

PROTOCOLLO di PURIFICAZIONE:

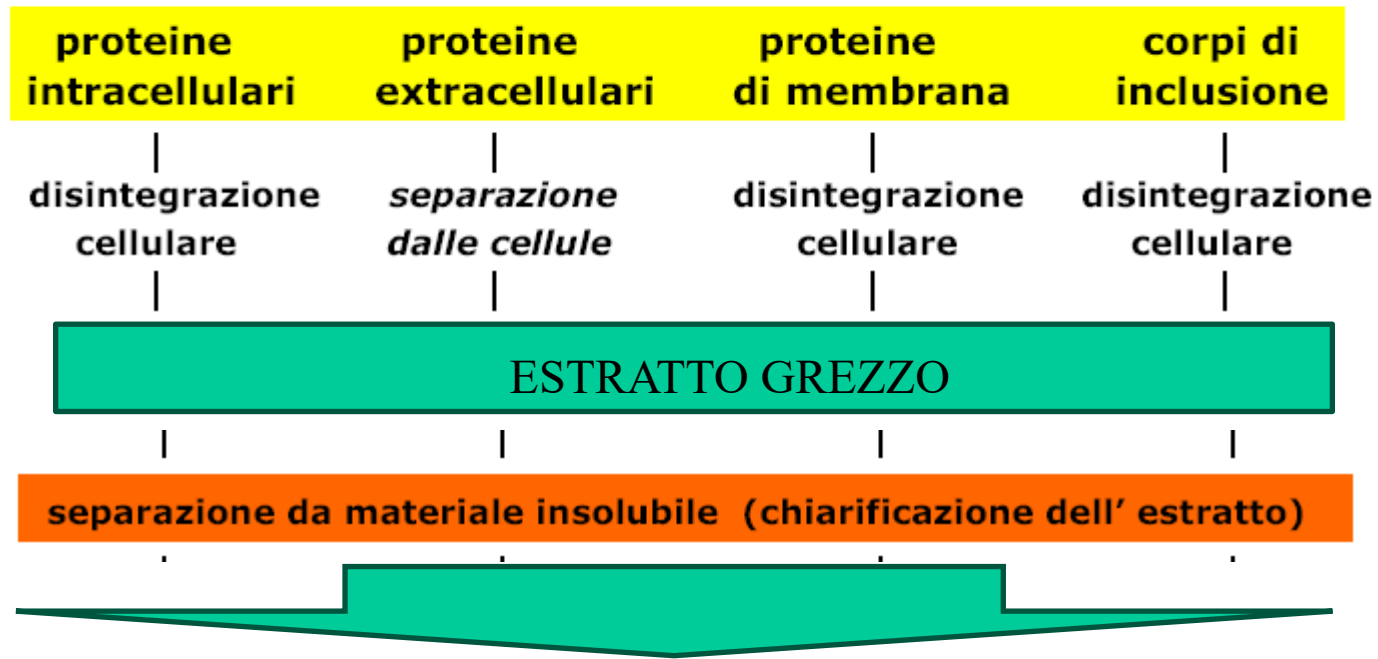
Insieme di **tecniche di separazione** che sfruttano principi diversi e vengono effettuate secondo un preciso ordine al fine di purificare una proteina a partire da una miscela complessa



Tecniche di separazione di tipo preparativo

Per verificare il livello di purificazione raggiunto nelle diverse fasi della purificazioni dobbiamo usare **tecniche di separazione analitiche**

Solubilizzazione della proteina e sviluppo dei passaggi di purificazione



Purificazione della proteina
che si vuole studiare

PROTOCOLLO DI PURIFICAZIONE

Serie di tecniche di separazione che sfruttano principi diversi per purificare una proteina a partire da una miscela complessa

Le diverse tecniche sfruttano diverse caratteristiche:

- SOLUBILITA' > PRECIPITAZIONI

- MASSA MOLECOLARE

- CARICA ELETTRICA

- PROPRIETA' di ADSORBIMENTO

- AFFINITA' di LEGAME ad altre biomolecole

CROMATOGRAFIA

CROMATOGRAFIA

```
graph LR; A[CROMATOGRAFIA] --> B[analitica]; A --> C[preparativa];
```

La cromatografia (dal greco χρῶμα, traslitterato in khrôma, "colore") è una tecnica di separazione dei componenti di una miscela basata sulla distribuzione dei suoi componenti tra **due fasi**, una stazionaria e una mobile che si muove lungo una direzione definita.

- **Fase stazionaria** (solida o liquida o miscela solido/liquido)
- **Fase mobile** (liquida o gassosa)
- **La separazione delle molecole dipende dalle interazioni che le molecole instaurano con la fase stazionaria o la fase mobile**

Classificazione delle tecniche cromatografiche

1. Stato fisico delle due fasi

- cromatografia liquida
- gascromatografia

2. Meccanismo di ritenzione

- adsorbimento
- ripartizione
- scambio ionico
- esclusione
- affinità

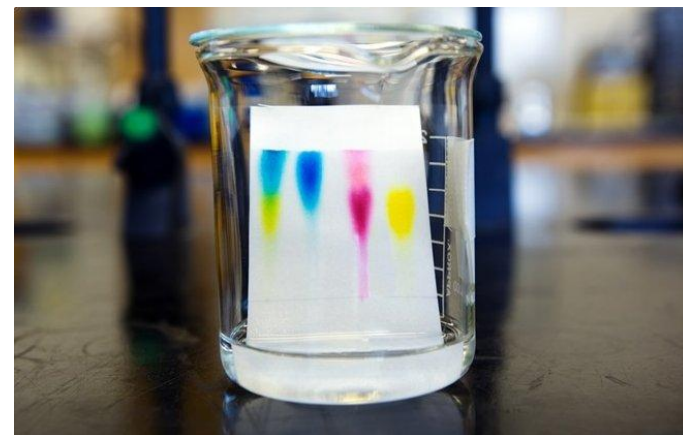
3. Apparato strumentale

- cromatografia su colonna
- cromatografia su strato sottile

TECNICHE CROMATOGRAFICHE

TECNICHE di SEPARAZIONE dei componenti di una miscela basate sulla diversa distribuzione dei componenti della miscela in due fasi non miscibili tra loro:
FASE MOBILE e FASE STAZIONARIA

- **CROMATOGRAFIA** su **STRATO SOTTILE** o **TLC** (thin layer chromatography) in **MODALITA' ANALITICA**



Nella TLC la fase stazionaria è rappresentata da uno strato sottile di materiale adsorbente, solitamente **gel di silice** o ossido di alluminio, depositato sulla superficie di una lastra di materiale inerte, generalmente vetro, plastica o alluminio. Si semina una goccia del campione su un'estremità della lastra da TLC che viene poi posizionata verticalmente in una camera chiusa contenente un **solvente organico (fase mobile)** sul fondo. La fase mobile risale lungo la superficie della lastra per capillarità; i componenti del campione migrano a distanze variabili, in base alle rispettive affinità differenziali per la fase stazionaria e quella mobile. Quando il solvente raggiunge l'estremità superiore della lastra, questa viene rimossa dalla camera di sviluppo e lasciata asciugare.

<https://www.youtube.com/watch?v=YCqxrGtguXo>

TECNICHE CROMATOGRAFICHE

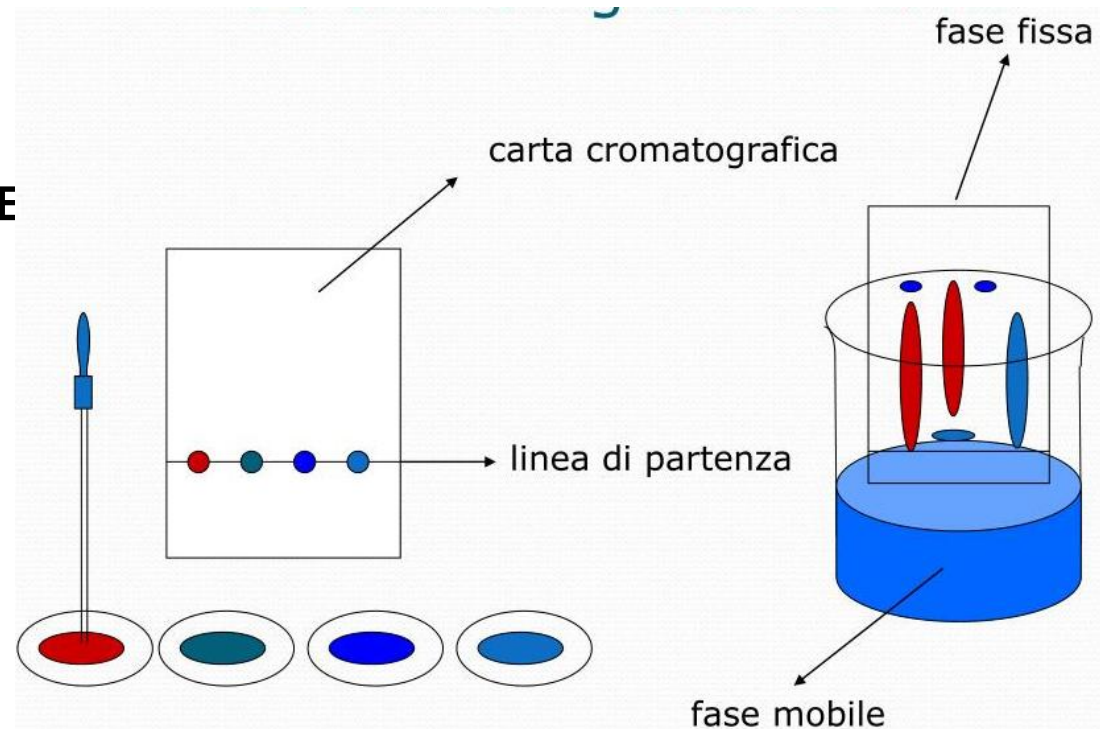
TECNICHE di SEPARAZIONE dei componenti di una miscela basate sulla diversa distribuzione dei componenti della miscela in due fasi non miscibili tra loro:
FASE MOBILE e FASE STAZIONARIA

-CROMATOGRAFIA su CARTA in MODALITA'

ANALITICA

FASE STAZIONARIA: fibre di cellulosa

FASI MOBILI miscele di solventi organici = **SONO POCO UTILIZZATE** x le **PROTEINE** (denaturazione)



TECNICHE CROMATOGRAFICHE

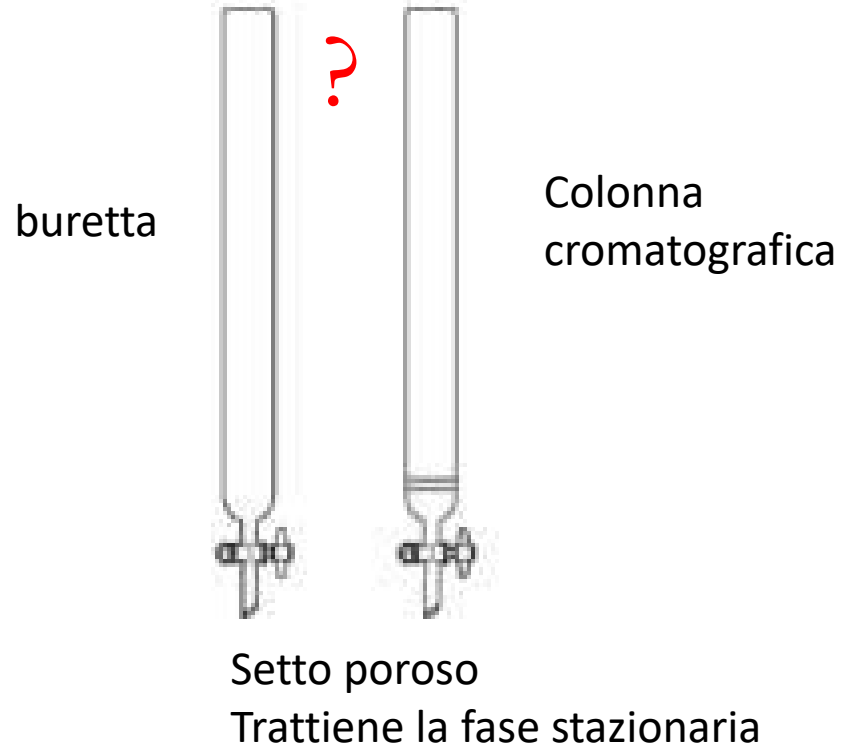
TECNICHE di SEPARAZIONE dei componenti di una miscela basate sulla diversa distribuzione dei componenti della miscela in due fasi non miscibili tra loro:
FASE MOBILE e FASE STAZIONARIA

- CROMATOGRAFIA su COLONNA Liquid chromatography (LC)
con MODALITA' sia ANALITICA che PREPARATIVA:

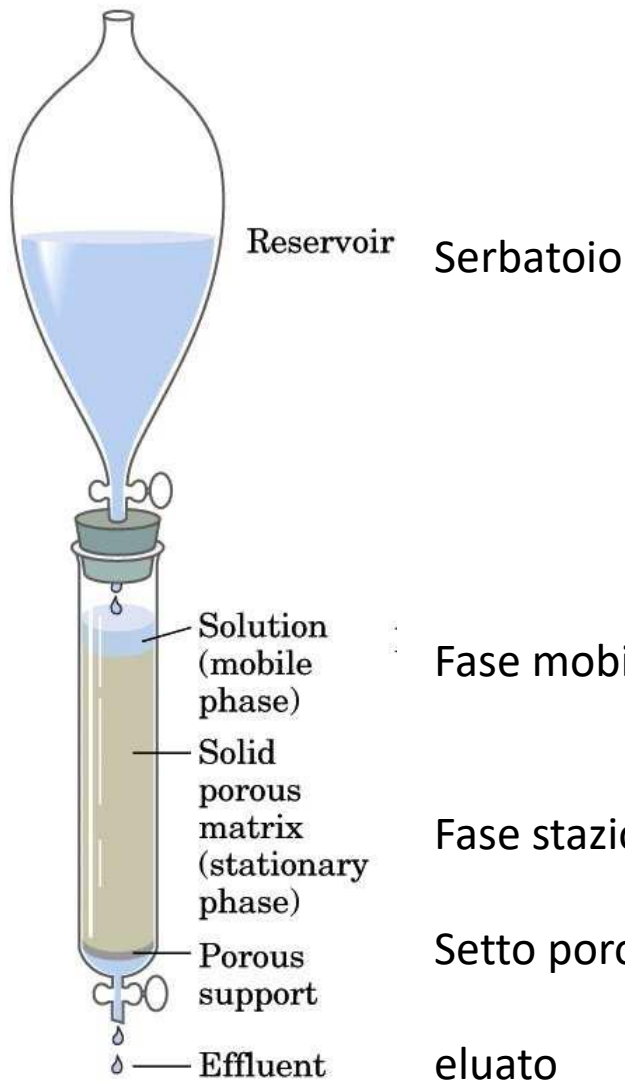
a basse pressioni < 5 bar

Low Pressure Liquid Chromatography

ad alte pressioni > 50 bar HPLC

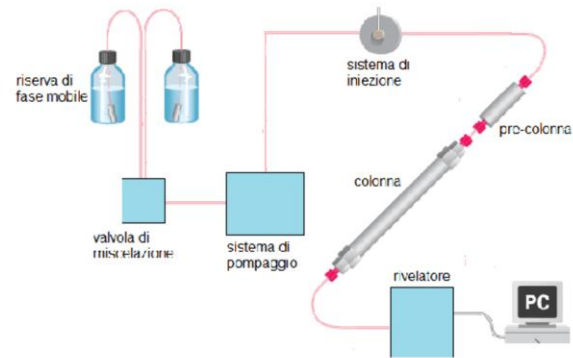


Sistema CROMATOGRAFICO

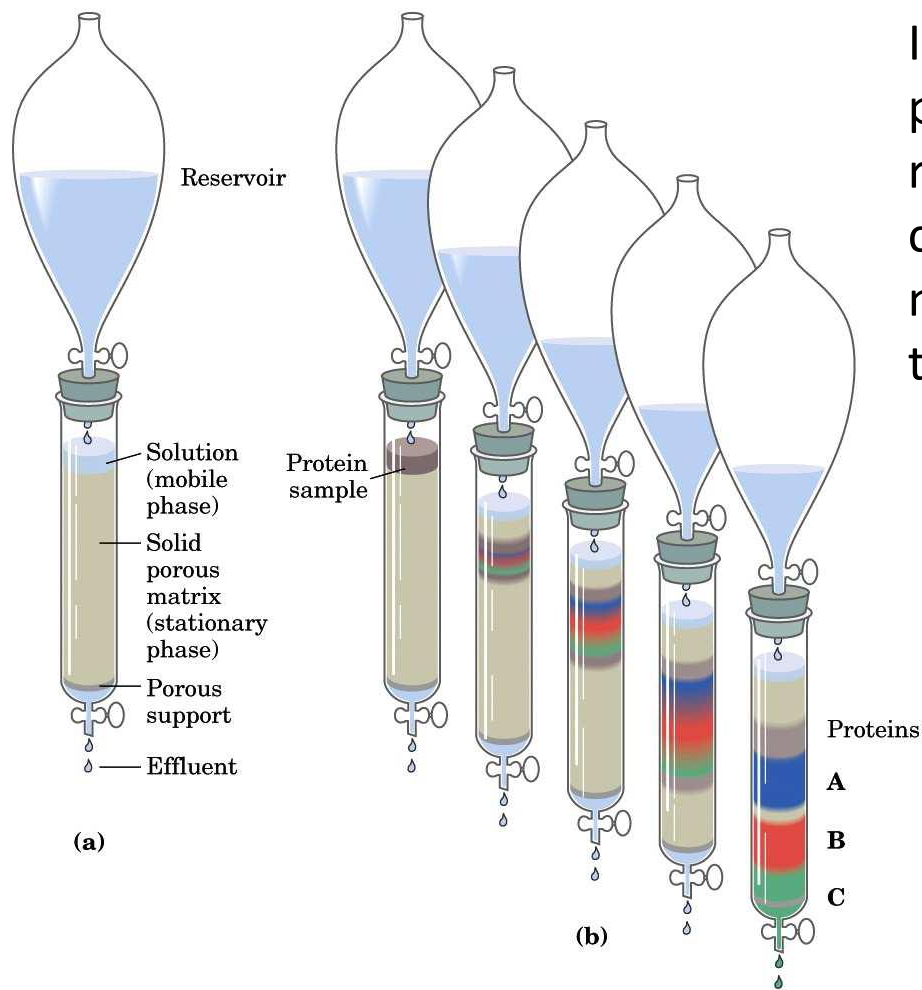


Cromatografia Liquida (LC)

Un cromatografo liquido è costituito da



- 1) Una riserva di fase mobile (più un sistema di degassamento)
- 2) Una valvola di miscelazione
- 3) Un sistema di pompaggio
- 4) Un sistema di iniezione del campione
- 5) Una colonna di separazione contenente una opportuna fase stazionaria
- 6) Un rivelatore



I componenti della miscela che **interagiscono** più fortemente con la FS **saranno rallentati** rispetto ad altri componenti della miscela che non interagiscono con la FS, che si muovono più velocemente lungo la colonna, trascinati dal flusso di FM

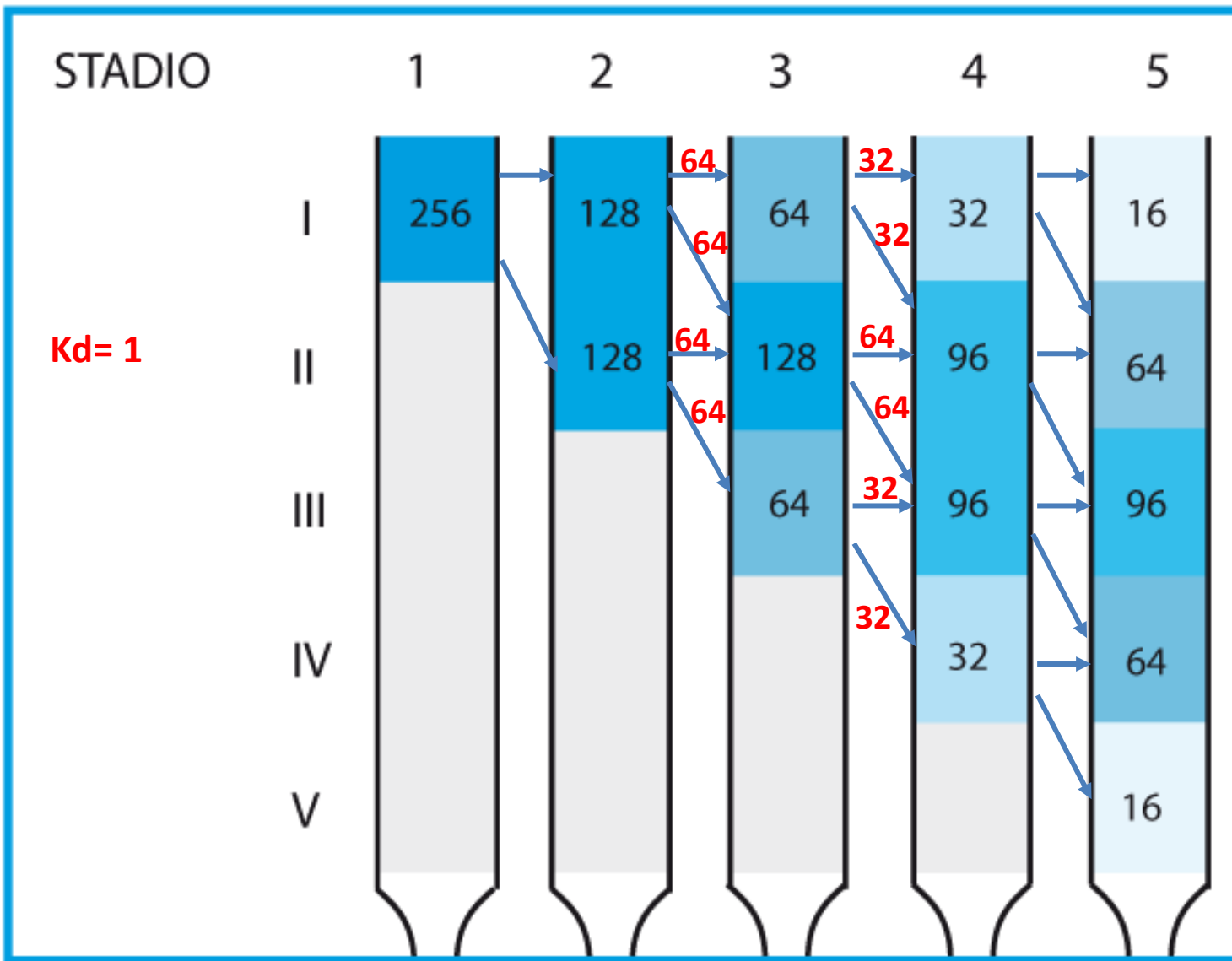
Ogni analita **A** della miscela è caratterizzato da un coefficiente di distribuzione K_d tra due **fasi immiscibili**

$$K_d = \frac{[A] \text{ nella fase mobile}}{[A] \text{ nella fase stazionaria}}$$

$K_d = 1$ indica che l'analita interagisce ugualmente con la fase mobile e la fase stazionaria

$K_d > 1$ indica che l'analita interagisce preferenzialmente con la fase mobile → si muove velocemente attraverso la colonna

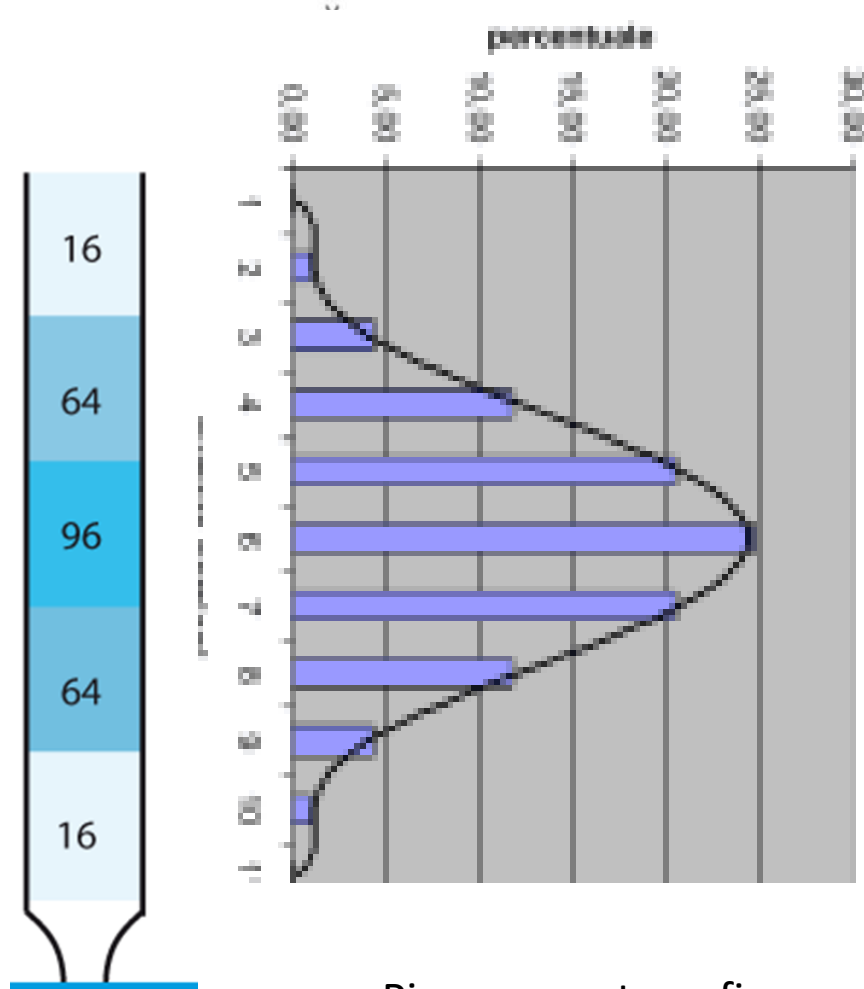
$K_d < 1$ indicano che l'analita interagisce preferenzialmente con la fase stazionaria → si muove lentamente lungo la colonna



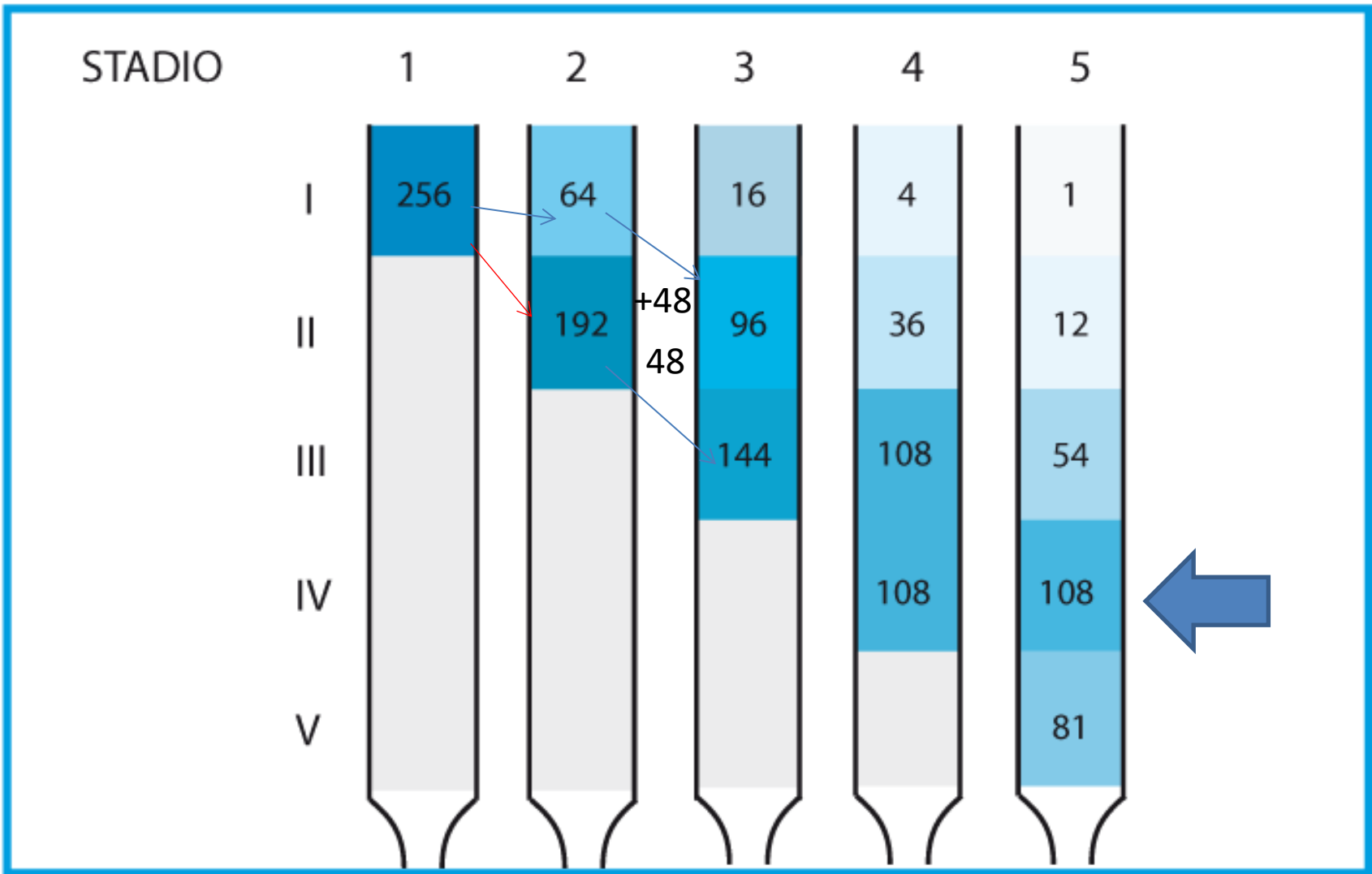
$K_d = 1$ indica che l'analita interagisce ugualmente con la fase mobile e la fase stazionaria

PICCO CROMATOGRAFICO= GAUSSIANA

Un processo separativo di tipo cromatografico ha quindi come risultato un **profilo di concentrazione** risolto nello spazio o nel tempo di **forma gaussiana**.



Picco cromatografico



SU 4 MOLECOLE:

- 3 parti FM
- 1 parte FS

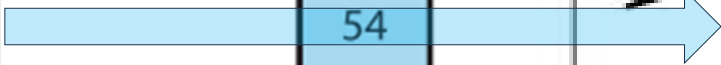
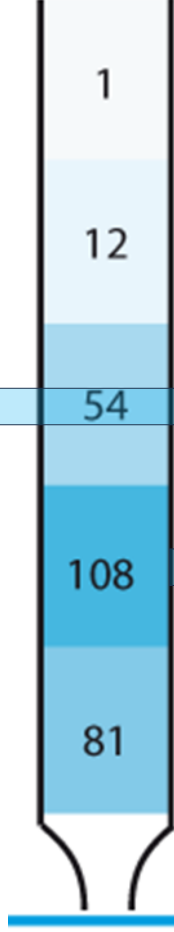
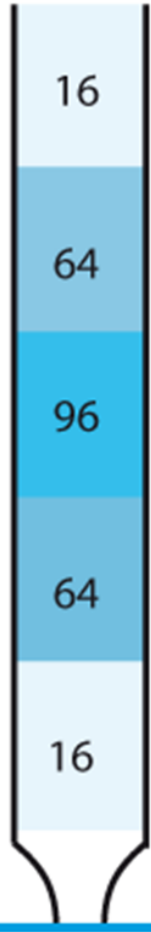
$$K_d = \frac{[A] \text{ nella fase mobile}}{[A] \text{ nella fase stazionaria}}$$

A: $K_d=1$

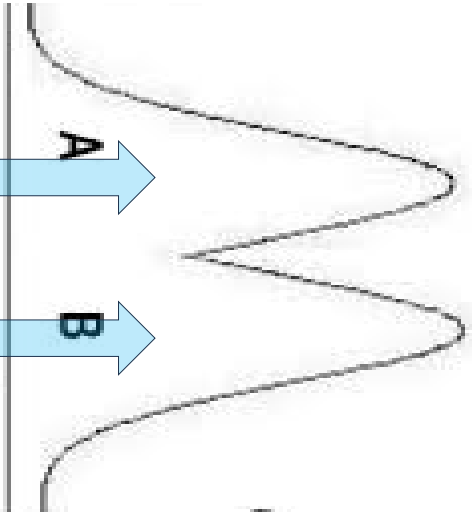
B: $K_d>1$

5

5



tempo

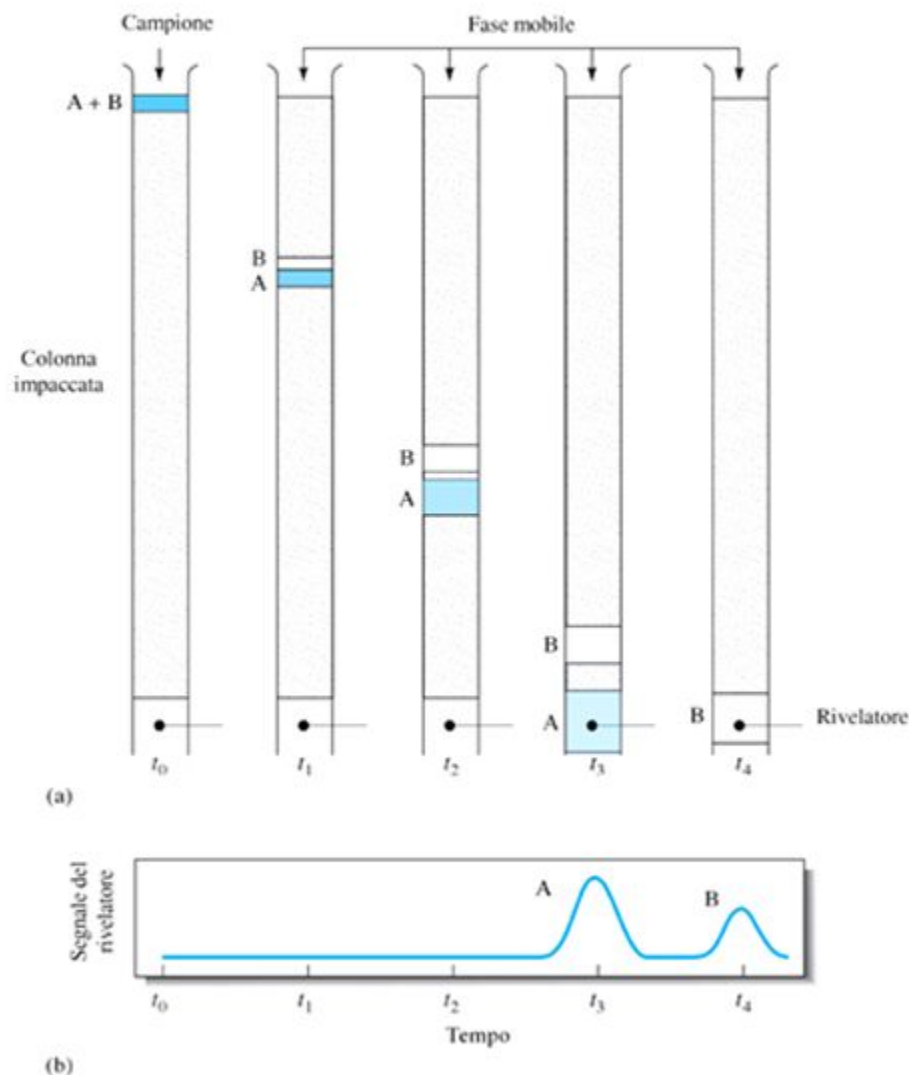


Visualizzazione della separazione

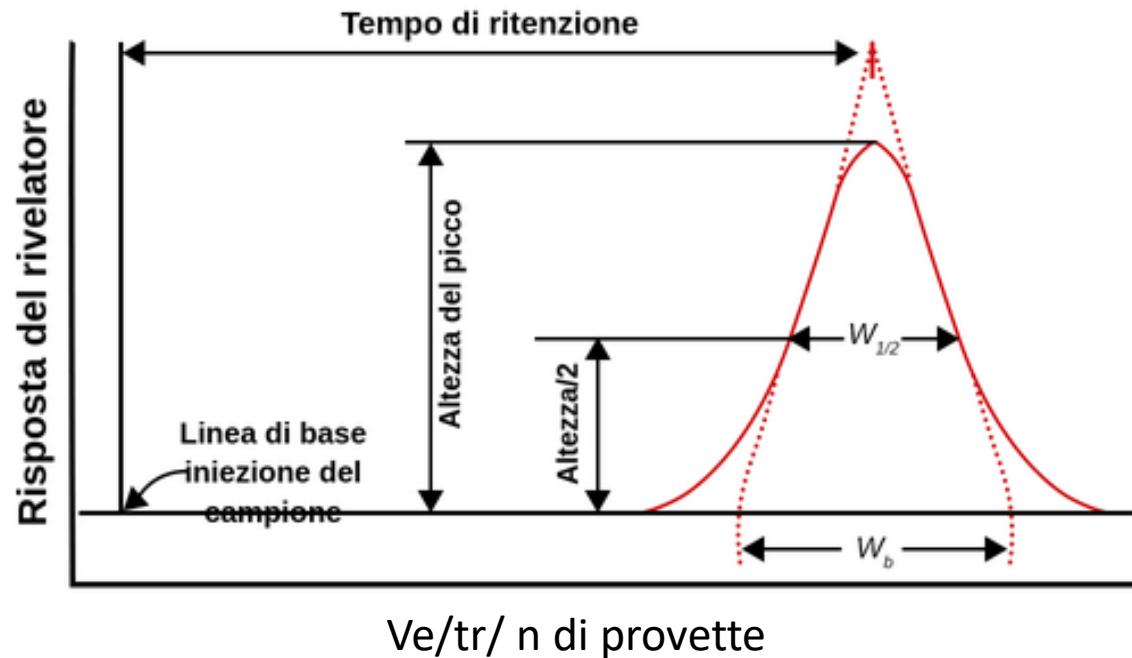
Ponendo all'uscita della colonna un rivelatore che misuri la concentrazione del soluto nell'*eluato* (cioè la fase mobile che esce dalla colonna) e riportando il segnale in funzione del tempo si può ottenere un *cromatogramma*

La posizione dei picchi sull'asse dei tempi, o *tempo di ritenzione*, serve per identificare i componenti del campione

L'area sottesa dai picchi è proporzionale alla quantità di ogni singolo componente e può essere utilizzata a scopo quantitativo



IL PICCO CROMATOGRAFICO



W è la **Larghezza del picco** misurato tracciando le tangenti al punto di flesso

W_{1/2} è la **Larghezza** del picco misurata al 50% dell'altezza

t_R **tempo di ritenzione** = Il tempo impiegato da ciascun analita per fuoriuscire dalla colonna, viene misurato nel punto massimo del picco

V_e è **volume di eluizione** = Il volume di fase mobile richiesto per l'eluizione di ciascun analita

t_M è il tempo necessario affinché una sostanza non trattenuta (marcatore) attraversi la colonna dal punto di iniezione al rivelatore.

La **risoluzione di un picco** fornisce una misura delle capacità di un sistema cromatografico di separare un analita dagli altri della miscela=
PICCHI BEN SEPARATI

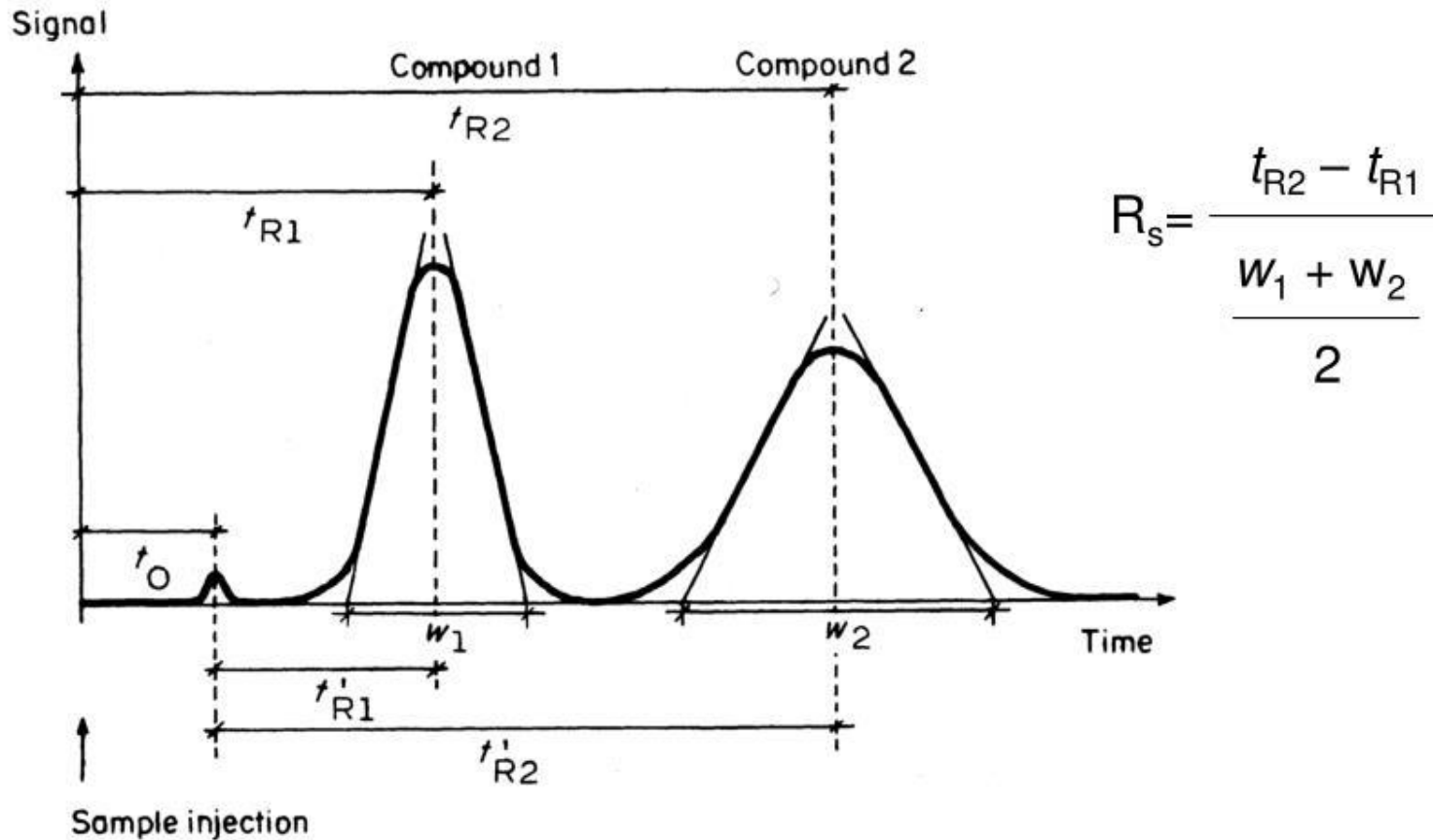
▪ **Selettività :**

▪ **Efficienza:**

Risoluzione

La risoluzione indica il grado di separazione dei picchi e dipende dalla selettività ed efficienza.

In termini matematici la risoluzione tra due picchi adiacenti (R_s) è espressa dal rapporto fra le loro distanze e la semisomma delle rispettive larghezze alla base

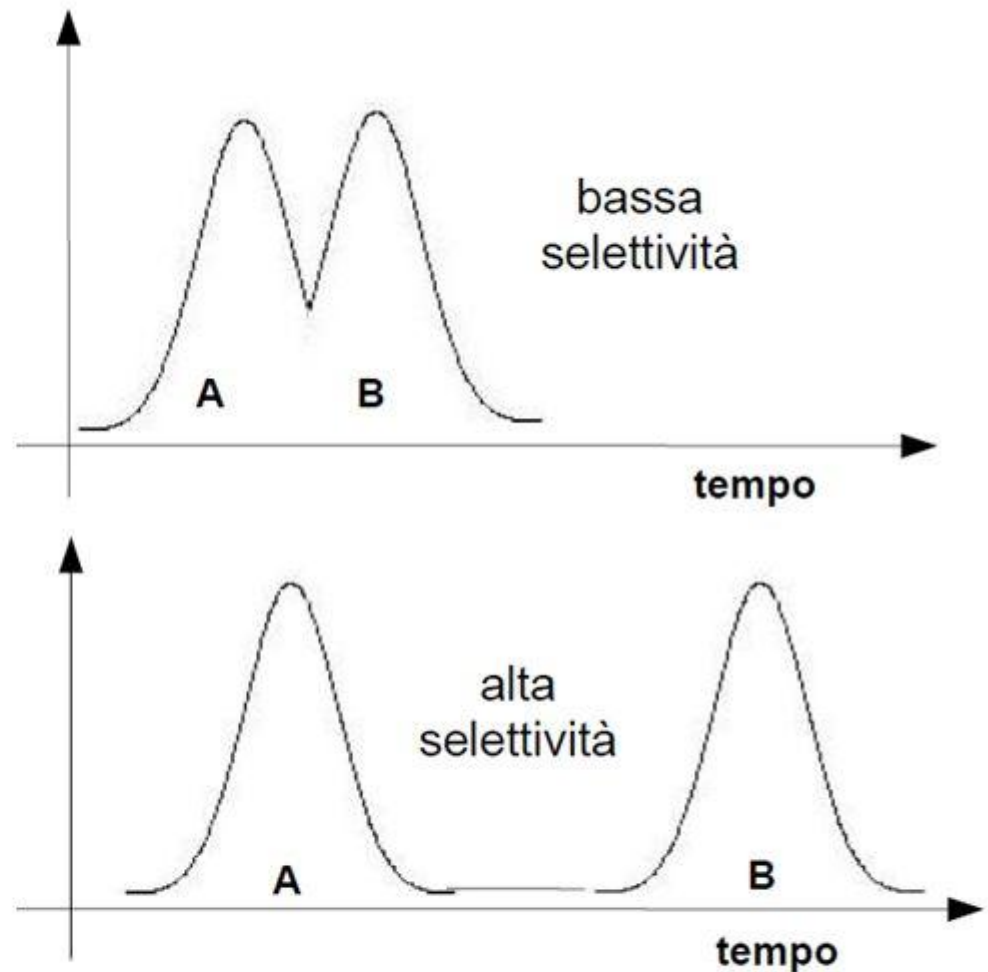


▪ **Selettività** : capacità di eluire specie chimiche diverse a velocità diverse (rapporto tra i tempi di ritenzione delle due sostanze)

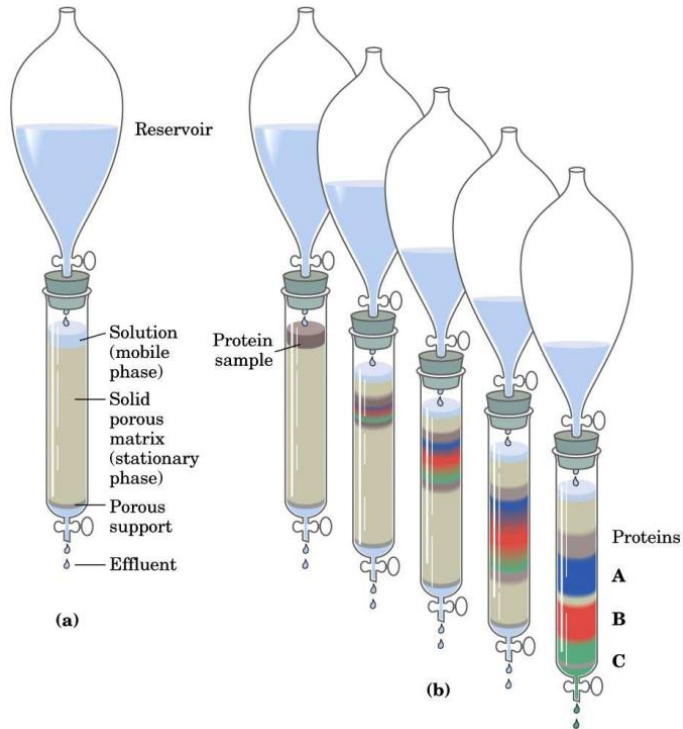
○ **Selettività**

E' definita come la capacità di una colonna di fornire picchi distanziati e dipende dalla temperatura e dalla natura della fase stazionaria.

- A fianco sono riportati due cromatogrammi, di una miscela di due composti, ottenuti con due diverse fasi stazionarie: nel secondo caso si ha una maggior selettività.



▪ Selettività : è in funzione della costante di ripartizione



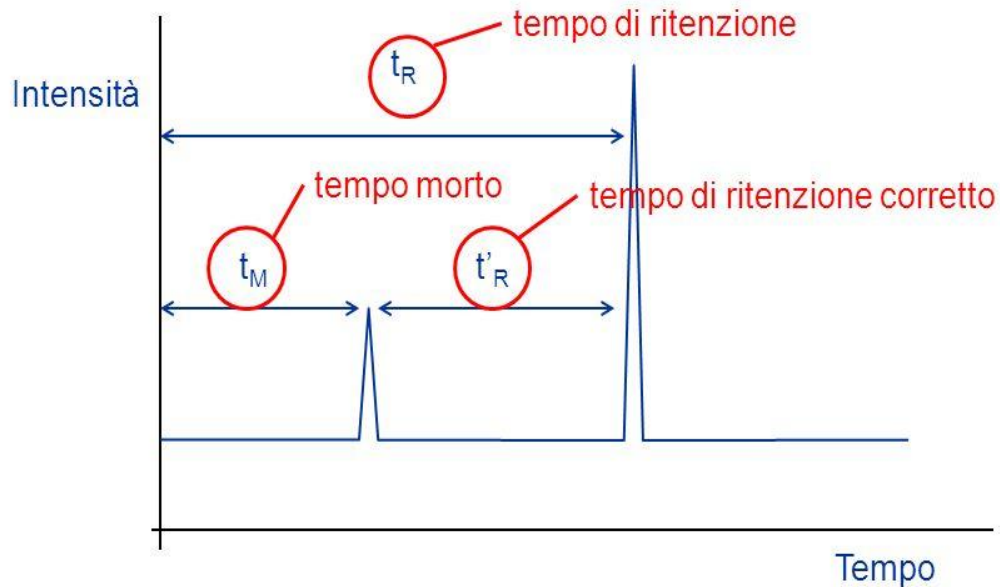
Ogni analita della miscela è caratterizzato da un coefficiente di ripartizione o di distribuzione K_d

$$K_d = \frac{[A] \text{ nella fase mobile}}{[A] \text{ nella fase stazionaria}}$$

$K_d > 1$ indica che l'analita interagisce preferenzialmente con la fase mobile → si muove velocemente attraverso la colonna

$K_d < 1$ indicano che l'analita interagisce preferenzialmente con la fase stazionaria → si muove lentamente lungo la colonna

Un sistema cromatografico ha una buona **SELETTIVITA'** se separa due composti strutturalmente correlati: **si misura come rapporto tra t_R**



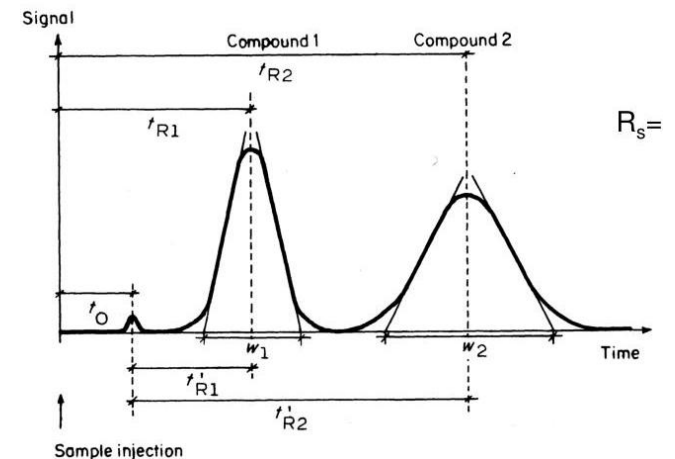
▪ tempo di ritenzione = t_R
 Il tempo impiegato da ciascun analita per fuoriuscire dalla colonna

tempo morto = t_M

tempo netto di ritenzione = t'_R

$$t'_R = t_R - t_M$$

$$\text{SELETTIVITA}' = t'_{R2} / t'_{R1}$$



▪ **Efficienza:** ampiezza relativa dei picchi (capacità del sistema di raggruppare tutte le molecole di un soluto in un volume ristretto)



▪ L'efficienza di una colonna si quantifica con il *numero di piatti teorici, N*

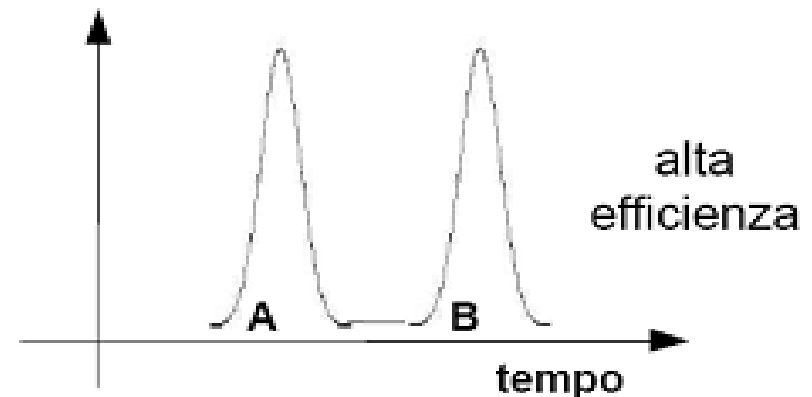
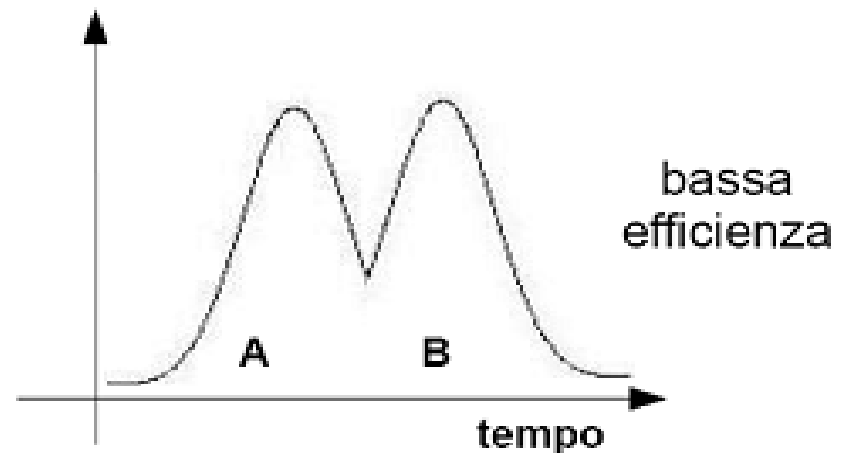
Efficienza.

E' la capacità del sistema cromatografico di mantenere compatta la banda di eluizione di una sostanza lungo tutto il percorso della fase mobile.

Ciò significa ottenere picchi alti e stretti all'uscita della colonna. La cosa è di grande importanza, perché qualora due sostanze avessero tempi di ritenzione molto vicini se ne potrebbe ottenere ugualmente la separazione.

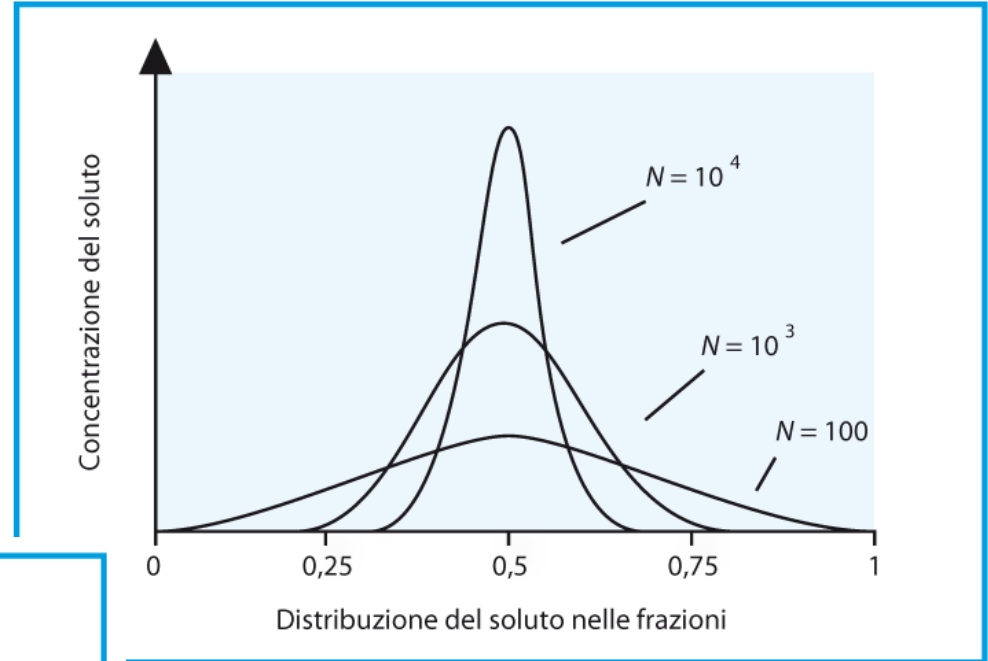
Quindi, quanto più stretti sono i picchi tanto più efficiente risulta la colonna.

A fianco sono riportati due cromatogrammi di una miscela di due sostanze effettuati con colonne diverse; in ambedue i casi si ha la stessa selettività, ma nel secondo caso si ha una maggior efficienza.

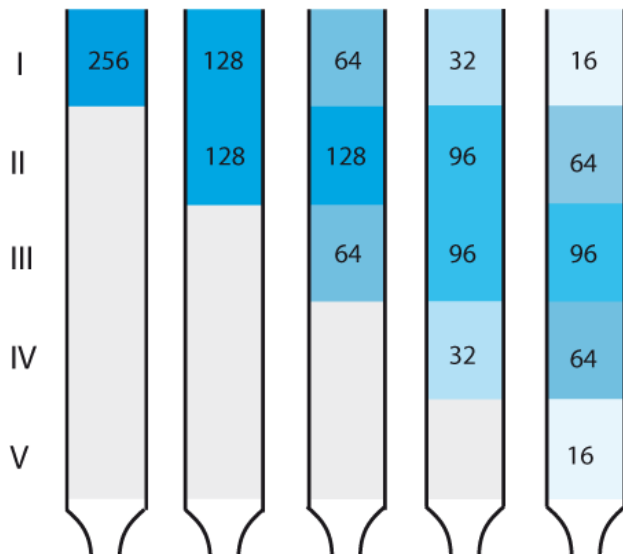


▪ L'efficienza di una colonna si quantifica con il **numero di piatti teorici, N**

Un piatto teorico è la più piccola zona all'interno della colonna in cui il soluto raggiunge un equilibrio di ripartizione tra la FM e la FS

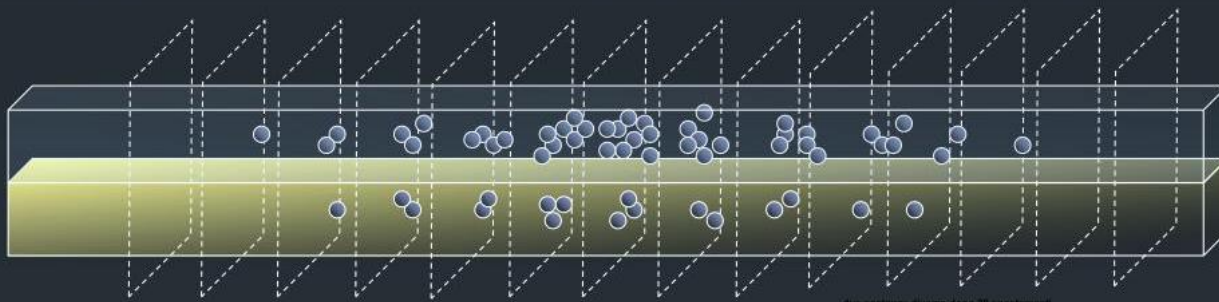


STADIO 1 2 3 4 5



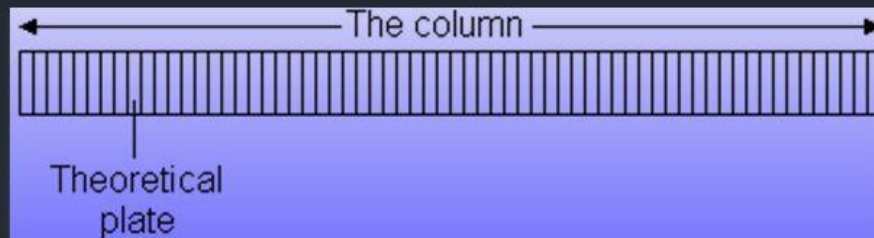
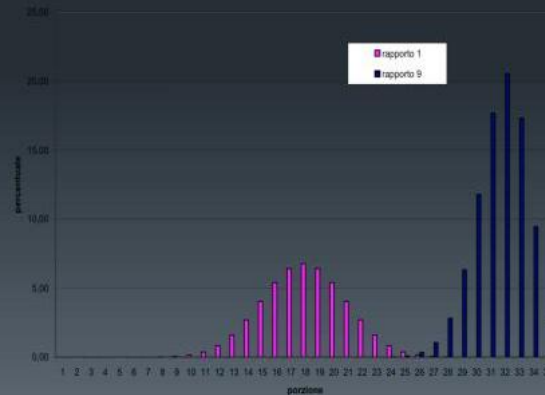
Colonna con 5 PIATTI TEORICI

$K_d = 1$ indica che l'analita interagisce ugualmente con la fase mobile e la fase stazionaria



due sostanze diverse dopo 30 spostamenti

Quindi l'efficienza di una colonna aumenta con il numero di piatti, tanto maggiore è N , tanto più è compatta la banda in uscita e quindi tanto più stretto è il picco sul cromatogramma.



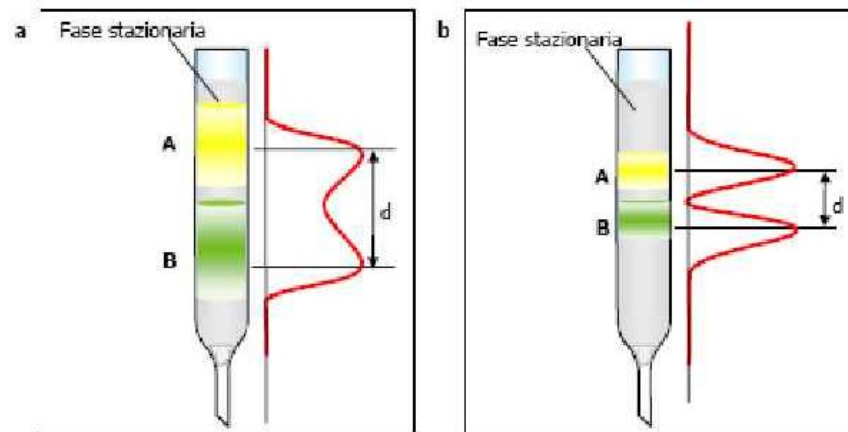
- La sostanza si sposta verso la fine della colonna attraverso la fase mobile che, in equilibrio su un piatto, si passa al piatto successivo.
- È importante sottolineare che, a differenza della colonna di distillazione, i piatti *non esistono realmente* all'interno della colonna ma sono solo un modello per facilitare la comprensione del processo che avviene.

Parametri importanti

- **Efficienza (quantificata come N): ampiezza relativa dei picchi rapporto tra il t_R e l'ampiezza del picco**

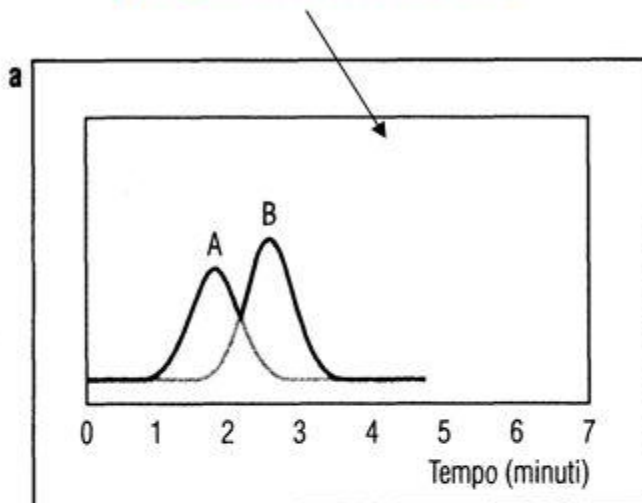
Efficienza di un sistema cromatografico

La capacità di un sistema cromatografico di eluire tutte le particelle di una data specie chimica con la stessa velocità, in modo da generare picchi molto stretti e ben separati, si definisce efficienza. In due separazioni cromatografiche su colonne che hanno uguale selettività ma diversa efficienza, si osserva che in quella caratterizzata da bassa efficienza (a), le bande dei composti A e B sono molto larghe e perciò si sovrappongono, mentre in quella dotata di buona efficienza (b), le bande sono strette e perciò ben distinte.

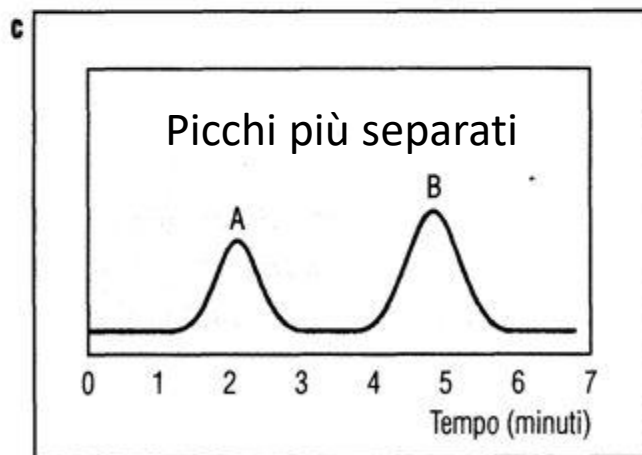
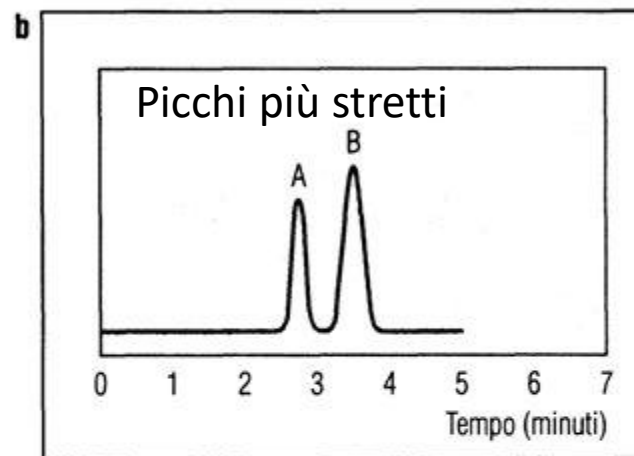


Il principio su cui si basa la separazione può essere descritto considerando una colonna contenente una fase stazionaria solida granulare circondata da una fase mobile liquida. Se, ad esempio, mettiamo in una colonna 256 molecole di una sostanza **A** e 256 molecole di una sostanza **B**, con **A** e **B** che hanno i coefficienti di ripartizione ($K=C_{FM}/C_{FS}$) rispettivamente **$K_A = 1$** e **$K_B = 0,33$** , le due sostanze verranno eluite in tempi diversi. Anche se in realtà l'aggiunta di solvente è continua, è possibile immaginare ogni colonna cromatografia come un insieme di

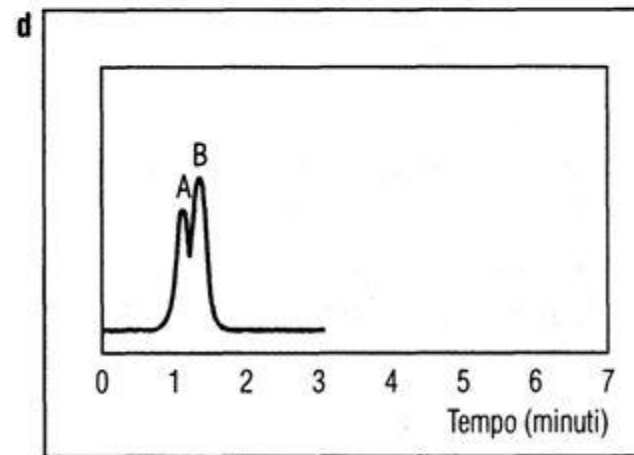
**Scarsa selettività ed efficienza
= picchi non risolti**



Aumento di efficienza



Aumento di selettività



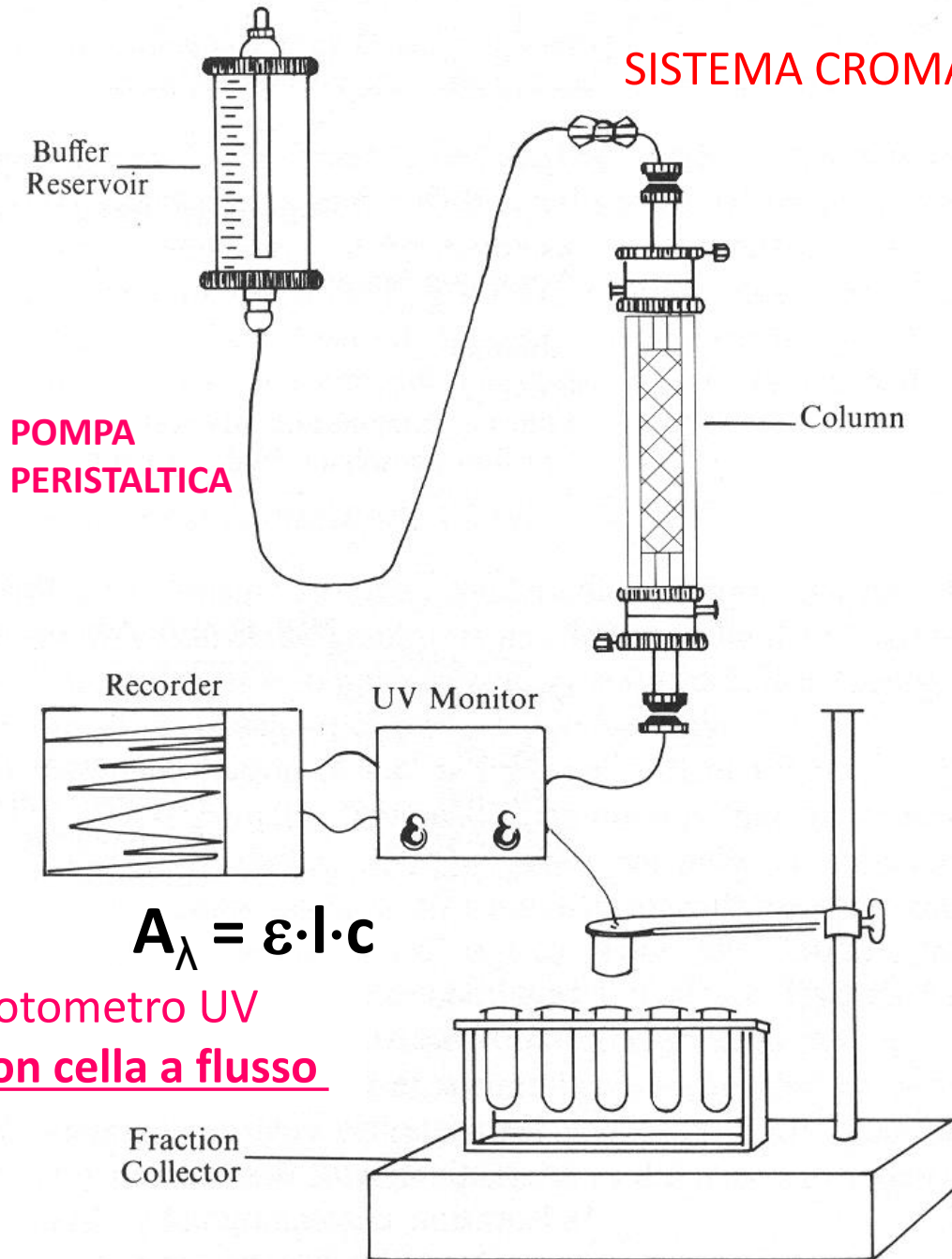
**Aumento di efficienza ma
non di selettività**

Parametri importanti

Capacità:

- **Misura della quantità di materiale che può essere risolto senza sovrapposizione dei picchi.**

SISTEMA CROMATOGRAFICO AUTOMATIZZATO

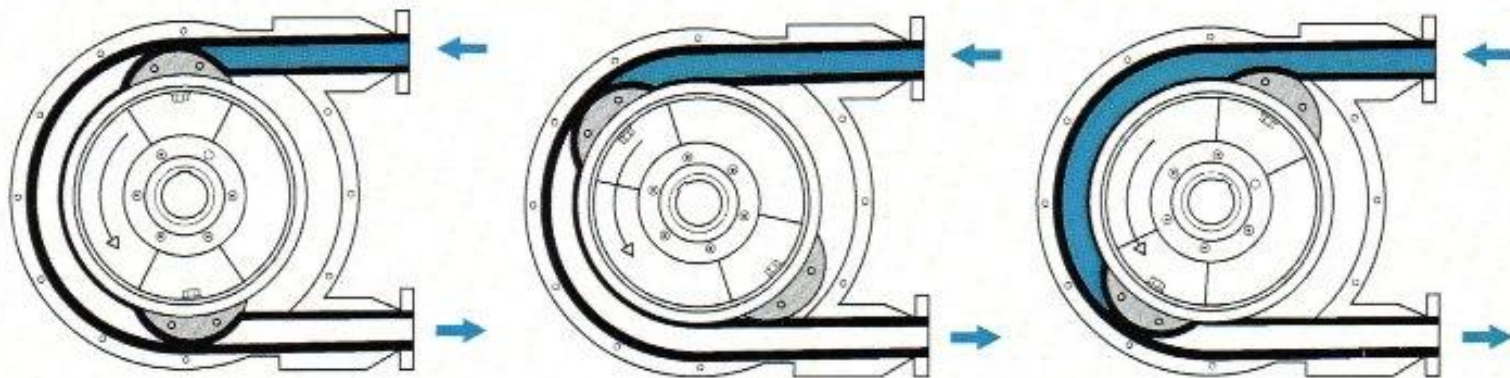
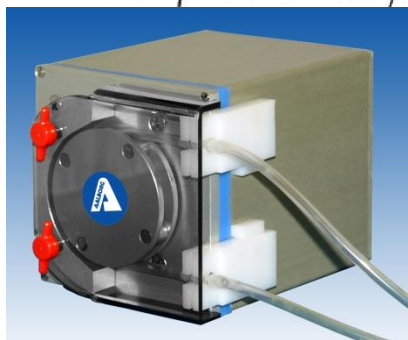
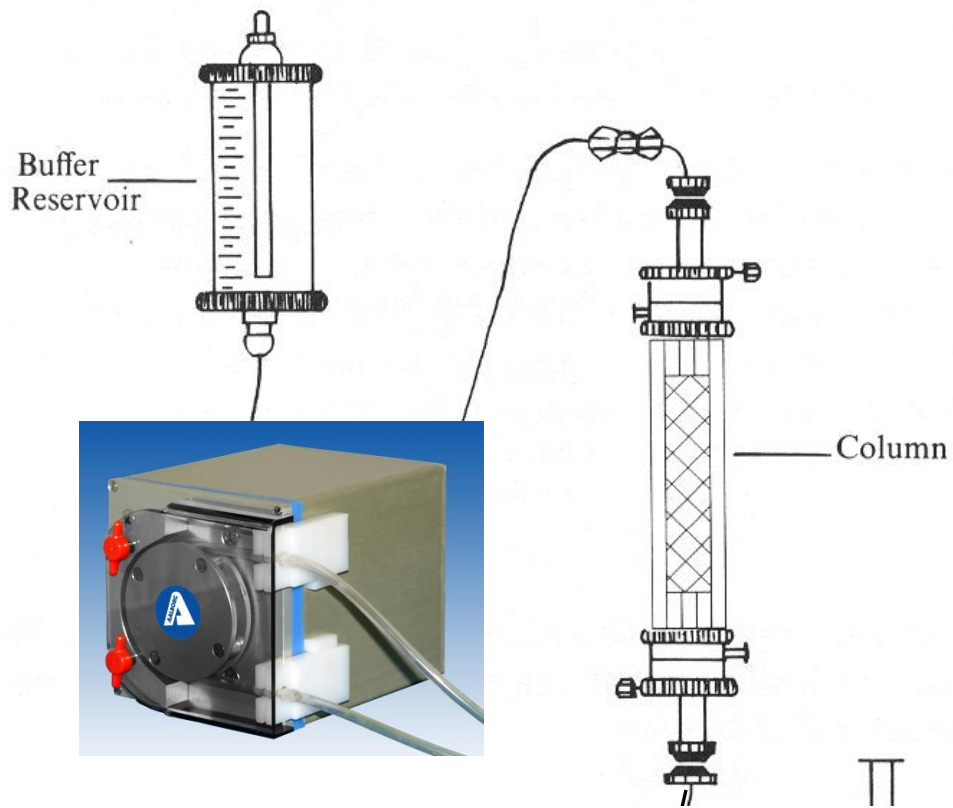


$$A_{\lambda} = \epsilon \cdot l \cdot c$$

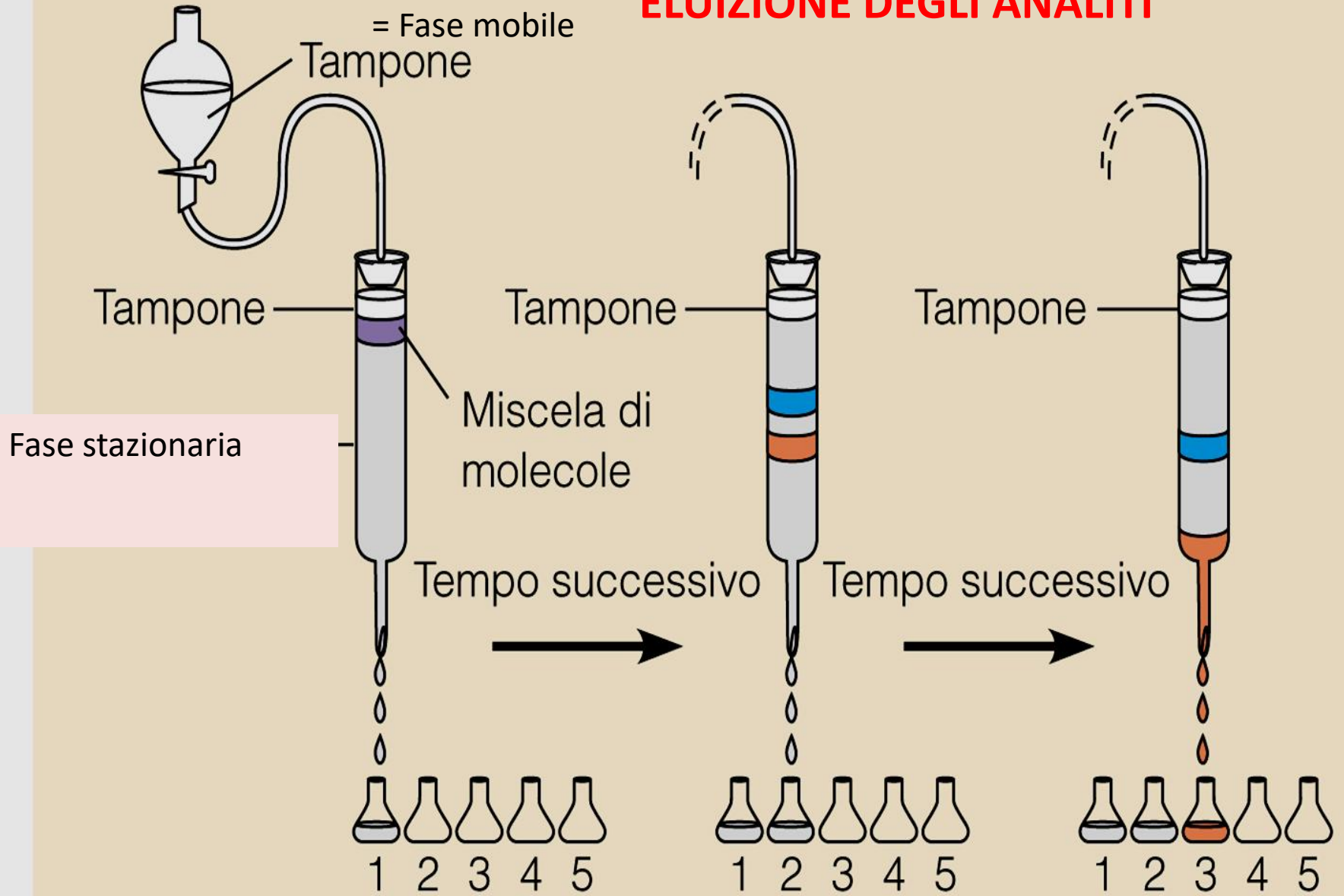
Fotometro UV
Con cella a flusso



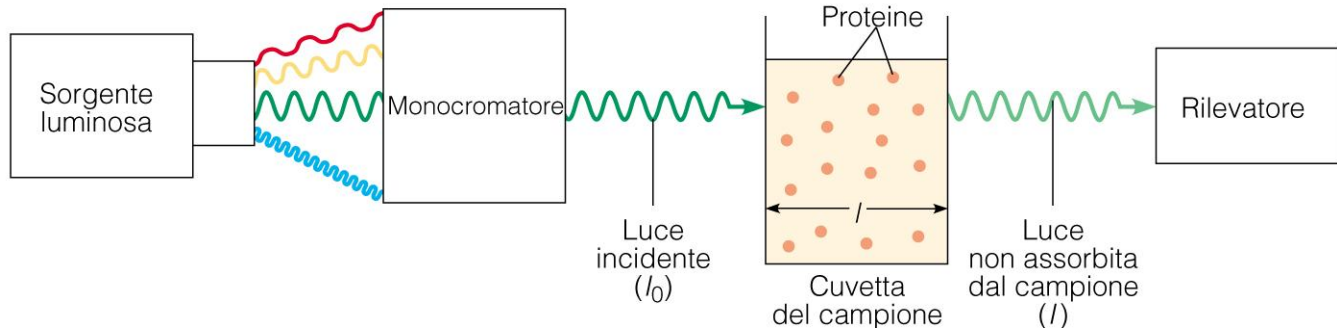
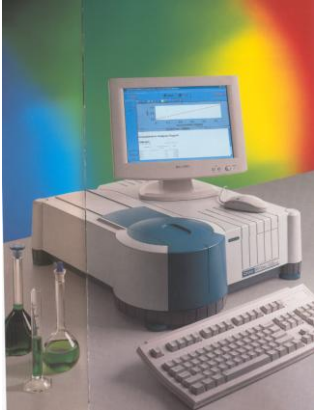
**POMPA
PERISTALTICA**



ELUIZIONE DEGLI ANALITI



...uso un fotometro UV/VIS



Cromatogramma o grafico di eluizione

che mostra la separazione completa dei componenti il campione da analizzare

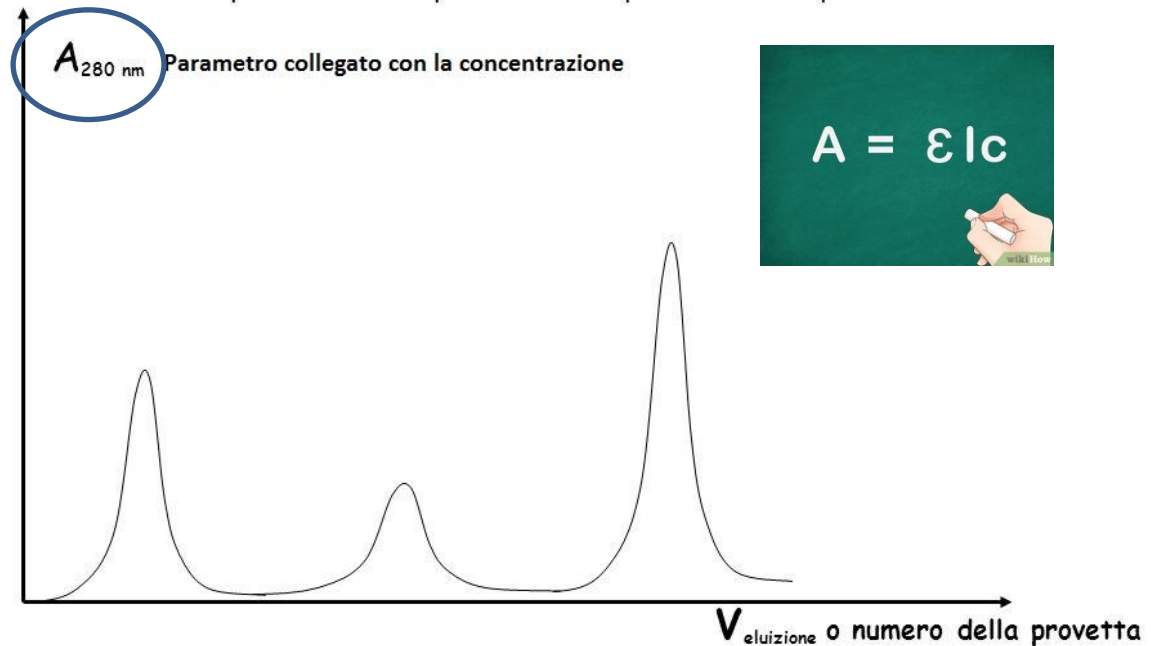
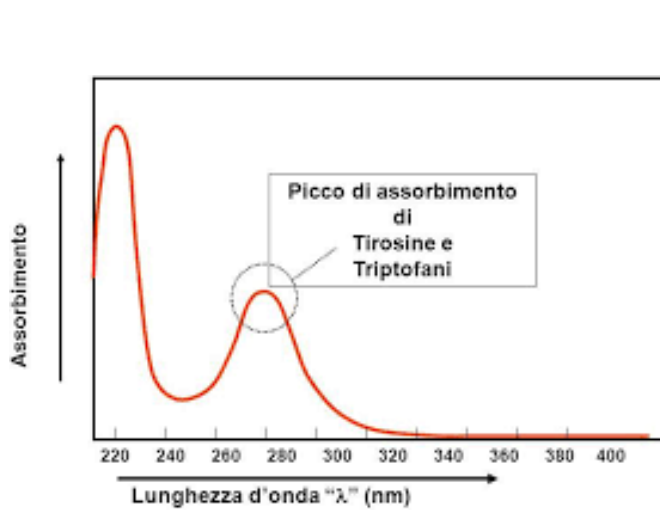
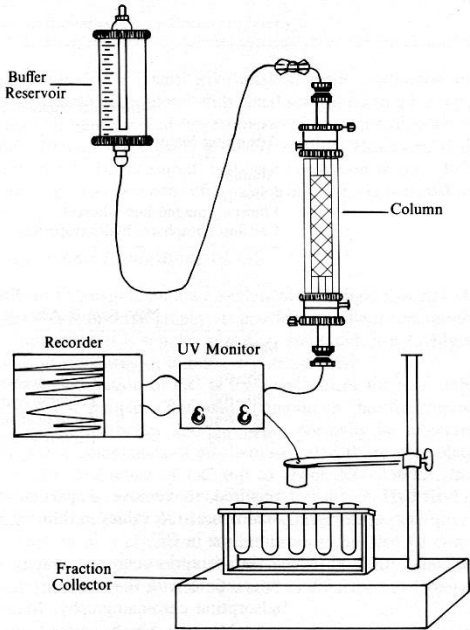


Figure 3.10

Elution curve for a mixture of several proteins.

- A = hemoglobin,
- B = egg albumin,
- C = chymotrypsinogen,
- D = myoglobin,



A_{λ}

Grafico di eluizione

Protein Concentration



Numero delle provette



La **MATRICE** e' il supporto della Fase Stazionaria

La matrice deve essere modificata con l'inserimento di specifici gruppi funzionali

MATRICI più utilizzate in CROMATOGRAFIA su colonna:

-INORGANICHE:

-**SILICE** : polimero dell'acido ortosilicico (idrofilica) -Si-OH
-Stabile tra pH 3 e 8

- POLISACCARIDICHE:

•**AGAROSIO** : D-galattosio e 3,6-anidro-L-galattosio (ESTRATTO DALL'ALGA AGAR) Stabile tra pH 3 e 14
Sepharose o Biogel

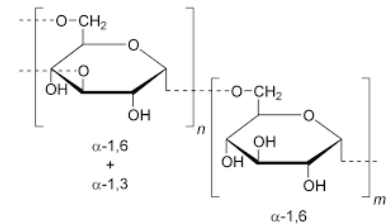
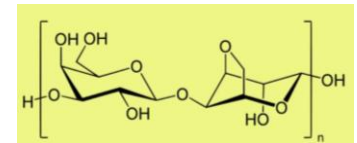
•**CELLULOSA**: omopolisaccaride di glucosio (idrofilica) legami β 1-4 glicosidici
Stabile a diversi valori di pH

•**DESTRANO**: omopolisaccaride di glucosio (idrofilica) legami α 1,6 glicosidici
Stabile fino a pH 12 Sephadex

- POLIMERI ORGANICI SINTETICI:

•**POLIACRILAMIDE**: polimero formato da acrilamide e N,N'-metilen bis-acrilamide
(Stabile tra pH 2 e 11)

•**POLISTIRENE**: polimero formato da molecole di stirene
Buona stabilità a tutti i valori di pH





CARATTERISTICHE della **MATRICE: deve possedere :**

- **Elevata Stabilità Meccanica (deve permettere flussi di fase mobile elevati)**
- **Buona stabilità chimica=Inerte e Insolubile nella F. Mobile e nel Campione**
- **Gruppi funzionali opportuni x legare gruppi Funzionali della F. S.**
- **Elevata densità di gruppi funzionali = Elevata Capacità**

FASI OPERATIVE di una SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA:

- IMPACCAMENTO della COLONNA
- CARICAMENTO del CAMPIONE
- SVILUPPO DELLA COLONNA con ELUIZIONE degli ANALITI
- RIVELAZIONE degli analiti
- RACCOLTA delle FRAZIONI
- CONTROLLO della PURIFICAZIONE

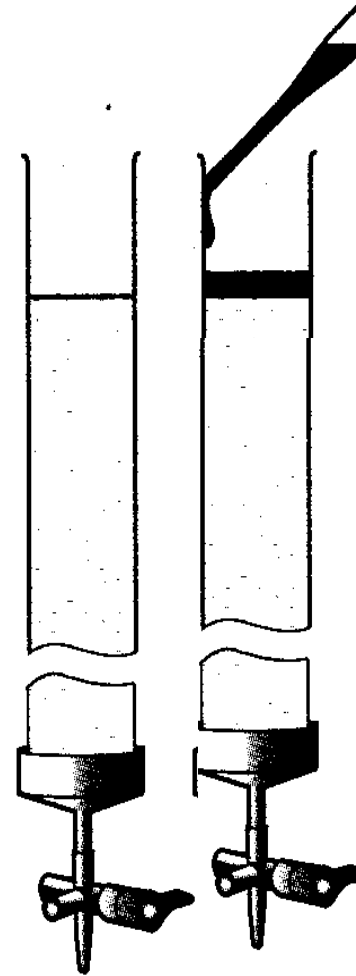
IMPACCAMENTO della COLONNA:

Equilibrare opportunamente la fase stazionaria:

- se in forma di polvere secca deve essere **sospesa** nella fase mobile (generalmente acquosa)
- se in sospensione in una miscela acqua/solventi organici (x conservazione a lungo termine) deve essere equilibrata nella fase mobile prescelta

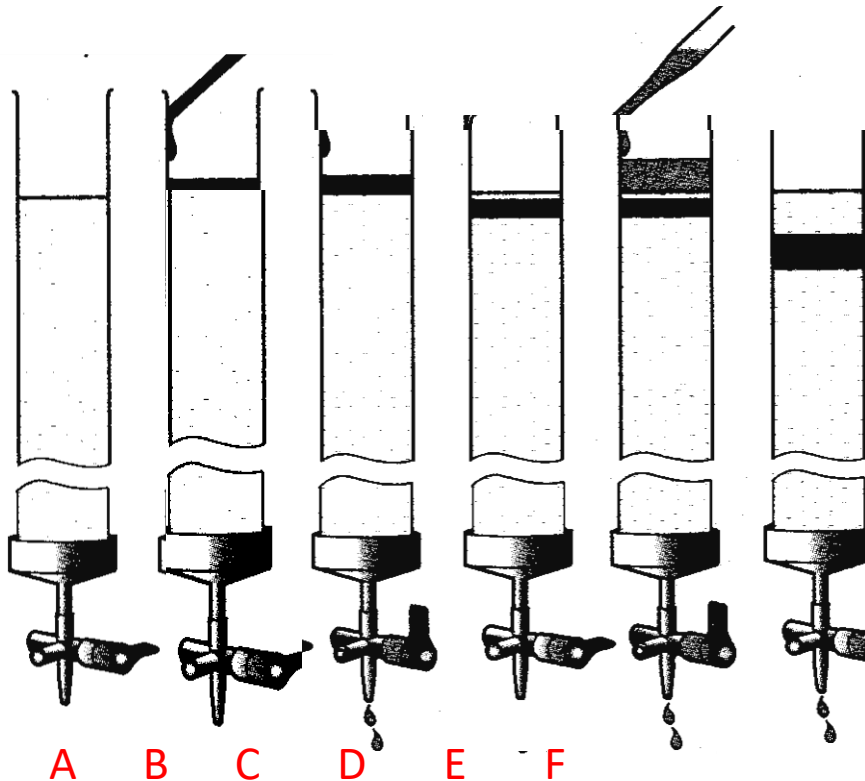
Tale sospensione deve essere versata **con continuità** e delicatamente in colonna avendo cura di tenere **chiuso il rubinetto**, evitando che bolle d'aria rimangano intrappolate tra le particelle di fase stazionaria durante l'impaccamento

Una volta che la colonna è impaccata **non deve mai essere lasciata andare a secco**, quindi sopra la resina deve sempre essere lasciato uno strato di fase mobile



CARICAMENTO DEL CAMPIONE

- A)** Rimuovere dalla sommità della colonna l'eccesso di fase mobile e chiudere il rubinetto
- B)** Applicare il campione (a rubinetto chiuso) sul top della F.S. utilizzando una pipetta e facendo attenzione a non disturbare il letto di F.S.
- C)** Aprire il rubinetto sino a far interagire tutto il campione con la F.S.
- D)** Chiudere il rubinetto
- E)** Aggiungere Fase Mobile delicatamente con una pipetta, aprire il rubinetto e fare scorrere la fase mobile sulla F.S.
- F)** I componenti della miscela si muovono lungo la colonna in funzione della loro interazione con la F.S. e con la F.M.



SVILUPPO DELLA COLONNA: ELUIZIONE

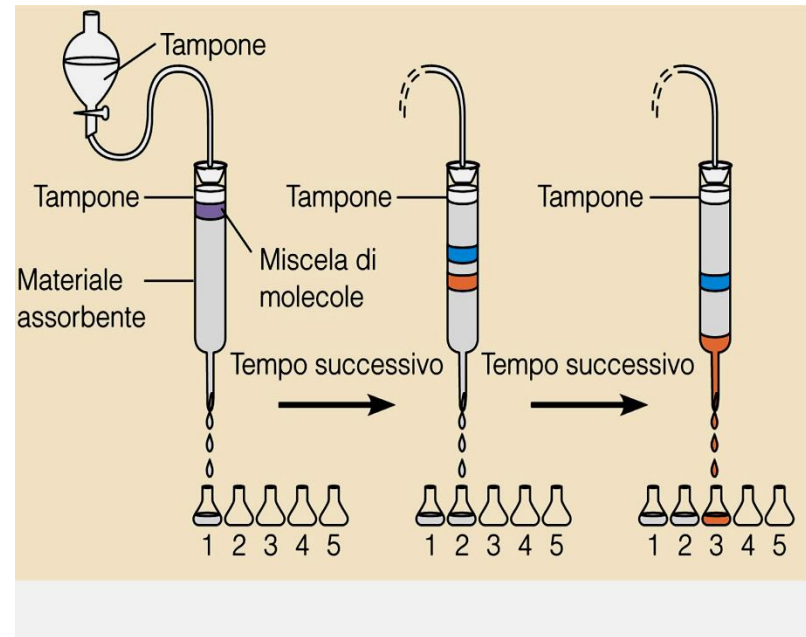
I componenti della miscela vengono separati all'interno della colonna cromatografica durante il processo di **ELUIZIONE**

Il tempo impiegato da ciascun analita per fuoriuscire dalla colonna = **tempo di eluizione**

Il volume di fase mobile richiesto per l'eluizione di ciascun analita = **volume di eluizione**

$$V_e = t_e F$$

E' importante che l'eluizione avvenga a flusso costante: pompa peristaltica



ELUIZIONE ISOCRATICA



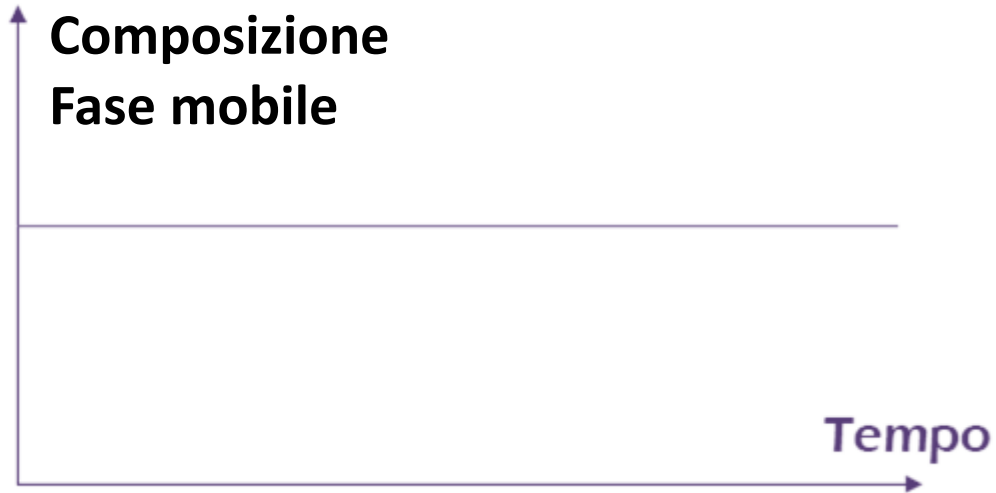
Sviluppo della colonna senza modificare la composizione della FASE MOBILE

ELUIZIONE NON ISOCRATICA



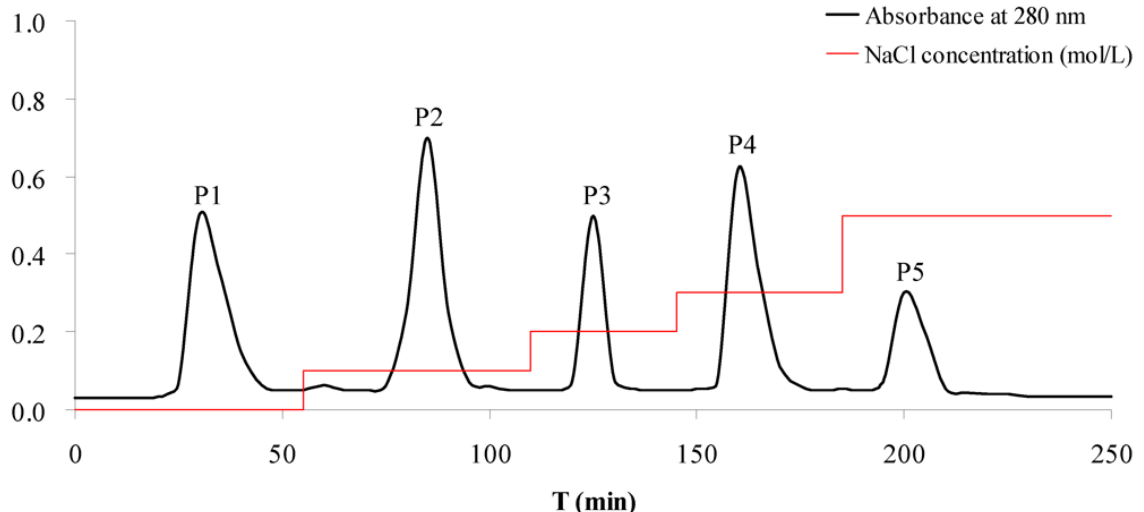
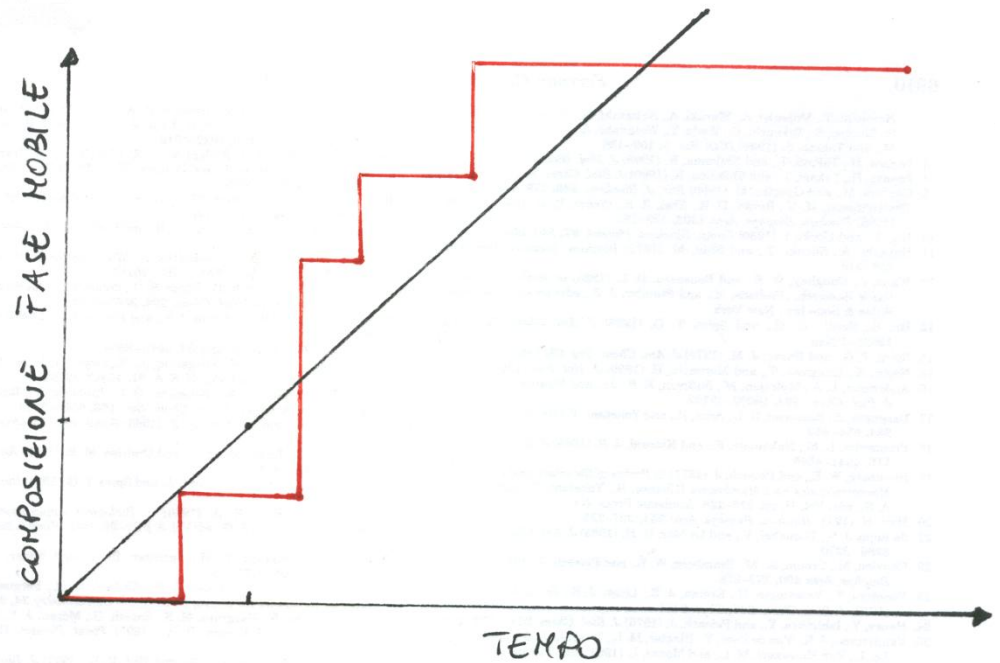
Lo sviluppo della colonna avviene modificando una o più caratteristiche della FASE MOBILE (pH, Forza ionica)

**Se durante l'eluizione non viene modificata la composizione della fase mobile =
ELUZIONE ISOCRATICA**



Se durante l'eluizione la fase mobile viene variata per uno o più parametri (pH, f. ionica):
ELUZIONE NON ISOCRATICA

ELUZIONE A STEP
variazioni discontinue impartite
manualmente dall'operatore

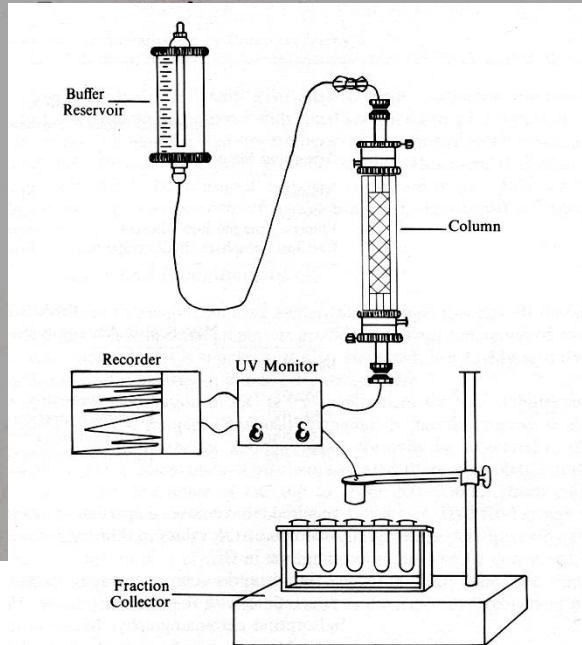


ELUZIONE IN GRADIENTE

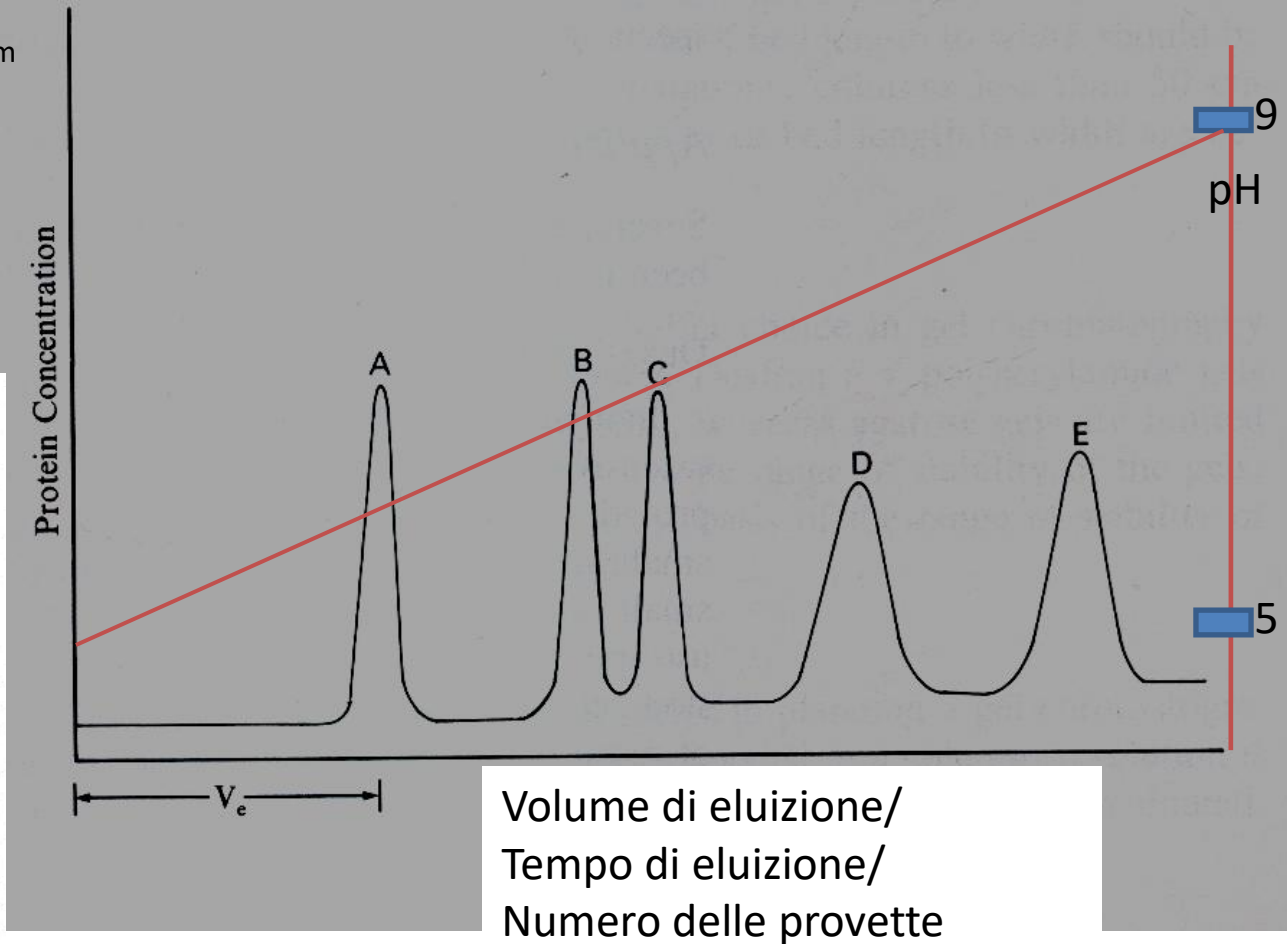
Figure 3.10

Elution curve for a mixture of several proteins.

- A = hemoglobin,
- B = egg albumin,
- C = chymotrypsinogen,
- D = myoglobin,



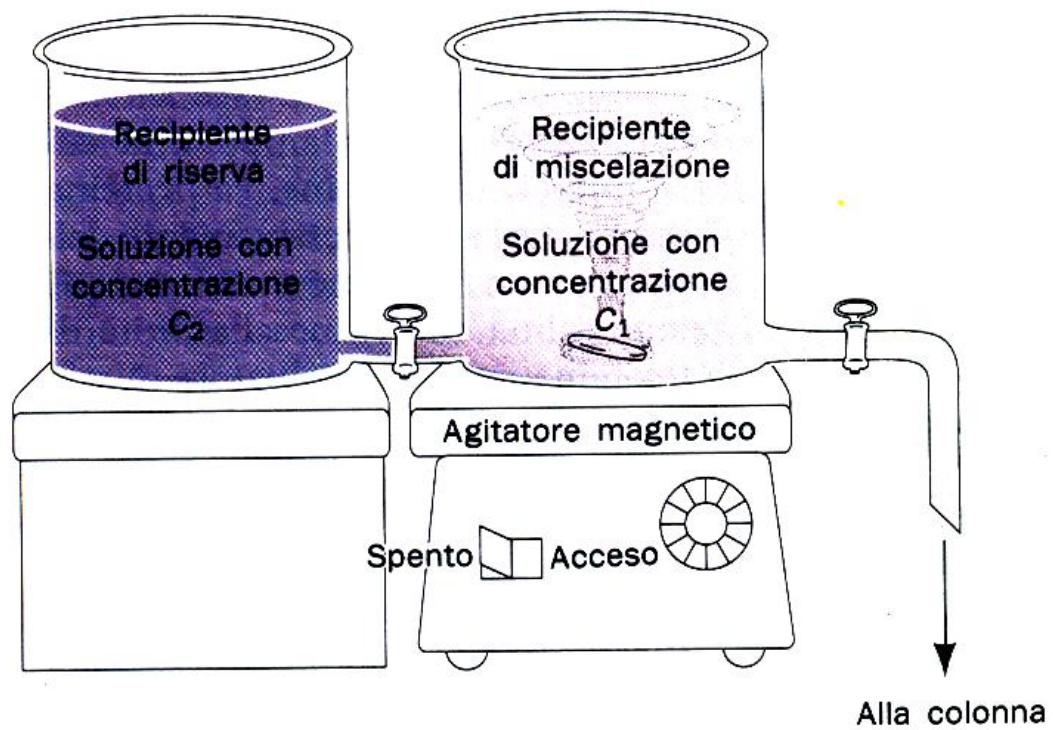
A_{280nm}

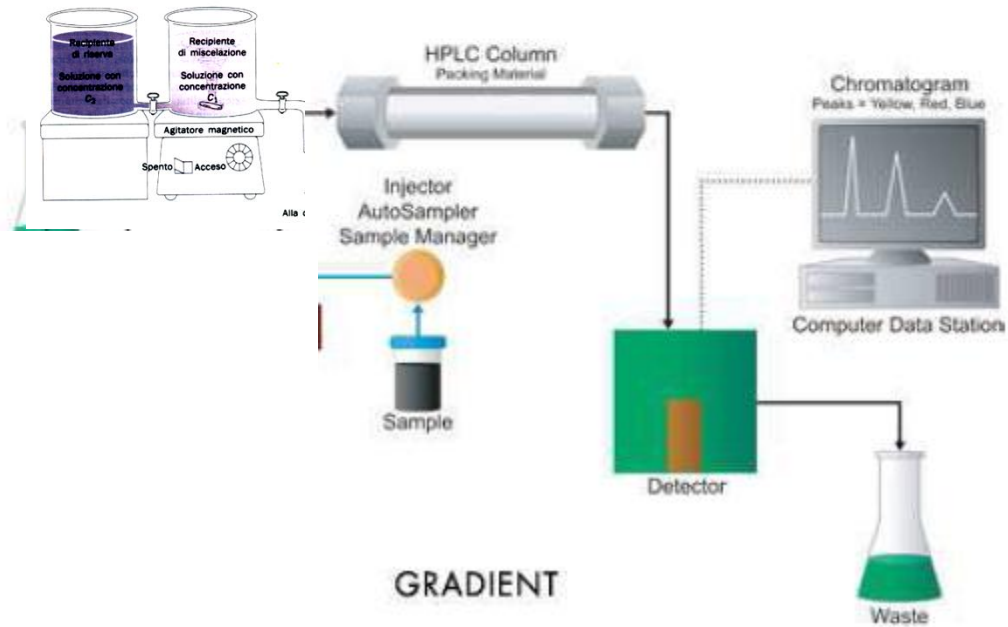
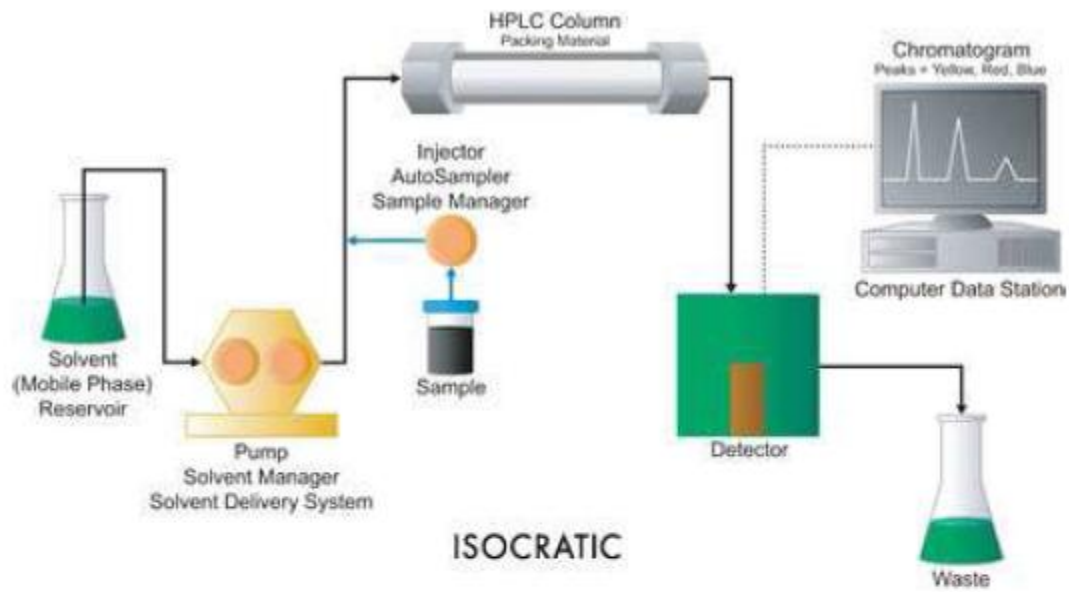


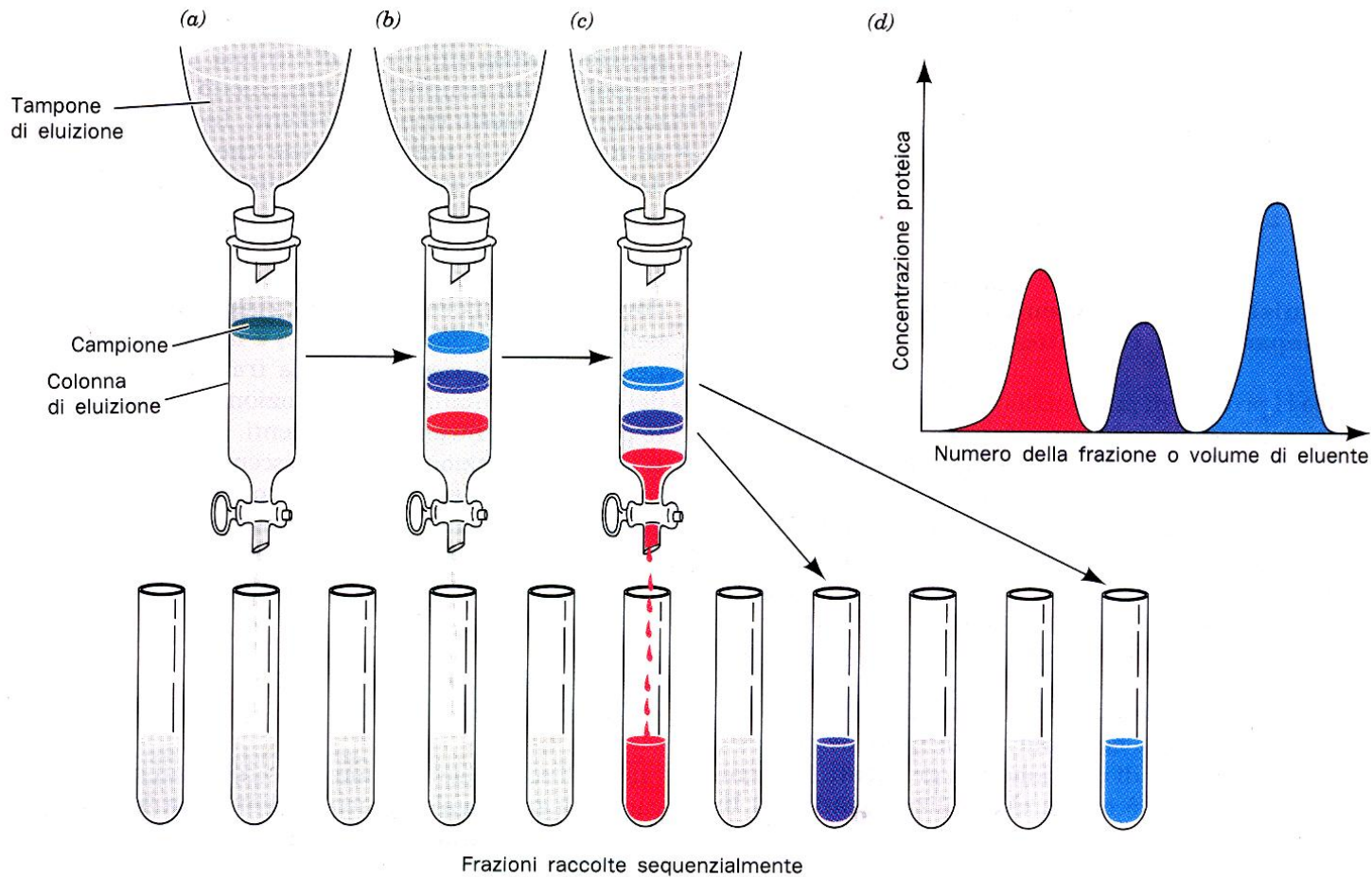
Volume di eluizione/
Tempo di eluizione/
Numero delle provette

ELUZIONE in GRADIENTE
variazioni continue mediante
FORMATORE di GRADIENTE o
DUE POMPE

FORMATORE DI GRADIENTE







FASI OPERATIVE di una SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA:

IMPACCAMENTO della COLONNA

CARICAMENTO del CAMPIONE

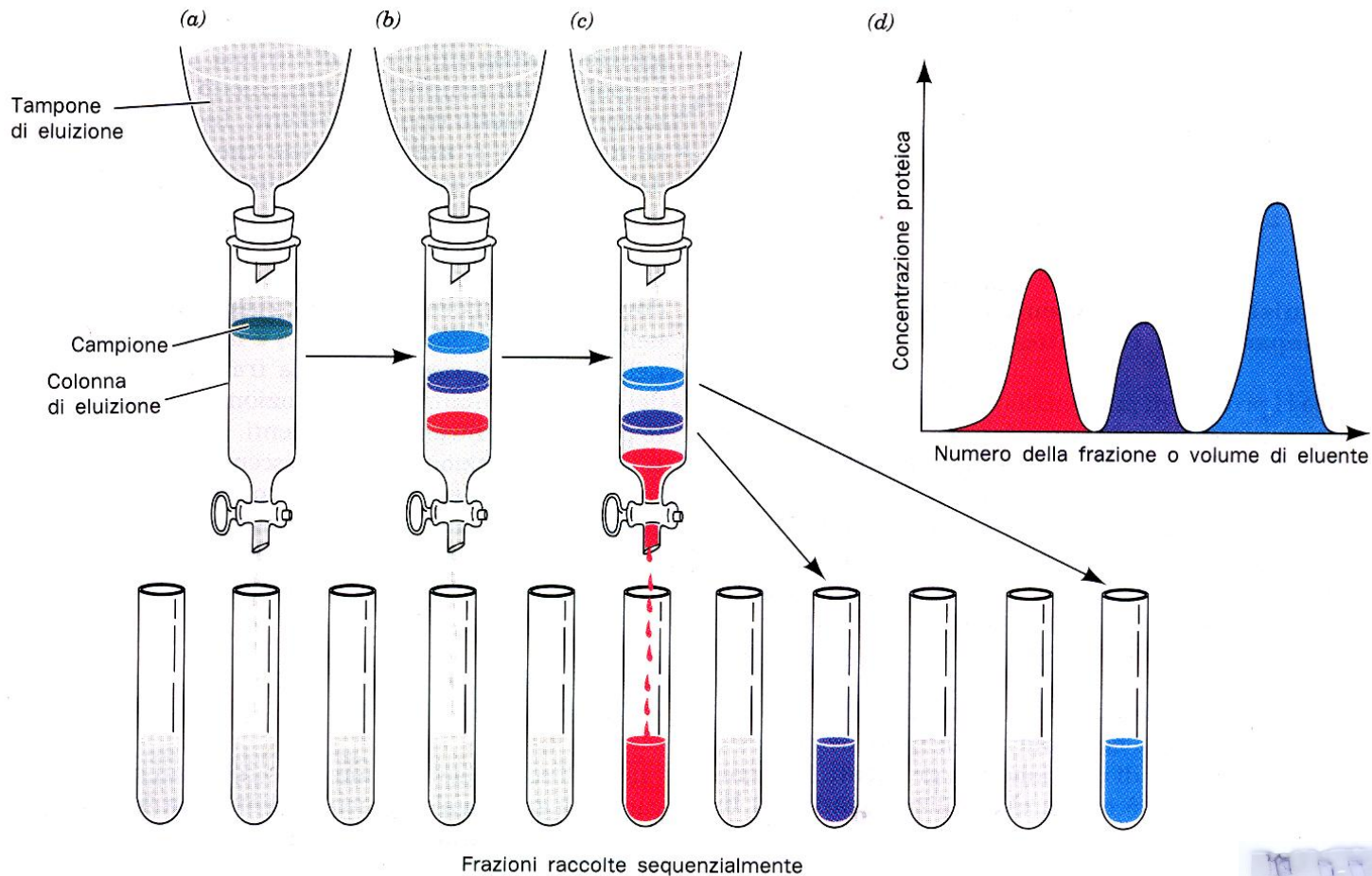
ELUIZIONE

RIVELAZIONE degli analiti

RACCOLTA delle FRAZIONI

CONTROLLO della PURIFICAZIONE





FASI OPERATIVE di una SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA:

IMPACCAMENTO della COLONNA

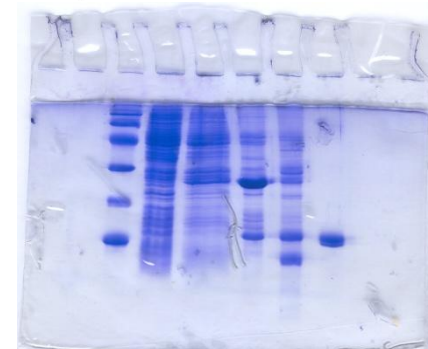
CARICAMENTO del CAMPIONE

ELUIZIONE

RIVELAZIONE degli analiti

RACCOLTA delle FRAZIONI

CONTROLLO della PURIFICAZIONE mediante tecnica analitica (p.es. elettroforesi)





POMPA PERISTALTICA



Fast protein liquid chromatography (FPLC)



Raccoltore di frazioni

