

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ Ι: ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ



# Μελέτη της σταθερότητας DNA φυτικών κυττάρων σε φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες

---

Διπλωματική εργασία

Παυλοπούλου Καλλιόπη Έλλη

Επιβλέπουσα  
Αναστασία Δέτση  
Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2022

## Ευχαριστίες

---

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας του Ε.Μ.Π. Δρ. Αναστασίας Δέτση κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια κα. Αναστασία Δέτση, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση αυτού του εξαιρετικά ενδιαφέροντος θέματος που δεν είχε μελετηθεί ξανά. Η στήριξή της και ο ενθουσιασμός της ήταν μεταδοτικός και σημαντική κινητήρια δύναμη ακόμα και για τις δύσκολες μέρες μιας ερευνητικής ζωής.

Πολλές εγκάρδιες ευχαριστίες όμως πρέπει να αποδοθούν και στην υποψήφια διδάκτορα, που ήταν συνεχώς δίπλα μου σε αυτό το ταξίδι, Ιωάννα Πιττερού. Με το ακούραστο πνεύμα και χαμόγελό της, με στήριξε και με βοήθησε να κατανοήσω την έρευνα που διεξήγαμε σε βάθος. Με στήριξε και η αμοιβαία εμπιστοσύνη μας επέφερε καρπούς και τόσο όμορφα αποτελέσματα. Η συνεχής της προσπάθεια να βοηθήσει, ακόμα και χωρίς ωράριο πολλές φορές, συντέλεσε στην ομαλή ολοκλήρωση των πειραμάτων που είχαμε σχεδιάσει και στην αξιολόγησή τους.

Δεν θα μπορούσα να είχα φτάσει ως εδώ χωρίς την αμέριστη στήριξη της οικογένειάς μου, που πάντα προωθούσε την πνευματική ανάπτυξη και ευζωία μου. Ήταν δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια, και ελπίζω πολλά ακόμα, και τους ευχαριστώ για τις αρχές που μου δίδαξαν και για το ανήσυχο πνεύμα που μου μετέδωσαν. Ιδιαίτερο μέρος ευχαριστίας αποδίδεται στον αγαπημένο μου Φόξυ, που με βοήθησε να συγγράψω την παρούσα εργασία με προσφορές αγάπης και κουτουλιών.

*Στο άπειρο κι ακόμα παραπέρα.*

## Περίληψη

---

Το DNA, από τη στιγμή της ανακάλυψής του μέχρι και σήμερα, αποτελεί ερευνητικό κόμβο για πολλές επιστήμες. Όντας ο ακρογωνιαίος λίθος στην κατανόηση των όλων των έμβιων οργανισμών, και δη του ανθρώπου, η καθαρότητά του και η βέλτιστη συντήρησή του είναι βαρύνουσας σημασίας. Η απορρόφηση του DNA στο φάσμα ορατού-υπεριώδους και συγκεκριμένα ο λόγος απορρόφησης στα 260 nm προς αυτήν στα 280 nm είναι ενδεικτικός για την ταυτότητα και την σταθερότητα του μακρομορίου (ύπαρξη προσμίξεων, αποδόμηση).

Ιδιάζουσα ιδιότητα του DNA είναι και η αλληλεπίδρασή του με διάφορες ενώσεις. Η δράση της εκάστοτε ένωσης μπορεί να είναι αποσταθεροποιητική ή σταθεροποιητική με άμεσες επιπτώσεις στην σταθερότητα και την συντήρηση του γενετικού υλικού.

Στην παρούσα εργασία διερευνάται η ανάπτυξη μιας πράσινης διεργασίας για την εκχύλιση του DNA από φυτικά κύτταρα μπανάνας (*Musa Acuminata*) και η βελτιστοποίησή της ως προς τις σημαντικότερες παραμέτρους. Παράλληλα, μελετάται η επίδραση των φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (NaDESs) στην σταθερότητα του απομονωμένου DNA. Τα βέλτιστα αποτελέσματα εφαρμόζονται στο DNA θύμου αδένου βοδιού (calf thymus DNA, ct-DNA) και σε μελέτες αλληλεπίδρασης.

Αρχικά, εξετάστηκαν διάφορα NaDESs ως προς την διαλυτική τους ικανότητα για το DNA και βρέθηκε κατάλληλο το NaDES με συστατικά τη βεταΐνη και τη γλυκερόλη (Bet-Gly) σε αναλογία 1:2, καθώς διαθέτει τα κατάλληλα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (pH, πολικότητα). Στη συνέχεια, στην διεργασία απομόνωσης του DNA, πραγματοποιήθηκε πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης 3 παραμέτρων σε 3 αποκρίσεις (Box Behnken 3x3). Συγκεκριμένα, ως ανεξάρτητες μεταβλητές μελετήθηκαν η συγκέντρωση άλατος (M) στο διάλυμα λύσης των κυττάρων, η συγκέντρωση αιθανόλης (% v/v) στο διάλυμα ανάδυσης του DNA και τέλος η συγκέντρωση του NaDES Bet-Gly 1:2 (% v/v) στο διάλυμα αποθήκευσης του απομονωμένου DNA. Οι εξαρτημένες μεταβλητές που παρακολούθηθηκαν ήταν η ποσότητα του απομονωμένου DNA (mg), η καθαρότητά του ( $A_{260}/A_{280}$ ) και η σταθερότητά του (d). Η βελτιστοποίηση του μοντέλου έδειξε ότι οι κατάλληλες τιμές των μεταβλητών για τις μέγιστες αποκρίσεις είναι: [NaCl] = 0.51 M, EtOH = 70 % v/v, NaDES Bet-Gly: 1 % v/v. Το μοντέλο αυτό επιβεβαιώθηκε και πειραματικά. Επιπροσθέτως, μέρος του απομονωμένου φυτικού DNA χρησιμοποιήθηκε για χαρακτηρισμούς με χρήση φασματοφωτομετρίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) και δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS).

Ακολούθως, το βέλτιστο υδατικό διάλυμα 1% NaDES Bet-Gly 1:2, χρησιμοποιήθηκε σε μελέτη σταθερότητας ct-DNA. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αντίστοιχη διάλυση του ct-DNA σε διάλυμα Tris-HCl pH 7.4 και το αντίστοιχο φυσικό μίγμα του 1% NaDES Bet-Gly 1:2. Το NaDES έδειξε εξαιρετική συντηρητική ικανότητα η οποία μπορεί να συγκριθεί με αυτή του συμβατικού ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl. Επιπροσθέτως, διενεργήθηκε μελέτη αλληλεπίδρασης του ct-DNA με το 1% NaDES Bet-Gly 1:2 και τα αποτελέσματα έδειξαν την σταθεροποιητική δράση που προσφέρει και ενισχύει την καλή συντηρητική ικανότητα που προσφέρει (ερυθρή μετατόπιση και  $K_{b,NaDES} = 1.85 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ). Μελέτη αλληλεπίδρασης πραγματοποιήθηκε και με το ct-DNA και το ασκορβικό οξύ συγκριτικά για την περίπτωση διάλυσης σε 1% NaDES Bet-Gly 1:2 ( $K_{b,Ascorbic,NaDES} = 3.23 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) και την περίπτωση διάλυσης σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH 7.4 ( $K_{b,Ascorbic,Tris} = 3.09 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ). Τα αποτελέσματα ήταν συγκρίσιμα και έτσι το NaDES μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε παρόμοιες μελέτες.

**Επιστημονικό πεδίο:** Πράσινη Χημεία, Βιοτεχνολογία

**Λέξεις-κλειδιά:** Απομόνωση DNA, φυτικά κύτταρα, φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, σταθερότητα DNA, αλληλεπίδραση ct-DNA



## Abstract

---

DNA, from the moment of its discovery until today, is a research hub for many sciences. Being the cornerstone in the understanding of all living organisms, especially humans, its purity and optimal preservation are of paramount importance. The absorption of DNA in the visible-UV spectrum, and specifically the ratio of absorption at 260 nm to that at 280 nm, is indicative of the identity and stability of the macromolecule (presence of impurities, degradation).

A peculiar property of DNA is its interaction with various compounds. The action of each compound can be destabilizing or stabilizing with direct effects on the stability and maintenance of the genetic material.

In the present work, the development of a green process for the extraction of DNA from plant cells (*Musa Acuminata*) and its optimization in terms of the most important parameters are investigated. At the same time, the effect of natural deep eutectic solvents (NaDESs) on the stability of isolated DNA is studied. Best results are applied to ct-DNA and interaction studies.

Initially, various NaDESs were investigated for their ability to solubilize DNA and NaDES Bet-Gly 1:2 was found to be suitable as it has the appropriate characteristics (pH, polarity). Then, in the DNA isolation process, an experimental design was carried out to study the effect of 3 parameters on 3 responses (Box Behnken 3x3). Specifically, the salt concentration (M) in the cell lysis solution, the ethanol concentration (% v/v) in the DNA extraction solution and finally the concentration of NaDES Bet-Gly 1:2 (% v/v) were studied as independent variables. In the storage solution of the isolated DNA. The dependent variables monitored were the amount of DNA isolated (mg), its purity ( $A_{260}/A_{280}$ ) and its stability (d). Optimization of the model showed that the appropriate values of the variables for maximum responses are:  $[NaCl] = 0.51$  M, EtOH = 70 % v/v, NaDES Bet-Gly: 1 % v/v. This model was subsequently confirmed by conducting appropriate experiments. Additionally, part of the isolated plant DNA was used for FT-IR and DLS measurements.

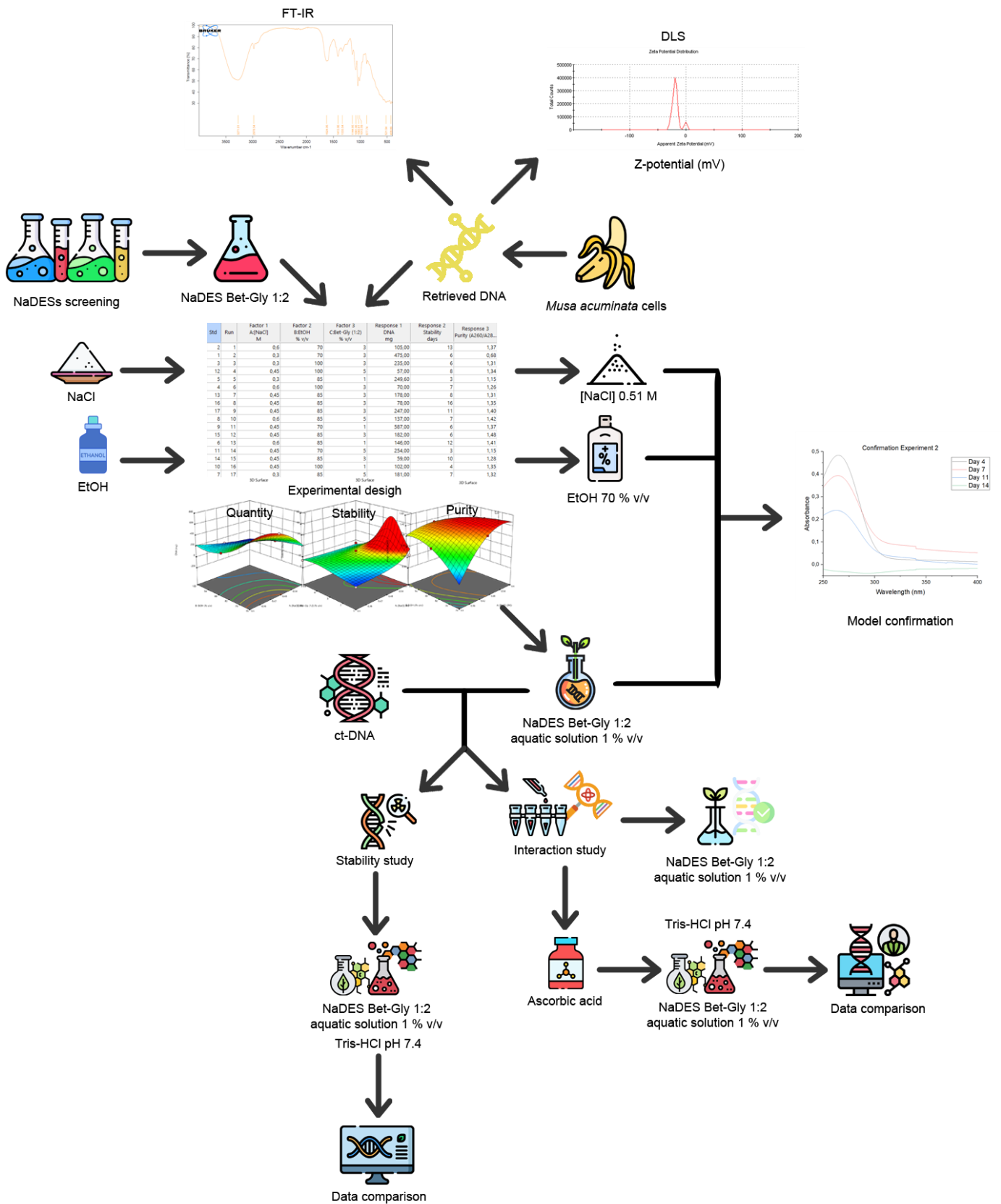
Next, the optimal 1% NaDES Bet-Gly 1:2 aqueous solution was used in a ct-DNA stability study. The results were compared with corresponding dissolution of ct-DNA in Tris-HCl solution pH 7.4 and the corresponding natural mixture of 1% NaDES Bet-Gly 1:2. NaDES showed excellent preservative ability which can be compared with that of conventional Tris-HCl buffer. In addition, an interaction study of ct-DNA with 1% NaDES Bet-Gly 1:2 was carried out and the results showed the stabilizing effect it offers and enhances the good preservative ability it offers (red shift and  $K_{b,NaDES} = 1.85 \cdot 10^3 M^{-1}$ ). An interaction study was also carried out with ct-DNA and ascorbic acid comparing the case of dissolution in 1% NaDES Bet-Gly 1:2 ( $K_{b,Ascorbic,NaDES} = 3.23 \cdot 10^3 M^{-1}$ ) and the case of dissolution in buffer solution Tris-HCl pH 7.4 ( $K_{b,Ascorbic,Tris} = 3.09 \cdot 10^3 M^{-1}$ ). The results were comparable and thus NaDES can also be used in similar studies.

**Scientific field:** Green Chemistry, Biotechnology

**Keywords:** DNA, plant cells, *Musa*, isolation, natural deep eutectic solvents, stabilization, maintenance, ctDNA interaction



# Graphical Abstract



## Πίνακας περιεχομένων

---

Ευρετήριο εικόνων.....	1
Ευρετήριο διαγραμμάτων .....	2
Ευρετήριο πινάκων .....	5
Ευρετήριο σχημάτων .....	7
Συνομογραφίες .....	8
Αγγλικές ορολογίες .....	9
1. Θεωρητικό Μέρος .....	10
1.1. DNA.....	10
1.1.1. Ανακάλυψη.....	10
1.1.2. Φορέας γενετικής πληροφορίας .....	12
1.1.3. Μελέτη DNA & εφαρμογές.....	13
1.1.3.1. Ιατρική & φαρμακευτική .....	13
1.1.3.2. Εγκληματολογία .....	15
1.1.3.3. Γεωργία & Κτηνοτροφία .....	15
1.1.4. Απομόνωση .....	17
1.1.4.1. Αίμα .....	17
1.1.4.2. Σάλιο .....	18
1.1.4.3. Φυτικά κύτταρα .....	18
1.1.5. Καθαρότητα.....	20
1.1.5.1. Φασματοφωτομετρία UV-Vis.....	20
1.1.6. Αλληλεπίδραση.....	21
1.1.6.1. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.....	22
1.1.6.2. Δέσμευση στην κύρια ή δευτερεύουσα αύλακα .....	22
1.1.6.3. Παρεμβολή.....	23
1.2. Πράσινη χημεία .....	25
1.2.1. Αρχές της Πράσινης Χημείας .....	25



1.2.2.	Πράσινοι διαλύτες .....	28
1.2.2.1.	Νερό.....	29
1.2.2.2.	Ιοντικά υγρά.....	30
1.2.2.3.	Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες.....	31
1.2.2.4.	Φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες.....	32
1.2.3.	Παρασκευή .....	33
1.2.4.	Ιδιότητες .....	34
2.	Πειραματικό Μέρος .....	36
2.1.	Σκοπός.....	36
2.2.	Όργανα και αντιδραστήρια.....	36
2.3.	Μέθοδοι.....	37
2.3.1.	Χαρακτηρισμός με φασματοφωτομετρία UV-Vis.....	37
2.3.1.1.	Πειραματική διαδικασία.....	38
2.3.2.	Χαρακτηρισμός με φασματοφωτομετρία FT-IR .....	38
2.3.3.	Δυναμική σκέδαση φωτός.....	38
2.3.3.1.	Πειραματική διαδικασία.....	39
2.3.4.	Παρασκευή NaDES και διαλυμάτων .....	39
2.3.4.1.	Πειραματική διαδικασία.....	40
2.3.4.2.	Μέτρηση pH.....	40
2.3.4.3.	Μέτρηση πολικότητας.....	40
2.3.4.4.	Παρασκευή φυσικού μίγματος.....	41
2.3.5.	Απομόνωση και συντήρηση DNA από φυτικά κύτταρα.....	41
2.3.5.1.	Πειραματική διαδικασία.....	41
2.3.5.2.	Πειραματικός σχεδιασμός .....	43
2.3.6.	Συντήρηση ct-DNA .....	44
2.3.7.	Μελέτη αλληλεπίδρασης .....	44
2.3.7.1.	Αλληλεπίδραση με υδατικό διάλυμα NaDES Bet-Gly 1:2.....	44
2.3.7.2.	Αλληλεπίδραση με ασκορβικό οξύ .....	45

3.	Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	46
3.1.	Διαλυτική ικανότητα NaDESs .....	46
3.2.	Απομόνωση και συντήρηση φυτικού DNA .....	48
3.2.1.	Ποσότητα DNA.....	49
3.2.2.	Σταθερότητα DNA .....	57
3.2.3.	Καθαρότητα DNA .....	63
3.2.4.	Βελτιστοποίηση απομόνωσης και συντήρησης DNA.....	71
3.2.5.	Επιβεβαίωση μοντέλου .....	72
3.3.	Συντήρηση ct-DNA σε NaDES .....	73
3.4.	Αλληλεπίδραση ct-DNA .....	75
3.4.1.	Διάλυμα NaDES Bet-Gly 1:2 περιεκτικότητας 1%.....	75
3.4.2.	Διάλυμα Ασκορβικού Οξέος .....	76
3.5.	Φάσμα FT-IR απομονωμένου DNA.....	78
3.6.	Μέτρηση DLS απομονωμένου DNA.....	79
4.	Συμπεράσματα.....	80
5.	Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	82
6.	Συμμετοχή σε διεθνή συνέδρια .....	83
	Βιβλιογραφία.....	84
	Παράρτημα I.....	88
	Παράρτημα II .....	98

## Ευρετήριο εικόνων

---

Εικόνα 1. Πρώτη απομόνωση DNA από τον F. Miescher (σπέρμα σολομού).....	10
Εικόνα 2. Το Πράσινο Δέντρο (Green Chemistree).....	27
Εικόνα 3. Ανάδυση DNA με χρήση διαλύματος EtOH.....	42
Εικόνα 4. Απομονωμένο DNA.....	42
Εικόνα 5. Υπολογιστική μελέτη αλληλεπίδρασης γλυκερόλης-DNA .....	47

## Ευρετήριο διαγραμμάτων

---

Διάγραμμα 1. Διάγραμμα φάσεων ενός μείγματος δύο συστατικών. ....	31
Διάγραμμα 2. Συσχέτιση συγκέντρωση NaCl με την παραλαμβανόμενη ποσότητα DNA.....	49
Διάγραμμα 3. Συσχέτιση περιεκτικότητας EtOH με την παραλαμβανόμενη ποσότητα DNA	50
Διάγραμμα 4. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES Bet-Gly 1:2 με την παραλαμβανόμενη ποσότητα DNA. ....	50
Διάγραμμα 5. Πραγματικές και προβλεπόμενες τιμές της ανακτώμενης ποσότητας DNA από το μοντέλο .....	52
Διάγραμμα 6. Επίδραση ανεξάρτητων μεταβλητών στην ποσότητα του DNA.....	53
Διάγραμμα 7. Γράφημα αλληλεπίδρασης άλατος - αιθανόλης για την μεταβλητή της ποσότητας του DNA. ....	54
Διάγραμμα 8. Συσχέτιση ανακτώμενης ποσότητας DNA και περιεκτικότητας NaCl, EtOH....	55
Διάγραμμα 9. Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης NaCl, EtOH και NaDES Bet-Gly 1:2 με την ανακτώμενη ποσότητα DNA.....	56
Διάγραμμα 10. Συσχέτιση συγκέντρωση NaCl με την σταθερότητα του DNA.....	57
Διάγραμμα 11. Συσχέτιση περιεκτικότητας EtOH με την σταθερότητα του DNA.....	58
Διάγραμμα 12. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES Bet-Gly 1:2 με την σταθερότητα του DNA. ....	58
Διάγραμμα 13. Πραγματικές και προβλεπόμενες τιμές της σταθερότητας του DNA από το μοντέλο .....	60
Διάγραμμα 14. Επίδραση ανεξάρτητων μεταβλητών στην σταθερότητα του DNA.....	60
Διάγραμμα 15. Συσχέτιση σταθερότητας DNA και περιεκτικότητας NaCl, NaDES Bet-Gly 1:2 .....	61
Διάγραμμα 16. Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης NaCl, EtOH και NaDES Bet-Gly 1:2 με την σταθερότητα του DNA .....	62
Διάγραμμα 17. Συσχέτιση συγκέντρωση NaCl με την καθαρότητα του DNA.....	63
Διάγραμμα 18. Συσχέτιση περιεκτικότητας EtOH με την καθαρότητα του DNA.....	64
Διάγραμμα 19. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES Bet-Gly 1:2 με την καθαρότητα του DNA. ....	64

Διάγραμμα 20. Πραγματικές και προβλεπόμενες τιμές της καθαρότητας του DNA από το μοντέλο .....	66
Διάγραμμα 21. Επίδραση ανεξάρτητων μεταβλητών στην καθαρότητα του DNA.....	66
Διάγραμμα 22. Γράφημα αλληλεπίδρασης αιθανόλης - NaDES για την μεταβλητή της καθαρότητας του DNA .....	67
Διάγραμμα 23. Γράφημα αλληλεπίδρασης αιθανόλης - άλατος για την μεταβλητή της καθαρότητας του DNA .....	68
Διάγραμμα 24. Γράφημα αλληλεπίδρασης άλατος - NaDES για την μεταβλητή της καθαρότητας του DNA .....	68
Διάγραμμα 25. Συσχέτιση καθαρότητας DNA και περιεκτικότητας NaCl, NaDES Bet-Gly 1:2	69
Διάγραμμα 26. Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης NaCl, EtOH και NaDES Bet-Gly 1:2 με την καθαρότητα του DNA.....	70
Διάγραμμα 27. Φάσμα UV-Vis αλληλεπίδρασης υδατικού διαλύματος NaDES Bet-Gly 1:2 συγκέντρωσης 1% με διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA (0-300μM). .....	75
Διάγραμμα 28. Φάσμα UV-Vis αλληλεπίδρασης ασκορβικού οξέος 10mM με διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA (0-300μM) διαλυμένο σε υδατικό διάλυμα NaDES Bet-Gly 1:2 συγκέντρωσης 1%. .....	76
Διάγραμμα 29. Φάσμα UV-Vis αλληλεπίδρασης ασκορβικού οξέος 10mM με διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA διαλυμένο σε διάλυμα Tris-HCl (0-300μM). .....	77
Διάγραμμα 30. Φάσμα FT-IR απομονωμένου DNA .....	78
Διάγραμμα 31. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 1 του πειραματικού σχεδιασμού. ....	88
Διάγραμμα 32. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 2 του πειραματικού σχεδιασμού. ....	89
Διάγραμμα 33. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 3 του πειραματικού σχεδιασμού. ....	89
Διάγραμμα 34. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 4 του πειραματικού σχεδιασμού. ....	90
Διάγραμμα 35. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 5 του πειραματικού σχεδιασμού. ....	90
Διάγραμμα 36. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 6 του πειραματικού σχεδιασμού. ....	91
Διάγραμμα 37. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 7 του πειραματικού σχεδιασμού. ....	91
Διάγραμμα 38. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 8 του πειραματικού σχεδιασμού. ....	92
Διάγραμμα 39. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 9 του πειραματικού σχεδιασμού. ....	92
Διάγραμμα 40. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 10 του πειραματικού σχεδιασμού. ....	93

Διάγραμμα 41. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 11 του πειραματικού σχεδιασμού. ....	93
Διάγραμμα 42. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 12 του πειραματικού σχεδιασμού. ....	94
Διάγραμμα 43. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 13 του πειραματικού σχεδιασμού. ....	94
Διάγραμμα 44. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 14 του πειραματικού σχεδιασμού. ....	95
Διάγραμμα 45. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 15 του πειραματικού σχεδιασμού. ....	95
Διάγραμμα 46. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 16 του πειραματικού σχεδιασμού. ....	96
Διάγραμμα 47. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 17 του πειραματικού σχεδιασμού. ....	96
Διάγραμμα 48. Φάσματα UV-Vis πειράματος 1 επιβεβαίωσης του πειραματικού σχεδιασμού.....	97
Διάγραμμα 49. Φάσματα UV-Vis πειράματος 2 επιβεβαίωσης του πειραματικού σχεδιασμού.....	97
Διάγραμμα 50. Φάσματα UV-Vis συντήρησης ct-DNA σε υδατικό διάλυμα 1 % NaDES Bet-Gly 1:2 (1). ....	98
Διάγραμμα 51. Φάσματα UV-Vis συντήρησης ct-DNA σε υδατικό διάλυμα 1 % NaDES Bet-Gly 1:2 (2). ....	99
Διάγραμμα 52. Φάσματα UV-Vis συντήρησης ct-DNA σε υδατικό διάλυμα 1 % NaDES Bet-Gly 1:2 (3). ....	99
Διάγραμμα 53. Φάσματα UV-Vis συντήρησης ct-DNA σε φυσικό μίγμα 1 % NaDES Bet-Gly 1:2 (1). ....	100
Διάγραμμα 54. Φάσματα UV-Vis συντήρησης ct-DNA σε φυσικό μίγμα 1 % NaDES Bet-Gly 1:2 (2). ....	100
Διάγραμμα 55. Φάσματα UV-Vis συντήρησης ct-DNA σε φυσικό μίγμα 1 % NaDES Bet-Gly 1:2 (3). ....	101
Διάγραμμα 56. Φάσματα UV-Vis συντήρησης ct-DNA σε διάλυμα Tris-HCl (1). ....	101
Διάγραμμα 57. Φάσματα UV-Vis συντήρησης ct-DNA σε διάλυμα Tris-HCl (2). ....	102
Διάγραμμα 58. Φάσματα UV-Vis συντήρησης ct-DNA σε διάλυμα Tris-HCl (3). ....	102
Διάγραμμα 59. Φάσματα UV-Vis συντήρησης ct-DNA σε υπερκάρθαρο νερό.....	103

## Ευρετήριο πινάκων

---

Πίνακας 1. Συντομογραφίες .....	8
Πίνακας 2. Αγγλικές Ορολογίες .....	9
Πίνακας 3. Όργανα και συσκευές .....	36
Πίνακας 4. Αντιδραστήρια.....	37
Πίνακας 5. NaDESs που παρασκευάστηκαν .....	39
Πίνακας 6. Βασικές πληροφορίες των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή NaDESs.....	39
Πίνακας 7. Παράμετροι μελέτης και αποκρίσεις προς βελτίωση .....	43
Πίνακας 8. Οριοθέτηση παραμέτρων πειραματικού σχεδιασμού .....	43
Πίνακας 9. Παράγοντες μελέτης απομόνωσης και συντήρησης DNA.....	43
Πίνακας 10. Συγκεντρώσεις ct-DNA διαλυμάτων αλληλεπίδρασης.....	45
Πίνακας 11. pH παρασκευασμένων NaDESs .....	46
Πίνακας 12. pH NaDES Bet-Gly 1:2 και διαλυμάτων.....	47
Πίνακας 13. Πολικότητα NaDES Bet-Gly 1:2 και διαλυμάτων.....	47
Πίνακας 14. Παράγοντες μελέτης απομόνωσης και συντήρησης φυτικού DNA και αντίστοιχες αποκρίσεις .....	48
Πίνακας 15. Τιμές παραμέτρων μοντέλου πρόβλεψης ανακτώμενης ποσότητας DNA.....	51
Πίνακας 16. Τιμές παραμέτρων μοντέλου πρόβλεψης σταθερότητας του DNA .....	59
Πίνακας 17. Τιμές παραμέτρων μοντέλου πρόβλεψης καθαρότητας του DNA .....	65
Πίνακας 18. Παράμετροι για βέλτιστη απομόνωση και συντήρηση DNA .....	71
Πίνακας 19. Ποσότητα, σταθερότητα και καθαρότητα DNA για τις βέλτιστες παραμέτρους	71
Πίνακας 20. Σύγκριση πειραματικών και προβλεπόμενων αποκρίσεων βέλτιστου σεναρίου .....	72
Πίνακας 21. Επιβεβαίωση εγκυρότητας αποκρίσεων .....	72
Πίνακας 22. Λόγοι απορρόφησης διαλυμάτων ct-DNA σε υδατικό διάλυμα 1 % NaDES Bet-Gly 1:2.....	73
Πίνακας 23. Λόγοι απορρόφησης διαλυμάτων ct-DNA σε φυσικό μίγμα 1 % Bet-Gly 1:2. ...	73

Πίνακας 24. Λόγοι απορρόφησης διαλυμάτων ct-DNA σε Tris-HCl. ....	73
Πίνακας 25. Καθαρότητα ct-DNA σε NaDES, φυσικό μίγμα και διάλυμα Tris .....	74
Πίνακας 26. Καθαρότητα ct-DNA σε νερό.....	74
Πίνακας 27. Δεδομένα ανάλυσης αλληλεπίδρασης 1 % NaDES Bet-Gly 1:2 με το ct-DNA ....	75
Πίνακας 28. Δεδομένα ανάλυσης αλληλεπίδρασης ασκορβικού οξέος με το ct-DNA.....	76
Πίνακας 29. Μέγεθος και Z-Δυναμικό για το απομονωμένο DNA. ....	79
Πίνακας 30. Μέγεθος και Z-Δυναμικό για το ct-DNA. ....	79
Πίνακας 31. Βέλτιστες αναλογίες και αποκρίσεις πειραματικού σχεδιασμού .....	80
Πίνακας 32. Μέγεθος και Z-Δυναμικό απομονωμένου και ct-DNA. ....	80



## Ευρετήριο σχημάτων

---

Σχήμα 1. Η χημική δομή του νουκλεοτιδίου. ....	11
Σχήμα 2. Σύνδεση των δύο κλώνων της έλικας του DNA.....	12
Σχήμα 3. Το γονίδιο στο κύτταρο.....	13
Σχήμα 4. Φαρμακογονιδιωματική και καρκίνος.....	14
Σχήμα 5. Εφαρμογή φαρμακογονιδιωματικής σε κλινικές περιπτώσεις.....	14
Σχήμα 6. CRISPR-Cas9: γονιδιακή θεραπεία. ....	15
Σχήμα 7. Επισκόπηση δημιουργίας διαγονιδιακών καλλιιεργειών.....	16
Σχήμα 8. Επισκόπηση διαδικασίας δημιουργίας γενετικά βελτιωμένων απογόνων. ....	16
Σχήμα 9. Διαδικασία απομόνωσης DNA από αίμα.....	17
Σχήμα 10. Διαδικασία απομόνωσης DNA από φυτικά κύτταρα με τη μέθοδο CTAB.....	19
Σχήμα 11. Απορροφήσεις UV-Vis των ενώσεων ενδιαφέροντος. ....	21
Σχήμα 12. Αύλακες του DNA και δότες/δέκτες δεσμών. ....	22
Σχήμα 13. Κύρια και δευτερεύουσα αύλακα του DNA.....	23
Σχήμα 14. 3D απεικόνιση παρεμβολών .....	24
Σχήμα 15. Σχηματική αναπαράσταση παρεμβολέα με σπείρωμα .....	24
Σχήμα 16. Χαρακτηριστικά του ιδανικού διαλύτη.....	28
Σχήμα 17. Οργανικοί & πράσινοι διαλύτες. ....	28
Σχήμα 18. Σύνοψη εναλλακτικών πράσινων διαλυτών. ....	29
Σχήμα 19. Συνήθη ιόντα των ILs. ....	30
Σχήμα 20. Φυσικά συστατικά για NaDESs.....	33
Σχήμα 21. Βέλτιστες τιμές ανεξάρτητων μεταβλητών απομόνωσης και συντήρησης DNA και αναμενόμενες αποκρίσεις.....	71

## Συντομογραφίες

Παρατίθεται πίνακας με τις συντομογραφίες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη συγγραφή.

Πίνακας 1. Συντομογραφίες

Συντομογραφίες	
<b>ABS</b>	Υδατικά διφασικά συστήματα
<b>Bet-Gly</b>	Βεταΐνη-Γλυκερόλη
<b>C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>O</b>	Ισοαμλική αλκοόλη
<b>CFC</b>	Χλωροφθοράνθρακες
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Χλωροφόρμιο
<b>ct-DNA</b>	Calf Thymus DNA
<b>CTAB</b>	Βρωμιούχο κετυλοτριμεθυλοαμμώνιο
<b>DESS</b>	Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες
<b>DNA</b>	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
<b>EDTA</b>	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
<b>EtOH</b>	Αιθανόλη
<b>FT-IR</b>	Φασματοσκοπία υπερύθρων μετασχηματισμού Fourier
<b>HBA</b>	Δέκτης δεσμού υδρογόνου
<b>HBD</b>	Δότης δεσμού υδρογόνου
<b>ILs</b>	Ιοντικά υγρά
<b>MeOH</b>	Μεθανόλη
<b>NaCl</b>	Χλωριούχο νάτριο
<b>NaDESS</b>	Φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες
<b>NaOAc</b>	Οξικό νάτριο
<b>NMR</b>	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
<b>PCR</b>	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
<b>PhOH</b>	Φαινόλη
<b>PVP</b>	Πολυβινυλοπυρρολιδόνη ή Πολυβιδόνη ή Ποβιδόνη
<b>RNA</b>	Ριβονουκλεϊκό οξύ
<b>SDS</b>	Θειικό δωδεκύλιο νάτριο ή Λαουροθειικό νάτριο
<b>Tris-HCl</b>	Τρομεθαμίνη-Υδροχλωρικό οξύ
<b>UV-Vis</b>	Φασματοφωτομετρία ορατού-υπεριώδους
<b>VOC</b>	Πτητικές οργανικές ενώσεις

## Αγγλικές ορολογίες

---

Παρατίθεται πίνακας με τις αγγλικές ορολογίες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη συγγραφή.

Πίνακας 2. Αγγλικές Ορολογίες

### Αγγλικός όρος

<b>Adeq Precision</b>	Επαρκής ακρίβεια
<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	Προσαρμοσμένο R <sup>2</sup>
<b>Factor</b>	Παράμετρος (ανεξάρτητη μεταβλητή)
<b>F-value</b>	Τιμή κατανομής F
<b>Lack of Fit</b>	Έλλειψη προσαρμογής
<b>PI High</b>	Άνω όριο διαστήματος πρόβλεψης
<b>PI Low</b>	Κάτω όριο διαστήματος πρόβλεψης
<b>Predicted Mean</b>	Προβλεπόμενος μέσος όρος
<b>Predicted Median</b>	Προβλεπόμενος διάμεσος
<b>Predicted R<sup>2</sup></b>	Προβλεπόμενο R <sup>2</sup>
<b>p-value</b>	Τιμή σημαντικότητας
<b>Response</b>	Απόκριση (εξαρτημένη μεταβλητή)
<b>SE Dev</b>	Τυπικό σφάλμα
<b>Std Dev</b>	Τυπική απόκλιση

# 1. Θεωρητικό Μέρος

---

## 1.1. DNA

---

### 1.1.1. Ανακάλυψη

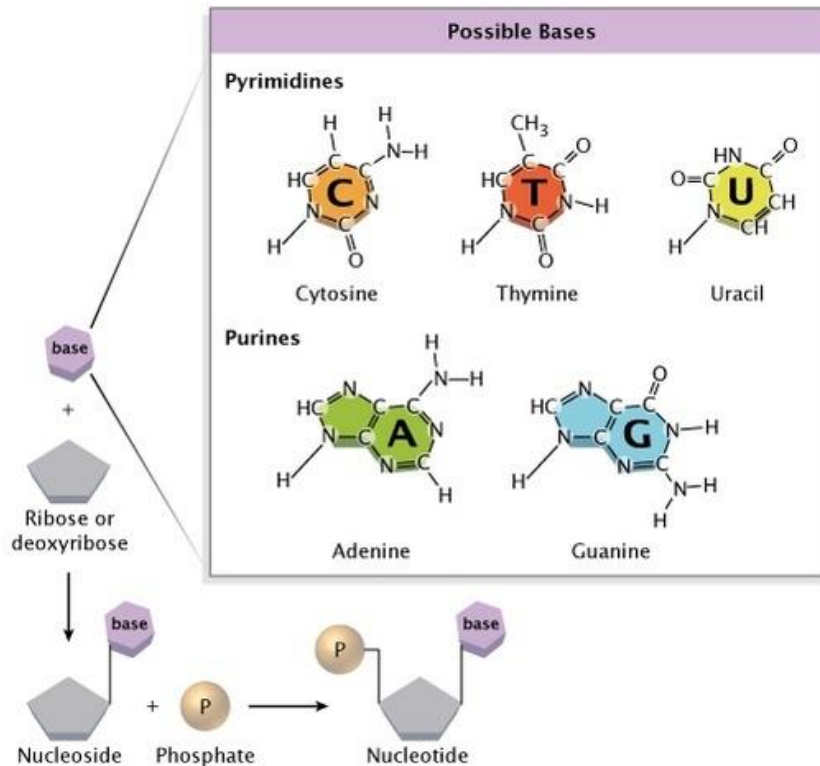
---

Το 1869 ο Σουηδός φυσιολόγος χημικός F.Miescher ανακαλύπτει για πρώτη φορά τα μετέπειτα ονομαζόμενα νουκλεϊκά οξέα στον πυρήνα των λευκών αιμοσφαιρίων. Στόχος του ήταν η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός πρωτεϊνών, όμως λόγω του μεγάλου ποσοστού φωσφόρου και της αντίστασης στην πρωτεόλυση της ουσίας που απομόνωσε κατάλαβε ότι είχε ανακαλύψει κάτι καινούριο. Η συνεισφορά του δεν αναγνωρίστηκε παρά πολλά χρόνια αργότερα καθώς ήταν ο επιστήμονας που ανακάλυψε το ένα από τα τέσσερα σημαντικά συστατικά του κυττάρου, ανάμεσα στις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τους πολυσακχαρίτες. (Pray, 2008)



*Εικόνα 1. Πρώτη απομόνωση DNA από τον F. Miescher (σπέρμα σολομού).  
Ιδιοκτησία του Πανεπιστημίου του Τύμπιγκεν, Γερμανία. (DNA | Summary, n.d.)*

Ακολούθως, ο Ρώσος βιοχημικός P.Levene κάνει πολυάριθμες ανακαλύψεις. Ανάμεσά τους είναι η ακολουθία των τριών βασικών συστατικών ενός νουκλεοτιδίου, δηλαδή φωσφορική ομάδα-σάκχαρο-βάση, η ανακάλυψη των δύο σακχάρων, ήτοι της ριβόζης για το RNA και της δεοξυριβόζης για το DNA, καθώς και τον τρόπο που τα μόρια του RNA και του DNA είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους. Ο Levene πρότεινε το πολυνουκλεοτιδικό μοντέλο, σύμφωνα με το οποίο το νουκλεϊκό οξύ συντίθενται από μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων, ενώ το κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από μία από τις τέσσερις πιθανές αζωτούχες βάσεις, ένα σάκχαρο και μια φωσφορική ομάδα. Η αρχική του πρόταση χρονολογείται το 1919. (Pray, 2008)

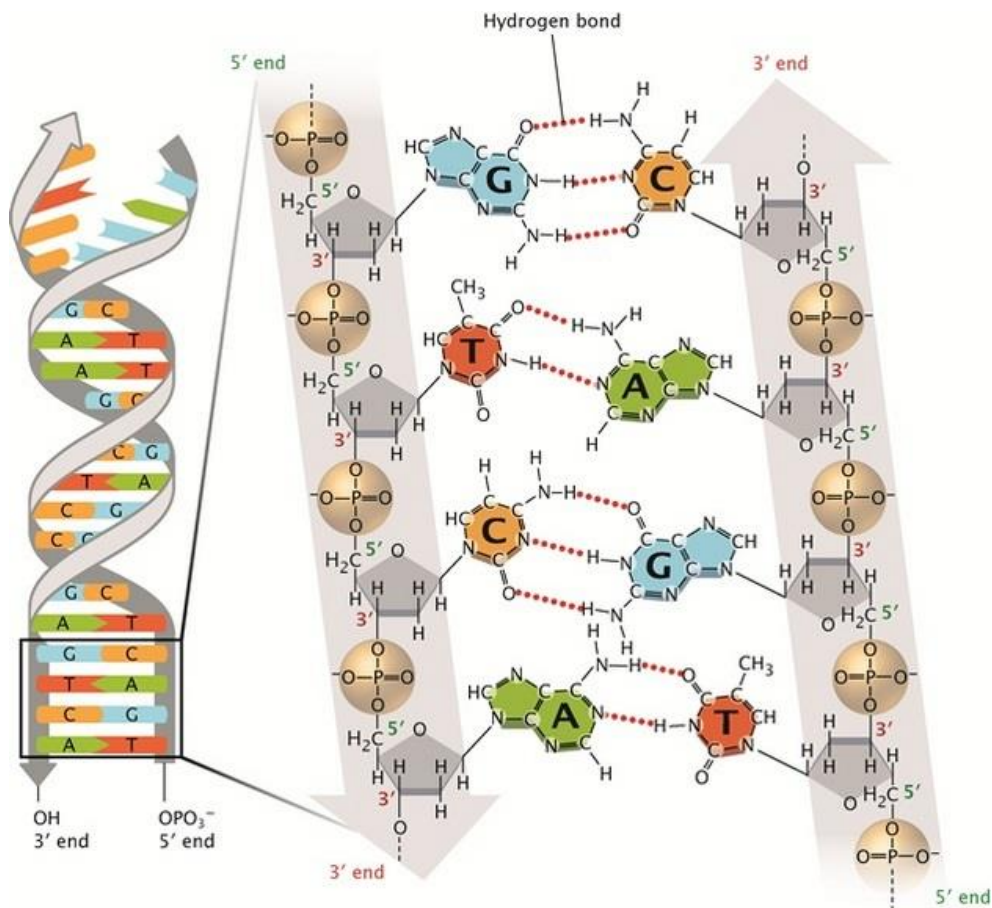


Σχήμα 1. Η χημική δομή του νουκλεοτιδίου.  
(Pray, 2008)

Στην συνέχεια, ο E.Chargaff το 1950 διατυπώνει τον κανόνα που πήρε το όνομά του και λέει ότι ο συνολικός αριθμός των πουρινών (αδενίνη, γουανίνη) σε ένα μόριο DNA είναι ίσος με τον συνολικό αριθμό των πυριμιδινών (κυτοσίνη, θυμίνη). Η παρατήρηση αυτή αποτέλεσε κομβικό σημείο που οδήγησε στην μετέπειτα εξήγηση ότι η αδενίνη είναι πάντα συνδεδεμένη με τη θυμίνη και η γουανίνη με την κυτοσίνη. (Pray, 2008)

Χάρis τις εξελίξεις στην μοντελοποίηση του Αμερικανού βιοχημικού L.Pauling, τον κανόνα του Chargaff και τις σημαντικές κρυσταλλογραφίες με ακτίνες X των Άγγλων ερευνητών R.Franklin και M.Wilkins, το 1953 οι J.Watson και F.Crick αποδίδουν την περίφημη μορφή της διπλής έλικας στο μόριο του DNA. Μέχρι και σήμερα, τέσσερα βασικά χαρακτηριστικά παραμένουν ίδια από τη θεωρία τους:

- Το DNA είναι ένα δίκλωνο μόριο με μορφή έλικας και οι δύο κλώνοι του συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Η αδενίνη (A) είναι πάντα συνδεδεμένη με τη θυμίνη (T), και η γουανίνη (G) πάντα με την κυτοσίνη (C).
- Οι περισσότερες έλικες του DNA είναι δεξιόστροφες. Μόνο ένας τύπος DNA (Z-DNA) είναι αριστερόστροφος.
- Η διπλή έλικα του DNA είναι αντιπαράλληλη, δηλαδή το 5' άκρο του ενός κλώνου συνδέεται με το 3' άκρο του συμπληρωματικού και το αντίστροφο.
- Πέρα από τις βάσεις του DNA που συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου, και οι φωσφορικές ομάδες στο εξωτερικό του μορίου μπορούν να συνάψουν τέτοιους δεσμούς. Αυτό είναι ένα ιδιαίτερα χρήσιμο χαρακτηριστικό καθώς κάνει προσιτά τα μόρια του DNA σε άλλα όπως τις πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την αντιγραφή και την έκφραση του DNA. (Pray, 2008)

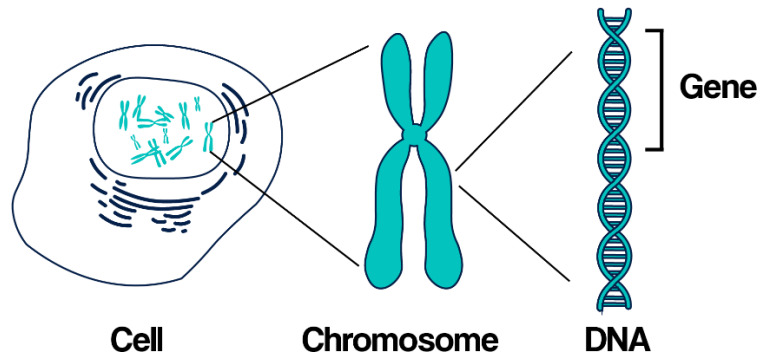


Σχήμα 2. Σύνδεση των δύο κλώνων της έλικας του DNA.  
(Pray, 2008)

### 1.1.2. Φορέας γενετικής πληροφορίας

Το DNA, ή δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ, είναι ο φορέας της γενετικής πληροφορίας από τη μία γενιά κυττάρων στην επόμενη για όλους τους ζώντες οργανισμούς. Σε δύο μεγάλου μήκους πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες κωδικοποιούνται πληροφορίες μέσα στα γονίδια. Η αποθήκευση του υπέρποκου πλήθους πληροφοριών που χρειάζεται ένας οργανισμός για να δημιουργηθεί και να επιβιώσει είναι δυνατή χάρις την διαφορετική αλληλούχηση των τεσσάρων διαφορετικών βάσεων. (Alberts et al., 2014)

Τα γονίδια είναι οι λειτουργικές μονάδες της κληρονομικότητας και μεταφέρονται συνολικά από τα χρωμοσώματα. Ο ρόλος των γονιδίων είναι να παρέχουν τις απαραίτητες πληροφορίες για να παραχθεί ένα μόριο RNA ή μια πρωτεΐνη. Με τη σειρά τους αυτά είναι υπεύθυνα για δομικές και καταλυτικές λειτουργίες στο κύτταρο ενώ μπορεί να συμμετέχουν και στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων. (Alberts et al., 2014)



Σχήμα 3. Το γονίδιο στο κύτταρο.

Στην πλειοψηφία των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων, εκτός από τα γονίδια, στο DNA εντοπίζονται και παρεμβολές από περιοχές που δεν έχει προσδιοριστεί η χρησιμότητά τους. Τα συγκεκριμένα τμήματα ονομάζονται junk DNA, δηλαδή άχρηστο DNA, όμως είναι πιθανόν να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξελικτική διαδικασία και στην ενεργότητα των γονιδίων. Η εικασία ότι τα κομμάτια αυτά εξυπηρετούν σημαντικές λειτουργίες ενισχύεται και από συγκριτικές μελέτες σε αλληλουχίσεις DNA συγγενικών ειδών, όπου τα παρεμβαλλόμενα κομμάτια DNA διατηρούν σημαντική ομοιότητα. (Alberts et al., 2014)

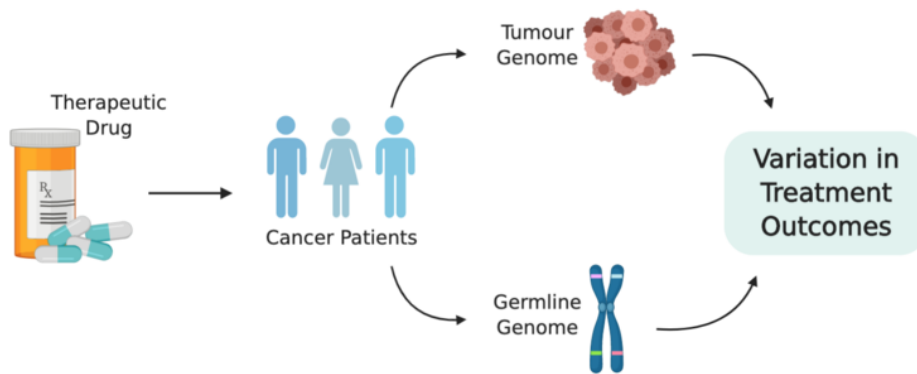
### 1.1.3. Μελέτη DNA & εφαρμογές

Η μελέτη του DNA αποτελεί τον πυρήνα της βιοτεχνολογίας και της φαρμακευτικής. Το γενετικό υλικό είναι καθοριστικός παράγοντας κατανόησης του τρόπου λειτουργίας του ανθρώπινου οργανισμού και της πορείας μιας ασθένειας. Με γνώση τη δομή και τη λειτουργία του DNA ερευνήθηκαν τα μονοπάτια νόσων, η γενετική προδιάθεση για συγκεκριμένες ασθένειες, η διάγνωση γενετικών ασθενειών και η δημιουργία νέων φαρμάκων, ενώ ταυτοποιήθηκαν και παθογόνα. Κομβικός είναι και ο ρόλος του στην εγκληματολογία για ταυτοποίηση εγκληματιών και αναγνώριση αγνοούντων. Πλέον, η γνώση του DNA χρησιμοποιείται και για τη βελτίωση καλλιεργειών και στην κτηνοτροφία. (DNA / Summary, n.d.)

#### 1.1.3.1. Ιατρική & φαρμακευτική

Η χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος οδήγησε στην σύνδεση των γενετικών ασθενειών με συγκεκριμένα γονίδια και νουκλεοτίδια. Με την κατανόηση των ασθενειών αυτών, και με τις νέες τεχνολογίες, προέκυψε ο νέος κλάδος της φαρμαγονιδιωματικής. Η φαρμακογονιδιωματική μελετά το πώς τα γονίδια ενός ατόμου επηρεάζουν την απόκριση σε φαρμακευτικές αγωγές. Η φιλοσοφία της προσωποποιημένης φαρμακευτικής κερδίζει ολοένα και περισσότερο έδαφος και χρησιμοποιείται ήδη για ασθένειες όπως διάφοροι τύποι καρκίνου και HIV, ενώ στόχος είναι και ο σχεδιασμός φαρμάκων για την εκάστοτε ομάδα ασθενών για καρδιαγγειακές ασθένειες, άσθμα, Alzheimer ακόμα και κατάθλιψη. Με τον τρόπο αυτό, ο κάθε ασθενής θα μπορεί να χορηγηθεί με το καταλληλότερο φάρμακο για αυτόν: πρόσληψη σωστής δοσολογίας φαρμακευτικής ουσίας χωρίς να διατρέχει υψηλό κίνδυνο. (DNA Sequencing | Summary, n.d.; Pharmacogenomics, n.d.)





Σχήμα 4. Φαρμακογονιδιωματική και καρκίνος.



Σχήμα 5. Εφαρμογή φαρμακογονιδιωματικής σε κλινικές περιπτώσεις.

(Buguliskis, 2015)

Φυσικά η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να λάβει και άλλες μορφές. Από τις σπουδαιότερες καινοτομίες είναι το εργαλείο γενετικής τροποποίησης CRISPR/Cas 9 το οποίο έλαβε και βραβείο Νόμπελ Χημείας το 2020. Στην Αμερική, έχει ήδη πραγματοποιηθεί θεραπεία με το συγκεκριμένο εργαλείο σε άτομα με δρεπανοκυτταρική αναιμία και β-θαλασσαιμία και τα αποτελέσματα δείχνουν πολύ ενθαρρυντικά και με συνέπεια σε διαφορετικά άτομα. (Frangoul et al., 2020; Stein, 2020)





Σχήμα 6. CRISPR-Cas9: γονιδιακή θεραπεία.

#### 1.1.3.2. Εγκληματολογία

Η χρήση του DNA για τη λύση εγκλημάτων αποτέλεσε ένα σημαντικό εργαλείο για το σύστημα δικαιοσύνης. Η χρήση του για την εξιχνίαση εγκλημάτων μπορεί να είναι μία από τις εξής δύο:

- Αν έχει αναγνωριστεί κάποιος ύποπτος, ένα δείγμα από το DNA του συγκρίνεται με στοιχεία από τη σκηνή του εγκλήματος. Το αποτέλεσμα μπορεί να καθορίσει αν αυτός ο ύποπτος διέπραξε τελικά το έγκλημα.
- Στην περίπτωση που δεν υπάρχει ακόμα κάποιος ύποπτος, βιολογικά δείγματα από τη σκηνή του εγκλήματος αναλύονται και συγκρίνονται με βάσεις δεδομένων DNA γνωστών εγκληματιών για να αναγνωριστεί ο δράστης.

Δείγμα DNA από ένα έγκλημα μπορεί να συγκριθεί και συνδεθεί και με άλλα εγκλήματα μέσα από αυτές τις βάσεις. Και στην περίπτωση κατ' εξακολούθηση εγκλημάτων, με την καταδίκη του εγκληματία αποτρέπονται και πιθανότατα επόμενες απόπειρες. Η τεχνολογία του DNA έχει αποτελέσει ακρογωνιαίο λίθο στην διασφάλιση ακρίβειας και δικαιοσύνης στο σύστημα ποινικού δικαίου. (*Using DNA to Solve Crimes*, 2017)

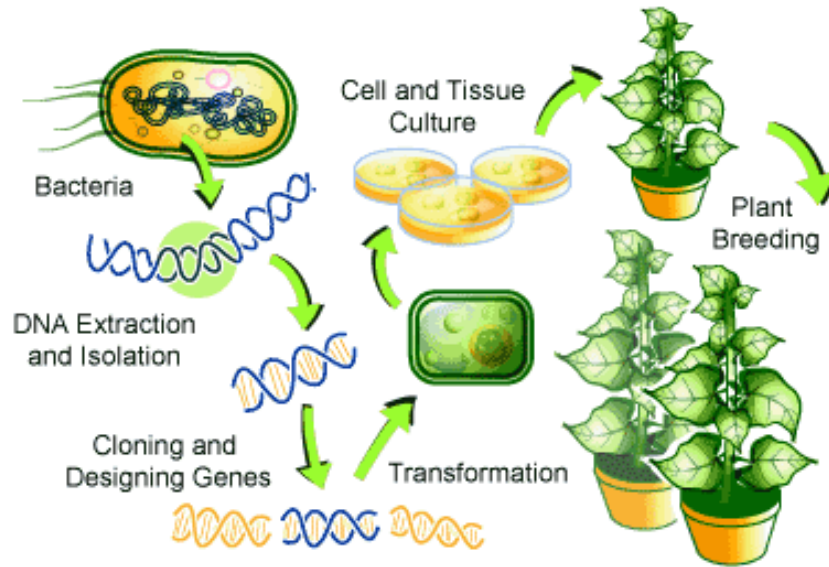
Στην αντίπερα όχθη, το DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την αθώωση. Συγκεκριμένα, κατάδικος μπορεί να αθωωθούν με την επανεξέταση, ή εξέταση νέων, στοιχείων DNA από τον τόπο του εγκλήματος τα οποία δεν είχαν αναλυθεί τη χρονική περίοδο της δίκης. (*Using DNA to Protect the Innocent*, 2017)

Τέλος, στην ιατροδικαστική έρευνα το DNA μπορεί να λειτουργήσει και ως εργαλείο αναγνώρισης αγνοούμενων ατόμων. Σε αυτήν την περίπτωση, σε συγκεκριμένες βάσεις δεδομένων, παρέχονται δεδομένα γενετικού υλικού από συγγενείς εξαφανισμένων ατόμων και δεδομένα μη αναγνωρισμένων πτωμάτων. Μέσα από σύγκριση ανάμεσα στα δύο σύνολα δεδομένων μπορεί να γίνει ταυτοποίηση. (*Using DNA to Identify Missing Persons*, 2017)

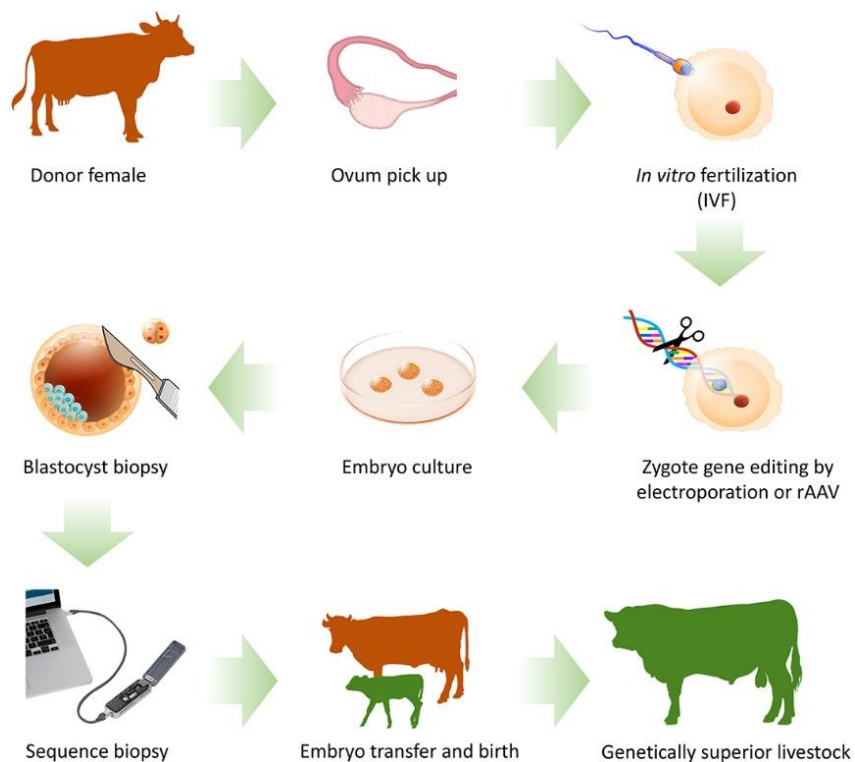
#### 1.1.3.3. Γεωργία & Κτηνοτροφία

Φυσικά δεν θα έπρεπε να παραλειφθεί η συνεισφορά στους τομείς της γεωργίας και της κτηνοτροφίας. Με τις τεχνικές ανασυνδυασμού του DNA και της επιλογής επιθυμητών γονιδίων, μπορεί να επιτευχθεί βελτιωμένος ιατρικός έλεγχος και εμβόλια για τα ζώα. Με γενετικές τροποποιήσεις είναι επίσης δυνατόν να προσδοθούν συγκεκριμένα

χαρακτηριστικά ή να αυξηθεί η παραγόμενη ποσότητα των αγαθών. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση των καλλιεργειών, όπου η βελτίωση στην αντοχή των καιρικών συνθηκών, αλλά και στη θρεπτική αξία, μέσα από την εφαρμογή ανασυνδυασμού του DNA ήδη αποφέρει καρπούς και αποτελεί σημαντική πρόοδο για την καταπολέμηση του υποσιτισμού σε υπανάπτυκτες χώρες. (Petters, 1986)



Σχήμα 7. Επισκόπηση δημιουργίας διαγονιδιακών καλλιεργειών.  
(Credits J.Wang)



Σχήμα 8. Επισκόπηση διαδικασίας δημιουργίας γενετικά βελτιωμένων απογόνων.  
(Qi et al., 2050)

#### 1.1.4. Απομόνωση

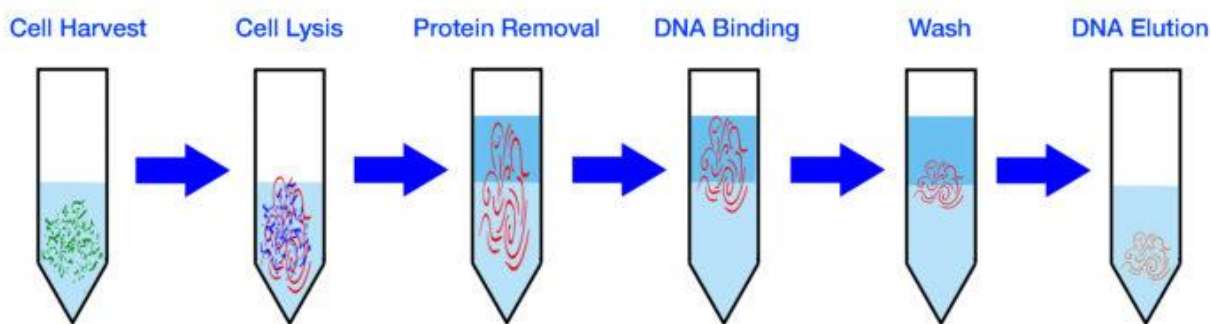
Για να γίνει εφικτή οποιαδήποτε από τις παραπάνω μελέτες και εφαρμογές, πρέπει πρώτα το DNA να απομονωθεί από το υπόλοιπο κυτταρικό περιβάλλον. Οι τρόποι απομόνωσης είναι πολυάριθμοι και μπορούν να πραγματοποιηθούν με διάφορα kit εργαλείων διαθέσιμα στο εμπόριο.

Για τις γενετικές μελέτες, ειδικά όταν αφορούν μεγάλη κλίμακα, η ποσότητα και η ποιότητα του DNA που διατίθεται είναι καίριας σημασίας. Όμως, τα δύο αυτά χαρακτηριστικά μπορούν να επηρεαστούν, όχι μόνο από την επιλεγμένη μέθοδο, αλλά και από την πηγή που επιλέγεται να απομονωθεί το DNA.

##### 1.1.4.1. Αίμα

Για την ανάλυση του αίματος απαιτείται αρχικά φυγοκέντριση. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται τρία στρώματα: το κατώτερο περιέχει τα ερυθρά αιμοσφαίρια (45 %), το ανώτερο το πλάσμα του αίματος (55 %), και ενδιάμεσα δημιουργείται μια μικρή στρώση που περιλαμβάνει τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια (< 1 %). Αυτή η μικρή στρώση συνήθως χρησιμοποιείται για τις αναλύσεις και ονομάζεται «buffer blood». Υπάρχουν πολλές μεθοδολογίες με διαφορές μεταξύ τους αλλά τα βήματα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής:

- Λύση κυττάρων: προσθήκη κατάλληλου διαλύματος το οποίο περιέχει συνήθως Tris-HCl (~ 10 mM), NaCl (10-100 mM ανάλογα τη μέθοδο και τα υπόλοιπα συστατικά), EDTA (1-10 mM, pH 8-8.2), K πρωτεΐνάση (~ 1 mg/mL), SDS (0.5-1 %)
- Επάωση: μπορεί να χρειαστεί έως και 8 ώρες σε θερμοκρασία 37 ή 55 °C ανάλογα τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο
- Προσθήκη αντιδραστηρίων: μετά την επάωση μπορεί να γίνει προσθήκη NaCl ή NaOAc
- Απομόνωση: στο διάλυμα που έχει δημιουργηθεί προστίθεται κατάλληλο διάλυμα για την απομόνωση του DNA (EtOH, PhOH ή PhOH:ChCl<sub>3</sub>:C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>O) (Loparev et al., 1991)



Σχήμα 9. Διαδικασία απομόνωσης DNA από αίμα.  
(Cepham Life Sciences Research Products, n.d.)

Η απομόνωση DNA από το περιφερειακό αίμα μπορεί να δώσει ποσότητες DNA περίπου 10-15 μg/mL αίματος. Παρ' όλ' αυτά, η συγκεκριμένη διαδικασία δεν είναι ιδιαίτερα προτιμητέα, ειδικά από τους δότες, λόγω της διαδικασίας λήψης αίματος και της πιθανότητας μετάδοσης ασθενειών. Δεν θα πρέπει να παραλειφθούν και πολιτιστικοί περιορισμοί που απαγορεύουν

τη λήψη αίματος σε ορισμένες περιπτώσεις. Σημαντικό μειονέκτημα επίσης του DNA που παραλαμβάνεται από αίμα είναι η ταχεία μείωση της ποιότητάς του αν δεν διατηρηθεί σε χαμηλές θερμοκρασίες και τυπικά δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διάστημα περισσότερο των 7 ημερών. Αυτό επηρεάζει και την απόσταση που δύναται να ταξιδέψει ένα δείγμα αν δεν του παρέχεται η κατάλληλη αποθήκευση μέχρι τον τελικό του προορισμό. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι η παρουσία ιόντων σιδήρου και μαγνησίου από το αίμα μπορεί να αναστείλει την τεχνική PCR, η οποία είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη για την ανάλυση του DNA. (Garbieri et al., 2017)

#### 1.1.4.2. Σάλιο

---

Περίπου το 75 % του ανθρώπινου σάλιου περιέχει επιθηλιακά κύτταρα από τον στοματικό βλεννογόνο και 25 % λευκοκύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι ο ρυθμός αναγέννησης των επιθηλιακών κυττάρων στην στοματική κοιλότητα γίνεται περίπου κάθε 3 ώρες, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα να υπάρχει αμόλυντο DNA στο δείγμα. Η συλλογή δείγματος σε αυτήν την περίπτωση μπορεί να γίνει και από μη καταρτισμένο προσωπικό, χωρίς τους κινδύνους που ελλοχεύουν στην περίπτωση του αίματος. Το DNA που απομονώνεται από σάλιο μπορεί επίσης να διατηρηθεί για πολύ μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (της τάξεως των χρόνων) και σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάστημα συντήρησης μπορεί να αυξηθεί με καλύτερη διασφάλιση ποιότητας αν τα δείγματα καταψυχθούν. (Garbieri et al., 2017)

Τα προτερήματα του DNA από σάλιο όμως έχουν μελετηθεί περαιτέρω. Συγκεκριμένα, όταν συγκρίθηκαν με δείγματα από αίμα, τα δείγματα DNA πτυέλου βρέθηκαν ικανά να χρησιμοποιηθούν σε ιατροδικαστικές έρευνες. Ήτοι, ένα άτομο μπορεί με υψηλή βεβαιότητα να αναγνωριστεί ανάμεσα σε άλλα με τη χρήση ακόμα και μόνο 1 ng DNA. Παρόλο που η ποσότητα που απομονώνεται από δείγματα σάλιου είναι σαφώς μικρότερη από αυτήν που προέρχεται από αίμα (~ 3 φορές μικρότερη), η ικανότητα ταυτοποίησης του DNA από σάλιο 1 μL είναι ίση με την ικανότητα ταυτοποίησης από αίμα 10 μL. (Parul et al., 2014)

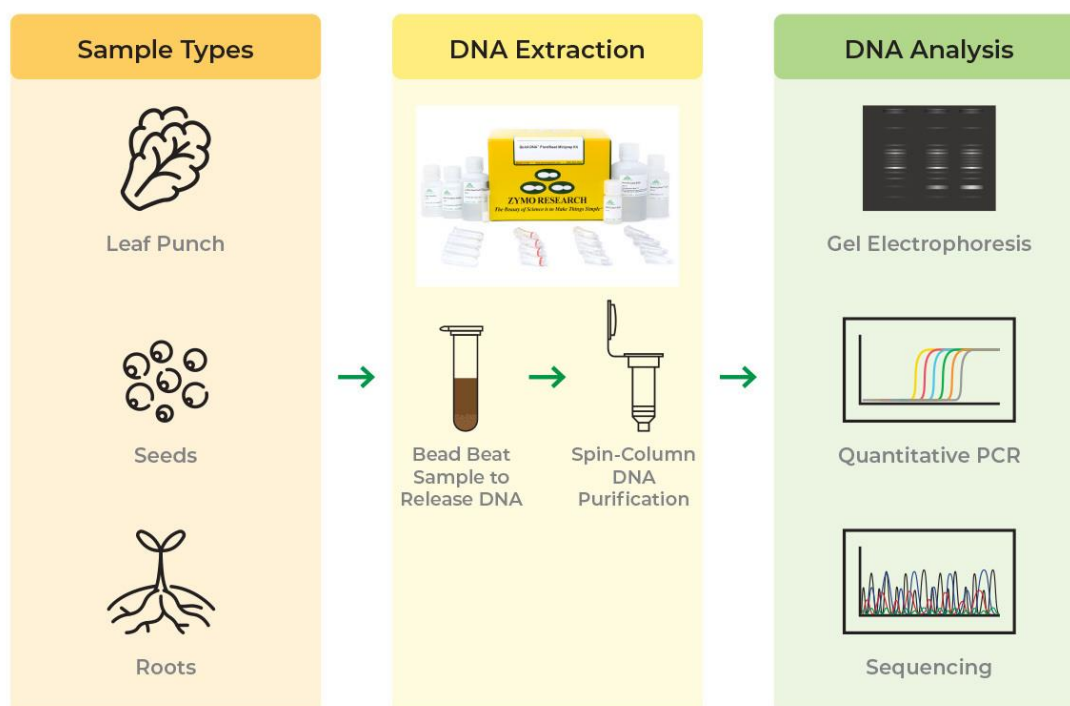
Δε θα πρέπει όμως να παραβλέψει κανείς και τα μειονεκτήματα που ενέχονται. Στην συγκριτική μελέτη μεταξύ δειγμάτων από σάλιο και από αίμα, η καθαρότητα του DNA από το σάλιο για κάποια δείγματα ήταν οριακά εκτός των επιθυμητών τιμών, ενώ για όλα τα δείγματα του αίματος, οι τιμές ήταν εντός των αποδεκτών ορίων. Πέρα από το γεγονός ότι, λόγω μειωμένης ποσότητας παραλαμβανόμενου DNA, δεν είναι εφικτή η κάθαρση των δειγμάτων μέσα από πολλά στάδια, οι πιθανότητες επιμόλυνσης είναι αρκετές. Συγκεκριμένα, κατά τη διαδικασία λήψης του δείγματος, το σάλιο που παραλαμβάνεται μπορεί να περιέχει πέραν των επιθυμητών κυττάρων, μεγάλο αριθμό βακτηρίων, μικροοργανισμών της στοματικής κοιλότητας, ένζυμα, ορμόνες και άλλα βιομόρια τα οποία πιθανότατα επηρεάζουν την ποσότητα και την ποιότητα του DNA που παραλαμβάνεται στο τέλος της διαδικασίας. (Garbieri et al., 2017; Parul et al., 2014)

#### 1.1.4.3. Φυτικά κύτταρα

---

Η απομόνωση DNA από φυτικά κύτταρα μπορεί να αποτελέσει επίσης μια ιδιαίτερα περίπλοκη διεργασία. Ιδιαίτερα στην περίπτωση των δημητριακών, η λήψη καθαρού DNA περιπλέκεται από την παρουσία πολυσακχαριτών, πρωτεϊνών, τανινών, αλκαλοειδών και πολυφαινόλων. Οι πολυσακχαρίτες, που βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα φυτά, δυσχεραίνουν τον χειρισμό του απομονωμένου DNA καθώς του προσδίδουν μια γλοιώδη

υφή, ενώ παράλληλα τα ανιοντικά μόρια επηρεάζουν την ενζυματική ανάλυση του DNA. Η απομόνωση καθαρού DNA από δημητριακά, τόσο για εφαρμογές όπως περιεγράφηκαν παραπάνω, όσο και για εμπορικούς λόγους, όπως η διασφάλιση ποιότητας συγκεκριμένων ποικιλιών που εξάγονται, αποτελεί μια ιδιαίτερα δαπανηρή και χρονοβόρα διαδικασία πολλών σταδίων. (Abdel-Latif & Osman, 2017)



Σχήμα 10. Διαδικασία απομόνωσης DNA από φυτικά κύτταρα με τη μέθοδο CTAB. (CTAB Protocol, 2022)

Τα εμπορικά kit έχουν αρκετά υψηλό αντίτιμο, ενώ η απόδοσή τους είναι χαμηλή ποσοτικά ή μπορεί να μην παρέχουν αποτελέσματα με σταθερή ποιότητα. Αυτό οφείλεται στη μεγάλη ποσότητα λιγνίνης που περιέχεται στα κύτταρα των δημητριακών. Η αποικοδόμησή της είναι ιδιαίτερα δύσκολη και συνεπώς η ποσότητα του DNA που απομονώνεται τελικά είναι πολύ μικρότερη της συνολικής. Η πιο συνήθης μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η μέθοδος CTAB, ή διάφορες παραλλαγές της, ανάλογα με τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και της ενδοκυτταρικής σύνθεσης του κάθε φυτού. Τα κύρια αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι CTAB, NaCl, Tris-HCl, EDTA, K πρωτεϊνάση, PVP, RNάση A,  $\text{ChCl}_3$ , EtOH, ενώ χρειάζονται αλλεπάλληλες φυγοκεντρήσεις και αρκετούς χρόνους επώασης (10 δείγματα μπορεί να χρειαστούν 3-4 ώρες). (Abdel-Latif & Osman, 2017)

Αξίζει, σε αυτήν την περίπτωση κυττάρων, να σημειωθεί πως υπάρχει ένα απλό πείραμα το οποίο πραγματοποιείται με υλικά που υπάρχουν σε ένα σπίτι ή ένα σχολείο. Το πείραμα αφορά την απομόνωση DNA από φρούτα, όπως η μπανάνα ή η φράουλα. Τα αντιδραστήρια που χρειάζονται είναι απιονισμένο νερό, σαπούνι, αλάτι και παγωμένο οινόπνευμα. Σε αυτήν την διαδικασία, αρχικά το φρούτο πολτοποιείται ώστε να επιτευχθεί μηχανική λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια, προστίθεται το διάλυμα λύσης των κυττάρων, το οποίο παρασκευάζεται με νερό, αλάτι και σαπούνι και γίνεται ήπια ανάμιξη για την αποφυγή του σχηματισμού φυσαλίδων. Το μίγμα έπειτα μπορεί να τοποθετηθεί υπό θέρμανση (50-60 °C) για 15 λεπτά (χημική λύση των κυττάρων). Μετά το πέρας του χρόνου, το μίγμα φιλτράρεται



και συλλέγεται το διήθημα. Μικρή ποσότητα από το διήθημα τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με παγωμένη EtOH και με την πάροδο του χρόνου το DNA περνάει στην οργανική φάση. Το DNA «ψαρεύεται» και ξεπλένεται με διάλυμα EtOH. Μικρή ποσότητα από το DNA που έχει συλλεχθεί διαλύεται σε νερό και πραγματοποιείται φασματοφωτομετρία UV-Vis για την εξακρίβωση της καθαρότητάς του.

#### 1.1.5. Καθαρότητα

---

Όπως έχει γίνει ήδη φανερό, η απομόνωση του DNA δεν είναι μια απλή διαδικασία. Και δεν είναι πάντα βέβαιο ότι θα επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα. Ανάλογα τη διαδικασία που θα ακολουθηθεί μετά την απομόνωση του DNA, υπάρχουν διαφορετικά επιθυμητά όρια που πρέπει να βρίσκεται η καθαρότητα και η ποσότητα. Η διακύμανση εκτός αυτών των ορίων μπορεί να οδηγήσει σε ορισμένες περιπτώσεις σε χαμηλής βεβαιότητας αποτελέσματα.

##### 1.1.5.1. Φασματοφωτομετρία UV-Vis

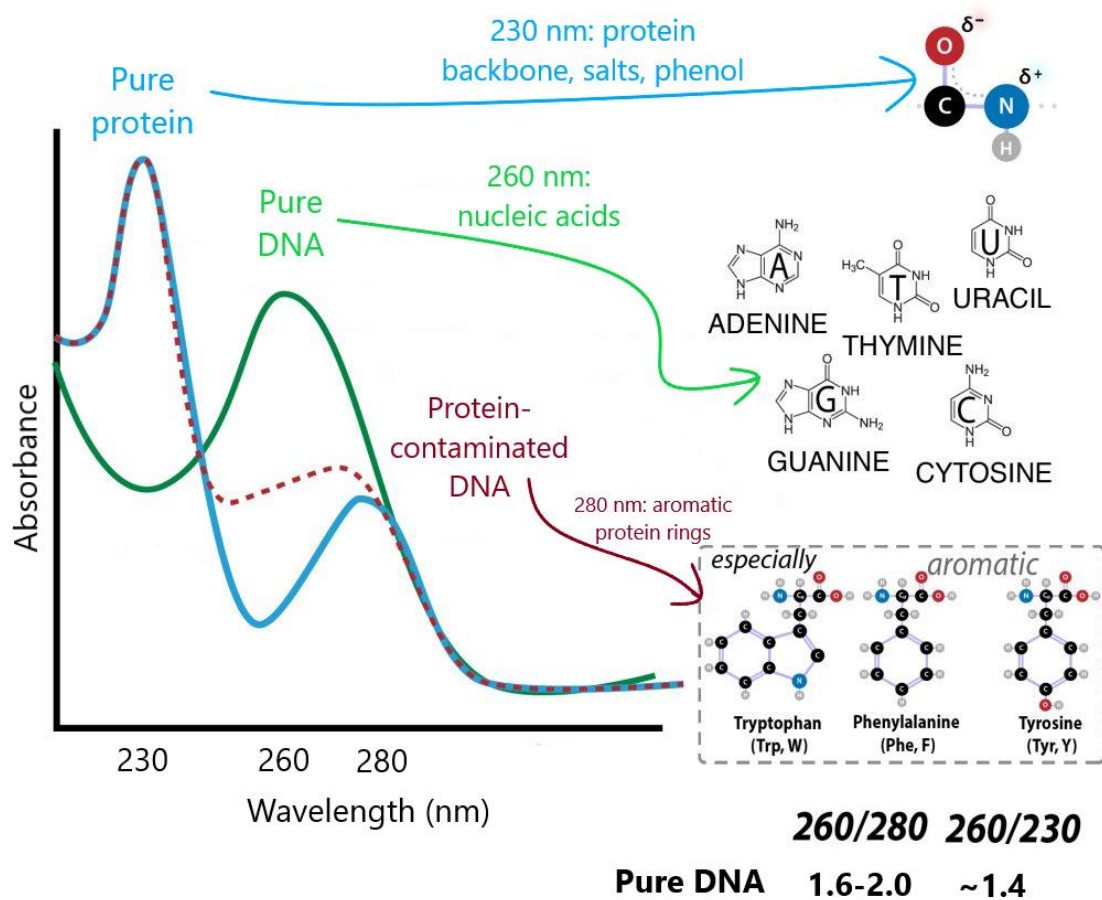
---

Ο κατ' εξοχήν τρόπος επιβεβαίωσης της σχετικής καθαρότητας ενός δείγματος DNA είναι η φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis). Τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν ακτινοβολία σε μήκος κύματος 260 nm λόγω των υπολειμμάτων αδεΐνης. Παράλληλα, οι πρωτεΐνες απορροφούν στα 280 nm, λόγω υπολειμμάτων τρυπτοφάνης, και οι φαινόλη απορροφά σε μήκη κύματος 270-275 nm. Η απορρόφηση του DNA στα 260 nm είναι περίπου 1.6-2.0 φορές μεγαλύτερη από την απορρόφηση στα 280 nm. Συνεπώς, η απορρόφηση στα 260 nm προς την αντίστοιχη στα 280 nm πρέπει να είναι εντός αυτού του ορίου ώστε το απομονωμένο δείγμα να έχει την ιδανική καθαρότητα. Το εύρος αυτό μπορεί να διαφέρει ανάλογα την περίπτωση, παρουσιάζοντας αυστηρότερη οριοθέτηση, όπως 1.7 ή 1.8 με μέγιστη τιμή το 2.0. Όταν ο λόγος των απορροφήσεων είναι κάτω από το κατώτατο όριο, το δείγμα είναι πιθανότατα μολυσμένο με πρωτεΐνες ή φαινόλη. Αν ο λόγος είναι πάνω από το ανώτατο όριο, το δείγμα πιθανότατα περιέχει RNA, αφού το RNA παρουσιάζει λόγους απορρόφησης στα 260 nm προς 280 nm 2.0-2.3. (Boesenberg-Smith et al., 2012; Parul et al., 2014)

Σε συγκεκριμένες εφαρμογές, όπου τα υπολείμματα ουσιών μπορεί να παρεμποδίσουν την αποτελεσματικότητά τους, λαμβάνεται υπ' όψιν και ο λόγος απορροφήσεων στα 260 nm προς 230 nm. Η απορρόφηση σε μήκος κύματος 230 nm ταυτοποιεί την παρουσία χημικών υπολειμμάτων όπως χαστροπικά άλατα, τα οποία παρεμποδίζουν την PCR. Ο λόγος των απορροφήσεων δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 1.4 σε κλίμακα με μέγιστη τιμή 2.0, ώστε να μπορούν να πραγματοποιηθούν περίπλοκες μέθοδοι PCR. (Boesenberg-Smith et al., 2012)

Πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου εντοπίζονται στην μη απαίτηση περαιτέρω αντιδραστηρίων και χρόνου επώασης. Επίσης, τα φασματόμετρα ορατού-υπεριώδους είναι ευρέως διαθέσιμα. Υπάρχουν όμως και μειονεκτήματα, όπως η απαίτηση ορισμένου όγκου δείγματος για την ακριβή μέτρηση. Αυτό μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα στην περίπτωση που η αρχική συγκέντρωση δείγματος είναι αρκετά χαμηλή και ο όγκος μη επαρκής. Έτσι δεν είναι εφικτή η προσθήκη περαιτέρω διαλύτη, καθώς αυτό θα μειώσει ακόμα παραπάνω την συγκέντρωση. Επίσης δεν είναι ακριβής μέθοδος για δείγματα συγκεντρώσεων μικρότερα του 1.5 μg/mL. Όπως προαναφέρθηκε, η παρουσία χημικών πρόσθετων από προηγούμενα στάδια (άλατα, Tris, EDTA κ.ά.), επηρεάζει επίσης την μέτρηση και μπορεί να δώσει λανθασμένα αποτελέσματα. Τέλος, οι μεταβολές του pH στα διαλύματα που

χρησιμοποιούνται μπορεί να μεταβάλλουν τις απορροφήσεις. (Boesenberg-Smith et al., 2012)



Σχήμα 11. Απορροφήσεις UV-Vis των ενώσεων ενδιαφέροντος.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα περισσότερα σφάλματα στις μετρήσεις που μπορεί να οφείλονται στους άνωθεν λόγους αφορούν κυρίως την ποσοτικοποίηση που είναι εφικτή μέσω της φασματοφωτομετρίας. Η μέτρηση της απορρόφησης ως μέθοδος μέτρησης της καθαρότητας είναι αρκετά ακριβής και αρκεί η μέτρηση και ερμηνεία των λόγων όπως περιεγράφηκε παραπάνω. Ως μέθοδος ποσοτικοποίησης θα ήταν προτιμότερη κάποια άλλη μέθοδος, όπως φθορομετρικές μέθοδοι και PCR πραγματικού χρόνου. (Boesenberg-Smith et al., 2012)

### 1.1.6. Αλληλεπίδραση

Σημαντικό κομμάτι των φαρμακευτικών ερευνών αποτελεί συχνά η μελέτη της αλληλεπίδρασης του DNA με μικρά μόρια. Τα μόρια παρεμβολείς χρησιμοποιούνται εκτενώς ως αντιβακτηριδιακοί, αντιπαρασιτικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες. Οι δράσεις τους οφείλονται στο γεγονός ότι η αλληλεπίδρασή τους οδηγεί σε αναστολή της διαδικασίας αντιγραφής και μεταγραφής του DNA και συνεπώς καταστέλλουν την ανάπτυξη και την διαίρεση του κυττάρου. Η σύνδεση μικρών μορίων με το DNA μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρεις τρόπους: ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, παρεμβολή, και αλληλεπιδράσεις

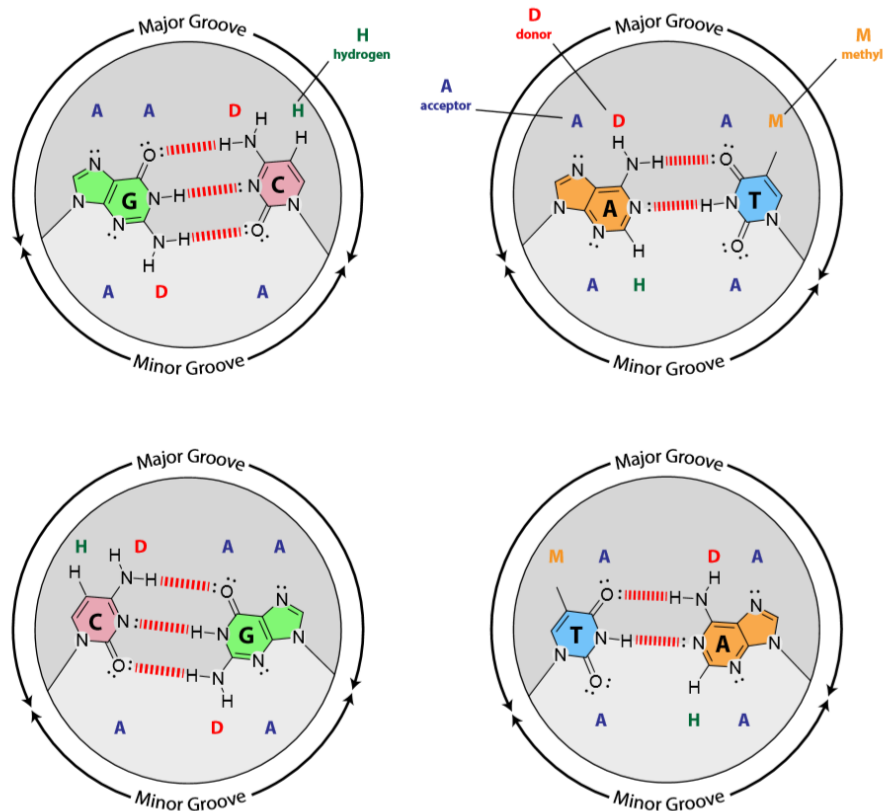
δέσμευσης κύριας και δευτερεύουσας αύλακας του DNA. (Mukherjee & Sasikala, 2013; Rauf et al., 2005)

### 1.1.6.1. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις

Το μόριο του DNA είναι μία από τις πιο φορτισμένες βιολογικές έλικες (ένα στοιχειώδες φορτίο  $e_0$  ανά  $\sim \text{nm}^2$  DNA, σε τυπικές συνθήκες pH και φυσιολογικές συγκεντρώσεις άλατος). Το φορτίο οφείλεται στις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται περιφερειακά της έλικας του DNA. Περίπου το 75 % του συνολικού φορτίου του DNA, εξουδετερώνεται με την προσρόφηση αντίθετα φορτισμένων ιόντων από το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται. Η σύνδεση μορίων στο DNA μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων είναι γενικά μη ειδική και ανάλογα με τον τρόπο σύνδεσης, τη χημική φύση και το σθένος των μορίων αυτών υπαγορεύονται τα χαρακτηριστικά των δυνάμεων που ασκούνται και φυσικά η τελική μορφή του μορίου του DNA (η ελικοειδής μορφή τροποποιείται λόγω υπολειπόμενου φορτίου ή λόγω γεωμετρικών τροποποιήσεων, όπως χαλάρωση ή επιμήκυνση). (Cherstny, 2011; Rauf et al., 2005)

### 1.1.6.2. Δέσμευση στην κύρια ή δευτερεύουσα αύλακα

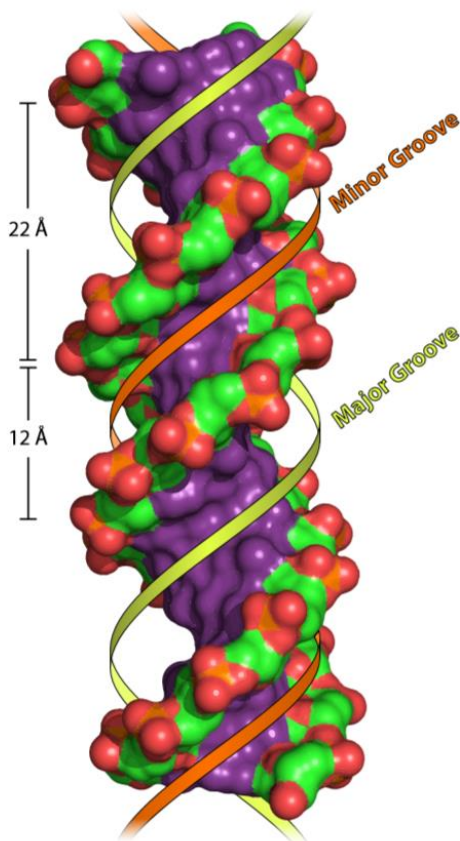
Οι αυλακώσεις του DNA σχηματίζουν δύο συνεχείς επιφάνειες που τυλίγονται γύρω από την έλικα. Κάθε αυλάκωση απαρτίζεται από τα εκτεθειμένα άκρα των ζευγών βάσεων. Η κύρια αύλακα είναι ευρύτερη και πιο προσιτή από ό,τι η δευτερεύουσα. (Cabeen et al., 2020)



Σχήμα 12. Αύλακες του DNA και δότες/δέκτες δεσμών.

Σε σκούρο γκρι φόντο φαίνονται τα άτομα της κύριας αύλακας, ενώ σε ανοιχτό γκρι τα άτομα της δευτερεύουσας αύλακας. (H: Hydrogen, A: Acceptor, D: Donor, M: Methyl) (Cabeen et al., 2020)





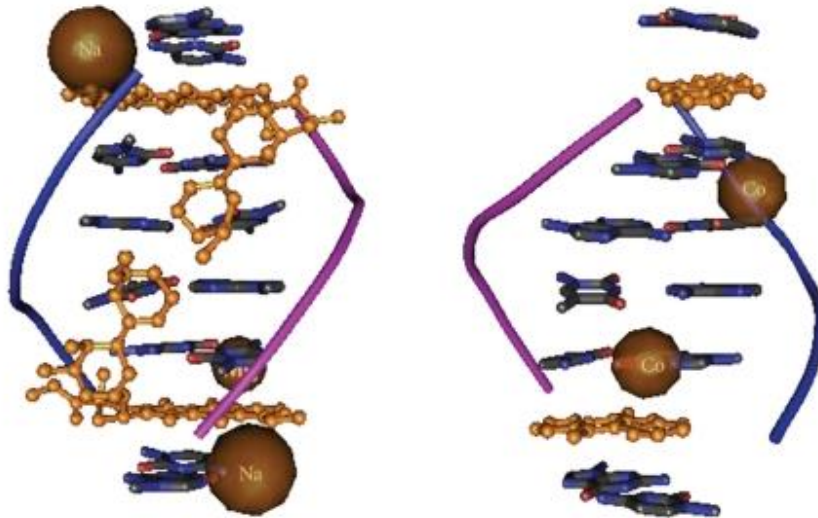
Σχήμα 13. Κύρια και δευτερεύουσα αύλακα του DNA.

Με μωβ απεικονίζονται όλες οι βάσεις του DNA. Ο άνθρακας απεικονίζεται με πράσινο, το οξυγόνο με κόκκινο και ο φώσφορος με πορτοκαλί. (Cabeen et al., 2020)

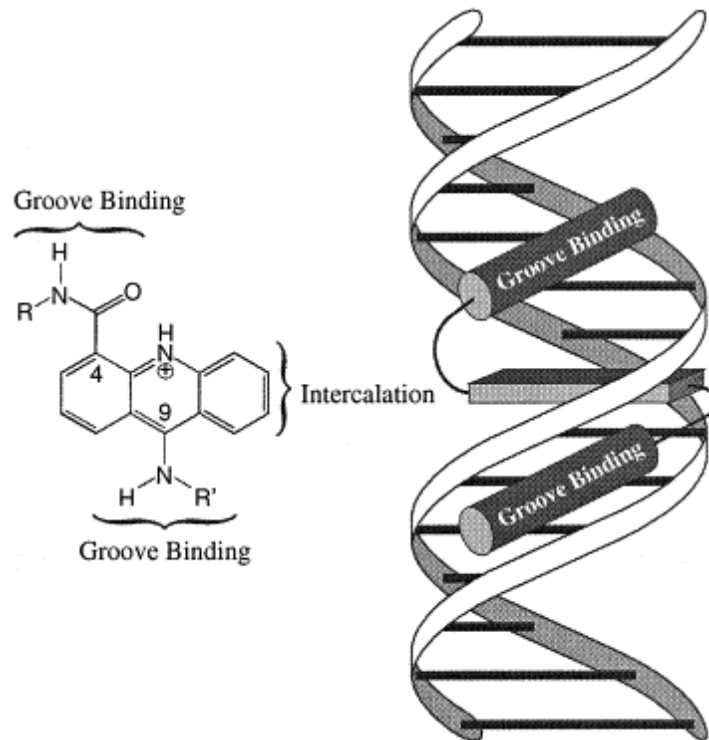
Η δέσμευση στην δευτερεύουσα αύλακα του DNA δημιουργεί πολύ στενές επαφές με τα τοιχώματα της αύλακας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία πολλαπλών δεσμών υδρογόνου και την αύξηση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων και του DNA. Η δέσμευση στην κύρια αύλακα προκύπτει από τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου με το DNA και μπορεί να προκαλέσει τον σχηματισμό τριπλής έλικας. (Rauf et al., 2005)

#### 1.1.6.3. Παρεμβολή

Υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι παρεμβολών: οι μονοπαρεμβολείς, οι διπαρεμβολείς και οι παρεμβολείς με σπείρωμα. Οι μονοπαρεμβολείς είναι μικρά οργανικά μόρια με επίπεδο τμήμα το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ ζευγών βάσεων σε οποιαδήποτε από τις δύο αυλακώσεις του DNA. Οι διπαρεμβολείς σχηματίζονται με την ένωση δύο μονοπαρεμβολών και πρέπει να έχουν το ιδανικό μήκος, ώστε να είναι δυνατή η τοποθέτηση του κάθε μονοπαρεμβολέα ανάμεσα σε ζεύγη βάσεων για να αλληλεπιδράσουν. Οι παρεμβολείς με σπείρωμα διαθέτουν σε κάθε πλευρά του επίπεδου τμήματος πλευρικές αλυσίδες. Συνεπώς, κατά την αλληλεπίδραση, η μία πλευρική αλυσίδα πρέπει να περάσει μέσα από τα ζεύγη βάσεων ώστε κάθε πλευρική αλυσίδα να βρίσκεται σε μια αύλακα.



Σχήμα 14. 3D απεικόνιση παρεμβολέων  
 Διπαρεμβολέας (αριστερά) και μονοπαρεμβολέας (δεξιά) (Lenglet & David-Cordonnier, 2010)



Σχήμα 15. Σχηματική αναπαράσταση παρεμβολέα με σπείρωμα  
 (Carlson & Beal, 2000)

## 1.2. Πράσινη χημεία

---

Η τεχνολογική ανάπτυξη που έχει επέλθει τα τελευταία χρόνια ακολουθείται από μια αύξηση του κινδύνου, τόσο για τον άνθρωπο όσο και για το περιβάλλον. Ο κίνδυνος μπορεί να θεωρηθεί ως μια συνάρτηση της έκθεσης και της επικινδυνότητας. Έχοντας ως γνώμονα την επικινδυνότητα μιας ουσίας, ο κίνδυνος μπορεί να μειωθεί αν ελαχιστοποιηθεί αναλόγως η έκθεση του ανθρώπου και του περιβάλλοντος σε αυτήν. Παλαιότερα ήταν σύνηθες φαινόμενο να παραβλέπονται οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις των ουσιών με την απόθεσή τους στο περιβάλλον, πλέον όμως, διατίθενται και οι γνώσεις και τα εργαλεία για να διορθωθούν προβλήματα που δημιουργήθηκαν από αμέλεια, και να αποφευχθούν επόμενα. Είναι ούτως ή άλλως γνωστό πλέον ότι ο πλανήτης βρίσκεται σε ένα κρίσιμο κλιματικό σημείο, και το οικοσύστημα είναι ιδιαίτερα βεβαρημένο από τις ολοένα αυξανόμενες ανθρώπινες δραστηριότητες. (P. T. Anastas & Warner, 2000)

Η πράσινη χημεία αποσκοπεί σε περιβαλλοντικά ήπιες χημικές συνθέσεις, εναλλακτικές συνθετικές οδούς ώστε να προληφθεί η ρύπανση και στον σχεδιασμό περιβαλλοντικά φιλικών διεργασιών. Συνίσταται ουσιαστικά από ένα σύνολο αρχών που στοχεύουν στη μείωση ή πλήρη εξάλειψη της χρήσης ή παραγωγής επικίνδυνων ουσιών όταν σχεδιάζονται και παράγονται χημικά προϊόντα. Η δεοντολογία του νέου αυτού επιστημονικού πεδίου παρατίθεται μέσα από τις 12 αρχές της πράσινης χημείας. (P. T. Anastas & Warner, 2000)

### 1.2.1. Αρχές της Πράσινης Χημείας

---

Ο ορισμός της Πράσινης Χημείας ξεκίνησε τη δεκαετία του 1990 και έκτοτε η έννοια αυτή υιοθετήθηκε σε πληθώρα κυβερνητικών πρωτοβουλιών και προγραμμάτων. Η Πράσινη Χημεία εστιάζει στον σχεδιασμό: μια ανθρώπινη πρόθεση που εγκλείει καινοτομία, προγραμματισμό και συστηματική σύλληψη. Αυτός ο στόχος του σχεδιασμού μπορεί να επιτευχθεί έχοντας ως γνώμονα την βιωσιμότητα μέσα από τις Δώδεκα Αρχές της Πράσινης Χημείας. Αυτές αποτελούν ουσιαστικά σχεδιαστικούς κανόνες, ώστε να δημιουργηθούν συνέργειες στην διαδικασία παραγωγής και όχι συμβιβασμοί. (P. Anastas & Eghbali, 2010)

Οι δώδεκα αρχές της Πράσινης Χημείας παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω.

1. Πρόληψη: Είναι προτιμότερο να προλαμβάνεται η παραγωγή αποβλήτων αντί να επιδιώκεται η εκ των υστέρων διαχείριση και καθαρισμός τους μετά την παραγωγή.
2. Οικονομία ατόμων: Οι συνθετικές μέθοδοι είναι απαραίτητο να σχεδιάζονται ώστε η ενσωμάτωση όλων των αντιδρώντων στο τελικό προϊόν να είναι η μέγιστη δυνατή.
3. Λιγότερο επικίνδυνες συνθετικές μεθοδολογίες: Οι συνθετικές μεθοδολογίες πρέπει να χρησιμοποιούν ή να παράγουν χημικές ουσίες (αντιδρώντα, προϊόντα, παραπροϊόντα) με την ελάχιστη ή μηδενική τοξικότητα στον άνθρωπο και το περιβάλλον.
4. Σχεδιασμός ασφαλέστερων χημικών προϊόντων: Τα χημικά προϊόντα πρέπει να είναι έτσι σχεδιασμένα ώστε να μειώνεται η τοξικότητά τους αλλά να διατηρείται η λειτουργικότητά τους και οι επιθυμητές τους ιδιότητες.
5. Ασφαλέστεροι διαλύτες και αντιδραστήρια: Η χρήση βοηθητικών χημικών ουσιών (διαλυτών και αντιδραστηρίων) πρέπει να περιορίζεται, αν δύναται, και αν είναι αναγκαία θα πρέπει αυτές να είναι ακίνδυνες και μη τοξικές.

6. Ενεργειακά αποδοτικός σχεδιασμός χημικών διεργασιών: Οι ενεργειακές απαιτήσεις είναι σημαντικό να αναγνωρίζονται και να ελαχιστοποιούνται. Ιδανικά, οι συνθετικές μεθοδολογίες πρέπει να διεξάγονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ατμοσφαιρική πίεση.
7. Χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών: Όπου είναι τεχνικά και οικονομικά εφικτό, οι πρώτες ύλες θα πρέπει να προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές.
8. Ελαχιστοποίηση χημικών τροποποιήσεων: Πρέπει να αποφεύγεται η άσκοπη παραγωγοποίηση (προσθήκη προστατευτικών ομάδων, προσωρινές τροποποιήσεις ενδιάμεσων).
9. Κατάλυση: Είναι προτιμότερη η χρήση καταλυτών, όσο το δυνατόν πιο εκλεκτικών, από την χρήση σε στοιχειομετρική αναλογία αντιδραστηρίων.
10. Σχεδιασμός για αποικοδόμηση: Τα χημικά προϊόντα πρέπει να σχεδιάζονται ώστε να αποικοδομούνται, να μην παραμένουν στο περιβάλλον και να είναι αβλαβή μετά το πέρας της χρήσης τους.
11. Ανάλυση ρύπων σε πραγματικό χρόνο: Περαιτέρω ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων ώστε να αναλύονται σε πραγματικό χρόνο τους ρύπους, επιτρέποντας έτσι τον έλεγχό τους πριν τον σχηματισμό επικίνδυνων ενώσεων.
12. Ασφαλέστερες χημικές διεργασίες για την πρόληψη ατυχημάτων: Οι ουσίες που συμμετέχουν σε μια χημική διεργασία και η μορφή τους θα πρέπει να επιλέγονται με προσοχή ώστε να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος ατυχήματος (διαρροή, έκρηξη, ανάφλεξη κ.ά.). (P. T. Anastas & Warner, 2000)

# The GREEN CHEMISTREE



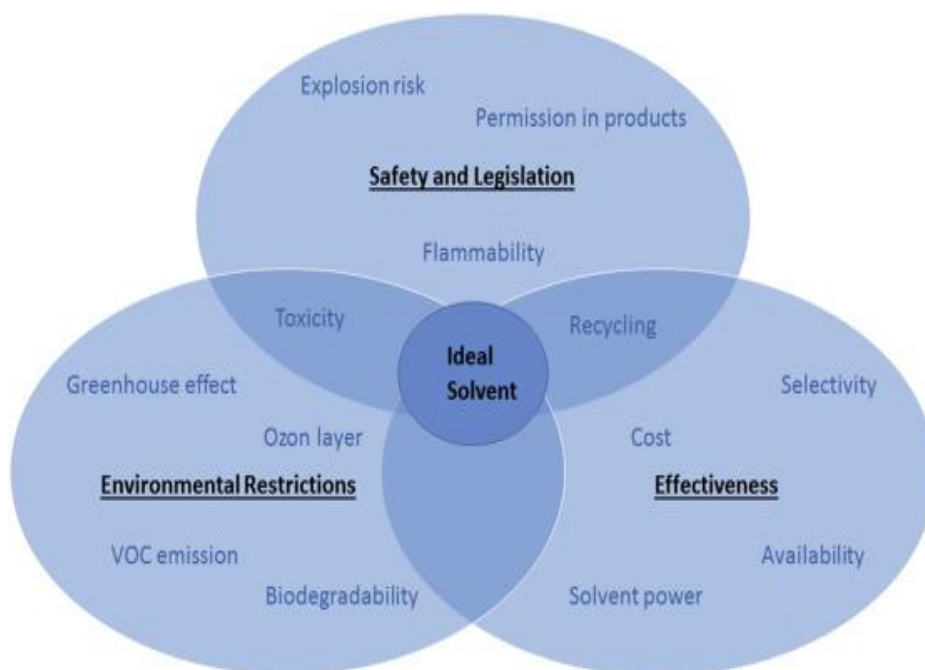
Εικόνα 2. Το Πράσινο Δέντρο (Green Chemistree).

Στα κλαδιά του βρίσκονται οι 12 αρχές της Πράσινης Χημείας και στα φύλλα του τα πεδία έρευνας που σχετίζονται με αυτές. (Li et al., 2018)



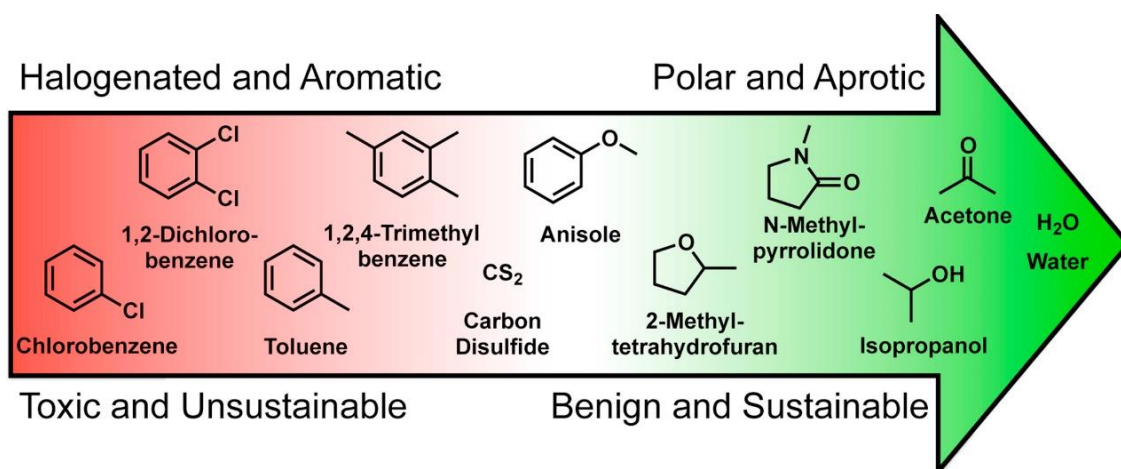
### 1.2.2. Πράσινοι διαλύτες

Οι διαλύτες είναι ένα σημαντικό κομμάτι που χρήζει βελτίωσης στα πλαίσια της Πράσινης Χημείας. Οι βοηθητικές ενώσεις εν γένει χρησιμοποιούνται τόσο εκτενώς που δυστυχώς δεν είθισται να γίνεται αξιολόγηση της αναγκαιότητάς τους. Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται για αυτούς τους λόγους συχνά έχουν και επιπτώσεις στο περιβάλλον και την υγεία λόγω της φύσης τους. (P. T. Anastas & Warner, 2000)



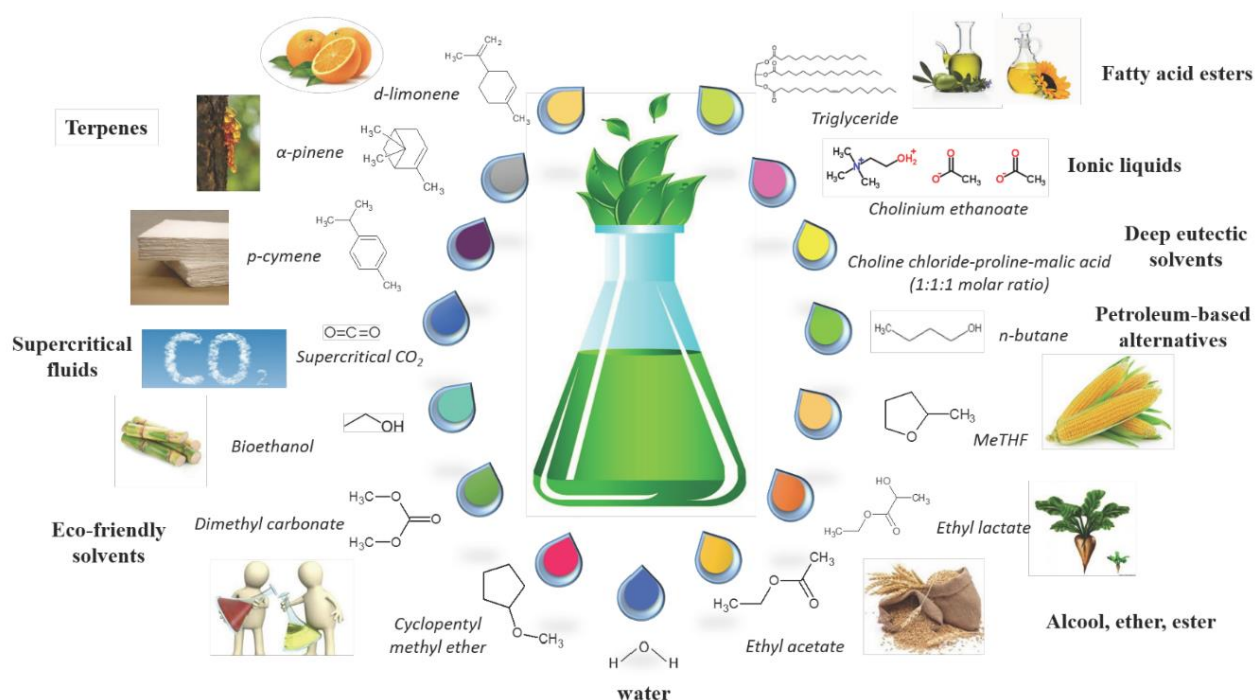
Σχήμα 16. Χαρακτηριστικά του ιδανικού διαλύτη.  
(Häckl & Kunz, 2018)

Μεγάλη μερίδα διαλυτών, οι οποίοι χρησιμοποιούνται τακτικά λόγω της υψηλής αποδοτικότητάς τους, όπως το χλωροφόρμιο, το βενζόλιο και άλλοι αλογονωμένοι διαλύτες και αρωματικοί υδρογονάνθρακες, έχουν συνδεθεί με καρκινογένεσεις στον άνθρωπο και στα ζώα. Φυσικά, σε άλλους διαλύτες οφείλονται σημαντικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις, όπως η μείωση του στρατοσφαιρικού όζοντος (CFC), και η φωτοχημική ρύπανση-αιθαλομίχλη (VOC). (P. T. Anastas & Warner, 2000)



Σχήμα 17. Οργανικοί & πράσινοι διαλύτες.  
(McDowell & Bazan, 2017)

Στην προσπάθεια να αντικατασταθούν αυτοί οι συμβατικοί διαλύτες, πραγματοποιείται εκτενής μελέτη για τη λειτουργία και τη χρήση πράσινων διαλυτών. Οι πιο συνηθισμένες εναλλακτικές είναι το νερό, τα ιοντικά υγρά και οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες.



Σχήμα 18. Σύνοψη εναλλακτικών πράσινων διαλυτών.  
(Chemat et al., 2019)

### 1.2.2.1. Νερό

Ο παγκόσμιος διαλύτης, το νερό, διαθέτει κάποια αναμφισβήτητα πλεονεκτήματα όπως η μηδαμινή πιθανότητα κινδύνου (δεν είναι τοξικό και εύφλεκτο), η υψηλή διαθεσιμότητα και φυσικά το χαμηλό κόστος του. Διαθέτει χρήσιμα χαρακτηριστικά που μπορούν να αξιοποιηθούν όπως η επιλεκτικότητα που μπορεί να εμφανίσει, οι δεσμοί υδρογόνου, η εύκολη ρύθμιση του pH του, η ικανότητα διάλυσης αλάτων και η εφαρμογή του σε διεφασικά συστήματα. Λόγω της πολικότητάς του και του σφαιρικού σχήματος του μορίου, αποτελεί εξαιρετικό διαλύτη σε περιπτώσεις διαβροχής, έγχυσης και διήθησης, ενώ με την αύξηση της θερμοκρασίας και της πίεσης η πολικότητα μπορεί να μειωθεί λόγω αλλοίωσης του πλέγματος των δεσμών υδρογόνου. (Chemat et al., 2019; Häckl & Kunz, 2018)

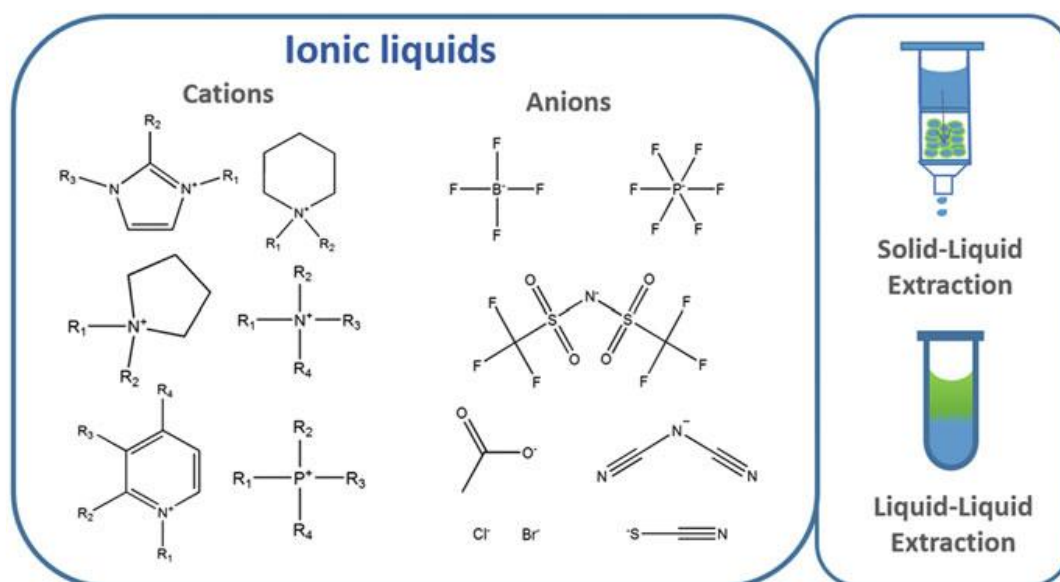
Παρ' όλ' αυτά, η χρήση του ενέχει και μειονεκτήματα. Η θερμοχωρητικότητα που παρουσιάζει σε συνδυασμό με το μικρό σχετικά θερμοκρασιακό εύρος της υγρής του φάσης, το καθιστούν ενεργοβόρο για διεργασίες απόσταξης, ατμοποίησης και αντίστροφης ώσμωσης. Τέτοιες διεργασίες απαιτούνται όταν το νερό πρέπει να απομακρυνθεί από τελικά μη πτητικά, πολικά και ημιπολικά προϊόντα. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποτελέσει παράγοντα αποκλεισμού του νερού ως διαλύτη. (Chemat et al., 2019; Häckl & Kunz, 2018)

Μελέτες δείχνουν πως η χρήση του ως υποκρίσιμο ρευστό (θερμοκρασίες μεταξύ του σημείου βρασμού και του κρίσιμου σημείου, 100 °C, 1 bar και 374 °C, 221 bar) για τις περιπτώσεις των πολικών προϊόντων είναι πολλά υποσχόμενη, καθώς σε αυτήν την κατάσταση το νερό συμπεριφέρεται όπως ένας οργανικός διαλύτης (η πολικότητά του

μειώνεται, όπως και η διηλεκτρική σταθερά). Μπορεί επίσης να λειτουργήσει ως καταλύτης, αφού μπορεί να είναι είτε οξύ είτε βάση λόγω της παρουσίας ιόντων  $\text{H}_3\text{O}^+$  και  $\text{OH}^-$ . Τέλος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί συνδυαστικά με ένζυμο ώστε να επιτευχθεί υψηλή εκλεκτικότητα. Σε αυτήν την περίπτωση, δεν απαιτούνται υψηλές θερμοκρασίες, ο χρόνος αντίδρασης είναι σύντομος και η ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος υψηλή λόγω μικρού ποσοστού υπολειμμάτων. (Chemat et al., 2019)

### 1.2.2.2. Ιοντικά υγρά

Τα ιοντικά υγρά (ILs) αποτελούνται από ανόργανα ή οργανικά ανιόντα και σχετικά μεγάλα και ασύμμετρα οργανικά κατιόντα. Τα συστατικά των ILs δεν σχηματίζουν συχνά δομημένους κρυστάλλους με συνέπεια το χαμηλό σημείο τήξεως. Η τάση ατμών τους είναι πρακτικά αμελητέα και συνεπώς δεν αποτελούν αναφλέξιμα υλικά, όπως είναι συνήθως οι οργανικοί διαλύτες, και είναι χημικά σταθερά. Προτιμώνται ιδιαίτερα σε περιπτώσεις διαχωρισμού υγρού- υγρού. Αξίζει να σημειωθεί πως λόγω του συνδυασμού ανιόντων και κατιόντων, μπορούν να σχεδιαστούν πολλά ILs ανάλογα με την επιθυμητή ιδιότητα που απαιτείται στην εκάστοτε περίπτωση. (Itoh & Koo, 2019)



Σχήμα 19. Συνήθη ιόντα των ILs.  
(Itoh & Koo, 2019)

Ο πράσινος χαρακτήρα των ILs έχει αμφισβητηθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι δεν έχουν υψηλή βιοσυμβατότητα και βιοαποδομησιμότητα. Επίσης, για τα περισσότερα ILs, η διαδικασία παραγωγής δεν συμβαδίζει με τις αρχές της Πράσινης Χημείας. Η κατηγορία των ILs που περιλαμβάνει κατιόντα που εντοπίζονται στον μεταβολισμό οργανισμών θεωρείται μια πράσινη περίπτωση αυτών. Η σύνθεση ILs της συγκεκριμένης κατηγορίας μπορεί να γίνει με σύνθεση ενός σταδίου και τα αντιδραστήρια έχουν χαμηλό κόστος και μεγάλη διαθέσιμη ποσότητα. (Chemat et al., 2019; Häckl & Kunz, 2018)

Τα ILs χρησιμοποιούνται επίσης και σε υδατικά διφασικά συστήματα (ABS). Τα συστήματα αυτά αποτελούν μια πιο πράσινη εναλλακτική λόγω της δυνατότητας συνδυασμού δύο μη πτητικών συστατικών σε ένα πλούσιο υδατικό μέσο. Το ABS συνήθως αποτελείται από δύο

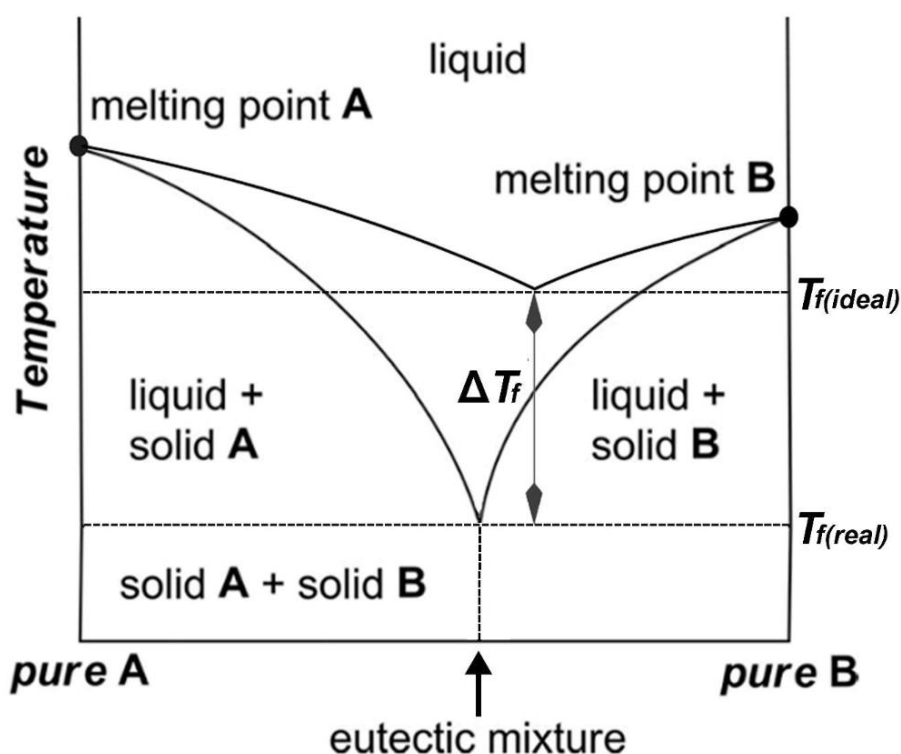


πλούσιες υδατικές φάσεις σε ισορροπία μετά τη διάλυση, με δεδομένη συγκέντρωση ενός ζεύγους διαλυμένων ουσιών (δύο πολυμερή ή ένα πολυμερές και άλας). Τα ABS όμως αδυνατούν να κλιμακωθούν σε μια διεργασία και να λειτουργήσουν σε συνθήκες συνεχούς λειτουργίας. Τα ABS βρίσκουν ιδιαίτερη εφαρμογή στην απομόνωση βιολογικών μορίων, και τα πολυμερή που χρησιμοποιούνται βοηθούν και στην σταθεροποίηση των ουσιών που απομονώνονται. (Itoh & Koo, 2019)

### 1.2.2.3. Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DESS) άρχισαν να χρησιμοποιούνται ως εναλλακτική λύση των ILs το 2004. Κατασκευάζονται με απλή μείξη στερεών συστατικών σε ήπια θέρμανση. Έτσι σχηματίζεται ένα ευτηκτικό μίγμα, με σημείο τήξης χαμηλότερο των αντίστοιχων των δύο συστατικών. Αυτή η ξεχωριστή ιδιότητά τους οφείλεται στους διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ ενός δότη δεσμού υδρογόνου (HBD) και ενός δέκτη δεσμού υδρογόνου (HBA). (Chemat et al., 2019; Itoh & Koo, 2019)

Πολλά από τα χαρακτηριστικά τους μοιάζουν με εκείνα των ILs (υψηλό ιξώδες, χαμηλή πτητικότητα, χημική και θερμική σταθερότητα, μη εύφλεκτος χαρακτήρας). Όμως, διαθέτουν επιπλέον πλεονεκτήματα που τους καθιστούν πιο πράσινους διαλύτες, όπως η μη τοξικότητά τους και μεγαλύτερη βιοαποδομησιμότητα. Επίσης, η μέθοδος παραγωγής τους είναι λιγότερο ενεργειακά απαιτητική και τα υλικά τους πιο φθηνά και διαθέσιμα. Μπορούν να παρέχουν μεγάλη ποικιλία διαλυτών, καθώς ο αριθμός των πιθανών συστατικών και συνδυασμών τους είναι μεγάλος, και παράλληλα η μοριακή αναλογία μεταξύ τους μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικά αποτελέσματα, προσθέτοντας και άλλες επιλογές. (Chemat et al., 2019; Itoh & Koo, 2019)



Διάγραμμα 1. Διάγραμμα φάσεων ενός μείγματος δύο συστατικών.

$T_{f(ideal)}$  είναι το μετρούμενο σημείο πήξης του μείγματος στην ευτηκτική σύνθεση.  $T_{f(ideal)}$  είναι το θεωρητικά προβλεπόμενο σημείο πήξης. (Kalhor & Ghandi, 2019)

Ένα DES μπορεί να αναπαρασταθεί από τον ακόλουθο τύπο

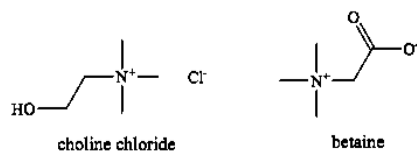


όπου  $\text{Cat}^+$  είναι ένα οποιοδήποτε κατιόν αμμωνίου, φωσφονίου ή σουλφονίου, και X μια βάση κατά Lewis (συνήθως ένα ανιόν αλογονιδίου). Πολύπλοκα ανιονικά είδη σχηματίζονται μεταξύ της βάσης και ενός οξέος κατά Lewis ή Brønsted Y. Το z αναφέρεται στον αριθμό των ατόμων του οξέος Y που συμμετέχουν στον σχηματισμό του ανιόντος. (Smith et al., 2014)

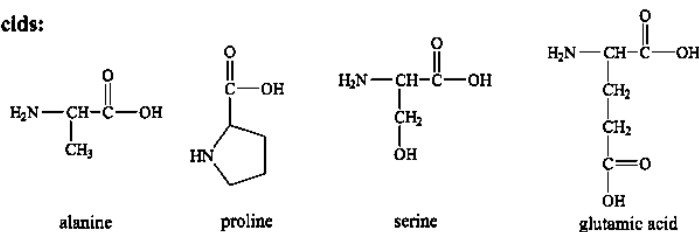
#### 1.2.2.4. Φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες

Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NaDESs) είναι μια κατηγορία των DESs. Συγκεκριμένα, τα συστατικά τους προέρχονται από φυσικές πηγές και δεν είναι συνθετικά. Λόγω της προέλευσής τους, οι NaDESs θεωρούνται ακόμα πιο πράσινοι διαλύτες και εξαιρετικά βιοαποδομήσιμοι και συνεπώς τα εκχυλίσματά τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις βιομηχανίες των τροφίμων, των φαρμακευτικών και των καλλυντικών. Τα φυσικά συστατικά που συνήθως απαρτίζουν τους NaDESs είναι πρωτογενείς μεταβολίτες (οργανικά οξέα, σάκχαρα, αμινοξέα κ.τ.λ.) και διαδραματίζουν κομβικούς ρόλους σε βιολογικές διεργασίες, κυρίως στην άμυνα έναντι ακραίων συνθηκών (ξηρασία, παγετός). (Chemat et al., 2019; Itoh & Koo, 2019)

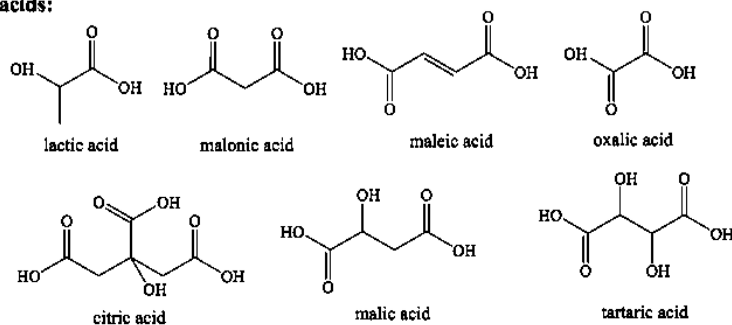
### Salts:



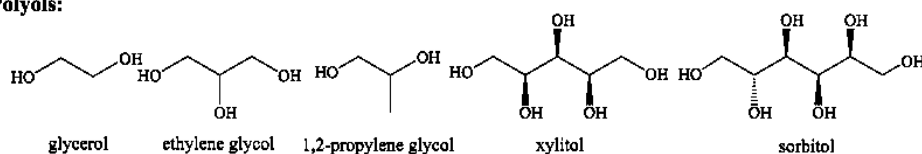
### Amino acids:



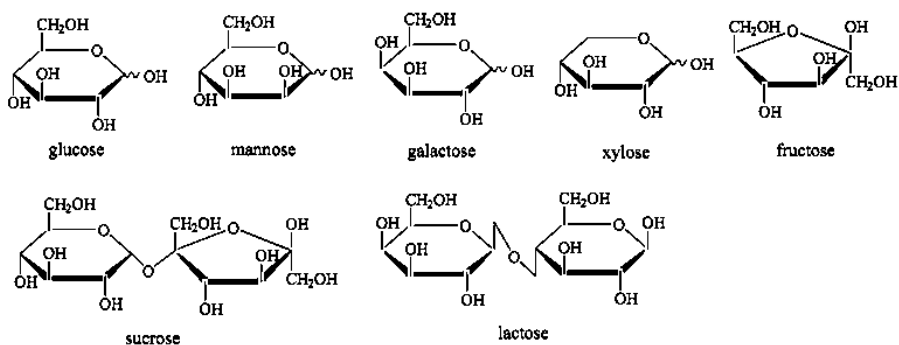
### Organic acids:



### Polyols:



### Sugars:



Σχήμα 20. Φυσικά συστατικά για NaDESS.  
(Itoh & Koo, 2019)

### 1.2.3. Παρασκευή

Η μέθοδος παρασκευής τους είναι παρόμοια με των DESs. Υπάρχουν τρεις συνήθειες μεθοδολογίες:

1. Θερμική ανάμειξη: γίνεται ανάμειξη των συστατικών στους 60-80 °C για 1-2 h με μαγνητική ανάδευση ώσπου να σχηματιστεί ένα διαυγές άχρωμο ρευστό.
2. Εξάτμιση υπό κενό: γίνεται διάλυση των συστατικών σε νερό και ακολουθεί εξάτμιση στους 50 °C σε περιστροφικό εξάτμιστή.

3. Ξήρανση με κατάψυξη: γίνεται διάλυση των συστατικών σε νερό και στη συνέχεια πραγματοποιείται λυοφιλίωση.

Όλες οι μέθοδοι οδηγούν στο ίδιο αποτέλεσμα. Η πρώτη εναλλακτική όμως είναι πιο ασφαλής και φθηνή. (Itoh & Koo, 2019)

#### 1.2.4. Ιδιότητες

---

Η πυκνότητά τους είναι υψηλότερη του νερού και μειώνεται γραμμικά με την αύξηση της θερμοκρασίας ή της περιεκτικότητας σε νερό. Η μοριακή αναλογία των συστατικών επίσης επηρεάζει την πυκνότητα του τελικού NaDES. Σε σχέση με πολλούς οργανικούς διαλύτες, το ιξώδες των NaDESs είναι υψηλότερο και οφείλεται πιθανότατα στο εκτενές δίκτυο δεσμών υδρογόνου. Λογικό επακόλουθο αυτού είναι το συμπέρασμα πως όταν χρησιμοποιούνται συστατικά με παραπάνω υδροξύλια, ο NaDES που θα προκύψει θα έχει μεγαλύτερο ιξώδες από έναν άλλο με λιγότερα υδροξύλια. Το χαρακτηριστικό αυτό όμως μπορεί να ρυθμιστεί με την θερμοκρασία ή την προσθήκη νερού. (Itoh & Koo, 2019)

Η πολικότητα είναι ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό για τους διαλύτες. Για τους NaDESs, οι τιμές κυμαίνονται ανάλογα με τα συστατικά τους: οι πιο πολικοί περιλαμβάνουν οργανικά οξέα, ακολουθούν αυτοί με αμινοξέα και οι λιγότερο πολικοί περιλαμβάνουν σάκχαρα και πολυόλες, με πολικότητα που βρίσκεται κοντά σε εκείνη του νερού και της μεθανόλης. Ακολούθως, η διαλυτική ικανότητα των NaDESs παρουσιάζει ένα μεγάλο εύρος, καθώς μπορούν να διαλυτοποιήσουν μη υδατοδιαλυτούς μεταβολίτες και φυσικά προϊόντα με μικρά και μεγάλα μοριακά βάρη. Η διαλυτική ικανότητα φυσικά επηρεάζεται από την πολικότητα του διαλύτη, και μπορεί να τροποποιηθεί αν χρειαστεί με την προσθήκη νερού. Όμως, οι NaDESs είναι εξαιρετικοί διαλύτες, όχι μόνο λόγω της ικανότητάς τους να διαλύουν βιολογικά μόρια που δεν είναι υδατοδιαλυτά, αλλά και επειδή φαίνεται να σταθεροποιούν τα μόρια αυτά. Φάσματα NMR και FT-IR έχουν δείξει έντονες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαλυμένων ουσιών και των NaDESs, το οποίο εξηγεί την ισχυρή διάλυση και σταθεροποίηση που παρουσιάζουν οι συγκεκριμένοι διαλύτες. (Itoh & Koo, 2019)

Όσον αφορά την τοξικότητά τους, κάποιοι NaDESs που περιέχουν οργανικά οξέα έχει παρατηρηθεί ότι μπορούν να δράσουν επιζήμια στα κύτταρα κυρίως λόγω της μείωσης του pH που προκαλούν. Σε δοκιμές με βακτήρια, παρατηρήθηκε πως οι NaDESs με οργανικό οξύ διαθέτουν αντιβακτηριακές ιδιότητες αφού ανέστειλαν την ανάπτυξή τους. Συγκεκριμένα, τα Gram-αρνητικά βακτήρια επηρεάστηκαν περισσότερο από τα θετικά επειδή διαθέτουν μια λιποπολυσακχαριδική μεμβράνη εξωτερικά του κυτταρικού τους τοιχώματος. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως, σε μελέτη με ανθρώπινες κυτταρικές καρκινικές σειρές, η κυτταροτοξικότητα των NaDESs φάνηκε να επηρεάζεται από τους εξής παράγοντες:

1. pH: Ο πιο τοξικός NaDES ήταν αυτός με το χαμηλότερο pH που προέκυπτε από την παρουσία οργανικού οξέος.
2. Κυτταρικά μεταβολικά μονοπάτια: Τα κύτταρα φαίνεται να παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανεκτικότητα σε συστατικά που χρησιμοποιούνται στον μεταβολισμό τους. Συνεπώς, NaDESs με τέτοια συστατικά είναι λιγότερο τοξικά, και για ασφαλούς διαλύτες θα πρέπει να προτιμώνται τα υλικά αυτά που είναι απαραίτητα στο κύτταρο.

3. Φυσικές ιδιότητες των NaDESs: Παρατηρήθηκε πως ο λιγότερο τοξικός NaDES είχε χαμηλό ιξώδες. Συνεπώς, η τοξικότητα συνδέεται ανάλογα με τις φυσικές ιδιότητες, ειδικά το ιξώδες.
4. Αλληλεπίδραση NaDESs με την κυτταρική μεμβράνη: Με τη βοήθεια προσομοιώσεων, συμπεραίνεται πως η ισχυρή αλληλεπίδραση ενός NaDES με ορισμένες λειτουργικές ομάδες που βρίσκονται πάνω στην κυτταρική μεμβράνη, μπορεί να οδηγήσει στη διείσδυση και τη συσσώρευση του διαλύτη μέσα στο κύτταρο καθιστώντας τον πιθανώς τοξικό.

Οι NaDESs λοιπόν μπορεί να είναι τοξικοί υπό συγκεκριμένες συνθήκες σε βακτήρια και κύτταρα θηλαστικών. Το χαρακτηριστικό αυτό όμως δίνει νέες προοπτικές για χρήση τους ως αντιβακτηριακές ουσίες και αντικαρκινικούς παράγοντες. Η διασφάλιση της μη τοξικότητάς τους για τις υπόλοιπες χρήσεις μπορεί να γίνει με βάσει τους 4 παράγοντες όπως περιεγράφηκαν παραπάνω. (Itoh & Koo, 2019)

## 2. Πειραματικό Μέρος

### 2.1. Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης έρευνας είναι η μελέτη της σταθερότητας του DNA από φυτικά κύτταρα σε φυσικούς βαθώς ευτηκτικούς διαλύτες. Το DNA απομονώνεται από φυτικούς ιστούς (συγκεκριμένα από *Musa acuminata*, το γνωστό φρούτο μπανάνα) και στη συνέχεια διαλύεται σε διάλυμα NaDES. Αρχικά, έγινε μελέτη για την εύρεση του κατάλληλου διαλύματος NaDES για τη διάλυση του DNA. Η διαδικασία απομόνωσης του DNA βελτιστοποιείται μέσω πειραματικού σχεδιασμού με τη χρήση του λογισμικού Design Expert. Οι παράμετροι που εξετάζονται είναι η περιεκτικότητα χλωριούχου νατρίου (M) στο διάλυμα λύσης κυττάρων, η περιεκτικότητα της αιθανόλης (% v/v) για την ανάδυση του DNA και η περιεκτικότητα του υδατικού διαλύματος σε NaDES (% v/v) όπου τελικά διαλύεται το DNA που έχει απομονωθεί. Οι αποκρίσεις που παρατηρούνται είναι το βάρος του απομονωμένου DNA (mg), η καθαρότητά του ( $A_{260}/A_{280}$ ) και η σταθερότητά του (d). Συγκεκριμένα, η καθαρότητα προσδιορίζεται με φασματοφωτομετρία UV-Vis, από τον λόγο της απορρόφησης του εκάστοτε δείγματος στα 260 nm προς την απορρόφησης του στα 280 nm, ενώ η σταθερότητα προσδιορίζεται επίσης μέσω της φασματοφωτομετρίας UV-Vis, με τη διατήρηση της κορυφής κοντά στα 260 nm και την επαρκή απορρόφηση στο συγκεκριμένο μήκος κύματος. Με τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές διάλυσης και συντήρησης ct-DNA συγκριτικά με το αντίστοιχο φυσικό μίγμα του NaDES και με το διάλυμα Tris-HCl pH 7.4. Τέλος, έγινε μελέτη αλληλεπίδρασης του ct-DNA με τον NaDES που έχει επιλεγεί και με ασκορβικό οξύ, το οποίο συγκρίθηκε με την αντίστοιχη αλληλεπίδραση του ασκορβικού οξέος όταν το ct-DNA είναι διαλυμένο σε διάλυμα Tris-HCl pH 7.4. Τέλος, έγινε μέτρηση του pH και της πολικότητας των διαλυμάτων NaDESs που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ πραγματοποιήθηκαν και μετρήσεις DLS και FT-IR για το DNA που απομονώθηκε από την *Musa acuminata*.

### 2.2. Όργανα και αντιδραστήρια

Στους ακόλουθους πίνακες παρατίθενται τα όργανα, οι συσκευές και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για όλες τις διαδικασίες που περιλάμβανε η παρούσα έρευνα.

Πίνακας 3. Όργανα και συσκευές

Όργανα- Συσκευές	Κατασκευαστής	Μοντέλο
Αναδευτήρας τύπου Vortex	Velp	ZX4
Ζυγός ακριβείας (έως 210 g)	Kern	ADJ 200-4
Ζυγός ακριβείας (έως 2 g)	Sartorius	M2P
Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενη εστία	Witeg	MSH-20A
Θερμαινόμενο λουτρό	Büchi	B-480
Πεχάμετρο	Metrohm	744
Φασματοφωτόμετρο UV-Vis	Jasco	V-777

	BioTek	Epoch 2
<b>Φασματοφωτόμετρο FT-IR</b>	Jasco	4200
<b>Dynamic Light Scattering (DLS)</b>	Malvern Panalytical	Zetasizer Nano ZS
<b>Incubator</b>	Gallenkamp	-

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια

Αντιδραστήρια	Χημικός τύπος	Παρασκευαστής/ Προμηθευτής
<b>Αιθανόλη</b>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Sigma-Aldrich
<b>Ασκορβικό οξύ</b>	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	Penta
<b>Βεταΐνη (άνυδρη)</b>	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	Alfa Aesar
<b>Γαλακτικό οξύ</b>	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Labkem
<b>Γλυκερόλη (άνυδρη)</b>	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Penta
<b>Νερό (απιονισμένο)</b>	H <sub>2</sub> O	-
<b>Οξαλικό οξύ</b>	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-
<b>Χλωριούχο νάτριο</b>	NaCl	Penta
<b>B-Αλανίνη</b>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	Merck
<b>ct-DNA</b>	-	Sigma-Aldrich
<b>L-Προλίνη</b>	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	Glentham
<b>Nile red</b>	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Glentham

## 2.3. Μέθοδοι

### 2.3.1. Χαρακτηρισμός με φασματοφωτομετρία UV-Vis

Η φασματοφωτομετρία ορατού-υπεριώδους φωτός βασίζεται στην απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας μήκους κύματος 100-800 nm από μόρια διαλυμένης ουσίας, διεσπαρμένης σε μια υγρή φάση, που υφίστανται ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις. Συνήθως, οι μετρήσεις γίνονται είτε στην περιοχή 400-800 nm (ορατό), είτε στα 190-400 nm (εγγύς υπεριώδες), καθώς ο αέρας και ο χαλαζίας (το υλικό κατασκευής των κυψελίδων) απορροφούν σε μήκη κύματος 100-190 nm (άπω υπεριώδες).

Στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis μετράται η διαπερατότητα  $T$  (Transmittance) που ορίζεται από τον τύπο

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

όπου  $I_0$  η αρχική ένταση της ακτινοβολίας και  $I$  η ένταση της ακτινοβολίας μετά την μερική της απορρόφηση από το δείγμα.

Η διαπερατότητα σχετίζεται με την απορροφητικότητα  $A$  μέσω της ακόλουθης σχέσης

$$A = -\log T = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (3)$$

Με την μέτρηση της απορροφητικότητας ενός στοιχείου σε συγκεκριμένο μήκος κύματος και με την εφαρμογή του νόμου του Lambert-Beer, μπορεί να γίνει προσδιορισμός της συγκέντρωσης του στοιχείου αυτό στο διάλυμα. Στην παρούσα εργασία, η φασματοφωτομετρία δεν χρησιμοποιείται για λόγους ποσοτικοποίησης, αλλά χαρακτηρισμού, οπότε δεν θα αναλυθεί η διαδικασία για τον ποσοτικό προσδιορισμό.

#### 2.3.1.1. Πειραματική διαδικασία

---

Αρχικά, σε δύο κυψελίδες χαλαζία όγκου 1.4 mL τοποθετείται το διάλυμα για την βαθμονόμηση του οργάνου (λευκό). Στη συνέχεια, στη μία κυψελίδα, αραιώνεται κατάλληλα το διάλυμα που οδηγείται για φωτομέτρηση και λαμβάνεται η μέτρηση στο επιθυμητό εύρος μήκους κύματος.

#### 2.3.2. Χαρακτηρισμός με φασματοφωτομετρία FT-IR

---

Η φασματοφωτομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας ( $400-4000 \text{ cm}^{-1}$ ) από τα μόρια μιας ένωσης τα οποία διεγείρονται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης όταν αυτές είναι κβαντισμένες.

Συγκεκριμένα, το σημαντικό μέρος ενός φασματομέτρου FT-IR είναι το συμβολόμετρο Μίκελσον. Η δέσμη φωτός διέρχεται από έναν σχάστη, ο οποίος την χωρίζει στα δύο, σε δύο διαφορετικές κατευθύνσεις που είναι κάθετες μεταξύ τους. Η μία δέσμη ανακλάται πίσω από ένα σταθερό κάτοπτρο. Η δεύτερη δέσμη ανακλάται από ένα κινούμενο κάτοπτρο που κινείται συνεχώς σε μια απόσταση 2.5  $\mu\text{m}$ . Η κίνηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή του συνολικού μήκους της διαδρομής της ακτίνας. Όταν οι δύο δέσμες συναντηθούν ξανά στον σχάστη, η διαφορά του μήκους των διαδρομών τους δημιουργεί μια αλληλουχία από παρεμβολές, το λεγόμενο συμβολόγραμμα. Η ανασυνδυασμένη ακτίνα διαπερνά το δείγμα και αυτό με τη σειρά του απορροφά τα χαρακτηριστικά μήκη κύματος του φάσματός του, τα οποία αφαιρούνται από το συμβολόγραμμα. Ο ανιχνευτής μετρά την διακύμανση της ενέργειας ως προς το χρόνο για όλα τα μήκη κύματος. Ο μετασχηματισμός Fourier επιτρέπει τη μετατροπή του φάσματος ενέργειας ως προς τον χρόνο σε φάσμα έντασης ως προς τη συχνότητα σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση

$$A(r) = \sum X(k) \exp\left(-2\pi \frac{irk}{N}\right) \quad (4)$$

#### 2.3.3. Δυναμική σκέδαση φωτός

---

Η δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) είναι η κατεξοχήν μέθοδος χαρακτηρισμού νανοσωματιδίων. Μπορεί να παρέχει πληροφορίες για το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό των σωματιδίων. Η μέθοδος βασίζεται στην κίνηση Brown ή αλλιώς τυχαία θερμική κίνηση. Μια δέσμη φωτός χτυπάει το δείγμα και το DLS μετράει τις στατιστικές διακυμάνσεις της έντασης του φωτός (λόγω των συγκρούσεων με τα σωματίδια) σε



συνάρτηση με το χρόνο. Μικρότερα σωματίδια προκαλούν μεγαλύτερες διακυμάνσεις έντασης και έχουν υψηλό συντελεστή διάχυσης, ενώ αντίθετα τα μεγάλα σωματίδια δίνουν μικρότερες διακυμάνσεις.

### 2.3.3.1. Πειραματική διαδικασία

Μετά τη συλλογή του DNA από την απομόνωση και τη ζύγισή του, λαμβάνονται 2 mg και διαλύονται σε 10 mL του βέλτιστου διαλύματος NaDES όπως αυτό προσδιορίστηκε από τον πειραματικό σχεδιασμό. Με σύριγγα προστίθεται ποσότητα του μίγματος σε κυψελίδα τύπου U (DTS1070) μέχρι την πλήρη διαβροχή των ηλεκτροδίων της και ελέγχεται ώστε να μην υπάρχουν φυσαλίδες στο διάλυμα. Η κυψελίδα εισέρχεται στο όργανο και λαμβάνονται 3 μετρήσεις για το μέγεθος και 3 για το ζ-δυναμικό. Ακολούθως, ζυγίζονται 2 mg ct-DNA και διαλύονται σε 10 mL του βέλτιστου διαλύματος NaDES. Ακολουθεί αραιώση 1 mL αυτού του μίγματος σε 5 mL υπερκάθαρου νερού. Πραγματοποιούνται οι ίδιες μετρήσεις και λαμβάνεται το μέγεθος και το ζ-δυναμικό του.

### 2.3.4. Παρασκευή NaDES και διαλυμάτων

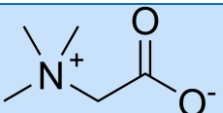
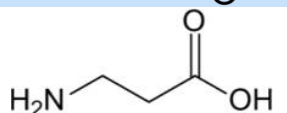
Για την σύνθεση των NaDESs χρησιμοποιήθηκαν ως κύρια συστατικά η βεταΐνη και αμινοξέα (B-Αλανίνη, L-Προλίνη), τα οποία συνδυάστηκαν με οργανικά οξέα σε συγκεκριμένες αναλογίες ώστε να σχηματίσουν ευτηκτικά συστήματα. Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται τα συστατικά και οι μοριακές αναλογίες τους.

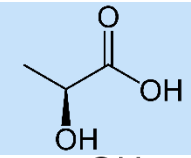
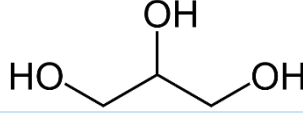
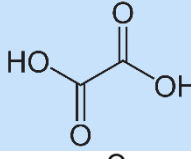
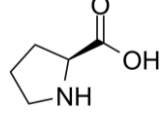
Πίνακας 5. NaDESs που παρασκευάστηκαν

Κωδικός	Συστατικό 1	Συστατικό 2	Μοριακή αναλογία	Συντομογραφία
1	Βεταΐνη	Γλυκερόλη	1:2	Bet-Gly
2	B-Αλανίνη	Γαλακτικό οξύ	1:2	AL-LA
3	L-Προλίνη	Γαλακτικό οξύ	1:2	PR-LA
4	L-Προλίνη	Οξαλικό οξύ	1:1	PR-OX

Στον επόμενο Πίνακα παρουσιάζονται τα βασικά χαρακτηριστικά των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των NaDESs.

Πίνακας 6. Βασικές πληροφορίες των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή NaDESs.

Ένωση	Μοριακός τύπος	Συντακτικός τύπος	Μοριακό βάρος (g/mol)	Σημείο Τήξης (°C)	Πυκνότητα (g/cm <sup>3</sup> )
Βεταΐνη	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>		117.15	-	-
B-Αλανίνη	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>		89.09	-	-

<b>Γαλακτικό οξύ</b>	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>		90.08	16.8	1.21
<b>Γλυκερόλη</b>	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>		92.09	17.8	1.26
<b>Οξαλικό οξύ</b>	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>		90.03	190	1.90
<b>L-Προλίνη</b>	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>		115.13		-

#### 2.3.4.1. Πειραματική διαδικασία

Για την σύνθεση των NaDESs χρησιμοποιήθηκε η συμβατική μέθοδος της ανάδευσης υπό θέρμανση. Αρχικά, γίνεται ο υπολογισμός των ποσοτήτων των συστατικών με βάση τη μοριακή τους αναλογία, και ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας. Στη συνέχεια, τα συστατικά αναμιγνύονται σε σφαιρική φιάλη υπό ήπια θέρμανση (60-80 °C) με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα μέχρι τον σχηματισμό ενός διαυγούς ρευστού (συνήθως χρειάζονται μερικές ώρες, ανάλογα με τα συστατικά του κάθε διαλύματος). Στη συνέχεια, το ρευστό μεταφέρεται σε δοχείο αποθήκευσης.

Για την παρασκευή των υδατικών διαλυμάτων NaDESs, ανάλογα με την εκάστοτε επιθυμητή αναλογία % v/v και τον επιθυμητό συνολικό όγκο, υπολογίζονται τα mL NaDES και συμπληρώνεται απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου.

#### 2.3.4.2. Μέτρηση pH

Αρχικά, γίνεται βαθμονόμηση του πεχάμετρου με ρυθμιστικό διάλυμα με pH 4.0 και με ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.0. Στη συνέχεια, το πεχάμετρο εμβαπτίζεται στο κάθε NaDES και υδατικό διάλυμα που έχει παρασκευαστεί και καταγράφεται η ένδειξη. Το πεχάμετρο ξεπλένεται καλά με απιονισμένο νερό πριν εμβαπτιστεί σε κάθε νέο διάλυμα.

#### 2.3.4.3. Μέτρηση πολικότητας

Για την μέτρηση της πολικότητας των NaDESs και των διαλυμάτων, γίνεται χρήση της φασματοφωτομετρίας UV-Vis. Σε κυψελίδα χαλαζία χωρητικότητας 1.4 mL, τοποθετούνται 990 μL του μελετώμενου διαλύματος και γίνεται μέτρηση της απορρόφησης του στην περιοχή 400-700 nm. Στη συνέχεια, στην κυψελίδα προστίθενται ακόμα 10 μL της ουσίας Nile red, γίνεται κατάλληλη ανάδευση και επαναλαμβάνεται η μέτρηση. Το μέγιστο μήκος κύματος  $\lambda_{max}$  που εμφανίζεται χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της πολικότητας με βάση τον εξής μαθηματικό τύπο

$$E_{NR} \left( \frac{kcal}{mol} \right) = \frac{28591}{\lambda_{max} (nm)} \quad (5)$$

όπου  $E_{NR}$  είναι η ενέργεια μοριακής μετάβασης. Με βάση την κλίμακα πολικότητας του Nile red, όταν η ενέργεια μοριακής μετάβασης λαμβάνει χαμηλές τιμές, η πολικότητα είναι υψηλή, ενώ όταν η ενέργεια έχει υψηλή τιμή η πολικότητα είναι χαμηλή. Αναφέρονται ενδεικτικά οι πολικότητες του νερού και της αιθανόλης (Karadendrou et al., 2022)

$$E_{NR}^{H_2O} = 48.20 \text{ kcal/mol} \quad (6) \quad E_{NR}^{EtOH} = 52.17 \text{ kcal/mol} \quad (7)$$

#### 2.3.4.4. Παρασκευή φυσικού μίγματος

---

Για την παρασκευή του αντίστοιχου φυσικού μίγματος ενός NaDES υπολογίζονται οι ποσότητες των συστατικών που απαιτούνται με βάση την αναλογία του NaDES και την τελική περιεκτικότητα του υδατικού διαλύματος σε NaDES. Τα συστατικά και το απιονισμένο νερό αναδεύονται σε συσκευή vortex για λίγα λεπτά μέχρι τον σχηματισμό διαυγούς διαλύματος.

#### 2.3.5. Απομόνωση και συντήρηση DNA από φυτικά κύτταρα

---

Η διαδικασία απομόνωσης DNA από φυτικά κύτταρα βελτιστοποιήθηκε με πειραματικό σχεδιασμό όπως ήδη αναφέρθηκε. Εξετάστηκαν οι παράμετροι της περιεκτικότητας σε NaCl (M) στο διάλυμα λύσης κυττάρων, η % v/v περιεκτικότητα EtOH στο διάλυμα για την ανάδυση του DNA και τέλος η % v/v περιεκτικότητα σε NaDES του υδατικού διαλύματος που χρησιμοποιείται για τη διάλυση και συντήρηση του ανακτημένου DNA.

##### 2.3.5.1. Πειραματική διαδικασία

---

Αρχικά, παρασκευάζεται το διάλυμα λύσης κυττάρων. Σε όγκο 100 mL απιονισμένου νερού, διαλύονται 6 g σαπουνιού και μερικά g NaCl, ανάλογα με την τελική συγκέντρωση που χρειάζεται. Τα συστατικά αναδεύονται προσεκτικά σε ποτήρι ζέσεως μέχρι να ομογενοποιηθεί το διάλυμα και αποφεύγεται ο σχηματισμός φυσαλίδων. Η *Musa acuminata* καθαρίζεται και τεμαχίζεται σε μικρά κομμάτια, τα οποία τοποθετούνται σε πλαστικό σακουλάκι ώστε να πολτοποιηθούν και να προκληθεί μηχανική λύση των κυττάρων. Όταν δεν υπάρχουν πλέον κομμάτια, προστίθεται το διάλυμα λύσης κυττάρων που έχει παρασκευαστεί, και το μίγμα αναδεύεται προσεκτικά για την αποφυγή αφρισμού. Η ήπια ανάδυσή του συνεχίζεται σε θερμαινόμενο λουτρό στους 60 °C για 15 min. Με το πέρας του χρόνου, το μίγμα αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Στο μίγμα γίνεται προσθήκη 1 mL φυσικού χυμού ανανά (μικρή περιεκτικότητα ενζύμων που βοηθούν στον καθαρισμό του DNA από πρωτεΐνες). Στη συνέχεια, το μίγμα διηθείται και συλλέγεται το διήθημα. Παρασκευάζονται τα διαλύματα EtOH που θα χρησιμοποιηθούν για την ανάδυση του DNA με βάση την περιεκτικότητα % v/v που έχει αποφασιστεί. Σε δοκιμαστικό σωλήνα, προστίθενται 8 mL από το διήθημα και 10 mL διαλύματος EtOH. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφήνονται να ηρεμήσουν έως 1 h για να γίνει ανάδυση του DNA και σχισοποίησή του. Ακολούθως, με μια ράβδο «ψαρεύεται» το DNA που έχει αναδυθεί στην επιφάνεια της οργανικής φάσης, ξεπλένεται στο διάλυμα περιεκτικότητας EtOH που έχει χρησιμοποιηθεί και τοποθετείται σε διηθητικό χαρτί ώστε να απορροφήσει μεγάλο μέρος της περιεχόμενης υγρασίας. Τέλος, η ποσότητα που έχει συλλεχθεί από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας και καταγράφεται η μάζα του (mg).



*Εικόνα 3. Ανάδυση DNA με χρήση διαλύματος EtOH*

Ζυγίζονται περίπου 3 mg απομονωμένου DNA σε ζυγό ακριβείας και διαλύονται σε υδατικό διάλυμα NaDES (% v/v ανάλογα με το πείραμα). Γίνεται μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στο εύρος 250-400 nm με την πάροδο των ημερών ώστε να παρατηρείται η μεταβολή του λόγου απορρόφησης  $A_{260}/A_{280}$  (καθαρότητα), και η εμφάνιση κορυφής στα 260-270 nm (σταθερότητα).



*Εικόνα 4. Απομονωμένο DNA*

### 2.3.5.2. Πειραματικός σχεδιασμός

Ο πειραματικός σχεδιασμός της διαδικασίας έγινε με τη χρήση του λογισμικού Design Expert. Μελετήθηκαν 3 ανεξάρτητες μεταβλητές και 3 εξαρτημένες (Box Behnken 3x3), όπως φαίνονται συνοπτικά στον Πίνακα 7. Σκοπός είναι η μεγιστοποίηση και των τριών αποκρίσεων, δηλαδή της μάζας DNA που απομονώνεται, της καθαρότητας και της σταθερότητας του.

Πίνακας 7. Παράμετροι μελέτης και αποκρίσεις προς βελτίωση

Παράμετροι	Αποκρίσεις
Συγκέντρωση NaCl (M)	Μάζα απομονωμένου DNA (mg)
Περιεκτικότητα EtOH (% v/v)	Καθαρότητα (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )
Περιεκτικότητα NaDES Bet-Gly 1:2 (% v/v)	Σταθερότητα (d)

Αρχικά ορίζονται άνω και κάτω όρια για τις παραμέτρους που μελετώνται (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Οριοθέτηση παραμέτρων πειραματικού σχεδιασμού

Factor	Name	Units	Minimum	Maximum	Coded Low	Coded High	Mean	Std. Dev.
A	[NaCl]	M	0.3	0.6	-1 ↔ 0.3	+1 ↔ 0.6	0.45	0.1061
B	EtOH	% v/v	70	100	-1 ↔ 70	+1 ↔ 100	85	10.61
C	Bet-Gly 1:2	% v/v	1	5	-1 ↔ 1	+1 ↔ 5	3	1.41

Στον Πίνακα 9 συνοψίζονται τα προτεινόμενα πειράματα που προέκυψαν από το Design Expert. Σκοπός είναι η μεγιστοποίηση

Πίνακας 9. Παράγοντες μελέτης απομόνωσης και συντήρησης DNA

Run	Factor 1 A: [NaCl] (M)	Factor 2 B: EtOH (% v/v)	Factor 3 C: Bet-Gly 1:2 (% v/v)
1	0.6	70	3
2	0.3	70	3
3	0.3	100	3
4	0.45	100	5
5	0.3	85	1
6	0.6	100	3
7	0.45	85	3
8	0.45	85	3
9	0.45	85	3
10	0.6	85	5
11	0.45	70	1
12	0.45	85	3
13	0.6	85	1



<b>14</b>	0.45	70	5
<b>15</b>	0.45	85	3
<b>16</b>	0.45	100	1
<b>17</b>	0.3	85	5

Με την συσχέτιση των παραμέτρων και την προτεινόμενη βελτιστοποίηση της διαδικασίας, πραγματοποιούνται πειράματα για την επιβεβαίωση των βέλτιστων τιμών των ανεξάρτητων μεταβλητών.

### 2.3.6. Συντήρηση ct-DNA

Ζυγίζονται 0.4 mg ct-DNA σε ζυγό ακριβείας και διαλύονται στο υδατικό διάλυμα NaDES Bet-Gly 1:2 με τη βέλτιστη συγκέντρωση που επιβεβαιώθηκε από τον πειραματικό σχεδιασμό. Το διάλυμα φωτομετρείται στα 250-400 nm με την πάροδο των ημερών για την παρατήρηση της καθαρότητας και της σταθερότητάς του. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές.

Ακολουθείται η ίδια διαδικασία για τη διάλυση του ct-DNA στο αντίστοιχο φυσικό μείγμα του NaDES και σε διάλυμα Tris-HCl pH 7.4. Ενδεικτικά, γίνεται και διάλυσή του σε σκέτο απιονισμένο νερό.

### 2.3.7. Μελέτη αλληλεπίδρασης

Τα διαλύματα υπό μελέτη φωτομετρώνται στα 250-400 nm. Καταγράφεται η μέγιστη απορρόφηση και το μήκος κύματος στο οποίο εμφανίζεται και μέσω της εξίσωσης Benesi-Hilderbrand υπολογίζεται η σταθερά σύνδεσης με το DNA  $K_b$

$$\frac{1}{A_f - A_{obs}} = \frac{1}{A_f - A_{fc}} + \frac{1}{K_b \cdot (A_f - A_{fc}) \cdot [DNA]} \quad (8)$$

όπου  $A_f$  η απορρόφηση της ελεύθερης ένωσης,  $A_{obs}$  η παρατηρούμενη απορρόφηση και  $A_{fc}$  η απορρόφηση κορεσμού. Ο υπολογισμός της σταθεράς  $K_b$  πραγματοποιείται με τη βοήθεια του υπολογιστικού εργαλείου Excel και τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων.

Όταν μια ένωση παρεμβάλλεται στο DNA παρατηρείται μείωση απορρόφησης (υποχρωμία). Αντιθέτως, όταν η ένωση δεσμεύεται εξωτερικά του DNA (ηλεκτροστατικά ή στην αύλακα) παρατηρείται υπερχρωμία, δηλαδή αύξηση της απορρόφησης. Επίσης, παρατηρείται γενικά μετατόπιση του μήκους κύματος της μέγιστης απορρόφησης, φαινόμενο το οποίο συνδέεται με τη σταθεροποίηση του DNA. Έτσι, παρατηρείται το φαινόμενο της βαθυχρωμίας ή ερυθρής μετατόπισης (μετατόπιση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος) και της υψιχρωμίας ή κυανής μετατόπισης (μετατόπιση σε χαμηλότερα μήκη κύματος). Η βαθυχρωμία αντιστοιχεί σε σταθεροποίηση της ελικοειδούς δομής του DNA μέσω της αλληλεπίδρασης της ένωσης, ενώ η υψιχρωμία είναι ενδεικτική της αποσταθεροποίησης του DNA.

#### 2.3.7.1. Αλληλεπίδραση με υδατικό διάλυμα NaDES Bet-Gly 1:2

Παρασκευάζεται πυκνό διάλυμα ct-DNA (5mM) σε διάλυμα Tris-HCl pH 7.4. Στη συνέχεια, με βάση το νόμο αραιώσης παρασκευάζονται διαλύματα συγκεντρώσεων 300, 200, 100, 75, 50,

40 και 30  $\mu\text{M}$  όπως φαίνεται στον Πίνακα 10. Ο τελικός όγκος ( $V_T$ ) ορίζεται ως 5000  $\mu\text{L}$ , και για να επιτευχθούν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις ( $c_T$ ) από την αρχική ( $c_{\text{αρχ}}=5 \text{ mM}$ ) λαμβάνονται όγκοι  $V_{\text{αρχ}}$  από το αρχικό διάλυμα. Συμπληρώνεται μέχρι τελικού όγκου διάλυμα Tris-HCl ( $V_{\text{διαλ}}$ ). Σε 7 φιαλίδια Eppendorf, τοποθετούνται 990  $\mu\text{L}$  των 7 διαλυμάτων ct-DNA και 10  $\mu\text{L}$  του διαλύματος NaDES. Τα φιαλίδια επωάζονται για 5 min στους 37 °C. Στη συνέχεια, φωτομετρούνται στα 250-400 nm όπως αναλύθηκε παραπάνω.

Πίνακας 10. Συγκεντρώσεις ct-DNA διαλυμάτων αλληλεπίδρασης

$C_T$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{αρχ}}$ ( $\mu\text{L}$ )	$V_{\text{διαλ}}$ ( $\mu\text{L}$ )	$V_T$ ( $\mu\text{L}$ )
30	30	4970	5000
40	40	4960	5000
50	50	4950	5000
75	75	4925	5000
100	100	4900	5000
200	200	4800	5000
300	300	4700	5000

#### 2.3.7.2. Αλληλεπίδραση με ασκορβικό οξύ

Η μελέτη αλληλεπίδρασης του ασκορβικού οξέος έγινε και σε διάλυμα NaDES και σε διάλυμα Tris-HCl pH 7.4. Ακολουθείται η ίδια διαδικασία, και παρασκευάζονται 2 πυκνά διαλύματα ct-DNA (5mM), ένα σε διάλυμα Tris-HCl και ένα σε διάλυμα NaDES Bet-Gly 1:2. Παρασκευάζεται διάλυμα ασκορβικού οξέος 10mM σε EtOH. Πραγματοποιούνται οι ίδιες αραιώσεις και συνθήκες επώασης. Στο τέλος, τα αποτελέσματα της φασματομέτρησης συγκρίνονται.

### 3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

#### 3.1. Διαλυτική ικανότητα NaDESs

Αρχικά, μελετήθηκε η ικανότητα διάλυσης διάφορων διαλυμάτων του DNA που απομονώθηκε από φυτικά κύτταρα. Δοκιμάστηκαν υδατικά διαλύματα των NaDESs PR-OX 1:1, PR-LA 1:2 και AL-LA 1:2 σε περιεκτικότητες 5 και 10 %. Κανένα από αυτά τα διαλύματα δεν πέτυχε διάλυση του DNA, καθώς το διάλυμα συνέχιζε να παρουσιάζει συσσωματώματα και δεν ήταν εφικτή η φωτομέτρησή τους στο UV-Vis. Το διάλυμα NaDES Bet-Gly 1:2 περιεκτικότητας 1 % διέλυσε το DNA και αυτό διαπιστώθηκε και από την φωτομέτρηση του διαλύματος.

Τα συγκεκριμένα NaDESs επιλέχθηκαν καθώς αλληλεπιδρούν με το DNA σύμφωνα με μελέτες του εργαστηρίου. Όμως, η έλλειψη ικανότητας διάλυσής του, αποδόθηκε σε φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τελικών διαλυμάτων, όπως το pH και η πολικότητα. Τα δύο αυτά χαρακτηριστικά είναι κρίσιμα σημασίας για να επιτευχθεί η σωστή διάλυση του DNA και η μετέπειτα συντήρησή του για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Στον Πίνακα 11 καταγράφονται οι τιμές του pH των NaDESs όπως αυτές μετρήθηκαν.

Πίνακας 11. pH παρασκευασμένων NaDESs

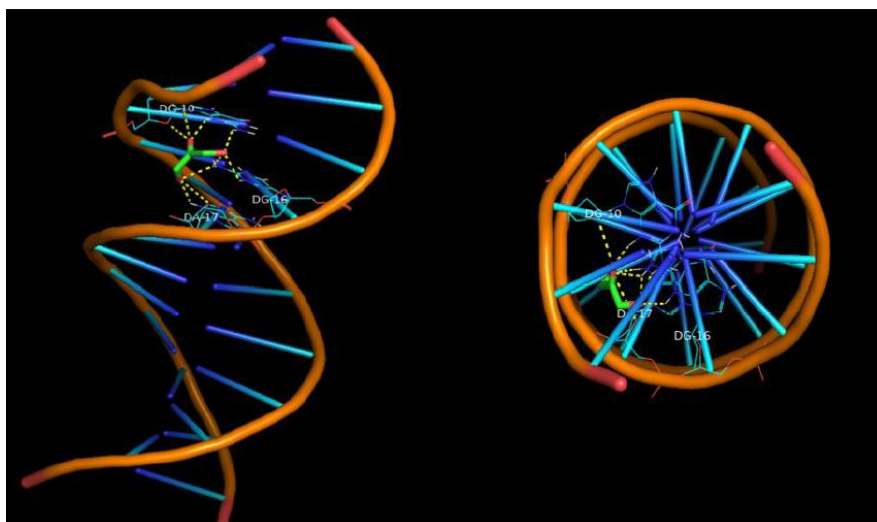
NaDES	pH
PR-OX 1:1	2.04
PR-LA 1:2	2.76
AL-LA 1:2	3.50
Bet-Gly 1:2	6.62

Είναι φανερό πως τα NaDESs με βάση την προλίνη και την αλανίνη έχουν ιδιαίτερα όξινο χαρακτήρα. Παρ' όλο που η διαλυτότητα του DNA φαίνεται να μην επηρεάζεται για τιμές pH από 5 έως 9, στις υπόλοιπες τιμές μειώνεται δραματικά με την αλλαγή του pH και είναι δυνατόν να προκληθεί αποπουρίνωση και σπάσιμο της έλικας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι πολικές ομάδες που εμπλέκονται στους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των ζευγών βάσεων αποκτούν φορτίο και ιονίζονται. Τα μόρια του DNA λαμβάνουν μορφή «πηνίου», δηλαδή περιεληγμένη μορφή, και δεν είναι πια μια καθαρά διατεταγμένη έλικα. Η περιεληγμένη μορφή αυξάνει την πρόσβαση σε θέσεις πρωτονίωσης και συνεπώς δεσμεύονται περισσότερα πρωτόνια. Το DNA μπορεί να φτάσει μέχρι και το στάδιο της μετουσίωσης, το οποίο είναι αναντίστροφο αποτέλεσμα. (Cheng & Pettitt, 1992; Kohne et al., 1968; Roberts & Crothers, 1992) Η επιρροή αυτή στην σταθερότητα της διπλής έλικας είναι αντίθετη από το επιθυμητό αποτέλεσμα και φυσικά καταλυτικός παράγοντας για να απορριφθούν τα συγκεκριμένα διαλύματα, τα οποία ακόμα και στις αραιές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν δεν κατάφεραν το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Η μελέτη συνεχίστηκε με το NaDES Bet-Gly, το οποίο παρουσιάζει επιθυμητή τιμή pH και κατάφερε να διαλύσει το DNA. Αξίζει να σημειωθεί πως, σύμφωνα με μελέτη molecular docking που έχει πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο, η γλυκερόλη παρουσιάζει υψηλή δράση όσον αφορά την αλληλεπίδραση με το DNA. Συγκεκριμένα, εμφανίζει ενέργεια αλληλεπίδρασης ίση με -4.2 kcal/mol, και προσφέρει 9 θέσεις για δεσμούς υδρογόνου με τα



νουκλεοτίδια. Εμφανίζει σταθεροποιητική δράση μέσω σύνδεσής της στη δευτερεύουσα αύλακα του DNA.



Εικόνα 5. Υπολογιστική μελέτη αλληλεπίδρασης γλυκερόλης-DNA

Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται οι μετρήσεις του pH του NaDES Bet-Gly 1:2 και των υδατικών διαλυμάτων του περιεκτικότητας 1, 3 και 5 %.

Πίνακας 12. pH NaDES Bet-Gly 1:2 και διαλυμάτων

	pH
NaDES Bet-Gly 1:2	6.62
Υδατικό δ/μα 1 % NaDES	6.58
Υδατικό δ/μα 3 % NaDES	6.40
Υδατικό δ/μα 5 % NaDES	5.44

Στον Πίνακα 13 παρουσιάζονται τα μέγιστα μήκη κύματος και η πολικότητα που προκύπτει από αυτά.

Πίνακας 13. Πολικότητα NaDES Bet-Gly 1:2 και διαλυμάτων

	$\lambda_{max}$ (nm)	$E_{RN}$ (kcal/mol)
EtOH	548	52.17
NaDES Bet-Gly 1:2	566	50.51
Υδατικό δ/μα 1 % NaDES	580	49.29
Υδατικό δ/μα 3 % NaDES	582	49.13
Υδατικό δ/μα 5 % NaDES	588	48.62
H <sub>2</sub> O	593	48.20

Παρατηρείται πως οι πολικότητες είναι πιο κοντινές στην πολικότητα του νερού γεγονός που ενισχύει την διαλυτική ικανότητα των διαλυμάτων για το πολικό μόριο του DNA.

### 3.2. Απομόνωση και συντήρηση φυτικού DNA

Μέσω του πειραματικού σχεδιασμού, όπως αυτός περιεγράφηκε άνωθεν, εκτελέστηκαν τα προτεινόμενα πειράματα και καταγράφηκαν οι αποκρίσεις, όπως φαίνονται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14. Παράγοντες μελέτης απομόνωσης και συντήρησης φυτικού DNA και αντίστοιχες αποκρίσεις

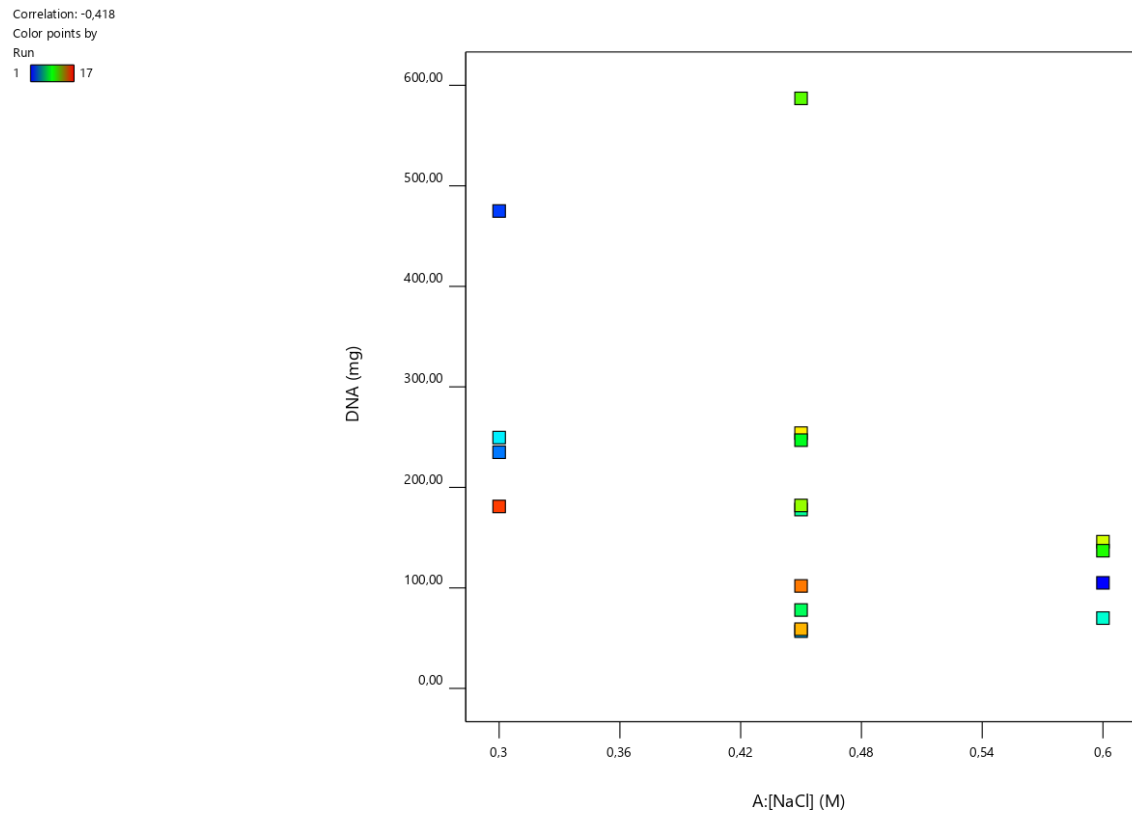
<b>Run</b>	<b>Factor 1 A: [NaCl] (M)</b>	<b>Factor 2 B: EtOH (% v/v)</b>	<b>Factor 3 C: Bet-Gly 1:2 (% v/v)</b>	<b>Response 1 DNA (mg)</b>	<b>Response 2 Stability (Days)</b>	<b>Response 3 Purity (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>)</b>
1	0.6	70	3	105.00	13	1.37
2	0.3	70	3	475.00	6	0.68
3	0.3	100	3	235.00	6	1.31
4	0.45	100	5	57.00	8	1.34
5	0.3	85	1	250.00	3	1.15
6	0.6	100	3	70.00	7	1.26
7	0.45	85	3	178.00	8	1.31
8	0.45	85	3	78.00	16	1.35
9	0.45	85	3	247.00	11	1.40
10	0.6	85	5	137.00	7	1.42
11	0.45	70	1	587.00	6	1.37
12	0.45	85	3	182.00	6	1.48
13	0.6	85	1	146.00	12	1.41
14	0.45	70	5	254.00	3	1.15
15	0.45	85	3	59.00	10	1.28
16	0.45	100	1	102.00	4	1.35
17	0.3	85	5	181.00	7	1.32

Παρατηρείται πως η καθαρότητα δεν ξεπέρασε το 1.48, όμως αξίζει να σημειωθεί πως η μέθοδος απομόνωσης που χρησιμοποιήθηκε είναι η πιο απλή και δεν κάνει χρήση χημικών παραγόντων για τον περαιτέρω καθαρισμό του ανακτώμενου DNA κατά τη διάρκεια της απομόνωσης. Συνεπώς, η υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες στο τέλος της διεργασίας είναι λογικά επόμενο.

Μέσω του λογισμικού Design Expert, δοκιμάστηκαν μοντέλα και με βάση τη σημαντικότητα των παραμέτρων στην εκάστοτε περίπτωση, επιλέχθηκε το κατάλληλο για την κάθε παράμετρο.

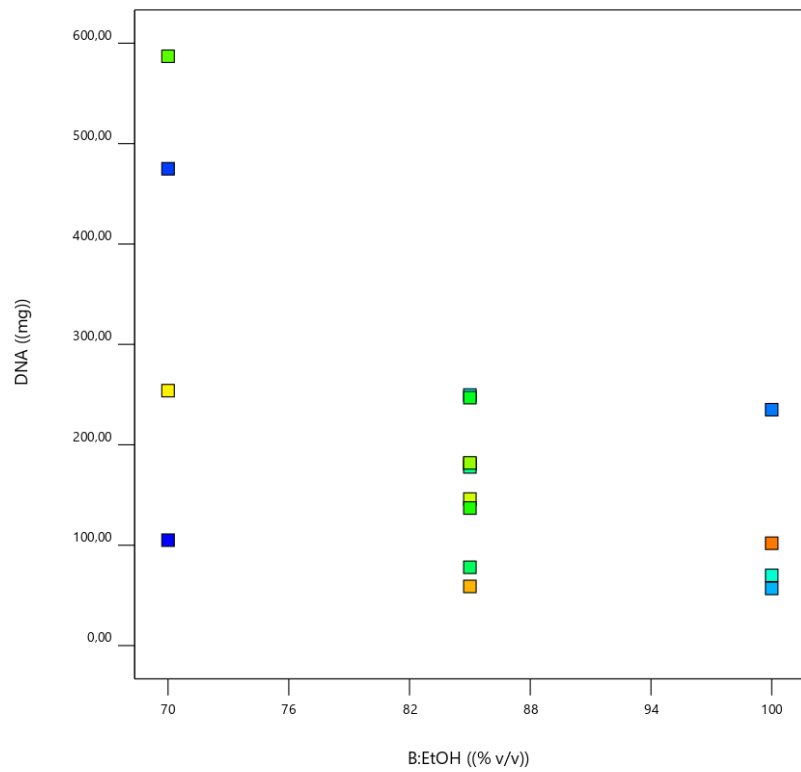
### 3.2.1. Ποσότητα DNA

Αρχικά αναλύεται η επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στην παραλαμβανόμενη ποσότητα DNA.



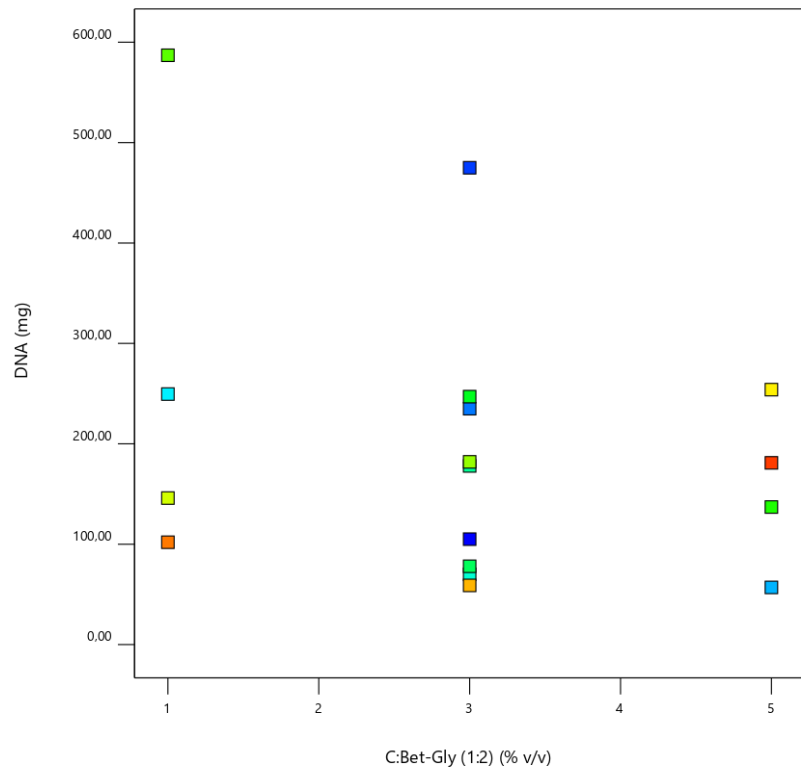
Διάγραμμα 2. Συσχέτιση συγκέντρωση NaCl με την παραλαμβανόμενη ποσότητα DNA

Correlation: -0,587  
 Color points by  
 Run  
 1 



Διάγραμμα 3. Συσχέτιση περιεκτικότητας EtOH με την παραλαμβανόμενη ποσότητα DNA

Correlation: -0,279  
 Color points by  
 Run  
 1 



Διάγραμμα 4. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES Bet-Gly 1:2 με την παραλαμβανόμενη ποσότητα DNA.

Από τα διαγράμματα συσχέτισης μπορούν να γίνουν οι ακόλουθες παρατηρήσεις. Αρχικά, η συγκέντρωση του NaCl στο διάλυμα λύσης κυττάρων, όταν λαμβάνει μικρές τιμές φαίνεται να προσφέρει υψηλότερη απόδοση διεργασίας στο σύνολο των πειραμάτων, ενώ στη μέγιστη τιμή που δοκιμάστηκε παρατηρείται μείωση στην παραλαμβανόμενη ποσότητα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η αυξημένη συγκέντρωση αλάτων στο διάλυμα μπορεί να συμβάλει στην καταστροφή του DNA λόγω των ιόντων που ελευθερώνονται και την πρόσδεσή τους πάνω στις πολωμένες βάσεις του DNA. Συνεπώς, η συγκέντρωση του άλατος πρέπει να είναι τέτοια ώστε να επιτρέπει την μεγαλύτερη δυνατή απελευθέρωση χωρίς όμως να επιφέρει δραστικά αποτελέσματα στην δευτεροταγή δομή της έλικας του DNA.

Ακολούθως, η περιεκτικότητα σε EtOH στο διάλυμα ανάδυσσης του DNA φαίνεται να έχει καλύτερα αποτελέσματα όταν είναι χαμηλότερη. Δηλαδή, ο συνδυασμός αιθανόλης και νερού δίνει καλύτερα αποτελέσματα από ό,τι η καθαρή αιθανόλη. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στα συνδυαστικά χαρακτηριστικά του διαλύματος: η παγωμένη αιθανόλη προσφέρει την κατάλληλη θερμοκρασία για να αναδυθεί το DNA και φυσικά ένα πιο άπολο περιβάλλον ώστε να μην διαλυθεί σε αυτό και να σκοινοποιηθεί ευκολότερα, ενώ το νερό έχοντας μεγαλύτερη συγγένεια με το μόριο του DNA βοηθάει να αναδυθεί μεγαλύτερη ποσότητα.

Η περιεκτικότητα του NaDES Bet-Gly 1:2 φαίνεται να μην επηρεάζει ιδιαίτερα καθώς για τις διαφορετικές τιμές της η ποσότητα του DNA κατανέμεται ομοιόμορφα.

Για την εύρεση του κατάλληλου μοντέλου που να περιγράφει την ανακτώμενη ποσότητα DNA με βάση τις τρεις παραμέτρους, χρησιμοποιήθηκε η στατιστική ανάλυση ANOVA και εξετάστηκε η σημαντικότητα των ανεξάρτητων μεταβλητών και των πεπλεγμένων όρων τους. Η ανακτώμενη ποσότητα DNA βρέθηκε ότι περιγράφεται καλύτερα από το τροποποιημένο κυβικό μοντέλο (Reduced Cubic Model). Για να θεωρείται ένας όρος σημαντικός στο συγκεκριμένο μοντέλο πρέπει να έχει  $p$ -value  $< 0.05$ . Φυσικά, το ίδιο το μοντέλο πρέπει να έχει  $p$ -value  $< 0.05$  για να γίνει αποδεκτό. Στην προκειμένη περίπτωση, οι παράμετροι του μοντέλου λαμβάνουν τις τιμές που φαίνονται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15. Τιμές παραμέτρων μοντέλου πρόβλεψης ανακτώμενης ποσότητας DNA

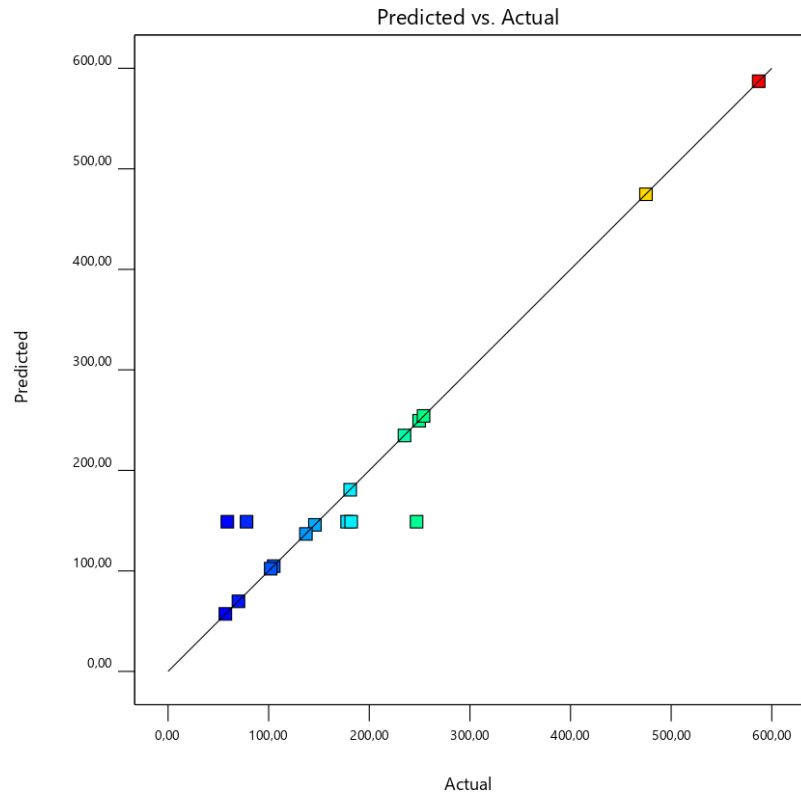
<b>Reduced Cubic Model for DNA Recovery</b>		
<b>Παράμετρος</b>	<b>Τιμή</b>	
p-value	0.0340	
F-value	5.68	
Lack of Fit	p-value	0.9917
	F-value	0.0001
R <sup>2</sup>	0.9259	
Adjusted R <sup>2</sup>	0.7627	
Adeq Precision	8.9797	

Η  $p$ -value είναι πράγματι μικρότερη του 0.05 ενώ η έλλειψη προσαρμογής είναι 0.9917. Αυτό σημαίνει ότι η μη προσαρμογή στο μοντέλο οφείλεται κατά 99.17 % σε θόρυβο και δεν θεωρείται σημαντική (η τιμή F-value του lack of fit σημαίνει ότι η έλλειψη προσαρμογής δεν είναι σημαντική σε σχέση με το καθαρό σφάλμα). Η τιμή F-value του μοντέλου δηλώνει ότι

το μοντέλο είναι σημαντικό και υπάρχει μόνο 3.40 % πιθανότητα αυτή η F-value να έχει προκύψει από θόρυβο. Το  $R^2$  λαμβάνει την τιμή 0.9259, η οποία δηλώνει πολύ καλή προσαρμογή, ενώ ταυτόχρονα η τιμή του προσαρμοσμένου του  $R^2$  δείχνει ότι το μοντέλο προσφέρει καλή προβλεψιμότητα. Τέλος, η Adeg Precision υπολογίζεται από τον λόγο του σήματος προς τον θόρυβο. Είναι επιθυμητό να λαμβάνει τιμή μεγαλύτερη του 4, συνθήκη την οποία ικανοποιεί το παρόν μοντέλο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον σχεδιασμό.

DNA

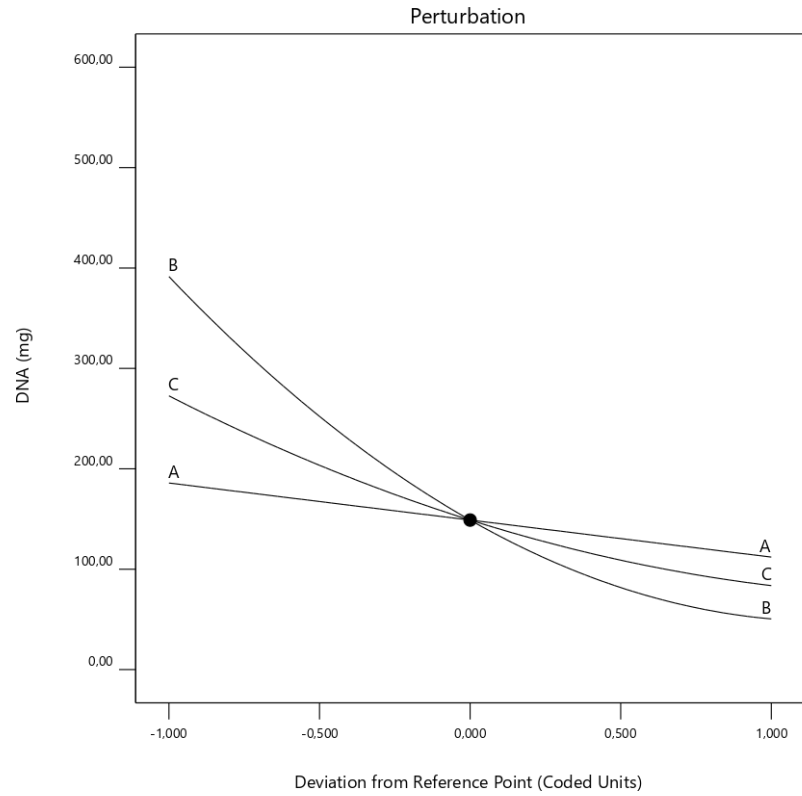
Color points by value of  
DNA:  
57,00 587,00



Διάγραμμα 5. Πραγματικές και προβλεπόμενες τιμές της ανακτώμενης ποσότητας DNA από το μοντέλο

Factor Coding: Actual

**Actual Factors**  
A: [NaCl] = 0,45  
B: EtOH = 85  
C: Bet-Gly (1:2) = 3



Διάγραμμα 6. Επίδραση ανεξάρτητων μεταβλητών στην ποσότητα του DNA.

Η πιο απότομη κλίση της παραμέτρου B (περιεκτικότητα της αιθανόλης) δείχνει πως η ποσότητα του DNA επηρεάζεται από αυτήν σε μεγαλύτερο βαθμό.

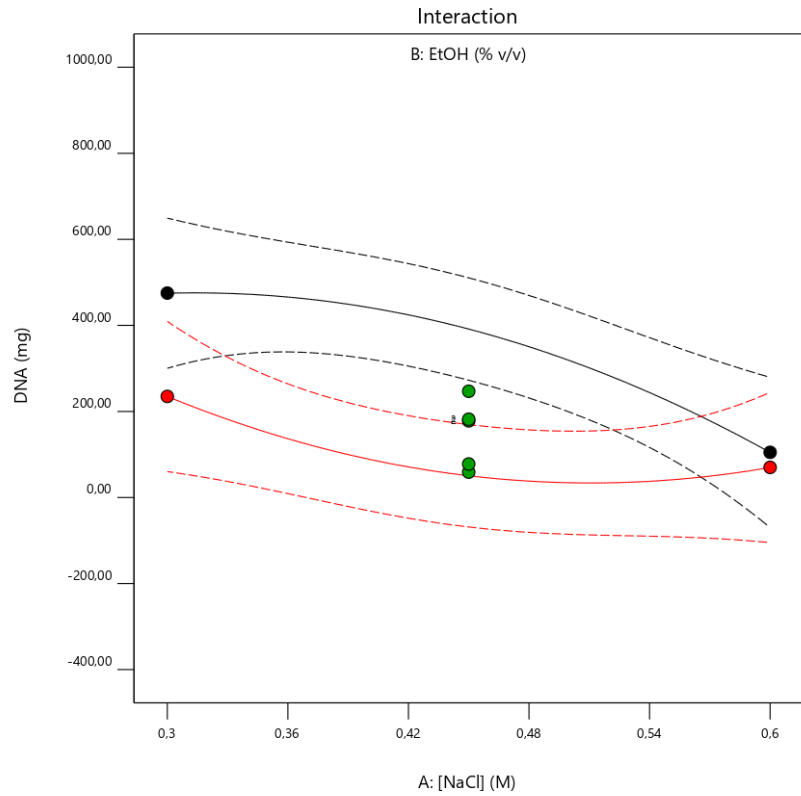


Factor Coding: Actual  
 ● Design Points  
 - - 95% CI Bands

X1 = A: [NaCl]  
 X2 = B: EtOH

**Actual Factor**  
 C: Bet-Gly (1:2) = 3

B- 70  
 B+ 100



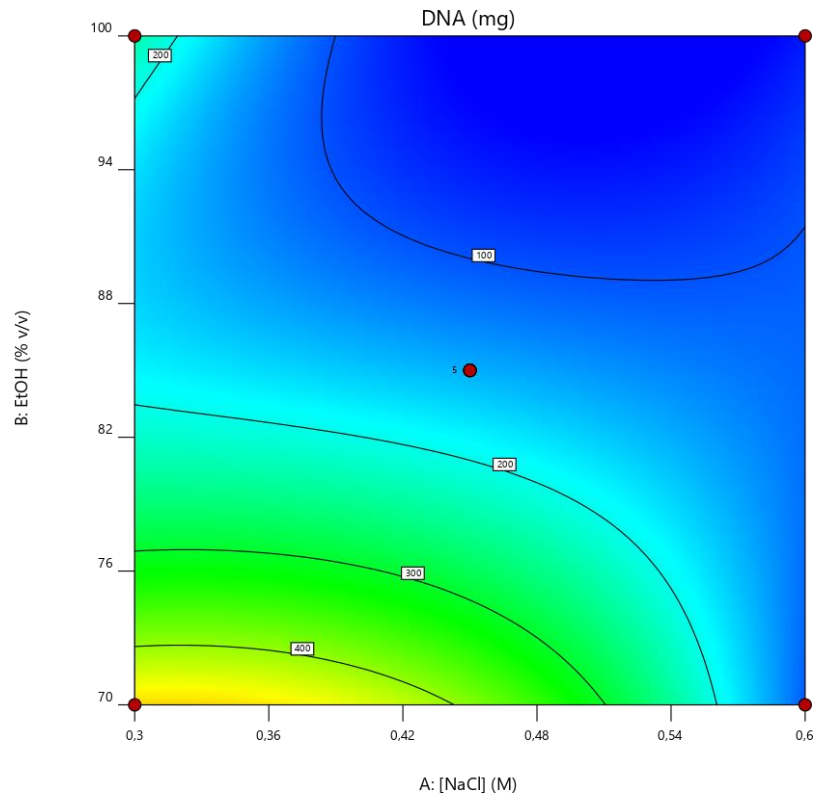
Διάγραμμα 7. Γράφημα αλληλεπίδρασης άλατος - αιθανόλης για την μεταβλητή της ποσότητας του DNA.

Στο διάγραμμα αλληλεπίδρασης μεταξύ του παράγοντα του άλατος και της αιθανόλης, παρατηρείται πως οι δύο όροι είναι πεπλεγμένοι, καθώς οι γραμμές δεν είναι παράλληλες, δηλαδή η επίδραση του ενός παράγοντα επηρεάζει τον άλλο.

Factor Coding: Actual  
 ● Design Points  
 57,00 587,00

X1 = A: [NaCl]  
 X2 = B: EtOH


**Actual Factor**  
 C: Bet-Gly (1:2) = 3



Διάγραμμα 8. Συσχέτιση ανακτώμενης ποσότητας DNA και περιεκτικότητας NaCl, EtOH

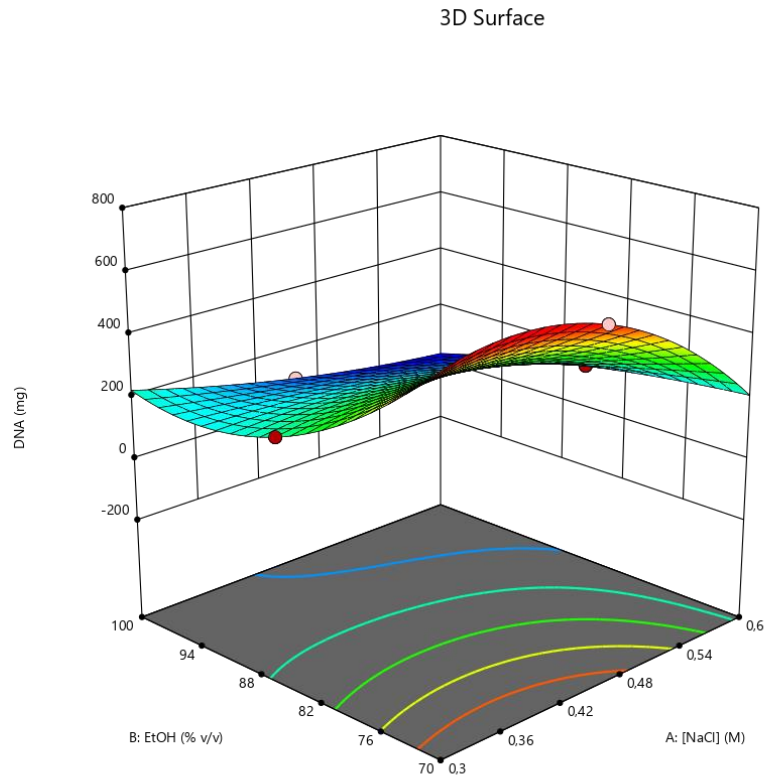
Το παραπάνω διάγραμμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της ανακτώμενης ποσότητας DNA για συγκεκριμένη συγκέντρωση NaCl και περιεκτικότητα EtOH. Φυσικά, κάποιες προβλέψεις διαφέρουν ως προς τις πειραματικές τιμές και το μοντέλο μπορεί να παρουσιάσει μικρότερη ή μεγαλύτερη ακρίβεια εντός ορισμένων ορίων σφάλματος.

Στο διάγραμμα που ακολουθεί συνοψίζεται το επιλεγμένο μοντέλο και επιτρέπει τον υπολογισμό της ποσότητας DNA.

Factor Coding: Actual  
 Design Points:  
 ● Above Surface  
 ○ Below Surface  
 57 

X1 = A: [NaCl]  
 X2 = B: EtOH

**Actual Factor**  
 C: Bet-Gly (1:2) = 1



Διάγραμμα 9. Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης NaCl, EtOH και NaDES Bet-Gly 1:2 με την ανακτώμενη ποσότητα DNA

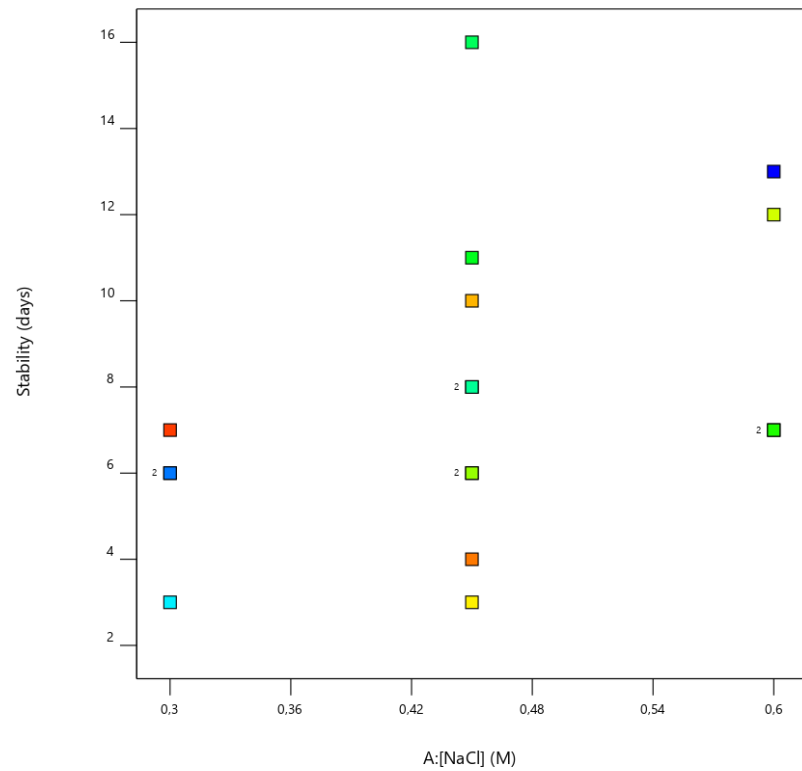
Η εξίσωση που προκύπτει για την εξαρτημένη τιμή της παραλαμβανόμενης ποσότητας του DNA είναι:

$$DNA = 148.98 - 36.90 \cdot A - 170.50 \cdot B - 94.50 \cdot C + 51.25 \cdot AB + 14.90 \cdot AC + 72.00 \cdot BC + 72.05 \cdot B^2 + 29.20 \cdot C^2 + 101.75 \cdot A^2B + 75.10 \cdot A^2C - 96.85 \cdot AB^2 \quad (9)$$

### 3.2.2. Σταθερότητα DNA

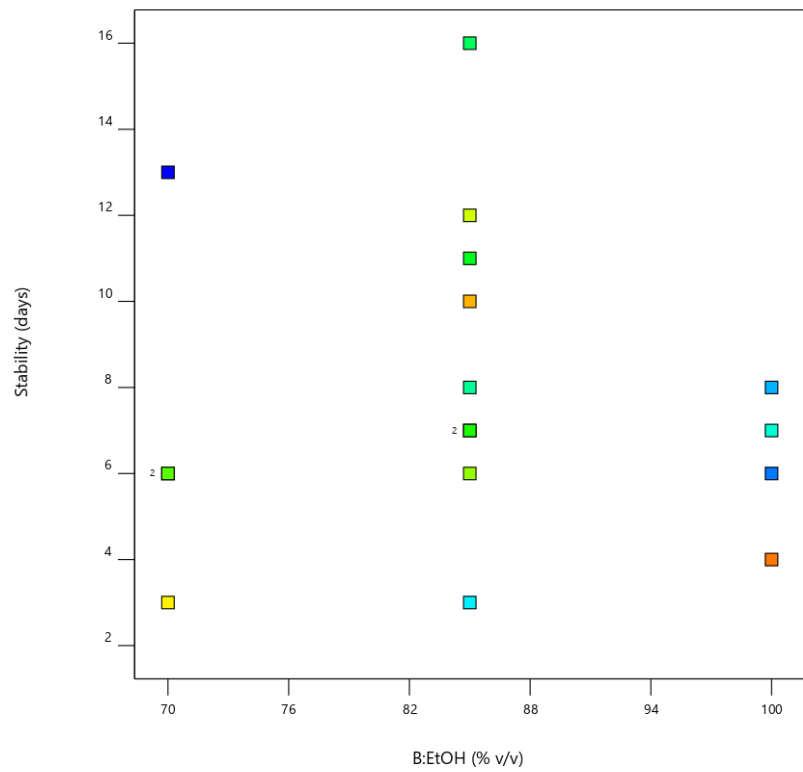
Ακολουθείται η ίδια διαδικασία ανάλυσης των ανεξάρτητων μεταβλητών ως προς την απόκριση της σταθερότητας του DNA.

Correlation: 0,422  
Color points by  
Run  
1 17



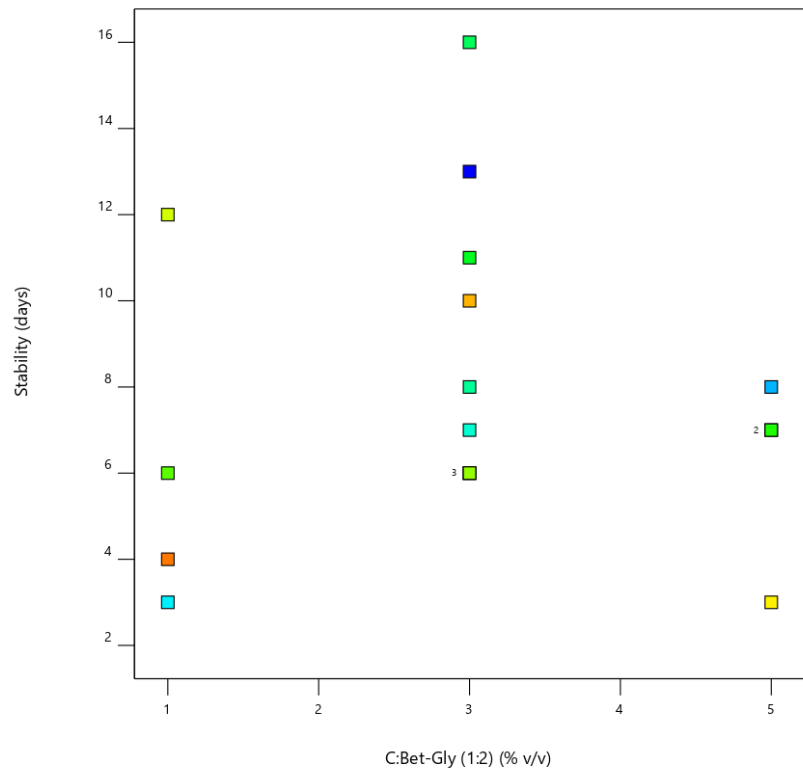
Διάγραμμα 10. Συσχέτιση συγκέντρωση NaCl με την σταθερότητα του DNA

Correlation: -0,075  
 Color points by  
 Run  
 1



Διάγραμμα 11. Συσχέτιση περιεκτικότητας EtOH με την σταθερότητα του DNA

Correlation: 0,000  
 Color points by  
 Run  
 1



Διάγραμμα 12. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES Bet-Gly 1:2 με την σταθερότητα του DNA.

Από τα διαγράμματα συσχέτισης μπορούν να γίνουν οι ακόλουθες παρατηρήσεις. Αρχικά, η συγκέντρωση του NaCl στο διάλυμα λύσης κυττάρων φαίνεται να σταθεροποιεί το DNA όταν είναι σε υψηλότερες τιμές. Όσον αφορά την περιεκτικότητα σε EtOH στο διάλυμα ανάδυσσης του DNA, παρατηρείται πως ενδιάμεσες τιμές φαίνεται να έχουν καλύτερο αποτέλεσμα στη διατήρηση του DNA. Τέλος, η περιεκτικότητα σε NaDES Bet-Gly 1:2 φαίνεται να προσφέρει καλύτερα αποτελέσματα σταθερότητας για ενδιάμεσες τιμές, ενώ στις ακραίες τιμές της φαίνεται να έχει παρόμοια συμπεριφορά.

Για την εύρεση του κατάλληλου μοντέλου που να περιγράφει την σταθερότητα του DNA με βάση τις τρεις παραμέτρους, χρησιμοποιήθηκε η στατιστική ανάλυση ANOVA όπως περιγράφηκε και παραπάνω. Λόγω αδυναμίας προσαρμογής των μοντέλων, έγινε αντίστροφος μετασχηματισμός, δηλαδή συσχετίστηκε το αντίστροφο της σταθερότητας με τις παραμέτρους. Το αντίστροφο λοιπόν της σταθερότητας του DNA βρέθηκε ότι περιγράφεται καλύτερα από το τετραγωνικό μοντέλο (Quadratic Model). Οι παράμετροι του μοντέλου λαμβάνουν τις τιμές που φαίνονται στον Πίνακα 16.

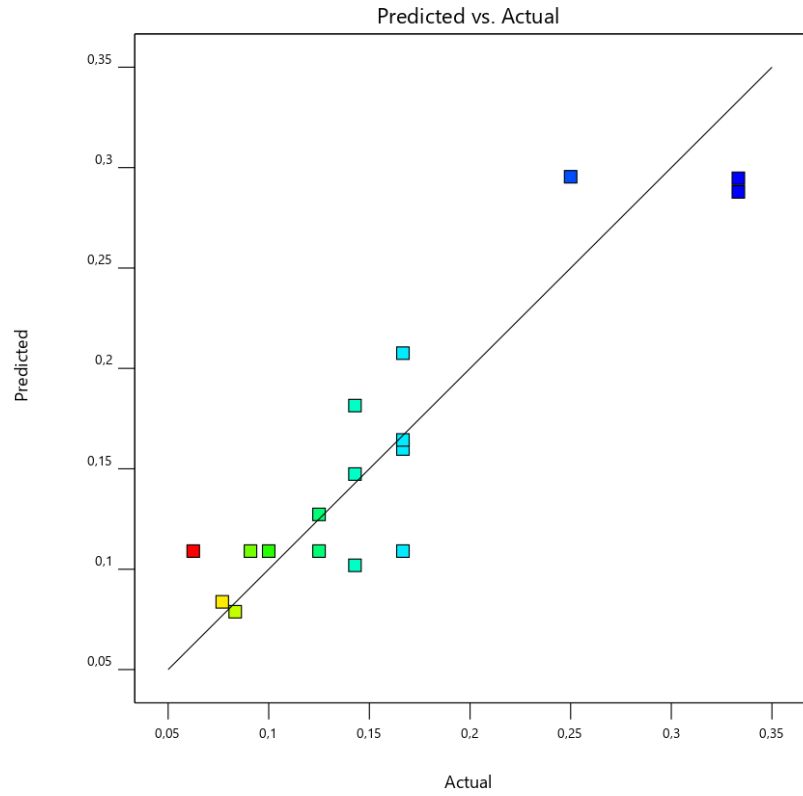
Πίνακας 16. Τιμές παραμέτρων μοντέλου πρόβλεψης σταθερότητας του DNA

Quadratic Model for DNA Stability		
Παράμετρος	Τιμή	
p-value	0.0414	
F-value	3.97	
Lack of Fit	p-value	0.2192
	F-value	2.30
R <sup>2</sup>	0.8361	
Adjusted R <sup>2</sup>	0.6253	
Adeq Precision	5.7723	

Η p-value είναι μικρότερη του 0.05. Η F-value είναι 3.97 που υποδηλώνει ότι υπάρχει μόνο 4.14 % πιθανότητα να έχει προκύψει αυτή η τιμή από θόρυβο. Η έλλειψη προσαρμογής είναι 0.2192 και σημαίνει ότι η μη προσαρμογή στο μοντέλο οφείλεται κατά 21.92 % σε θόρυβο και δεν θεωρείται σημαντική. Το R<sup>2</sup> λαμβάνει την τιμή 0.8361, η οποία δηλώνει καλή προσαρμογή. Τέλος, η Adeq Precision είναι μεγαλύτερη του 4, και παρέχει ένα επαρκές σήμα για να χρησιμοποιηθεί το συγκεκριμένο μοντέλο στον σχεδιασμό.

1/(Stability)

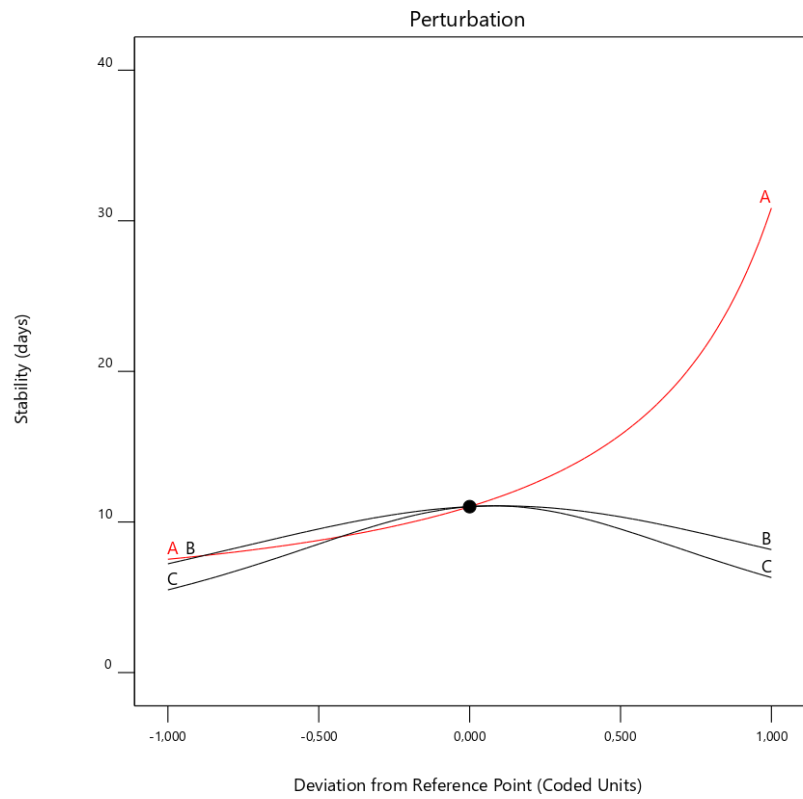
Color points by value of Stability:  
0,333 0,063



Διάγραμμα 13. Πραγματικές και προβλεπόμενες τιμές της σταθερότητας του DNA από το μοντέλο

Factor Coding: Actual

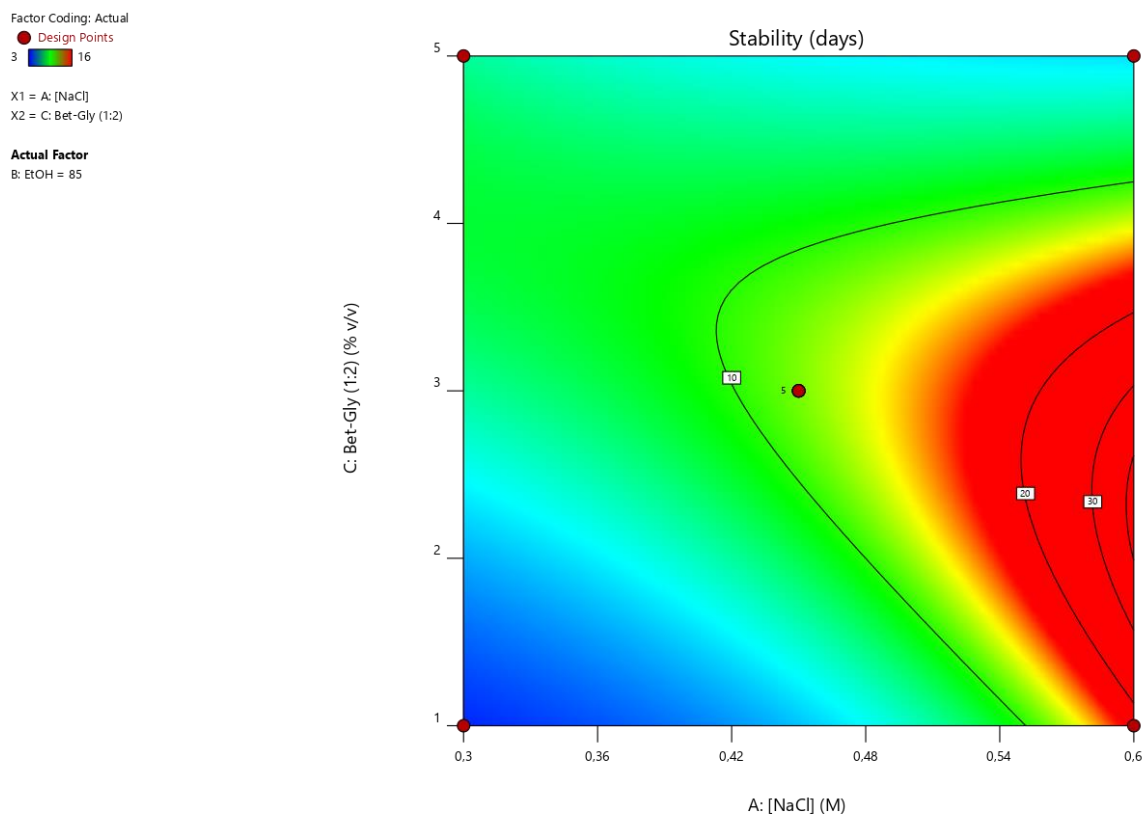
**Actual Factors**  
A: [NaCl] = 0,45  
B: EtOH = 85  
C: Bet-Gly (1:2) = 3



Διάγραμμα 14. Επίδραση ανεξάρτητων μεταβλητών στην σταθερότητα του DNA




Ο παράγοντας A (NaCl) επηρεάζει περισσότερο την σταθερότητα όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 14 αφού παρουσιάζει έντονη καμπυλότητα και αλλαγή κλίσης.

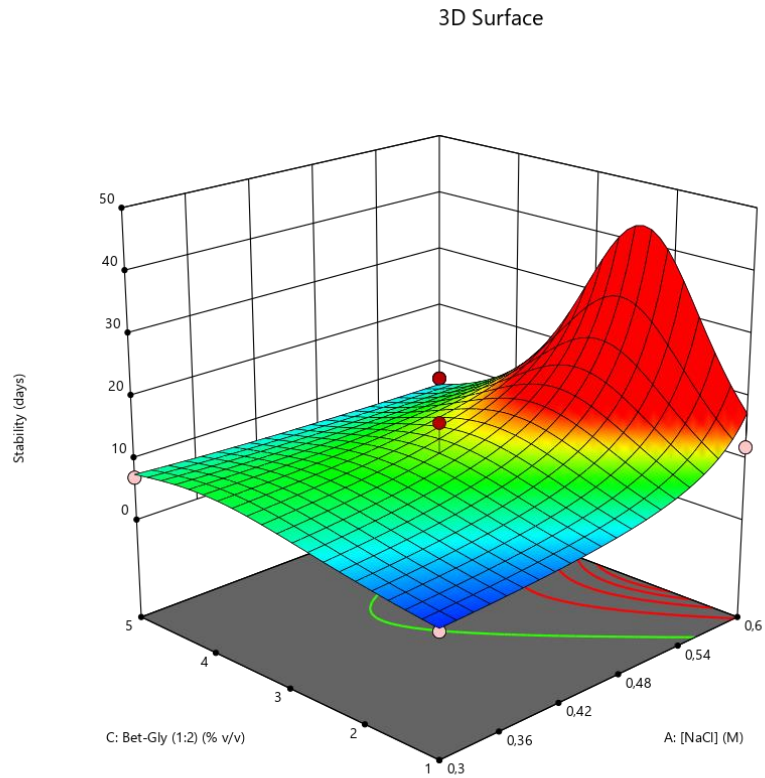


Διάγραμμα 15. Συσχέτιση σταθερότητας DNA και περιεκτικότητας NaCl, NaDES Bet-Gly 1:2

Το παραπάνω διάγραμμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της σταθερότητας του DNA για συγκεκριμένη συγκέντρωση NaCl και περιεκτικότητα NaDES Bet-Gly 1:2. Παρατηρούνται διαφορές σε κάποιες από τις προβλεπόμενες και τις υπολογισμένες τιμές και συνεπώς το μοντέλο μπορεί να παρουσιάσει μεγαλύτερη ή μικρότερη ακρίβεια.

Επιπροσθέτως, στο Διάγραμμα 16 παρουσιάζεται το επιλεγμένο μοντέλο και γίνεται εφικτός ο προσδιορισμός της σταθερότητας του DNA.

Factor Coding: Actual  
 Design Points:  
 ● Above Surface  
 ○ Below Surface  
 3   
 X1 = A: [NaCl]  
 X2 = C: Bet-Gly (1:2)  
**Actual Factor**  
 B: EtOH = 85



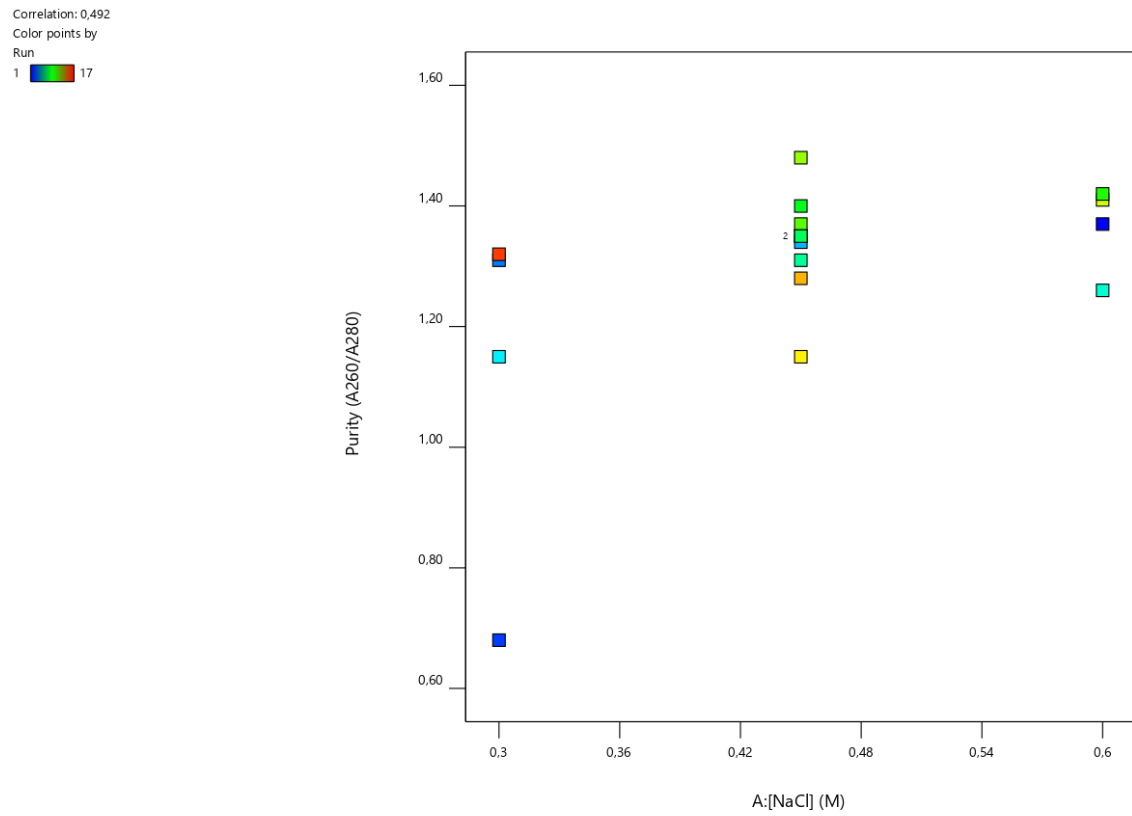
Διάγραμμα 16. Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης NaCl, EtOH και NaDES Bet-Gly 1:2 με την σταθερότητα του DNA

Η εξίσωση που προκύπτει για την εξαρτημένη τιμή της σταθερότητας του DNA είναι:

$$\frac{1}{(\text{Stability})} = 0.1090 - 0.0454 \cdot A - 0.0074 \cdot B - 0.0112 \cdot C + 0.0165 \cdot AB + 0.0625 \cdot AC - 0.0729 \cdot BC - 0.0069 \cdot A^2 + 0.0362 \cdot B^2 + 0.0735 \cdot C^2 \quad (10)$$

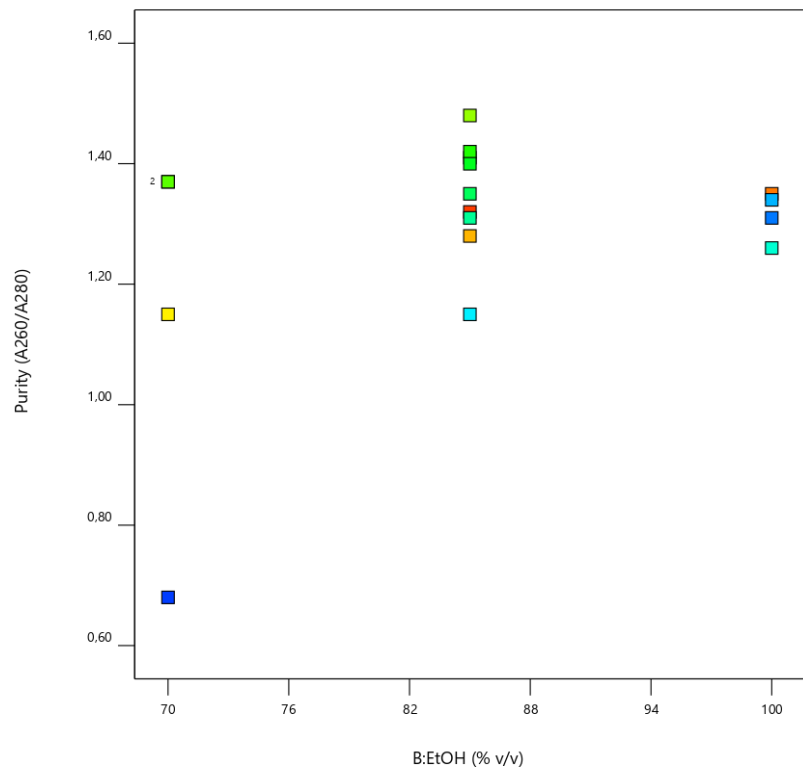
### 3.2.3. Καθαρότητα DNA

Ακολουθείται η ίδια διαδικασία ανάλυσης των ανεξάρτητων μεταβλητών ως προς την απόκριση της καθαρότητας του DNA.



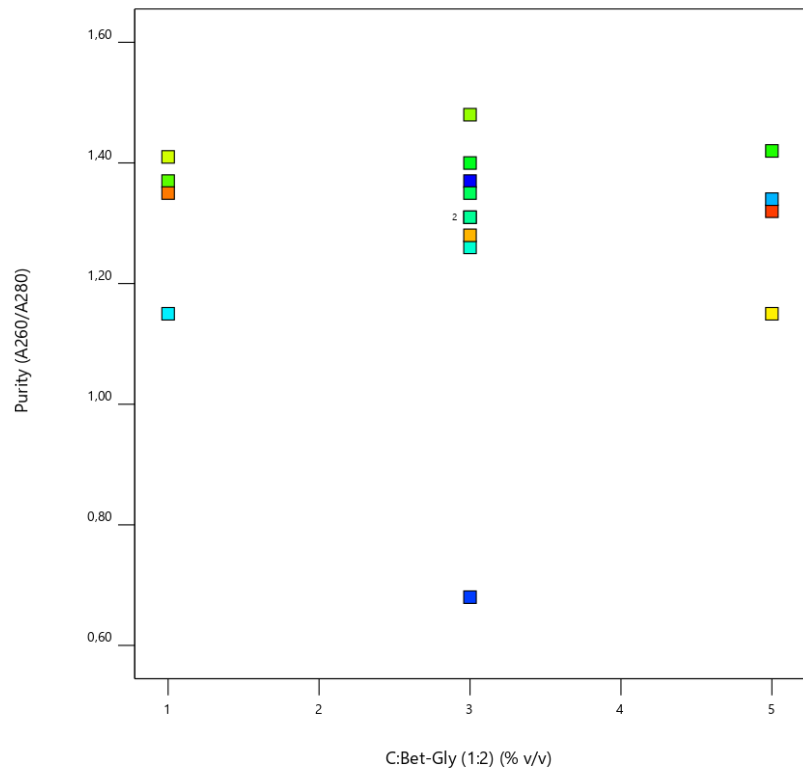
Διάγραμμα 17. Συσχέτιση συγκέντρωση NaCl με την καθαρότητα του DNA

Correlation: 0,340  
 Color points by  
 Run  
 1 17



Διάγραμμα 18. Συσχέτιση περιεκτικότητας EtOH με την καθαρότητα του DNA

Correlation: -0,025  
 Color points by  
 Run  
 1 17



Διάγραμμα 19. Συσχέτιση περιεκτικότητας NaDES Bet-Gly 1:2 με την καθαρότητα του DNA.

Από τα διαγράμματα συσχέτισης μπορούν να γίνουν οι ακόλουθες παρατηρήσεις. Αρχικά, η συγκέντρωση του NaCl στο διάλυμα λύσης κυττάρων φαίνεται να δίνει υψηλότερες τιμές καθαρότητας όταν λαμβάνει ψηλές τιμές συνολικά από ό,τι στο κάτω όριο. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε απομάκρυνση περισσότερων πρωτεϊνών κατά τη λύση των κυττάρων με υψηλότερη συγκέντρωση άλατος. Η περιεκτικότητα σε EtOH στο διάλυμα ανάδυσσης του DNA φαίνεται να προσφέρει λίγο καλύτερα αποτελέσματα σε ενδιάμεσες τιμές αλλά δεν παρουσιάζονται μεγάλες διαφορές. Όσον αφορά την περιεκτικότητα σε NaDES Bet-Gly 1:2 παρατηρείται πως οι τιμές καθαρότητας φαίνονται να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένες στις διάφορες περιεκτικότητες.

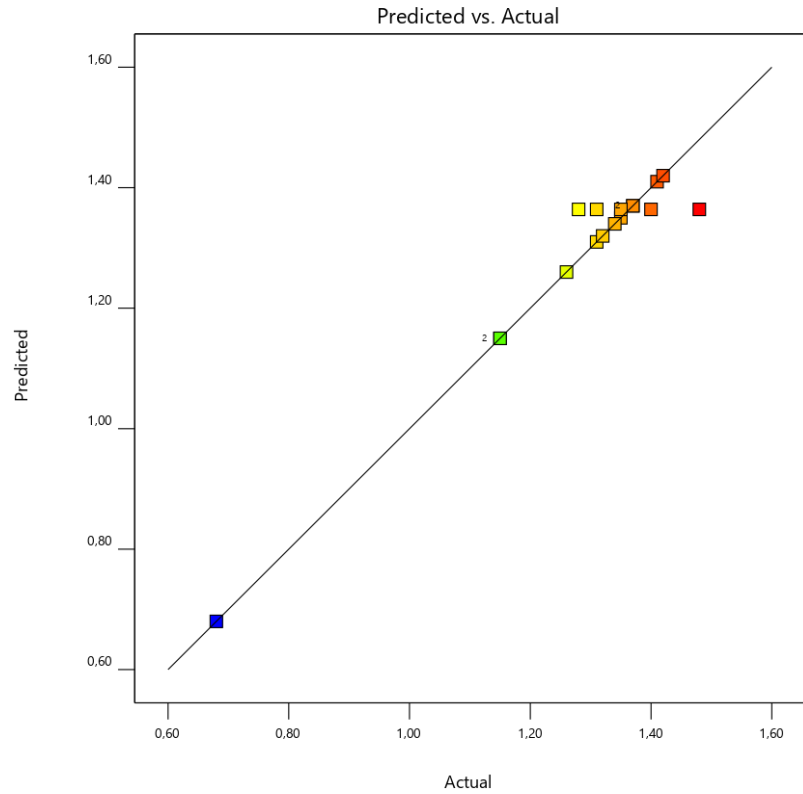
Για την εύρεση του κατάλληλου μοντέλου που να περιγράφει την καθαρότητα του DNA με βάση τις τρεις παραμέτρους, χρησιμοποιήθηκε η στατιστική ανάλυση ANOVA όπως περιεγράφηκε και παραπάνω. Η καθαρότητα του DNA βρέθηκε ότι περιγράφεται καλύτερα από το κυβικό μοντέλο (Cubic Model). Οι παράμετροι του μοντέλου λαμβάνουν τις τιμές που φαίνονται στον Πίνακα 17.

Πίνακας 17. Τιμές παραμέτρων μοντέλου πρόβλεψης καθαρότητας του DNA

Cubic Model for DNA Purity	
Παράμετρος	Τιμή
p-value	0.0416
F-value	6.5700
R <sup>2</sup>	0.9517
Adjusted R <sup>2</sup>	0.8068
Adeq Precision	10.7211

Η p-value είναι μικρότερη του 0.05. Η F-value λαμβάνει τιμή 6.5700 που υποδηλώνει ότι υπάρχει μόνο 4.16 % πιθανότητα να έχει προκύψει αυτή η τιμή από θόρυβο. Το R<sup>2</sup> ισούται με 0.9517, τιμή που δείχνει μια πολύ καλή προσαρμογή. Επιπρόσθετα, η Adeq Precision είναι μεγαλύτερη του 4, και παρέχει ένα επαρκές σήμα για να χρησιμοποιηθεί το συγκεκριμένο μοντέλο στον σχεδιασμό.

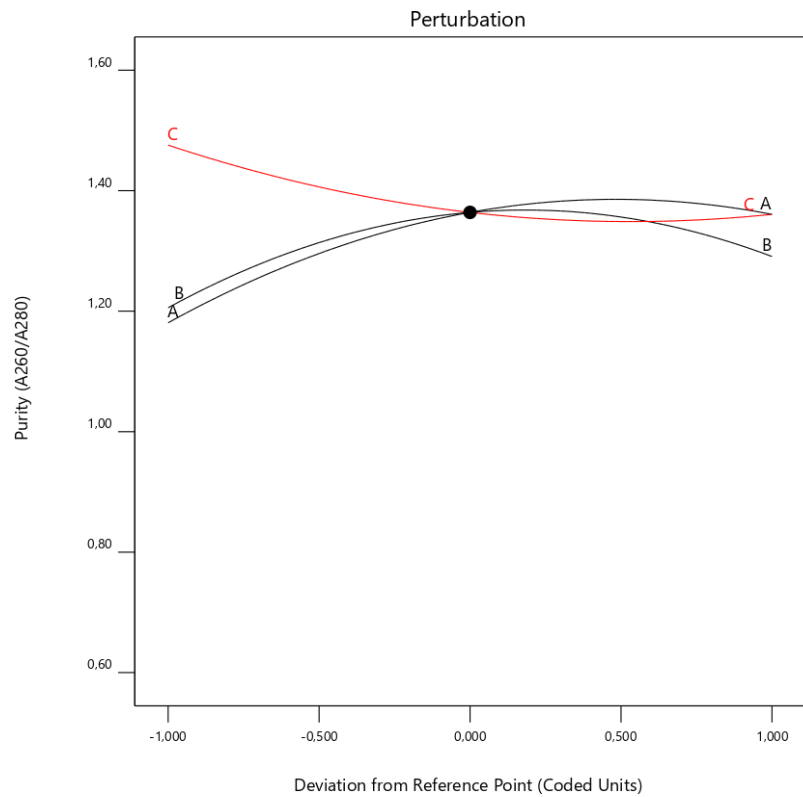
**Purity (A260/A280)**  
 Color points by value of  
 Purity (A260/A280):  
 0,68 ■ ■ ■ ■ ■ 1,48



Διάγραμμα 20. Πραγματικές και προβλεπόμενες τιμές της καθαρότητας του DNA από το μοντέλο

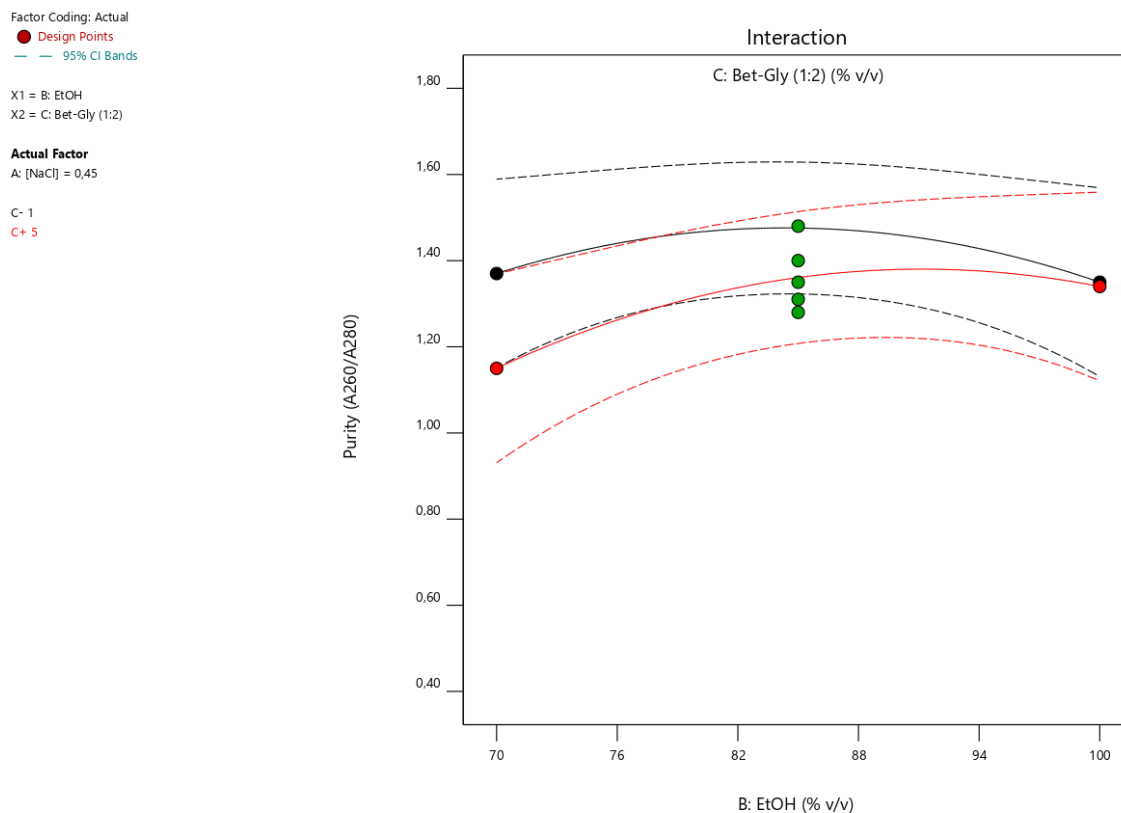
Factor Coding: Actual

**Actual Factors**  
 A: [NaCl] = 0,45  
 B: EtOH = 85  
 C: Bet-Gly (1:2) = 3



Διάγραμμα 21. Επίδραση ανεξάρτητων μεταβλητών στην καθαρότητα του DNA

Όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 21, όλοι οι παράγοντες εμφανίζουν παρόμοια καμπυλότητα και δεν είναι ξεκάθαρο σε ποιον ή ποιους παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία η συγκεκριμένη απόκριση.



Διάγραμμα 22. Γράφημα αλληλεπίδρασης αιθανόλης - NaDES για την μεταβλητή της καθαρότητας του DNA

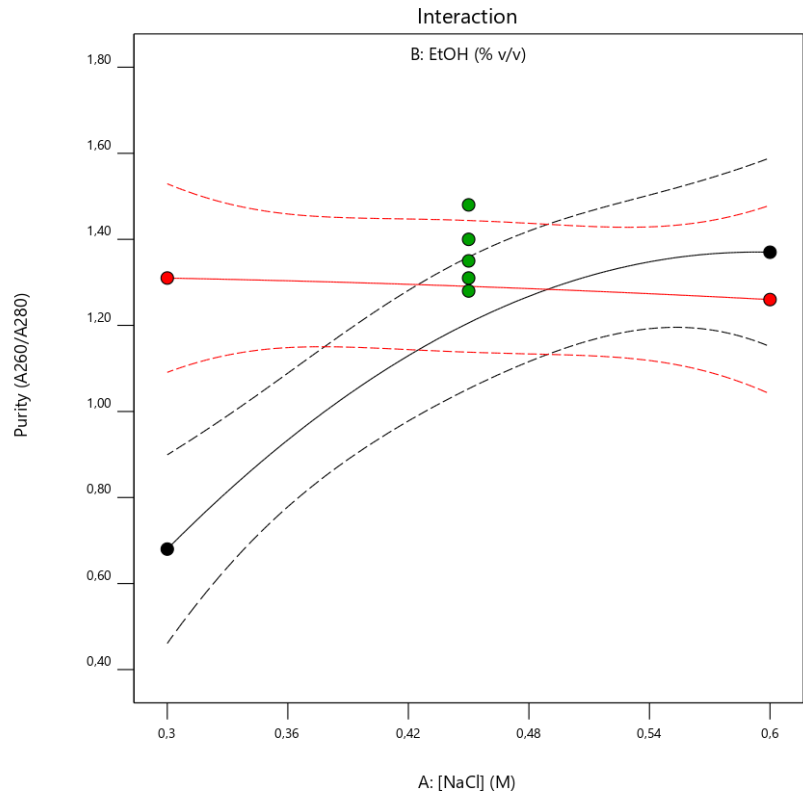


Factor Coding: Actual  
 ● Design Points  
 - - 95% CI Bands

X1 = A: [NaCl]  
 X2 = B: EtOH

**Actual Factor**  
 C: Bet-Gly (1:2) = 3

B- 70  
 B+ 100



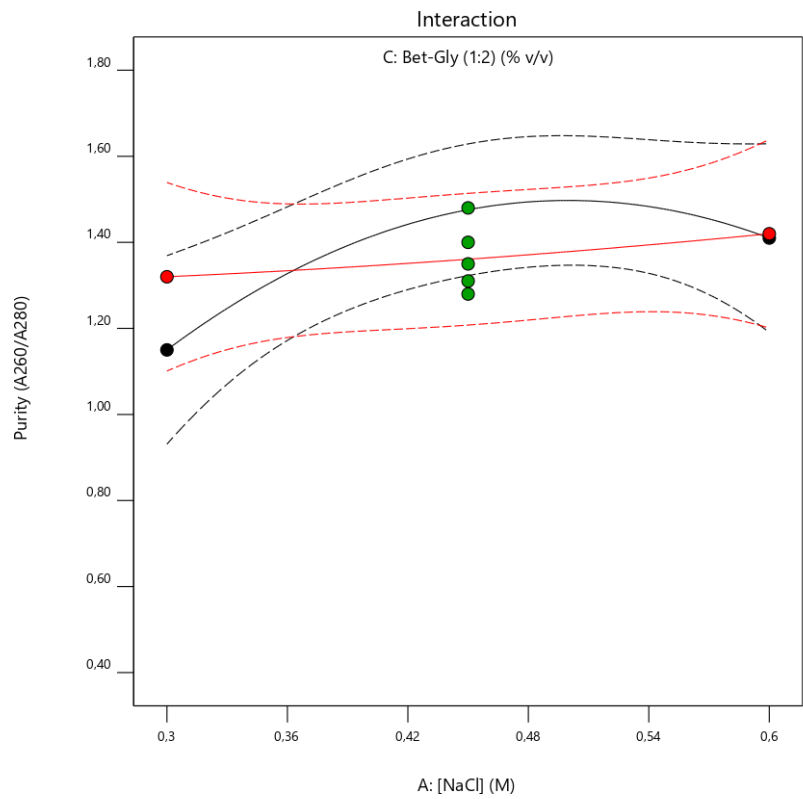
Διάγραμμα 23. Γράφημα αλληλεπίδρασης αιθανόλης - άλατος για την μεταβλητή της καθαρότητας του DNA

Factor Coding: Actual  
 ● Design Points  
 - - 95% CI Bands

X1 = A: [NaCl]  
 X2 = C: Bet-Gly (1:2)

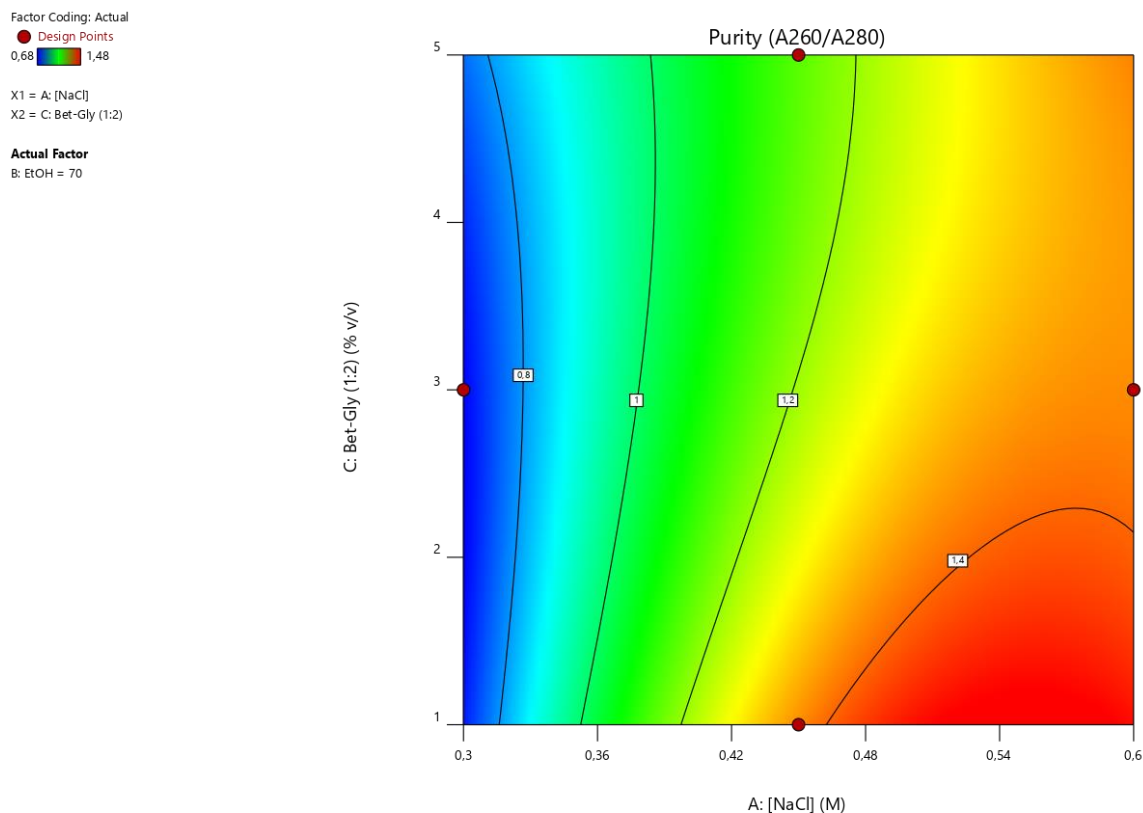
**Actual Factor**  
 B: EtOH = 85

C- 1  
 C+ 5



Διάγραμμα 24. Γράφημα αλληλεπίδρασης άλατος - NaDES για την μεταβλητή της καθαρότητας του DNA

Από τα 3 διαγράμματα αλληλεπίδρασης, γίνεται φανερό ότι όλοι οι όροι είναι πεπλεγμένοι. Η καθαρότητα του DNA φαίνεται να επηρεάζεται από ένα πολύπλοκο σύστημα παραγόντων και η επιρροή του κάθε ενός ξεχωριστά δεν είναι εφικτή.



Διάγραμμα 25. Συσχέτιση καθαρότητας DNA και περιεκτικότητας NaCl, NaDES Bet-Gly 1:2

Το παραπάνω διάγραμμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της καθαρότητας του DNA για συγκεκριμένη συγκέντρωση NaCl και περιεκτικότητα NaDES Bet-Gly 1:2.

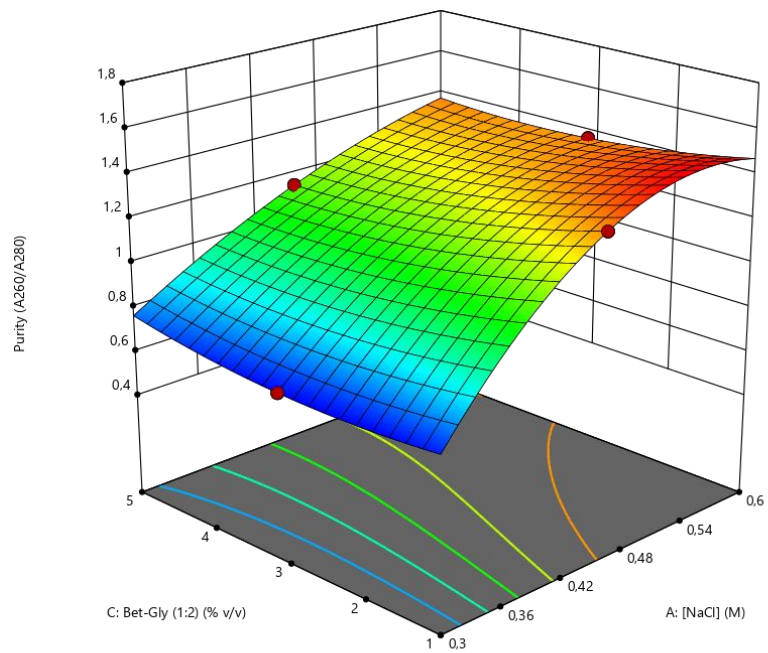
Τέλος, στο Διάγραμμα 26 παρουσιάζεται το επιλεγμένο μοντέλο με βάση το οποίο γίνεται εφικτός ο προσδιορισμός της καθαρότητας του DNA.

Factor Coding: Actual  
 ● Design Points  
 0,68 1,48

X1 = A: [NaCl]  
 X2 = C: Bet-Gly (1:2)

Actual Factor  
 B: EtOH = 70

3D Surface



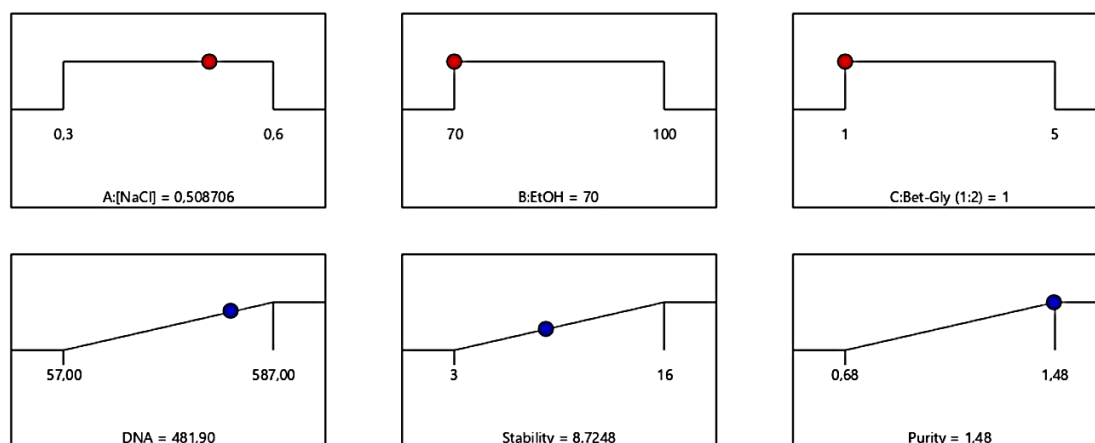
Διάγραμμα 26. Τρισδιάστατο διάγραμμα συσχέτισης NaCl, EtOH και NaDES Bet-Gly 1:2 με την καθαρότητα του DNA

Η εξίσωση που προκύπτει για την εξαρτημένη τιμή της καθαρότητας του DNA είναι:

$$\begin{aligned}
 \text{Purity} = & 1.36 + 0.0900 \cdot A + 0.0425 \cdot B - 0.0575 \cdot C - 0.1850 \cdot AB - 0.0400 \cdot AC + 0.0525 \\
 & \cdot BC - 0.0933 \cdot A^2 - 0.1157 \cdot B^2 + 0.0542 \cdot C^2 + 0.0875 \cdot A^2B + 0.1025 \cdot A^2C \\
 & + 0.0700 \cdot AB^2
 \end{aligned} \tag{11}$$

### 3.2.4. Βελτιστοποίηση απομόνωσης και συντήρησης DNA

Με βάση όλες τις παραμέτρους που αναλύθηκαν παραπάνω και των αντίστοιχων μοντέλων, γίνεται βελτιστοποίηση της διεργασίας απομόνωσης και συντήρησης του DNA από φυτικά κύτταρα. Με βάση το πρόγραμμα Design Expert, οι ανεξάρτητες μεταβλητές παίρνουν τις τιμές που φαίνονται στο Σχήμα 21 μαζί με τις προβλέψεις των αποκρίσεων.



Desirability = 0,864  
Solution 1 out of 34

Σχήμα 21. Βέλτιστες τιμές ανεξάρτητων μεταβλητών απομόνωσης και συντήρησης DNA και αναμενόμενες αποκρίσεις

Συνεπώς, το επόμενο στάδιο είναι η πραγματοποίηση διεργασίας απομόνωσης και συντήρησης DNA με τις τιμές παραμέτρων που φαίνονται στον Πίνακα 18.

Πίνακας 18. Παράμετροι για βέλτιστη απομόνωση και συντήρηση DNA

Απομόνωση και Συντήρηση DNA		
[NaCl] (M)	EtOH (% v/v)	NaDES Bet-Gly 1:2 (% v/v)
0.51	70	1

Με βάση αυτές τις τιμές των παραμέτρων πραγματοποιείται η διεργασία και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 19. Ποσότητα, σταθερότητα και καθαρότητα DNA για τις βέλτιστες παραμέτρους

Βέλτιστη Απομόνωση και Συντήρηση DNA		
DNA (mg)	Stability (d)	Purity ( $A_{260}/A_{280}$ )
268.10	11	1.35
276.00	8	1.32

Στον Πίνακα 20 γίνεται σύγκριση των πειραματικών και των προβλεπόμενων τιμών των αποκρίσεων, καθώς και η απόκλισή τους.

Πίνακας 20. Σύγκριση πειραματικών και προβλεπόμενων αποκρίσεων βέλτιστου σεναρίου

Βέλτιστη Απομόνωση και Συντήρηση DNA			
	DNA (mg)	Stability (d)	Purity (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )
Πειραματικά	272.05	9.5	1.335
Προβλεπόμενα	481.56	8.7	1.48
Αποκλίσεις (%)	43.5	9.2	9.8

Παρουσιάζεται μεγάλη απόκλιση για την παράμετρο της ανακτώμενης ποσότητας DNA, όμως πρέπει να σημειωθεί πως είναι η μόνη παράμετρος που, παρά την προσαρμογή της σε μοντέλο, τα αποτελέσματα κυμαίνονταν αρκετά κατά την διάρκεια των πειραμάτων. Παρ' όλο που ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο σε όλα τα πειράματα, ακόμα και η παραπάνω ποσότητα υγρασίας θα μπορούσε να δημιουργεί τέτοια απόκλιση.

### 3.2.5. Επιβεβαίωση μοντέλου

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 21 εισάγονται στο πρόγραμμα Design Expert ώστε να γίνει σύγκριση των αποκρίσεων και επιβεβαίωση του μοντέλου.

Πίνακας 21. Επιβεβαίωση εγκυρότητας αποκρίσεων

	Predicted Mean	Predicted Median	Std Dev	n	SE Dev	95 % PI Low	95 % PI High
DNA	481.56	481.56	70.25	2	83.70	266.41	696.71
Stability	10.33	8.73	4.36	2	N/A	4.05	Transform Error
Purity	1.48	1.48	0.08	2	0.10	1.21	1.74

Όπως φαίνεται, τα όρια του πειραματικού σχεδιασμού εγκλείουν τις μετρήσεις των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στις βέλτιστες συνθήκες.

### 3.3. Συντήρηση ct-DNA σε NaDES

Με βάση τα επιβεβαιωμένα αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού, έγινε η διάλυση του ct-DNA στο διάλυμα NaDES Bet-Gly 1:2 περιεκτικότητας 1 %. Ταυτόχρονα, γίνεται διάλυση του ct-DNA σε διάλυμα Tris-HCl pH 7.4 και το φυσικό μίγμα NaDES Bet-Gly 1:2 περιεκτικότητας 1 %. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους Πίνακες 22, 23 και 24.

Πίνακας 22. Λόγοι απορρόφησης διαλυμάτων ct-DNA σε υδατικό διάλυμα 1 % NaDES Bet-Gly 1:2

1 % NaDES Bet-Gly 1:2		$A_{260}/A_{280}$		
Day	Run 1	Run 2	Run 3	
5	2.03	1.76	1.88	
7	1.69	1.72	1.61	
12	1.68	1.90	2.03	

Πίνακας 23. Λόγοι απορρόφησης διαλυμάτων ct-DNA σε φυσικό μίγμα 1 % Bet-Gly 1:2.

P.M. 1 % Bet-Gly 1:2		$A_{260}/A_{280}$		
Day	Run 1	Run 2	Run 3	
5	1.80	1.82	1.74	
7	1.76	1.78	1.76	
12	1.70	2.03	1.82	

Πίνακας 24. Λόγοι απορρόφησης διαλυμάτων ct-DNA σε Tris-HCl.

Tris-HCl		$A_{260}/A_{280}$		
Day	Run 1	Run 2	Run 3	
5	2.10	1.85	1.76	
7	-	1.72	1.77	
12	-	1.76	1.68	

Το υδατικό διάλυμα του NaDES και το αντίστοιχο φυσικό μίγμα φαίνεται να παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά ενώ αξίζει να σημειωθεί πως και το διάλυμα Tris-HCl φαίνεται να διατηρείται σε καλό βαθμό παρά την πάροδο 4 ημερών. Ο πρακτικός κανόνας της συμβατικής συντήρησης θέλει το ct-DNA να διατηρείται στο ρυθμιστικό διάλυμα Tris μέχρι 4 μέρες. Παρόλο που στην μία επανάληψη του πειράματος αυτό επιβεβαιώνεται, στις υπόλοιπες φαίνεται το DNA να παρουσιάζει ικανοποιητικό λόγο καθαρότητας ακόμα και στη μία εβδομάδα. Όλα τα διαλύματα στη μία εβδομάδα φαίνεται να έχουν μία πτώση στον λόγο και μετά μια άνοδο. Φυσικά δεν είναι απόλυτα επιθυμητή συμπεριφορά, καθώς ο λόγος ιδανικά πρέπει να μένει σταθερός, όμως κανένα δεν ξεπερνά τα όρια της καθαρότητας. Στον Πίνακα 25 φαίνονται συνοπτικά οι μέσοι όροι των τιμών για καλύτερη σύγκριση.

Πίνακας 25. Καθαρότητα ct-DNA σε NaDES, φυσικό μίγμα και διάλυμα Tris

$A_{260}/A_{280}$	1 % NaDES Bet-Gly 1:2	P.M. 1 % Bet-Gly 1:2	Tris-HCl
<b>Day</b>	M.O. $\pm$ STD DEV		
<b>5</b>	1.89 $\pm$ 0.13	1.79 $\pm$ 0.04	1.90 $\pm$ 0.18
<b>7</b>	1.67 $\pm$ 0.05	1.77 $\pm$ 0.01	1.75 $\pm$ 0.02
<b>12</b>	1.87 $\pm$ 0.15	1.85 $\pm$ 0.14	1.72 $\pm$ 0.04

Συνεπώς, το συμβατικό ρυθμιστικό διάλυμα, βρέθηκε να διατηρεί παραπάνω χρόνο το ct-DNA σταθερό από ό,τι χρησιμοποιείται συνήθως, αλλά φαίνεται να παρουσιάζει μια σταθερή πτώση. Το φυσικό μίγμα παρουσιάζει μικρότερες αποκλίσεις από ό,τι το NaDES αλλά συνολικά η δράση τους μοιάζει. Το NaDES φαίνεται να κάνει μια πιο έντονη πτώση στις 7 μέρες από ό,τι το φυσικό μίγμα. Αυτό όμως ίσως να μπορεί να βελτιωθεί με περισσότερη ανάδευση πριν τη χρήση του καθώς διαφορές στους λόγους απορρόφησης μπορεί να παρουσιαστούν λόγω ανομοιόμορφης κατανομής στο διάλυμα μετά από πολλές μέρες ηρεμίας.

Ενδεικτικά, πραγματοποιήθηκε διάλυση του ct-DNA και σε υδατικό μέσο (υπερκάθαρο νερό) και τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 26.

Πίνακας 26. Καθαρότητα ct-DNA σε νερό

<b>H<sub>2</sub>O</b>	
<b>Day</b>	$A_{260}/A_{280}$
<b>5</b>	1.66
<b>7</b>	1.62
<b>12</b>	1.63

Ο λόγος απορρόφησης φαίνεται να είναι εντός των ορίων αν και χαμηλότερος από αυτόν που προσφέρουν τα άλλα διαλύματα. Με την πάροδο των ημερών βέβαια η ήδη χαμηλή τιμή μειώνεται παραπάνω οπότε δεν είναι ιδανικό μέσο συντήρησης για πολλές μέρες.

Επιπροσθέτως, αξίζει να σημειωθεί πως έγινε προσπάθεια διάλυσης και συντήρησης του ct-DNA σε υδατικό διάλυμα NaDES Bet-Gly 1:2 περιεκτικότητας 50 %. Το δείγμα παρουσίασε έναν ικανοποιητικό βαθμό καθαρότητας στις 3 μέρες (1.75) αλλά στις 6 μέρες ο λόγος απορρόφησης αυξήθηκε υπερβολικά (2.27), γεγονός που συνέβαλε στην απόρριψη χρήσης πιο πυκνού διαλύματος.

### 3.4. Αλληλεπίδραση ct-DNA

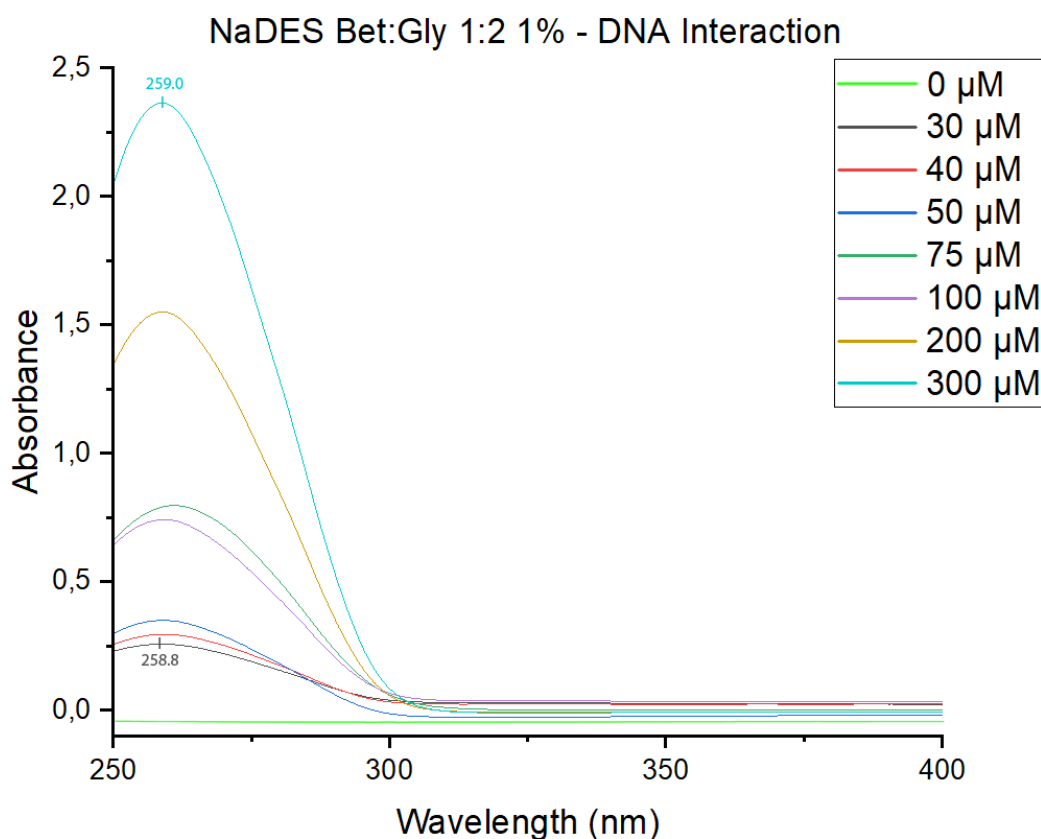
Ακολούθως παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης του ct-DNA για τις τρεις περιπτώσεις μελέτης.

#### 3.4.1. Διάλυμα NaDES Bet-Gly 1:2 περιεκτικότητας 1%

Στον Πίνακα 27 καταγράφονται τα εξής δεδομένα:  $\lambda_{\max \text{ absend}}$ , δηλαδή το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης για μηδενική συγκέντρωση DNA,  $\lambda_{\max \text{ present}}$ , δηλαδή το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης για μέγιστη συγκέντρωση DNA, η διαφορά των δύο αυτών τιμών ( $\Delta\lambda$ ), η Υποχρωμία ή Υπερχρωμία (ανάλογα αν παρατηρείται αύξηση ή μείωση της απορρόφησης) και τέλος η σταθερά αλληλεπίδρασης της ένωσης με το DNA  $K_b$ . Διάγραμμα

Πίνακας 27. Δεδομένα ανάλυσης αλληλεπίδρασης 1 % NaDES Bet-Gly 1:2 με το ct-DNA

	$\lambda_{\max \text{ absend}}$ (nm)	$\lambda_{\max \text{ present}}$ (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	$K_b$ ( $\cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ )	$R^2$
<b>1 % NaDES Bet-Gly 1:2</b>	258.8	259.0	0.2	1.85	0.97



Διάγραμμα 27. Φάσμα UV-Vis αλληλεπίδρασης υδατικού διαλύματος NaDES Bet-Gly 1:2 συγκέντρωσης 1% με διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA (0-300μM).

Παρατηρούνται τα φαινόμενα της βαθυχρωμίας και της υπερχρωμίας. Αυτό σημαίνει ότι αρχικά το συγκεκριμένο NaDES σταθεροποιεί τη δομή του DNA μετατοπίζοντας το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης σε μεγαλύτερες τιμές (ερυθρή μετατόπιση), ενώ παράλληλα αυξάνεται η απορρόφηση, δηλαδή η σύνδεση του NaDES πάνω στο μόριο του DNA γίνεται εξωτερικά. Η σταθερά αλληλεπίδρασης δεν είναι πολύ υψηλή σε σχέση με άλλες



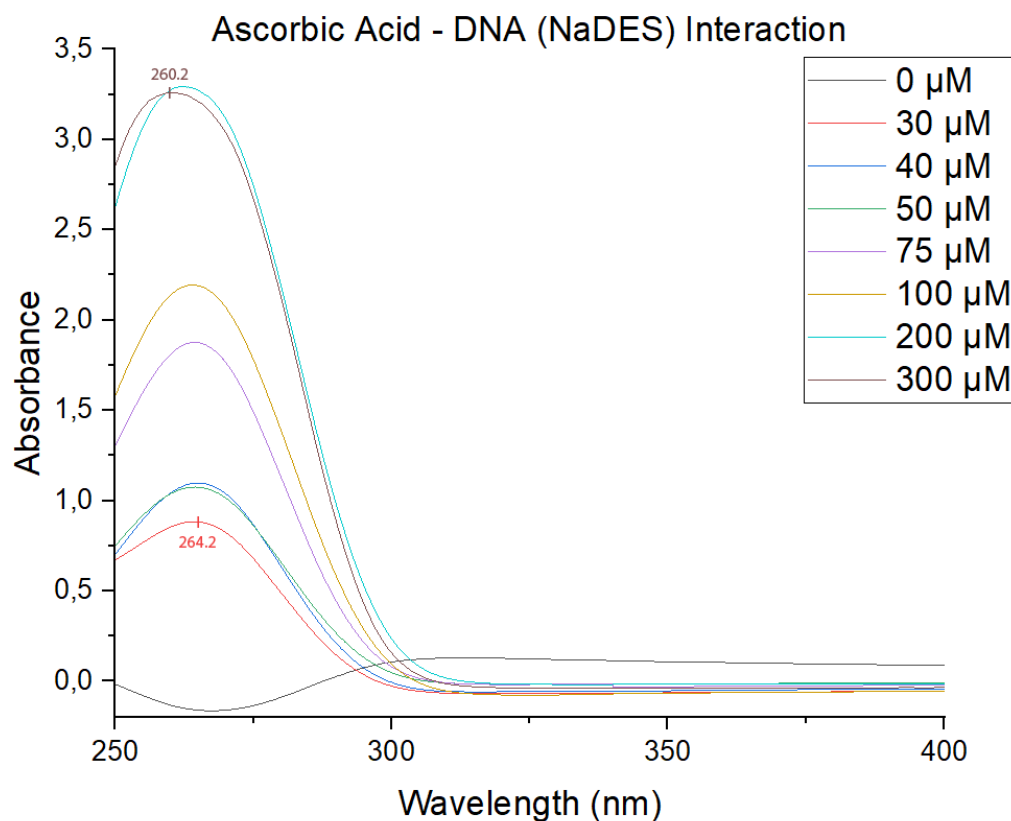
πρότυπες ενώσεις, όμως το γεγονός ότι προσφέρει σταθεροποιητική δράση στο DNA είναι ιδιαίτερα σημαντικό.

### 3.4.2. Διάλυμα Ασκορβικού Οξέος

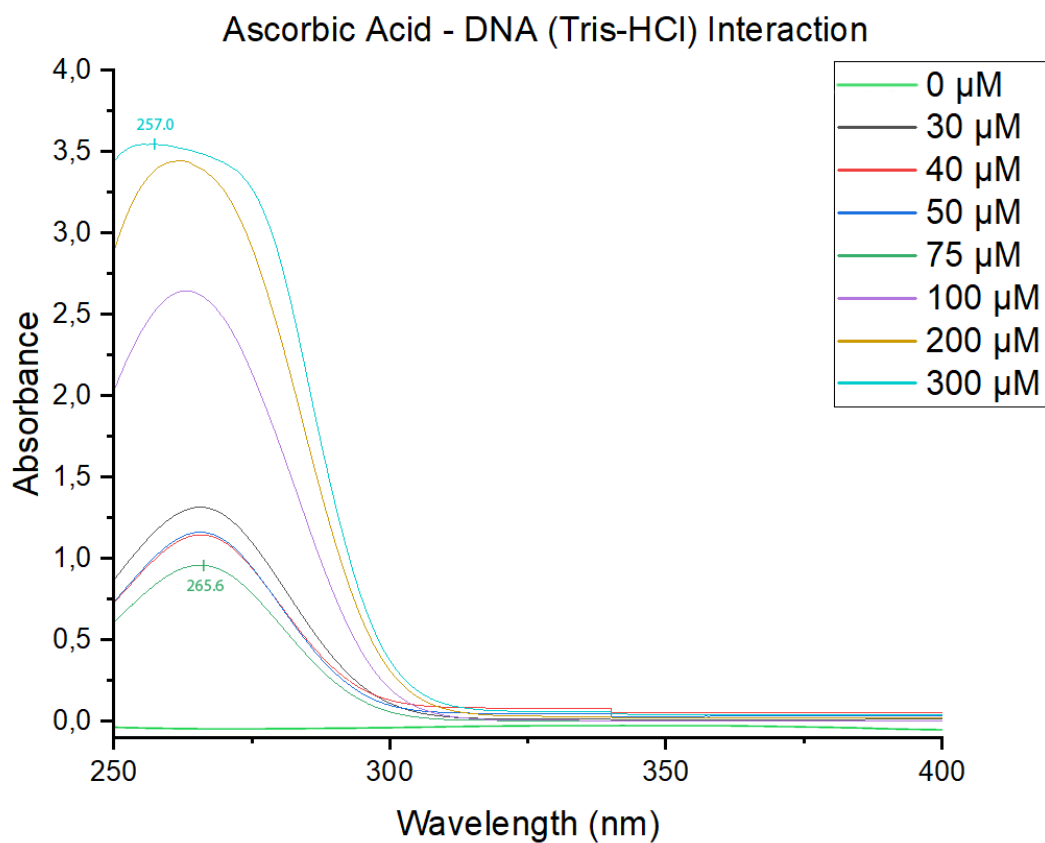
Στον Πίνακα 28 καταγράφονται τα ίδια δεδομένα για την περίπτωση που το ct-DNA είναι διαλυμένο σε διάλυμα Tris-HCl pH 7.4 και για την περίπτωση που είναι διαλυμένο σε διάλυμα 1% NaDES Bet-Gly 1:2.

Πίνακας 28. Δεδομένα ανάλυσης αλληλεπίδρασης ασκορβικού οξέος με το ct-DNA

Ascorbic Acid	$\lambda_{\max \text{ absend}}$ (nm)	$\lambda_{\max \text{ present}}$ (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	$K_b (\cdot 10^3 M^{-1})$	$R^2$
1 % NaDES Bet-Gly 1:2	264.2	260.2	-4.0	3.23	0.97
Tris-HCl	265.6	257.0	-8.6	3.09	0.95



Διάγραμμα 28. Φάσμα UV-Vis αλληλεπίδρασης ασκορβικού οξέος 10mM με διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA (0-300μM) διαλυμένο σε υδατικό διάλυμα NaDES Bet-Gly 1:2 συγκέντρωσης 1%.

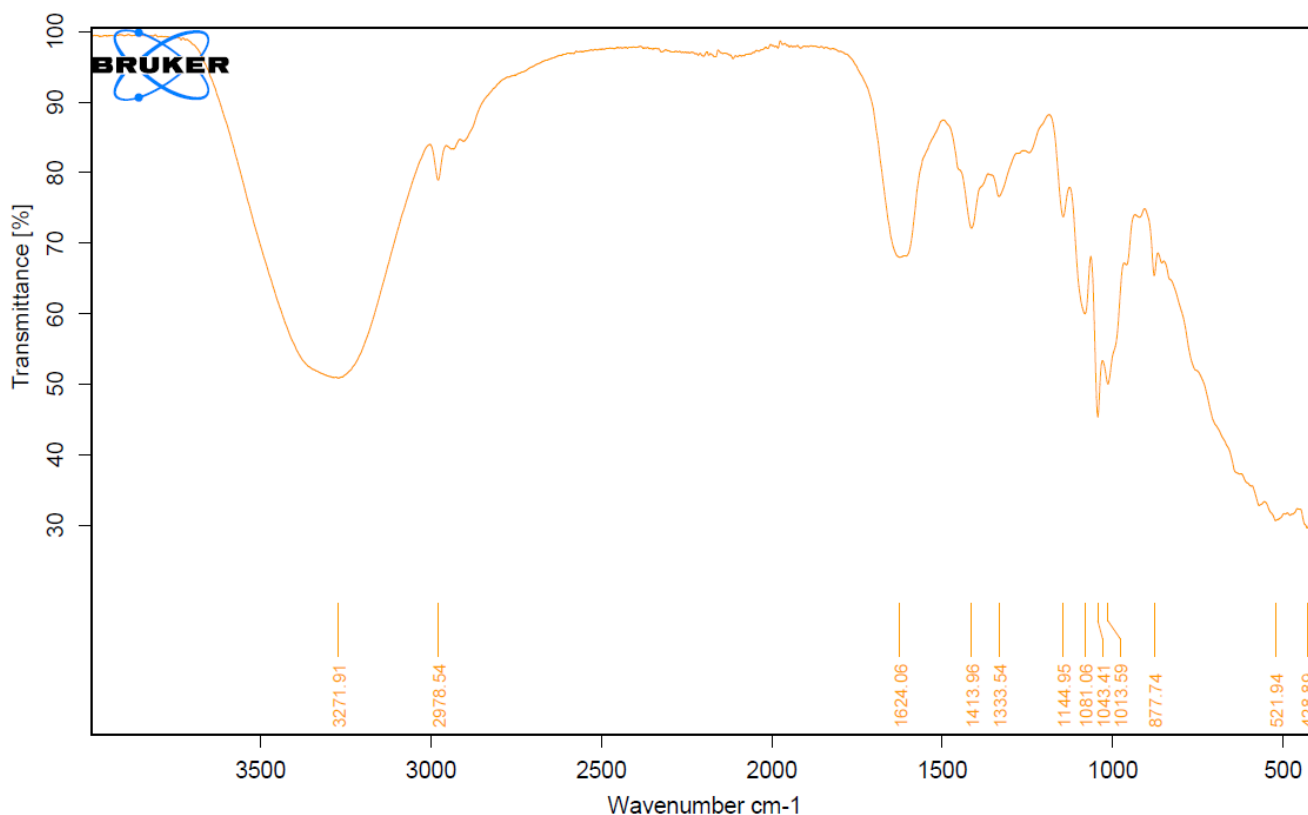


Διάγραμμα 29. Φάσμα UV-Vis αλληλεπίδρασης ασκορβικού οξέος 10mM με διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA διαλυμένο σε διάλυμα Tris-HCl (0-300μM).

Σε αυτήν την περίπτωση, παρατηρείται υψιχρωμία και υπερχρωμία. Πράγματι, και στις 2 περιπτώσεις, το ασκορβικό οξύ, αποσταθεροποιεί το DNA, μειώνοντας το  $\lambda_{max}$ , και η σύνδεσή του στο μόριο του DNA γίνεται εξωτερικά. Αξίζει να σημειωθεί πως η σταθερά αλληλεπίδρασης είναι συγκρίσιμη για τα δύο διαλύματα.

### 3.5. Φάσμα FT-IR απομονωμένου DNA

Δείγμα από το απομονωμένο DNA χρησιμοποιήθηκε σε φασματοφωτομετρία υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier και λήφθηκε το ακόλουθο φάσμα.



Διάγραμμα 30. Φάσμα FT-IR απομονωμένου DNA

Η πρώτη κορυφή στα  $3271.91\text{ cm}^{-1}$  οφείλεται σε δόνηση τάσης του δεσμού μεταξύ οξυγόνου και υδρογόνου (ζώνη απλών δεσμών  $4000\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ ). Αυτή πιθανότητα αντιστοιχεί στην ύπαρξη νερού, αλλά και σε άλλα συστατικά, όπως οι πολυσακχαρίτες. Στη ζώνη των τριπλών δεσμών ( $2500\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ ) δεν παρατηρείται κάποια κορυφή. Στην περιοχή των διπλών δεσμών ( $2000\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ ) εμφανίζεται μια κορυφή, συγκεκριμένα στα  $1624.06\text{ cm}^{-1}$ , η οποία πιθανόν οφείλεται σε δόνηση διπλού δεσμού μεταξύ ανθράκων ή άνθρακα και αζώτου. Οι συγκεκριμένοι δεσμοί μπορούν να αποδοθούν στην αδείνη. (Pakbin et al., 2022) Ακολούθως, εντοπίζονται πολλές κορυφές στην περιοχή του «δακτυλικού» αποτυπώματος της ένωσης ( $1500\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ ). Η κορυφή στα  $1081.06\text{ cm}^{-1}$  μπορεί να αποδοθεί στην συμμετρική δόνηση του φωσφορικού άλατος. (Jangir et al., 2010)

### 3.6. Μέτρηση DLS απομονωμένου DNA

Δείγμα από το απομονωμένο DNA χρησιμοποιήθηκε σε μέτρηση DLS σε συγκέντρωση 0.2 mg/mL και καταγράφηκαν τα ακόλουθα δεδομένα.

Πίνακας 29. Μέγεθος και Ζ-Δυναμικό για το απομονωμένο DNA.

Μέτρηση	Μέγεθος (nm)	Z-Δυναμικό (mV)
1	382.4	-22.8
2	440.5	-18.1
3	353.3	-11.8
<b>M.O.</b>	<b>392.1 ± 36.2</b>	<b>-17.6 ± 4.5</b>

Το μέγεθος του μακρομορίου φαίνεται να είναι κοντά στα 400 nm, ενώ το ζ-δυναμικό βρίσκεται στα -20 mV. Η τιμή αυτή του ζ-δυναμικού δείχνει ότι δεν είναι πλήρως σταθερό το δείγμα (όριο σταθερότητας -30 mV), οπότε υπάρχει μικρή τάση συσσωμάτωσης. Το αρνητικό πρόσημο σηματοδοτεί ότι τα διεσπαρμένα μόρια φέρουν αρνητικό φορτίο.

Στη συνέχεια, μετρήθηκε στο DLS ct-DNA σε τελική συγκέντρωση 0.03 mg/mL.

Πίνακας 30. Μέγεθος και Ζ-Δυναμικό για το ct-DNA.

Μέτρηση	Μέγεθος (nm)	Z-Δυναμικό (mV)
1	329.4	-24.9
2	332.4	-28.2
3	305.6	-26.5
<b>M.O.</b>	<b>322.5 ± 14.7</b>	<b>-26.5 ± 1.7</b>

Το μέγεθος βρίσκεται κοντά στα 300 nm, και το ζ-δυναμικό στα -26 mV. Η τιμή του ζ-δυναμικού δείχνει πως το μακρομόριο αυτό είναι πιο σταθερό από το απομονωμένο DNA. Η διαφορά στο μέγεθος πιθανόν οφείλεται στην υψηλότερη καθαρότητα που διαθέτει το ct-DNA, καθώς το απομονωμένο DNA μπορεί να περιέχει ακόμα ορισμένες προσμίξεις.

## 4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε απομόνωση και συντήρηση DNA από φυτικά κύτταρα, και μελέτη της σταθερότητάς του με την χρήση φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών.

Συγκεκριμένα, η σύνθεση των NaDESs και η διερεύνηση της διαλυτικής τους ικανότητας με βάση τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (pH, πολικότητα), καθώς και η σταθεροποιητική δράση μέσω της αλληλεπίδρασης με το DNA, έδειξε πως η βέλτιστη επιλογή ήταν το NaDES Bet:Gly 1:2.

Για την εκτενέστερη έρευνα και βελτιστοποίηση της διαδικασίας απομόνωσης και συντήρησης πραγματοποιήθηκε πειραματικός σχεδιασμός Box Behken 3x3 με χρήση του προγράμματος Design Expert. Η απαίτηση για μεγιστοποίηση και των 3 αποκρίσεων ταυτόχρονα έδωσε τις βέλτιστες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών. Με βάση αυτές τις τιμές, πραγματοποιήθηκαν πειράματα επιβεβαίωσης του μοντέλου και καταγράφηκαν οι βέλτιστες αποκρίσεις.

Πίνακας 31. Βέλτιστες αναλογίες και αποκρίσεις πειραματικού σχεδιασμού

Βέλτιστες αναλογίες		
[NaCl] (M)	EtOH (% v/v)	NaDES Bet-Gly 1:2 (% v/v)
0.51	70	1
Επιβεβαίωση		
DNA (mg)	Stability (d)	Purity ( $A_{260}/A_{280}$ )
272.05	9.5	1.335

Πραγματοποιήθηκε δομικός χαρακτηρισμός του απομονωμένου DNA με μέτρηση FT-IR. Ταυτόχρονα, μετρήθηκε το μέγεθος του απομονωμένου μακρομορίου με μέτρηση DLS. Το ζ-δυναμικό υποδεικνύει τάσεις συσσωμάτωσης και ύπαρξη αρνητικού φορτίου στην επιφάνεια του μακρομορίου. Συγκριτικά με το ct-DNA, το μακρομόριο φαίνεται να έχει μεγαλύτερο μέγεθος. Αυτό οφείλεται πιθανότατα είτε σε ύπαρξη προσμίξεων που δεν απομακρύνθηκαν αποτελεσματικά, είτε σε μεγαλύτερη τάση συσσωμάτωσης που εμφανίζει. Με βάση και τη σύγκριση του ζ-δυναμικού, το ct-DNA φαίνεται να είναι περισσότερο σταθερό.

Πίνακας 32. Μέγεθος και Ζ-Δυναμικό απομονωμένου και ct-DNA.

	Μέγεθος (nm)	Z-Δυναμικό (mV)
<b>Musa acuminata DNA</b>	392.1 ± 36.2	-17.6 ± 4.5
<b>ct-DNA</b>	322.5 ± 14.7	-26.5 ± 1.7

Μετά το πέρας της βελτιστοποίησης της διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε μελέτη σταθερότητας σε ct-DNA με το βέλτιστο διάλυμα NaDES Bet:Gly 1:2 όπως αυτό προέκυψε από τον πειραματικό σχεδιασμό, ήτοι υδατικό διάλυμα 1% NaDES Bet:Gly 1:2. Προέκυψε πως το συγκεκριμένο διάλυμα μπορεί να κρατήσει σταθερό το ct-DNA μέχρι και 12 μέρες σε υψηλότερη καθαρότητα από ό,τι το ευρέως χρησιμοποιούμενο διάλυμα Tris-HCl pH 7.4.

Έγινε διάλυση του ct-DNA και στο αντίστοιχο φυσικό μίγμα του 1% NaDES Bet:Gly 1:2 το οποίο έδειξε αντίστοιχα αποτελέσματα. Το NaDES φάνηκε να διατηρεί σε υψηλότερη τιμή καθαρότητας το ct-DNA από ό,τι το φυσικό μίγμα. Τέλος, ενδεικτικά δοκιμάστηκε η συντήρηση του ct-DNA σε υπερκάθαρο νερό το οποίο παρουσίασε σημαντικά μικρότερη καθαρότητα από τα υδατικά διαλύματα του NaDES.

Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκε μελέτη αλληλεπίδρασης του ct-DNA με ασκορβικό οξύ και αντικατάσταση του Tris με το NaDES ως μέσο. Τα αποτελέσματα ήταν συγκρίσιμα και στην περίπτωση που το ct-DNA ήταν διαλυμένο στο υδατικό διάλυμα 1% NaDES Bet:Gly 1:2 και σε αυτήν που είχε χρησιμοποιηθεί διάλυμα Tris-HCl. Συνεπώς, το συγκεκριμένο NaDES μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο ως μέσο συντήρησης του DNA, όσο και ως μέσο για μελέτες αλληλεπίδρασης μεταξύ του DNA και άλλων ενώσεων.

Εν κατακλείδι, η χρήση του συγκεκριμένου φυσικού βαθέως ευτηκτικού διαλύτη φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενη με την τριπλή του δράση: καλή διαλυτική ικανότητα του DNA, σταθεροποιητική δράση, και ικανό μέσο μελέτης αλληλεπιδράσεων.

## 5. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

---

Η μελέτη απομόνωσης και συντήρησης του DNA από φυτικά κύτταρα, όσο και η μελέτη σταθερότητας του ct-DNA, απέδωσε ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα για περαιτέρω διερεύνηση.

Όσον αφορά την διαδικασία απομόνωσης, προτείνεται η περαιτέρω μείωση της περιεκτικότητας σε αιθανόλη. Σε μεταγενέστερο στάδιο θα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον προς την κατεύθυνση της πράσινης χημείας να αντικατασταθεί πλήρως ο οργανικός διαλύτης με τη χρήση κάποιου NaDES που να μπορεί να λειτουργήσει με παρόμοιο τρόπο. Ειδικότερα, προτείνεται στοχευμένος σχεδιασμός κατάλληλου βαθέως ευτηκτικού διαλύτη με σκοπό την απομόνωση και τη σταθεροποίηση του του DNA.

Επιπροσθέτως, πραγματοποιώντας αρχικά μελέτες αλληλεπίδρασης είναι εφικτό να προσδιοριστούν NaDESs που λειτουργούν σταθεροποιητικά για τη δομή του DNA. Ακολούθως, τα συγκεκριμένα NaDESs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μελέτες σταθερότητας του DNA. Επίσης, μελέτες σταθερότητας μπορούν να πραγματοποιηθούν και με διαφορετικούς τρόπους (όπως η ηλεκτροφόρηση πηκτής), ώστε να επαληθευτούν και να συγκριθούν τα αποτελέσματα.

## 6. Συμμετοχή σε διεθνή συνέδρια

- ∞ I. Pitterou, K.E. Pavlopoulou, A. Tzani, T. Andreou, A. Detsi, Investigation of ctDNA stability in aqueous solutions of natural deep eutectic solvents, 22<sup>nd</sup> Tetrahedron Symposium, 28 June – 1 July 2022



### INVESTIGATION OF ctDNA STABILITY IN AQUEOUS SOLUTIONS OF NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENTS

I. Pitterou<sup>1</sup>, K.E. Pavlopoulou<sup>1</sup>, A. Tzani<sup>1</sup>, T. Andreou<sup>1</sup>, A. Detsi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Organic Chemistry, School of Chemical Engineering,

National Technical University of Athens, Zografou Campus, 15780 Athens, Greece

<sup>2</sup> VIO AG Pharmaceuticals SA, 47 Steliou Kazantzidi Str., GR 57001, Thermi, Thessaloniki, Greece

(\*adetsi@chemeng.ntua.gr)

#### Introduction

Natural deep eutectic solvents (NADES) are green solvents whose components are generally primary and secondary metabolites, such as organic acids, amino acids, sugars and other small hydrophilic molecules. NADES are capable of dissolving a wide range of poorly water-soluble metabolites or natural products with low (e.g., rutin, paclitaxel, ginkgolide B, quercetin) or high (e.g., starch, DNA, proteins) molecular weight.

DNA in a solution may denaturate, due to oxidative and hydrolytic phenomena, whereas the DNA helix structure can be damaged as a result of pH and temperature variations of the solution medium. Therefore, new solvents which can provide higher stability and facilitate handling are sought for.

In the present study, aqueous solutions of the NADES Betaine-Glycerol 1:2 were investigated as potential media for DNA preservation

#### Methodology

The **betaine/glycerol 1:2 NADES** was synthesized, and its physicochemical properties (pH and polarity) as well as their  $\lambda_{\max}$  (nm), were determined (Table 1). The NADES polarity is expressed by the  $E_{\text{NR}}$  parameter, obtained from solvatochromic shift of the Nile red dye used as a solvatochromic probe

Calf thymus DNA (ctDNA) was dissolved in aqueous solutions of **betaine/glycerol (1:2) NADES** and the ratio of UV-Vis absorbance at 260 to 280 nm was measured to investigate the stability of ctDNA in the solutions (Table 2)

The **interaction of ctDNA** with the **NADES Betaine-Glycerol 1:2** was studied using UV-Vis spectroscopy (Figure 1)

**Molecular docking** (using AutoDock Tools and PyMOL software.) was employed to obtain an insight regarding the interaction of betaine and glycerol (the NADES individual components) with ctDNA

#### Results & Discussion

**Table 1:**  $\lambda_{\max}$  (nm), polarity (determined using Nile red (initial stock solution of Nile red in ethanol: 0.1 mM) as a solvatochromic probe), and pH of the studied solutions at 25 °C.

Solvents	$\lambda_{\max}$ (nm)	$E_{\text{NR}}^{\text{pH}}$ (kcal/mol)	pH
Bet-Gly(1:2)	566	50.51	6.62
1% w/v aqueous solution of BetGly	580	49.29	6.58
3% w/v aqueous solution of BetGly	582	49.13	6.40
5% w/v aqueous solution of BetGly	588	48.62	5.44
Ethanol	548	52.17	7.52
Water	593	48.20	6.85

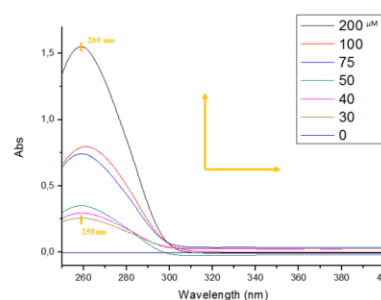
The 1% w/v aqueous solution of **betaine/glycerol NADES** provides enhanced stabilization of ctDNA as compared to **Tris-HCl buffer solution or H<sub>2</sub>O**

**Table 2:** ctDNA stability in the different aqueous solutions.

Solvents	Day	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$
NADES_Bet-Gly(1:2)(1%w/v)	12	1.80
Tris-HCl buffer solution	12	1.68
Water	12	1.31

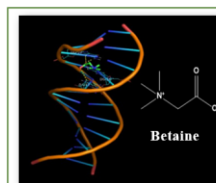
#### Binding Studies of the NADES with ctDNA

With incremental addition of ctDNA to the solution of the NADES, an increase in the absorption intensity was observed with concomitant **red shift** of the  $\lambda_{\max}$  at 260 nm (Figure 1).



**Figure 1** Absorption spectra of NADES (100 µg/mL) in Tris-HCl buffer with increasing concentrations of ctDNA (0–200 µM). Arrows (↑) and (→) refer to hyperchromic effect and red shift, respectively.

#### Molecular docking of the NADES' components



The binding architecture of Betaine is stabilized in the binding cavity of the minor groove of DNA by the formation of **four hydrogen bonds** with binding energy **-4.5 kcal/mol**



The binding architecture of Glycerol is stabilized in the binding cavity of the minor groove of DNA by the formation of **nine hydrogen bonds** with binding energy **-4.2 kcal/mol**

#### Conclusions

The observed hyperchromism and red shift results suggest that **betaine/glycerol NADES** can interact with ctDNA through a groove binding mode

The solubility of ctDNA in **betaine/glycerol NADES** is related to the polarity of the solvent, and can be further increased by adding water

ctDNA in the aqueous solution of **betaine/glycerol NADES** shows higher stability than in the Tris-HCl buffer solution or pure water for 12 days

#### References

- Tzani, A., Kalafeteli, S., Tatsis, G., Bairaktari, M., Kostopoulou, I., Pontillo, A. R. N., & Detsi, A. (2021). Natural deep eutectic solvents (NADESs) as alternative green extraction media for ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Sustainable Chemistry*, 2(4), 576-598.
- Tortora, M., Vigna, J., Mancini, I., Mele, A., Gessini, A., Masciovecchio, C., & Rossi, B. (2021). Effect of Hydrated Deep Eutectic Solvents on the Thermal Stability of DNA. *Crystals*, 11(9), 1057.
- Itoh, T., & Koo, Y. M. (Eds.). (2019). Application of Ionic Liquids in Biotechnology (Vol. 168). Cham, Switzerland: Springer.
- Mondal, D., Sharma, M., Mukesh, C., Gupta, V., & Prasad, K. (2013). Improved solubility of DNA in recyclable and renewable bio-based deep eutectic solvents with long-term structural and chemical stability. *Chemical communications*, 49(83), 9606-9608.



## Βιβλιογραφία

---

- Abdel-Latif, A., & Osman, G. (2017). *Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize*. 13, 1. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4>
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). *Essential Cell Biology*.
- Anastas, P., & Eghbali, N. (2010). Green Chemistry: Principles and Practice. *Chemical Society Reviews*, 39, 301–312. <https://doi.org/10.1039/b918763b>
- Anastas, P. T., & Warner, J. C. (2000). *Green Chemistry: Theory and Practise*. Oxford University Press.
- Boesenberg-Smith, K. A., Pessaraki, M. M., & Wolk, D. M. (2012). Assessment of DNA yield and purity: An overlooked detail of PCR troubleshooting. *Clinical Microbiology Newsletter*, 34(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.CLINMICNEWS.2011.12.002>
- Buguliskis, J. S. (2015, June 13). *Pharmacogenomics Adds Precision to the Practice of Medicine*. <https://www.genengnews.com/magazine/249/pharmacogenomics-adds-precision-to-the-practice-of-medicine/>
- Cabeen, M., Garner, A., Hagan, C., Kahne, D., Liu, D., Losick, R., Lue, R., Mango, S., Murray, A., & O’Shea, E. (2020). *An Integrated Introduction to Chemistry and Biology*. Harvard University Press. <https://www.labxchange.org/library/books/d16810cd-172e-4c2d-b82a-ba21e5dfbe0f>
- Carlson, C. B., & Beal, P. A. (2000). Solid-phase synthesis of acridine-based threading intercalator peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10(17), 1979–1982. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(00\)00388-7](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)00388-7)
- Cepharm Life Sciences Research Products. (n.d.). Retrieved April 30, 2022, from <https://www.cephaml.com/genomic-dna-extraction-kit-blood/>
- Chemat, F., Vian, M. A., Ravi, H. K., Khadhraoui, B., Hilali, S., Perino, S., & Tixier, A. S. F. (2019). Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Panorama, principles, applications and prospects. *Molecules*, 24(16). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24163007>
- Cheng, Y. K., & Pettitt, B. M. (1992). Stabilities of double- and triple-strand helical nucleic acids. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 58(3), 225–257. [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(92\)90007-S](https://doi.org/10.1016/0079-6107(92)90007-S)
- Cherstvy, A. G. (2011). Electrostatic interactions in biological DNA-related systems. *Phys. Chem. Chem. Phys*, 13, 9942–9968. <https://doi.org/10.1039/c0cp02796k>
- CTAB Protocol. (2022, February 9). Zymo Research. <https://www.zymoresearch.com/blogs/blog/ctab-protocol-for-isolating-dna-from-plant-tissues>
- DNA | Summary. (n.d.). Retrieved April 26, 2022, from <https://www.whatisbiotechnology.org/index.php/science/summary/dna/>

- DNA Sequencing | Summary. (n.d.). Retrieved April 26, 2022, from <https://www.whatisbiotechnology.org/index.php/science/summary/sequencing/dna-sequencing-determines-the-order-of-dna-building-blocks>
- Frangoul, H., Altshuler, D., Cappellini, M. D., Chen, Y.-S., Domm, J., Eustace, B. K., Foell, J., Fuente, J. de la, Grupp, S., Handgretinger, R., Ho, T. W., Kattamis, A., Kernysky, A., Lekstrom-Himes, J., Li, A. M., Locatelli, F., Mapara, M. Y., Montalembert, M. de, Rondelli, D., ... Corbacioglu, S. (2020). *CRISPRs-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and  $\beta$ -Thalassemia*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031054>
- Garbieri, T. F., Brozowski, D. T., Dionísio, T. J., Santos, C. F., & Neves, L. T. das. (2017). Human DNA extraction from whole saliva that was fresh or stored for 3, 6 or 12 months using five different protocols. *Journal of Applied Oral Science*, *25*(2), 147–158. <https://doi.org/10.1590/1678-77572016-0046>
- Häckl, K., & Kunz, W. (2018). Some aspects of green solvents. *Comptes Rendus Chimie*, *21*(6), 572–580. <https://doi.org/10.1016/J.CRCI.2018.03.010>
- Itoh, T., & Koo, Y.-M. (2019). *Application of Ionic Liquids in Biotechnology* (T. Itoh & Y.-M. Koo, Eds.; 1st ed.). Springer, Cham. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-23081-4>
- Jangir, D. K., Tyagi, G., Mehrotra, R., & Kundu, S. (2010). Carboplatin interaction with calf-thymus DNA: A FTIR spectroscopic approach. *Journal of Molecular Structure*, *969*(1–3), 126–129. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2010.01.052>
- Kalhor, P., & Ghandi, K. (2019). Deep Eutectic Solvents for Pretreatment, Extraction, and Catalysis of Biomass and Food Waste. *Molecules*, *24*. <https://doi.org/10.3390/molecules24224012>
- Karadendrou, M. A., Kostopoulou, I., Kakokefalou, V., Tzani, A., & Detsi, A. (2022). L-Proline-Based Natural Deep Eutectic Solvents as Efficient Solvents and Catalysts for the Ultrasound-Assisted Synthesis of Aurones via Knoevenagel Condensation. *Catalysts*, *12*(3). <https://doi.org/10.3390/CATAL12030249>
- Kohne, J., Callan, D. E., Beermann, J., Brink, W., Styles, R. A., ; • R Itossa, E. D., Spiegelman, F. M., Wallace, S., Birnsliel, H., Brown, M. L., Weber, D. D., Mo, J., Biol, !, Blrnsticl, M., Speirs, J. J., Purrlom, I., Jones, J., Loening, U. E., Birnstiel, J., ... Ccallum, M. (1968). Denaturation of DNA at pH 1~0 by Acid and Alkali. In *Studier, F. W.,l. Mol. Biol* (Vol. 161). The University of Wisconsin Press.
- Lenglet, G., & David-Cordonnier, M. H. (2010). DNA-destabilizing agents as an alternative approach for targeting DNA: Mechanisms of action and cellular consequences. *Journal of Nucleic Acids*, *2010*. <https://doi.org/10.4061/2010/290935>
- Li, R., Greenchem, /, Erythropel, H. C., Zimmerman, J. B., de Winter, T. M., Petitjean, L., Melnikov, F., Lam, C. H., Lounsbury, A. W., Mellor, K. E., Janković, N. Z., Tu, Q., Pincus, L. N., Falinski, M. M., Shi, W., Coish, P., Plata, D. L., & Anastas, P. T. (2018). *Green Chemistry Cutting-edge research for a greener sustainable future Green Chemistry CRITICAL REVIEW*. *20*. <https://doi.org/10.1039/c8gc00482j>
- Loparev, V. N., Cartas, M. A., Monken, C. E., Velpandi, A., & Srinivasan, A. (1991). An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify

- infectious agents. *Journal of Virological Methods*, 34(1), 105–112.  
[https://doi.org/10.1016/0166-0934\(91\)90126-K](https://doi.org/10.1016/0166-0934(91)90126-K)
- McDowell, C., & Bazan, G. C. (2017). Organic solar cells processed from green solvents. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 5, 49–54.  
<https://doi.org/10.1016/J.COGSC.2017.03.007>
- Mukherjee, A., & Sasikala, W. D. (2013). Drug–DNA Intercalation: From Discovery to the Molecular Mechanism. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 92, 1–62.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411636-8.00001-8>
- Pakbin, B., Zolghadr, L., Rafiei, S., Brück, W. M., & Brück, T. B. (2022). FTIR differentiation based on genomic DNA for species identification of Shigella isolates from stool samples. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06746-y>
- Parul, K., Vineet, R., Shaleen, C., & Suraksha, A. (2014). Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. *Journal of Forensic Dental Sciences*, 6(2). <https://doi.org/10.4103/0975-1475.132529>
- Petters, R. M. (1986). Symposium on “A Futuristic Look at the Livestock Industry” Recombinant DNA, Gene Transfer and the Future of Animal Agriculture. *Journal of Animal Science*, 62(6), 1759–1768.  
<https://doi.org/10.2527/JAS1986.6261759X>
- Pharmacogenomics*. (n.d.). Retrieved April 26, 2022, from  
<https://www.nigms.nih.gov/education/fact-sheets/Pages/pharmacogenomics.aspx>
- Pray, L. A. (2008). *Discovery of DNA Structure and Function: Watson and Crick*.  
<https://www.nature.com/scitable/topicpage/discovery-of-dna-structure-and-function-watson-397>
- Qi, Y., Running, M. P., Najda, A. B., Mcfarlane, G. R., Salvesen, H. A., Sternberg, A., & Lillico, S. G. (2020). *On-Farm Livestock Genome Editing Using Cutting Edge Reproductive Technologies*. 3, 106. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00106>
- Rauf, S., Gooding, J. J., Akhtar, K., Ghauri, M. A., Rahman, M., Anwar, M. A., & Khalid, A. M. (2005). Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37(2), 205–217.  
<https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2004.10.037>
- Roberts, R. W., & Crothers, D. M. (1992). Stability and properties of double and triple helices: dramatic effects of RNA or DNA backbone composition. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5087), 1463–1466. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1279808>
- Smith, E. L., Abbott, A. P., & Ryder, K. S. (2014). Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews*, 114(21), 11060–11082.  
<https://doi.org/10.1021/CR300162P>
- Stein, R. (2020, June 22). *Experimental CRISPR Treatment For Sickle Cell Disease Appears Effective : Shots - Health News : NPR*. <https://www.npr.org/sections/health-shots/2020/06/23/877543610/a-year-in-1st-patient-to-get-gene-editing-for-sickle-cell-disease-is-thriving?t=1604243189289>

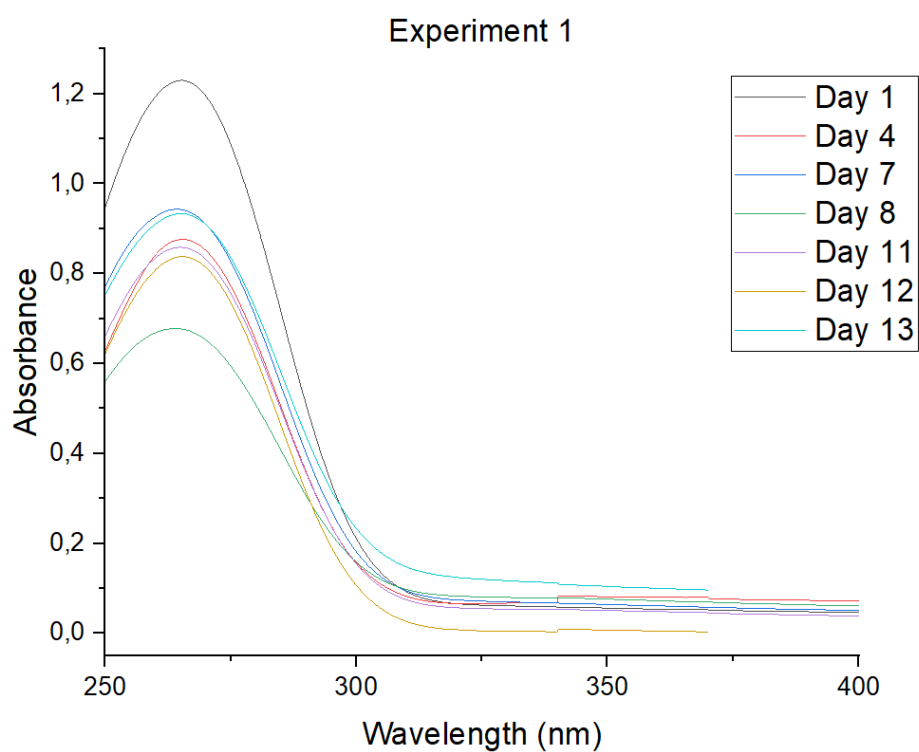
*Using DNA to Identify Missing Persons.* (2017, March 7). The United States Department of Justice. <https://www.justice.gov/archives/ag/advancing-justice-through-dna-technology-using-dna-identify-missing-persons>

*Using DNA to Protect the Innocent.* (2017, March 7). The United States Department of Justice. <https://www.justice.gov/archives/ag/advancing-justice-through-dna-technology-using-dna-protect-innocent>

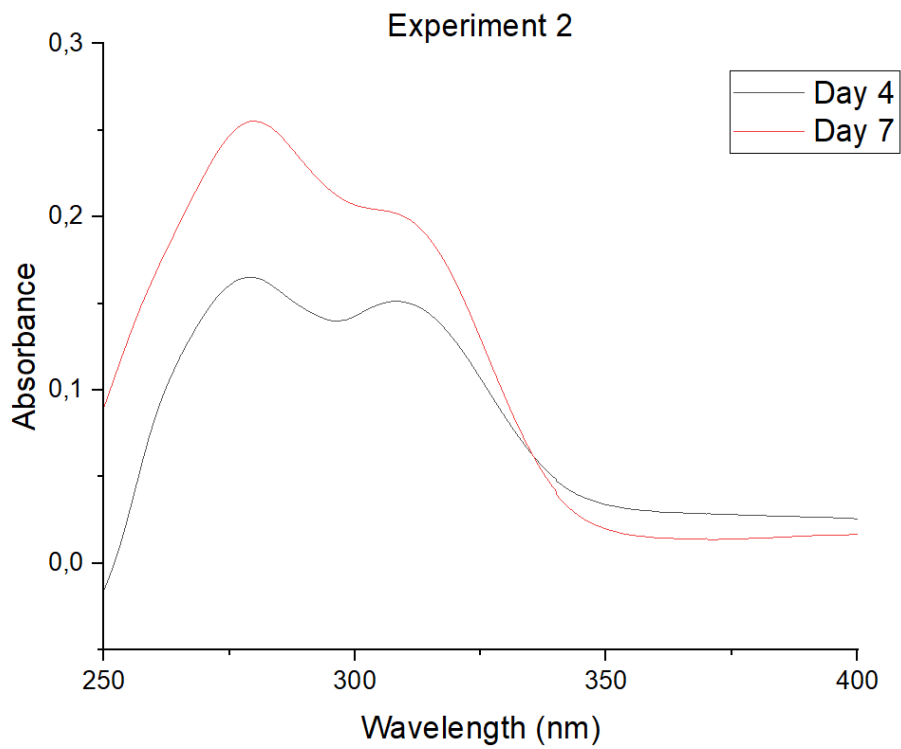
*Using DNA to Solve Crimes.* (2017, March 7). The United States Department of Justice. <https://www.justice.gov/archives/ag/advancing-justice-through-dna-technology-using-dna-solve-crimes>

## Παράρτημα I

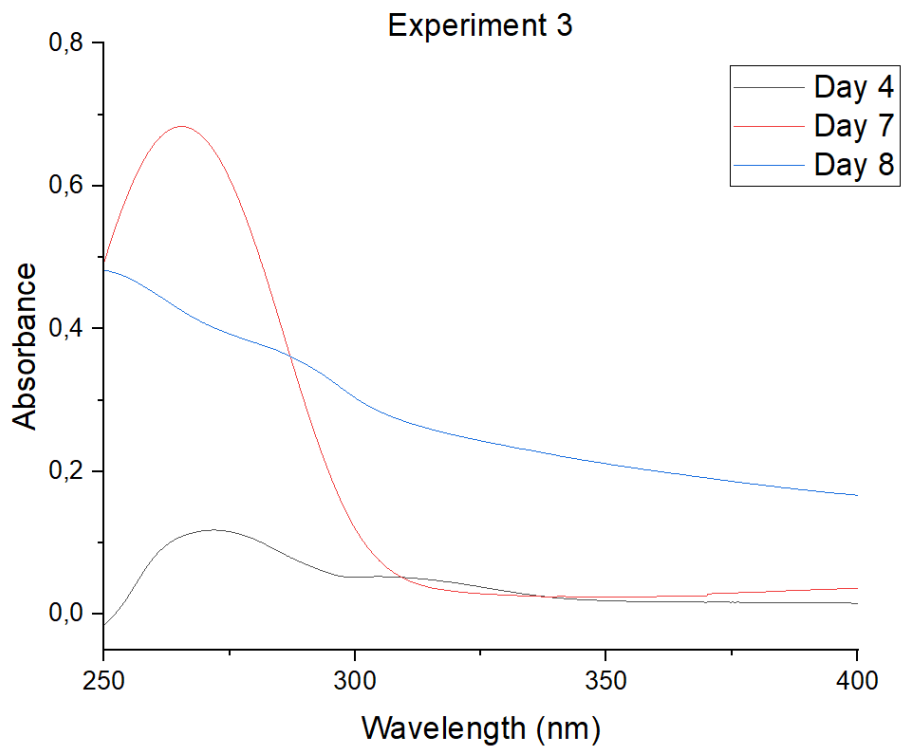
Παρακάτω παρατίθενται τα φάσματα UV-Vis από τα πειράματα του πειραματικού σχεδιασμού και τα πειράματα επιβεβαίωσης των βέλτιστων συνθηκών.



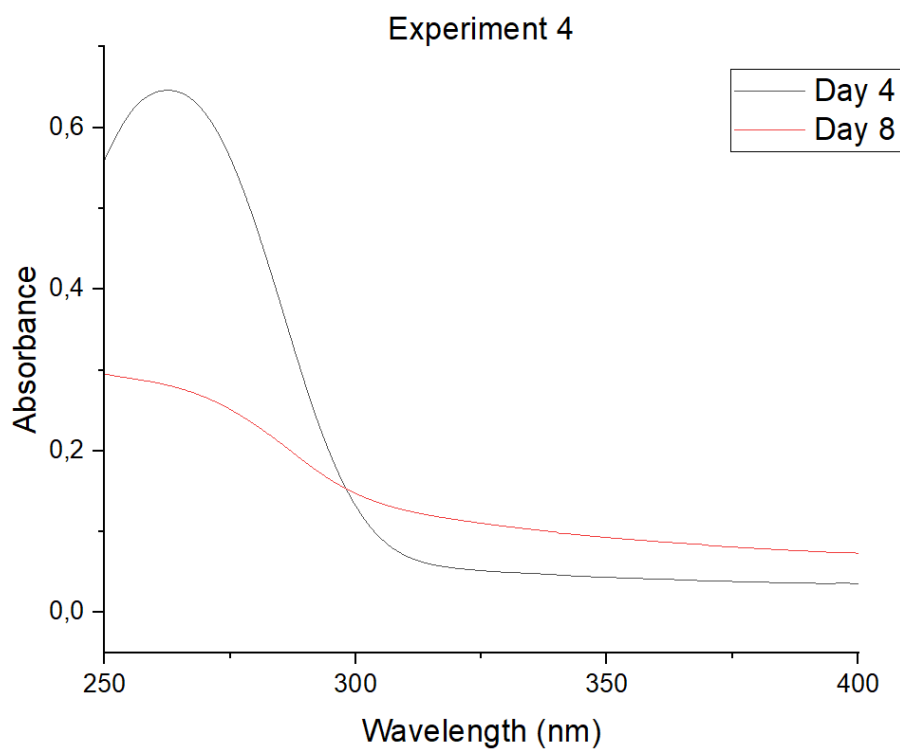
Διάγραμμα 31. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 1 του πειραματικού σχεδιασμού.



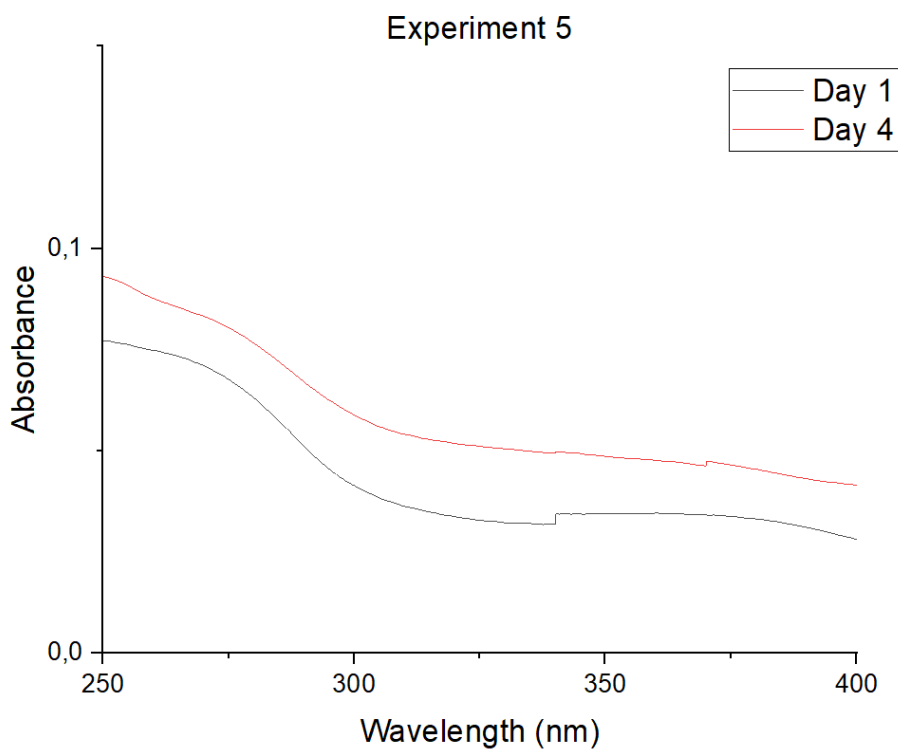
Διάγραμμα 32. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 2 του πειραματικού σχεδιασμού.



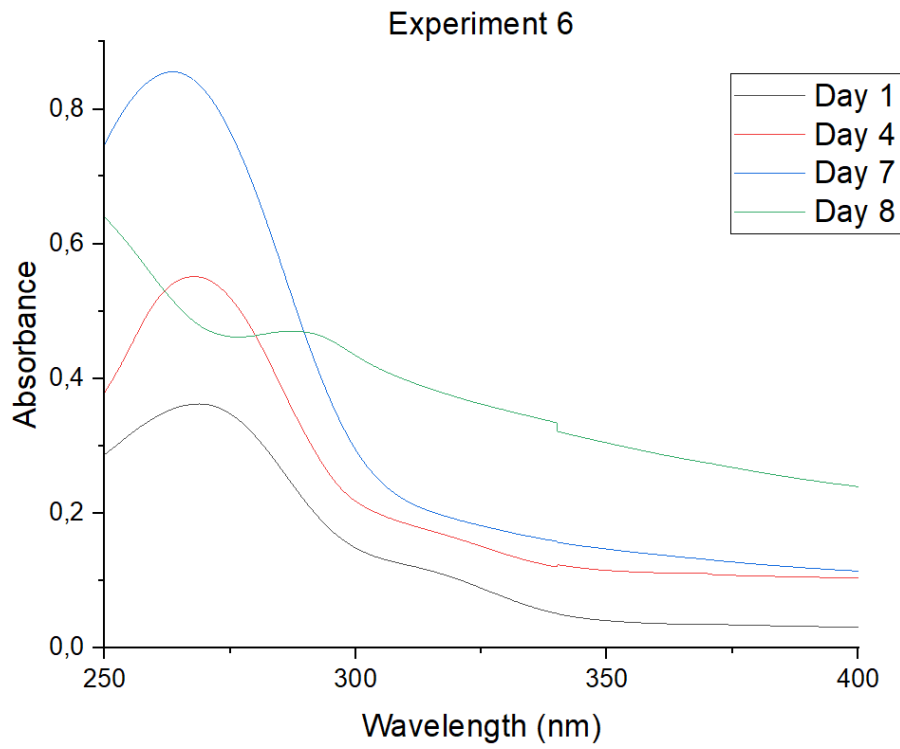
Διάγραμμα 33. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 3 του πειραματικού σχεδιασμού.



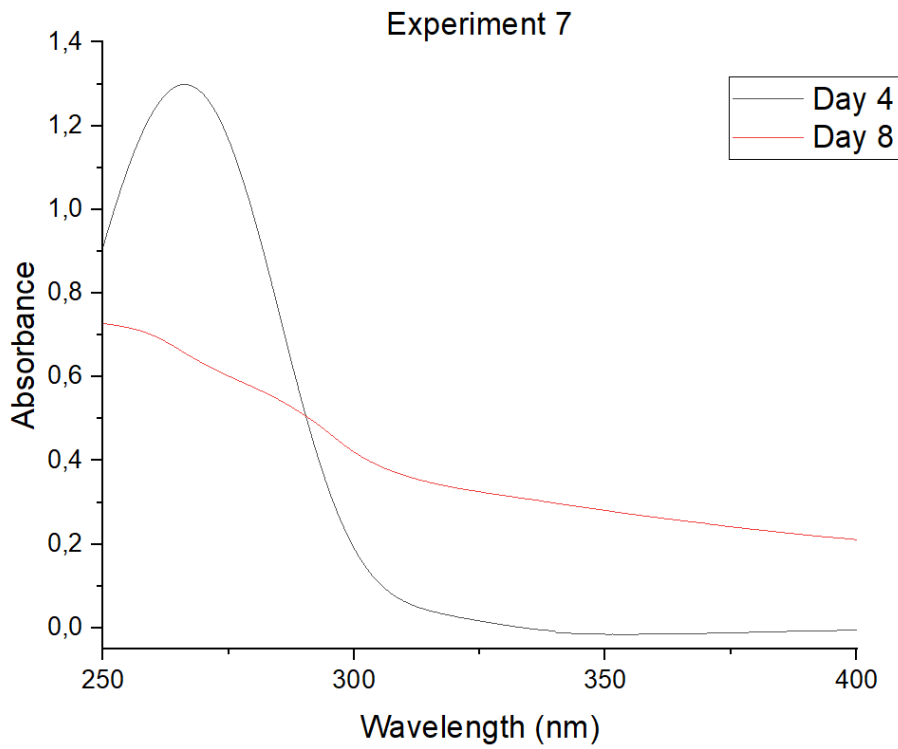
Διάγραμμα 34. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 4 του πειραματικού σχεδιασμού.



Διάγραμμα 35. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 5 του πειραματικού σχεδιασμού.

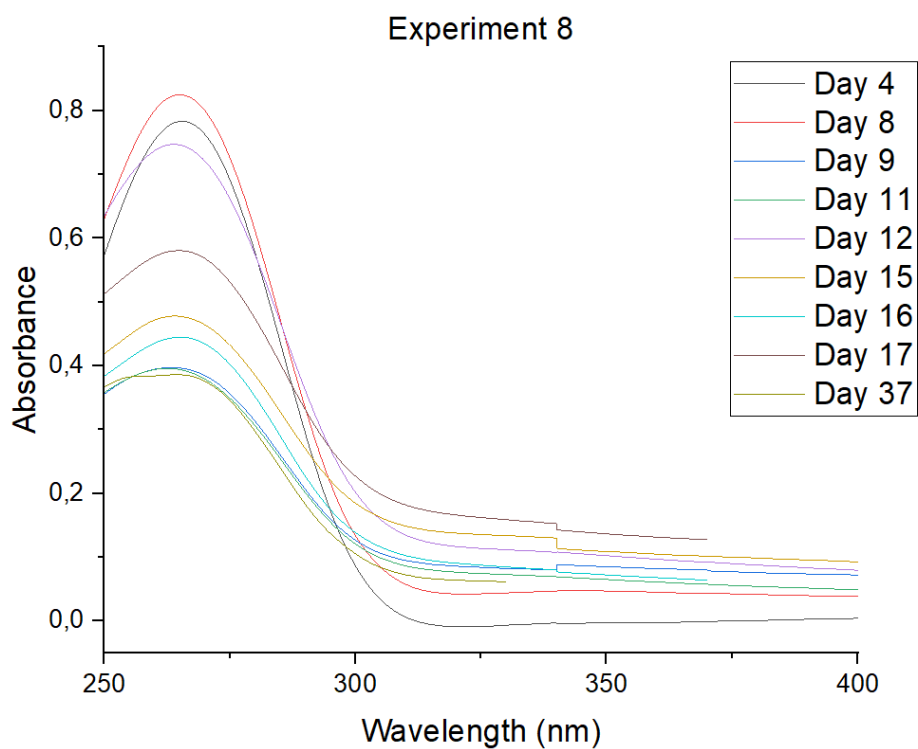


Διάγραμμα 36. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 6 του πειραματικού σχεδιασμού.

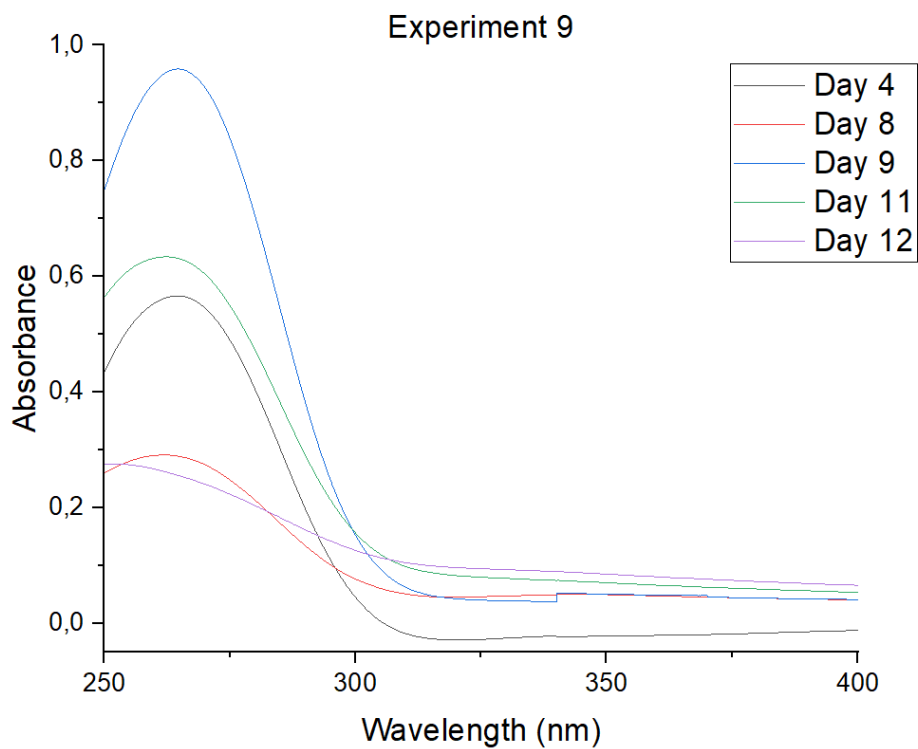


Διάγραμμα 37. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 7 του πειραματικού σχεδιασμού.

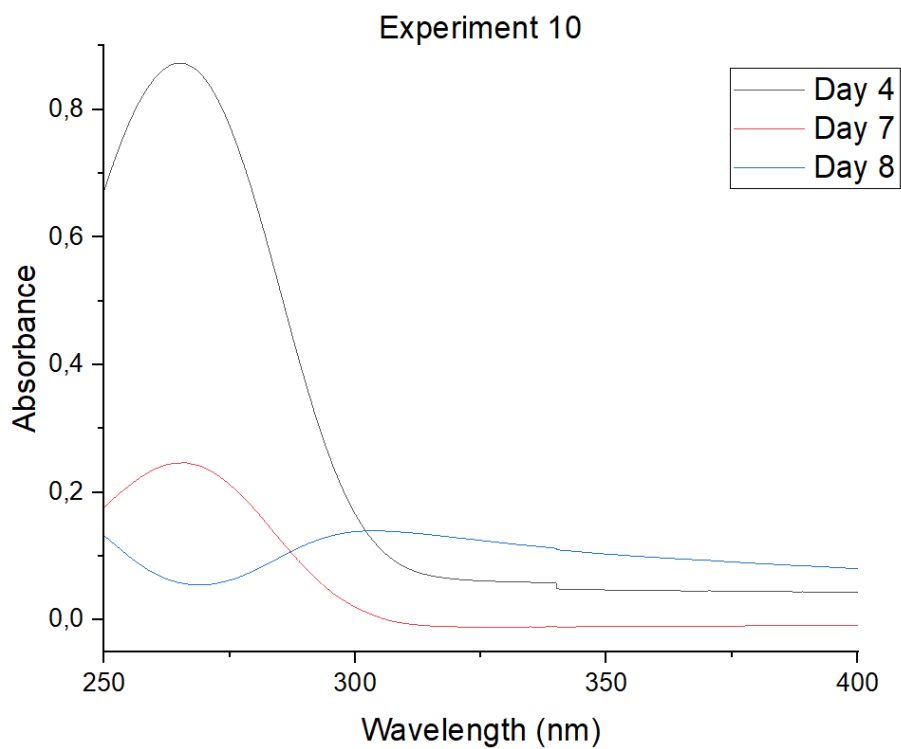




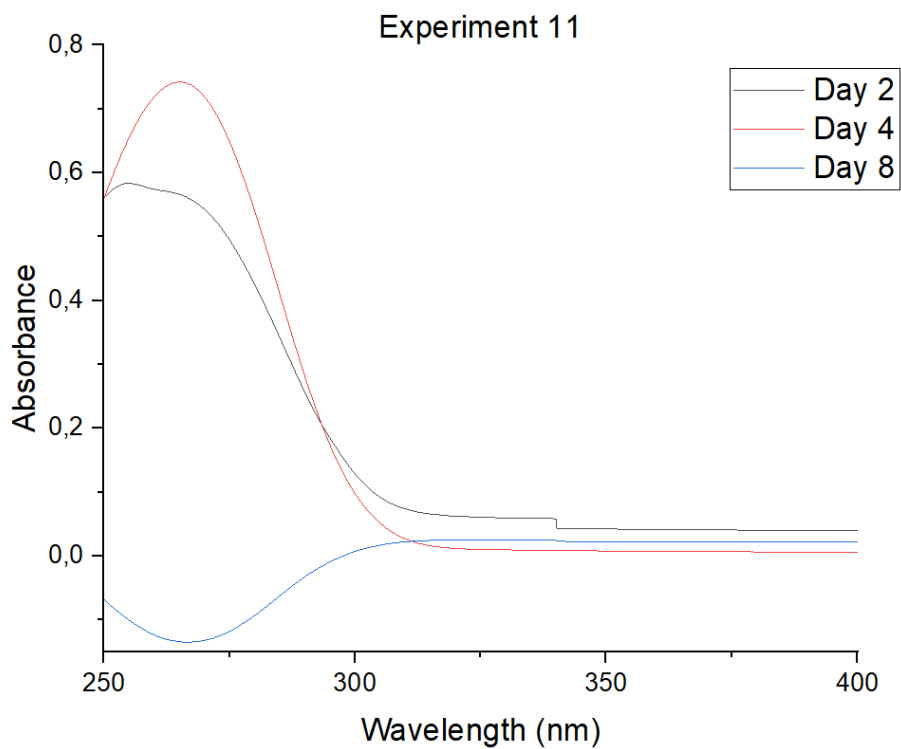
Διάγραμμα 38. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 8 του πειραματικού σχεδιασμού.



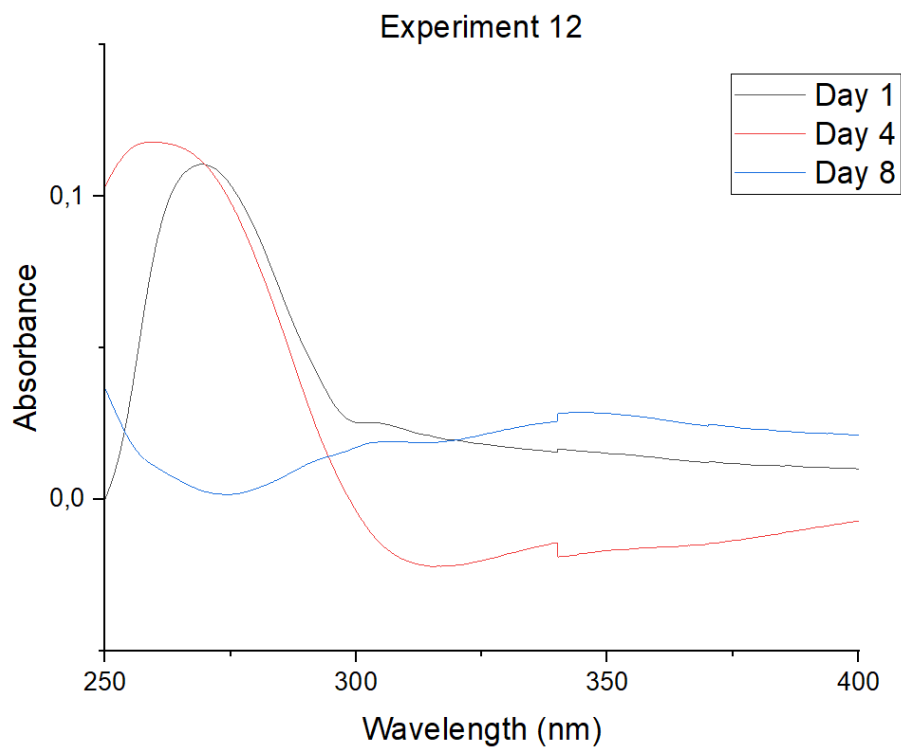
Διάγραμμα 39. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 9 του πειραματικού σχεδιασμού.



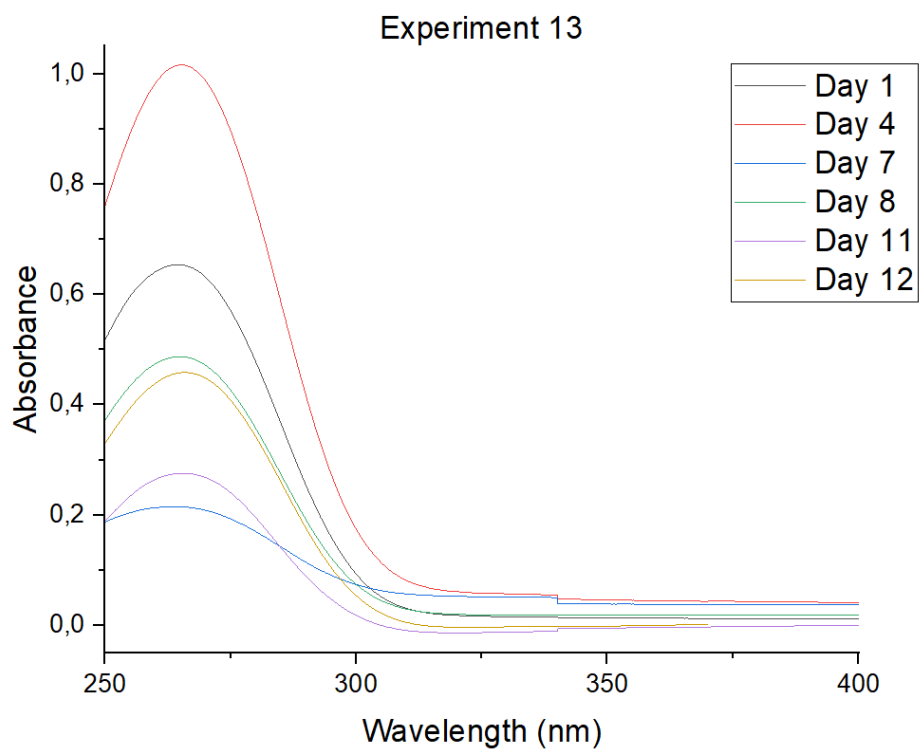
Διάγραμμα 40. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 10 του πειραματικού σχεδιασμού.



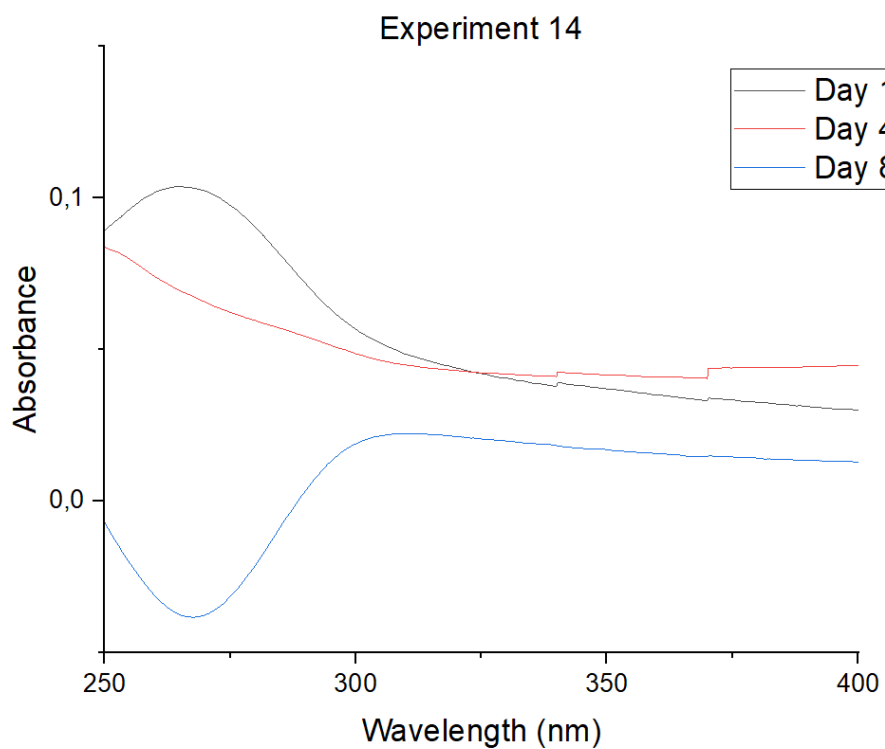
Διάγραμμα 41. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 11 του πειραματικού σχεδιασμού.



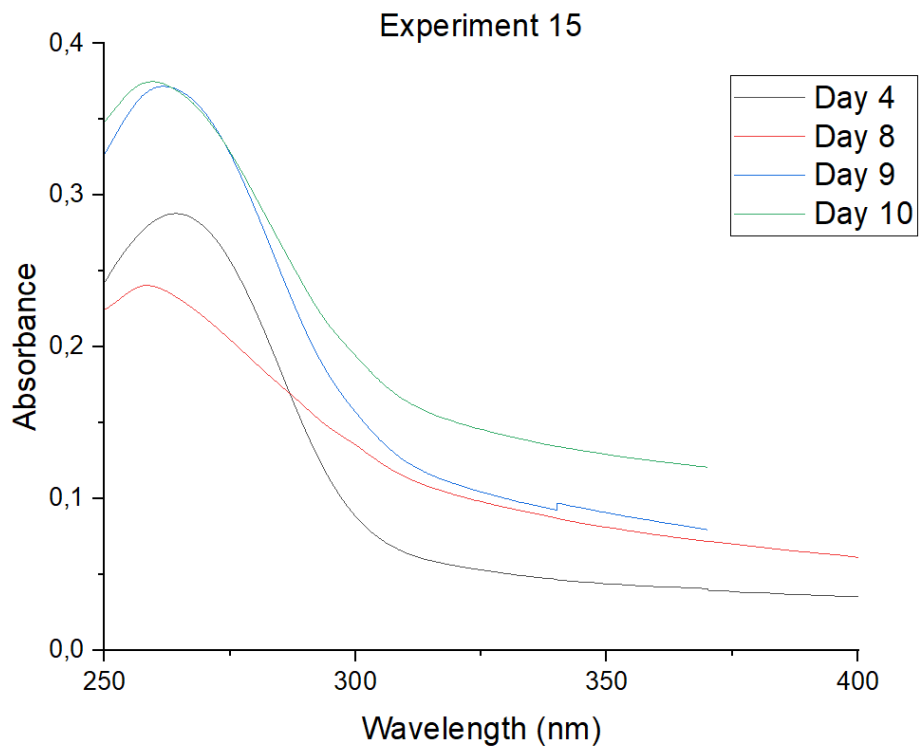
Διάγραμμα 42. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 12 του πειραματικού σχεδιασμού.



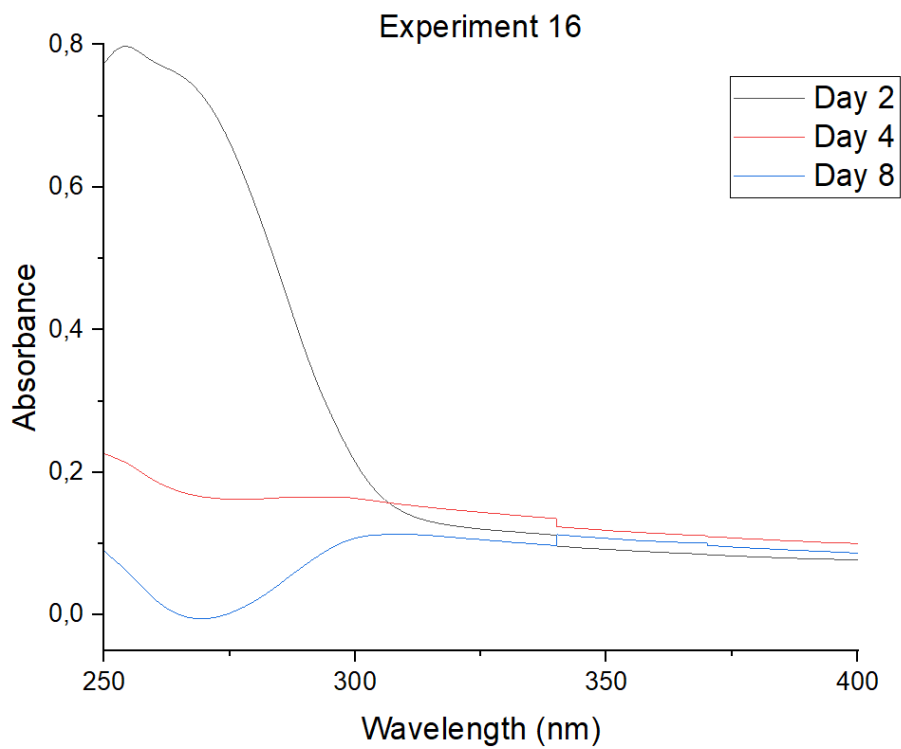
Διάγραμμα 43. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 13 του πειραματικού σχεδιασμού.



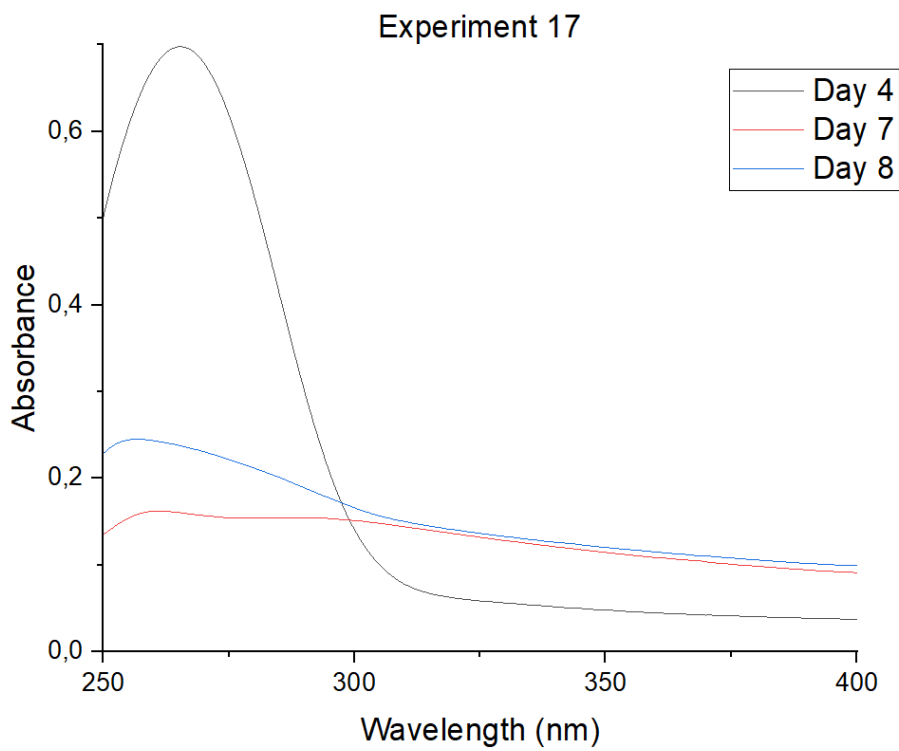
Διάγραμμα 44. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 14 του πειραματικού σχεδιασμού.



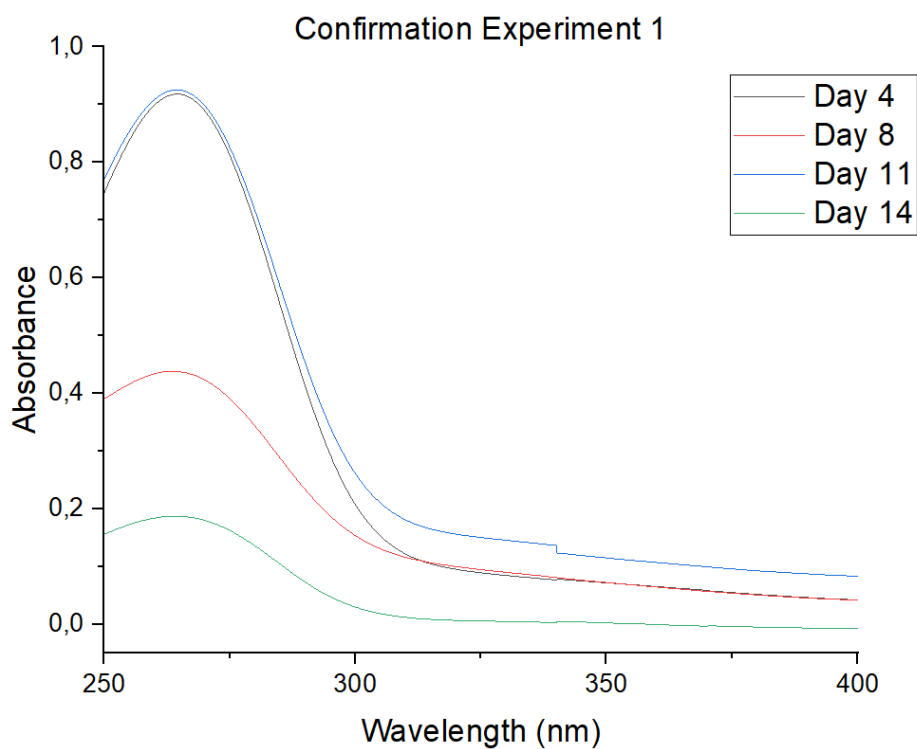
Διάγραμμα 45. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 15 του πειραματικού σχεδιασμού.



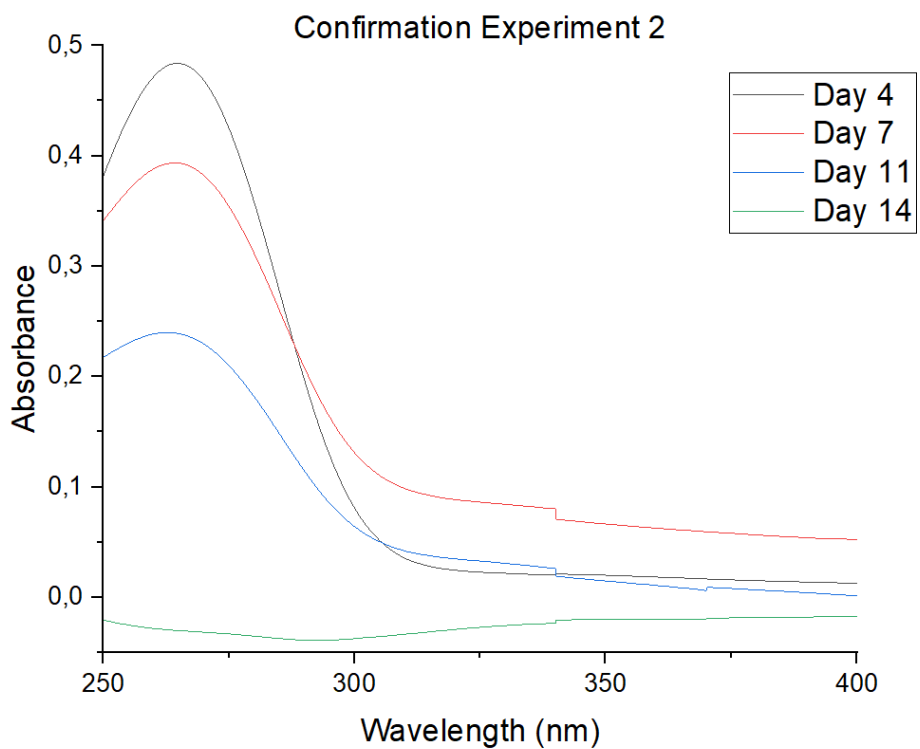
Διάγραμμα 46. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 16 του πειραματικού σχεδιασμού.



Διάγραμμα 47. Φάσματα UV-Vis Πειράματος 17 του πειραματικού σχεδιασμού.



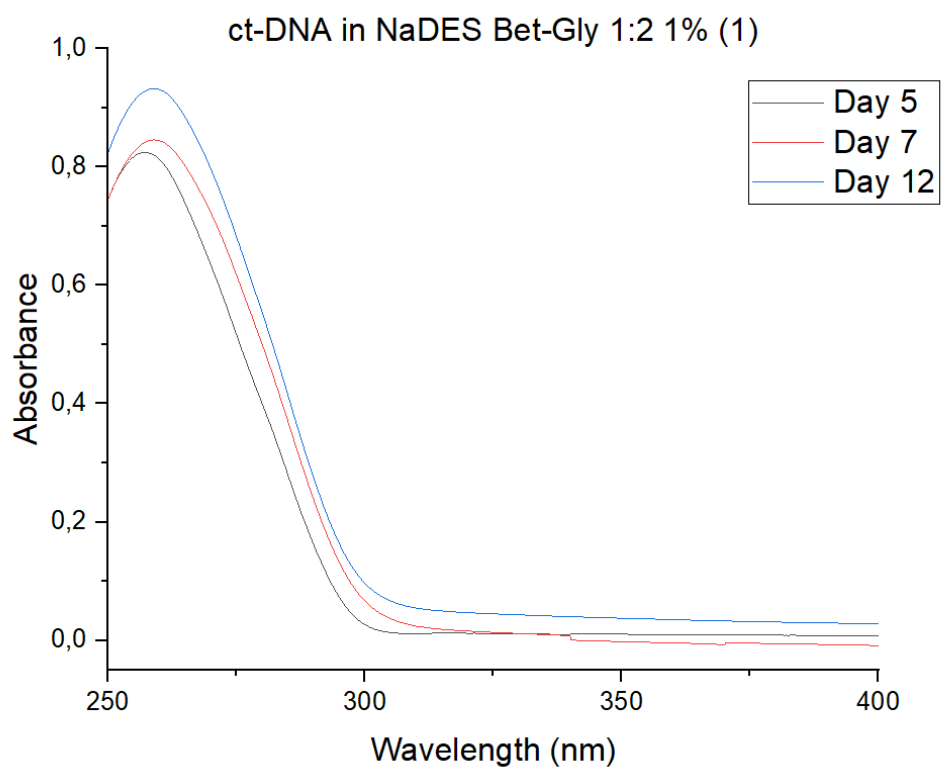
Διάγραμμα 48. Φάσματα UV-Vis πειράματος 1 επιβεβαίωσης του πειραματικού σχεδιασμού.



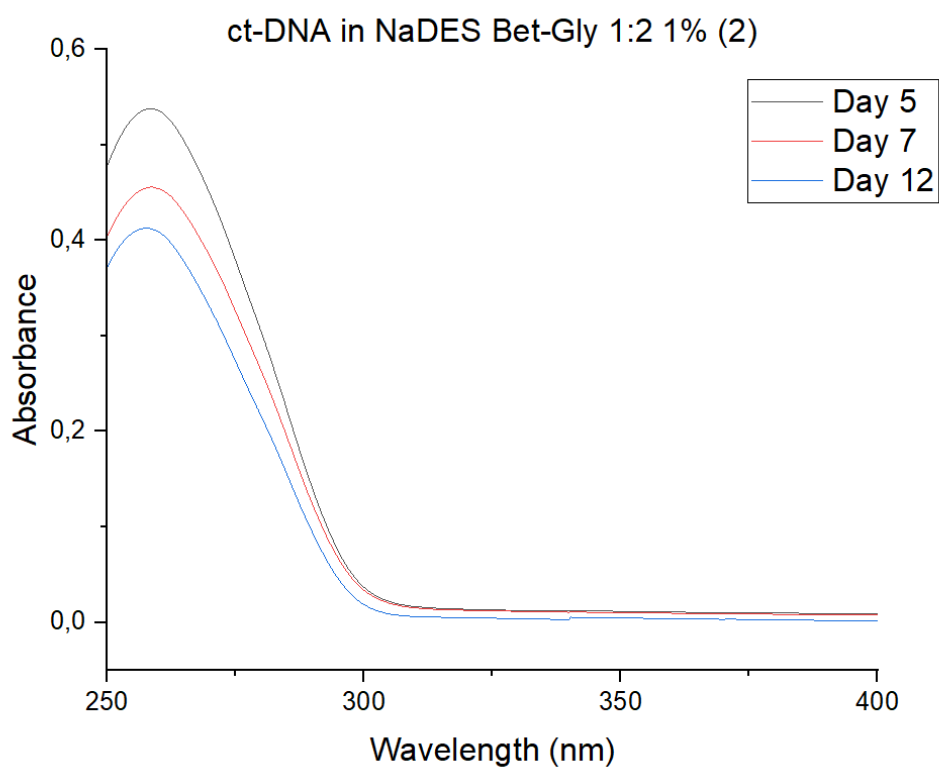
Διάγραμμα 49. Φάσματα UV-Vis πειράματος 2 επιβεβαίωσης του πειραματικού σχεδιασμού.

## Παράρτημα II

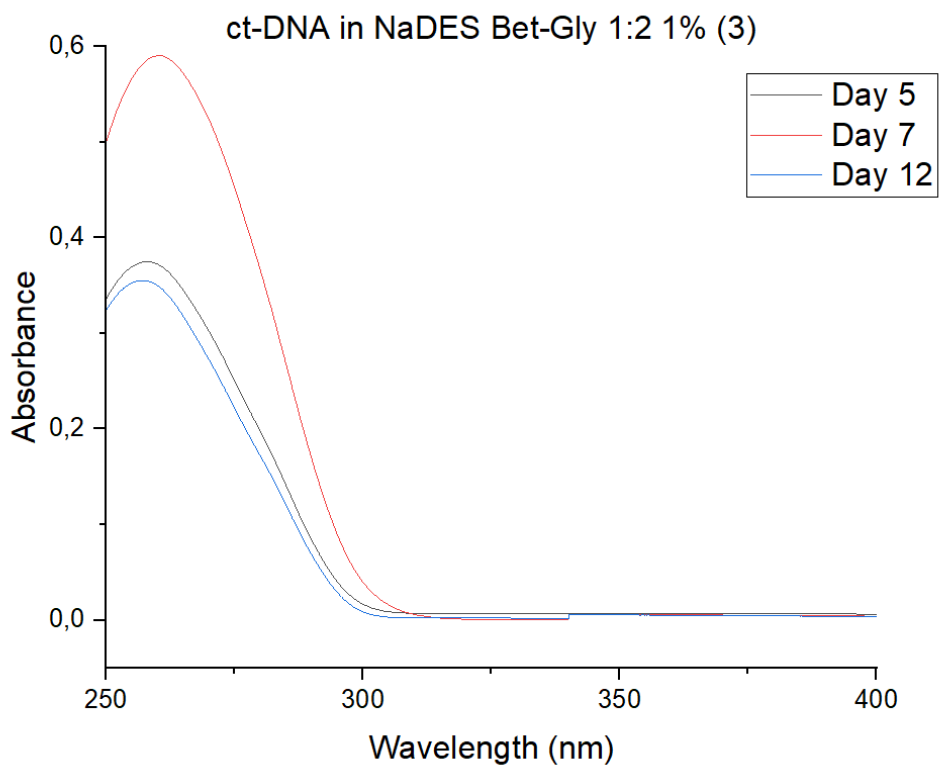
Παρακάτω βρίσκονται τα φάσματα UV-Vis για τα πειράματα συντήρησης του ct-DNA στα διάφορα μέσα.



Διάγραμμα 50. Φάσματα UV-Vis συντήρησης ct-DNA σε υδατικό διάλυμα 1 % NaDES Bet-Gly 1:2 (1).

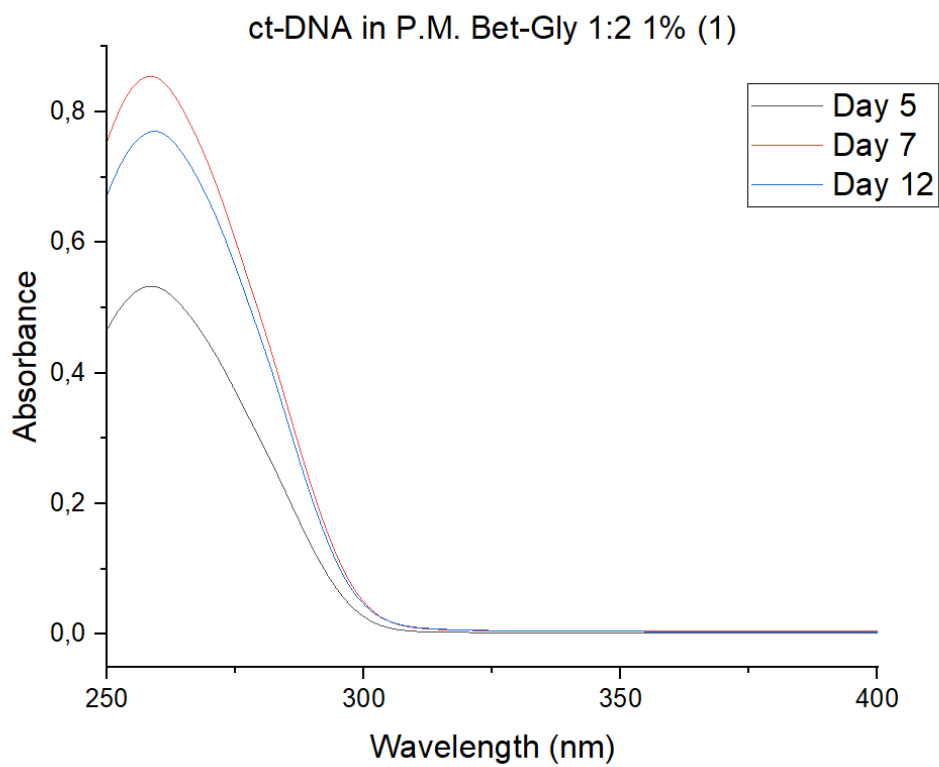


Διάγραμμα 51. Φάσματα UV-Vis συντήρησης ct-DNA σε υδατικό διάλυμα 1 % NaDES Bet-Gly 1:2 (2).

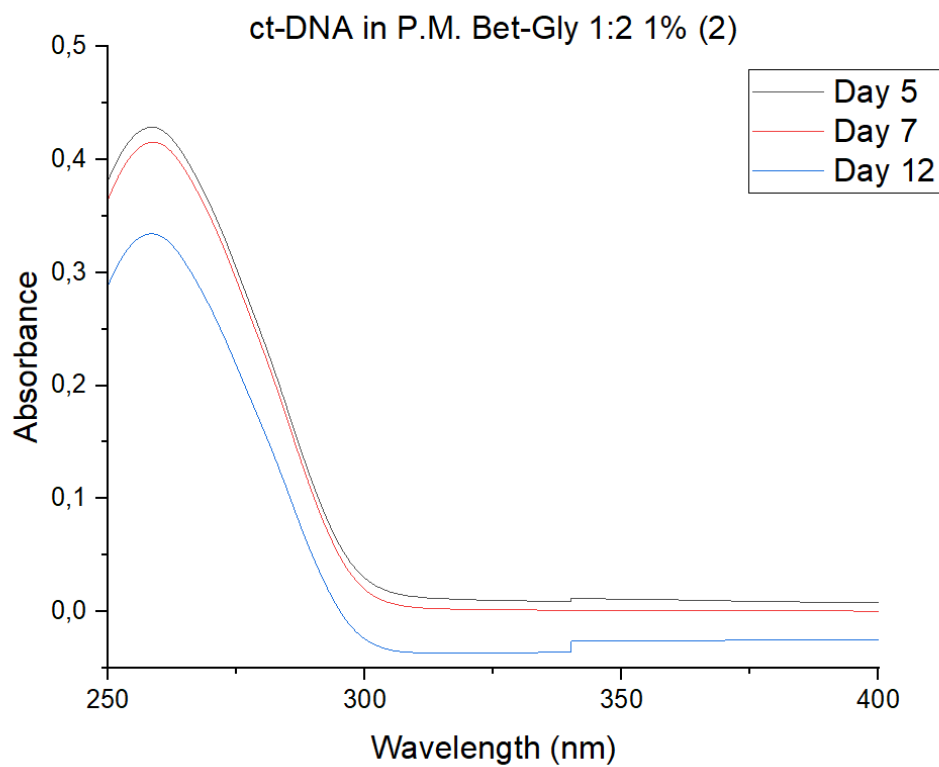


Διάγραμμα 52. Φάσματα UV-Vis συντήρησης ct-DNA σε υδατικό διάλυμα 1 % NaDES Bet-Gly 1:2 (3).

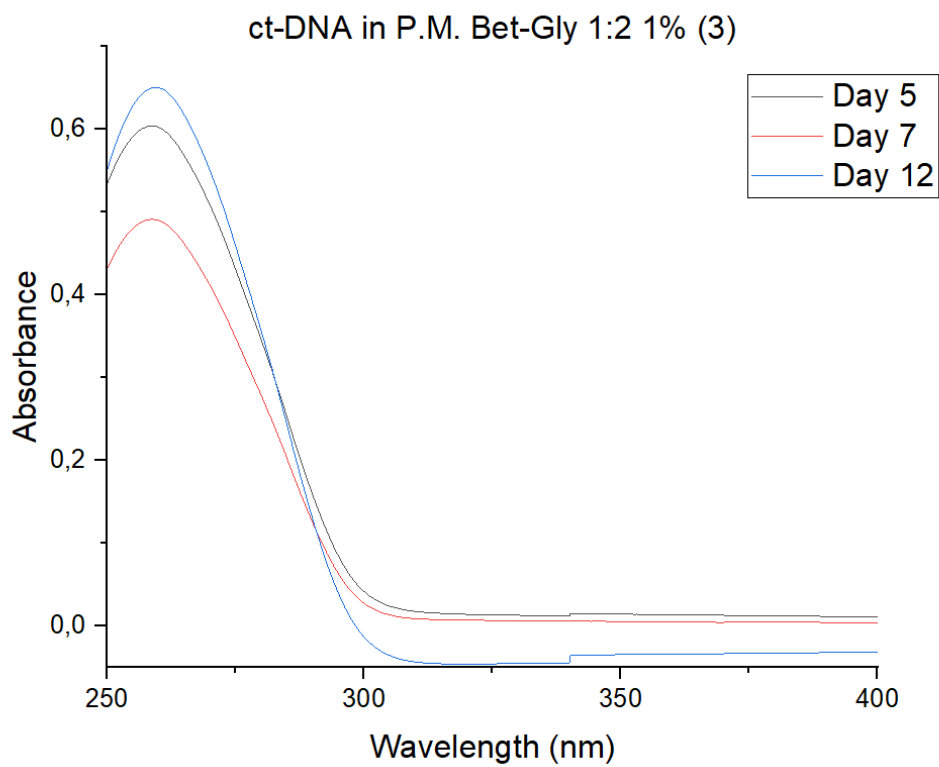




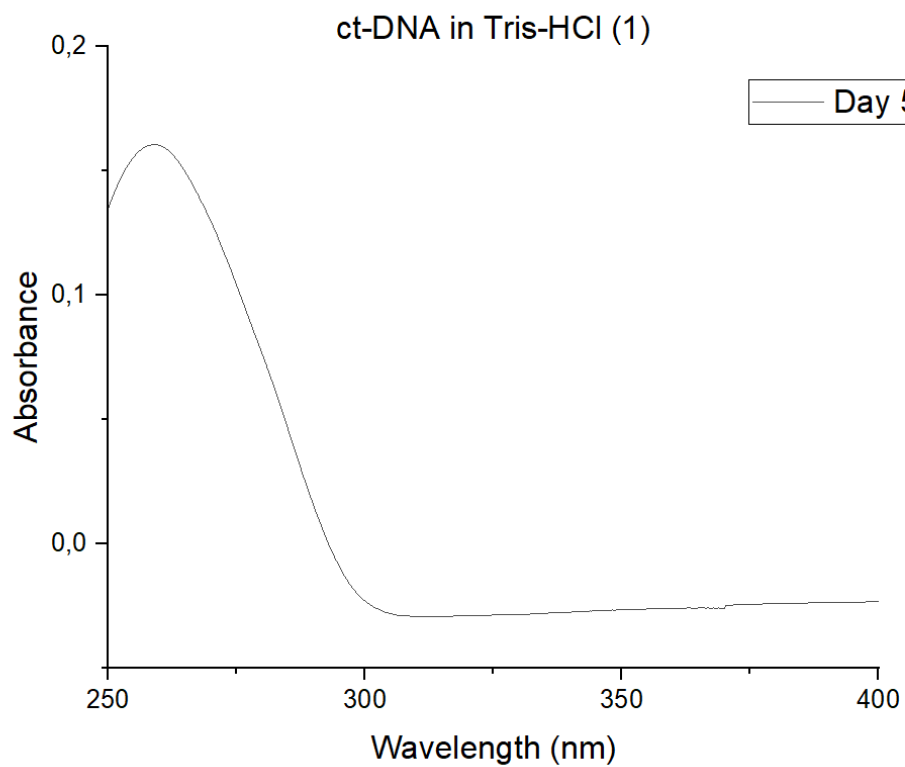
Διάγραμμα 53. Φάσματα UV-Vis συντήρησης ct-DNA σε φυσικό μίγμα 1 % NaDES Bet-Gly 1:2 (1).



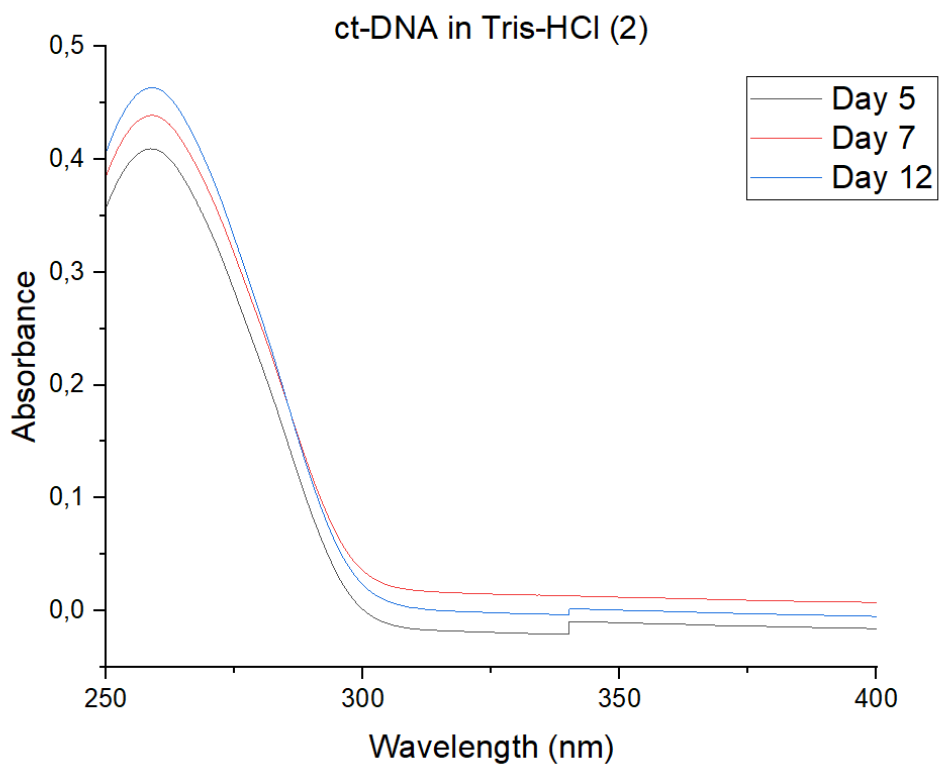
Διάγραμμα 54. Φάσματα UV-Vis συντήρησης ct-DNA σε φυσικό μίγμα 1 % NaDES Bet-Gly 1:2 (2).



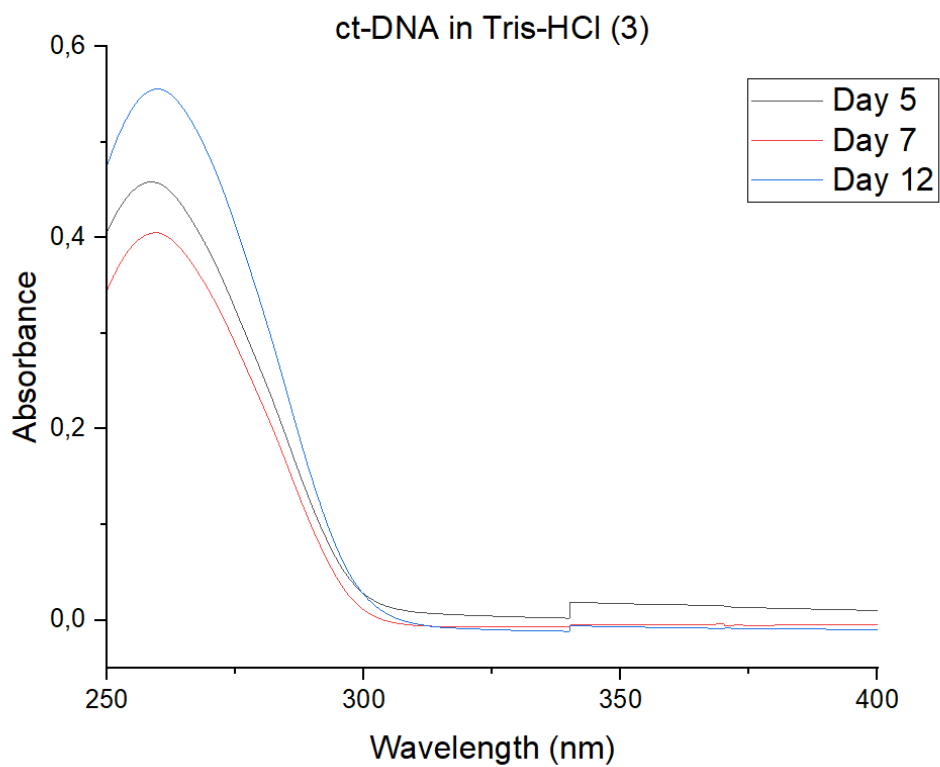
Διάγραμμα 55. Φάσματα UV-Vis συντήρησης ct-DNA σε φυσικό μίγμα 1 % NaDES Bet-Gly 1:2 (3).



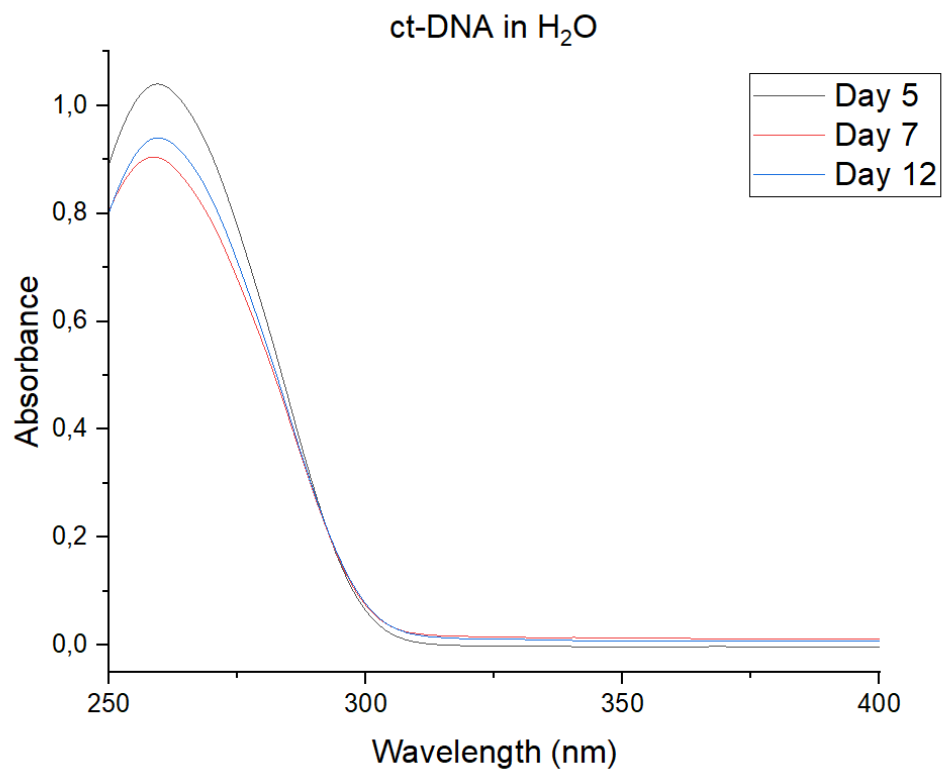
Διάγραμμα 56. Φάσματα UV-Vis συντήρησης ct-DNA σε διάλυμα Tris-HCl (1).



Διάγραμμα 57. Φάσματα UV-Vis συντήρησης ct-DNA σε διάλυμα Tris-HCl (2).



Διάγραμμα 58. Φάσματα UV-Vis συντήρησης ct-DNA σε διάλυμα Tris-HCl (3).



Διάγραμμα 59. Φάσματα UV-Vis συντήρησης ct-DNA σε υπερκάρθαιο νερό.