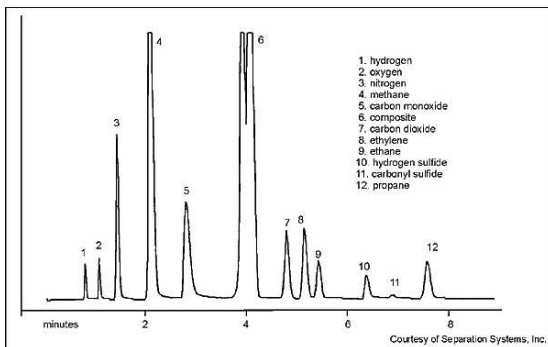


GENERALITA' SULLA CROMATOGRAFIA



COSA SONO LE TECNICHE CROMATOGRAFICHE?

La cromatografia consiste nello sfruttare la diversa attitudine di ogni molecola o ione nel **distribuirsi fra 2 fasi differenti**.

Una fase viene immobilizzata su di un supporto (es. colonna) ed è perciò detta fase stazionaria, l'altra viene fatta scorrere sulla prima continuamente: fase mobile.



TECNICHE CROMATOGRAFICHE

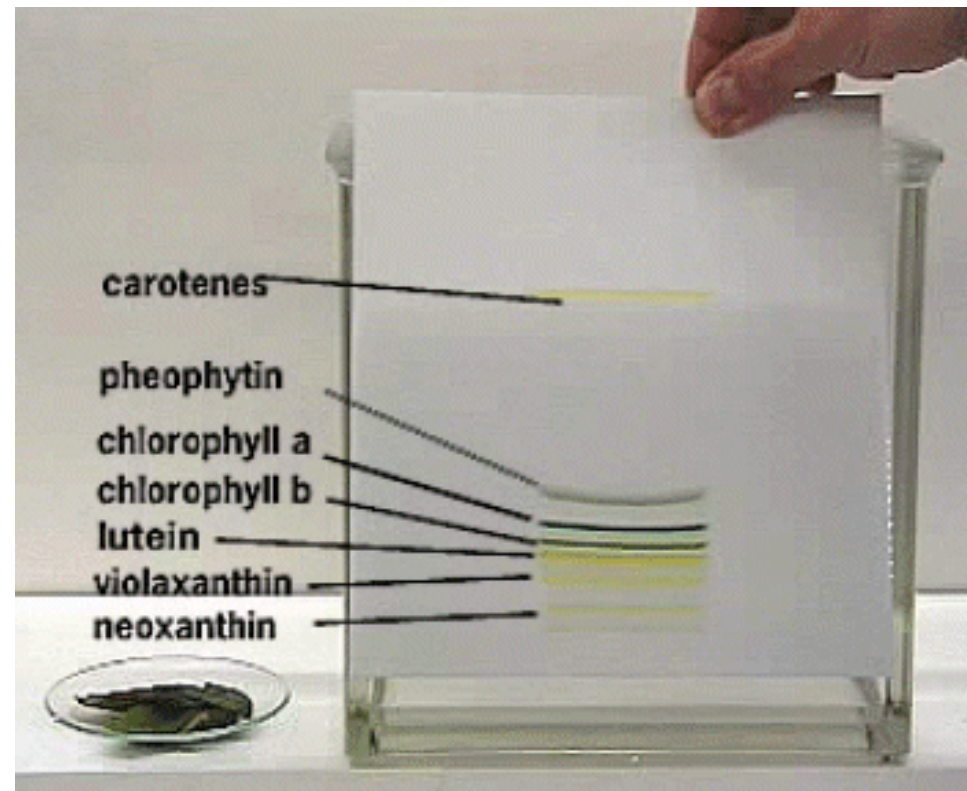
Ogni componente della miscela sarà in equilibrio fra le 2 fasi.



$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

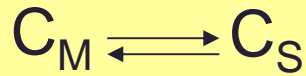
K = coefficiente di distribuzione
(diverso per ogni componente)

La miscela, messa a contatto con le 2 fasi, si separerà sulla base delle diverse **affinità** di ciascun componente **per tali fasi**.



TECNICHE CROMATOGRAFICHE

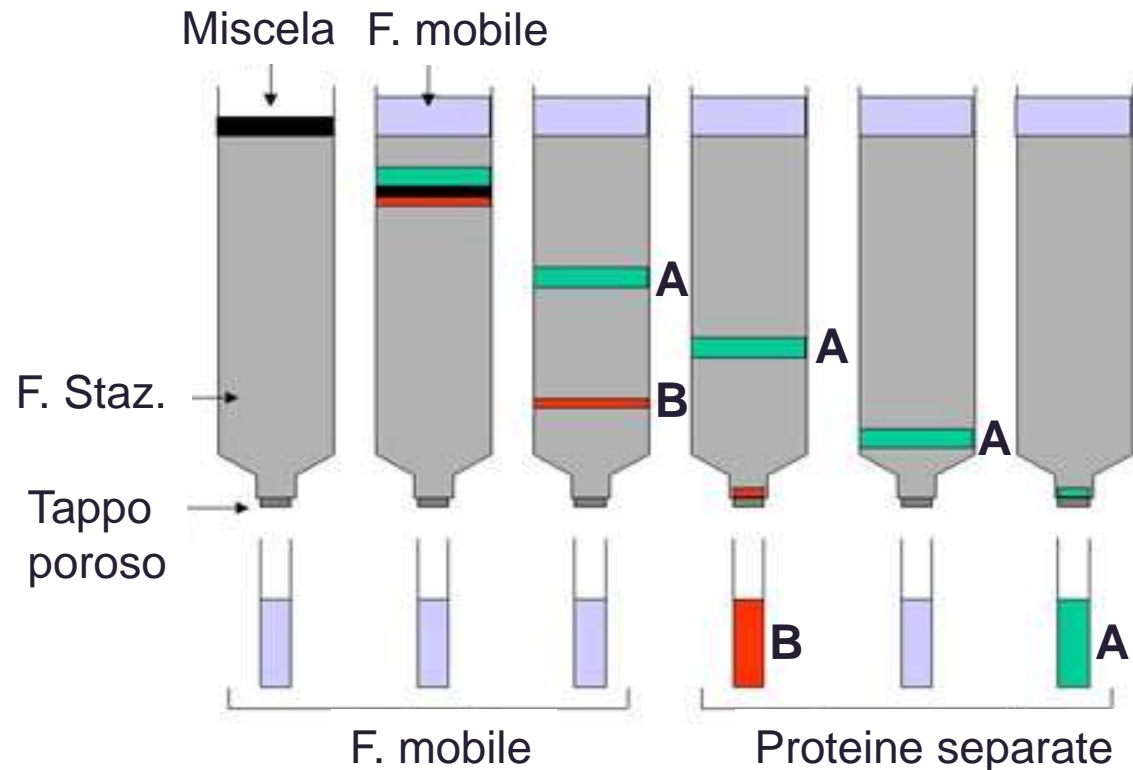
Ogni componente della miscela sarà in equilibrio fra le 2 fasi.



$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

K = coefficiente di distribuzione
(diverso per ogni componente)

La miscela, messa a contatto con le 2 fasi, si separerà sulla base delle diverse **affinità** di ciascun componente **per tali fasi**.



FINALITA' DELLA CROMATOGRAFIA

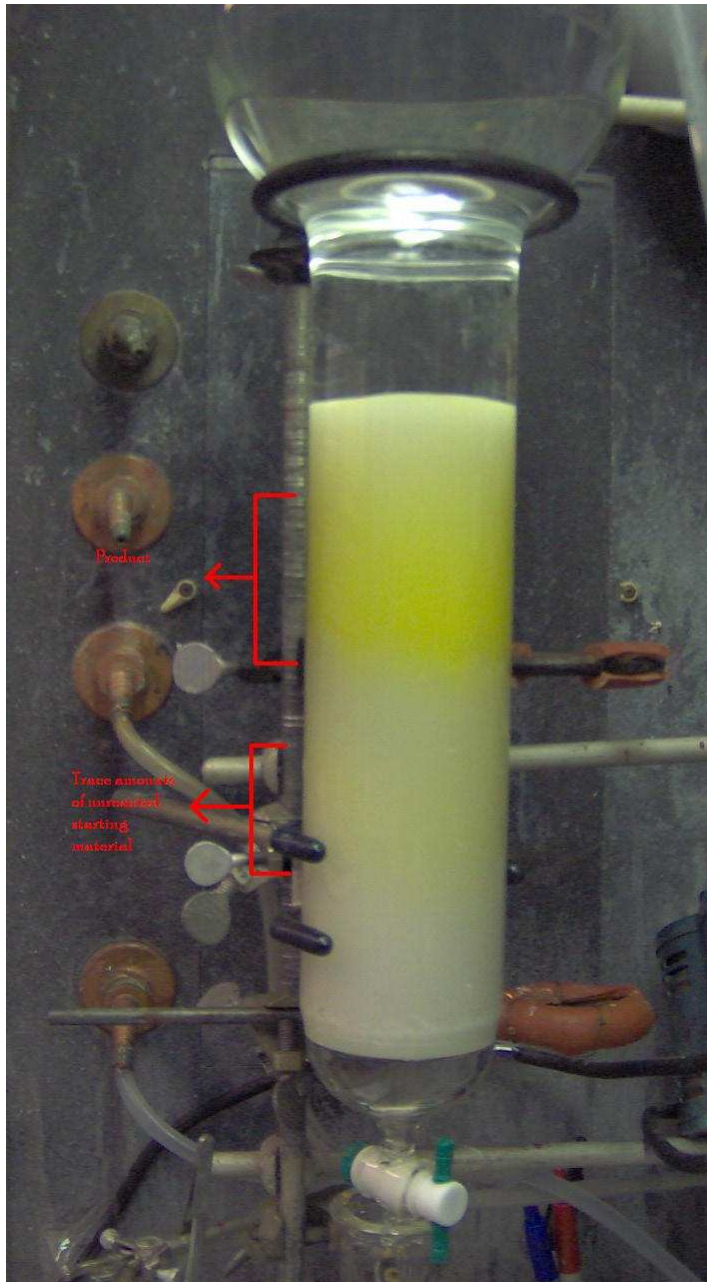
ANALITICA



PREPARATIVA



CROMATOGRAFIA SU COLONNA

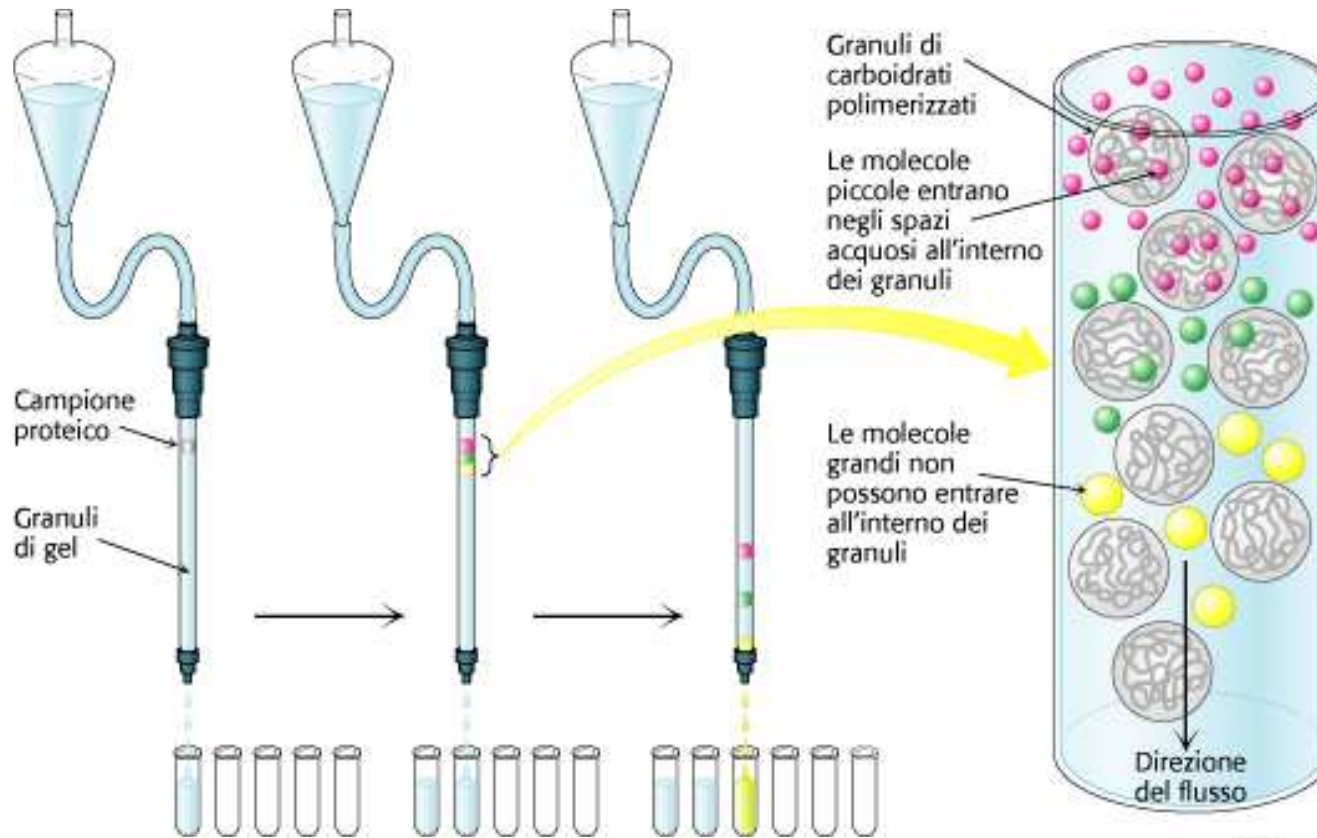


- Colonne (vetro, plastica, metallo)
- Serbatoi (Isocratica o gradiente)
- Pompe (peristaltica o continua)
- Fasi stazionarie
- Fasi mobili
- Rivelatori (spettrofotometro, fluorimetro, rilevatore elettrochimico, a indice di rifrazione)
- Sistemi per raccogliere le frazioni (manuale, semi-automatico, completamente automatico)

CLASSIFICAZIONI

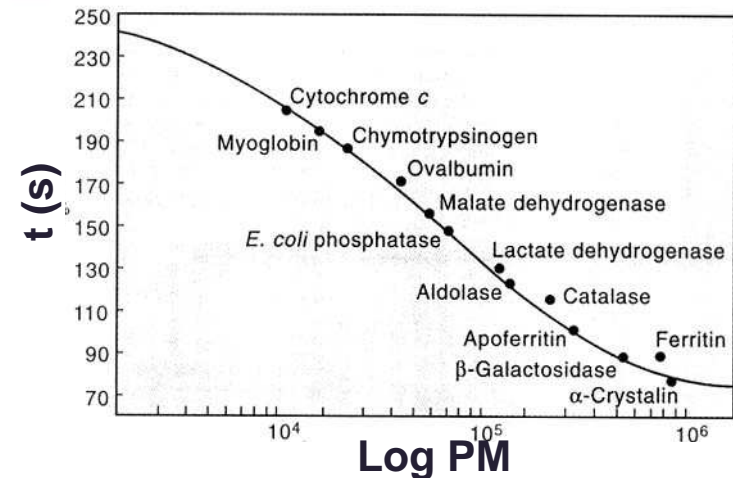
| CHROMATOGRAPHIC PRINCIPLE | Physical state of mobile phase | Type of Chromatography |
|--|--------------------------------|------------------------|
| Adsorption Chromatography Competition between a solid adsorbent and mobile phase | Gas | GC / GSC |
| | Liquid | LC / HPLC TLC / PC |
| Partition Chromatography Competition between a liquid stationary phase and mobile phase | Gas | GC / GLC SFC |
| | Liquid | LC / HPLC |
| Ion Exchange Chromatography Competition between an ion exchange resin stationary phase and liquid mobile phase | Liquid | IEC / IC / HPIC |
| Permeation Chromatography Competition between a polymer matrix and liquid mobile phase | Liquid | GPC |

CROMATOGRAFIA PER FILTRAZIONE SU GEL



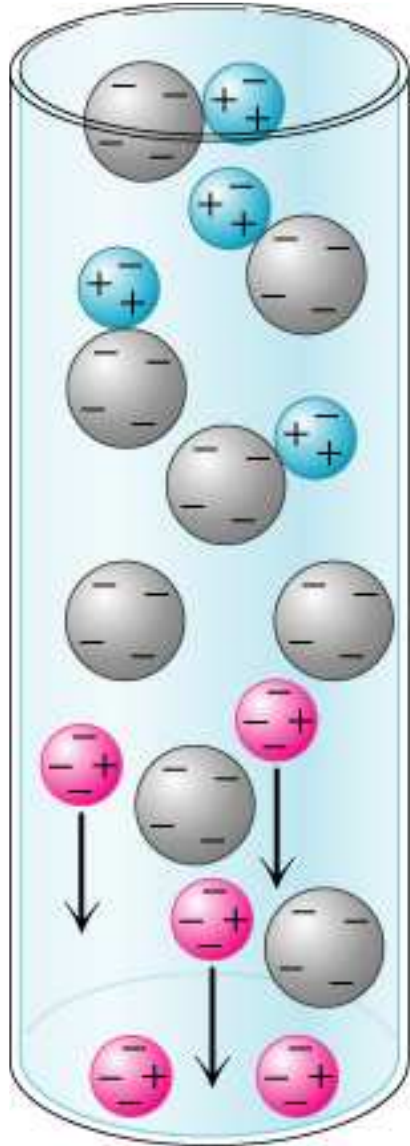
Proprietà sfruttata:
DIMENSIONE
delle molecole.

Ordine di uscita dei campioni **opposto** rispetto all'SDS-PAGE.



CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

1^a fase: legame



Proprietà sfruttata: **CARICA**
NETTA delle molecole.

2^a fase: eluizione



ESEMPIO DI CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

Scambiatore di anioni forte:
ammine quaternarie



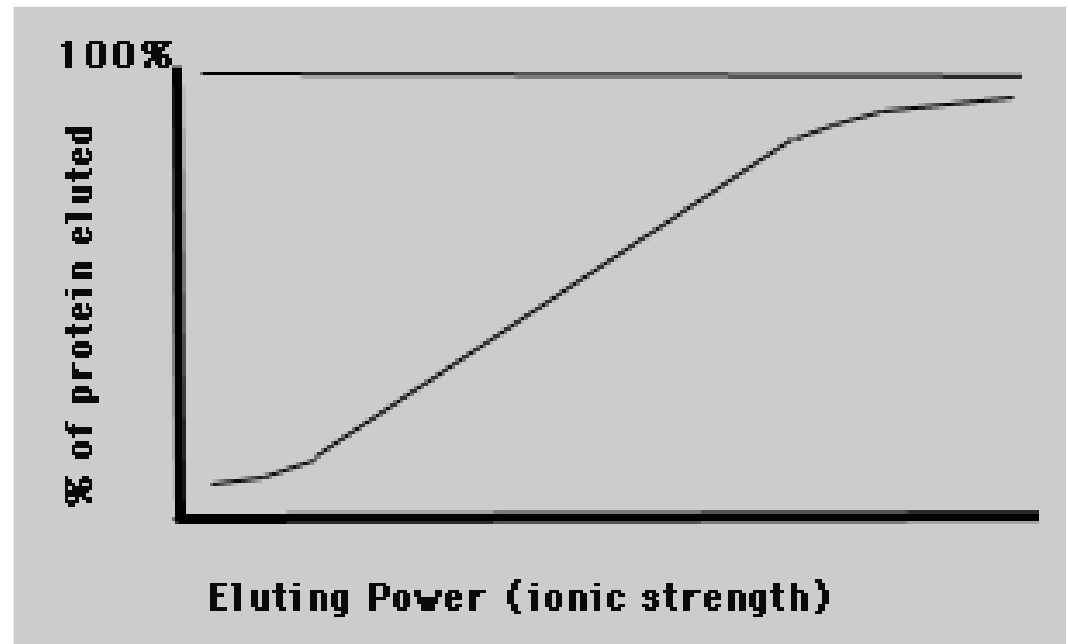
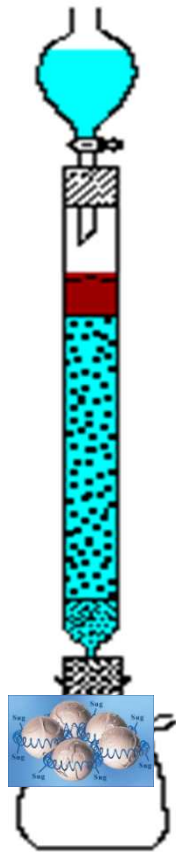
| | | |
|-------------|---------------|-----------------------|
| TRIS | 50 mM | EQUILIBRAZIONE |
| NaCl | 100 mM | RESINA |
| EDTA | 5 mM | |
| Benzamidina | 10 mM | pH 7.5 |

| | | |
|-------------|-------|--------------------|
| TRIS | 50 mM | FISSAZIONE |
| EDTA | 5 mM | ALLA RESINA |
| Benzamidina | 10 mM | pH 7.5 |

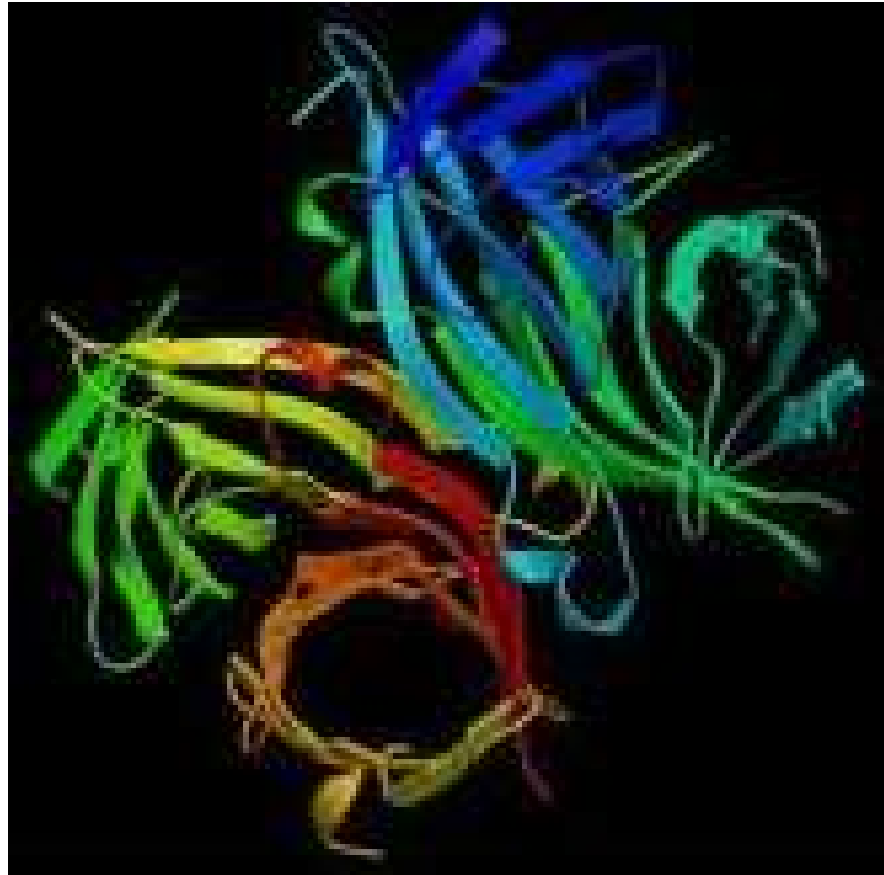
| | | |
|-------------|---------------|------------------|
| TRIS | 50 mM | ELUIZIONE |
| NaCl | 500 mM | |
| EDTA | 5 mM | |
| Benzamidina | 10 mM | pH 7.5 |

ESEMPIO DI CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

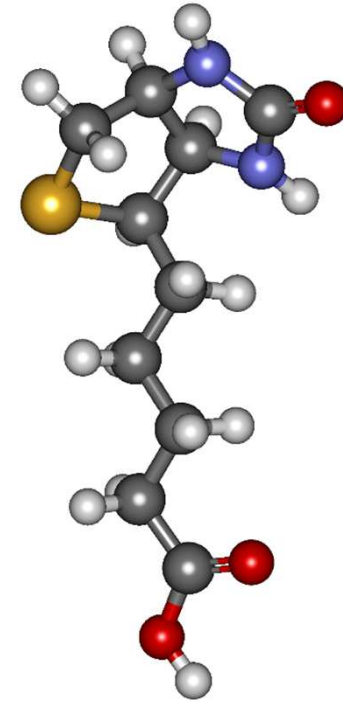
Scambiatore di anioni forte:
ammine quaternarie



STREPTAVIDINA E BIOTINA

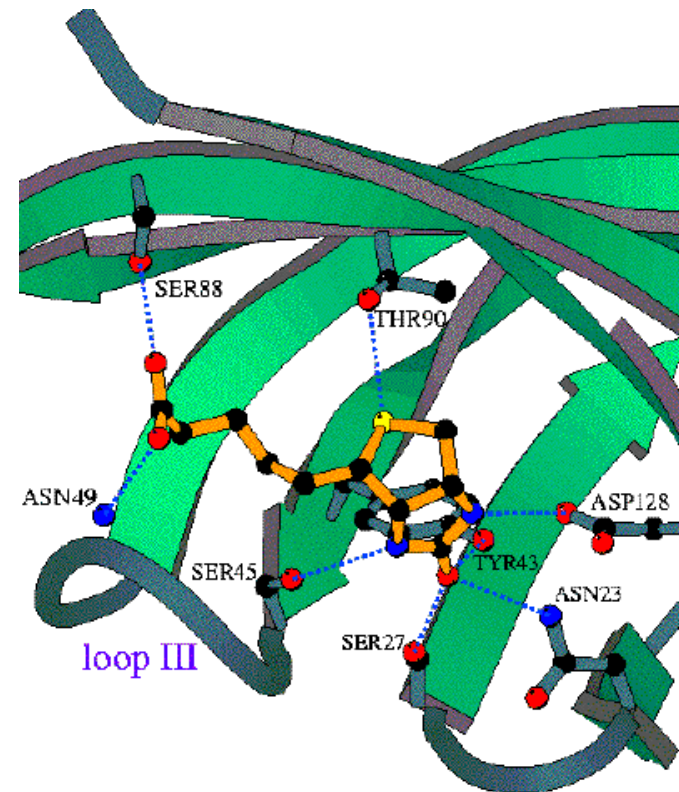
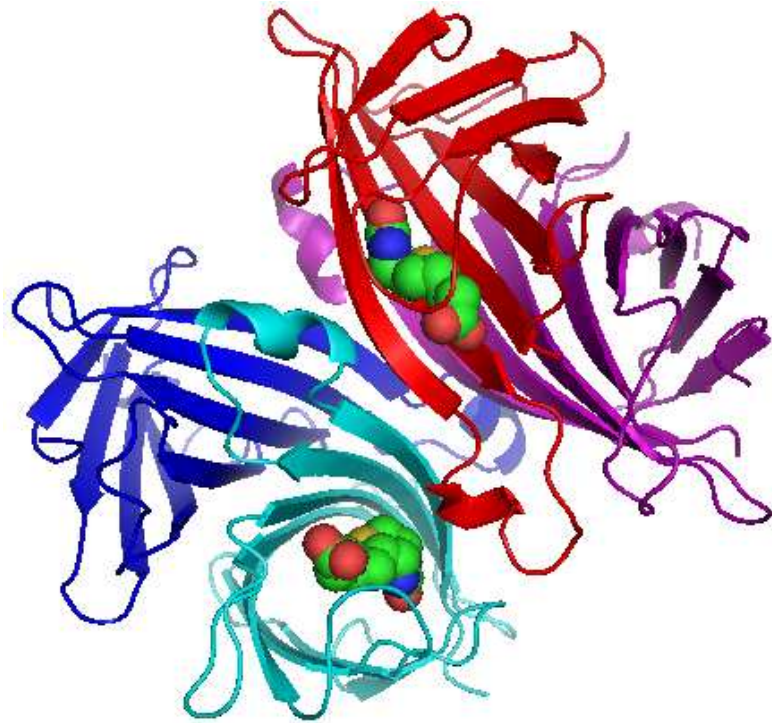


La STREPTAVIDINA è una proteina (MW 60 Kd) isolata dal batterio *Streptomyces avidinii*.



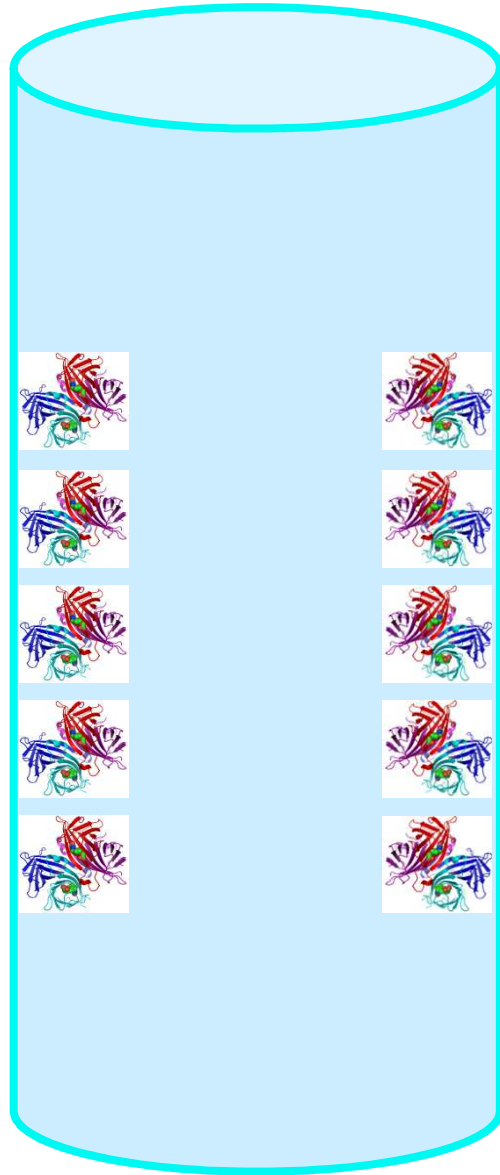
La BIOTINA è una vitamina idrosolubile.

STREPTAVIDINA E BIOTINA

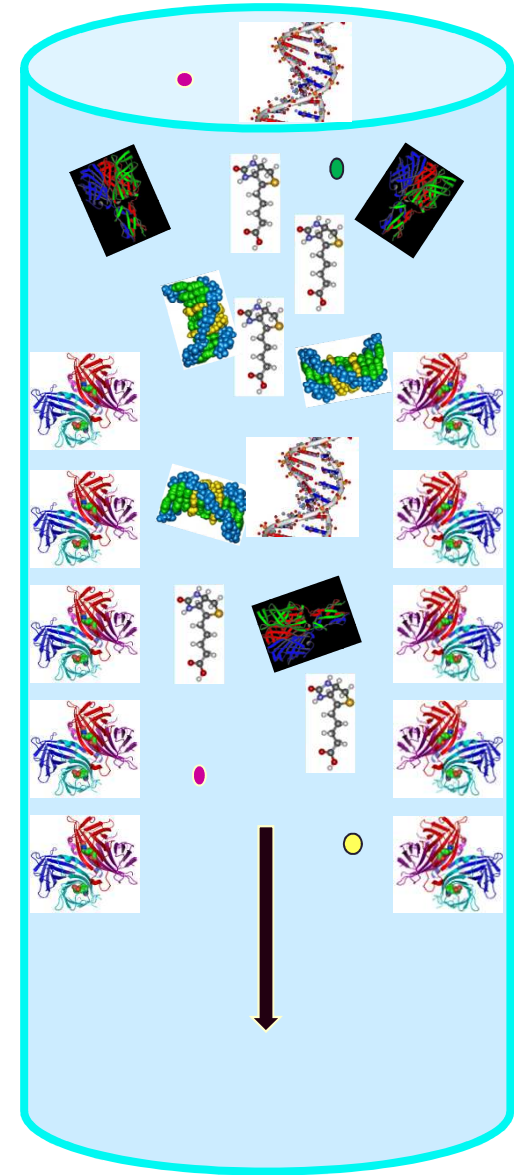


La streptavidina possiede 4 siti di legame ad alta affinità per la biotina.

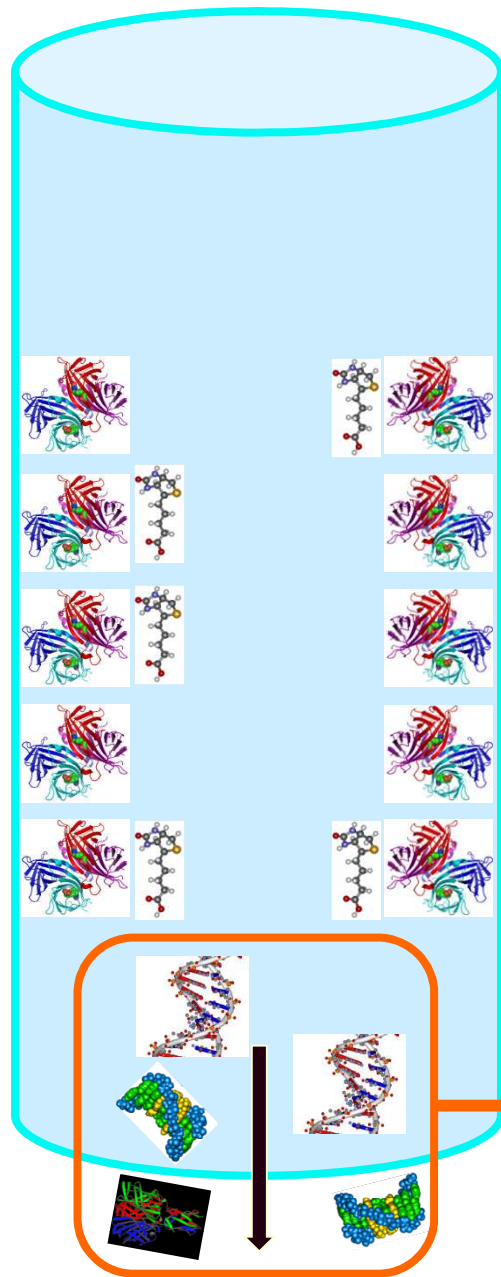
CROMATOGRAFIA PER AFFINITA'



Miscela campione
insieme alla FM



CROMATOGRAFIA PER AFFINITA'

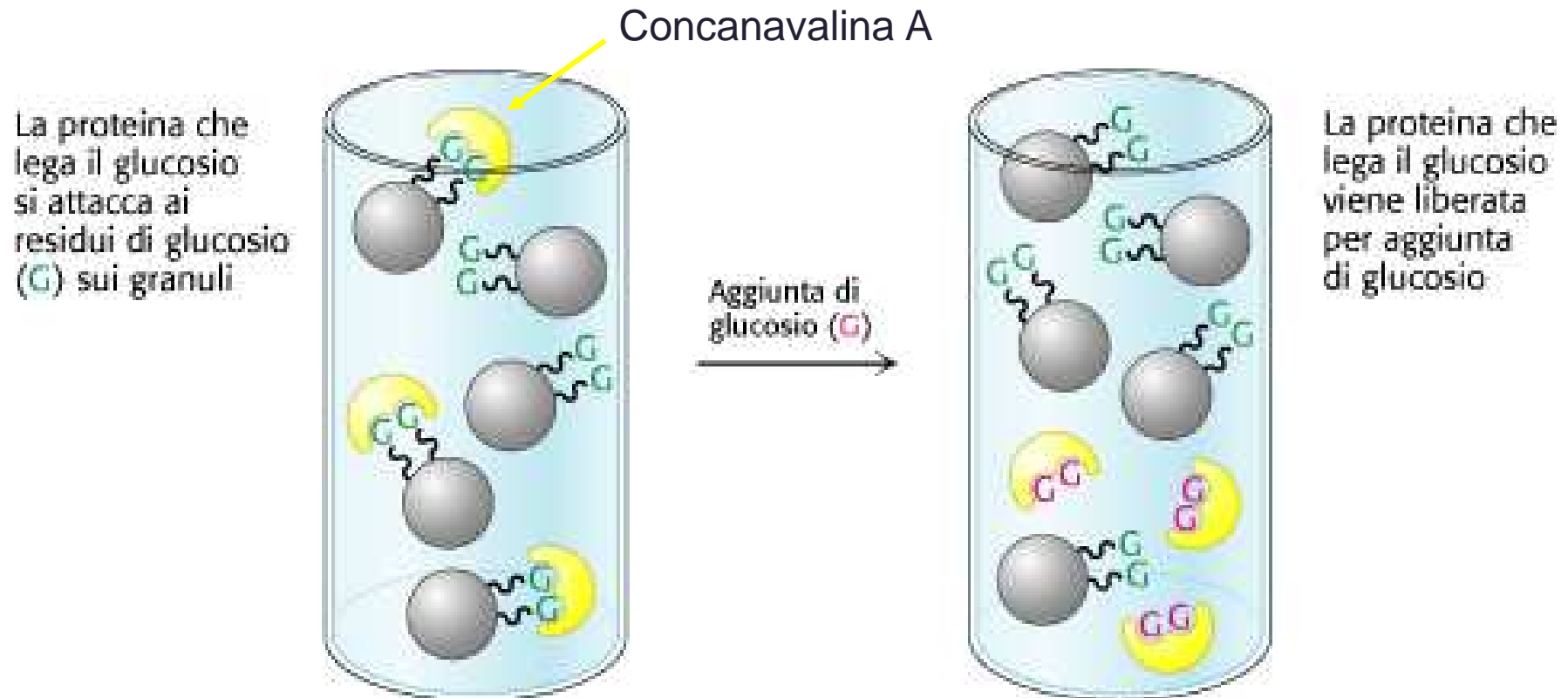


Recupero della molecola di interesse per alterazione delle **condizioni di legame.**

(pH, T, forza ionica....)

Molecole che non si legano

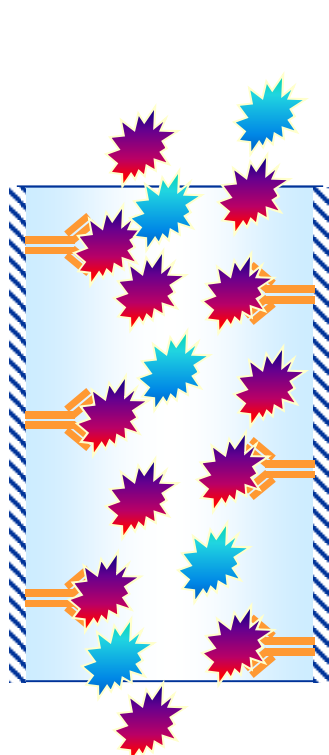
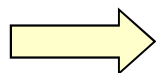
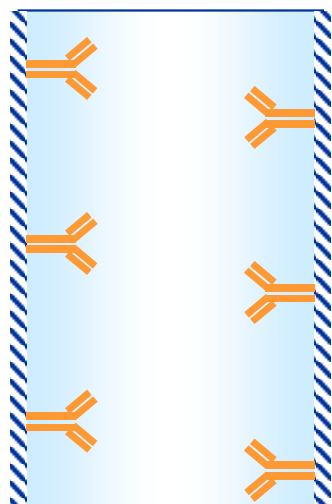
CROMATOGRAFIA PER AFFINITA'



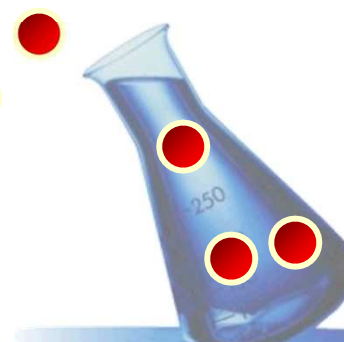
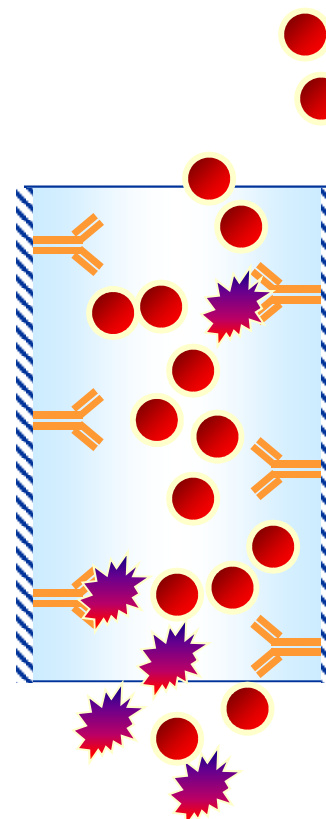
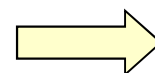
Proprietà sfruttata:
**AFFINITA' PER
ALCUNI GRUPPI
CHIMICI.**

- Legare covalentemente un composto ad un supporto solido.
- Addizionare la miscela.
- **Lavare** con tampone.
- Eluire la molecola desiderata con una elevata concentrazione di composto **in forma solubile.**

CROMATOGRAFIA PER IMMUNOAFFINITA'



Vengono
utilizzati
**ANTICORPI
SPECIFICI**



Colonna
cromatografica



Anticorpo
anti-proteina



Molecola di interesse



Altre molecole

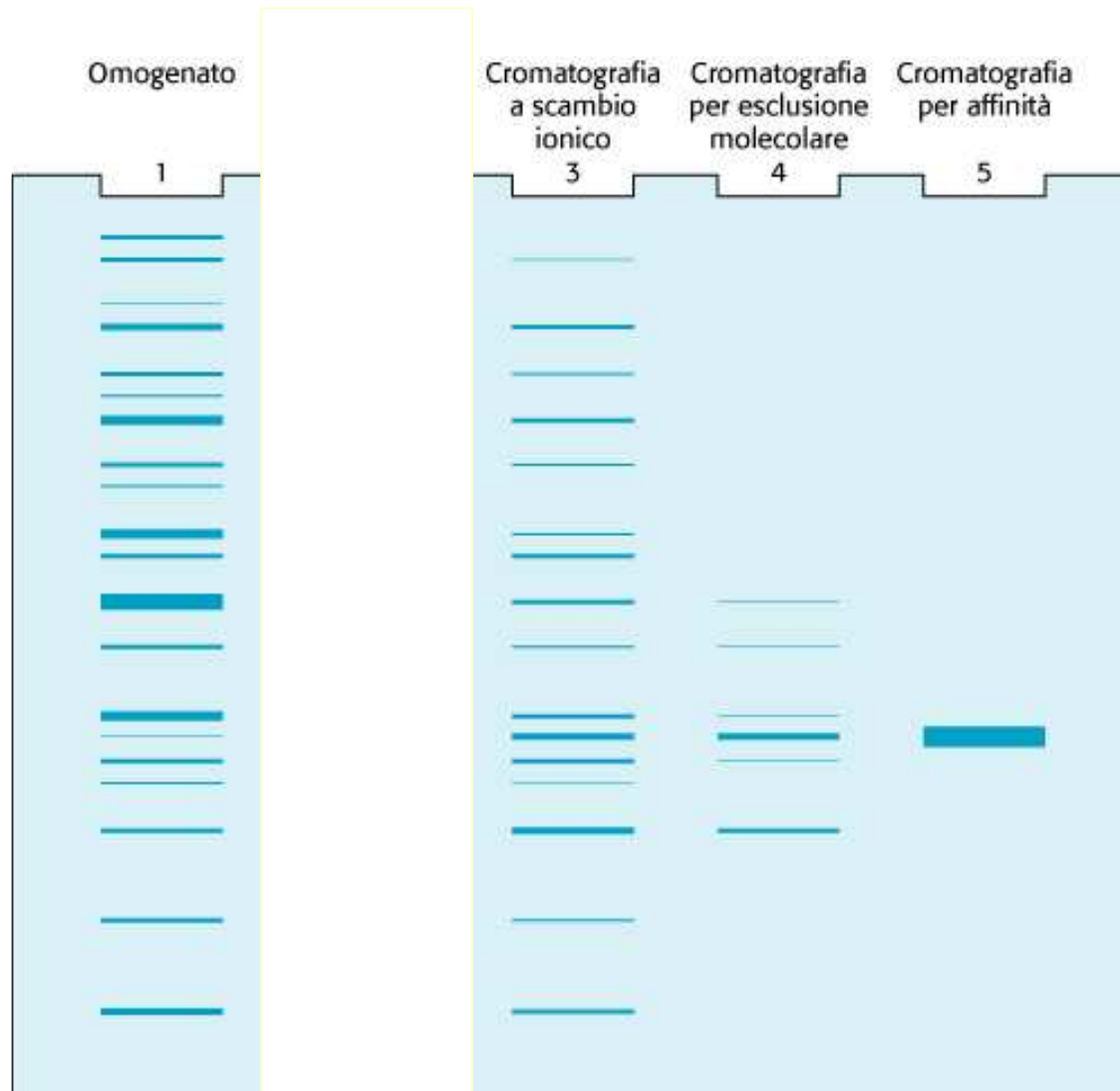


Eluente

CONFRONTO FRA TECNICHE DI SEPARAZIONE

Campione di partenza: la cellula.

Distruggendo la membrana cellulare si ottiene l'omogenato.



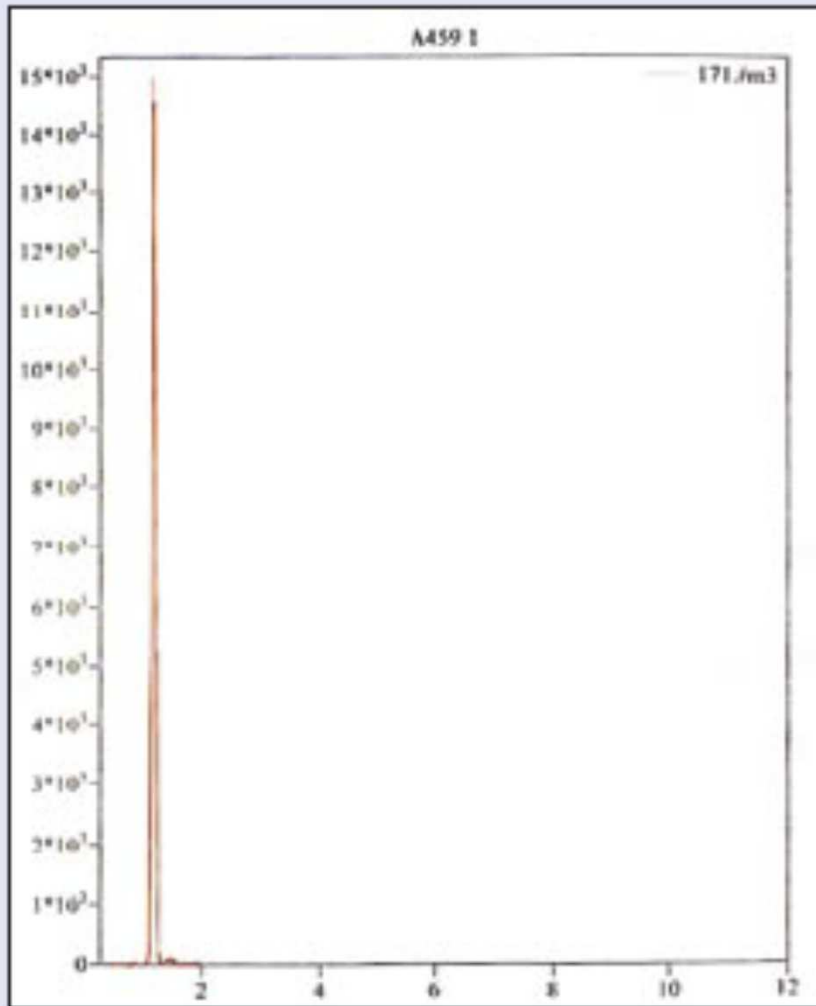
SDS-PAGE

Ogni pozzetto è stato caricato con **50 ug** di campione.

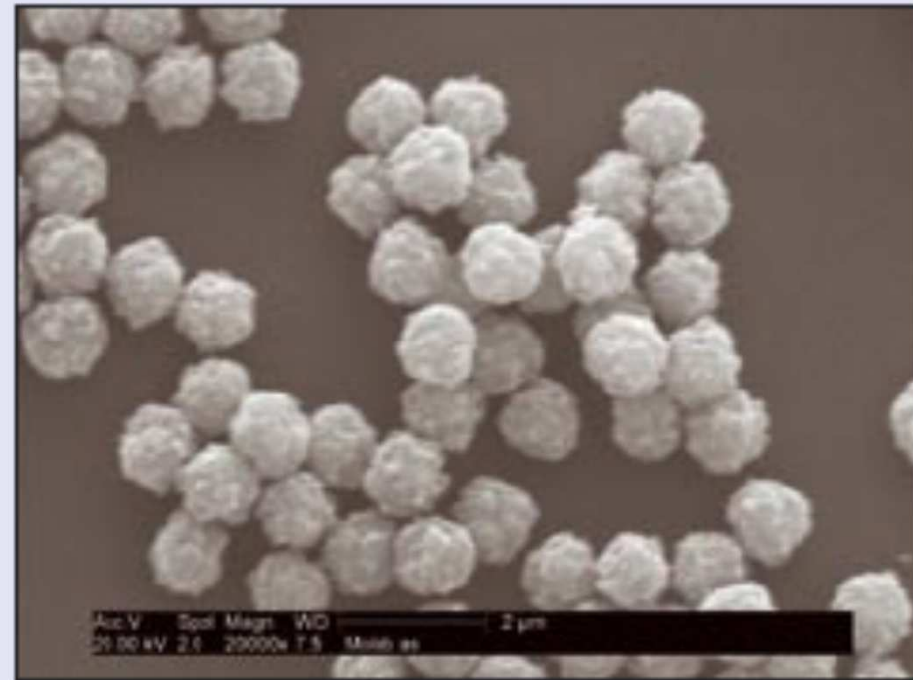
**Alternativa
per
purificare**

Isolamento di molecole e cellule

Biglie magnetiche



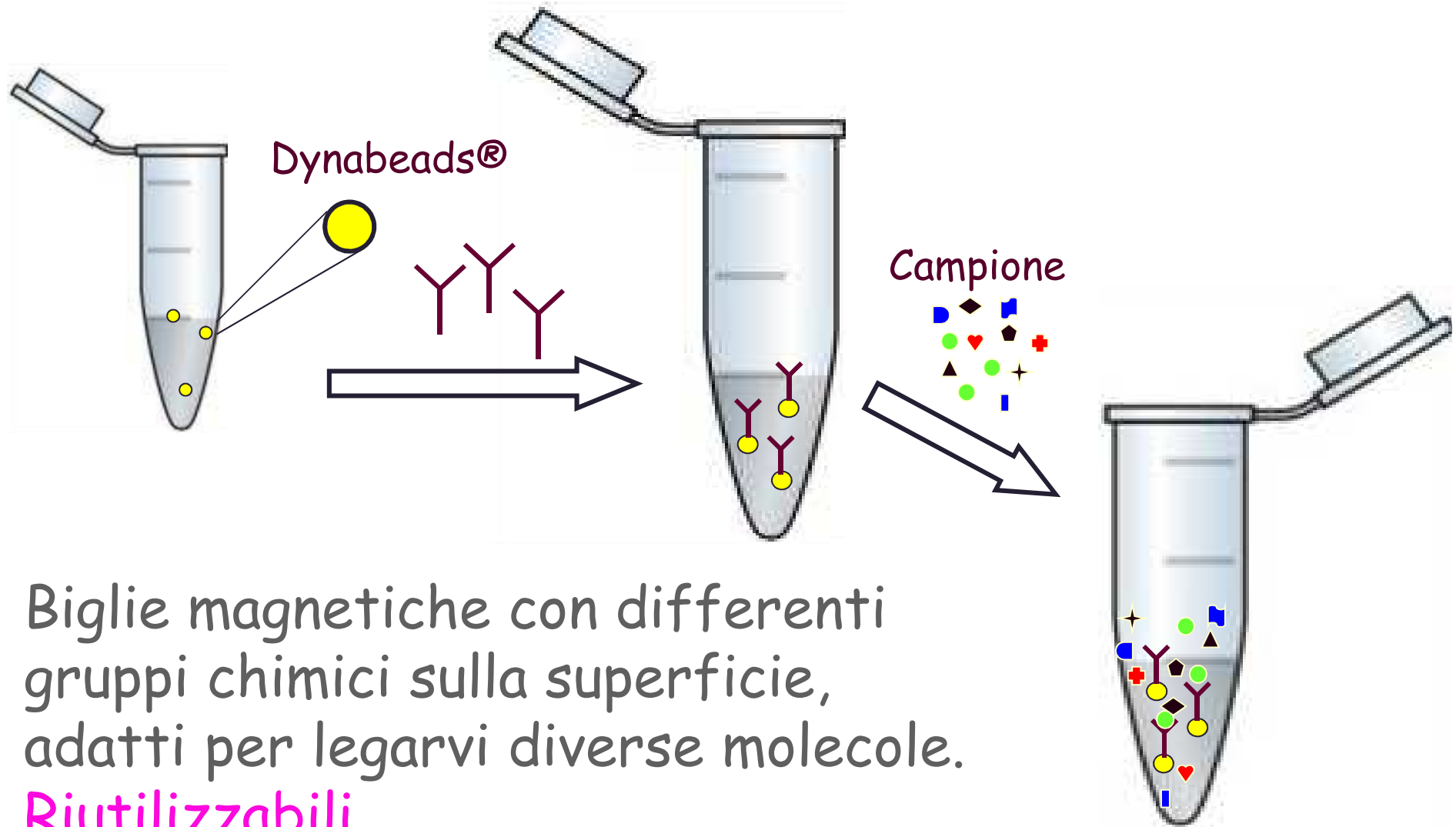
Dynabeads® MyOne™ size distribution.



Dynabeads® MyOne™ (SEM picture).

Dynabeads® are uniform, monodisperse and superparamagnetic particles. Constant iron content give a strong and even pull to the magnet.

Isolamento di molecole



Biglie magnetiche con differenti gruppi chimici sulla superficie, adatti per legarvi diverse molecole.
Riutilizzabili.

Isolamento di molecole

- Separazione estremamente **gentile** che previene la denaturazione del campione proteico.

- Permette di separare
Anche **complessi** integri.

- Usata per **deplezione** di un composto da un campione.



Isolamento di molecole



Automated protocols for high throughput screening are available for KingFisher® 96 from Thermo Electron.

Automatizzabile!