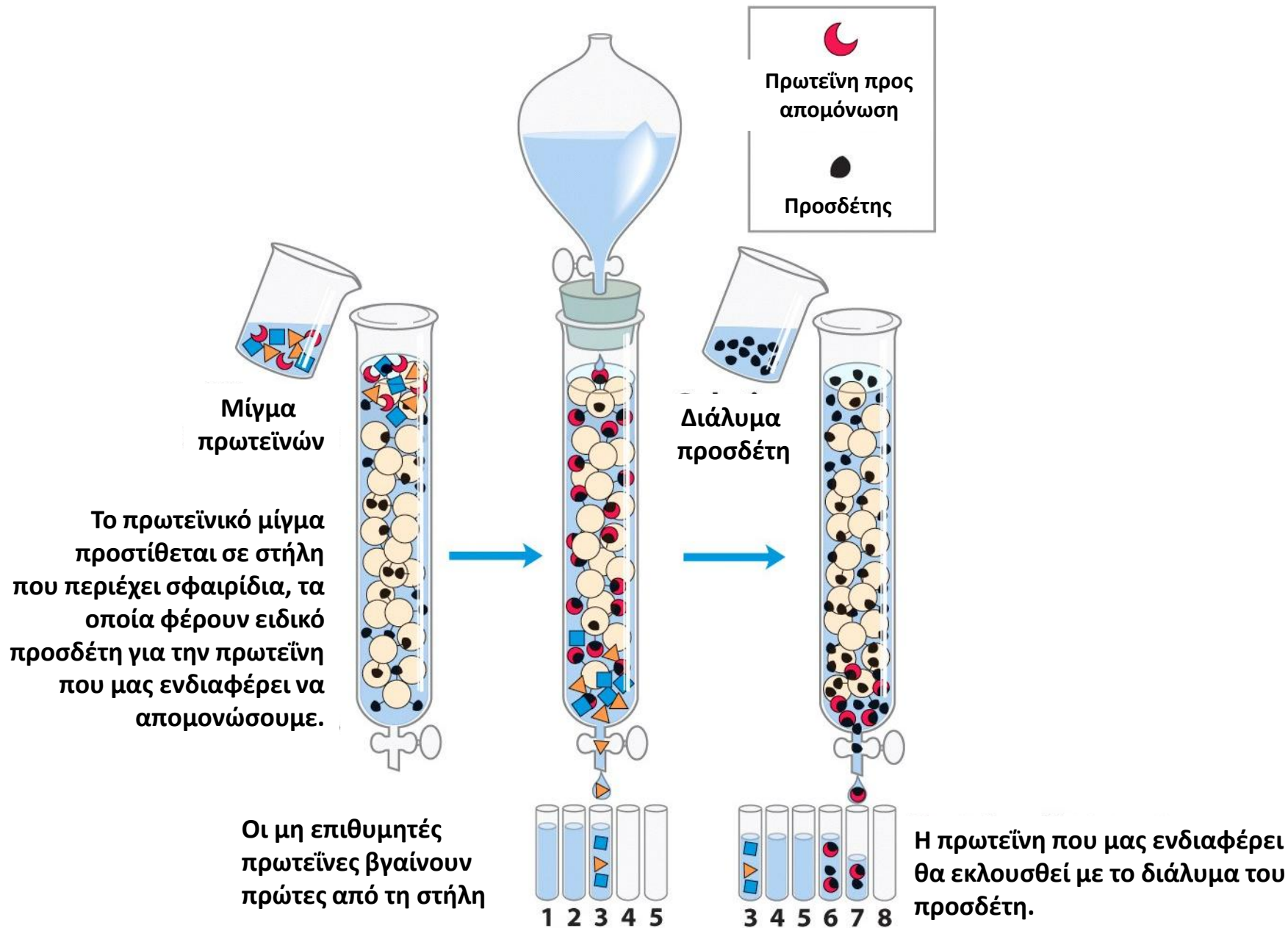
- Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει πρωτεΐνες και εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι πολλές πρωτεΐνες έχουν επάνω στην επιφάνειά τους υδρόφοβες περιοχές, που τις δημιουργούν υδρόφοβα αμινοξέα.
- Οι πρωτεΐνες διαφέρουν ως προς τη φύση και την έκταση των υδρόφοβων περιοχών.
- Μετά την έκλουση οι πρωτεΐνες διατηρούν άθικτη την τρισδιάστατη δομή.

# Χρωματογραφικοί μηχανισμοί διαχωρισμού- υδρόφοβη χρωματογραφία



# Χρωματογραφικοί μηχανισμοί διαχωρισμού- χρωματογραφία αγγιστείας

- Με τη μέθοδο αυτή τα βιομόρια καθαρίζονται με βάση τη βιολογική τους εξειδίκευση, παρά τις διαφορές στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες.
- Η απόδοση καθαρισμού μπορεί να είναι πολύ μεγάλη (ως και 1000 φορές).
- Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την ακινητοποίηση μιας συμπληρωματικής δεσμευμένης ουσίας (ligand) πάνω σε μια στερεά μήτρα με τέτοιο τρόπο, ώστε να διατηρείται η ικανότητα του ligand να δεσμεύει αντιστρεπτά άλλες ενώσεις πάνω του.



# Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

- Η ηλεκτοφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού που βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο.
- Ανόμοια μόρια κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες και τα συστατικά ενός μίγματος διαχωρίζονται, εάν βρεθούν μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο.
- Χρησιμοποιείται για την ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων ή για την απόδειξη της καθαρότητας βιομορίων που έχουν απομονωθεί.
- Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα φορτισμένων μορίων εξαρτάται από:
  - Το καθαρό φορτίο
  - Το μέγεθος
  - Το σχήμα
  - Ένταση του ηλεκτρικού πεδίου

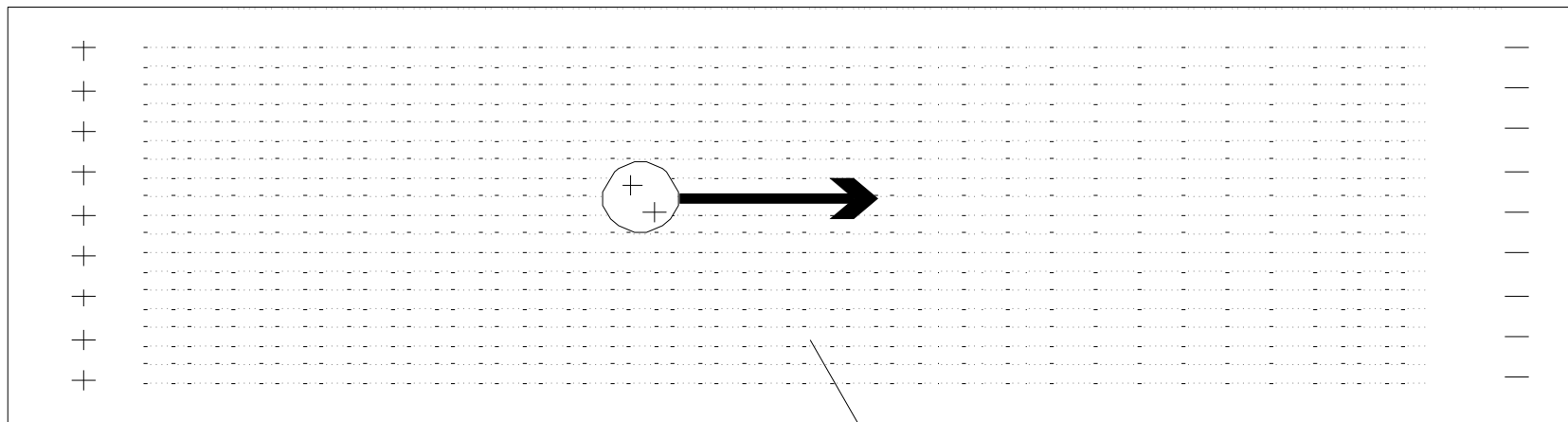


## Αρχή ηλεκτροφόρησης

Η βασική αρχή στηρίζεται στο φαινόμενο κατά το οποίο φορτισμένα μόρια και σωματίδια, μέσα σε υδάτινα διαλύματα και κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Δηλαδή, τα κατιόντα (+) κινούνται προς τη κάθοδο (αρνητικός πόλος) και τα ανιόντα (-) κινούνται προς την άνοδο (θετικός πόλος). Υπό την προϋπόθεση ότι το ηλεκτρικό πεδίο διακόπτεται πριν τα ιόντα φθάσουν τα ηλεκτρόδια, τότε τα συστατικά ενός μίγματος διαχωρίζονται με βάση την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα. Λόγω των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες (κινητικότητα). Η κινητικότητα αυτή εξαρτάται α) από την σταθερά  $\rho K$  και το μοριακό βάρος του φορτισμένου σωματιδίου ενώ άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητα είναι β) το  $pH$  και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer), γ) η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, δ) η θερμοκρασία καθώς και ε) η φύση του υλικού μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση.

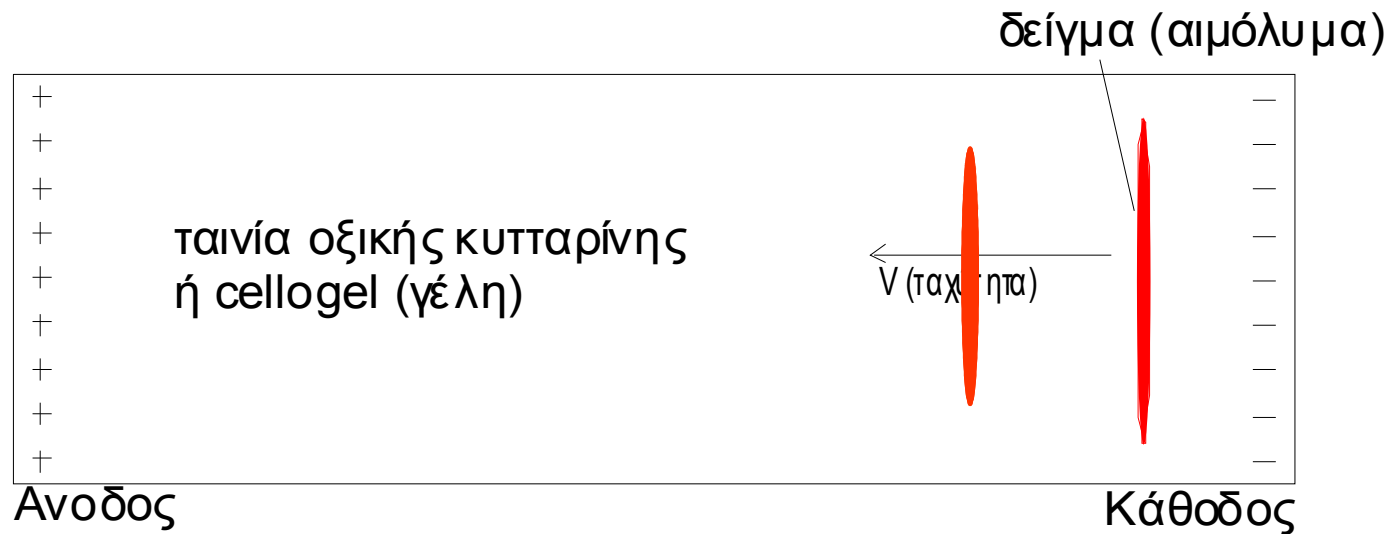
άνοδος

κάθοδος



ηλεκτρικό πεδίο

Η ταχύτητα μετακίνησης είναι ανάλογη του  $M_r$  και του φορτίου κάθε κλάσματος.



## Ηλεκτροφόρηση

Διαχωρίζει σύμφωνα με το μέγεθος και το φορτίο.

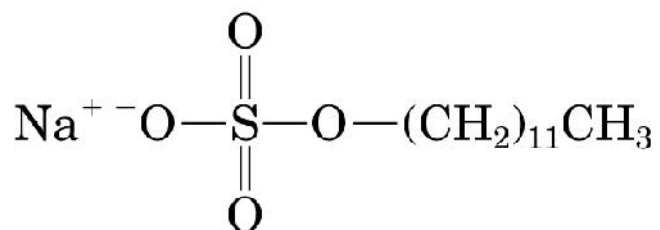
Ο διαχωρισμός γίνεται σε πηκτή πολυακρυλαμίδιο (πρωτεΐνες) ή σε πηκτή αγαρόζης (νουκλεϊκά οξέα).

### SDS-PAGE (ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου):

Χρησιμοποιούμε SDS, το οποίο καλύπτει τις πρωτεΐνες.

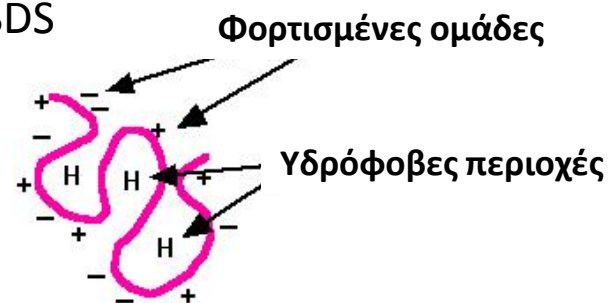
Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να αποκτούν ισοδύναμο αρνητικό φορτίο

– οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν τελικά μόνο με βάση το μοριακό τους μέγεθος.



Sodium dodecyl sulfate  
(SDS)

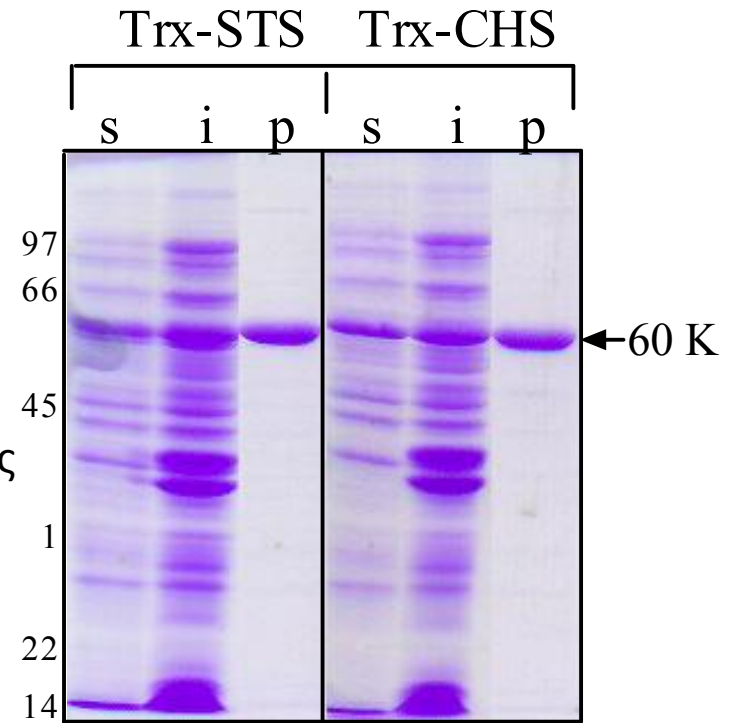
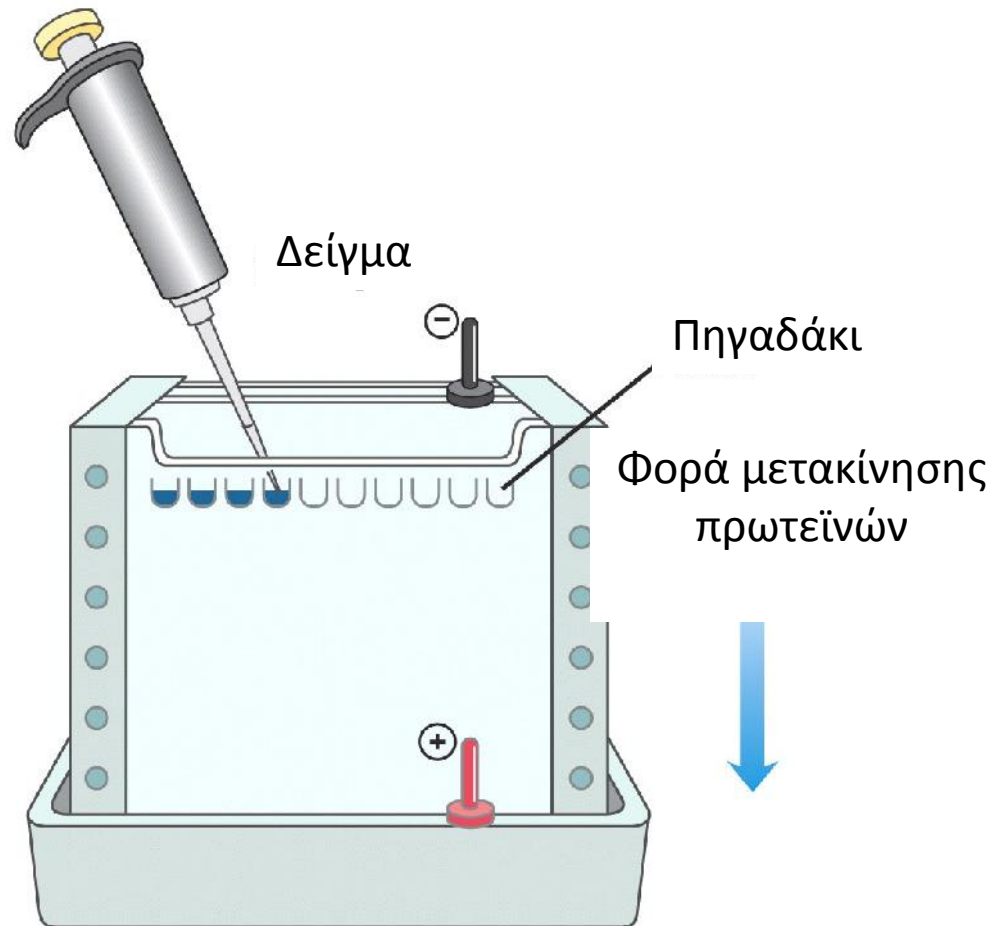
Πριν το SDS



Μετά την προσθήκη SDS



# SDS-PAGE

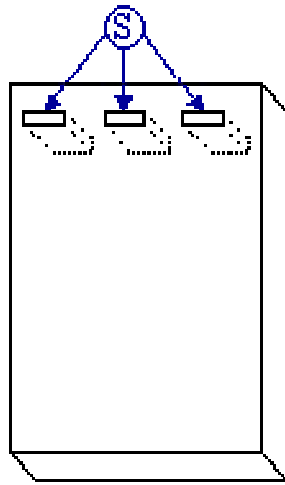


s - soluble fraction  
i - insoluble fraction  
p - post-Ni<sup>2+</sup> column

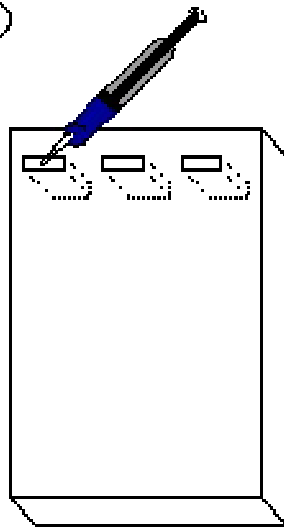
Συνδέουμε το τροφοδοτικό και ρυθμίζουμε τις παραμέτρους της ηλεκτροφόρησης (Volts και Ampers)



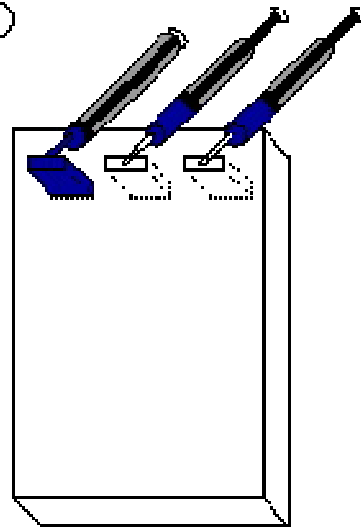
①



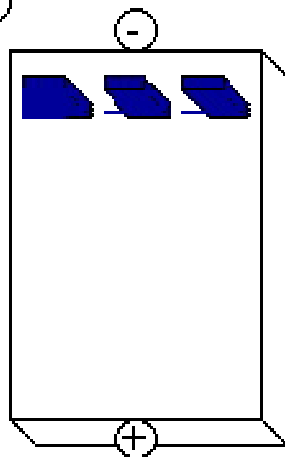
②



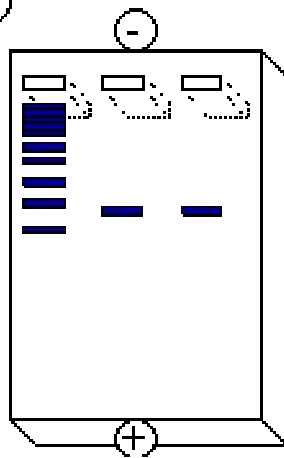
③



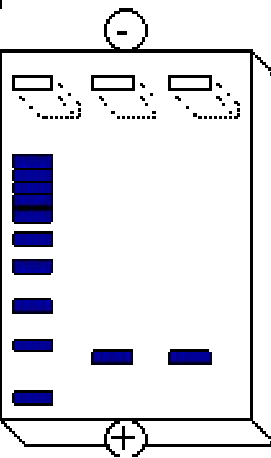
④

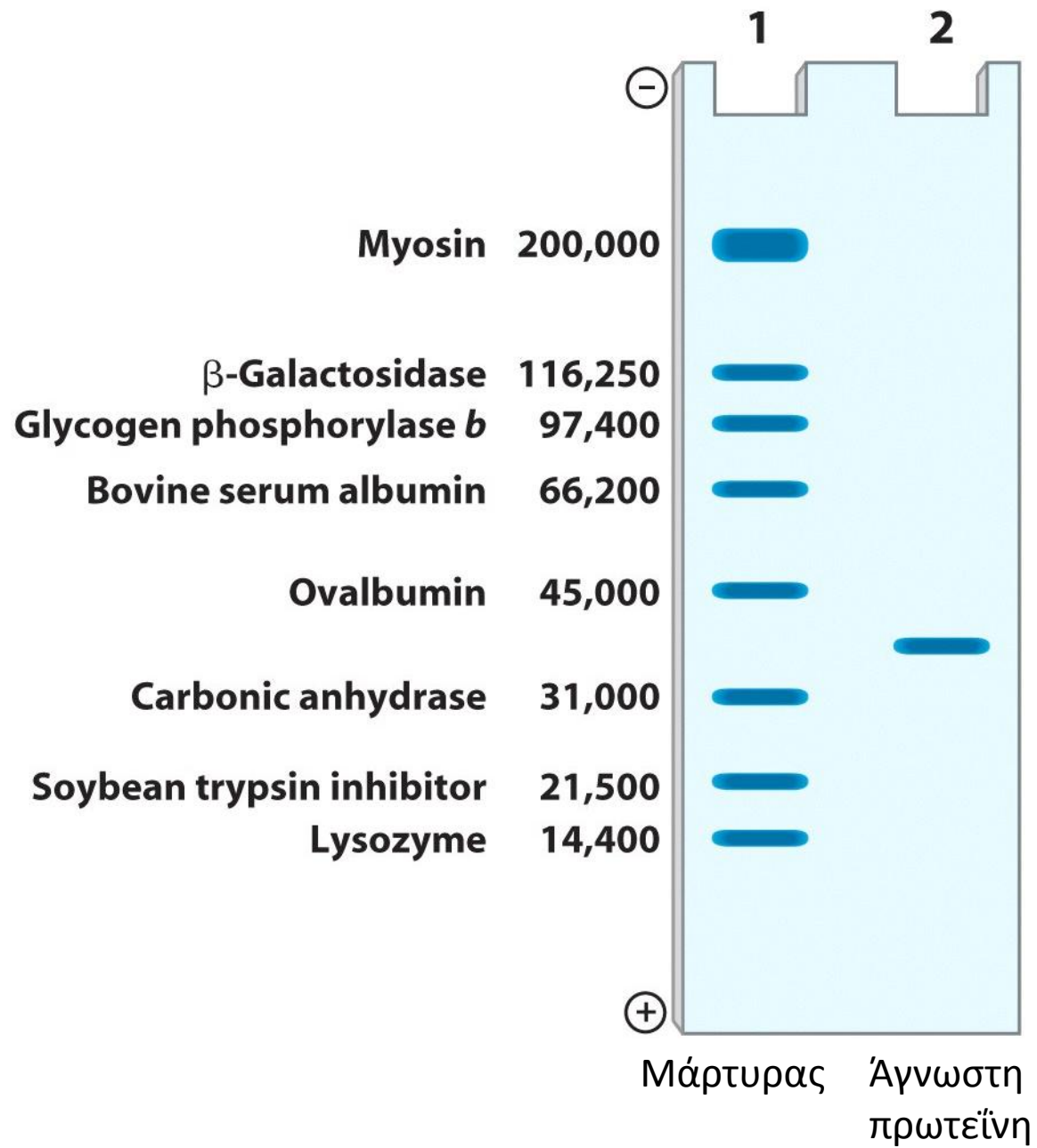


⑤



⑥





# ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΟΓΡΑΦΗΜΑ

