



CROMATOGRAFIA di AFFINITA'



CROMATOGRAFIA x INTERAZIONI IDROFOBICHE:

Cromatografia di affinità

Sfrutta la capacità delle macromolecole di interagire **reversibilmente** con determinati **ligandi**

Fase stazionaria : matrice a cui viene legato il ligando specifico per la molecola da isolare

In una miscela di proteine si legherà al ligando solo la proteina specifica.

Le altre proteine non si legheranno al ligando e verranno eluite con fase mobile

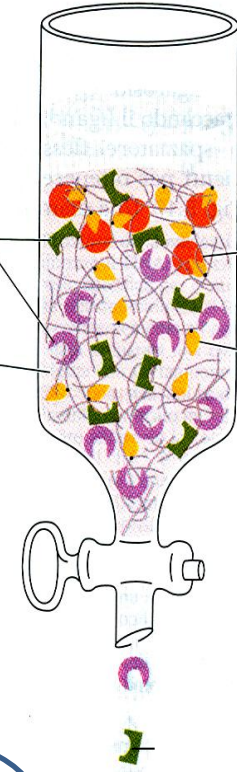
Cambiando le condizioni si potrà successivamente eluire la proteina che ci interessa

proteine che non si legano al ligando

matrice

Proteina-ligando

ligando



IMPORTANTE:

tecnica che purifica la proteina che ci interessa in un solo passaggio cromatografico

sono richieste **conoscenze preliminari** della specificità biologica della proteina da purificare

Matrici:

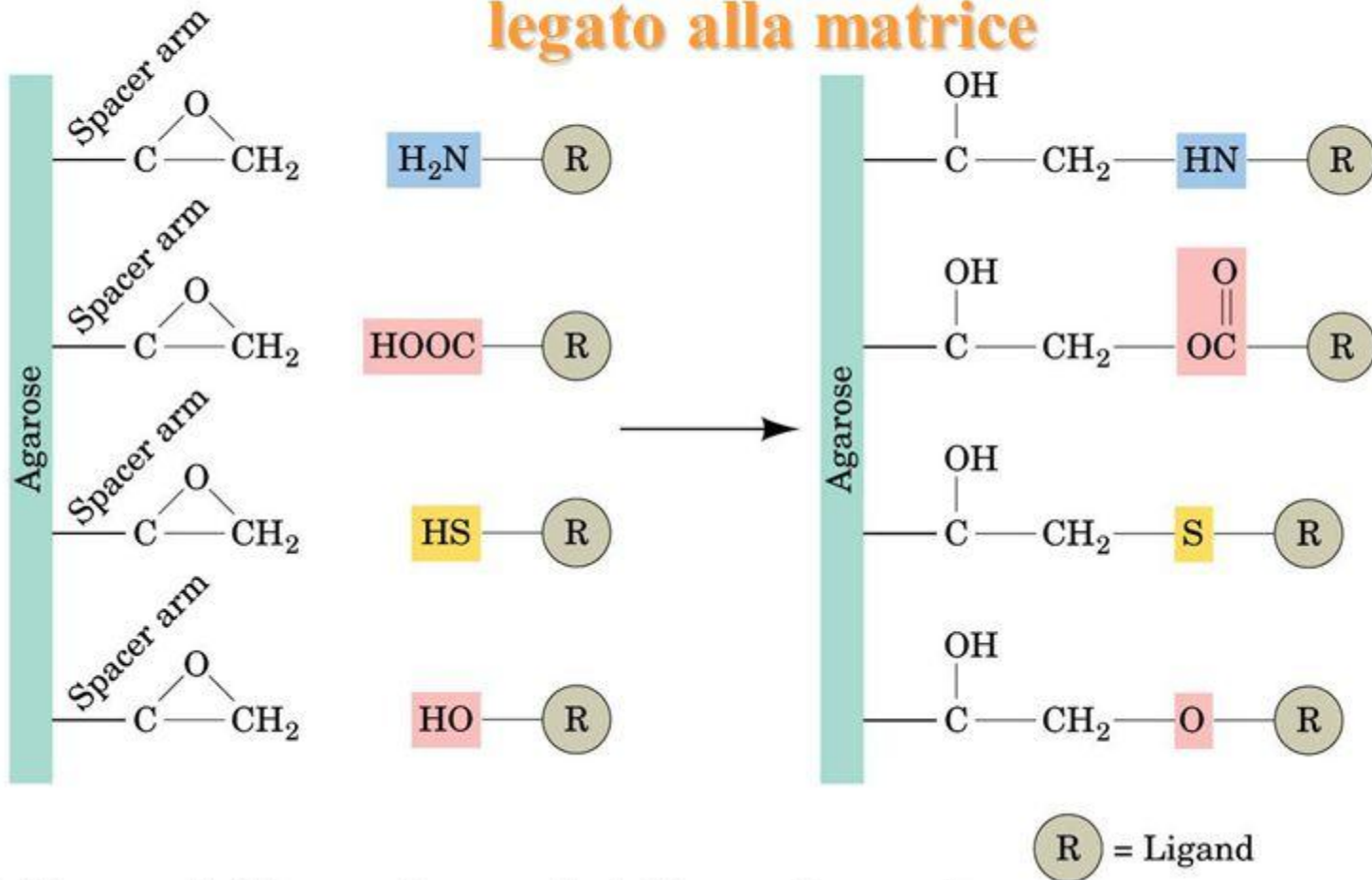
- Destrano **Sephacryl S**
- Agarosio **Sepharose 4B e 6 B, Biogel A**
- Cellulosa
- Poliacrilamide **Biogel P**

POLISACCARIDI:

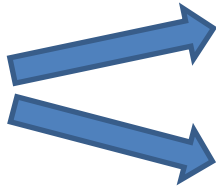
POLIMERI ORGANICI SINTETICI

- Chemically and physically inert support that directly or indirectly couples a ligand.
- Matrix should have a relatively larger surface area for better ligand attachment.
- It must be insoluble in solvents and buffers used in the purification process.
- It must exhibit good flow properties.
- Examples: agarose, polyacrylamide, polystyrene beads, cellulose, etc.

Legame di un ligando al braccio spaziatore legato alla matrice



Ligandi



Specifici per una singola molecola

Gruppo-specifici

Nucleotidi
Avidina
Eparina
Proteine A e G
Concanavalina A
Poli(A)

Scelta del ligando

-sono richieste conoscenze preliminari della specificità biologica della proteina da purificare

-Deve avere un legame con la molecola di interesse forte, specifico MA reversibile

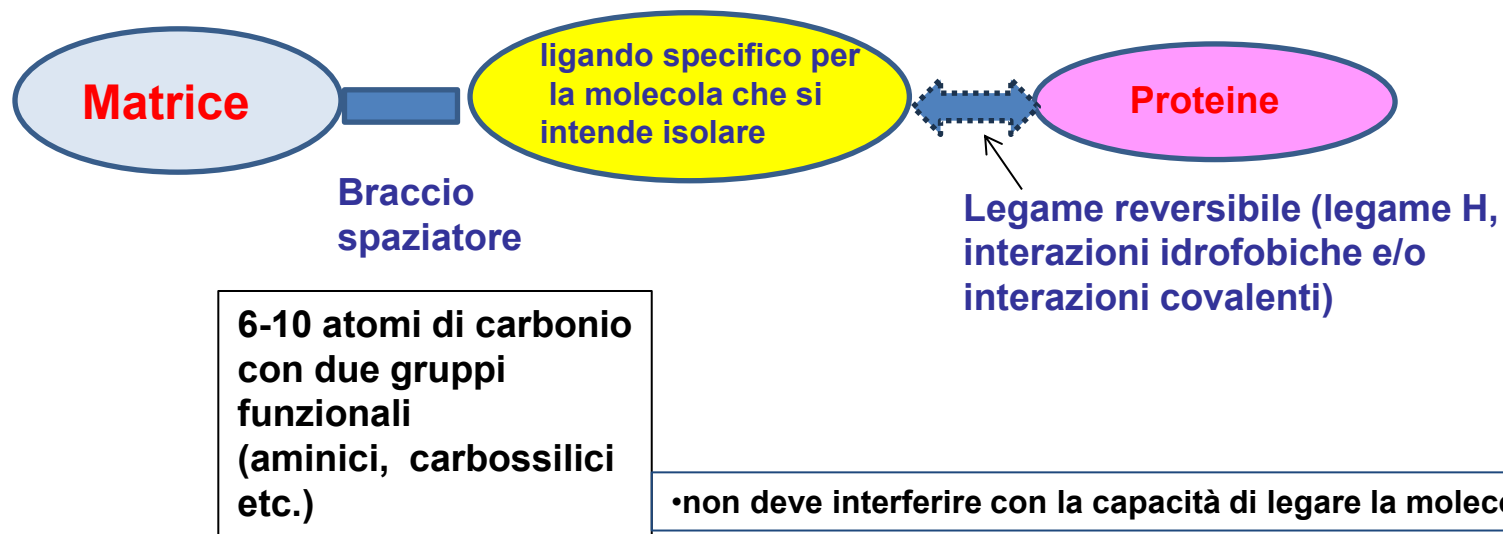
-Deve avere un legame con la matrice stabile

Solo 1-2% dei ligandi è orientato in modo corretto per legare la molecola di interesse !!

TABELLA 5.3 ►►► ESEMPI DI LIGANDI CHE POSSONO ESSERE UTILIZZATI PER LA PREPARAZIONE DI FASI STAZIONARIE IMPIEGATE NELLA CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ

Ligando	Molecole che mostrano affinità per il ligando
Nucleotidi 5'-AMP 2', 5'-ADP	Enzimi NAD ⁺ o NADP ⁺ -dipendenti, chinasi che utilizzano ATP Enzimi NAD ⁺ o NADP ⁺ -dipendenti
Calmodulina	Enzimi che legano la calmodulina
Avidina	Enzimi che contengono la biotina
Proteine A e G	Immunoglobuline
Concanavalina A	Glicoproteine contenenti residui di α -D-mannopiranosile e di α -D-glucopiranosile
Lectina di germe di soia	Glicoproteine contenenti residui di N-acetil- α -(o β)-galattopiranosile
Eparina	Proteine che legano gli acidi nucleici
Poli(A)	RNA contenente sequenze poli(U), alcune proteine RNA specifiche
Lisina	Plasminogeno
Cibacron Blue F3G-A	Enzimi che richiedono nucleotidi, enzimi che interagiscono con oligonucleotidi e polinucleotidi

Procedura sperimentale



➔ Riempimento della colonna con la matrice legata al ligando

➔ Viene equilibrata la matrice con un buffer che facilita le interazioni proteina-ligando

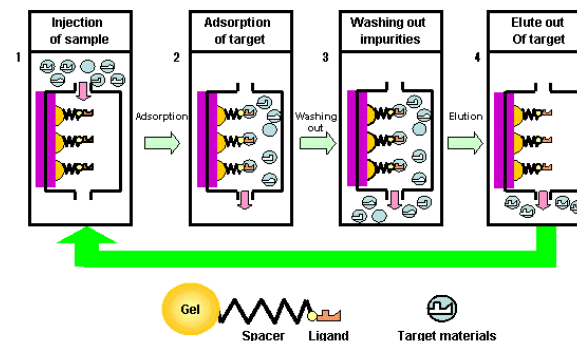
➔ Si carica il campione in colonna (la proteina di interesse si legherà alla matrice-ligando)

➔ Si lava la colonna per eliminare eventuali contaminanti

➔ Eluizione

Aspecifica

Specifica



Eluizione non isocratica

Specifica

Si aggiunge una molecola specifica che compete con la macromolecola per il legame con il ligando

- Ligandi ad alta affinità (compete con la proteina)
- **Eccesso** di ligando libero
- Inibitori competitivi

Non specifica:

(modificando le condizioni di eluizione si potrà eluire la proteina di interesse)

- Aumentare la forza ionica (NaCl 1M)
- pH
- diminuire la temperatura (int. Idrofobiche)
- Urea (blanda denaturazione del ligando)
- Glicina pH 2 (rompe i legami antigene/Ab)

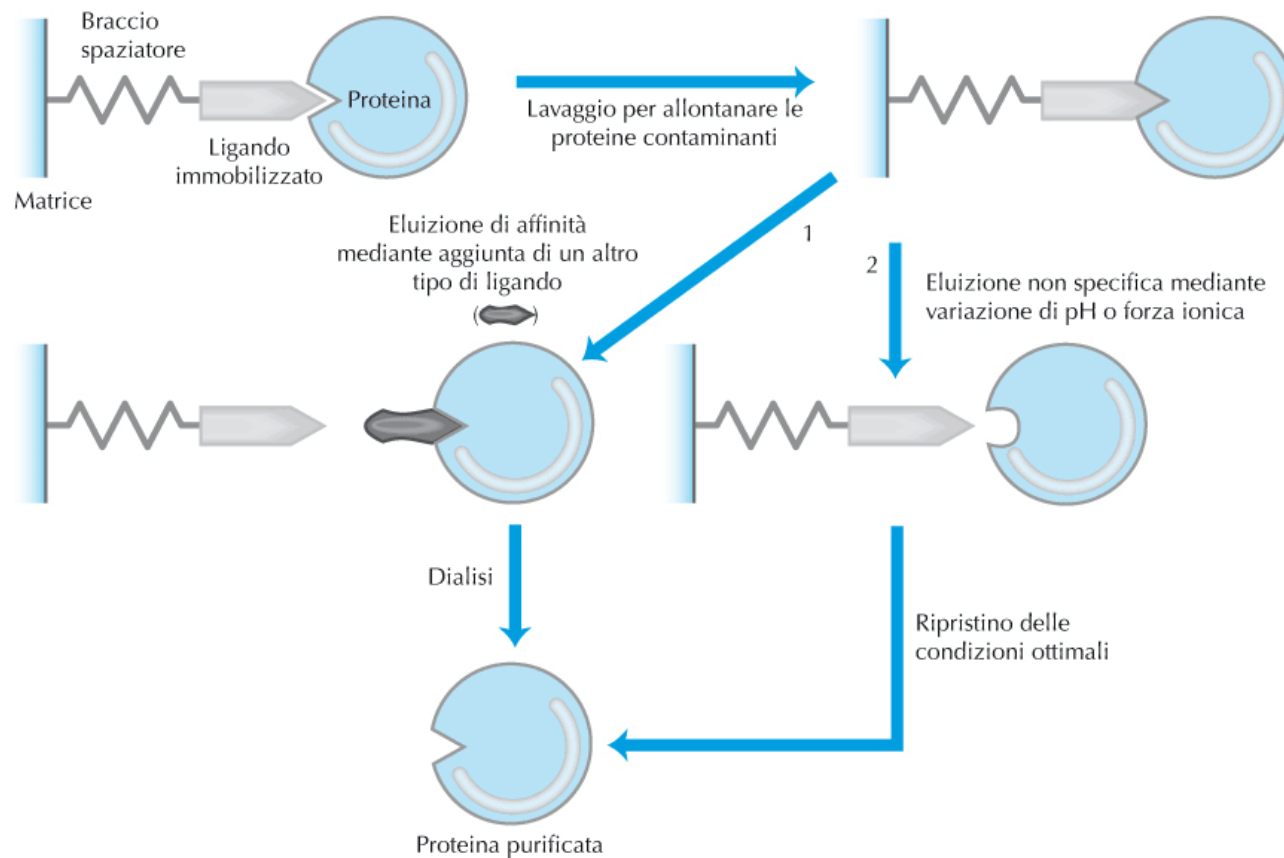
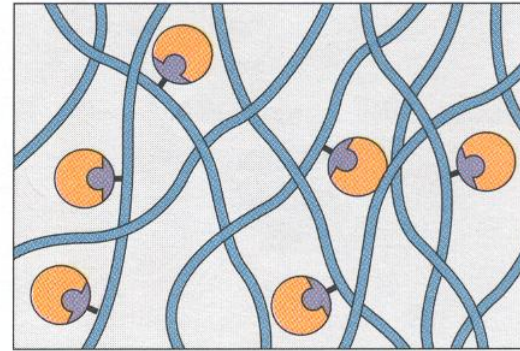
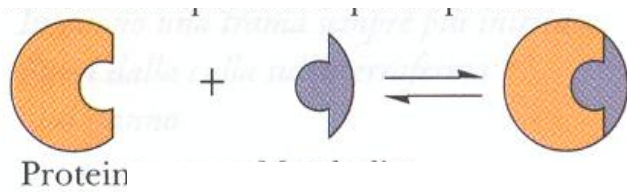
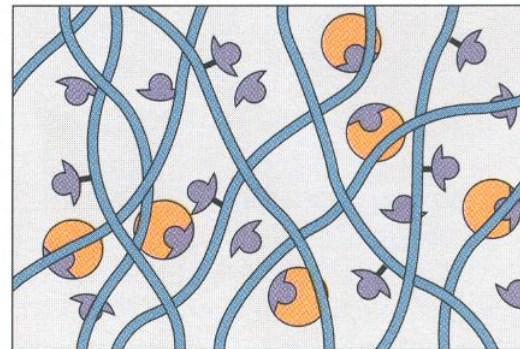


Figura 5.11 I due diversi tipi di eluizione che si possono utilizzare in una cromatografia di affinità. 1) Eluizione di affinità mediante aggiunta di un ligando specifico che entra in competizione con il ligando legato alla matrice per il legame con la proteina. 2) Eluizione non specifica che scinde i legami tra la proteina e il ligando immobilizzato mediante variazione di pH o di forza ionica.

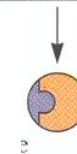
CROMATOGRAFIA di AFFINITA': eluizione specifica



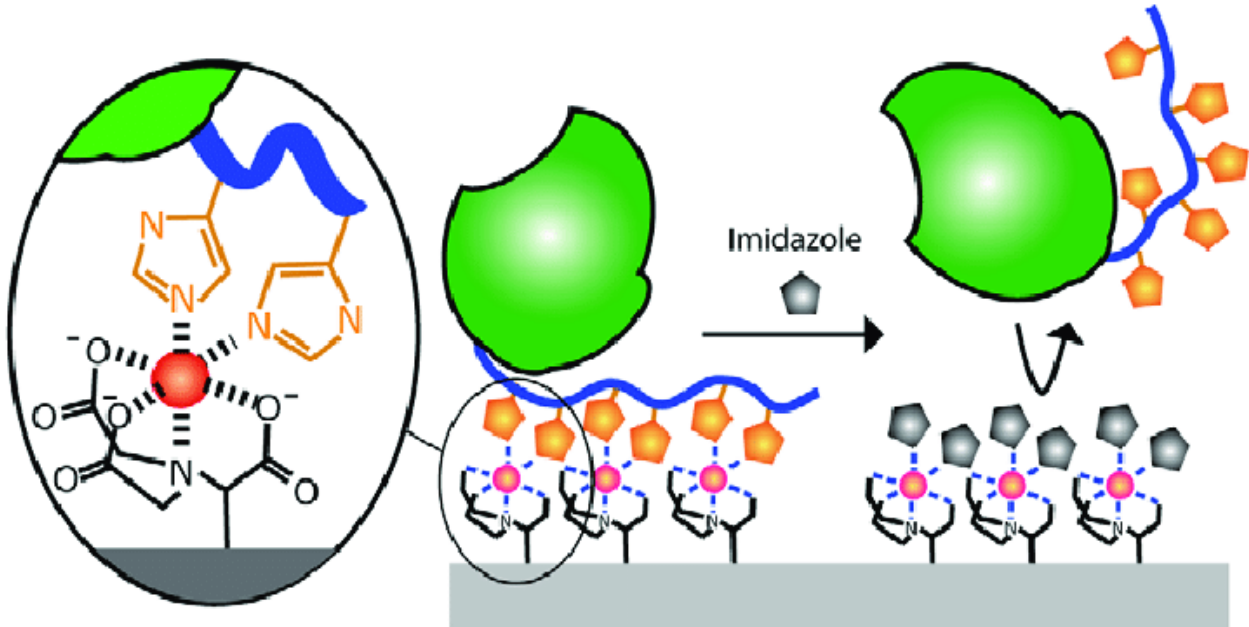
Aggiungiamo un eccesso di metabolita libero che compete con la proteina



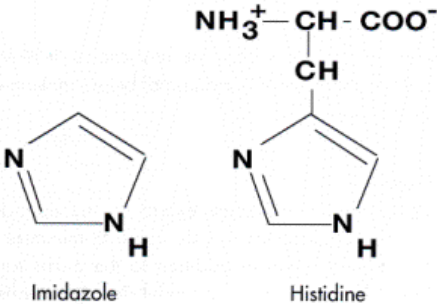
La proteina verrà eluita legata al ligando usato per l'eluizione che dovrà poi essere rimosso



Esempio: purificazione di HIS-TAG proteine ricombinanti sintetizzate con una coda di poly-His



Eluizione con gradiente crescente di imidazolo(compete)



pull-down assay

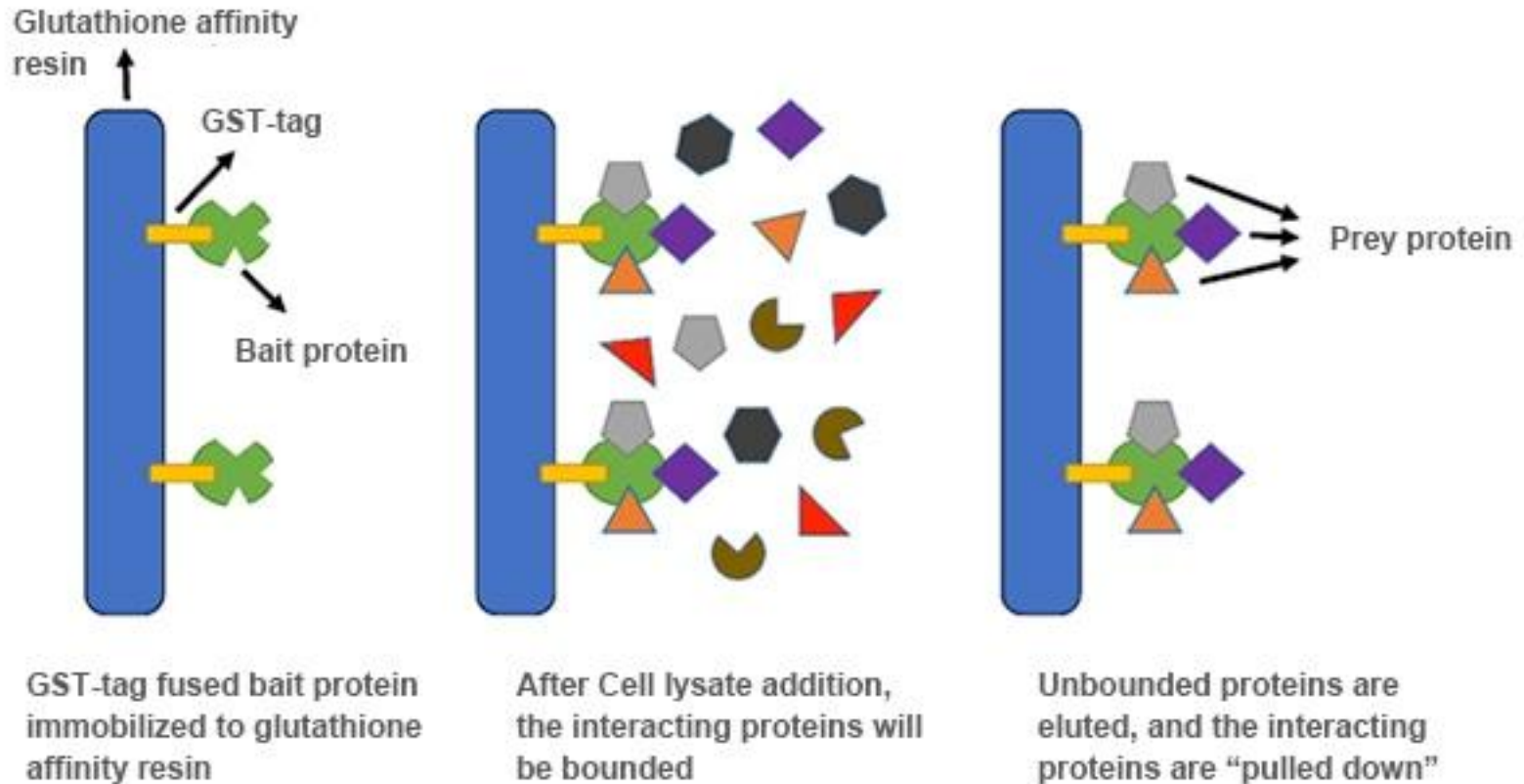
tecnica per verificare l'interazione fra due o più proteine.

Si utilizza una proteina con un tag (ad es. GST, His6, biotina...) detta **bait** (esca) che deve "catturare" un'altra proteina **prey** (preda), che è quella in cui voglio verificare se ci sia interazione.

La proteina esca viene immobilizzata su un supporto (ad es. su una colonna di affinità), a secondo del tag utilizzato, e viene utilizzata per testare l'interazione con altre proteine.

La "proteina esca immobilizzata" viene messa a contatto con diverse proteine con cui si "sospetta" ci sia un'interazione.

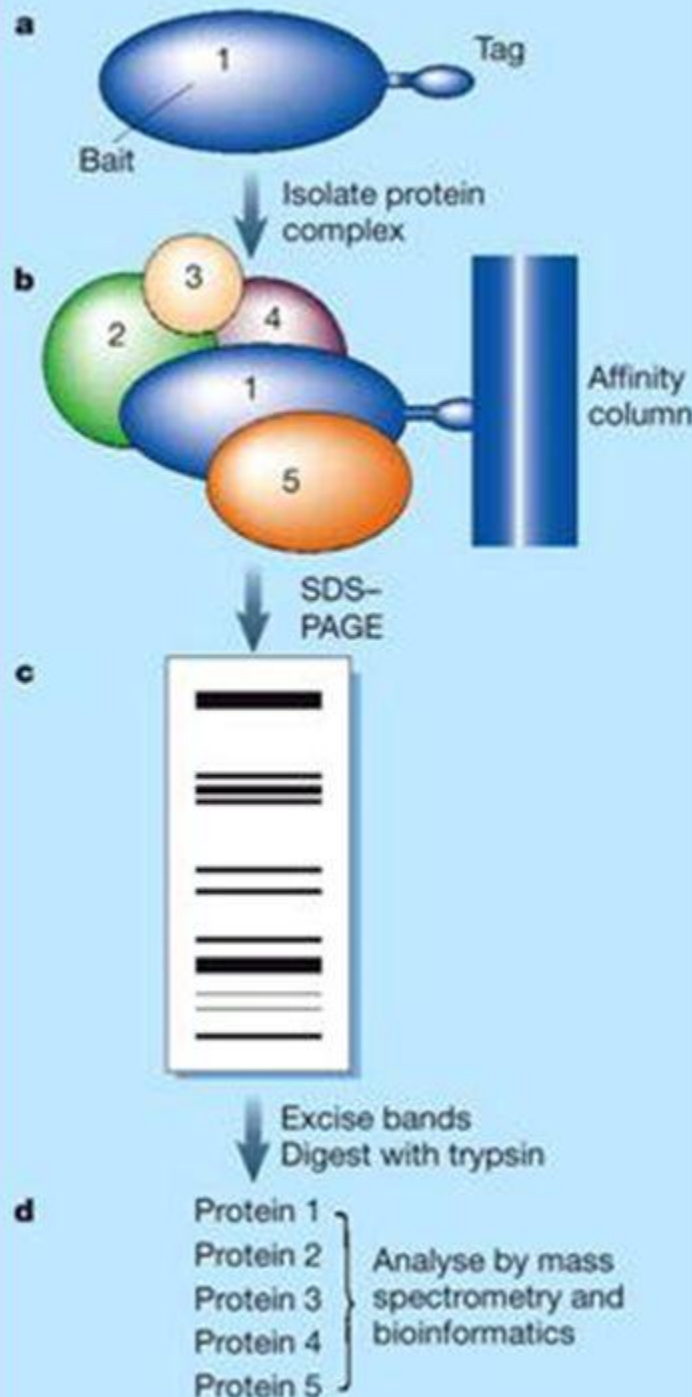
Il complesso "proteina esca-proteina preda" che si forma viene poi staccato dal supporto di affinità e analizzato mediante SDS-PAGE.



CROMATOGRAFIA PER AFFINITA' (pull down)

Una "esca" cattura un complesso proteico

Analisi della/e proteina:
digestione proteolitica e spettrometria di massa



Tag = GST

Colonna con Glutazione

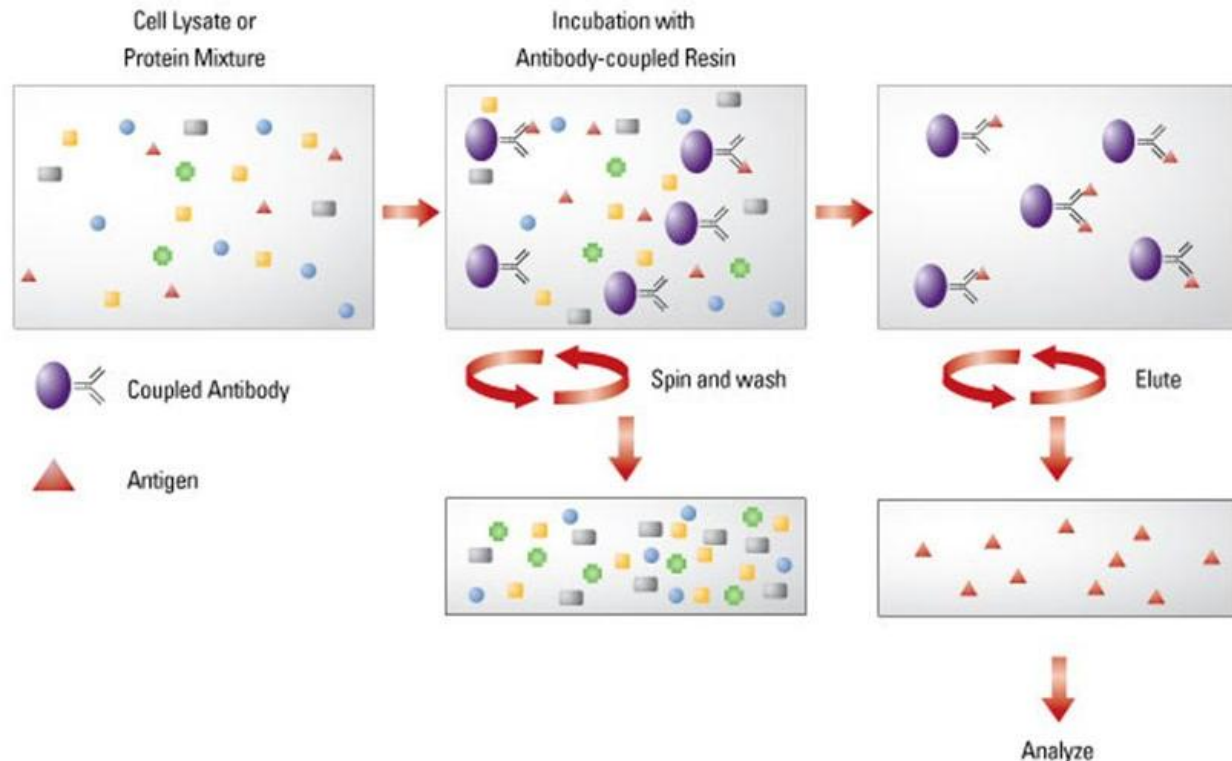
IMMUNOPRECIPITAZIONE

Gli anticorpi possono essere utilizzati per eseguire reazioni di immunoprecipitazione (cioè reazioni tra un antigene e un anticorpo che danno luogo alla formazione di un complesso insolubile in soluzione acquosa) che sono sfruttate in numerosi metodi biochimici e test diagnostici.

L'estratto cellulare contenente la proteina che si vuole studiare viene incubato con delle microsfere di agarosio, che sono state trattate in modo tale da esporre sulla loro superficie l'anticorpo specifico per quella proteina.

La funzione delle microsfere è duplice. Esse forniscono un supporto solido, facilmente separabile dalle proteine che non hanno interagito con l'anticorpo e che rimangono quindi nel surnatante. D'altro canto le microsfere hanno anche la funzione di esporre l'anticorpo all'interazione con la sua proteina specifica in una corretta disposizione spaziale: ciò avviene perché l'anticorpo non è immobilizzato direttamente sulle microsfere di agarosio, ma è legato tramite la proteina A di un batterio, *Staphylococcus aureus*, che fa da ponte fra le microsfere di agarosio e l'anticorpo.

Dopo 30 minuti di incubazione le microsfere vengono lavate più volte per eliminare le proteine legate in modo non specifico. Questa è la tecnica più semplice per separare le proteine, ma può essere applicata solo se la quantità di materiale da trattare è piccola.



APPLICAZIONI della CROMATOGRAFIA di AFFINITA'

Purificazione di:

Enzimi

Anticorpi (Immunoglobuline)

Glicoproteine

mRNA (coda di poliA)

ligando immobilizzato

substrato o un analogo del substrato
coenzima o un analogo del coenzima
inibitore reversibile
attivatore allosterico

Antigeni = Cromatografia di immunoaffinità

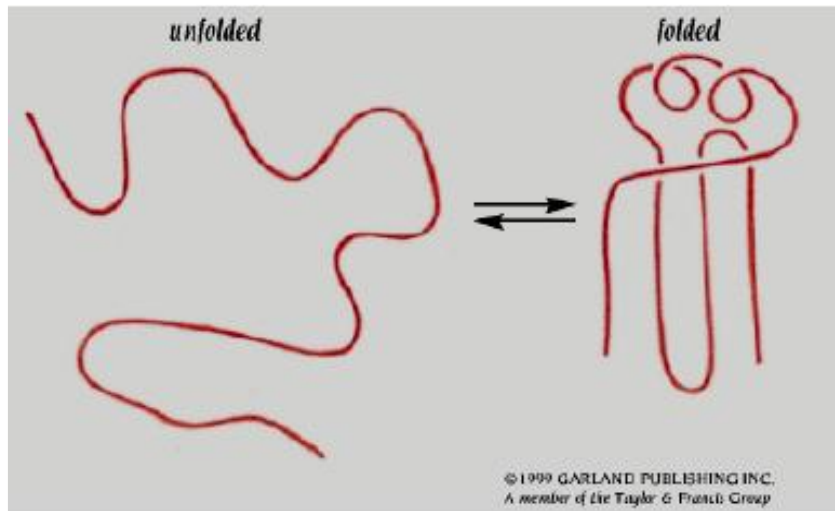
Lectine (proteine che legano glucidi)

oligonucleotide (TTTTTTT)

CROMATOGRAFIA x INTERAZIONI IDROFOBICHE (HIC)

Sfrutta la capacità delle **porzioni idrofobiche superficiali** delle proteine di interagire con catene alifatiche:

Nella maggior parte delle proteine globulari l'avvolgimento comporta la disposizione della maggior parte delle **porzioni idrofobiche verso l'interno**, e le **porzioni idrofiliche** all'esterno, a contatto con l'acqua



Ma ci sono anche porzioni idrofobiche superficiali

L'aggiunta di ioni ad una soluzione contenente proteine sottrae le molecole d'acqua di idratazione che rivestono le porzioni idrofobiche superficiali delle proteine
→ le porzioni idrofobiche superficiali sono "scoperte"

Salting out

Si utilizzano Forze Ioniche molto elevate



Scopo:

Aggregazione delle molecole proteiche mediante interaz. idrofobiche tra le loro porzioni idrofobiche "scoperte"



precipitazione

Crom.per interazioni idrofobiche

Si utilizzano Forze Ioniche meno elevate

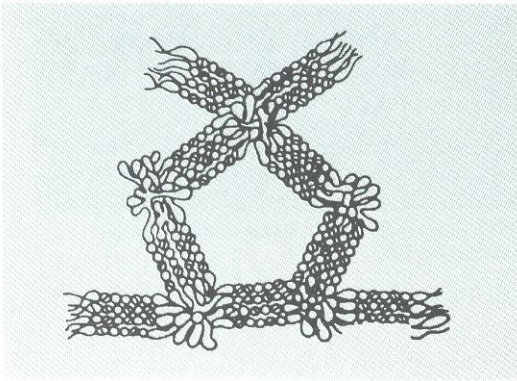


Scopo:

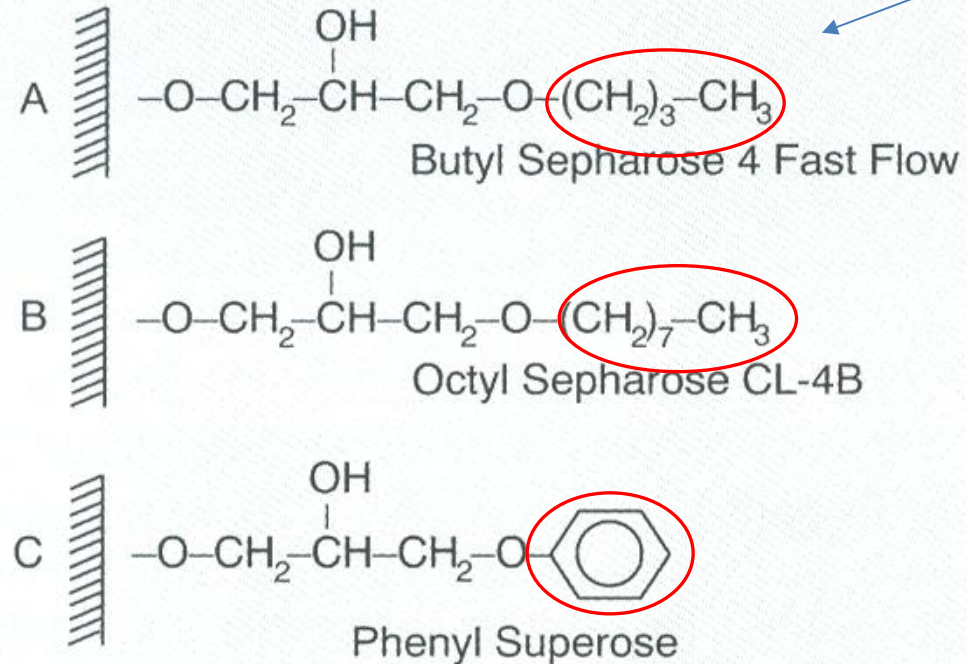
le proteine si **legano** ai gruppi idrofobici della Fase stazionaria mediante interazioni idrofobiche con le porzioni idrofobiche superficiali "scoperte"

CROMATOGRAFIA x INTERAZIONI IDROFOBICHE:

FASI STAZIONARIE utilizzate nella cromatografia per interazioni idrofobiche:



MATRICE di AGAROSIO



Gruppi alchilici

Fase mobile

- Buffer con alta forza ionica (**solfo d'ammonio** o **fosfato di potassio**)
- Forza Ionica **minore** di quella che causa **salting out**



Per favorire il legame dei gruppi idrofobici delle proteine alla FS

Le proteine con **più gruppi superficiali idrofobici** si legheranno alla FS

Le proteine con **meno gruppi superficiali idrofobici** si legheranno più debolmente alla FS

le biomolecole vengono eluite in ordine crescente di idrofobicità.

ELUIZIONE NON ISOCRATICA

- gradiente **decescente** di forza ionica

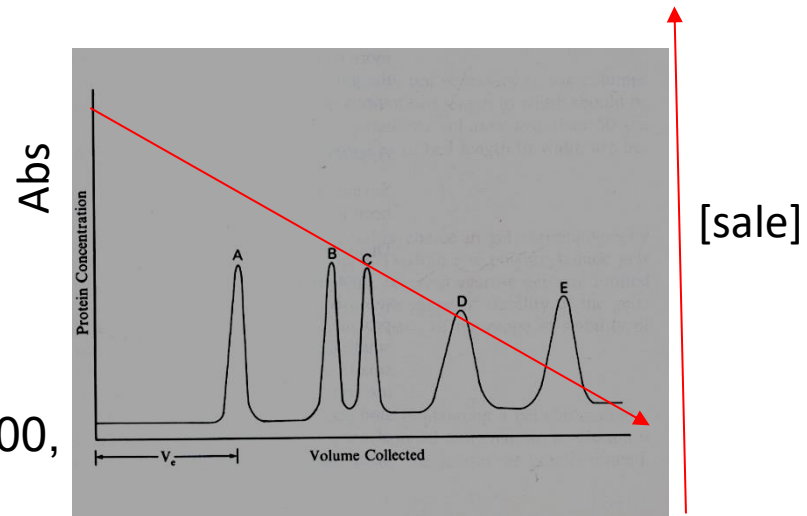
- Tris 10 mM pH 7 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1M



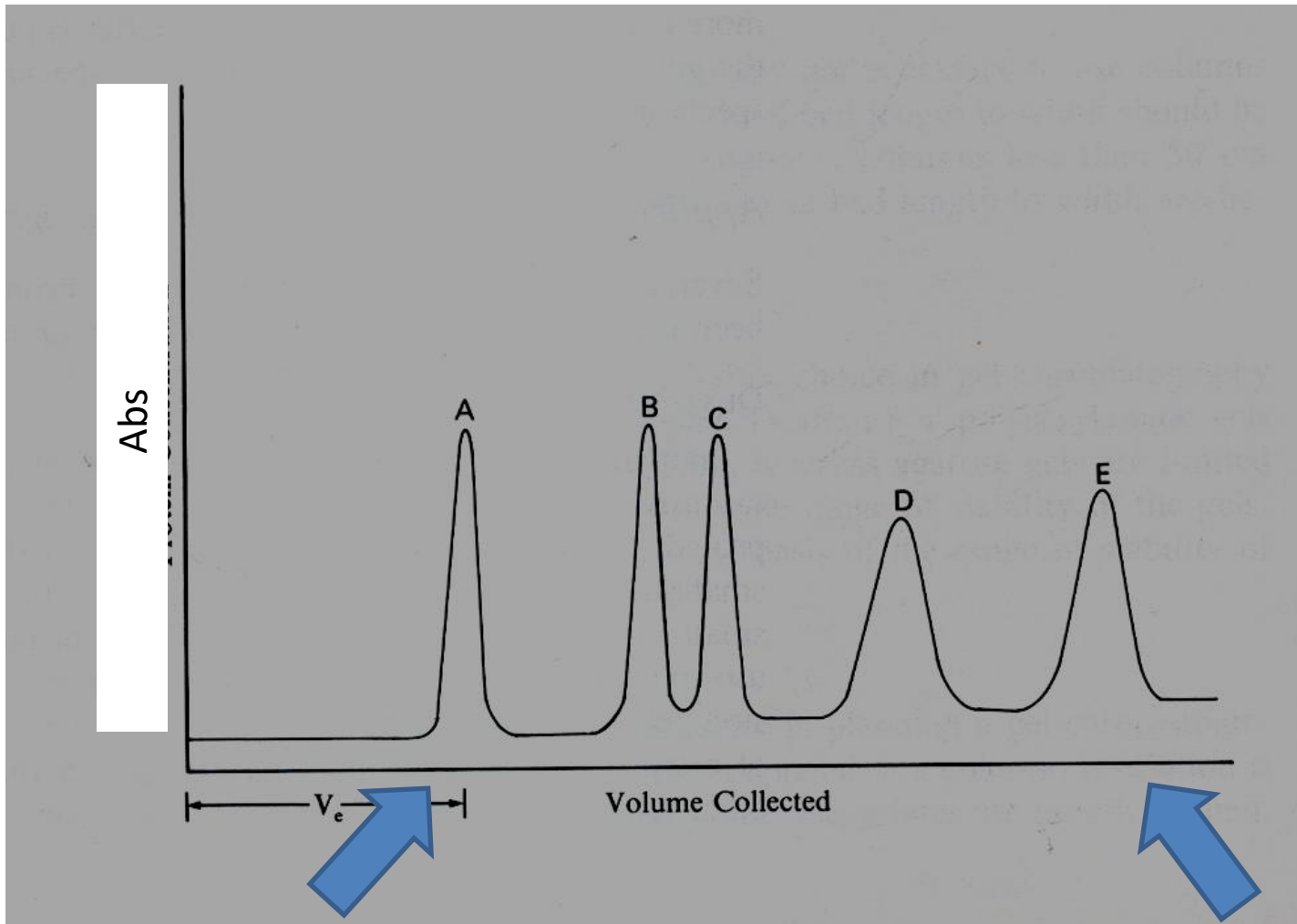
- Tris 10 mM pH 7

- Aggiunta di detergenti non-ionici come Triton X-100,

- diminuzione della temperatura



CROMATOGRAFIA x INTERAZIONI IDROFOBICHE:



PROTEINA MENO IDROFOBICHE:

PROTEINA PIU' IDROFOBICHE:

CROMATOGRAFIA x INTERAZIONI IDROFOBICHE (HIC):

APPLICAZIONI

▪1) dopo salting out utilizzando:

- il supernatante contenente la proteina non precipitata
- il precipitato risolubilizzato per aggiunta di sol. tampone a bassa FI

2) dopo eluizione da cromatografia a scambio ionico per \uparrow Forza Ionica (alternativa alla dialisi) caricando il campione direttamente su HIC

SVANTAGGIO:

Il comportamento di ciascuna proteina è difficilmente prevedibile
È necessario uno studio preliminare

VANTAGGIO:

Elevata capacità: si possono caricare quantità elevate di campione

