

Κεφάλαιο 5. Χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή

Σύνοψη – Περίληψη

Κατά την ενόργανο ανάλυση, ο αποτελεσματικότερος διαχωρισμός βάσει του μεγέθους των αναλυόμενων μορίων πραγματοποιείται κατά κοινή ομολογία με τη χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή (*gel-filtration chromatography*.) Στη χρωματογραφία διήθησης ή μοριακού αποκλεισμού σε πηκτή, ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με μοναδικό κριτήριο τη μοριακή μάζα των υπό διαχωρισμό μορίων. Κατά τον διαχωρισμό, τα ευμεγέθη πρωτεϊνικά μόρια εκλύονται σε μικρότερους χρόνους συγκριτικά με τα μικρομοριακά πρωτεϊνικά συστατικά, διότι δεν εισχωρούν στο εσωτερικό των κόκκων του υλικού πλήρωσης της στήλης. Σε αυτή την παραλλαγή χρωματογραφικής ανάλυσης, δεν απαιτείται η χρήση εξειδικευμένου προσδέτη και έτσι μειώνεται αισθητά ο κίνδυνος απώλειας της πρωτεΐνης, λόγω μη αναστρέψιμης πρόσδεσης στον προσδέτη, καθώς και η πιθανότητα ελάττωσης της λειτουργικότητάς της, λόγω εφαρμογής ακραίων συνθηκών έκλουσης. Το υλικό πλήρωσης της στήλης τοποθετείται στο ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης των προς διαχωρισμό μορίων, το οποίο και διαποτίζει τους κόκκους του υποστρώματος. Ο διαχωρισμός ξεκινά με την τοποθέτηση μικρής ποσότητας δείγματος στην κορυφή της στήλης. Το δείγμα μετακινείται διαμέσου του υλικού της στήλης και η σταθερή ροή διασφαλίζεται με τη σταθερή προσθήκη διαλύματος έκλουσης στην κορυφή. Ο διαχωρισμός βασίζεται στην επιβράδυνση των μορίων εκείνων που εισδύουν στα σωματίδια του υλικού πλήρωσης. Παραλλαγή της μεθόδου (η οποία έχει εφαρμογή και σε άλλες χρωματογραφικές προσεγγίσεις) είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (*HPLC*). Εδώ ισχύουν πάνω-κάτω οι ίδιες αρχές, με τη διαφορά ότι τα υλικά πλήρωσης των στηλών αυτών βρίσκονται σε λεπτότερο καταμερισμό και είναι ιδιαίτερος ανθεκτικά σε υψηλές πιέσεις, διατηρώντας ακέραια τη δομή τους. Η αναλυτική ικανότητα αυτής της μεθόδου είναι ιδιαίτερος υψηλή και πλεονεκτεί και στον χρόνο που απαιτείται, έναντι των κλασικών χρωματογραφικών αναλύσεων.

Προαπαιτούμενη γνώση

Για την πληρέστερη κατανόηση των θεμάτων που εκτίθενται παρακάτω και αφορούν την εφαρμογή στην πράξη της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού, θα πρέπει ο εκπαιδευόμενος να γνωρίζει βασικά σχετικά θέματα βιοχημείας, που αφορούν στη δομή και λειτουργία των πρωτεϊνών. Προτείνονται τα εξής συγγράμματα: 1) Berg M.J., Tymoczko L.J., Stryer L. *Βιοχημεία*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2005, κεφ. 3, 4. 2) Χατζηϊωάννου Π. Θ. *Ενόργανη ανάλυση*. Εκδόσεις Ιδιωτική, 2014. Μέρος τέταρτο: Τεχνικές διαχωρισμού και χρωματογραφικές τεχνικές αναλύσεων.

5.1 Καθαρισμός πρωτεΐνης

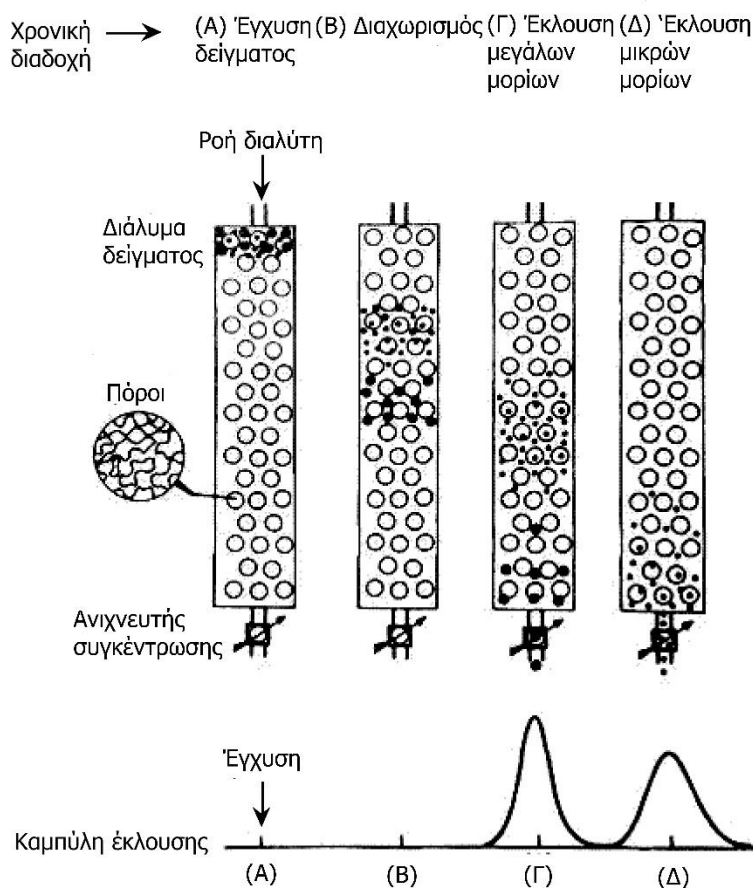
5.1.1 Εισαγωγή

Η χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή είναι μια σημαντική μέθοδος αναφορικά με τον καθαρισμό των πρωτεϊνών (Stellwagen, 1990). Η τεχνική αυτή είναι επίσης γνωστή και ως χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού και χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Αυτή η μέθοδος διαχωρισμού είναι η μοναδική στην κλασμάτωση η οποία δεν απαιτεί τη χρήση ειδικού πρωτεϊνικού προσδέτη, μειώνοντας έτσι σημαντικά τον κίνδυνο απώλειας της επιθυμητής πρωτεΐνης μέσω μη αναστρέψιμης σύνδεσης στη στήλη ή απενεργοποίησης. Η διήθηση σε πηκτή είναι επίσης πολύτιμη για την αντικατάσταση του ρυθμιστικού διαλύματος μιας πρωτεΐνης (βλέπε ενότητα II). Πότε όμως θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί η διήθηση σε πηκτή στη διαδικασία του καθαρισμού πρωτεΐνης; Δεν υπάρχει μια καθολική απάντηση σε αυτήν την ερώτηση, παρόλο που κατά γενική εκτίμηση τα αρχικά στάδια καθαρισμού πρωτεϊνικών μορίων μπορούν να διεξαχθούν ικανοποιητικά με διήθηση σε πηκτή. Εάν η πρωτεΐνη είναι σχετικά μεγάλη (>100 kDa), η διήθηση σε πηκτή θα μπορούσε να εφαρμοστεί ως ένα αρχικό βήμα κατά τον καθαρισμό. Με το κατάλληλο υπόστρωμα, η πρωτεΐνη θα εκλυθεί από τη στήλη στα αρχικά κλάσματα πρωτεΐνης, ενώ όλες οι μικρότερες πρωτεΐνες ακολουθούν χρονικά, επιτρέποντας έναν αξιοσημείωτο καθαρισμό. Επιπρόσθετα, εάν μια στήλη ανταλλαγής ιόντος έχει ήδη χρησιμοποιηθεί για τον μερικό καθαρισμό της πρωτεΐνης, η διήθηση σε πηκτή θα μπορούσε να είναι ένα ιδανικό τελικό βήμα καθαρισμού, αφού οι αρχές για τον διαχωρισμό της πρωτεΐνης με τη χρήση των δύο μεθόδων είναι συμπληρωματικές. Σε αυτήν την περίπτωση, μια αναλυτικότερη κλίμακα κλασμάτωσης του υλικού του υποστρώματος θα μπορούσε να επιλεγεί,

ώστε η πρωτεΐνη-στόχος να εξάγεται κοντά στο «κέντρο» των κλασμάτων, επιτρέποντας έναν αποτελεσματικότερο διαχωρισμό από τις πρωτεΐνες με παρόμοια μεγέθη. Εναλλακτικά, εάν το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης δεν είναι γνωστό, θα πρέπει να επιλεγεί υπόστρωμα το οποίο χαρακτηρίζεται από ευρύτερα όρια κλασμάτωσης και επακόλουθα από διευρυμένη αναλυτική ικανότητα. Τέλος, εάν η πρωτεΐνη είναι ήδη σε καθαρή μορφή, η πηκτική διήθηση μπορεί να παίξει έναν ρόλο στον ειδικό καθαρισμό, όπου ο δραστικός τύπος είναι ένα μονομερές ή ένα ολιγομερές του μορίου. Εν κατακλείδι, η χρωματογραφία διήθησης σε πηκτική μπορεί να εξυπηρετήσει τις ανάγκες διαχωρισμού και κλασμάτωσης σε ποικίλα στάδια της πορείας του πρωτεϊνικού καθαρισμού.

5.1.1.1 Αρχές της χρωματογραφίας διήθησης

Η χρωματογραφία διήθησης σε πηκτική διαχωρίζει τις πρωτεΐνες σύμφωνα με το μέγεθός τους. Το υπόστρωμα διήθησης σε πηκτική διαθέτει πόρους που επιτρέπουν στο ρυθμιστικό διάλυμα και τις μικρότερες πρωτεΐνες να εισαχθούν σε αυτούς, αλλά αποκλείουν μεγαλύτερες πρωτεΐνες και σύμπλοκα ή πολυμερή πρωτεϊνών. Ωστόσο, οι μεγαλύτερες πρωτεΐνες μετακινούνται μεταξύ και γύρω από τα τεμάχια-κόκκους του υλικού του υποστρώματος και εξάγονται από τη στήλη πριν από τις μικρότερες πρωτεΐνες, που καθυστερούν διανύοντας δαιδαλώδεις διαδρομές στο εσωτερικό της στήλης (Εικ. 5.1). Οι μεγαλύτερες πρωτεΐνες εκλύονται από τη στήλη πρώτα, διανύοντας μικρότερη απόσταση πριν φτάσουν στο άκρο έκλυσης της στήλης. Οι πρωτεΐνες μεσαίου μεγέθους ακολουθούν, ενώ οι μικρές πρωτεΐνες, ικανές να εισέρχονται σε όλους τους πόρους, καθυστερούν να εξέλθουν, διανύοντας ικανά διαστήματα κατά μήκος του υλικού πλήρωσης.



Εικόνα 5.1 Αρχή λειτουργίας της χρωματογραφίας διήθησης σε πηκτική. Ο διαχωρισμός βασίζεται στους διαφορετικούς χρόνους έκλυσης των συστατικών του δείγματος. Οι μεγαλύτερες πρωτεΐνες εκλύονται από τη στήλη πρώτα, οι πρωτεΐνες μεσαίου μεγέθους ακολουθούν, ενώ οι μικρές πρωτεΐνες, ικανές να εισέρχονται στους πόρους, καθυστερούν να εξέλθουν.

Το αντικείμενο του διαχωρισμού, δηλαδή ο στόχος της εφαρμογής της χρωματογραφίας διήθησης σε πηκτική, καθορίζει επακριβώς και την προσέγγιση του ζητούμενου, μέσα από μια ποικιλία εναλλακτικών προσεγγίσεων που τροποποιούν ένα ή περισσότερα στοιχεία-παραμέτρους κατά την εκτέλεση της διαδικασίας. Το ζητούμενο

λοιπόν μπορεί να είναι η υψηλή ανάλυση της πρωτεΐνης, ο ελάχιστος δυνατός χρόνος ανάλυσης, ο ελάχιστος δυνατός όγκος δείγματος (για μια αναλυτική εφαρμογή), ή η δυνατότητα αναπαράξιμων αποτελεσμάτων. Ο προσεκτικός καθορισμός των αντικειμένων της ανάλυσης είναι σημαντικός στην επιλογή του κατάλληλου εξοπλισμού χρωματογραφίας. Εάν για παράδειγμα ο βασικός στόχος είναι η μέγιστη ανάλυση μεταξύ πρωτεϊνών διαφορετικών μεγεθών, η στήλη διήθησης σε πηκτή πρέπει να είναι επιμήκης, μικρής διαμέτρου (το ύψος της στήλης πρέπει να είναι γενικά 20 με 40 φορές η διάμετρος της, για την επίτευξη υψηλών βαθμών ανάλυσης). Αυτές οι αναλογίες απαιτούνται για ικανοποιητική διήθηση, αφού δεν συντελείται κάποια πρόσδεση στο υλικό του υποστρώματος. Ορισμένα διερευνητικά πειράματα μπορεί να αποδειχθούν πολύτιμα για τη σύγκριση διαφορετικών τύπων υποστρωμάτων, που κάποιες φορές καταλήγουν σε διαφορετικούς βαθμούς διαχωρισμού. Επιπλέον, μικρό μέγεθος των συστατικών μονομερών του υλικού πλήρωσης και ροή μικρότερης κλίμακας, συνεισφέρουν σε υψηλότερης απόδοσης διαχωρισμούς. Όμως, εάν η ταχύτητα είναι σημαντική, κάποιος συμβιβασμός στην ανάλυση μπορεί να είναι απαραίτητος: διαφορετικά, μεγάλη προσοχή πρέπει να δοθεί στην επιλογή κατάλληλου υποστρώματος υψηλής ανάλυσης, με σχετικά μεγάλη κλίμακα ροής. Στην περίπτωση διεξαγωγής ανάλυσης με διήθηση σε πηκτή, όπου ο όγκος του δείγματος είναι ελάχιστος, ένα αυτοματοποιημένο σύστημα υψηλής ανάλυσης θα πρέπει να εξεταστεί ως εναλλακτική λύση. Εάν τέλος απαιτείται επαναληψιμότητα του αποτελέσματος, θα ήταν εύστοχη η επιλογή προστοιβαγμένης στήλης και η εν γένει αυτοματοποίηση του εξοπλισμού χρωματογραφίας.

Λοιπές εφαρμογές της χρωματογραφίας διήθησης σε πηκτή:

- **Καθορισμός μοριακού βάρους:** η διήθηση σε πηκτή μπορεί να παρέχει μια εκτίμηση για το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης, αφού οι πρωτεΐνες περνούν μέσα από τη στήλη χωρίς να αλληλεπιδρούν φυσικά με το υπόστρωμα. Όμως, κάθε εκτίμηση του μοριακού βάρους βασίζεται στην υπόθεση ότι η πρωτεΐνη είναι σφαιρική και όντως πολλές πρωτεΐνες διαθέτουν φυσική σφαιρική δομή. Όμως, στην περίπτωση ραβδοειδούς πρωτεΐνης, θα της αποδοθεί ένα σχετικά μεγάλο μοριακό βάρος εάν εξαιρεθεί από τους πόρους του υποστρώματος ή ένα χαμηλό μοριακό βάρος εάν η πρωτεΐνη διέλθει μέσα από τους πόρους των κόκκων πλήρωσης της στήλης. Μια κοινή στρατηγική για την απαλοιφή του παράγοντα στερεοδομή-γεωμετρία πρωτεΐνης, κατά τον καθορισμό του μοριακού βάρους χρωματογραφικά, είναι η επεξεργασία του δείγματος με υδροχλωρική γουανιδίνη ή ουρία πριν τη χρωματογραφία (Ansari & Mage, 1977). Κάτω από αυτές τις συνθήκες αποδιάταξης, η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης αναιρείται, δίνοντας τη θέση της σε ένα τυχαίο σπείραμα και ένα πιο αντιπροσωπευτικό μοριακό βάρος μπορεί να καθοριστεί.
- **Αφαίρεση ανεπιθύμητων προσμίξεων χαμηλού μοριακού βάρους:** Αποτελεσματική απομάκρυνση υπολειμμάτων ραδιενέργειας, θραυσμάτων πρωτεολυτικής διάσπασης της πρωτεΐνης, συμπαραγόντων ή πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους μπορεί να επιτευχθεί.
- **Διαχωρισμός πρωτεΐνης από διμερή και άλλα ολιγομερή**
- **Αντικατάσταση του ρυθμιστικού διαλύματος μιας πρωτεΐνης:** Εάν ένα υπόστρωμα που έχει επιλεγεί έχει αποκλείσει τελείως την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει, η πρωτεΐνη μπορεί να εξαχθεί σε ένα νέο ρυθμιστικό διάλυμα, καθώς το υπάρχον μπορεί να απομακρυνθεί μέσω της στήλης (βλ. Ενότητα II). Αυτή η διαδικασία χρησιμοποιείται επίσης για την «αφαλάτωση» μιας πρωτεΐνης: μια πρωτεΐνη σε ρυθμιστικό διάλυμα υψηλού ιοντικού σθένους επαναδιαλύεται σε διαφορετικό ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλού ιοντικού σθένους. Αυτό είναι χρήσιμο πριν την εφαρμογή της πρωτεΐνης σε μια στήλη ιοντικής ανταλλαγής ή εάν η πρωτεΐνη είναι λιγότερο ενεργή σε ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος.
- **Μελέτη των προσδετών της πρωτεΐνης.** Βλέπε Hummel & Dreyer (1962).

5.1.1.2 Ενδεικτικό πρωτόκολλο ανάλυσης δείγματος

Η σταδιοποίηση της διαδικασίας θα βοηθήσει στην κατανόηση των βημάτων που εφαρμόζονται κατά τη χρωματογραφική ανάλυση με διήθηση σε πηκτή: Έστω για παράδειγμα ότι, μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 50,000 daltons πρόκειται να αναλυθεί με τη χρήση 2 ml πρωτεϊνικού διαλύματός της, συγκέντρωσης 5 mg/ml. Είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη είναι σταθερή σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris, pH 8.

- **Επιλογή υποστρώματος.** Για μια πρωτεΐνη 50 kDa, υπόστρωμα όπως το Sephacryl S-200 θα δουλέψει ικανοποιητικά. Το Sephacryl S-200 έχει κλίμακα κλασμάτωσης από 5 kDa ως 250 kDa. Έτσι, μια πρωτεΐνη 50 kDa βρίσκεται στην κλίμακα κατάλληλου μεγέθους. Επιπλέον, εάν η πρωτεΐνη των 50 kDa υπάρχει και ως διμερές ή ολιγομερές στο δείγμα, θα πρέπει λογικά να αναλύεται καλά σε αυτό το υπόστρωμα.
- **Καθορισμός των διαστάσεων της στήλης.** Δύο παράμετροι θα πρέπει να εξεταστούν: ο κατάλληλος όγκος του υποστρώματος που θα χρησιμοποιηθεί και η γεωμετρία της στήλης. Εάν ο όγκος του δείγματος πρόκειται να αποτελεί το 2% του όγκου του υποστρώματος 100 ml του υποστρώματος θα είναι επαρκή (2 ml όγκου δείγματος είναι 2% των 100 ml). Για έναν ικανοποιητικό διαχωρισμό, το ύψος της στήλης θα πρέπει να είναι 20 με 40 φορές η διάμετρος της στήλης. Έτσι, όγκος υποστρώματος στήλης 100 ml, θα μπορούσε να στοιβαχθεί σε μια στήλη διαμέτρου 1,5 cm. Το ύψος της πηκτής θα πρέπει να είναι περίπου 57 cm [όγκος (V) = $\pi \times r^2 \times h$ και $100 \text{ ml} = 100 \text{ cm}^3$, οπότε $h=100/\pi \times r^2$].
- **Καθορισμός του ρυθμιστικού διαλύματος του πειράματος.** Σε αυτό το πείραμα, ρυθμιστικό διάλυμα Tris, pH 8 θα ήταν κατάλληλο. Βεβαιωθείτε ότι η πρωτεΐνη είναι σταθερή στο ρυθμιστικό διάλυμα του πειράματος και επίσης ότι είναι παρόντες οι απαραίτητοι συμπαράγοντες, κατιόντα κ.λπ. Η θερμοκρασία όπου το πείραμα χρωματογραφίας θα διεξαχθεί πρέπει επίσης να διασφαλίζει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης. Επιπλέον, ένα μετρίου ιοντικού σθένους άλας (0,2 M NaCl, για παράδειγμα) θα διασφάλιζε την απουσία αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης με το υπόστρωμα.
- **Εξουκείωση με τον εξοπλισμό της χρωματογραφίας.**
- **Προετοιμασία του υποστρώματος και στοιβαξη της στήλης.**
- **Έλεγχος των κλασμάτων της πρωτεΐνης.** Η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει μπορεί να ανιχνευτεί με έλεγχο της δραστηριότητάς της, με τη χρήση ανοσολογικών μεθόδων ή ταυτοποίηση μέσω του μοριακού βάρους. Η μελέτη της ενζυμικής ενεργότητας αποκαλύπτει μοναδικά εργαλεία ελέγχου, χρήσιμα στον καθαρισμό της πρωτεΐνης. Η ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιεί ένα αντίσωμα για να ανιχνεύσει την πρωτεΐνη, ενέχοντας όμως κινδύνους παρερμηνείας των αποτελεσμάτων και θα πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή. Η ανάλυση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να καθορίσει το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης.
- **Ανάλυση των αποτελεσμάτων.** Εάν η πρωτεΐνη εκλούεται νωρίς κατά τη χρωματογραφική ανάλυση, η αντίστοιχη «κορυφή» στο χρωματογράφημα, αναμένεται να έχει μεγάλη κλίση (απότομη). Πιθανή μόλυνση του κλάσματος της πρωτεΐνης μπορεί να δώσει γειτονική κορυφή. Αντίστροφα, έκλυση της πρωτεΐνης αργότερα κατά τη διάρκεια της διήθησής της στην πηκτή, μπορεί να δώσει περισσότερο ξεκάθαρη, απομονωμένη «κορυφή», η οποία όμως συνήθως είναι ευρύτερη, με κίνδυνο να περιέχει περισσότερα από ένα κλάσματα.

5.1.1.3 Επιλέγοντας το υπόστρωμα διήθησης σε πηκτή

Η επιλογή του υποστρώματος διήθησης σε πηκτή θα πρέπει να βασίζεται πρωταρχικά στο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης που πρόκειται να διαχωριστεί. Παράμετροι που δεν σχετίζονται με τον καθαυτό διαχωρισμό της πρωτεΐνης, λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή του υποστρώματος και συζητήθηκαν πιο πάνω. Το μοριακό βάρος θα πρέπει να κυμαίνεται γύρω από την ενδιάμεση τιμή της κλίμακας κλασμάτωσης του υποστρώματος για αποτελεσματικότερο διαχωρισμό (συμβουλευτείτε τον Πίνακα 5.1 για τα χαρακτηριστικά κάποιων υποστρωμάτων). Σημειώστε ότι χρήση υποστρώματος με περιορισμένη κλίμακα κλασμάτωσης θα επιτρέψει διαχωρισμούς με καλύτερη ανάλυση. Εάν δεν είναι διαθέσιμες καθόλου πληροφορίες σχετικά με την πρωτεΐνη, ένα υπόστρωμα με ευρεία κλίμακα κλασμάτωσης θα πρέπει να επιλεγεί (για παράδειγμα, Sephacryl S-300). Για μια πιο πλήρη εικόνα σχετικά με τα διαθέσιμα υποστρώματα, προτείνεται βιβλιογραφικός έλεγχος στην ετήσια λίστα των προμηθευτών, που δημοσιεύεται στις επιθεωρήσεις Science ή Biotechnology.

Τα υποστρώματα διήθησης σε πηκτή παρασκευάζονται συχνά από σταυροσυνδεδεμένη δεξτράνη, πολυακρυλαμίδιο ή σφαιρίδια αγαρόζης. Τα υποστρώματα δεξτράνης και πολυακρυλαμίδιου διαχωρίζουν ικανοποιητικά πρωτεΐνες μικρού ή μετρίου μοριακού βάρους, ενώ τα υποστρώματα αγαρόζης διαθέτουν μεγαλύτε-

ρους πόρους και είναι ικανά να διαχωρίσουν πολύ μεγαλύτερου μεγέθους μόρια πρωτεΐνης. Ορισμένα υποστρώματα αгарόζης έχουν το μειονέκτημα ότι συμπιέζονται κάτω από πίεση, ώστε πρέπει να επιδειχθεί προσοχή όταν εφαρμόζεται η περισταλτική αντλία (για τη διευκόλυνση ροής).

Κατά την επιλογή υποστρώματος διήθησης σε πηκτή, λαμβάνονται υπόψη και οι κλίμακες ροής του υποστρώματος. Κλίμακες ταχύτερης ροής θα επιτρέψουν ραγδαίο διαχωρισμό, ενώ κλίμακες πιο αργής ροής προσφέρουν καλύτερη ανάλυση στις ακραίες περιοχές μοριακών βαρών. Κάποια υποστρώματα είναι διαθέσιμα σε διαφορετικούς βαθμούς ροής, επιτρέποντας στον ερευνητή να καθορίσει τη βέλτιστη ισορροπία μεταξύ ταχύτητας και ανάλυσης. Δοκιμαστικοί διαχωρισμοί για την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών ροής μπορεί να απαιτούνται, ώστε να καθοριστεί ποια κλίμακα ροής μπορεί να είναι ανεκτή. Νεότερα, «υψηλής ανάλυσης» υποστρώματα μπορούν να εφαρμοστούν σε κλίμακες υψηλής ροής, χωρίς έκπτωση στην αναλυτική τους ικανότητα.

Υπόστρωμα	Μέθοδος Διαχωρισμού	Όρια εύρους MW	Εφαρμογή
GCL90	Διήθηση	100 – 30000	Πρωτεΐνες, αντισώματα
GCL300	Διήθηση	10000 – 90000	Πρωτεΐνες
GH25	Αποκλεισμού Μεγέθους	Max. 3000	Μικρά πεπτίδια, λιπίδια, φάρμακα
Superose-6	Διήθηση	5000 – 5000000	Μεγάλες πρωτεΐνες
Superose-12	Διήθηση	1000 – 300000	Πρωτεΐνες, αντισώματα
Superdex - 75	Διήθηση	3000 – 70000	Τμήματα αντισωμάτων
Superdex - Peptide	Διήθηση	100 – 7000	Πεπτίδια, λιπίδια, τοξίνες
Sephadex G-75	Διήθηση	1000 – 50000	Μεγάλα πεπτίδια
Sephadex G-100	Διήθηση	1000 – 100000	Πρωτεΐνες, αντισώματα
Sephadex G-200	Διήθηση	1000 – 200000	Πρωτεΐνες, αντισώματα
Sephacryl S-400 HR	Διήθηση	10000 – 2000000	Μεγάλες πρωτεΐνες
Bio-gel P-10	Διήθηση	1500 – 20000	Πεπτίδια
Bio-gel P-30	Διήθηση	2500 – 40000	Μεγάλα πεπτίδια
Bio-gel A-5M	Διήθηση	10000 – 5000000	Μεγάλες πρωτεΐνες
TSK G-2000-PW	Διήθηση	< 2000	Πρωτεΐνες, αντισώματα
TSK G-4000-PW	Διήθηση	2000 – 300000	Μεγάλες πρωτεΐνες
TSK G-2000-SW	Διήθηση	5000 – 150000	Πρωτεΐνες
TSK G-4000-SW	Διήθηση	20000 – 10000000	Μεγάλες πρωτεΐνες, πρωτ. συμπλέγματα
Phenyl	Υδροφοβική Αντ.	-	Πεπτίδια, λιπίδια, πρωτεΐνες
Butyl	Υδροφοβική Αντ.	-	Πεπτίδια, λιπίδια, τοξίνες
DEAE	Ιοντοανταλλαγή	-	Χρωστικές, πεπτίδια, ολιγονουκλεοτίδια
CM	Ιοντοανταλλαγή	-	Χρωστικές, πεπτίδια, ολιγονουκλεοτίδια

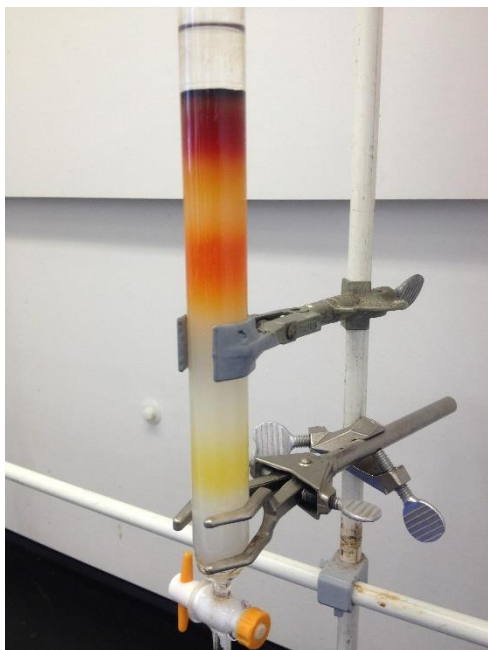
Πίνακας 5.1 Χαρακτηριστικά υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού.

5.1.2 Μέθοδοι

5.1.2.1 Εξοπλισμός

Ένα βασικό σύστημα χρωματογραφίας διήθησης σε πηκτή (Εικ. 5.2) απαιτεί μόνο μια στήλη με το ένα άκρο της προσαρμοσμένο σε έναν συλλέκτη κλασμάτων. Μια δεξαμενή αυτοματοποιεί τη διαδικασία προσθήκης του ρυθμιστικού διαλύματος στη στήλη και μια περισταλτική αντλία μπορεί να ρυθμίσει και να επιταχύνει τη ροή του ρυθμιστικού διαλύματος, μέσω αύξησης της πίεσης. Τελικά, ένας ανιχνευτής UV και ένας καταγραφέας μας απαλλάσσουν από την ανάγκη ελέγχου όλων των κλασμάτων για τη συλλογή της πρωτεΐνης. Περισσότερο εξειδικευμένος και ολοκληρωμένος εξοπλισμός χρωματογραφίας είναι επίσης εμπορικά διαθέσιμος, περιλαμβάνοντας συστήματα υψηλής πίεσης που επιτρέπουν πιο γρήγορους διαχωρισμούς. Ο ερευνητής θα πρέπει να συνεκτιμήσει τις απαιτήσεις του διαχωρισμού της πρωτεΐνης, ώστε να επιλέξει το σύστημα που θα χρησιμοποιήσει. Εξαιτίας του σχετικά μεγάλου χρόνου που απαιτείται για μια σωστή και ακριβή ανάλυση σε πηκτή χρωματογραφίας (12 ώρες δεν είναι ασυνήθιστο), η σημαντική επένδυση σε σύστημα χρωματογραφίας υψηλής πίεσης μπορεί να είναι απαραίτητη, όταν ο διαθέσιμος χρόνος για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης είναι περιορισμένος. Για τις περισσότερες εφαρμογές όμως, ο κοινός εξοπλισμός χρωματογραφίας παράγει έξοχα αποτελέ-

σματα. Η συζήτηση σε αυτό το κείμενο θα περιστραφεί γύρω από τον «χαμηλής πίεσης» εξοπλισμό χρωματογραφίας και τη μεθοδολογία που περισσότερο συχνά χρησιμοποιείται στα εργαστήρια για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης.



Εικόνα 5.2 Βασική διάταξη συστήματος χρωματογραφίας διήθησης σε πηκτή. Οι στήλες είναι συνήθως επιμήκεις, μικρής διατομής για να επιτρέπουν τον μέγιστο διαχωρισμό. Περισσότερο εξειδικευμένος και ολοκληρωμένος εξοπλισμός χρωματογραφίας είναι εμπορικά διαθέσιμος, με συστήματα υψηλής πίεσης που επιτρέπουν γρήγορους και περισσότερο αποτελεσματικούς διαχωρισμούς.

- **Στήλη.** Η στήλη διήθησης σε πηκτή είναι παρόμοια με τη στήλη που χρησιμοποιείται για τη χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντος. Η στήλη θα πρέπει να έχει πορώδη δομή και ο «νεκρός όγκος» μετά το πακετάρισμα θα πρέπει να είναι ελάχιστος για να μειώσει κάθε πιθανή ανάμειξη συστατικών μετά τη χρωματογραφία ($< 0,1\%$ του όγκου της στήλης είναι πρότυπο). Οι στήλες διήθησης σε πηκτή είναι συνήθως επιμήκεις, μικρής διατομής (το ύψος θα πρέπει να είναι 20 - 40 φορές η διάμετρος), για να επιτρέπουν τον μέγιστο διαχωρισμό, αν και η διάμετρος θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 1 cm για να μειώσει τις μη αναμενόμενες μετακινήσεις εξαιτίας της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης με το τοίχωμα της στήλης. Εάν ο όγκος του δείγματος απαιτεί τη χρήση εξαιρετικά επιμήκους και στενής στήλης για να επιτευχθεί ικανοποιητικός διαχωρισμός, μπορούν εναλλακτικά να προσαρμοστούν σε σειρά περισσότερες από μια στήλες, με σύνδεση με ελαστικό σωλήνα.
- **Σωλήνες.** Οι σωλήνες για τη σύνδεση των λειτουργικών μονάδων της χρωματογραφίας διήθησης σε πηκτή πρέπει να είναι ευλύγιστοι. Σωλήνες που χρησιμοποιούνται συχνά είναι οι Teflon®, Tygon® και οι ελαστικοί σωλήνες σιλικόνης.
- **Συλλέκτης κλασμάτων.** Ο συλλέκτης κλασμάτων προϋποθέτει την παρουσία ενός κατάλληλου ελαστικού σωλήνα συλλογής στην έξοδο της στήλης, ώστε να συλλέγεται σε προκαθορισμένους περιέκτες ένα κλάσμα, όταν ένας καθορισμένος όγκος έχει εξαχθεί ή μια συγκεκριμένη περίοδος χρόνου έχει παρέλθει.
- **Δοχείο ρυθμιστικού διαλύματος.** Το δοχείο περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα της έκλυσης και είναι συνδεδεμένο με τη στήλη μέσω σωλήνων. Το δοχείο του ρυθμιστικού διαλύματος μπορεί να είναι ένα πλατύστομο κύπελλο ή μια φιάλη Erlenmeyer.
- **Περισταλτική αντλία.** Μια αντλία ρυθμίζει την ταχύτητα ροής του ρυθμιστικού διαλύματος διαμέσου της στήλης. Για τα υποστρώματα που εκ συστάσεως ανέχονται κάποια πίεση, μια περισταλτική αντλία είναι χρήσιμη για την επιτάχυνση της ροής διαμέσου της στήλης.

- **Καταγραφέας UV.** Ένας ανίχνευτής- καταγραφέας υπεριώδους ακτινοβολίας που είναι προσαρμοσμένος στην έξοδο της στήλης επιτρέπει την άμεση ανίχνευση της πρωτεΐνης (για παράδειγμα, στα 280 nm), κατά τη δίοδο και έκλυση των διαδοχικών κλασμάτων. Το καταγεγραμμένο προφίλ του άκρου της στήλης εν είδει διαγράμματος, εξοικονομεί χρόνο στην ανάλυση, καθώς κάνει περιττή την προσπάθεια ελέγχου κάθε κλάσματος χωριστά για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση της πρωτεΐνης.

5.1.2.2 Προετοιμάζοντας το υπόστρωμα και στοιβάζοντας τη στήλη

- *Ενυδάτωση - διόγκωση του υποστρώματος*

Εάν το υπόστρωμα δεν έχει ενυδατωθεί από τον παρασκευαστή, η άνυδρη σκόνη θα απαιτήσει ενυδάτωση - διόγκωση.

1. Προσθέστε περίπου δέκα μέρη ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος προς ένα μέρος άνυδρου υλικού υποστρώματος.
2. Αναδεύσατε το εναιώρημα σε κατάλληλο αναδευτήρα ή περιστασιακά με το χέρι. Η ανακίνηση επιτρέπει την ομοιόμορφη ενυδάτωση του υποστρώματος διήθησης σε πηκτή.
3. Η διόγκωση μπορεί να ολοκληρωθεί σε μια ώρα εάν το υλικό βρίσκεται σε υψηλή θερμοκρασία, ή να εξελίσσεται καθόλη τη διάρκεια της νύχτας εάν βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου. Συμβουλευτείτε τις οδηγίες του παρασκευαστή του υποστρώματος.
4. Όταν το υπόστρωμα δεν έχει διογκωθεί με τον βρασμό, η εξαέρωση είναι απαραίτητη για να μειώσει τον κίνδυνο του σχηματισμού φυσαλίδων αέρα μέσα στη στήλη. Εφαρμόστε ένα κενό στο διάλυμα του υποστρώματος για μια ώρα, αναταράσσοντας με το χέρι περιστασιακά το διάλυμα ή συνεχόμενα με έναν αναδευτήρα.

Μην ανακινείτε το διάλυμα με μαγνητικό αναδευτήρα. Η μηχανική ανάδευση μπορεί να τεμαχίσει το υλικό του υποστρώματος σε «ψήγματα», που μπορούν να επηρεάσουν την αναλυτική διαδικασία. Εάν τα «ψήγματα» αποτελούν πρόβλημα, μπορούν να απομακρυνθούν μετά τη διόγκωση του υλικού του υποστρώματος. Αυτή η διαδικασία θα πρέπει να επαναληφθεί μερικές φορές μέχρι η υγρή αυτή φάση να είναι ορατά λιγότερο θολή.

- *Στοιβάζοντας τη στήλη*

Πριν τη στοιβαξη της στήλης, το υπόστρωμα θα πρέπει να βρίσκεται σε πυκνό διάλυμα, με το υλικό του υποστρώματος να κατέχει μέχρι και τα 3/4 του όγκου και το ρυθμιστικό διάλυμα να παραμένει στο 1/4. Το υπόστρωμα και η στήλη θα πρέπει να βρίσκονται στη θερμοκρασία χειρισμού της στήλης (συνήθως στους 4 °C).

Εάν μια στήλη πρόκειται να χρησιμοποιείται συχνά, συνίσταται η χρήση ρυθμιστών ροής. Οι εμπορικά διαθέσιμοι ρυθμιστές μπορούν να βοηθήσουν στη διατήρηση του επιπέδου επιφάνειας της στήλης και προφυλάσσουν το υπόστρωμα από πιθανώς ευμεγέθη συστατικά του δείγματος, συμβάλλοντας στην επιμήκυνση του χρόνου ζωής της στήλης.

1. Προσθέστε ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος στη γυάλινη στήλη πακεταρίσματος και κλείστε την έξοδο, αφού έχει τρέξει λίγο από το ρυθμιστικό διάλυμα. Αυτό θα αφαιρέσει φυσαλίδες αέρα από τον χώρο στο κάτω μέρος της στήλης.
2. Σε ένα βήμα, ανοίξτε την είσοδο της στήλης και μεταφέρατε το εναιώρημα του υποστρώματος μέσα στη γυάλινη στήλη. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να επιδειχθεί, ώστε να μην εισαχθούν φυσαλίδες αέρα ενώ στοιβάζεται η στήλη. Εάν οι φυσαλίδες αναπτυχθούν πρόωρα κατά τη διάρκεια της στοιβαξης, μια γυάλινη ράβδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάδευση του υποστρώματος και την απελευθέρωση των φυσαλίδων αέρα. Μια επέκταση της στήλης ή ένα χωνί μπορεί να χρειαστεί για τη στοιβαξη της στήλης σε ένα απλό βήμα. Εάν μια στήλη δεν έχει στοιβαχτεί σε ένα μόνο βήμα, το επίπεδο επιφάνειας της μπορεί να είναι μη ομαλό, με συνέπειες κατά τη φόρτωση του δείγματος.

3. Αφού τμήμα του υποστρώματος έχει ηρεμήσει στο κάτω μέρος της στήλης, ανοίξτε την έξοδο για να επισπεύσετε τη στοιβαξη και προσθέστε επιπλέον ρυθμιστικό διάλυμα.
4. Εκκλύνετε τη στήλη με αρκετούς όγκους στήλης ρυθμιστικού διαλύματος για να επιτρέψετε τη σταθεροποίηση και την ισορροπία. Η στήλη μπορεί να συνδεθεί με μια αντλία και ένα δοχείο αυτή τη φορά.

Να μην επιτρέψετε στο υπόστρωμα της στήλης να «τρέξει» χωρίς την παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος, διότι θα αναπτυχθούν ασυνέχειες κατά το πακετάρισμα, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν τη διαχωριστική ικανότητα της στήλης.

- *Ελέγχοντας τη στήλη*

Αφού φυσαλίδες αέρα ή ανώμαλη στοιβαξη στήλης μπορούν να προκαλέσουν μια σημαντική απώλεια στην ακρίβεια της ανάλυσης, κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας εξετάστε τη στήλη προσεκτικά για σημάδια ακατάλληλης στοιβαξης.

1. Επιθεωρήστε οπτικά τη στήλη για την ύπαρξη φυσαλίδων αέρα ή θραυσμάτων στο στοιβαγμένο υπόστρωμα. Ένας βοηθητικός λαμπτήρας χειρός μπορεί να είναι χρήσιμος για αυτήν την επιθεώρηση.
2. Για μια πιο προσεκτική επιθεώρηση της στήλης, ένα διάλυμα 2 mg/ml της χρωστικής μπλε της δεξτράνης (dextran blue) μπορεί να εφαρμοστεί στη στήλη. Ο προστιθέμενος όγκος θα πρέπει να είναι 1% του όγκου του επιπέδου στήλης και η χρωστική θα πρέπει να απομακρύνεται πλήρως σε όγκο όχι μεγαλύτερο από το διπλάσιο του όγκου προσθήκης.

Εάν η στήλη έχει στοιβαχτεί καλά, η χρωστική θα είναι εύκολα ορατή και θα πρέπει να διέλθει τη στήλη ως ενιαίο μέτωπο, χωρίς λωρίδες. Η αιμοσφαιρίνη και η φερριτίνη είναι έγχρωμες πρωτεΐνες που συνίστανται στη θέση της δεξτράνης για τις στήλες Bio-Gel P. Αυτοί οι δείκτες είναι επίσης χρήσιμοι στον καθορισμό του βαθμού της πρωτεϊνικής αραίωσης κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του χρωματογραφήματος.

Το διάλυμα δεξτράνης μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να καθορίσει τον «νεκρό όγκο» της στήλης. Ο νεκρός όγκος αναφέρεται στον όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος (κινητή φάση) μέσα από τον οποίο διέρχεται συστατικό του δείγματος το οποίο δεν εμφανίζει καμιά αλληλεπίδραση με το υλικό του υποστρώματος. Έτσι, ο νεκρός όγκος εκφράζει τον ελάχιστο όγκο έκλουσης στον οποίο η ζητούμενη πρωτεΐνη θα μπορούσε πιθανώς να εξαχθεί από τη στήλη. Ο όγκος που απαιτείται για την εξαγωγή άλλων πρωτεϊνών μπορεί να μετρηθεί σε σχέση με αυτό το πρότυπο.

5.1.2.3 Εφαρμογή και εξαγωγή του δείγματος

- *Εφαρμογή Δείγματος*

Το δείγμα της πρωτεΐνης θα πρέπει να είναι πυκνό (10 - 20 mg/ml - συμβουλευτείτε το εισαγωγικό κεφάλαιο του παρόντος εργαστηριακού οδηγού) και ο όγκος του δείγματος θα πρέπει να είναι μικρός (τυπικά 1-5% του όγκου της στήλης). Φόρτωση όγκου δείγματος μεγαλύτερου του 5% του όγκου στήλης, μπορεί να μειώσει την απόδοση της ανάλυσης, ενώ όγκος μικρότερος του 1% είναι απίθανο να βελτιώσει τον διαχωρισμό. Επιπλέον, το δείγμα δεν επιτρέπεται να είναι σημαντικά περισσότερο ιξώδες από το ρυθμιστικό διάλυμα, διότι μπορεί να συμβεί διεύρυνση των άκρων της κορυφής έκλουσης.

Το δείγμα της πρωτεΐνης θα πρέπει να καθαρίζεται με διήθηση (0,2 μm μέγεθος πόρου του φίλτρου) ή με φυγοκέντριση (5 λεπτά στα 10000 × g) για να αφαιρεθούν τυχόν κατάλοιπα που μπορούν να επηρεάσουν τη χρωματογραφία.

Το επιλεγμένο ρυθμιστικό διάλυμα οφείλει να διατηρεί τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης και να εμποδίζει μη συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης με πρωτεΐνη ή πρωτεΐνης με το υπόστρωμα. Γενικά, ένα άλας μικρού ιοντικού σθένους (20 με 100 mM) είναι αρκετό για να εμποδίσει μη ειδικές ιοντικές αλληλεπιδράσεις. Σε κάποιες περιπτώσεις, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με το υπόστρωμα είναι πιθανές και δεν πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένα άλας αυξημένου ιοντικού σθένους.

1. Εξάγετε το ρυθμιστικό διάλυμα μέχρι ο μηνίσκος να φτάσει στην κορυφή του επιπέδου του υποστρώματος και κλείστε την έξοδο της στήλης. Να μην επιτρέψετε στο υπόστρωμα της στήλης να «τρέξει» στεγνό, διαφορετικά η στήλη πρέπει να πακεταριστεί ξανά.
2. Προσεκτικά, εφαρμόστε το διάλυμα του δείγματος στο πάνω μέρος του υποστρώματος.
3. Ανοίξτε την έξοδο της στήλης και αφήστε το δείγμα να εισαχθεί στο υπόστρωμα, έπειτα κλείστε την έξοδο.
4. Προσθέστε με προσοχή, χωρίς να διαταραχθεί η επιφάνεια, μικρή ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος στο πάνω μέρος του υποστρώματος.
5. Ανοίξτε την έξοδο της στήλης μέχρι το ρυθμιστικό διάλυμα να εισαχθεί στο υπόστρωμα και έπειτα κλείστε την έξοδο.
6. Εφαρμόστε επιπλέον όγκο ρυθμιστικού διαλύματος στο υπόστρωμα.
7. Η έκλυση μπορεί να αρχίσει. Το δοχείο συλλογής των κλασμάτων, το δοχείο του ρυθμιστικού διαλύματος και η περισταλτική αντλία μπορούν να προσαρμοστούν σε αυτό το στάδιο.

- Παραλαβή (έκλυση) δείγματος

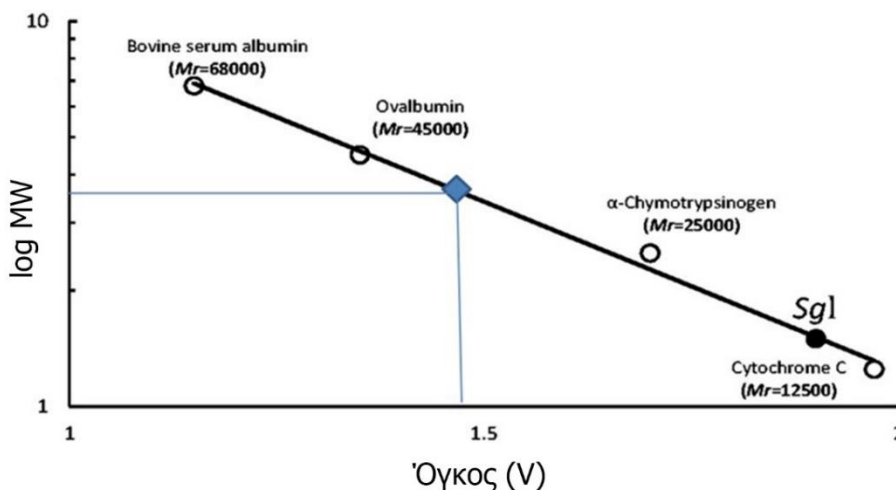
Έχει επιτραπεί στο ρυθμιστικό διάλυμα της χρωματογραφίας να διέλθει μέσω της στήλης, μέχρι η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει να εξαχθεί.

Για τον έλεγχο της ροής της στήλης χρησιμοποιείται συνήθως μια περισταλτική αντλία. Όταν εφαρμόζετε αντλία, να μην υπερβαίνετε τα όρια ανοχής του υποστρώματος (συμβουλευτείτε τις οδηγίες του κατασκευαστή).

Με δεδομένο τον αυξημένο αναγκαίο χρόνο ανάπτυξης του χρωματογραφήματος, θα πρέπει να λαμβάνονται όλα τα απαραίτητα μέτρα προκειμένου να αποφευχθεί η περίπτωση αφυδάτωσης της στήλης που θα οδηγούσε σε καταστροφή του υποστρώματος, κυρίως κατά τη χρήση περισταλτικής αντλίας.

Η απόδοση των χρωματογραφικών στηλών είναι τυπικά άνω από 85%, ενώ η αναλυτική ικανότητα γενικά βελτιώνεται με μια πιο μικρή κλίμακα ροής.

Για να υπολογίσουμε το μοριακό βάρος μιας πρωτεΐνης (έχοντας υπόψη ότι οι εκτιμήσεις του μεγέθους γίνονται με την παραδοχή ότι οι πρωτεΐνες είναι σφαιρικές), μια πρότυπη καμπύλη μπορεί να δημιουργηθεί με την ανάλυση πρότυπων πρωτεϊνών στη στήλη διήθησης σε πηκτή. Οι Bio-Rad, Pharmacia και Sigma παρέχουν πακέτα πρότυπων πρωτεϊνικών μεγεθών. Σημειώστε ότι οι συνθήκες αποδιάταξης που συχνά εφαρμόζονται για τον καθαρισμό μοριακού βάρους δεν είναι συμβατές με όλους τους τύπους των υποστρωμάτων. Οι όγκοι έκλυσης των πρότυπων πρωτεϊνών καταγράφονται ως λογαριθμική συνάρτηση των μοριακών τους βαρών και θα πρέπει να δημιουργούν μια ευθεία γραμμή. Έπειτα, ο όγκος έκλυσης μιας άγνωστης πρωτεΐνης μπορεί να αποτυπωθεί πάνω σ' αυτήν την πρότυπη καμπύλη και να αντιστοιχηθεί με ένα μοριακό βάρος, το οποίο θα αποδοθεί στην άγνωστη πρωτεΐνη (Εικ. 5.3).



Εικόνα 5.3 Για να υπολογίσουμε το μοριακό βάρος άγνωστης πρωτεΐνης, μια πρότυπη καμπύλη μπορεί να δημιουργηθεί με την ανάλυση πρότυπων πρωτεϊνών σε στήλη διήθησης σε πηκτή. Ο όγκος έκλυσης μιας άγνωστης πρωτεΐνης μπορεί να αποτυπωθεί πάνω σ' αυτήν την πρότυπη καμπύλη και να αντιστοιχηθεί με ένα μοριακό βάρος, το οποίο θα αποδοθεί στην άγνωστη πρωτεΐνη (τροποποιημένη από Eltogy et al., 2015).

5.1.2.4 Αναγέννηση και αποθήκευση της χρωματογραφικής στήλης

Αφού τα υποστρώματα της διήθησης σε πηκτή δεν έχουν σχεδιαστεί για να προσδένουν πρωτεΐνες, η αφαίρεση των πρωτεϊνών από αυτά δεν θα πρέπει να αποτελεί δύσκολη υπόθεση. Γενικά, πλύση με αραιό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου ή διάλυμα μη ιοντικού απορρυπαντικού, θα αφαιρέσει τα περισσότερα μη ειδικά προσδεδεμένα υλικά (βλέπε Πίνακα 5.2 πιο κάτω για κάποια παραδείγματα). Η ασφαλέστερη μέθοδος απομάκρυνσης μη επιθυμητών υλικών πρόσμιξης, είναι η προσεκτική διήθηση του δείγματος και η παρασκευή νέων κάθε φορά ρυθμιστικών διαλυμάτων χρωματογραφίας.

Υπόστρωμα διήθησης σε πηκτή	Διάλυμα αναγέννησης
Bio-Gel P	3% H ₂ O ₂
Bio-Gel A	0,01% diethylcarbonate
Sephacryl HR	0,2 – 0,5 M NaOH ή μη ιοντικό απορρυπαντικό
G-type Sephadex	Μη ιοντικό απορρυπαντικό ή 0,2 M NaOH
Sepharose CL	0,5 M NaOH ή 1% μη ιοντικό απορρυπαντικό
Superose	0,1 - 0,2M NaOH

Πίνακας 5.2 Αναγέννηση υποστρωμάτων διήθησης σε πηκτή. Στην αριστερή στήλη παρατίθενται τα διαλύματα αναγέννησης των υλικών πλήρωσης που χρησιμοποιούνται κατά κόρον στις χρωματογραφικές αναλύσεις.

Εάν οι αρχικές προσπάθειες αναγέννησης δεν αφαιρέσουν κάποιον ανεπιθύμητο παράγοντα, τότε οι ακόλουθες διαδικασίες μπορούν να δοκιμαστούν. Περισσότερο αποτελεσματική αναγέννηση μπορεί να επιτευχθεί με την έκπλυση του υποστρώματος εκτός στήλης και την επανεισαγωγή του σε αυτή. Οι υδρόφοβες πρωτεΐνες μπορεί να απομακρυνθούν με την έκπλυση της στήλης καθόλη τη διάρκεια της νύχτας με έναν οργανικό διαλύτη (π.χ. 24% αιθανόλη ή 30% ακετονιτρίλιο). Οι υδρόφιλες πρωτεΐνες μπορούν να εξαχθούν με 30-50% οξικό οξύ ή με την παρατεταμένη επώαση της στήλης με 1 mg/ml πεψίνης (σε 0,5 M NaCl και 0,1 M οξικού οξέος· πλύνετε καλά τη στήλη μετά τη χρήση της πρωτεάσης για να εξαλείψετε τα ίχνη της πεψίνης). Τα νουκλεϊκά οξέα μπορούν να αφαιρεθούν ικανοποιητικά με ρυθμιστικό διάλυμα TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ή εναλλακτικά με την προσθήκη νουκλεάσης. Τα λιπίδια αφαιρούνται από τη στήλη με παρατεταμένη επώαση με ένα μη ιοντικό απορρυπαντικό, όπως 0,2 - 1% NP - 40.

Η στήλη θα πρέπει να αποθηκευτεί σε ρυθμιστικό διάλυμα που θα περιέχει έναν αντιμικροβιακό παράγοντα. Η αποθήκευση σε ψυχρό περιβάλλον είναι ένα πρόσθετο εμπόδιο στην ανάπτυξη μικροβίων. Το αζίδιο του νατρίου (0,02%) συχνά περιλαμβάνεται στο ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης για να εμποδίσει την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Αιθανόλη (20%) μπορεί να χρησιμοποιηθεί με Sephacryl HR ή Sepharose CL. Άλλοι αντιμικροβιακοί παράγοντες μπορεί να προτείνονται από τους παρασκευαστές υποστρωμάτων.

5.1.2.5 Προβλήματα και λύσεις

Η ακόλουθη λίστα απαριθμεί προβλήματα που μπορεί να παρατηρηθούν στη χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή και παρέχει προτάσεις για να ξεπεραστεί κάθε σχετική δυσκολία.

- Ροή χαμηλής κλίμακας της στήλης

Λύσεις

1. Η έξοδος της στήλης δεν είναι πλήρως ανοικτή. Ανοίξτε πλήρως την έξοδο της στήλης.
2. Οι φυσαλίδες αέρα στον σωλήνα της στήλης παρεμποδίζουν τη ροή του ρυθμιστικού διαλύματος. Απομακρύνετε τις φυσαλίδες με την αύξηση της πίεσης της στήλης και χτυπώντας ελαφρά τον σωλήνα με το νύχι του δακτύλου. Βεβαιωθείτε ότι έχουν απομακρυνθεί οι φυσαλίδες από το ρυθμιστικό διάλυμα και το υπόστρωμα και χειριστείτε τις στήλες με μεγαλύτερη προσοχή.
3. Οι σωλήνες μπορεί να έχουν υποστεί απόφραξη. Διακόψτε τη ροή του ρυθμιστικού διαλύματος και αντικαταστήστε τον σωλήνα. Κάποιες φορές η παρεμπόδιση μπορεί να παρακαμφθεί με την προσθήκη απορρυπαντικού στο ρυθμιστικό διάλυμα. Διαφορετικά, η στήλη πρέπει να καθαριστεί και να στοιβαχτεί-πακεταριστεί ξανά.

4. Η πιθανή καθίζηση του δείγματος δημιουργεί εμπόδια στην άνω επιφάνεια του υποστρώματος. Ξύστε την επιφάνεια του υποστρώματος και αφαιρέστε κάθε κατάλοιπο. Έπειτα προσθέστε ένα με δύο εκατοστά φρέσκου υλικού του υποστρώματος και αφήστε να ηρεμήσει πριν συνεχίσετε με την έκλυση. Γενικά, διηθήστε το δείγμα πριν την εφαρμογή του πιο προσεκτικά ή χρησιμοποιήστε απορρυπαντικά κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας.
 5. Το υπόστρωμα είναι συμπίεμένο ή έχει διογκωθεί πλήρως ή περιέχει πάρα πολλά «ψήγματα». Τα υποστρώματα Sephadex μπορούν να συμπίεστούν εάν βρεθούν κάτω από πολύ μεγάλη πίεση. Η στήλη πρέπει να στοιβαχτεί ξανά.
 6. Ο σωλήνας της αντλίας εμφανίζει διαρροή. Επιθεωρήστε τον σωλήνα και αντικαταστήστε τον εάν είναι απαραίτητο.
 7. Ανάπτυξη μικροβίων στο υπόστρωμα. Μια νέα στήλη θα πρέπει να προετοιμαστεί.
- *Ασυνήθιστο προφίλ έκλυσης*

Λύσεις

1. Θεωρήστε άκυρη την προσπάθεια και επαναλάβετε την ανάλυση. Η εφαρμογή του δείγματος μπορεί να εκτελεστεί σε στήλη μπλε δεξτράνης για καλύτερο έλεγχο και εποπτεία της πορείας διαχωρισμού.
 2. Η πρωτεΐνη πιθανόν να προσροφήθηκε στο υπόστρωμα. Συμπεριλάβετε ένα άλας με μεγαλύτερο ιοντικό σθένος ή κάποιο απορρυπαντικό στο ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης. Σε κάποιες περιπτώσεις, μια υδρόφοβη αλληλεπίδραση μπορεί να συμπεριληφθεί, όπου το ιοντικό σθένος του άλατος θα πρέπει να μειωθεί.
- *Ανεπαρκής ανάλυση της επιθυμητής περιοχής κλασμάτων που περιέχουν την πρωτεΐνη*

Λύσεις

1. Η στήλη έχει περιορισμένο και ανεπαρκές μήκος. Η ανάλυση αυξάνει ανάλογα με την τετραγωνική ρίζα του μήκους της στήλης.
 2. Η κλίμακα ροής είναι αυξημένη. Οι μεγάλες κλίμακες ροής μειώνουν την ανάλυση. Περιορίστε τον ρυθμό ροής.
 3. Μεγάλος «νεκρός χώρος» στο κάτω μέρος της στήλης. Στον χώρο μεταξύ του τέλους της στήλης και του συλλέκτη κλασμάτων, οι πρωτεΐνες που έχουν εξαχθεί μπορούν να αναμειχθούν μειώνοντας την ανάλυση.
 4. Ο όγκος του δείγματος είναι πολύ μεγάλος. Για καλύτερη ανάλυση, το δείγμα θα πρέπει να αποτελεί το 1 - 5% του όγκου της στήλης.
 5. Η στήλη έχει στοιβαχτεί ανεπαρκώς. Το περιορισμένο πακετάρισμα του υλικού του υποστρώματος μπορεί να δημιουργήσει ιδιόμορφα πρότυπα ροής του ρυθμιστικού διαλύματος που μειώνουν την ανάλυση.
 6. Λανθασμένη επιλογή υλικού υποστρώματος. Χρησιμοποιήστε υπόστρωμα με κατάλληλη κλίμακα κλασμάτωσης. Υπόστρωμα με περιορισμένη κλίμακα κλασμάτωσης θα δώσει καλύτερη ανάλυση. Θυμηθείτε ότι μια μη σφαιρική ή αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη εμφανίζει διαφορετικά κινητικά χαρακτηριστικά και άρα πρότυπο έκλυσης από μια σφαιρική πρωτεΐνη με το ίδιο μοριακό βάρος.
 7. Ακατάλληλο μέγεθος κόκκων υλικού πλήρωσης. Λεπτότεροι κόκκοι υποστρώματος προσφέρουν γενικά καλύτερη ανάλυση με αντίτιμο μεγαλύτερους χρόνους εξαγωγής.
- *Περιορισμένη ανάκτηση του δείγματος*

Λύσεις

1. Το δείγμα έχει καθιζάνει. Ανεπαρκείς ή υπερβολικές συγκεντρώσεις άλατος στο ρυθμιστικό διάλυμα μπορούν να οδηγήσουν σε καθίζηση της πρωτεΐνης. Διασφαλίστε ότι η πρωτεΐνη είναι διαλυτή υπό τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες.
 2. Το δείγμα χάθηκε πριν φορτωθεί. Εάν το δείγμα της πρωτεΐνης έχει ληφθεί με διήθηση ή φυγοκέντριση πριν φορτωθεί στη στήλη, ελέγξτε την απόδοση της μεθόδου πριν φορτώσετε τη στήλη.
 3. Η πρωτεΐνη κατακρατήθηκε από το υπόστρωμα. Βλέπε παραπάνω.
 4. Οι συνθήκες εξαγωγής είναι ακραίες. Κάτω από ακραίες συνθήκες, οι υπομονάδες της πρωτεΐνης μπορούν να διαχωριστούν ή βασικοί συμπαράγοντες μπορούν να ελευθερωθούν. Ελέγξτε την πρωτεϊνική δραστηριότητα κάτω από τις συνθήκες εξαγωγής. Εάν υποψιάζεστε την απώλεια υπομονάδων ή συμπαράγοντων, κλάσματα μπορούν να αναμειχθούν ξανά για να επανακτηθεί η δραστηριότητα.
 5. Πρωτεόλυση. Συμπεριλάβετε αναστολείς πρωτεάσης στο ρυθμιστικό διάλυμα χρωματογραφίας (βλέπε Κεφ. 1).
 6. Ανάπτυξη μικροβίων στο υπόστρωμα (βλέπε πιο πάνω).
- *Το προφίλ έκλουσης δε μπορεί να αναπαραχθεί*

Λύσεις

1. Η σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος ή της στήλης δεν είναι η ίδια όπως αυτή του προηγούμενου πειράματος.
 2. Το δείγμα έχει καθιζάνει (βλέπε πιο πάνω).
 3. Το δείγμα υπέστη τροποποίηση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Επανεξετάστε τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης και αλλάξτε τις συνθήκες αποθήκευσης εάν είναι απαραίτητο.
- *Απώλεια της δραστηριότητας της πρωτεΐνης*

Λύσεις

1. Κάποιος συμπαράγοντας ή τμήμα του λειτουργικού συμπλόκου της πρωτεΐνης έχει χαθεί. Αναμείξτε ξανά τα κλάσματα και ελέγξτε για δραστηριότητα.
2. Η πρωτεΐνη δεν είναι σταθερή στο ρυθμιστικό διάλυμα του πειράματος. Ερευνήστε για εναλλακτικά ρυθμιστικά διαλύματα.
3. Η ανάπτυξη μικροβίων στο υπόστρωμα αλλάζει την πρωτεΐνη (βλέπε πιο πάνω).

5.2 Αντικαθιστώντας το ρυθμιστικό διάλυμα μιας πρωτεΐνης

Η χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή είναι μια ήπια και πολύ γρήγορη μέθοδος για τη «μεταφορά» ενός μείγματος πρωτεΐνης από ένα διάλυμα σε κάποιο άλλο. Συχνά, η διήθηση σε πηκτή χρησιμοποιείται για να απομακρύνει μια πρωτεΐνη από ένα ρυθμιστικό διάλυμα μικρού ιοντικού σθένους (για παράδειγμα, ένα ίζημα θειικού αμμωνίου ή μια «άκρη» από μια στήλη χρωματογραφίας ανταλλαγής ιόντων) σε μια διαδικασία που ονομάζεται αφαλάτωση (salting out).

Επιπλέον, μολυσματικοί παράγοντες με χαμηλό μοριακό βάρος όπως μη προσδεμένα ραδιενεργά ισότοπα ή νουκλεοτίδια μπορούν να αφαιρεθούν πάρα πολύ γρήγορα από ένα διάλυμα πρωτεΐνης. Η μέθοδος εκμεταλλεύεται τις ιδιότητες κάποιων υποστρωμάτων για να αποκλείσει ουσιαστικά όλες τις πρωτεΐνες από τους πόρους. Έτσι, η εφαρμοσμένη πρωτεΐνη παραλαμβάνεται από τη στήλη παρουσία ενός προ-ισορροπημένου ρυθμιστικού διαλύματος, πριν το επιλεγμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης ή οι μολυσματικοί παράγοντες χαμηλού μοριακού βάρους μπορέσουν να περάσουν μέσα από τις δαιδαλώδεις διαδρομές του υλικού πλήρωσης της στήλης. Αφού η πρωτεΐνη δεν αλληλεπιδρά με το υπόστρωμα της στήλης, πρακτικά δεν υπάρχει κίνδυνος για αποδιάταξη της πρωτεΐνης που μπορεί να συμβεί με την υπερδιήθηση. Τελικά, οι σχετικά υψηλές κλίμακες ροής και η πιθανότητα αντικατάστασης του ρυθμιστικού διαλύματος με διήθηση σε πηκτή (πιθανόν και με την

επικουρική εφαρμογή φυγοκέντρωσης), κάνουν τη μέθοδο ταχύτερη κατά τη διάρκεια του καθαρισμού πρωτεΐνης, σε σύγκριση με τη διαπίδυση. Όμως, η αφαλάτωση με διήθηση σε πηκτή δεν είναι πάντοτε ολοκληρωμένη και έτσι η διαπίδυση προτιμάται ακόμα για μια πληρέστερη αφαίρεση άλατος.

1. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης θα πρέπει να είναι μικρότερη από 30 mg/ml και ο όγκος του δείγματος μπορεί να είναι μέχρι το 20 - 30% του όγκου του υλικού της στήλης. Μικρότεροι σχετικοί όγκοι δείγματος θα απαιτούνται για την αφαίρεση συστατικού του ρυθμιστικού διαλύματος μεγάλης συγκέντρωσης. Μια κοντή, ευρεία στήλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να επιτευχθεί μια πιο γρήγορη κλίμακα ροής.
2. Προετοιμάστε το υπόστρωμα και στοιβάξτε μια στήλη με υλικό χαμηλού μοριακού βάρους, κλίμακας κλασμάτωσης όπως το Sephadex (Fine Grade) ή BioGel P-6DG (βλέπε πιο πάνω).
3. Ισορροπήστε τη στήλη με το ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο θα «μεταφερθεί» η πρωτεΐνη.
4. Εφαρμόστε και εξάγετε το δείγμα.
5. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή δεν είναι σημαντικό αφού η πρωτεΐνη θα περάσει μέσα από τη στήλη γρηγορότερα από οποιοδήποτε ρυθμιστικό διάλυμα.

Προστοιβαγμένες στήλες διήθησης σε πηκτή είναι εμπορικά διαθέσιμες για φυγοκέντρωση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο χαμηλής ταχύτητας. Αυτές οι στήλες μπορούν να εξισορροπηθούν και να αλλάξουν ρυθμιστικά διαλύματα για πρωτεϊνικά δείγματα μέχρι 10 ml μέσα σε λίγα λεπτά.

Βιβλιογραφία

- Ansari, A. A., & Mage, R. G. (1977). Molecular-weight estimation of proteins using Sepharose CL-6B in guanidine hydrochloride. *Journal of Chromatography A*, 140(1), 98-102.
- Elmogy, M., Bassal, T. T., Yousef, H. A., Dorrah, M. A., Mohamed, A. A., & Duvic, B. (2015). Isolation, Characterization, Kinetics, and Enzymatic and Nonenzymatic Microbicidal Activities of a Novel c-Type Lysozyme from Plasma of *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). *Journal of Insect Science*, 15(1), 57.
- Hummel, J. P., & Dreyer, W. J. (1962). Measurement of protein-binding phenomena by gel filtration. *Biochim. Biophys. Acta*, 63, 530-532.
- Siegel, L. M., & Monty, K. J. (1966). Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biophysics including Photosynthesis*, 112(2), 346-362.
- Stellwagen, E. (1990). Gel filtration. *Methods Enzymol.* 182, 317-28.
- Striegel, A., Yau, W. W., Kirkland, J. J., & Bly, D. D. (2009). *Modern size-exclusion liquid chromatography: practice of gel permeation and gel filtration chromatography*. John Wiley & Sons.