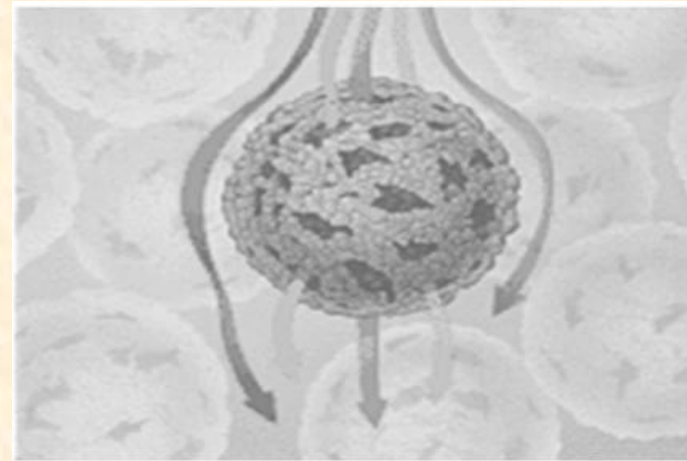
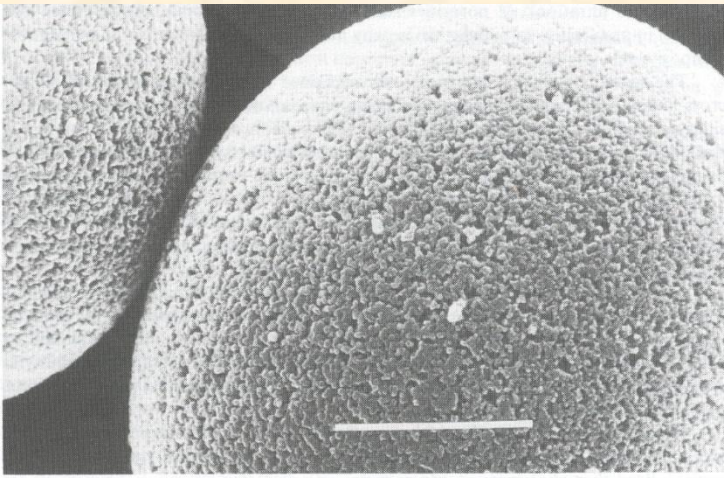


**Cromatografia per GEL FILTRAZIONE o
Cromatografia ad ESCLUSIONE MOLECOLARE
SEC**

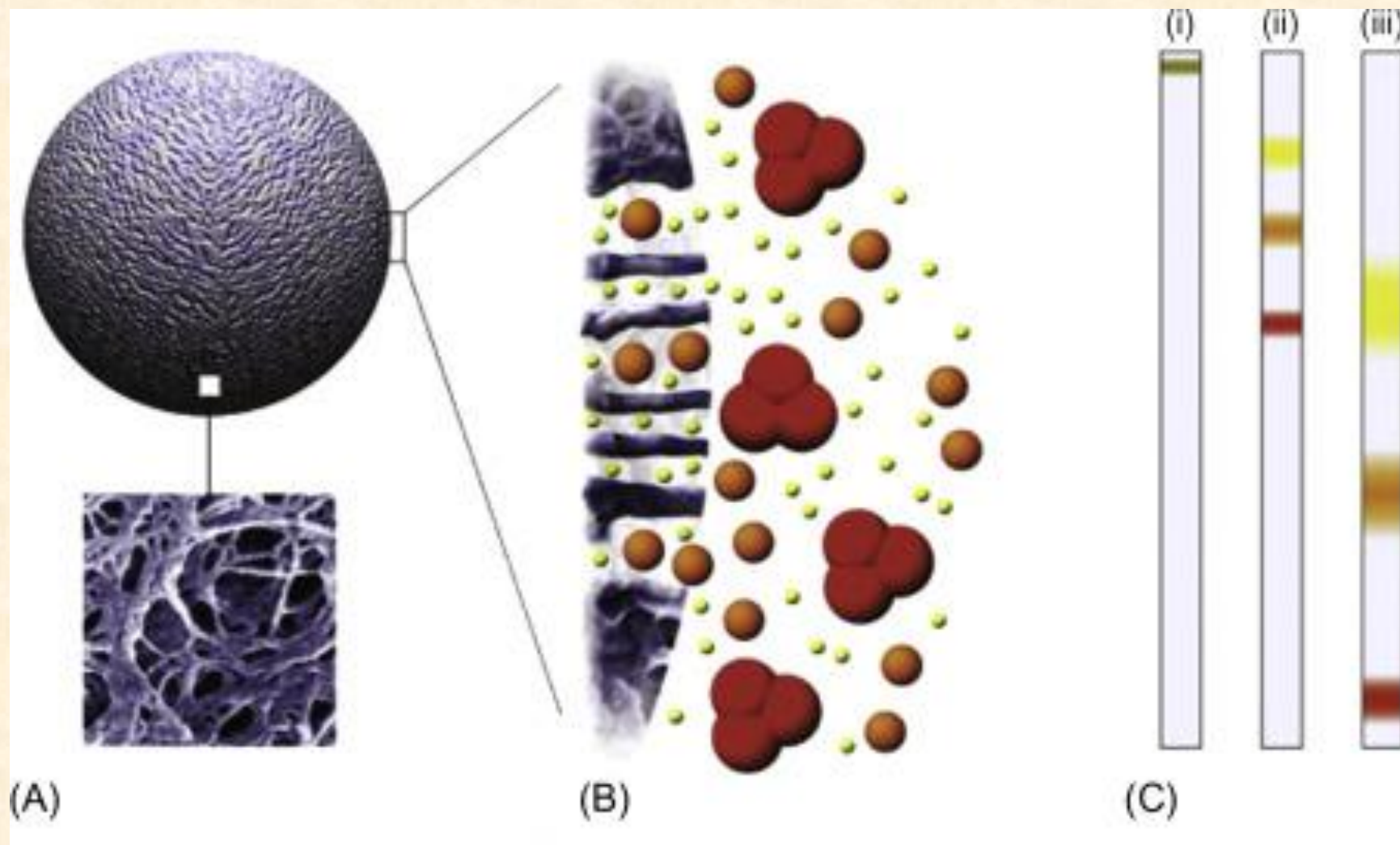
Cromatografia per GEL FILTRAZIONE o Cromatografia ad ESCLUSIONE MOLECOLARE

SEPARA le MOLECOLE in base alle **DIMENSIONI**
(forma e peso molecolare)

FASE STAZIONARIA costituita da matrici di **destrano, agarosio o poliacrilamide** modificate industrialmente per acquisire la forma di **SFERETTE** idratate, con **PORI** di dimensioni controllate che regolano l'ingresso delle molecole: **SETACCI MOLECOLARI**



La dimensione dei pori nelle sferette definisce il RANGE di FRAZIONAMENTO



Range di frazionamento

Polimero	Nome commerciale	Intervallo di frazionamento^a ($M_r \times 10^3$)		
Destrano	Sephadex	G10	< 0.7	
		G25	1.0-5	
		G50	1.5-30	
		G100	4.0-150	
		G200	5.0-600	
	Sephacryl	S200	5.0-250	
		S300	10.0-1500	
		S400	20.0-8000	
	Agarosio	Sepharose	6B	10.0-4000
			4B	60.0-20000
2B			70.0-40000	
Bio-Gel		A5m	10.0-5000	
		A15m	40.0-15000	
		A50m	100.0-50000	
		A150m	1000.0-150 000	
Poliacrilammide	Bio-Gel	P2	0.1-1.8	
		P6	1.0-6.0	
		P30	2.5-40.0	
		P100	5.0-100.0	
		P300	60.0-400.0	

(kDa)

<u>Nome commerciale</u>		<u>Materiale</u>	<u>Campo di frazionamento (kD)</u>
Sephadex G-10	Separazione di peptidi	Destrano	0.05 - 0.7
Sephadex G-25		Destrano	1 - 5
Sephadex G-50		Destrano	1 - 30
Sephadex G-100	Separazione di proteine	Destrano	4 - 150
Sephadex G-200		Destrano	5 - 600
Bio-Gel P-2		Poliacrilammide	0.1 - 1.8
Bio-Gel P-6		Poliacrilammide	1 - 6
Bio-Gel P-10		Poliacrilammide	1.5 - 20
Bio-Gel P-30		Poliacrilammide	2.4 - 40
Bio-Gel P-100		Poliacrilammide	5 - 100
Bio-Gel P-300		Poliacrilammide	60 - 400
Sepharose 6B		Agarosio	10 - 4000
Sepharose 4B		Agarosio	60 - 20000
Sepharose 2B		Agarosio	70 - 40000

Vengono vendute in **polvere secche** e devono essere idratate con un opportuno buffer

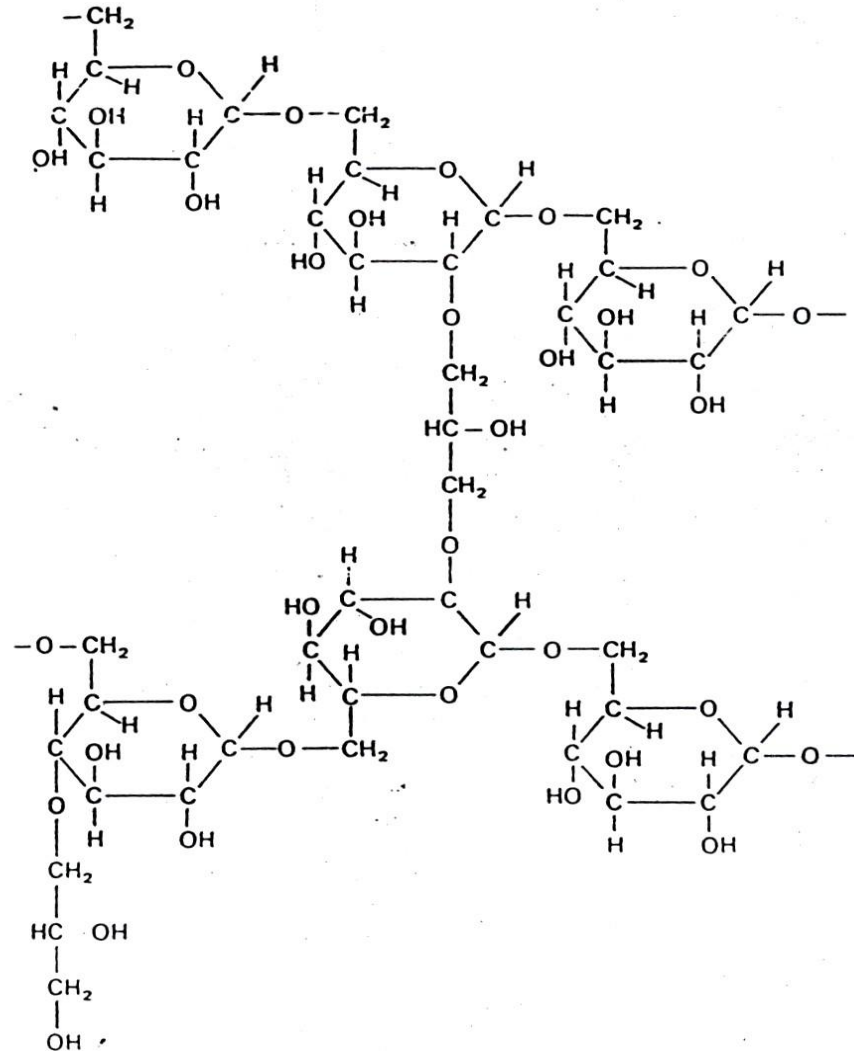
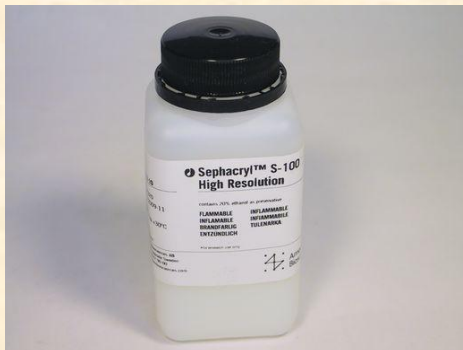
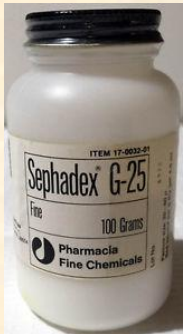
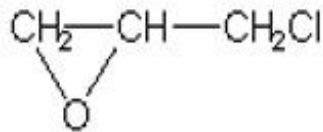
Oppure sotto forma di **gel idratati** (anche in questo caso devono essere equilibrate con un buffer per diverse ore)

Sephadex
Sephacryl

destrano

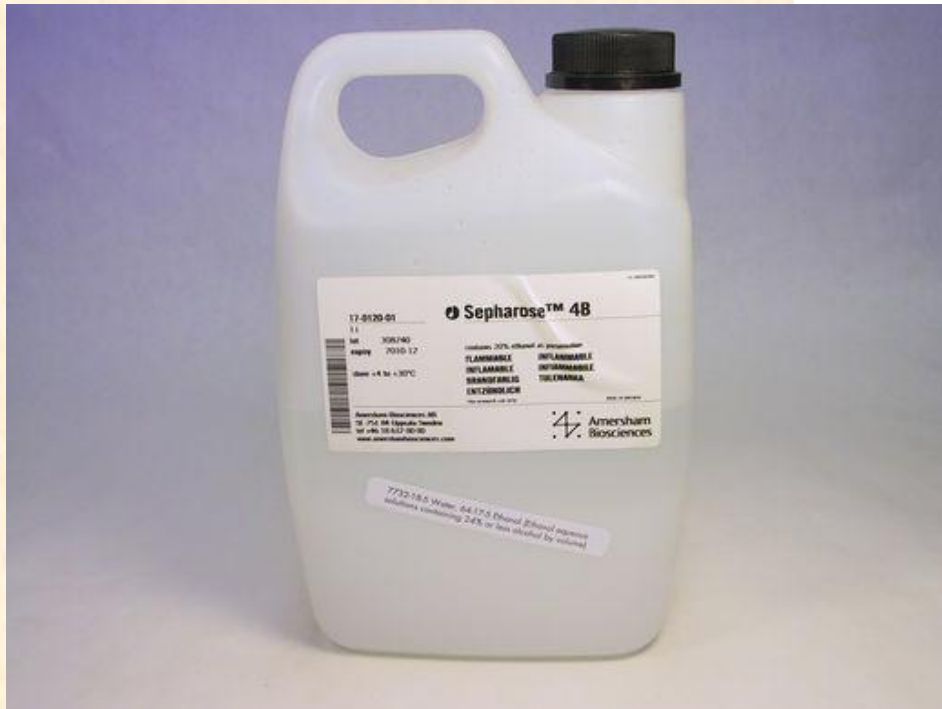
E' un carboidrato polimerico ramificato. La ramificazione determina le dimensioni dei pori della matrice. Può essere ulteriormente ramificato impiegando epiclorina

Epicloridrina:

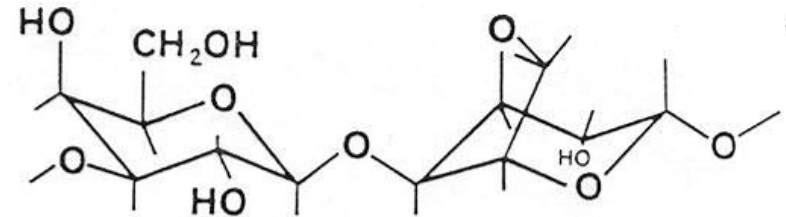


Sepharose

E' un polisaccaride costituito da residui alternati di D-galattosio e 3,6-galattosio anidro

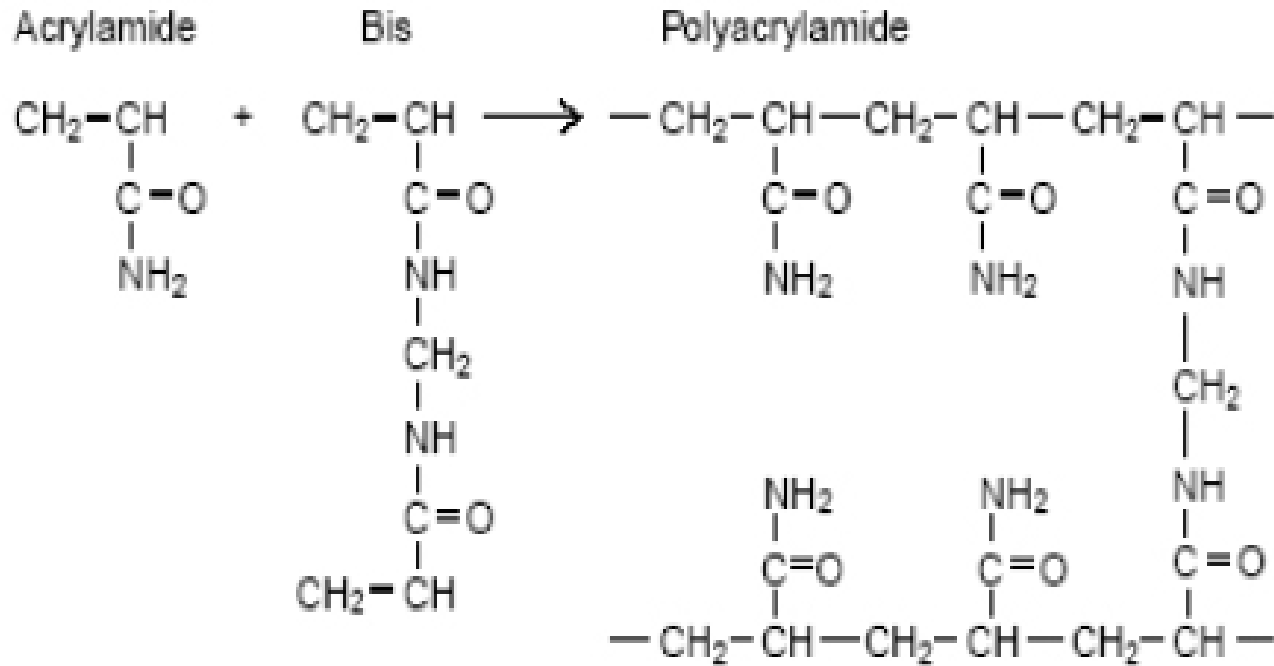


agarosio

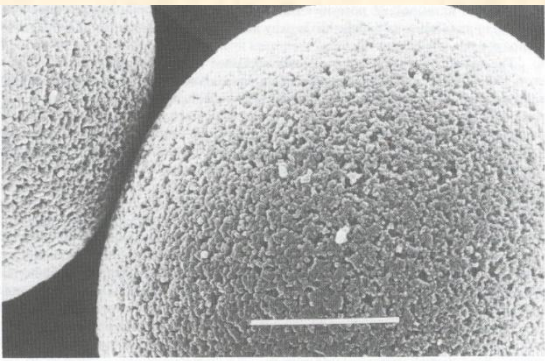


Bio-Gel

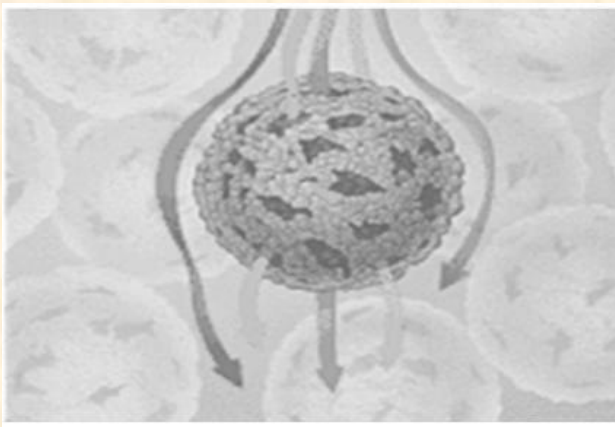
poliacrilammide



Altri parametri della GEL CROMATOGRAFIA



Cosa significa **mesh**?
 es. in una zanzariera si possono contare "i buchi" per centimetro Il numero di buchi per centimetro è il numero di mesh della zanzariera



IN BASE NUMERO DI PORI SULLA SUPERFICIE DELLE SFERUNCOLE

IN BASE AL DIAMETRO DELLE SFERUNCOLE

DIVERSE VELOCITA' DI FLUSSO E DIFFERENTE RISOLUZIONE
 Diverso uso!

Basso MESH	Coarse mesh size: 100-300 μm Medium mesh size : 50-150 μm Fine mesh size: 20-80 μm
Alto MESH	Superfine mesh size: 10-40 μm



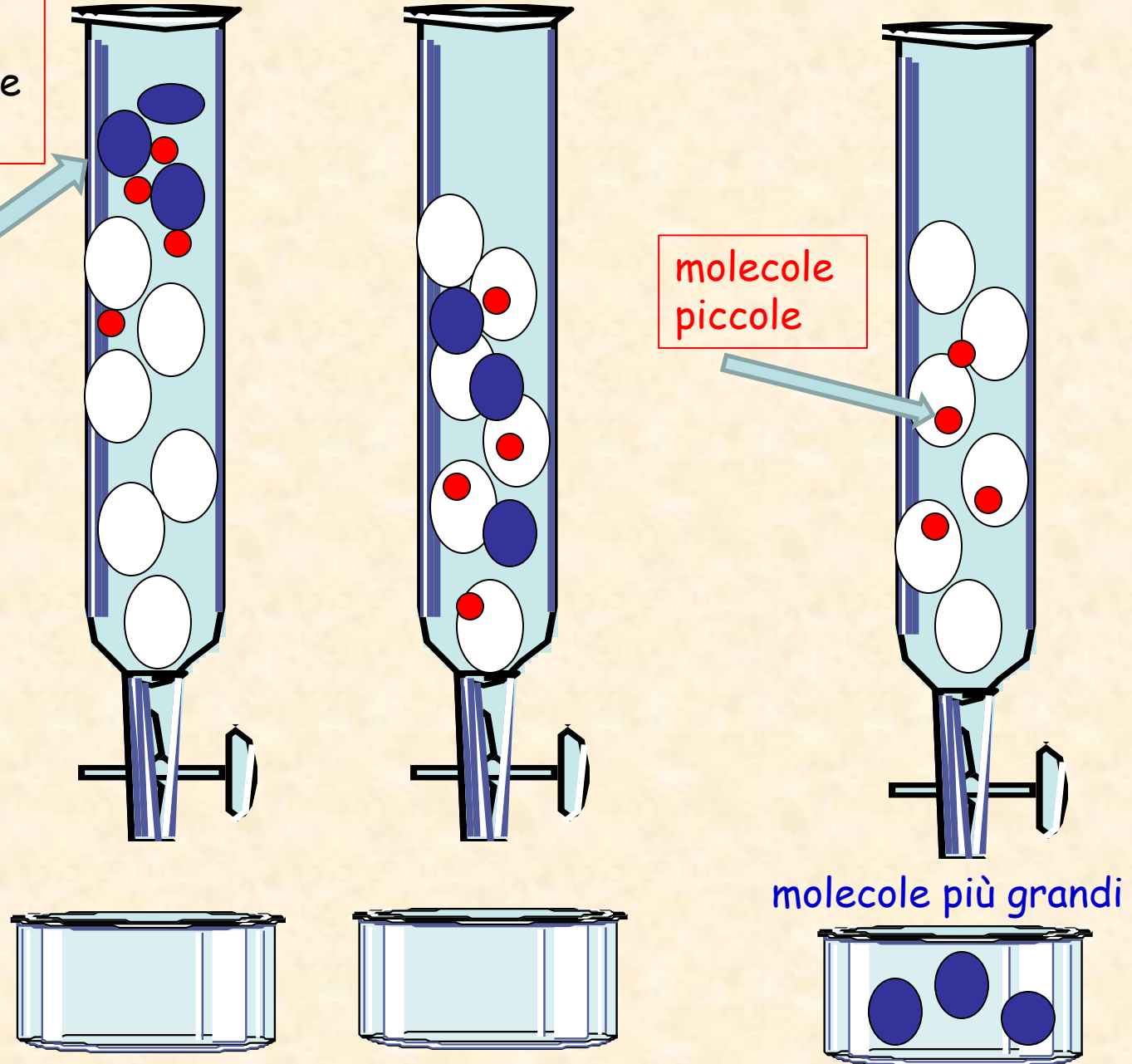
Alti flussi, bassa risoluzione
 Bassi flussi, alta risoluzione

Coefficiente di rigonfiamento: quantità di acqua necessaria per il rigonfiamento di 1 grammo di peso secco del gel

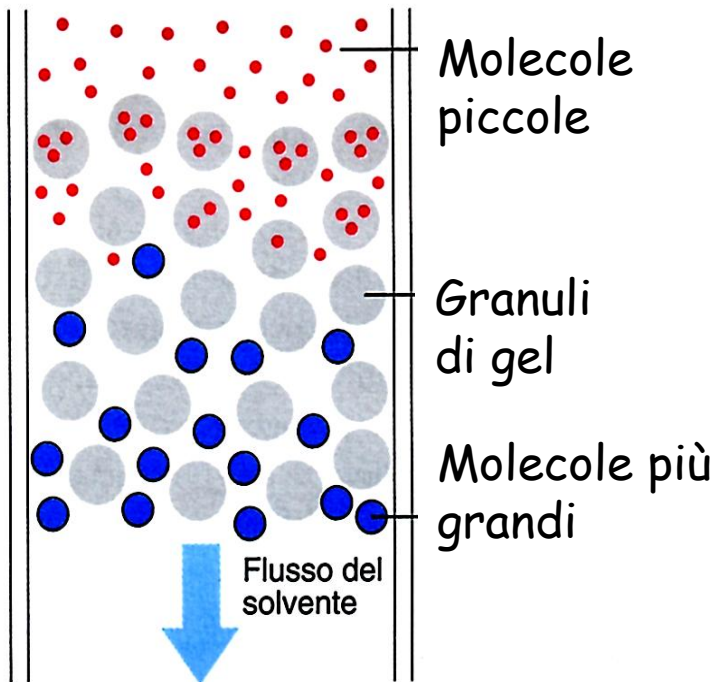
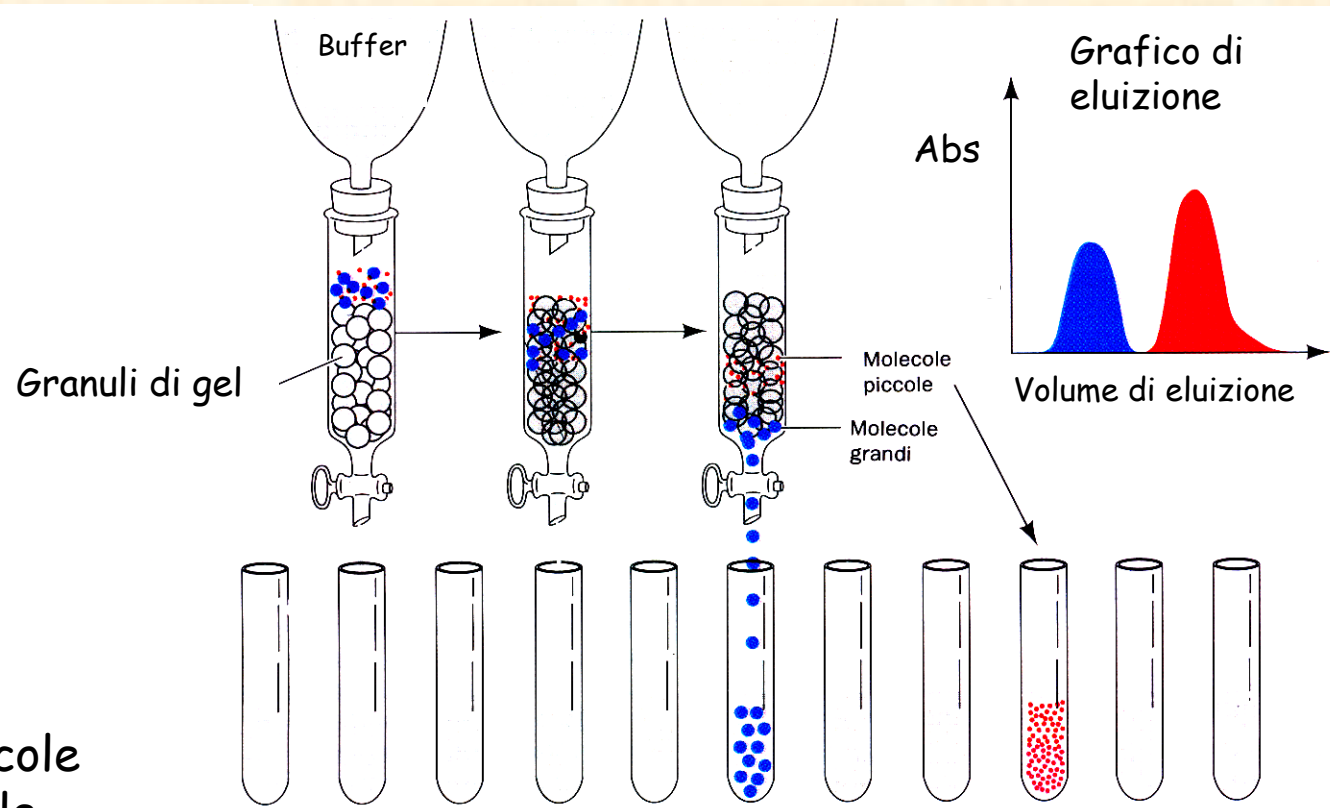
La separazione delle proteine dipende dalla loro ripartizione all'interno dei pori

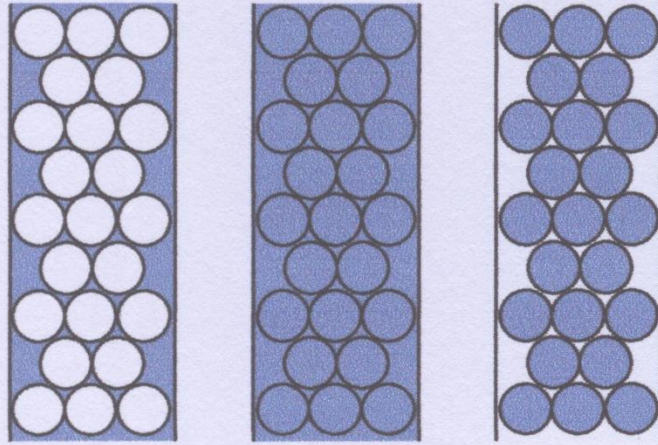
Le molecole più grandi eluiranno più velocemente

Le molecole piccole penetrano dentro i granuli di gel e sono ritardate



La separazione delle proteine dipende dalla loro ripartizione all'interno dei pori





V_o
(colore blu)

V_t
(colore blu)

V_i
(colore blu)

V_o (volume vuoto) = spazio tra i granuli (1/3 V_{tot}), si misura valutando il volume di eluizione di una molecola completamente esclusa ad es. Blue destrano (2.000.000 Da)

V_i = spazio all'interno dei granuli

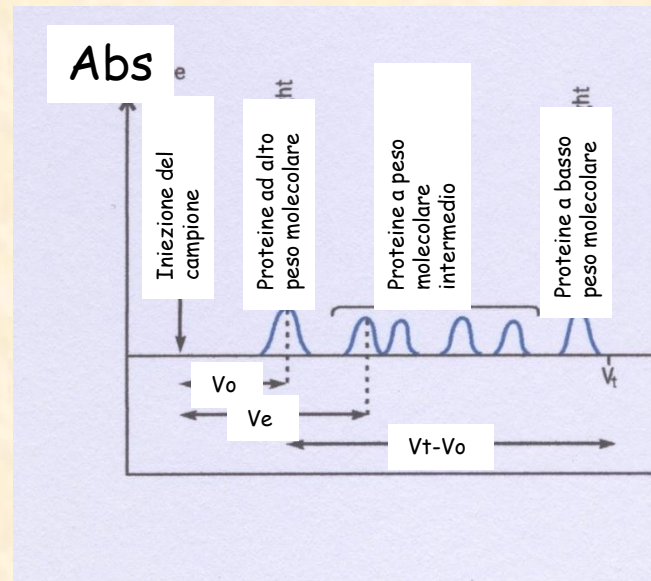
V_t (volume totale) = $V_o + V_i$

V_e (volume di eluizione) = volume di fase mobile necessario per eluire un dato analita

-le proteine con un $MW > RF$ eluiscono nel $V_e = V_o$

-le proteine con un MW compreso nel RF vengono eluite con un V_e

-le proteine con un $MW < RF$ eluiscono con il $V_e = V_t$



nella SEC la distribuzione tra fase fissa e fase mobile (K_d) dipende dalle dimensioni delle molecole e dalle dimensioni dei pori del gel e rappresenta la porzione di VOLUME accessibile ad una molecola di una determinata dimensione: LA FASE FISSA NON è ACCESSIBILE A TUTTE LE MOLECOLE IN SOLUZIONE

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_i}$$

-per una molecola completamente esclusa $V_e = V_0$: $K_d = 0$
 - per una molecola completamente inclusa nei pori $V_e = V_0 + V_i$: $K_d = 1$ (uguale distribuzione tra fase fissa e fase mobile)
 -per le molecole con dimensioni comprese nel FR $0 < K_d < 1$

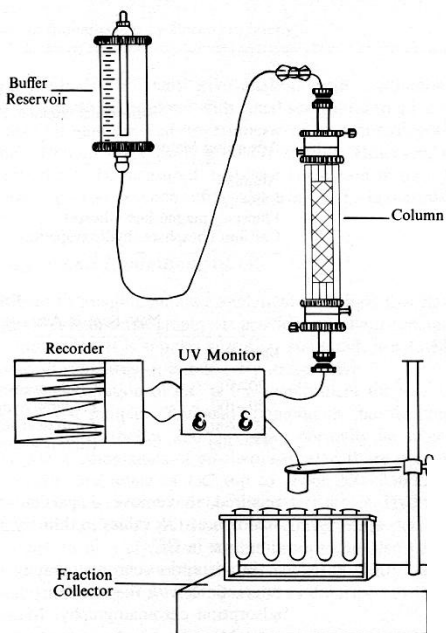
Siccome V_i è difficilmente determinabile nella SEC al posto di K_d si parla di K_{AV}

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_0}{V_{tot} - V_e}$$

$V_{tot} = V_0 + V_i + V_g$
 V_g è il volume occupato dalla matrice allo stato solido.

Grafico di eluizione

- A = hemoglobin, 64 kDa
- B = egg albumin, 45 kDa
- C = chymotrypsinogen, 25 kDa
- D = myoglobin, 16.9 kDa
- E = cytochrome c. 13.5 kDa

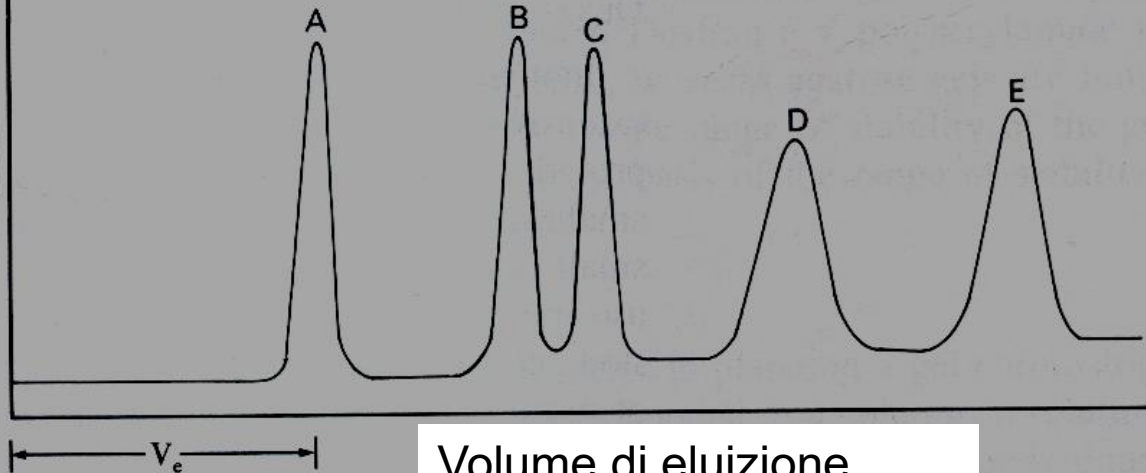


$A_{280\text{nm}}$

Abs 280 nm

Purificazione di macromolecole

64 KDa 45 25 16.9 13.5



Polimero	Nome commerciale	Intervallo di frazionamento ^a ($M_r \times 10^3$)
Destrano	G10	< 0.7
	G25	1.0-5
	Sephadex G50	1.5-30
	G100	4.0-150
	G200	5.0-600

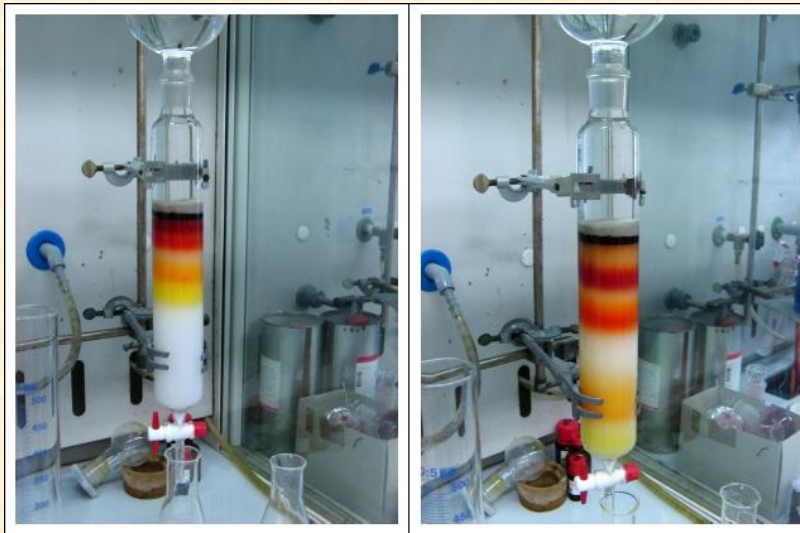
LA CAPACITA' di separare gli analiti in Gel-cromatografia dipende da:

- Volume di campione caricato rispetto a V_t
- Intervallo di dimensioni dei pori delle particelle di FS
più ristretto è l'intervallo, maggiore è la risoluzione
- lunghezza della colonna

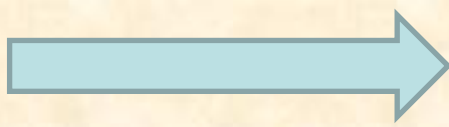
<2% V_{tot}

• **DIMENSIONI DELLE COLONNE**

Vengono generalmente utilizzate **colonne più lunghe** rispetto ad altre cromatografie al fine di aumentare il percorso compiuto dalle molecole del campione attraverso la F.S. e quindi differenziare maggiormente i volumi di eluzione delle diverse proteine



ELUIZIONE



Eluizione isocratica

Non prevede variazioni di Fase Mobile

COMPOSIZIONE della F.M. = ?

Per questo tipo di cromatografia **non è indispensabile** l'utilizzo di soluzioni tampone, teoricamente si può utilizzare anche **acqua distillata**, ma è sempre preferibile utilizzare una **soluzione tampone x controllare il pH**.

Si lavora generalmente in **condizioni non denaturanti**, per cui viene rispettata la conformazione nativa delle proteine, ma si può decidere di lavorare anche in **condizioni denaturanti**

Per una buona risoluzione della colonna servono flussi bassi

APPLICAZIONI della **GEL CROMATOGRAFIA**:

→ •PURIFICAZIONE di MACROMOLECOLE

→ •DETERMINAZIONE del Peso Molecolare

→ •DESALIFICAZIONE = eliminare sali dalla soluzione tampone in cui è solubilizzata la soluzione proteica (diminuire la forza ionica)

→ ▪ EQUILIBRARE il campione con un buffer ad un determinato pH



Determinazione del PM

1) Carichiamo sulla colonna per gel-filtrazione impaccata con la fase stazionaria prescelta una miscela di proteine a PM noto

(Attenzione al Range di frazionamento!!!)

2) Determiniamo V_e di ciascuna proteina

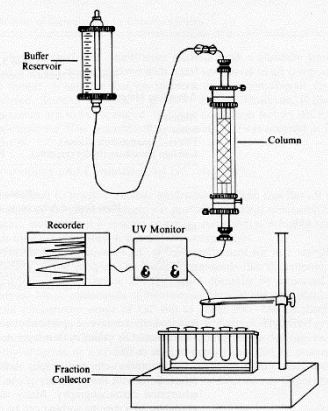
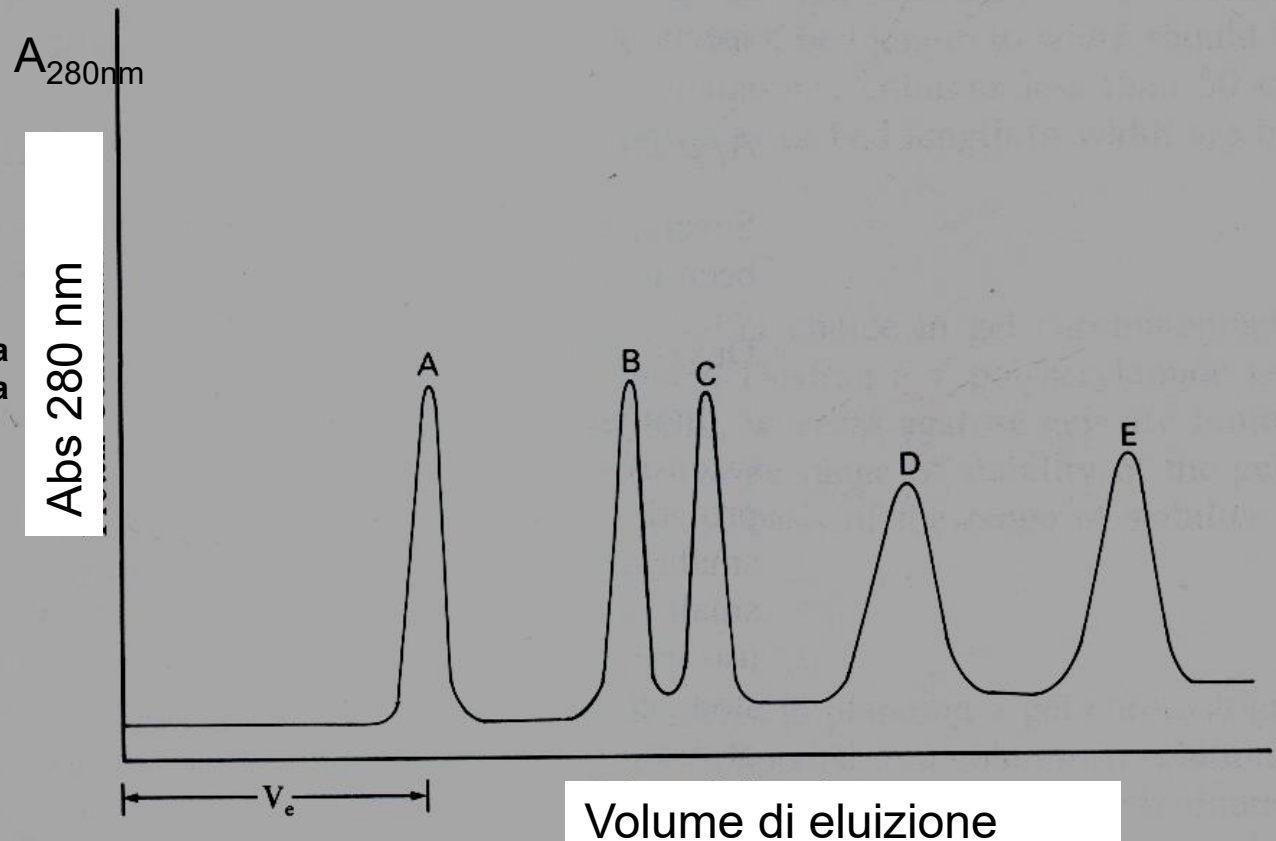


Grafico di eluizione

A = hemoglobin,	64 kDa
B = egg albumin,	45 kDa
C = chymotrypsinogen,	25 kDa
D = myoglobin,	16.9 kDa
E = cytochrome c.	13.5 kDa



Determinazione peso molecolare: Costruzione curva di taratura

- Devo caricare in colonna un campione costituito da una miscela di Proteine a PM noto
- Misurare il volume di eluizione per ogni proteina
- Costruire una grafico V_e in funzione del log PM

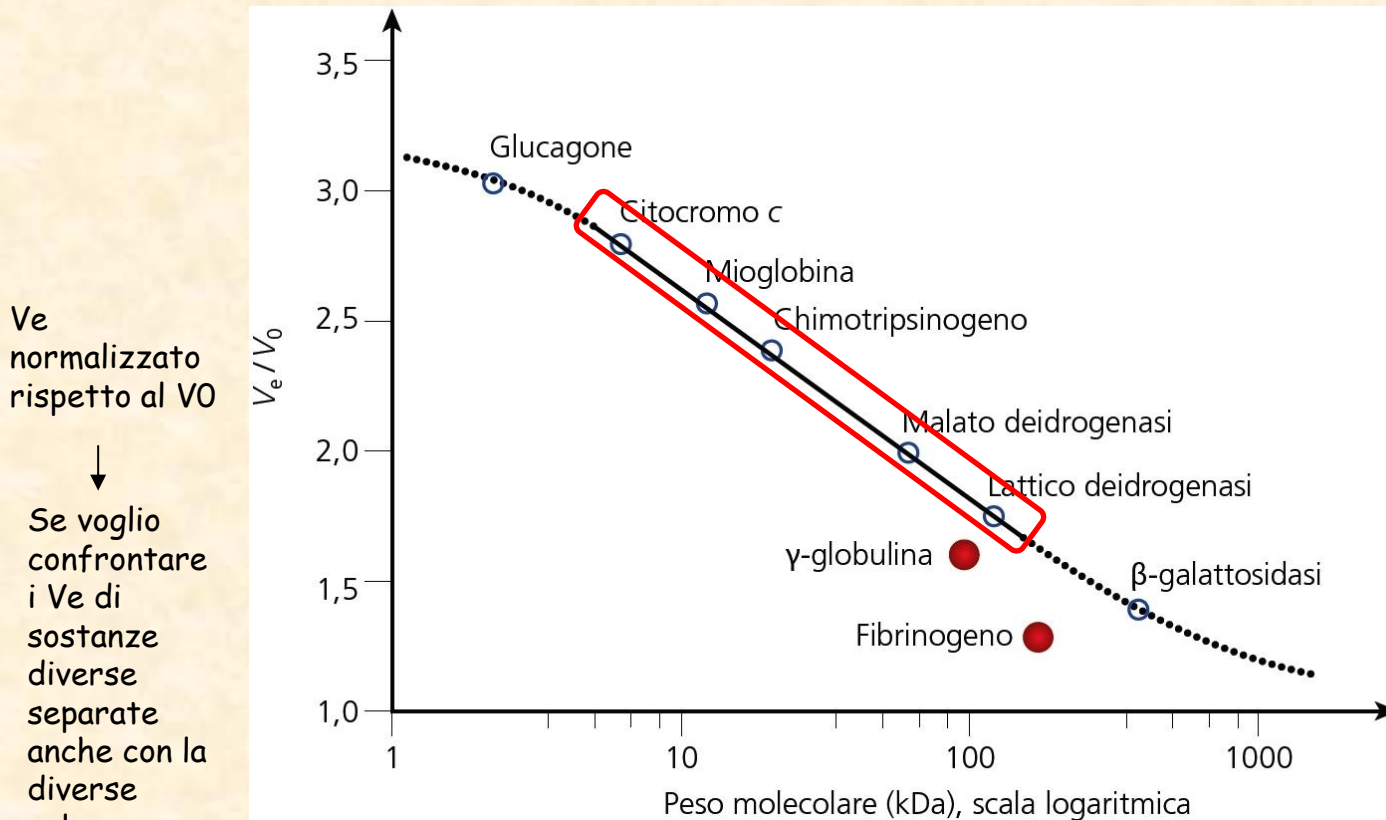
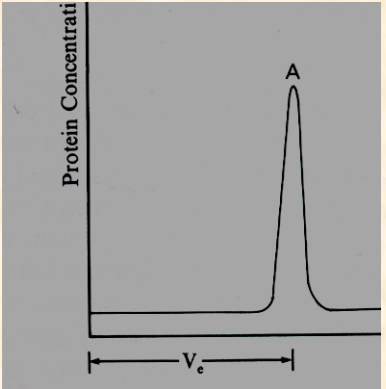


Figura 5.14

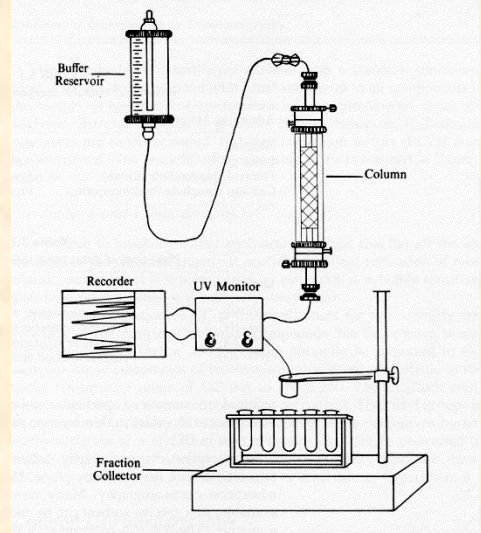
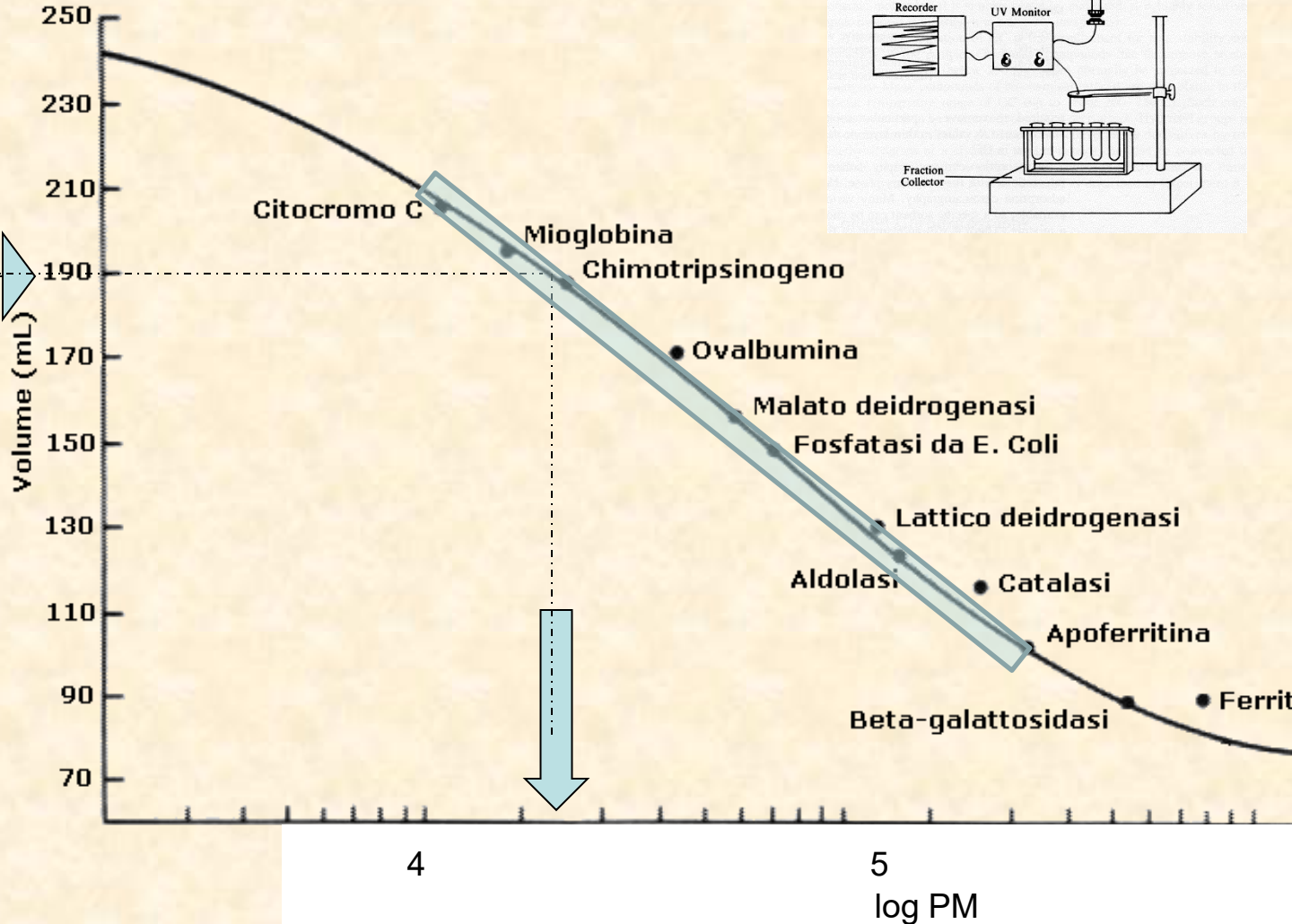
Gel-filtrazione su Sephadex G-200. Grafico del volume di eluizione relativo (V_e/V_0) in funzione del logaritmo del peso molecolare per alcune proteine, indicate in figura. L'esperimento si dimostra lineare (linea continua) per valori di peso molecolare che vanno dai 12 000 Da del citocromo C ai 144 000 Da della lattico deidrogenasi. Al di sotto e al di sopra di questi pesi molecolari la linearità viene meno (linea tratteggiata). Le glicoproteine (indicate in magenta), a causa del loro maggior volume dovuto alla presenza dei carboidrati, non seguono la linearità, e cadono anch'esse al di fuori della retta di taratura.

Determinazione PM proteina incognita



$V_e = 190 \text{ ml}$

Una proteina sconosciuta eluisce a 190 mL:



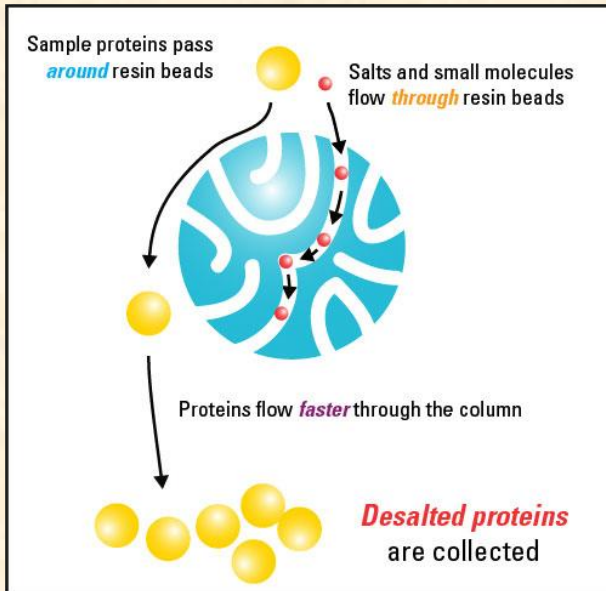
$\log PM = 4.12$ $PM = 13.180 \text{ Da}$

DESALIFICAZIONE:

Si utilizza una Fase Stazionaria che esclude completamente le molecole proteiche (vengono eluite con V_0) mentre le molecole di PM inferiore vengono rallentate

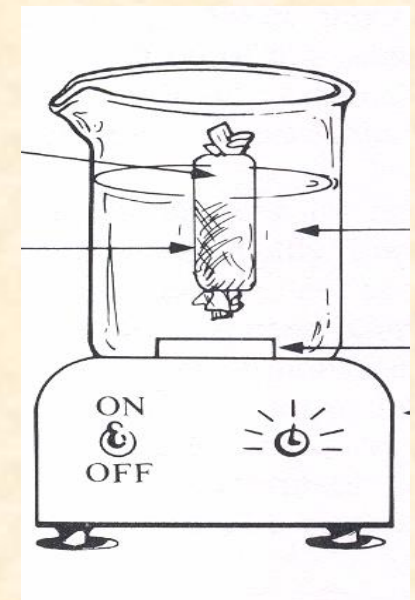
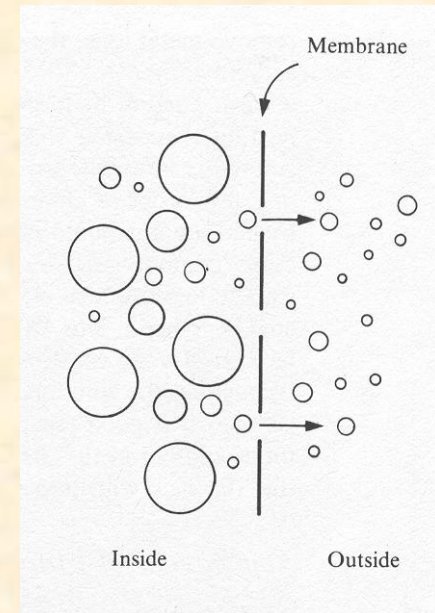
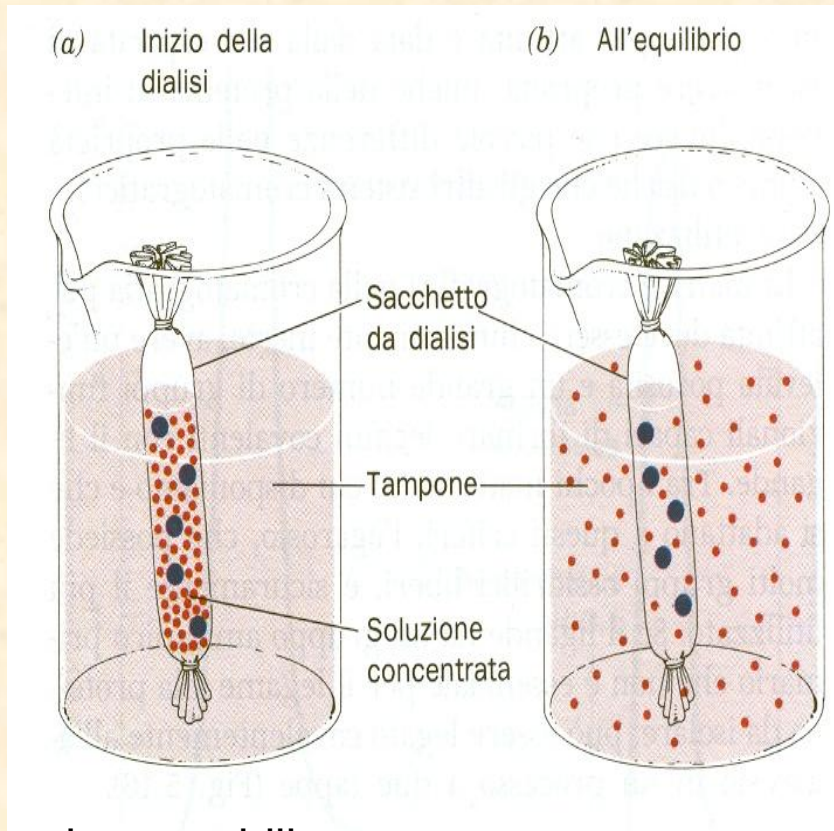
ES: Sephadex G25 (range di frazionamento 1000-5000 Da)

Polimero	Nome commerciale	Intervallo di frazionamento ^a ($M_r \times 10^3$)		
Destrano	Sephadex	G10	< 0.7	kDa
		G25	1.0-5	
		G50	1.5-30	
		G100	4.0-150	
		G200	5.0-600	



SEPARAZIONE DI GRUPPO

DIALISI



Membrane semipermeabili
p.es. acetato di cellulosa a porosità
tale da non permettere la fuoriuscita delle proteine



centricon



Gel filtrazione

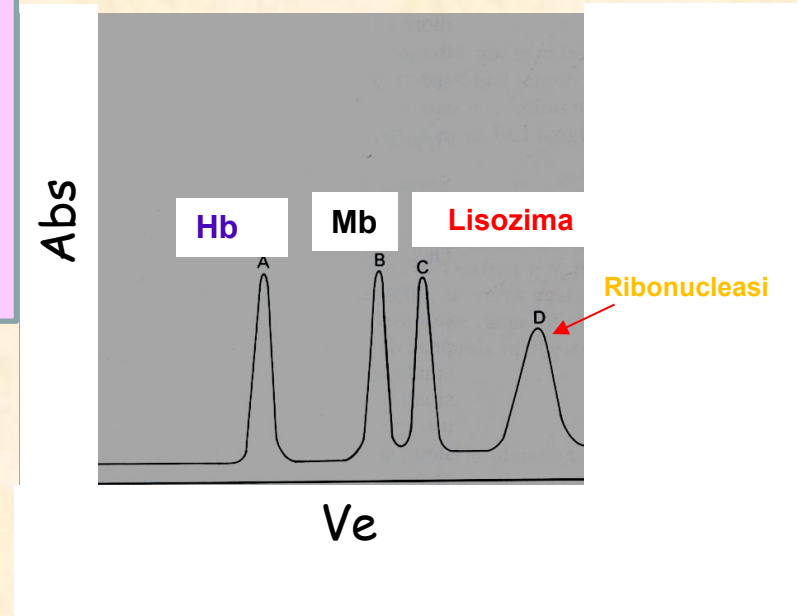
- Vantaggi
 - Semplice
 - Prevedibile
- Svantaggi
 - Bassa capacità (piccoli volumi) $<2\% V_t$



Quale metodo cromatografico è più adatto a separare le seguenti proteine:

- CM-cellulosa pH 6
- Sephadex G-100 (4-250kDa)
- Sephadex G-50 (1.5-30 kDa)

	pI	PM (kDa)
Mioglobina	7,0	16,9
Emoglobina	7,1	64,5
Ribonucleasi	7,8	12,6
Lisozima	11,0	14,6



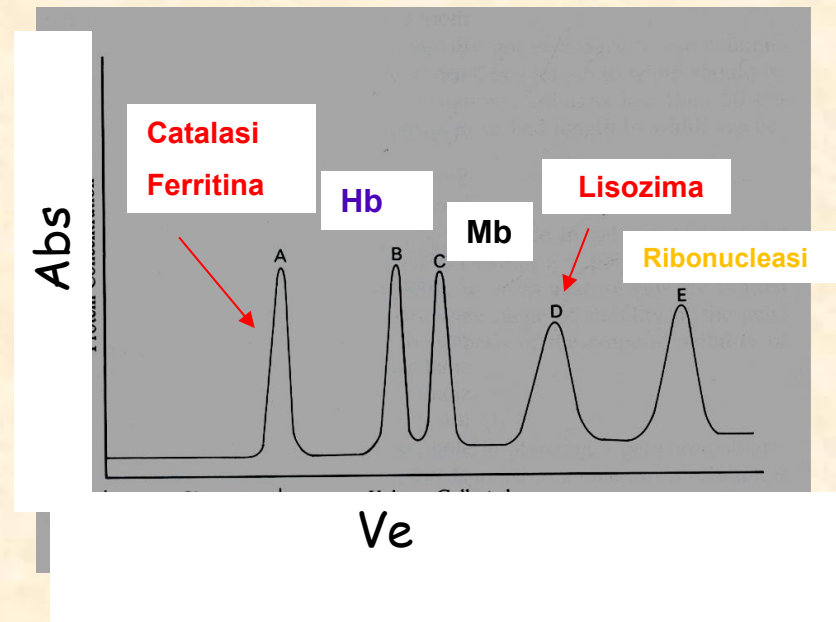
Qual'è l'ordine di eluzione delle proteine elencate da una colonna di equilibrata a pH 7.0 ?

Ipotizzare il grafico di eluzione

Ipotizzare il profilo di eluizione della miscela proteica in base al RF della FS

Polimero	Nome commerciale	Intervallo di frazionamento ^a ($M_r \times 10^3$)
Destrano	G10	< 0.7
	G25	1.0-5
	Sephadex G50	1.5-30
	G100	4.0-150
	G200	5.0-600

	PM (kDa)
Mioglobina	16,9
Emoglobina	64,5
Ribonucleasi	12,6
Lisozima	14,6
Ferritina	450
Catalasi	250



CROMATOGRAFIA a SCAMBIO IONICO

interazione elettrostatica
tra molecole di segno opposto

gruppi ionizzabili al variare
del pH

Maggiori volumi di campione
e maggiori quantità di proteine

Alta flessibilità nelle condizioni sperimentali (pH, I)

Lunghezza della colonna (non importante)

1) Cromatografia a
scambio cationico

2) Cromatografia a
scambio anionico

Gel filtrazione

SEPARA le MOLECOLE
in base alle DIMENSIONI

- Minori volumi di campione
(2% volume totale)
- minori quantità di proteine
- Importante lunghezza della colonna
cromatografica