

PURIFICAZIONE DI PROTEINE

PURIFICARE

Purificare significa ottenere “solamente” la nostra molecola di interesse (**isolarla**).

Purificare
una proteina
per:

- Determinarne la sequenza aminoacidica
- Studiarne la funzione
- Determinarne la struttura

Le proteine differiscono per :

- Dimensione e forma
- Carica
- Solubilità
- Attività biologica

PROPRIETÀ DELLE PROTEINE SFRUTTATE PER PURIFICARLE (1)

- la dimensione (PM) e forma
- il contenuto in aminoacidi acido o basici –
- la carica di una proteina è la somma delle cariche (+) e (-) ad un dato pH sulla superficie.
- il punto isoelettrico
- la distribuzione di carica (ci può essere una distribuzione non uniforme sulla superficie)
- solubilità (influenzata da pH, forza ionica)

PROPRIETÀ DELLE PROTEINE SFRUTTATE PER PURIFICARLE (2)

- densità ($\sim 1.4 \text{ g/cm}^3$)

lipoproteine < proteine < fosfoproteine

- idrofobicità (numero e distribuzione dei residui idrofobici)
- capacità a legare metalli o altre molecole
- capacità di associazione e dissociazione (reversibili)
- specificità di sequenza o di struttura (anticorpi)
- presenza di modifiche post-traduzionali
- altre proprietà (es. termolabilità)

Processi di separazione

Precipitazione

solfo d'ammonio

acetone

polietilenilammina (polimin P)

precipitazione isoelettrica

Ripartizione

polietilenglicole (PEG)

Cromatografia

scambio ionico

idrofobica

affinità

affinità per metallo immobilizzato

immunoaffinità

cromatofocusing

filtrazione su gel

Elettroforesi

gel elettroforesi (native)

gel elettroforesi denaturate-SDS

elettrofocusing

Centrifugazione Ultracentrifugazione

Proprietà sfruttate

solubilità

solubilità

solubilità, carica

solubilità, pI

coefficiente di ripartizione tra due fasi

carica, distribuzione di carica

idrofobicità

sito di legame per un ligando

legame con metallo

specifico sito antigenico

punto isoelettrico

forma, dimensione

carica, dimensione

dimensione

pI

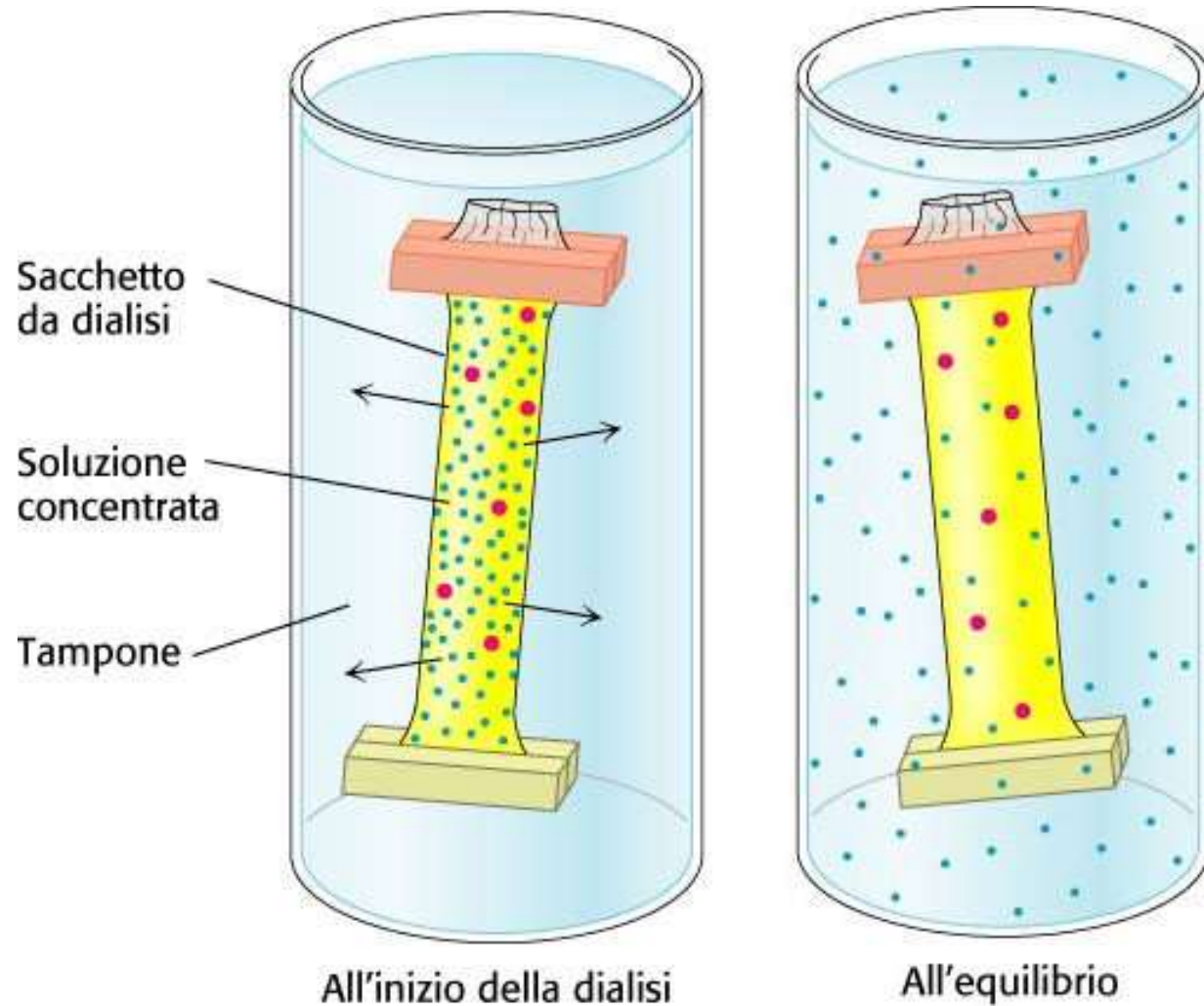
forma, dimensione, densità

forma, dimensione

DIALISI

Proprietà sfruttata:
DIMENSIONE
delle proteine.

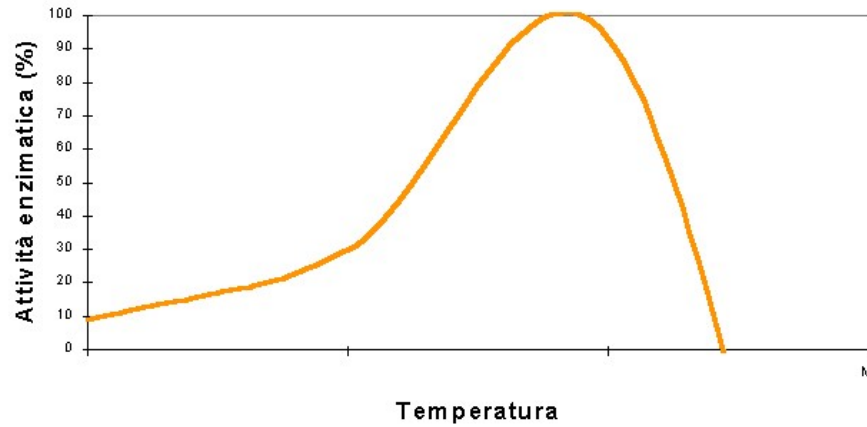
Vengono utilizzate
membrane
semi-permeabili
(es. cellulosa).



Per una dialisi esaustiva occorrono **diverse ore** ed è necessario sostituire periodicamente il tampone.

FRAZIONAMENTO PER DENATURAZIONE

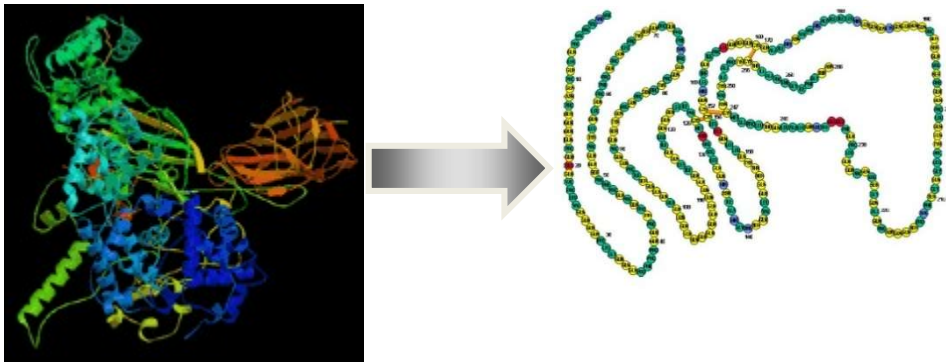
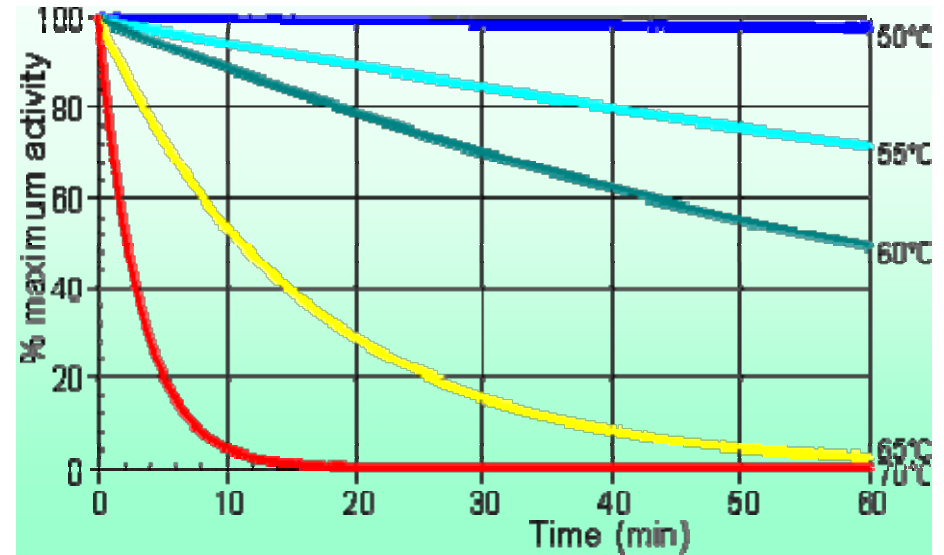
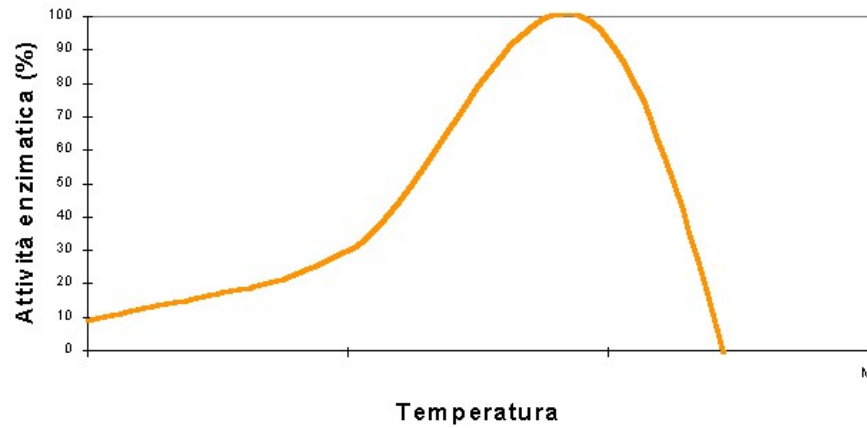
Influenza della temperatura sull'attività enzimatica (Kunze, 1999)



Proprietà sfruttata:
STABILITÀ delle proteine.

FRAZIONAMENTO PER DENATURAZIONE

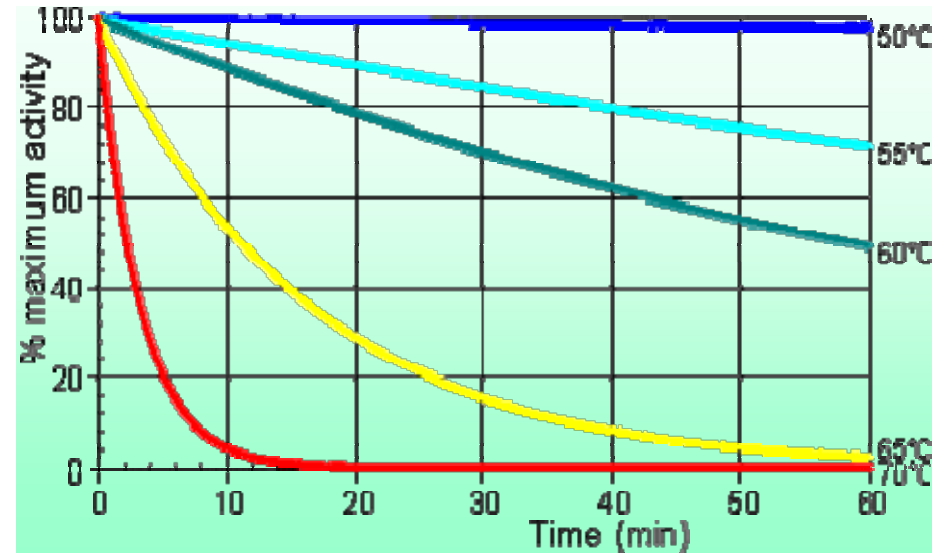
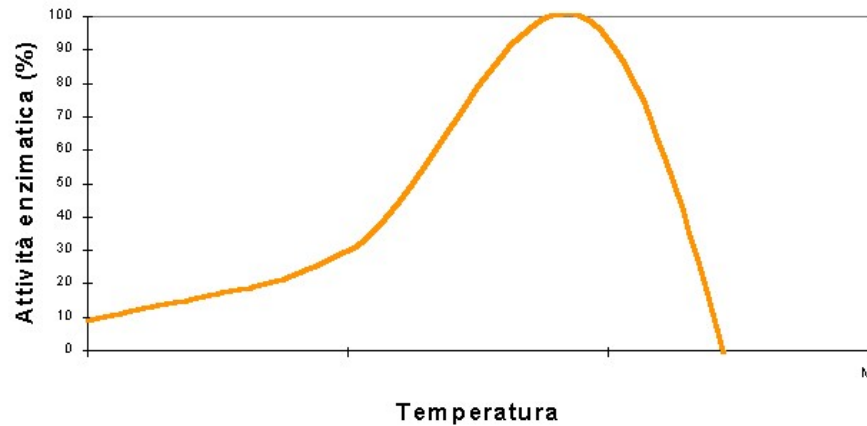
Influenza della temperatura sull'attività enzimatica (Kunze, 1999)



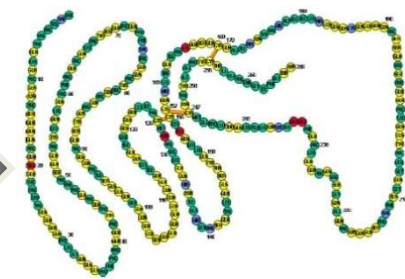
Proprietà sfruttata:
STABILITÀ delle proteine.

FRAZIONAMENTO PER DENATURAZIONE

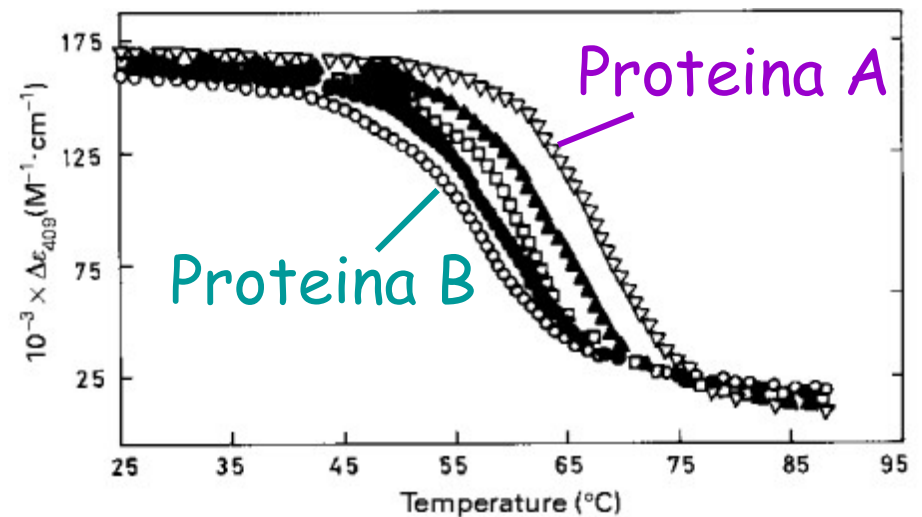
Influenza della temperatura sull'attività enzimatica (Kunze, 1999)



Differente sensibilità delle proteine al calore

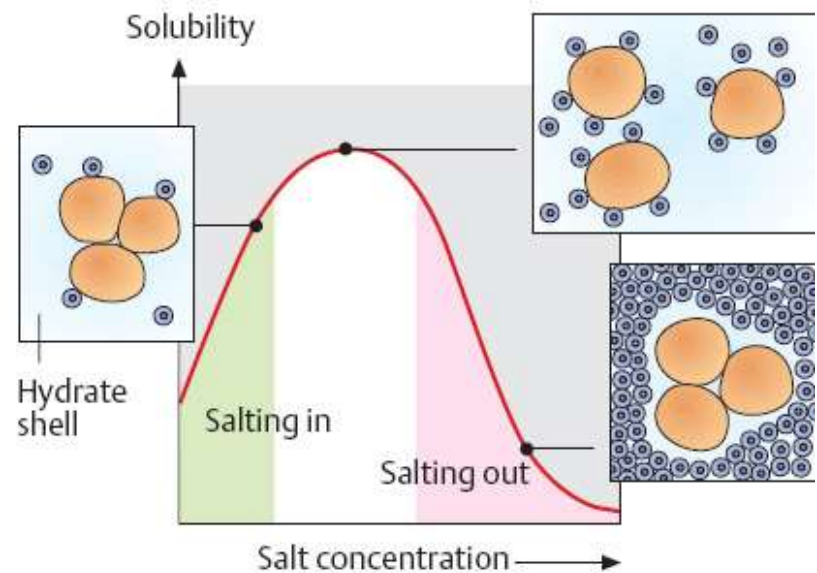


Proprietà sfruttata:
STABILITÀ delle proteine.



FRAZIONAMENTO SALINO o SALTING OUT

Proprietà sfruttata:
SOLUBILITÀ
delle proteine.



Solfato
d'ammonio

Soluzione di
fibrinogeno
ed albumina



Precipitazione

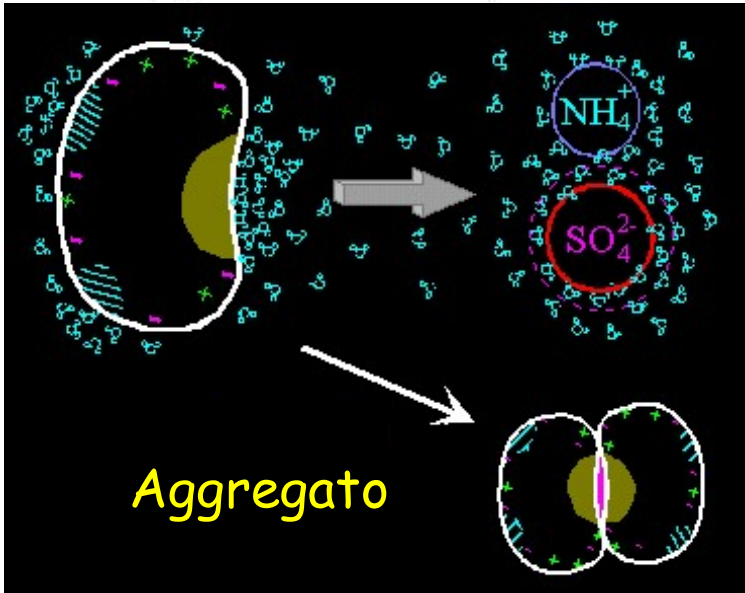


Albumina solubile

ppt fibrinogeno

FRAZIONAMENTO SALINO o SALTING OUT

Proprietà sfruttata:
SOLUBILITÀ
delle proteine.



Solfato
d'ammonio



Come si elimina il sale in eccesso?

Soluzione di
fibrinogeno
ed albumina



Precipitazione



Albumina solubile

ppt fibrinogeno

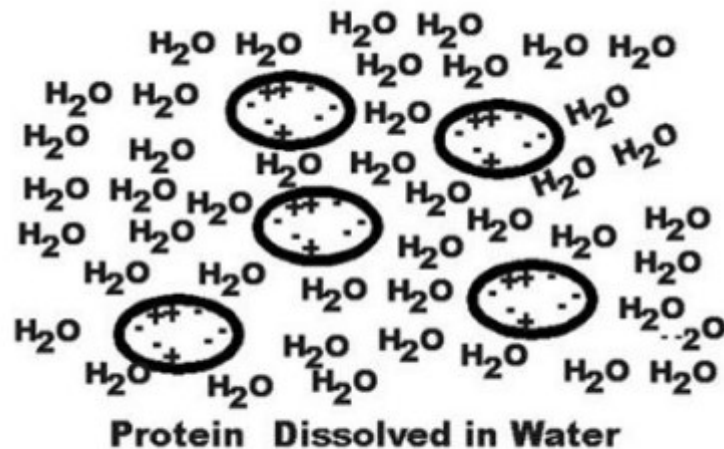


FRAZIONAMENTO SALINO o SALTING OUT

Proprietà sfruttata:

SOLUBILITÀ

delle proteine.



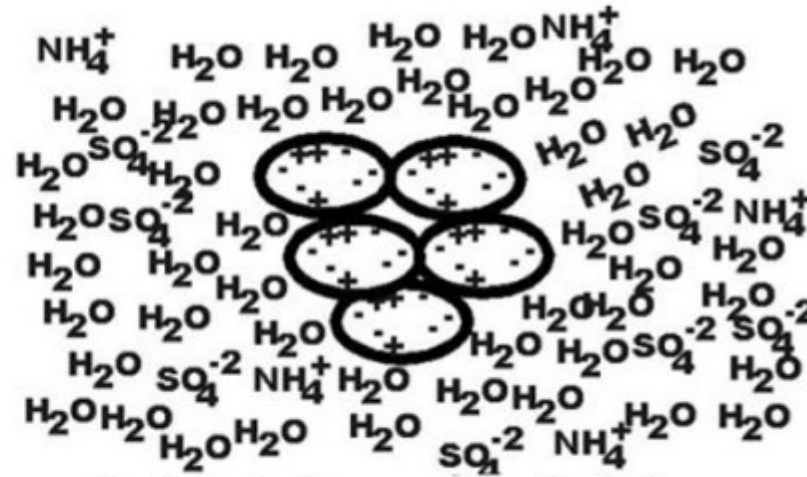
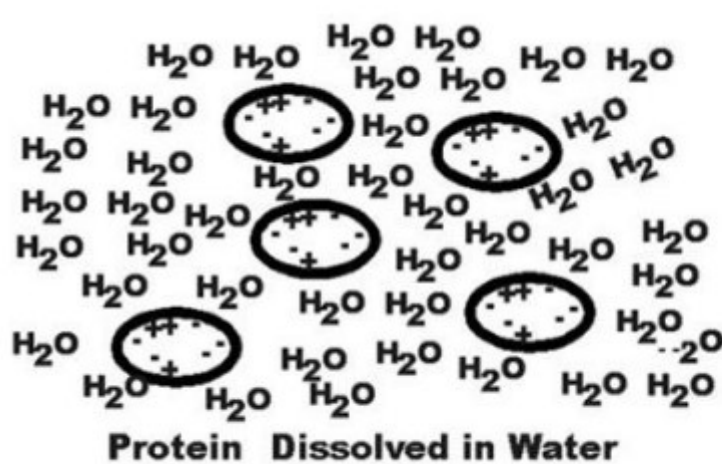
L'eccesso di cariche, dopo aver saturato la proteina, la destabilizzano
entrando in **competizione** con essa **per il solvente**

FRAZIONAMENTO SALINO o SALTING OUT

Proprietà sfruttata:

SOLUBILITÀ

delle proteine.



Precipitazione!!!

L'eccesso di cariche, dopo aver saturato la proteina, la destabilizzano
entrando in **competizione** con essa **per il solvente**

Salting-in _ & _out

Solubility of horse carbon monoxide hemoglobin in different salt solutions. The addition of a moderate amount of salt (salting in) is required to solubilize this protein. At high concentrations, certain salts compete more favorably for solvent, decreasing the solubility of the protein and thus leading to its precipitation (salting out). (Source: E. J. Cohn and J. T. Edsall, *Proteins, Amino Acids, and Peptides as Ions and Dipolar Ions*. Copyright ©1942, Reinhold, New York, N.Y.)

In condizioni normali le proteine si aggregano per attrazione tra le cariche di superficie e precipitano. **Quando viene aggiunto il sale gli ioni da esso derivanti interagiscono con le cariche elettriche di superficie delle proteine neutralizzandole e impedendo la formazione di aggregati.**

Al contrario aumentando la concentrazione di sale, e quindi facendo aumentare la forza ionica in soluzione, si ottiene un eccesso di cariche che, dopo aver saturato la proteina, la destabilizzano **entrando in competizione con essa per il solvente.**

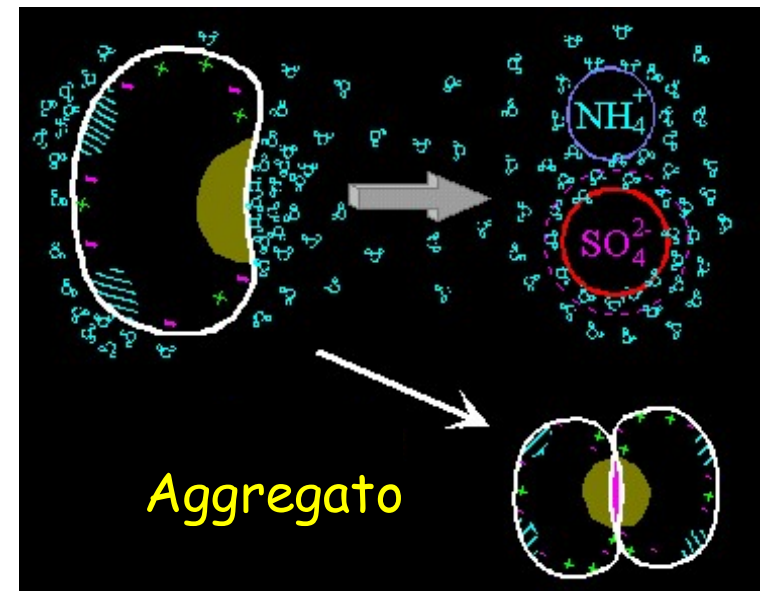
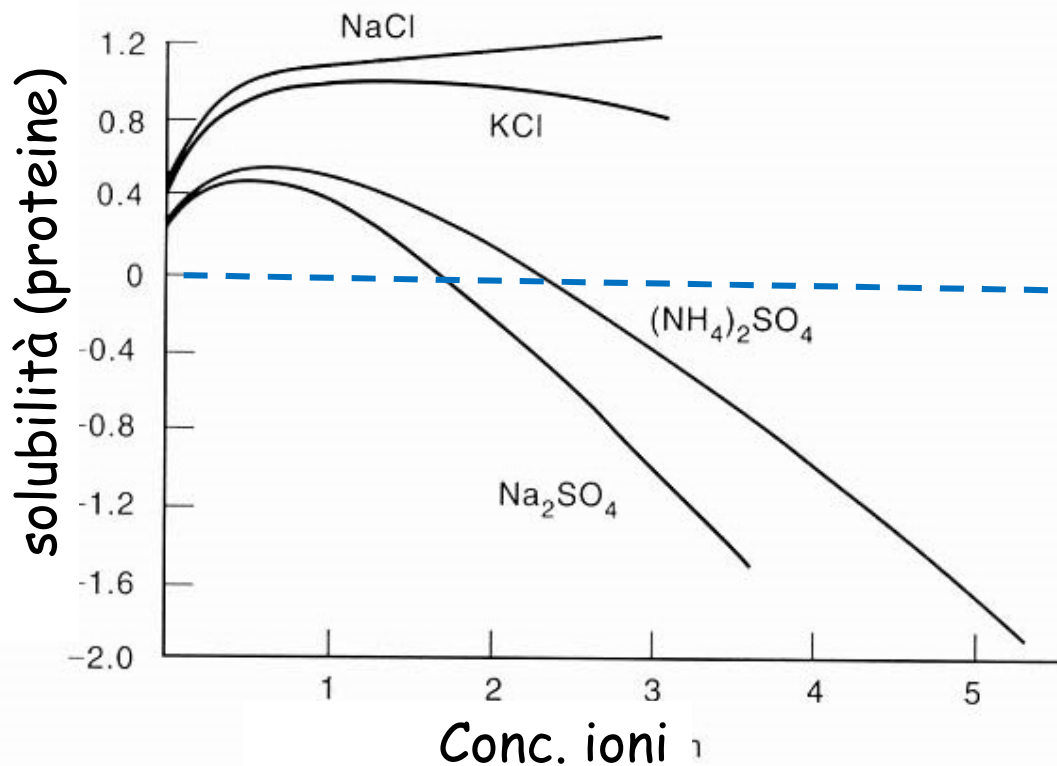
Poiché le cariche di superficie delle varie specie di proteine sono differenti, ognuna di esse ha un proprio punto di precipitazione che corrisponde ad una determinata **concentrazione di sale**. In questo modo, usando una concentrazione di sale ad hoc, possiamo isolare una o un gruppo di proteine da una miscela; **il sale viene poi eliminato per dialisi.**

FRAZIONAMENTO SALINO o SALTING OUT

Proprietà sfruttata:
SOLUBILITA'
delle proteine.

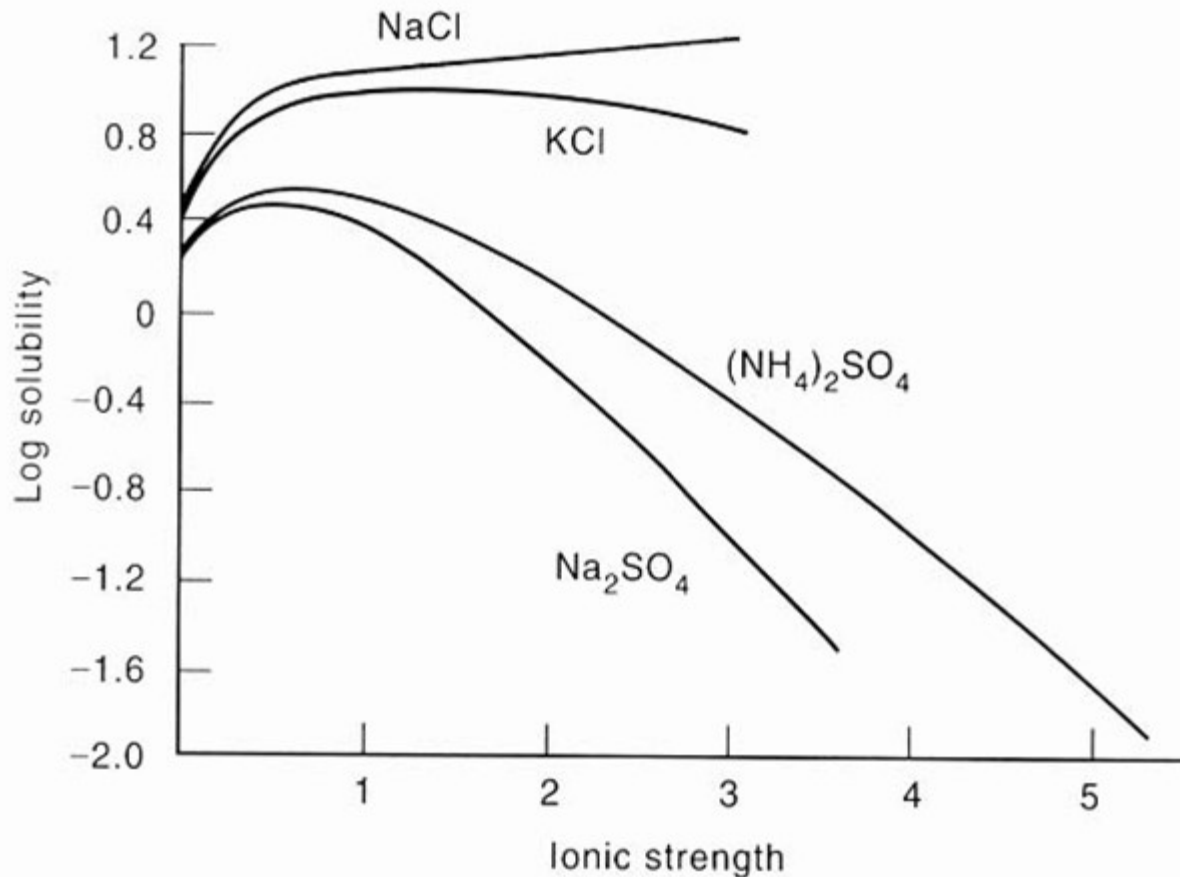
Le proteine sono solitamente solubili in H_2O ; tale solubilità è anche in funzione della forza ionica della soluzione.

Emoglobina



Salting-in & out

Solubility of horse carbon monoxide hemoglobin in different salt solutions. The addition of a moderate amount of salt (salting in) is required to solubilize this protein. At high concentrations, certain salts compete more favorably for solvent, decreasing the solubility of the protein and thus leading to its precipitation (salting out). (Source: E. J. Cohn and J. T. Edsall, *Proteins, Amino Acids, and Peptides as Ions and Dipolar Ions*. Copyright ©1942, Reinhold, New York, N.Y.)

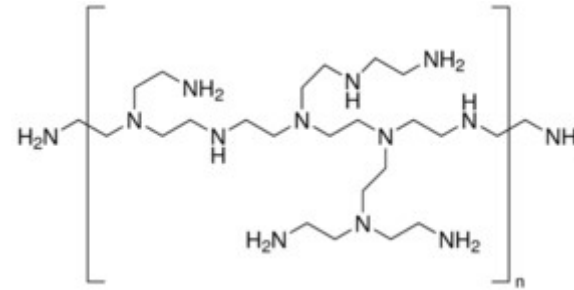


In condizioni normali le proteine si aggregano per attrazione tra le cariche di superficie e precipitano. Quando viene aggiunto il sale gli ioni da esso derivanti interagiscono con le cariche elettriche di superficie delle proteine neutralizzandole e impedendo la formazione di aggregati.

Al contrario aumentando la concentrazione di sale, e quindi facendo aumentare la forza ionica in soluzione, si ottiene un eccesso di cariche che, dopo aver saturato la proteina, la destabilizzano entrando in competizione con essa per il solvente.

Poichè le cariche di superficie delle varie specie di proteine sono differenti, ognuna di esse ha un suo punto di precipitazione che corrisponde ad una determinata concentrazione di sale. In questo modo usando una concentrazione di sale ad hoc possiamo isolare una o un gruppo di proteine da una miscela; il sale viene poi eliminato per dialisi.

Polyethyleneimine



average Mw ~750,000, 50 wt. % in H₂O

Add PEI solution slowly with mixing to the desired final concentration, centrifuge, and collect the supernatant or pellet as desired.

When added to a lysate, the solution rapidly becomes milky and opaque. Precipitation is rapid, but the suspension can be kept on ice for a few hours.

Polyethyleneimine

Medium ionic strength

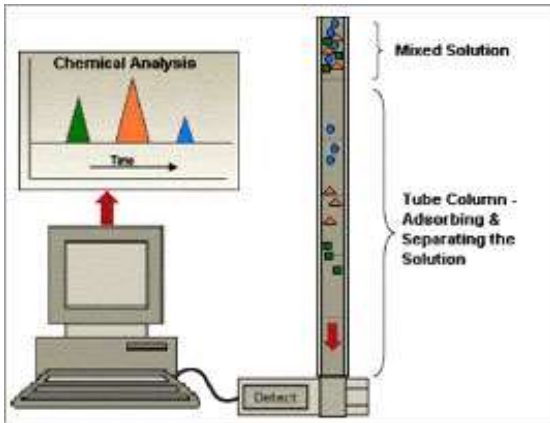
At ionic strength between 0.2-1M NaCl, nucleic acids and some proteins will be precipitated. The desired protein remains in the supernatant.

Low ionic strength

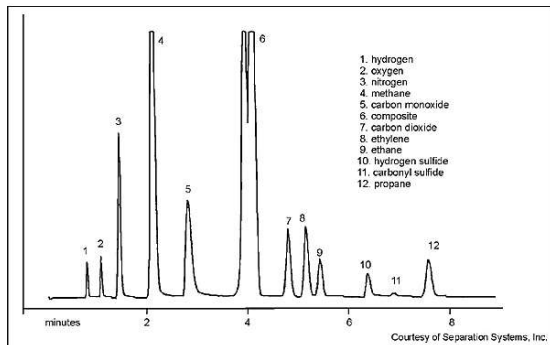
Between 0.1-0.2M NaCl, many nucleic acid binding proteins remain bound to the nucleic acid, which is precipitated by PEI. The desired protein is recovered from the pellet at higher ionic strength

Removal of PEI

The PEI that remains in solution can be a problem. A protein of interest can sometimes be removed from the PEI by [ammonium sulfate precipitation](#), or PEI can be removed from the solution by passing it over a negatively charged chromatography medium, such as [phosphocellulose](#) or [CM-sepharose](#).



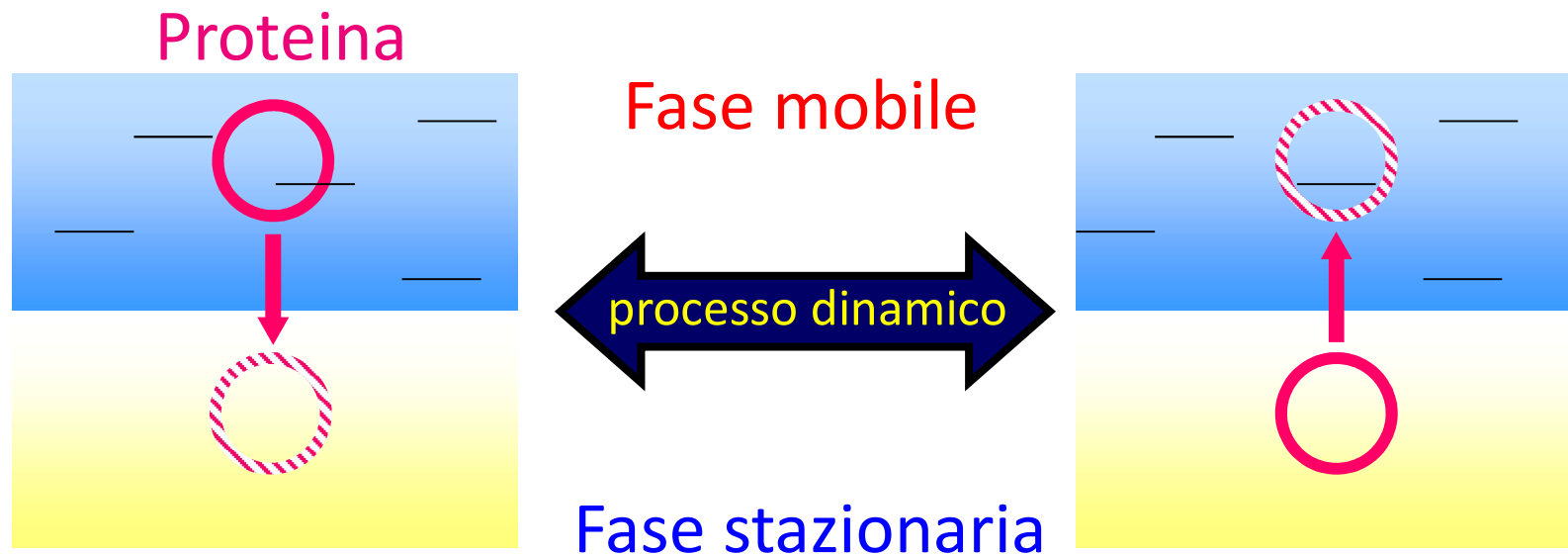
TECNICHE CROMATOGRAFICHE



PRINCIPIO DELLA CROMATOGRAFIA

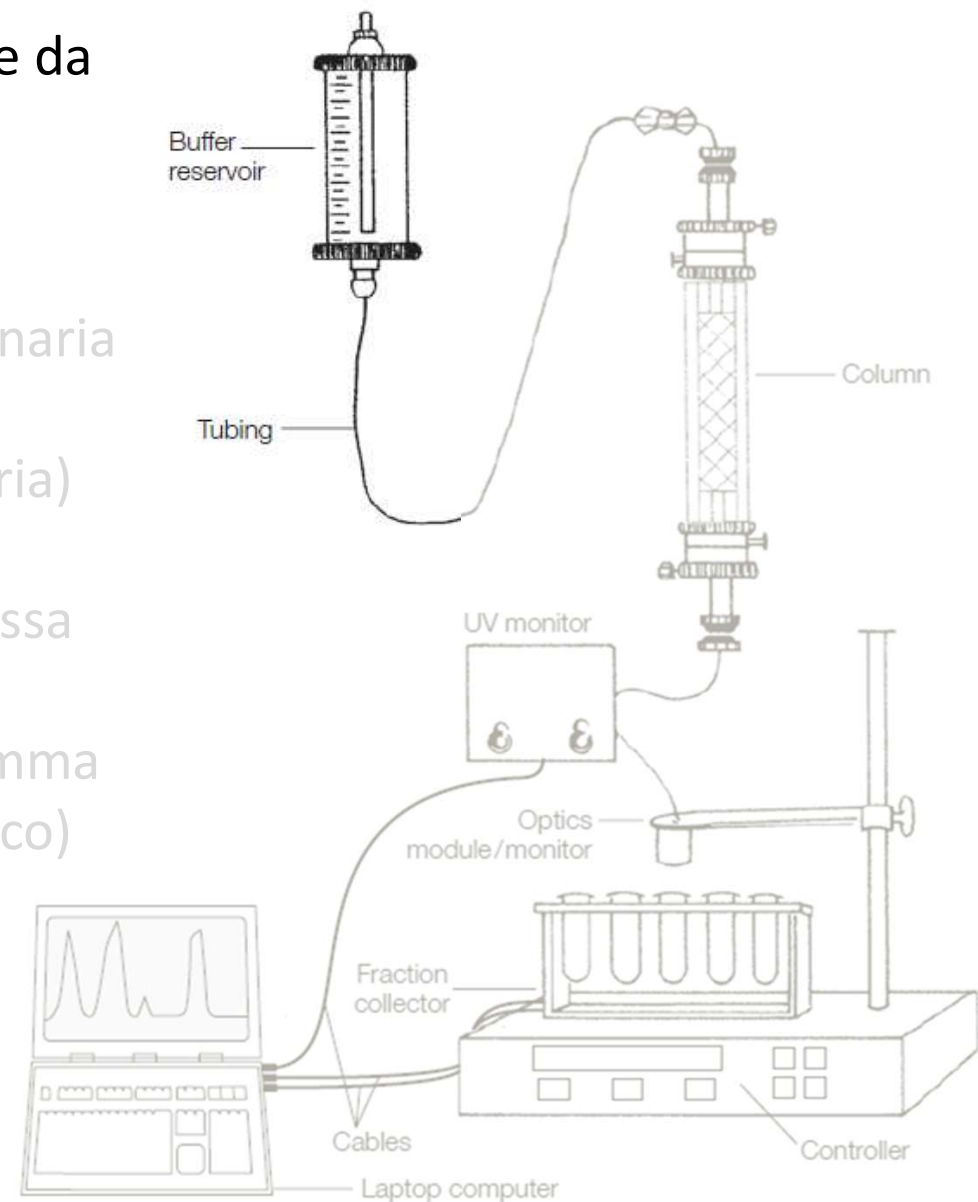
La cromatografia consiste nello sfruttare la diversa attitudine di ogni molecola o ione nel distribuirsi fra due fasi differenti.

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**.



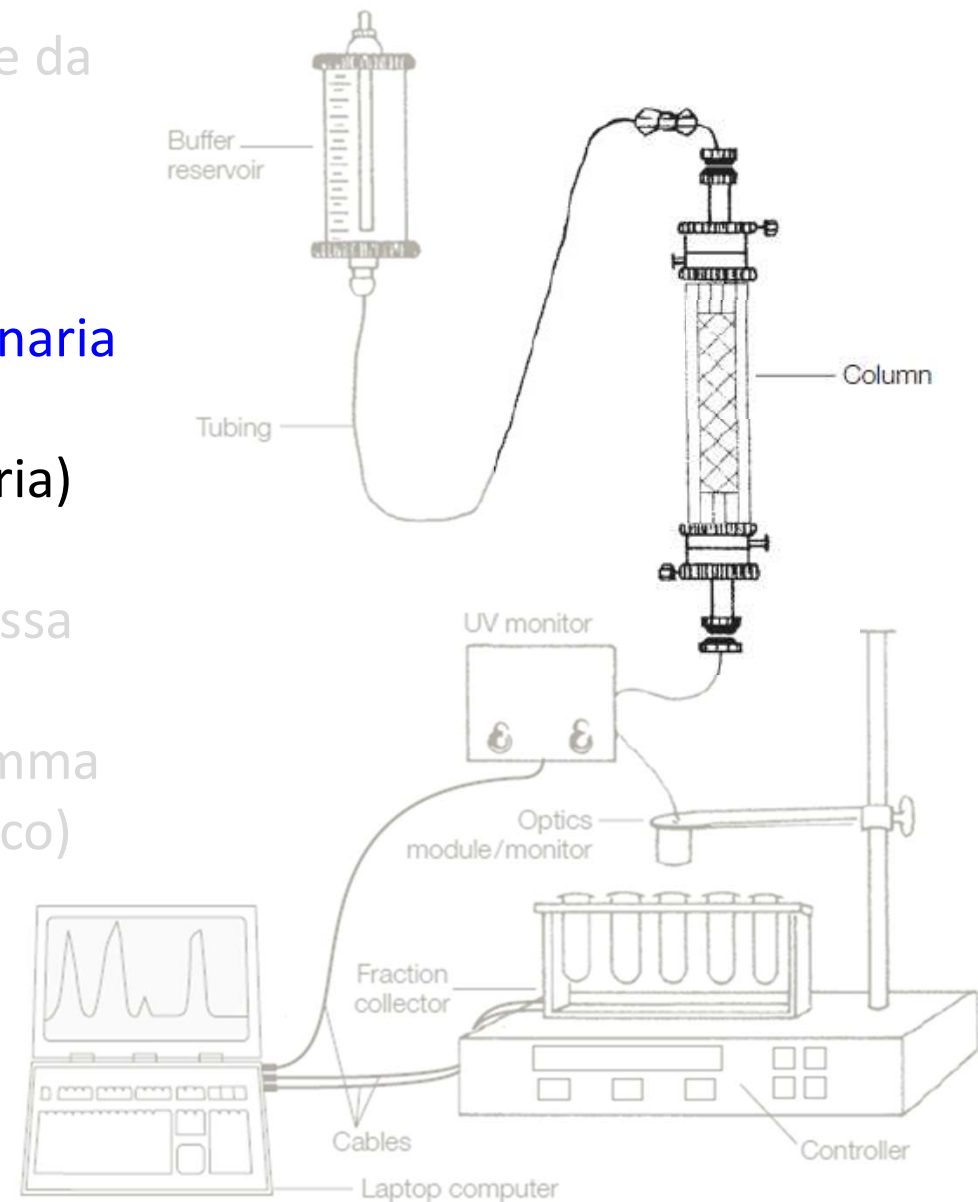
SCHEMA SISTEMA CROMATOGRAFICO SU COLONNA

- **Serbatoio** per il tampone (che funge da fase mobile); flusso per gravità o mediante pompe
- Colonna, che contiene la fase stazionaria ed è dotata di un dispositivo di uscita (fuoriuscita eluato, non fase stazionaria)
- Rivelatore (es. UV) attraverso cui passa l'eluato in uscita dalla colonna
Segnale registrato come cromatogramma (ogni composto identificato come picco)
- Raccoglitore di frazioni collegato al rivelatore, raccoglie un volume prefissato in più provette



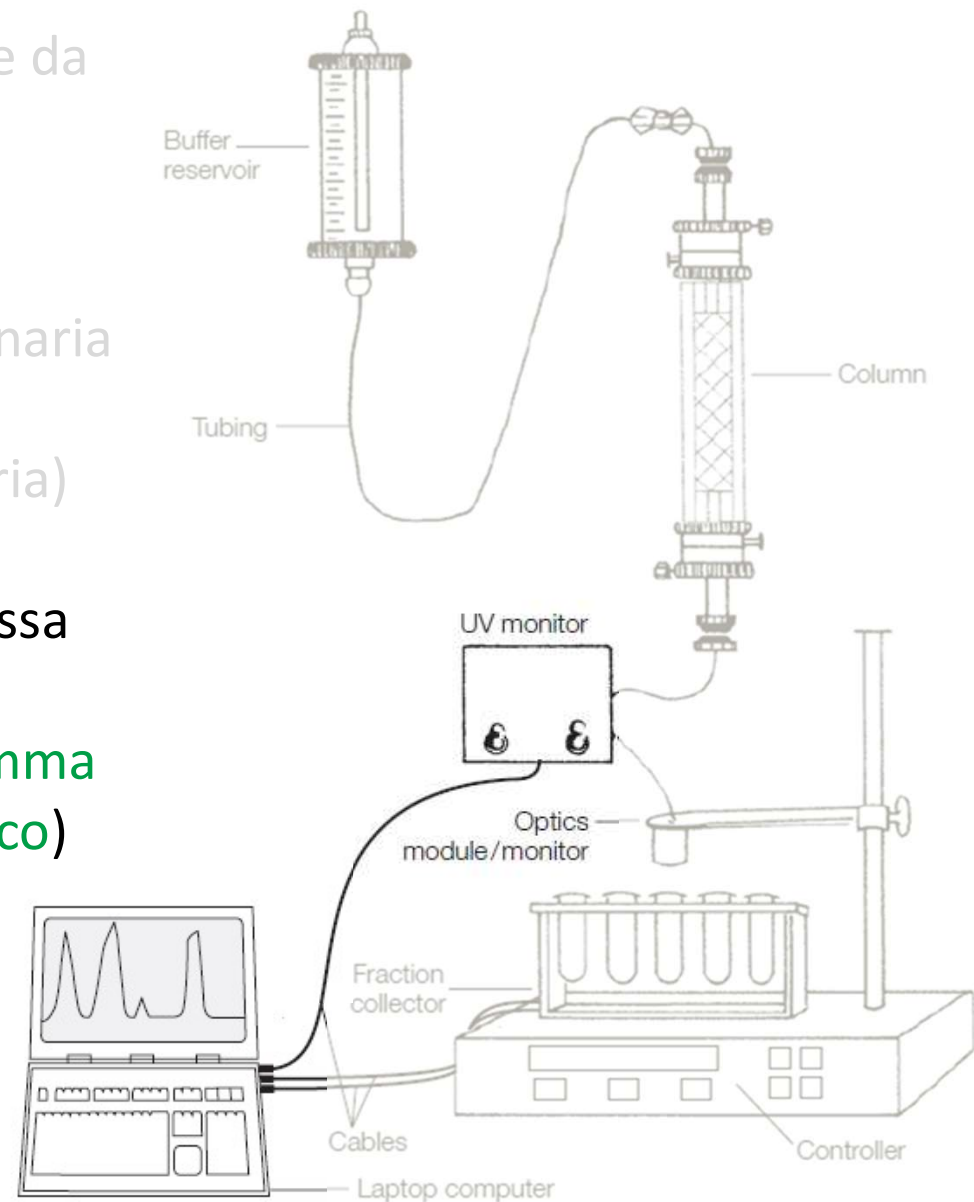
SCHEMA SISTEMA CROMATOGRAFICO SU COLONNA

- Serbatoio per il tampone (che funge da fase mobile); flusso per gravità o mediante pompe
- **Colonna**, che contiene la **fase stazionaria** ed è dotata di un dispositivo di uscita (fuoriuscita eluato, non fase stazionaria)
- Rivelatore (es. UV) attraverso cui passa l'eluato in uscita dalla colonna
Segnale registrato come cromatogramma (ogni composto identificato come picco)
- Raccoglitore di frazioni collegato al rivelatore, raccoglie un volume prefissato in più provette



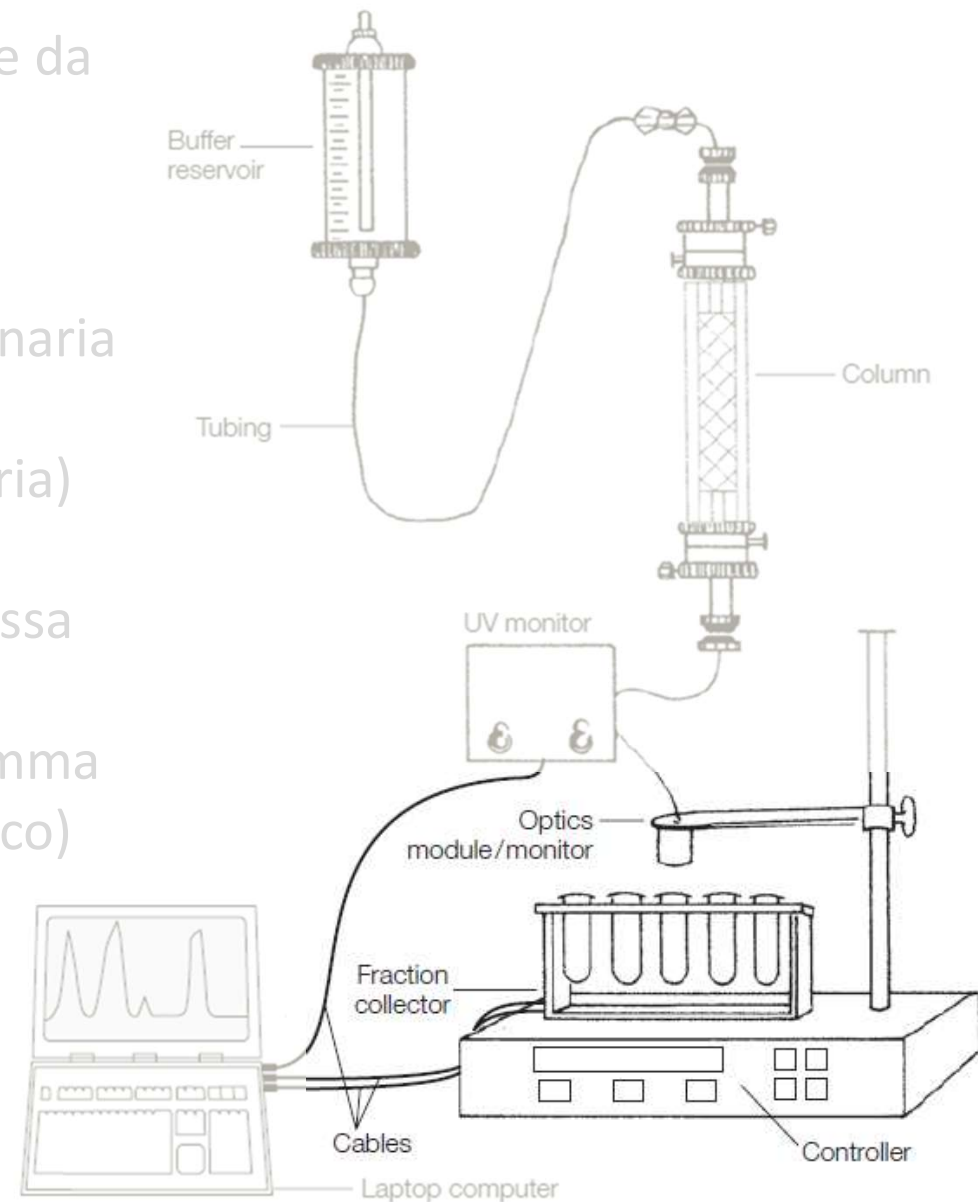
SCHEMA SISTEMA CROMATOGRAFICO SU COLONNA

- Serbatoio per il tampone (che funge da fase mobile); flusso per gravità o mediante pompe
- Colonna, che contiene la fase stazionaria ed è dotata di un dispositivo di uscita (fuoriuscita eluato, non fase stazionaria)
- **Rivelatore** (es. UV) attraverso cui passa l'eluato in uscita dalla colonna
Segnale registrato come **cromatogramma** (ogni composto identificato come **picco**)
- Raccoglitore di frazioni collegato al rivelatore, raccoglie un volume prefissato in più provette



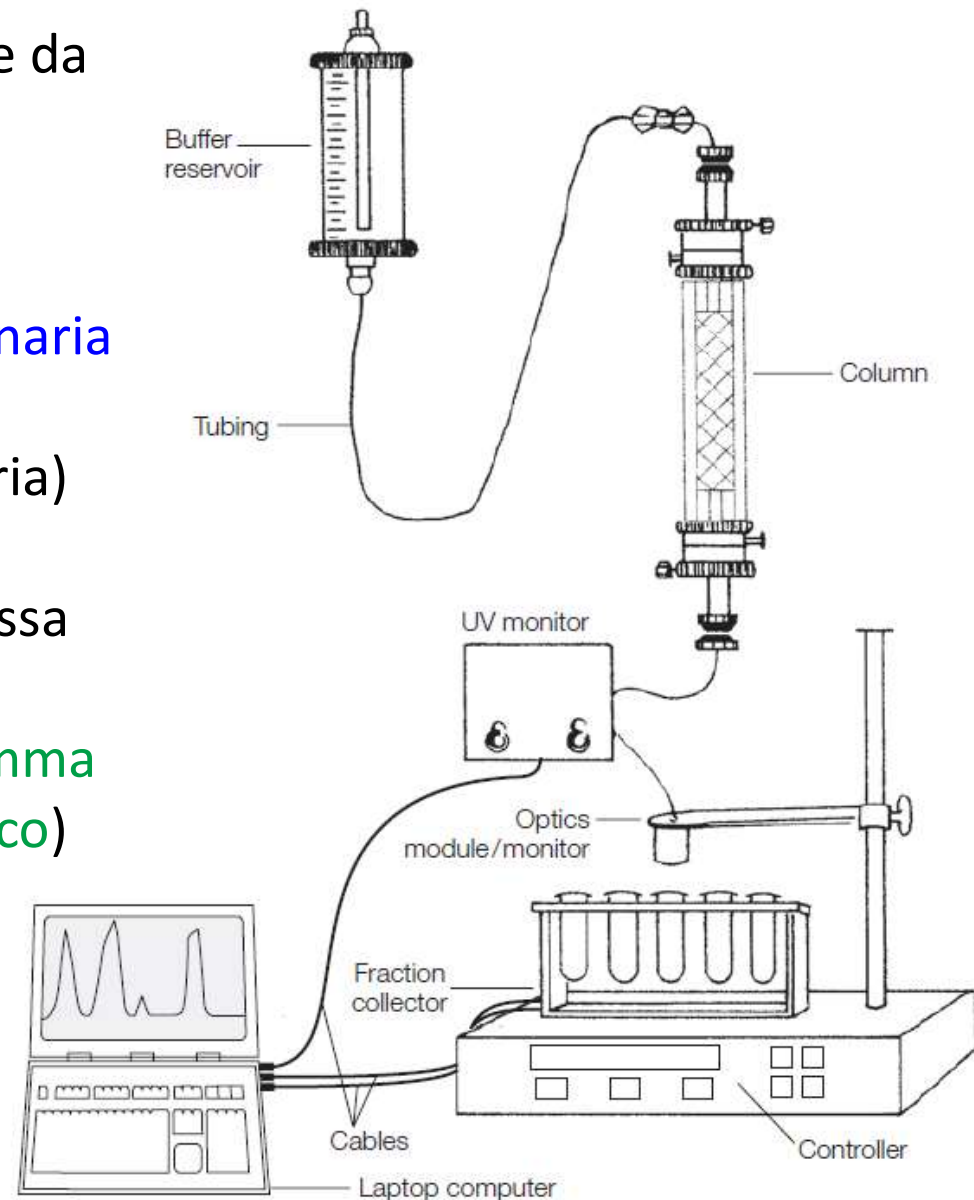
SCHEMA SISTEMA CROMATOGRAFICO SU COLONNA

- Serbatoio per il tampone (che funge da fase mobile); flusso per gravità o mediante pompe
- Colonna, che contiene la fase stazionaria ed è dotata di un dispositivo di uscita (fuoriuscita eluato, non fase stazionaria)
- Rivelatore (es. UV) attraverso cui passa l'eluato in uscita dalla colonna
Segnale registrato come cromatogramma (ogni composto identificato come picco)
- **Raccoglitore di frazioni** collegato al rivelatore, **raccoglie un volume prefissato** in più provette



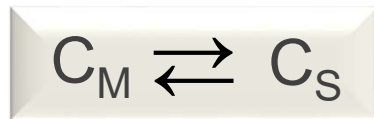
SCHEMA SISTEMA CROMATOGRAFICO SU COLONNA

- **Serbatoio** per il tampone (che funge da fase mobile); flusso per gravità o mediante pompe
- **Colonna**, che contiene la **fase stazionaria** ed è dotata di un dispositivo di uscita (fuoriuscita eluato, non fase stazionaria)
- **Rivelatore** (es. UV) attraverso cui passa l'eluato in uscita dalla colonna
Segnale registrato come **cromatogramma** (ogni composto identificato come **picco**)
- **Raccoglitore di frazioni** collegato al rivelatore, **raccoglie** un **volume prefissato** in più provette



TECNICHE CROMATOGRAFICHE

Ogni componente della miscela sarà in **equilibrio** fra 2 fasi



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

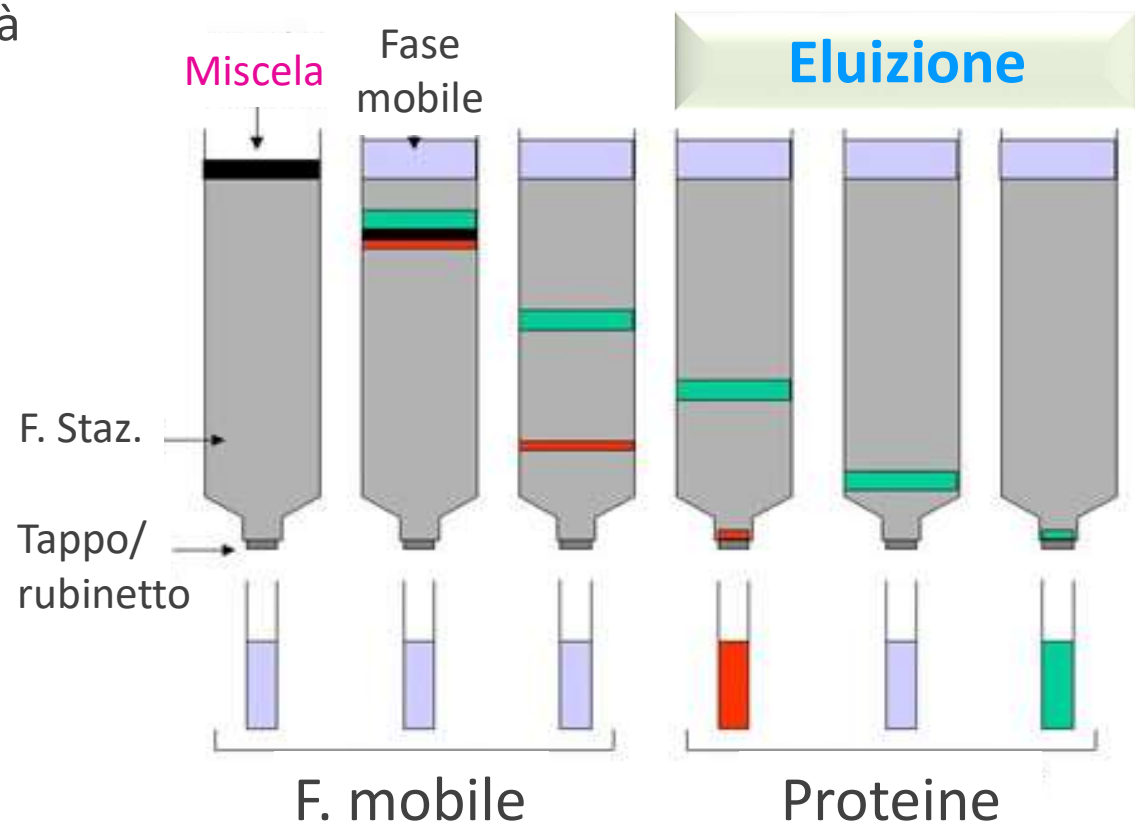
K = coefficiente di distribuzione
(diverso per ogni componente)

Una **miscela di proteine** messa a contatto con le due fasi si separerà sulla base delle **diverse affinità** di ciascuna proteina per tali fasi.

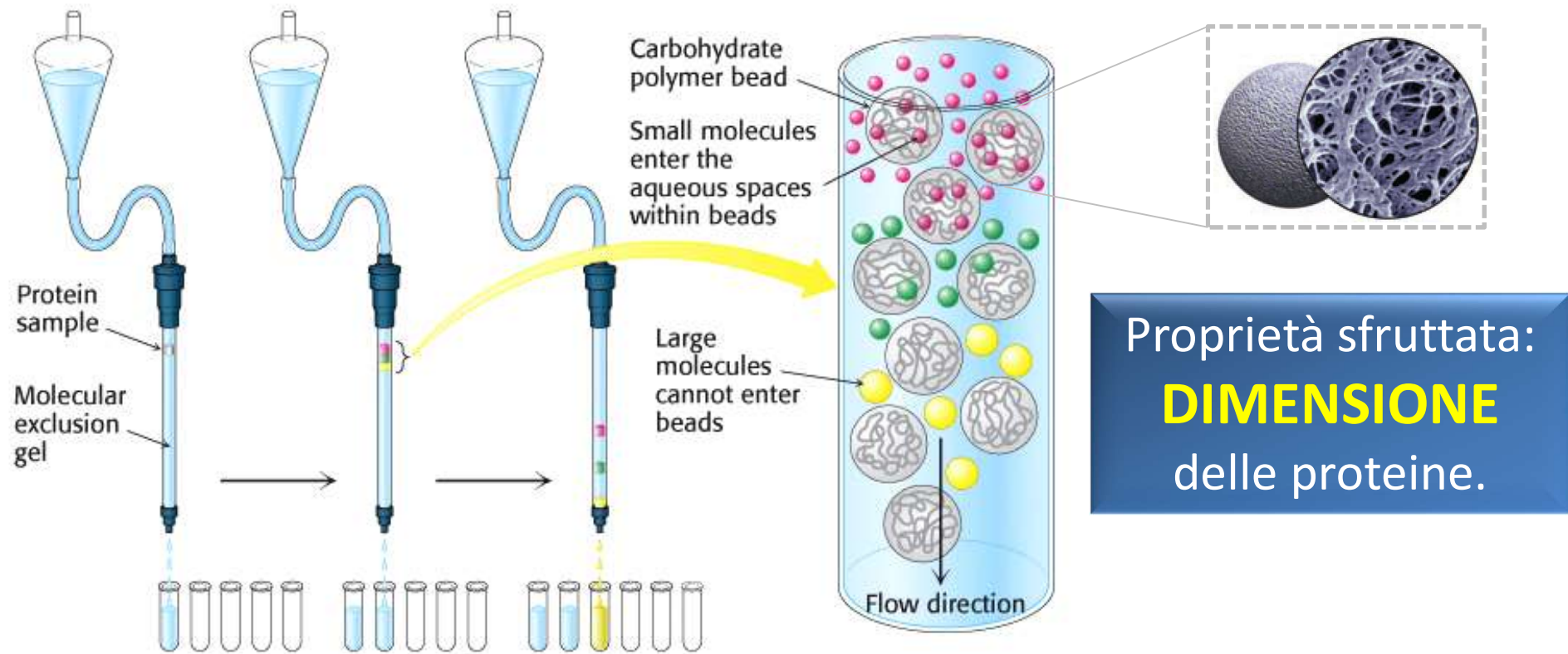
Importanza della

Velocità di flusso (flow rate):

- flow rate **troppo alto**: **equilibrio incompleto** del campione con le due fasi;
- flow rate **troppo basso**: **diffusione** dei soluti e scarsa risoluzione



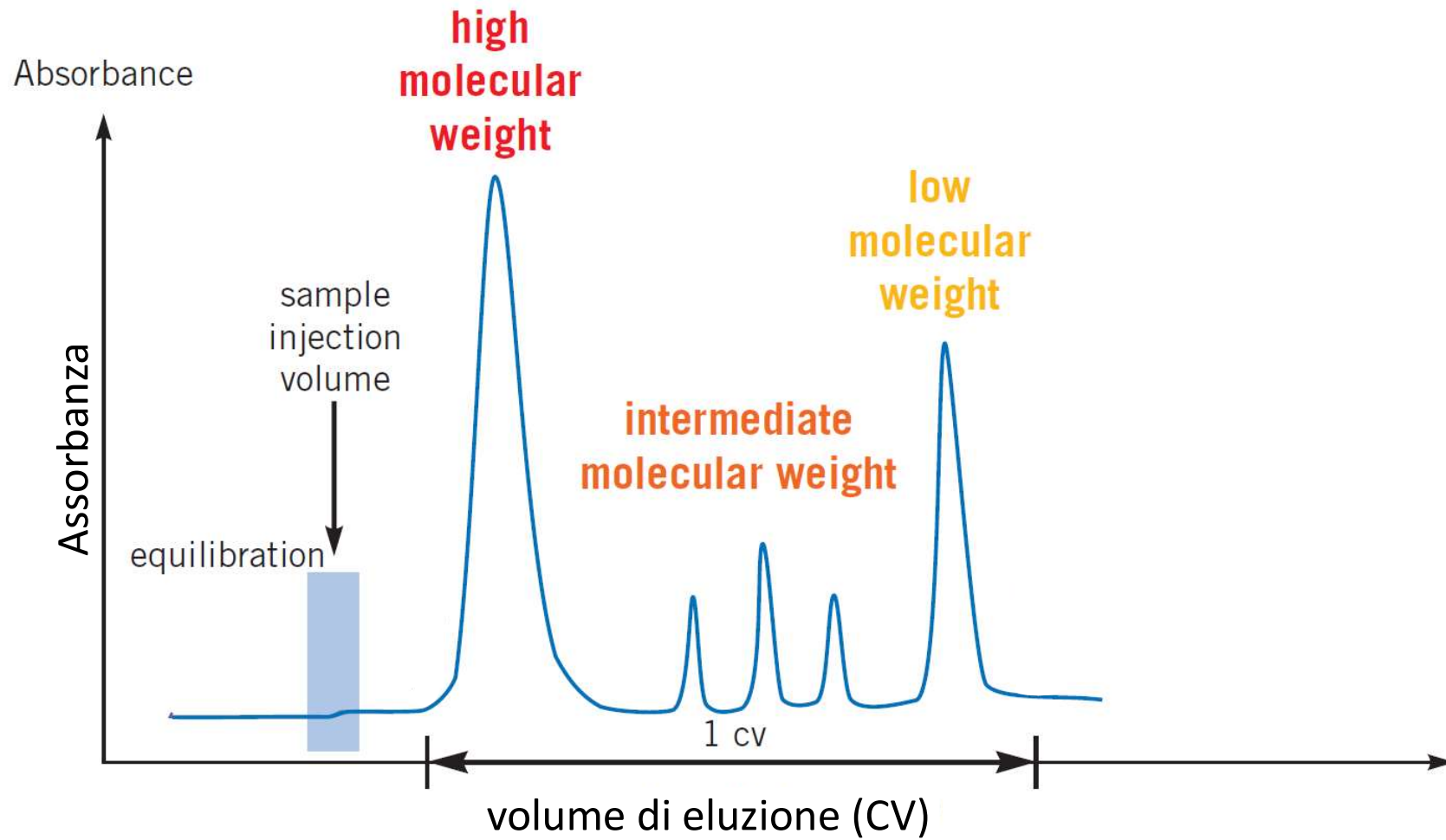
CROMATOGRAFIA PER FILTRAZIONE SU GEL (o "size-exclusion")



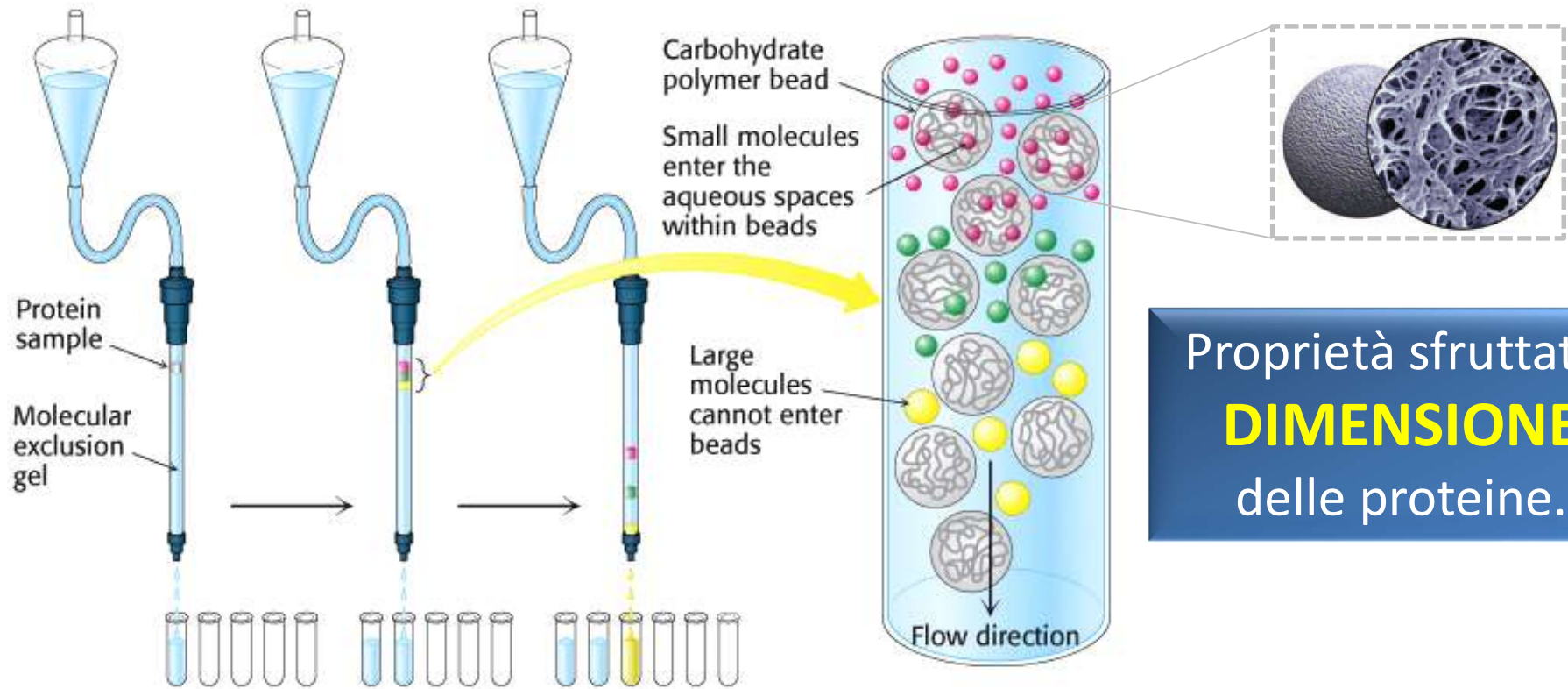
Quali molecole escono prima dalla colonna??

CROMATOGRAFIA PER FILTRAZIONE SU GEL (o "size-exclusion")

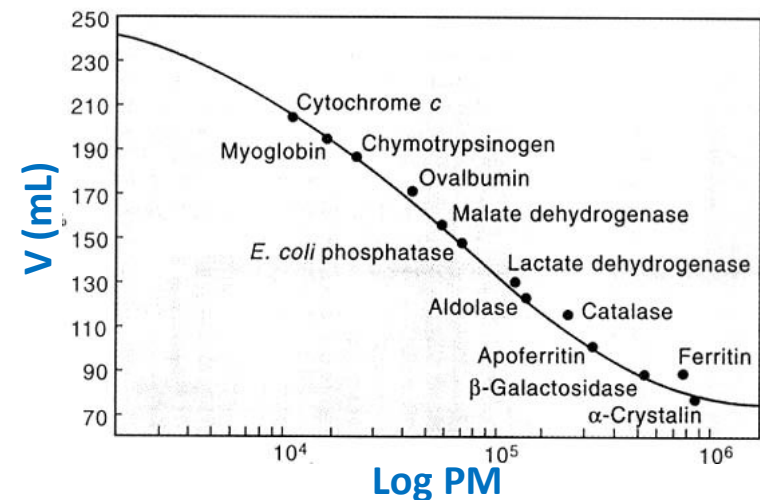
Le prime ad essere eluite sono le molecole grandi



CROMATOGRAFIA PER FILTRAZIONE SU GEL (o "size-exclusion")



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



Processi di separazione

Precipitazione

solfo d'ammonio

acetone

polietilenilammina (polimin P)

precipitazione isoelettrica

Ripartizione

polietilenglicole (PEG)

Cromatografia

scambio ionico

idrofobica

affinità

affinità per metallo immobilizzato

immunoaffinità

cromatofocusing

filtrazione su gel

Elettroforesi

gel elettroforesi (native)

gel elettroforesi denaturate-SDS

elettrofocusing

Centrifugazione Ultracentrifugazione

Proprietà sfruttate

solubilità

solubilità

solubilità, carica

solubilità, pl

coefficiente di ripartizione tra due fasi

carica, distribuzione di carica

idrofobicità

sito di legame per un ligando

legame con metallo

specifico sito antigenico

punto isoelettrico

forma, dimensione

carica, dimensione

dimensione

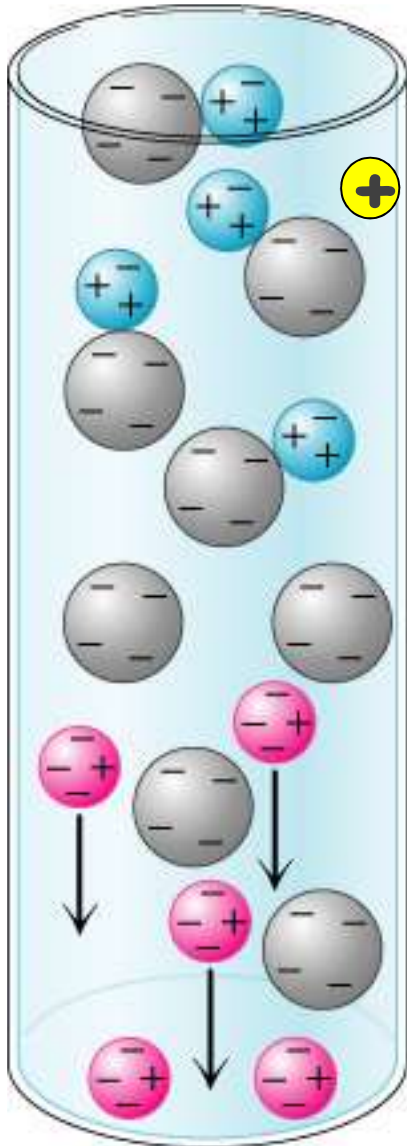
pl

forma, dimensione, densità

forma, dimensione

CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

Principio: attrazione fra particelle di **carica opposta**



Fase stazionaria

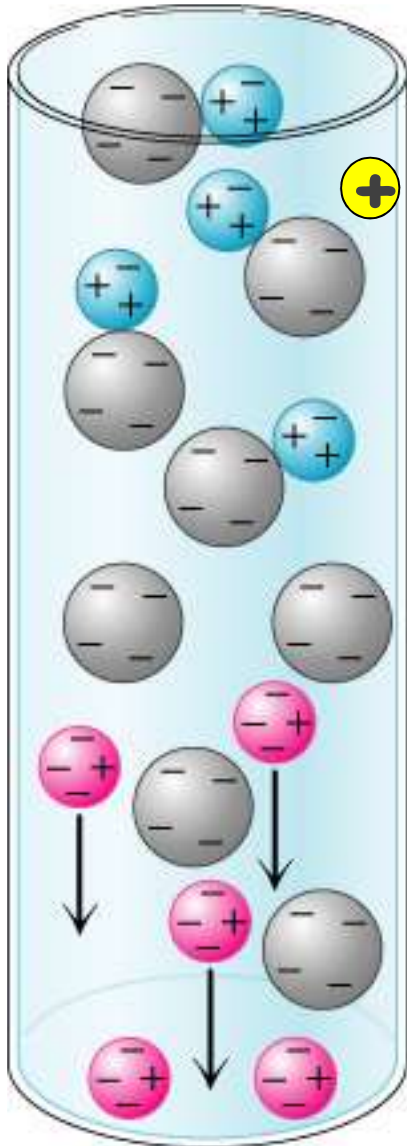
Resine che hanno la funzione di:

- scambiatori anionici (carichi +) → molecole cariche (-)
- scambiatori cationici (carichi -) → molecole cariche (+)

Separazione della molecola di interesse
conoscendone la carica.

CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

Principio: attrazione fra particelle di **carica opposta**



Fase stazionaria

Resine che hanno la funzione di:

- scambiatori anionici (carichi +) → molecole cariche (-)
- scambiatori cationici (carichi -) → molecole cariche (+)

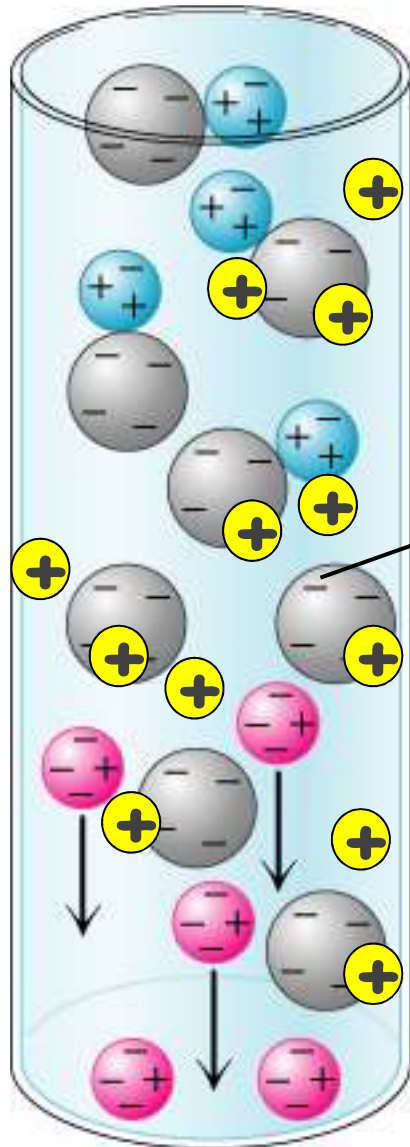
Proprietà sfruttata:
CARICA NETTA
delle proteine.

Separazione della molecola di interesse
conoscendone la carica.

CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

Principio: attrazione fra particelle di **carica opposta**

1^a fase: **legame**



Le proteine cariche positivamente si legano a granuli carichi negativamente

Scambiatore cationico

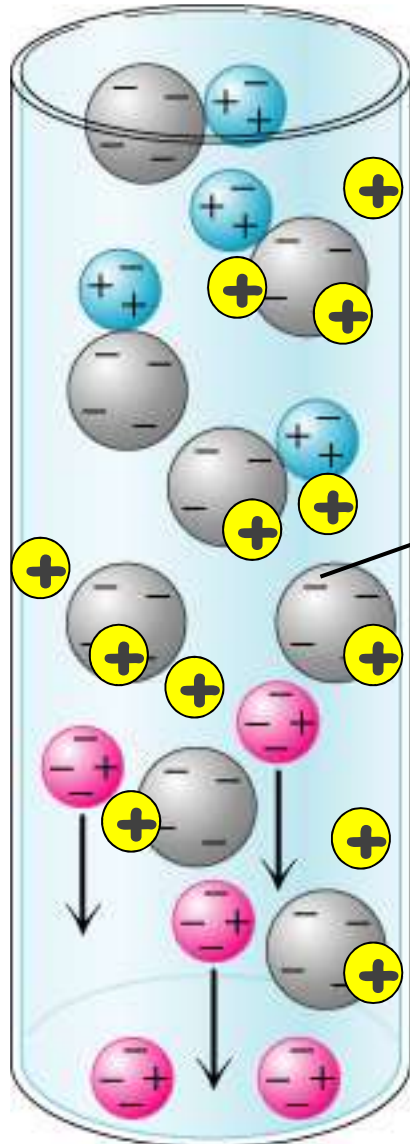
Le proteine cariche negativamente passano attraverso la colonna

Separazione della molecola di interesse conoscendone la carica.

CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

Principio: attrazione fra particelle di carica opposta

1^a fase: **legame**

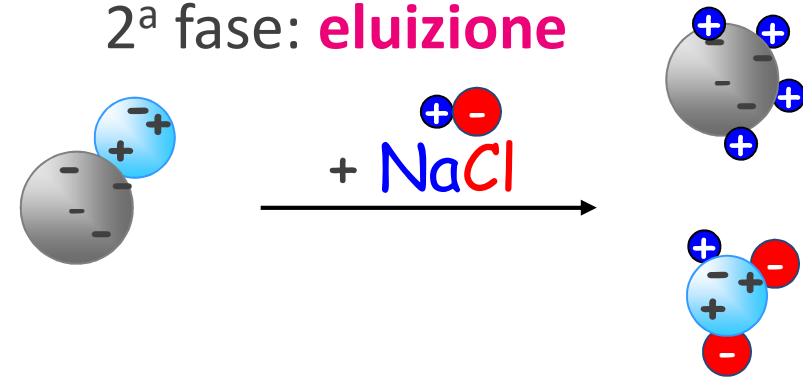


Le proteine cariche positivamente si legano a granuli carichi negativamente

Scambiatore cationico

Le proteine cariche negativamente passano attraverso la colonna

2^a fase: **eluizione**



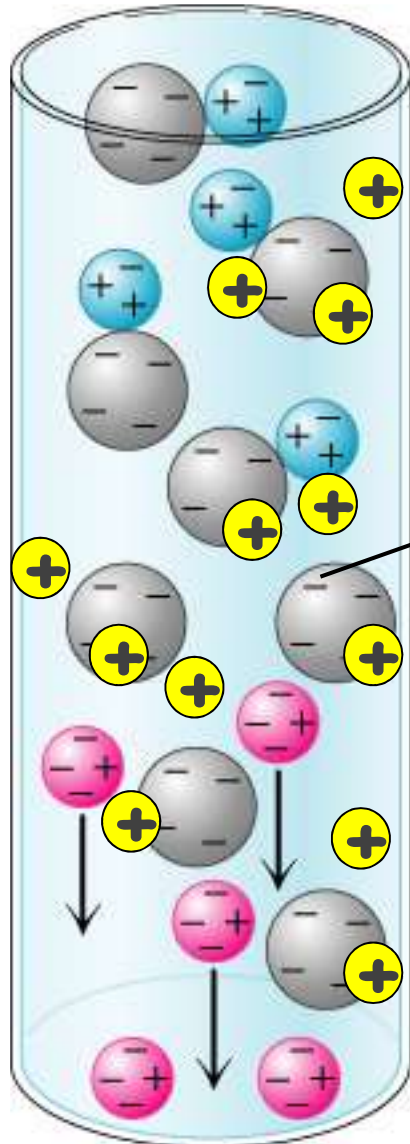
Proprietà sfruttata:
CARICA NETTA
delle proteine.

Separazione della molecola di interesse conoscendone la carica.

CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

Principio: attrazione fra particelle di **carica opposta**

1^a fase: **legame**

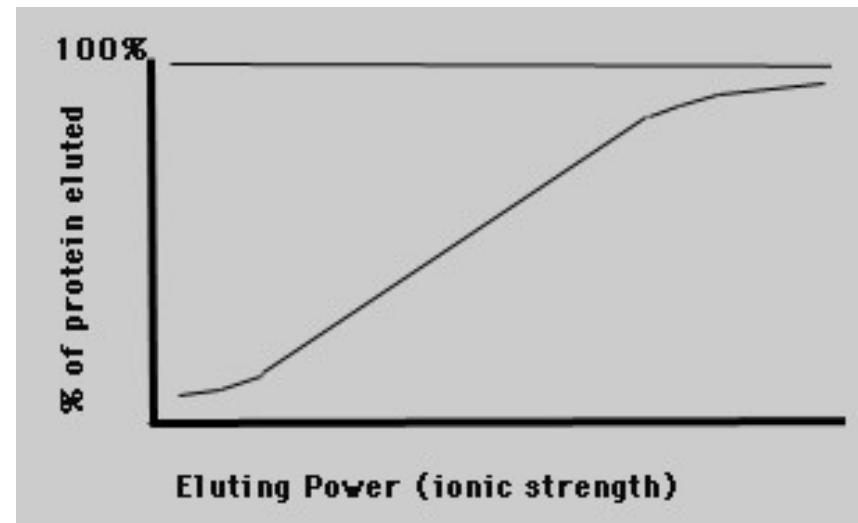
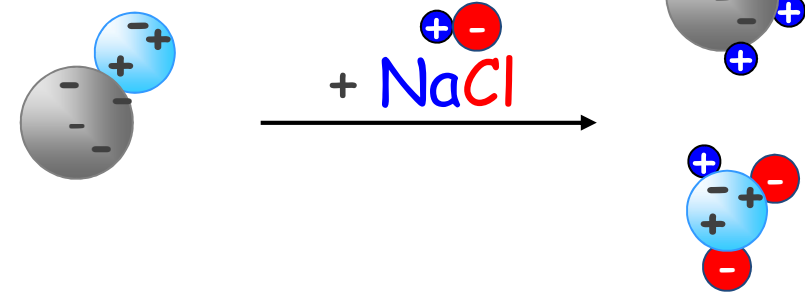


Le proteine cariche positivamente si legano a granuli carichi negativamente

Scambiatore cationico

Le proteine cariche negativamente passano attraverso la colonna

2^a fase: **eluizione**

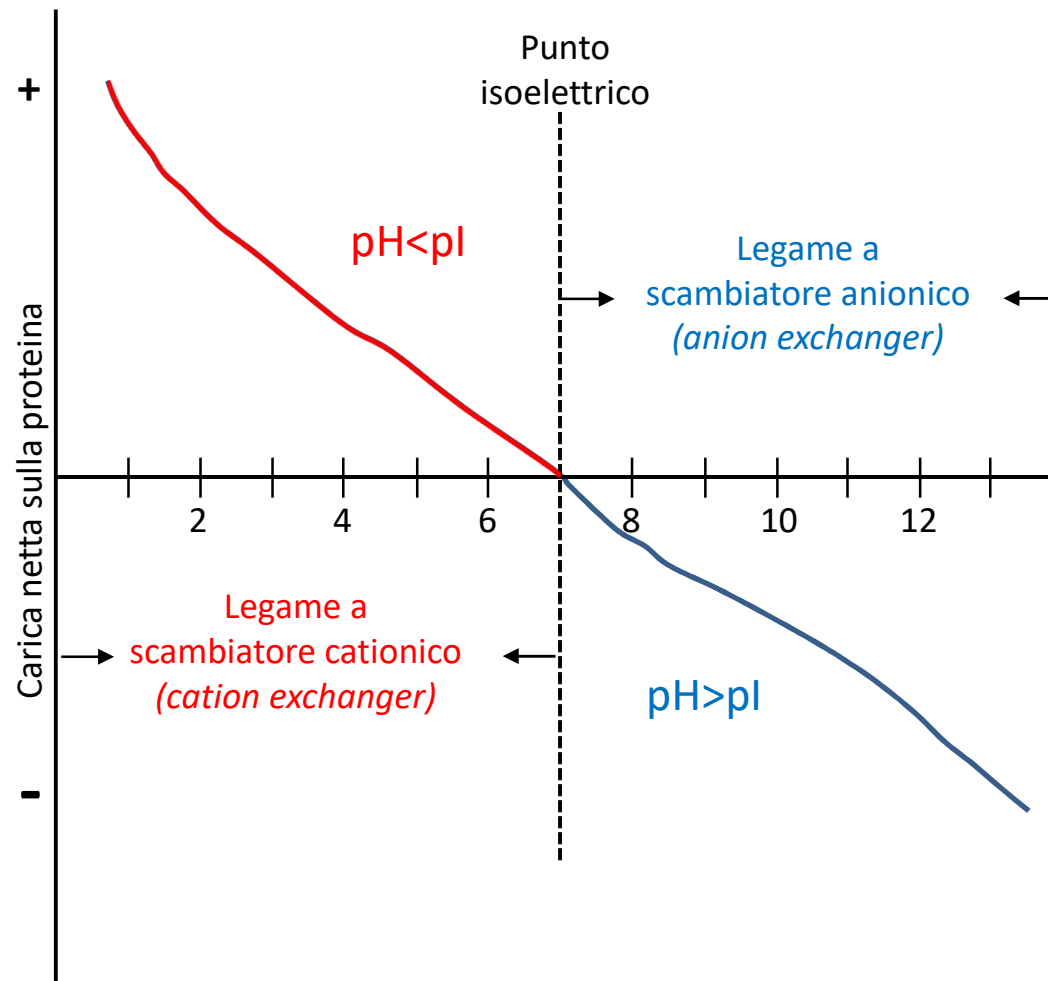


Separazione della molecola di interesse conoscendone la carica.

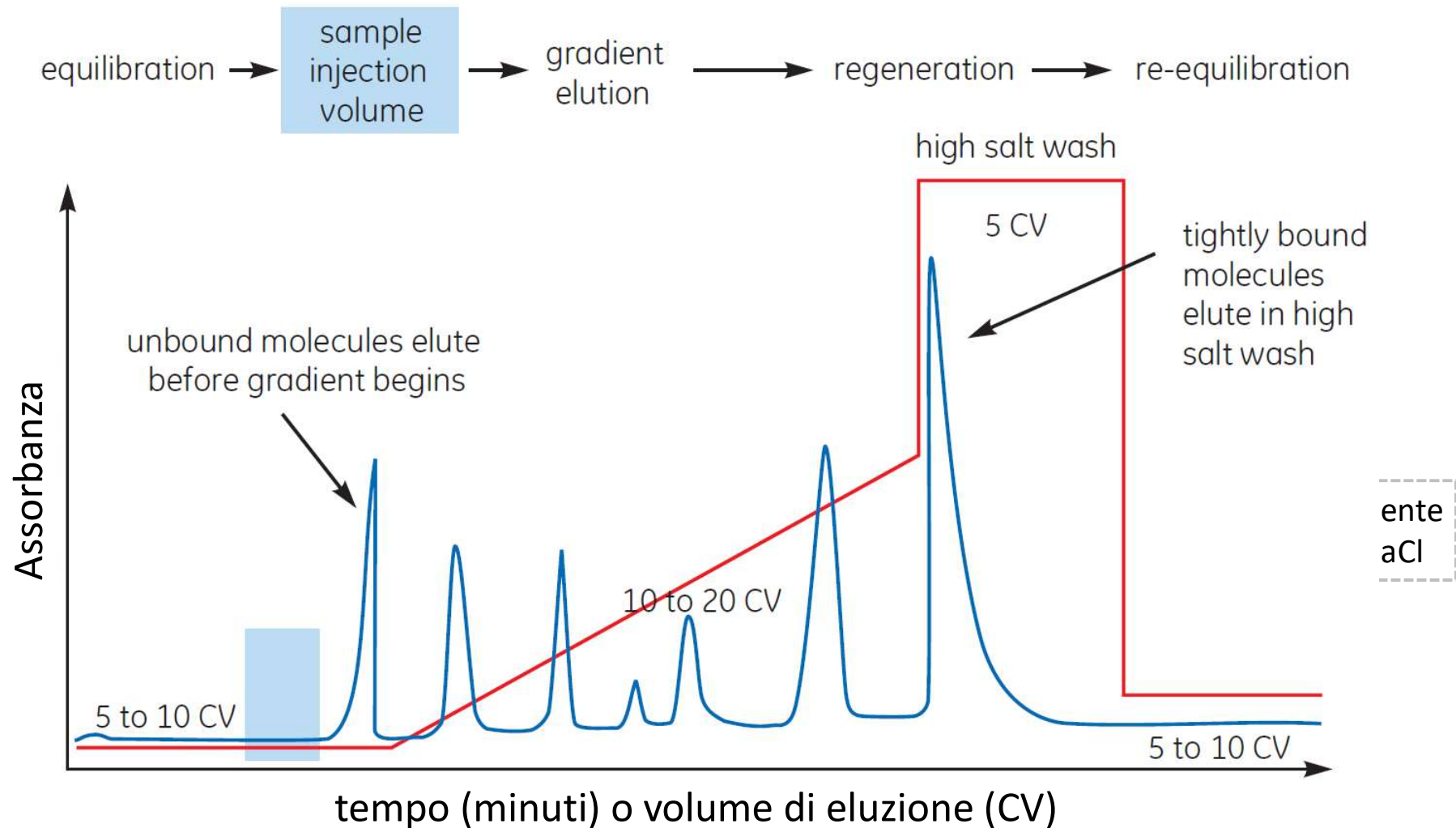
CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO - Effetto del pH

Molecole anfotere come le proteine possono legarsi sia a scambiatori anionici sia a scambiatori cationici.

Scelta del pH fondamentale → in condizioni errate la proteina potrebbe denaturarsi
→ scelta di valori di pH all'interno del range di stabilità della proteina

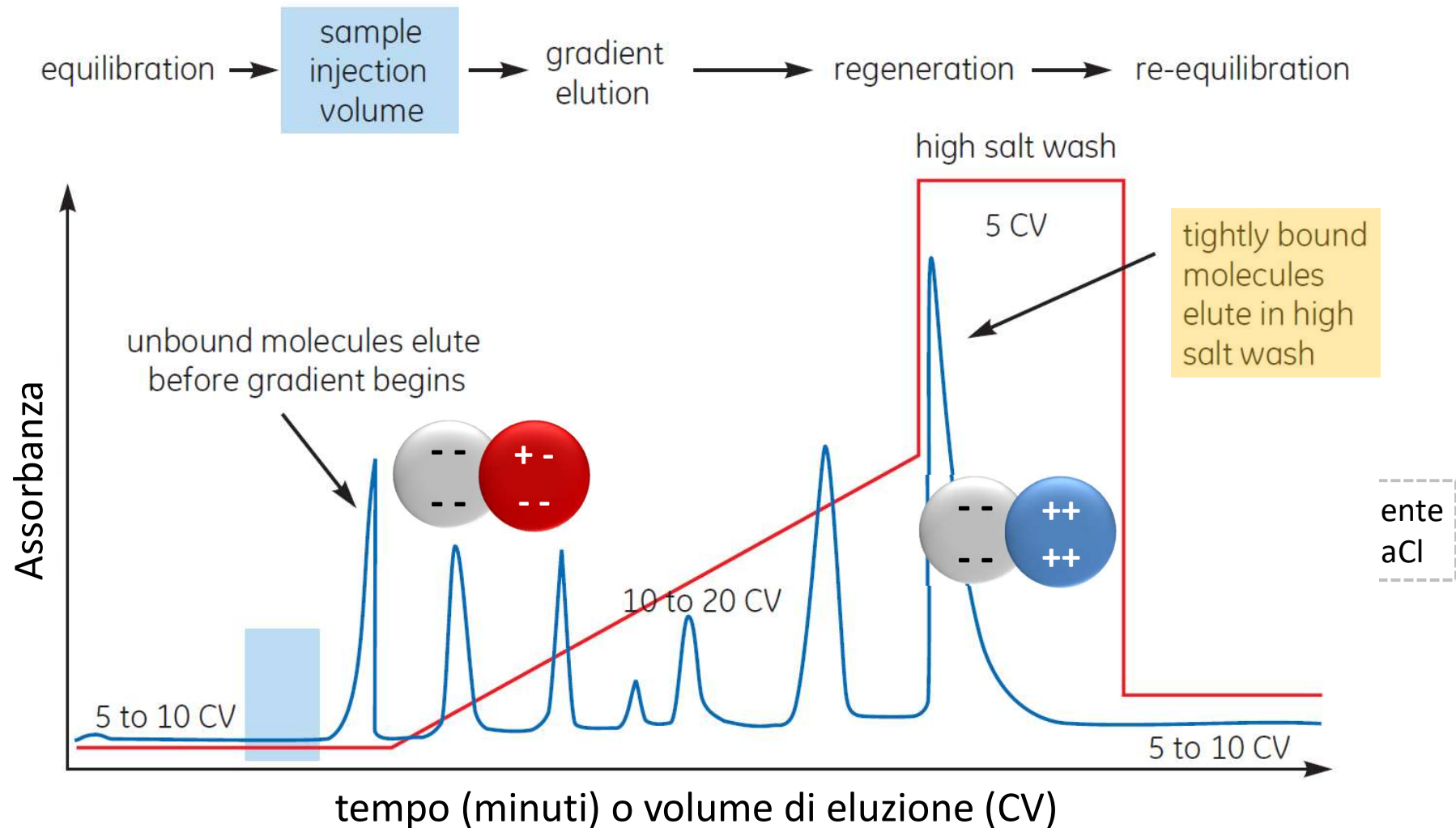


ELUIZIONE IN GRADIENTE DI CONCENTRAZIONE



Vengono raccolte molteplici **frazioni**

ELUIZIONE IN GRADIENTE DI CONCENTRAZIONE



Vengono raccolte molteplici **frazioni**

ESEMPIO DI CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

Scambiatore di anioni forte:
QAE sephadex (ammine quaternarie).

Da 20 L di medium a 60 mL
di purificato!

pl proteina di interesse = 5.2



TRIS	50 mM
NaCl	100 mM
EDTA	5 mM
Benzamidina	10 mM

**EQUILIBRAZIONE
RESINA**

pH 7.5

TRIS	50 mM
EDTA	5 mM
Benzamidina	10 mM
+ CAMPIONE	

**FISSAZIONE
RESINA**

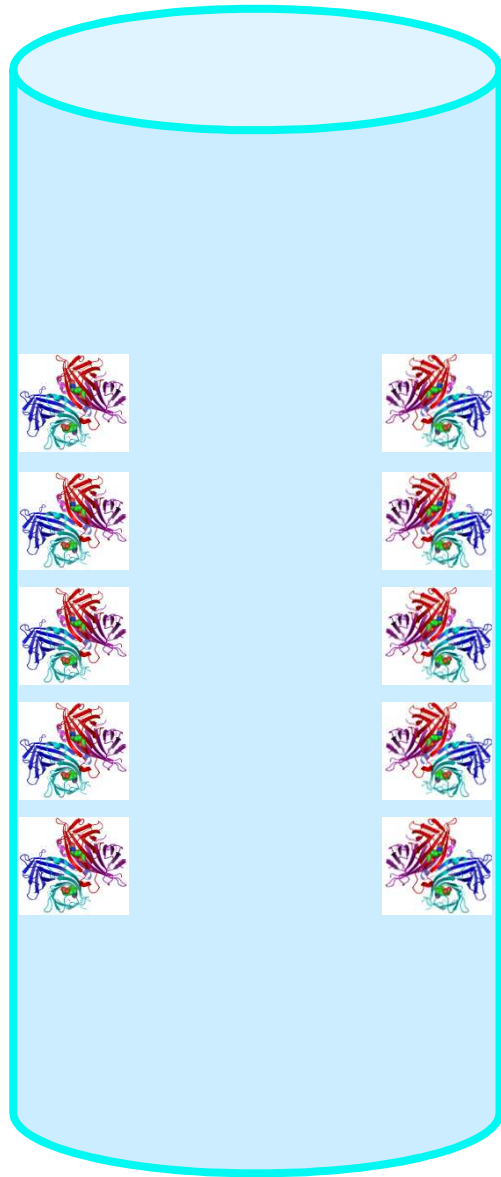
pH 7.5

TRIS	50 mM
NaCl	500 mM
EDTA	5 mM
Benzamidina	10 mM

ELUIZIONE

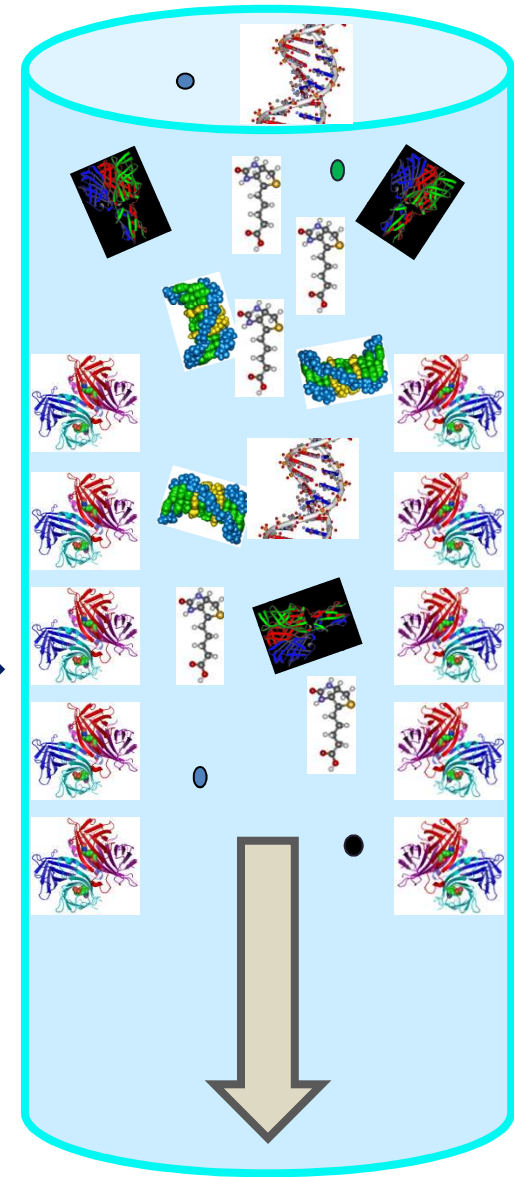
pH 7.5

CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ

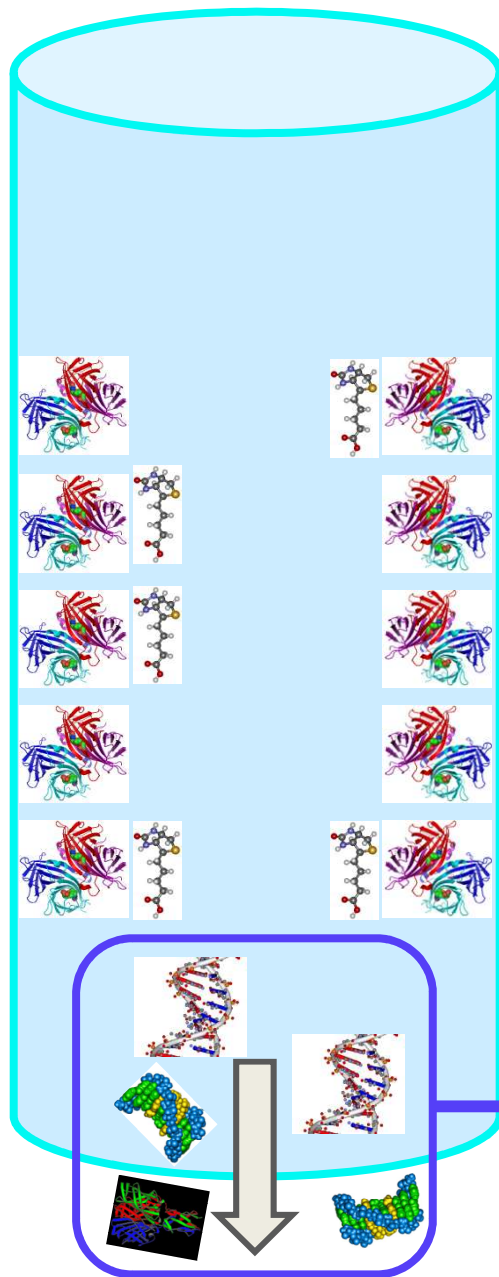


Miscela campione

insieme alla **F. Mob**



CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ

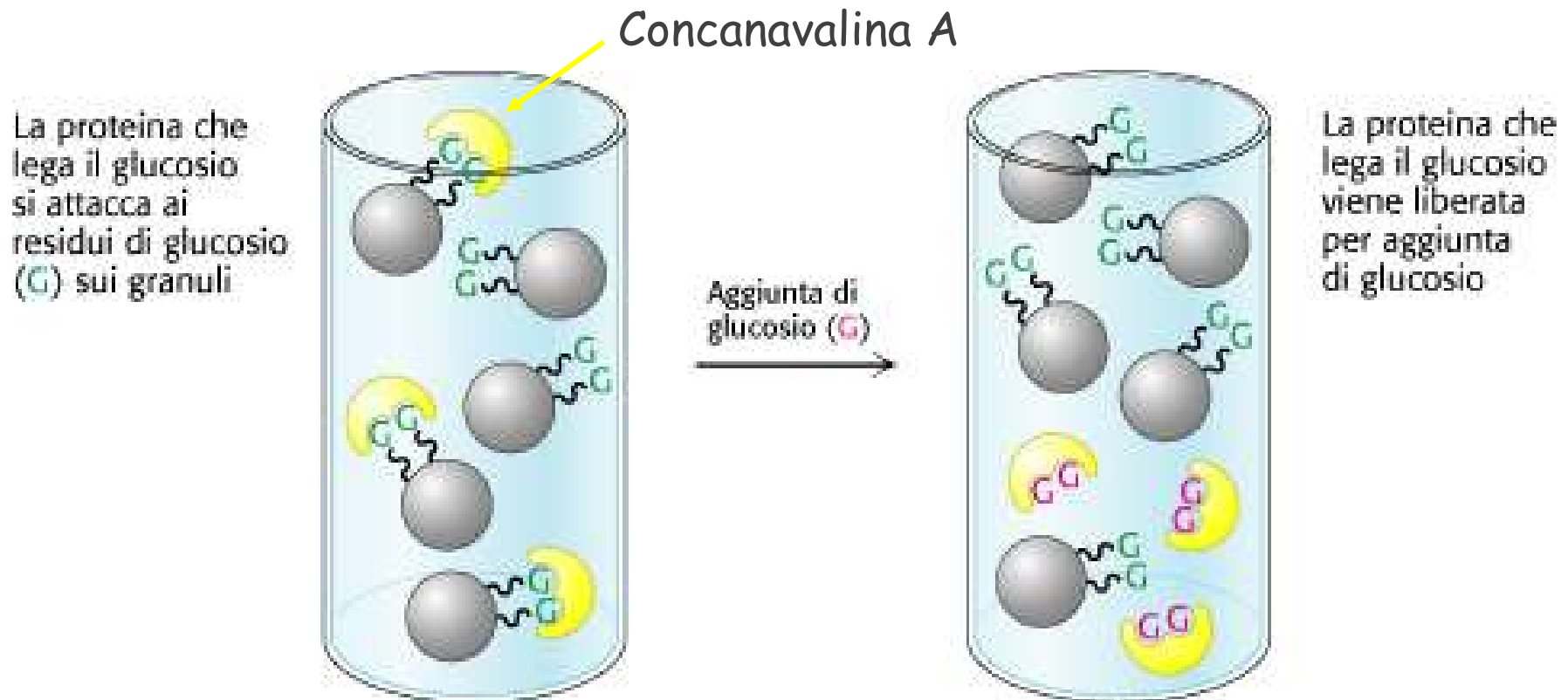


Recupero della molecola di interesse per alterazione delle condizioni di legame.

(pH, temperatura, forza ionica....)

Molecole non affini

ESEMPIO DI CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ

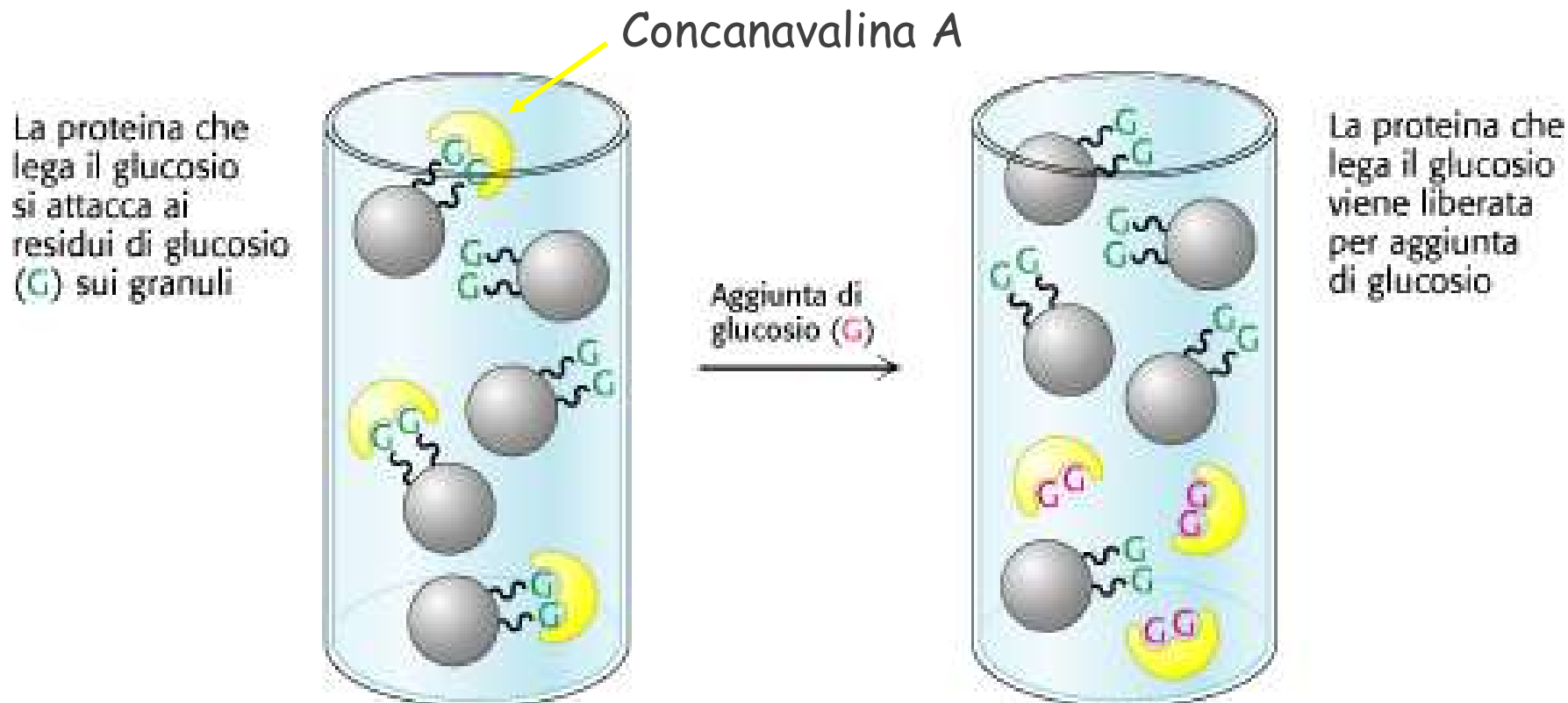


- Legare **covalentemente** un composto ad un supporto solido.
- Aggiungere la miscela proteica.
- Lavare con tampone.
- E per eluire??



Proprietà sfruttata:
**AFFINITÀ PER
ALCUNI GRUPPI
CHIMICI.**

ESEMPIO DI CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ

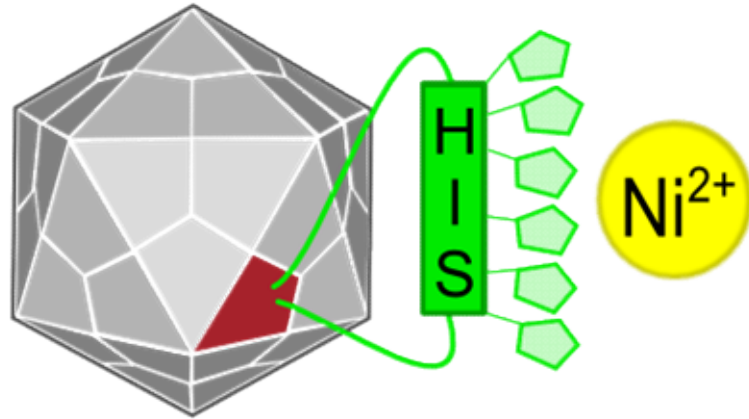


- Legare **covalentemente** un composto ad un supporto solido.
- Aggiungere la miscela proteica.
- Lavare con tampone.
- Eluire la proteina desiderata con una **elevata concentrazione** di composto in forma **solubile**.

Proprietà sfruttata:
**AFFINITÀ PER
ALCUNI GRUPPI
CHIMICI.**

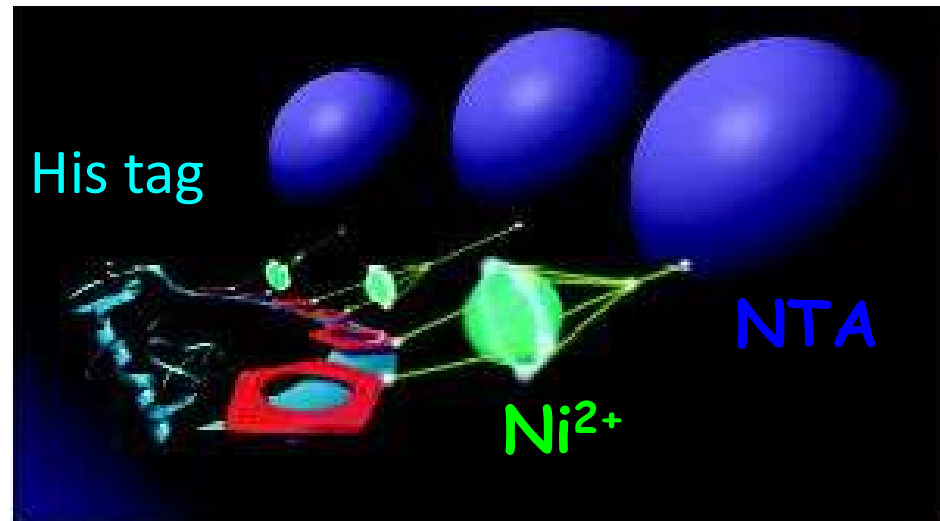
CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ

Sistema Poli His-Nichel (His tag)



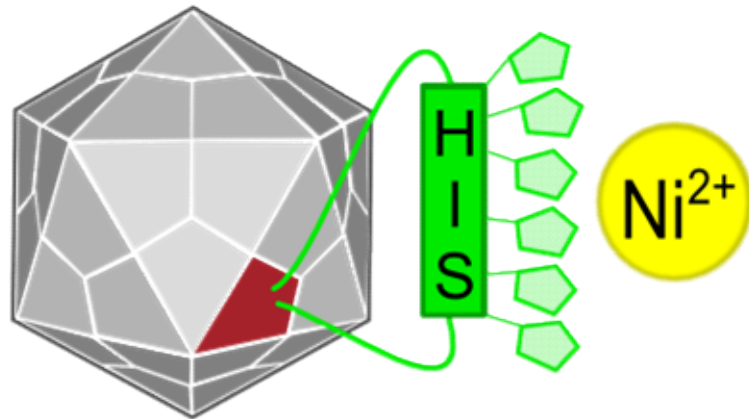
Coda di 6 Istidine

Acido nitrilotriacetico (NTA)
chelante dello ione Ni^{2+}



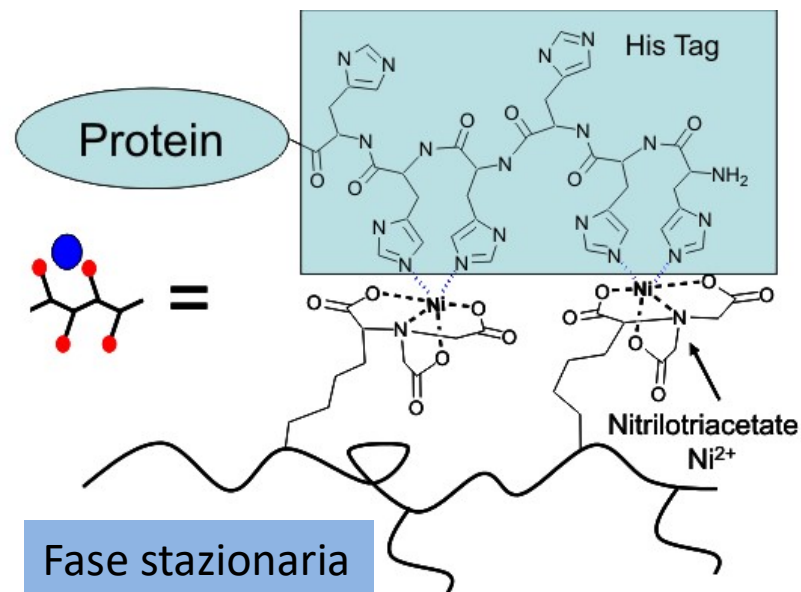
CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ

Sistema Poli His-Nichel (His tag)



Coda di 6 Istidine

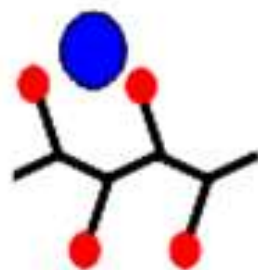
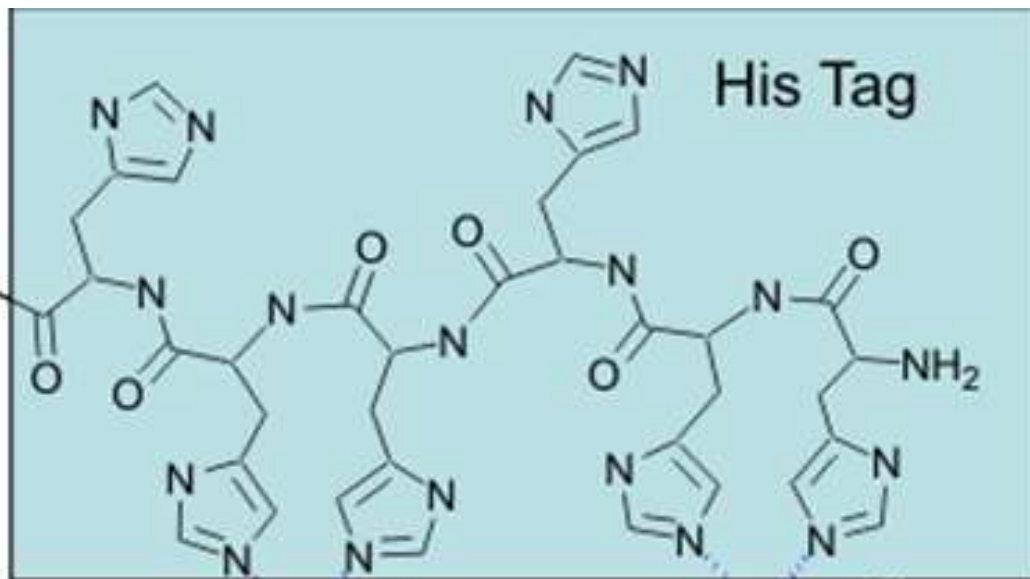
Acido nitrilotriacetico (NTA)
chelante dello ione Ni^{2+}



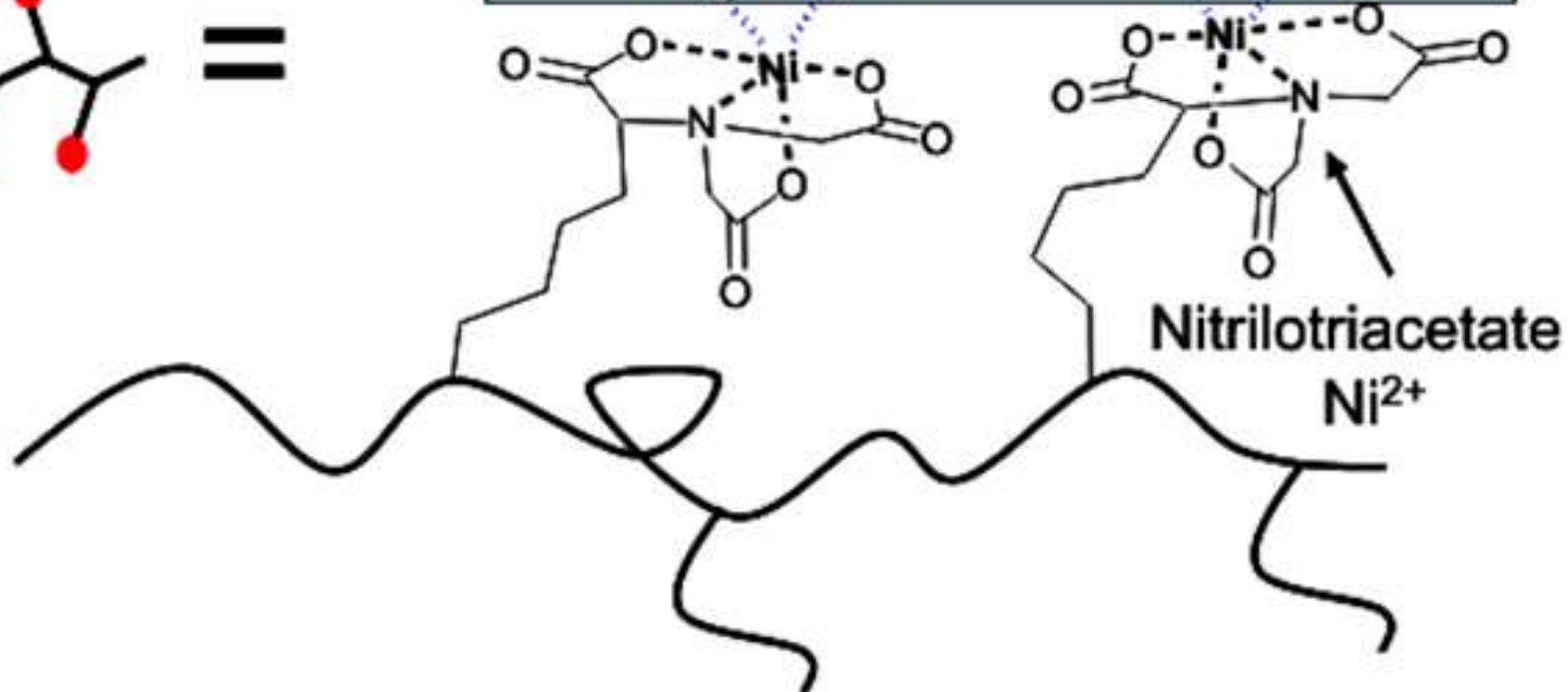
Eluizione:



Protein

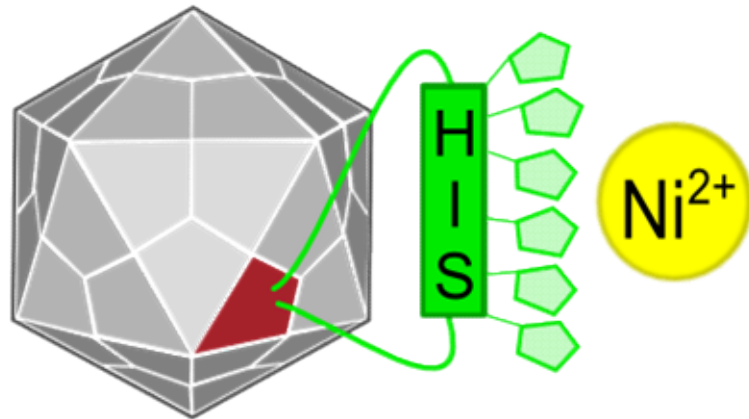


=



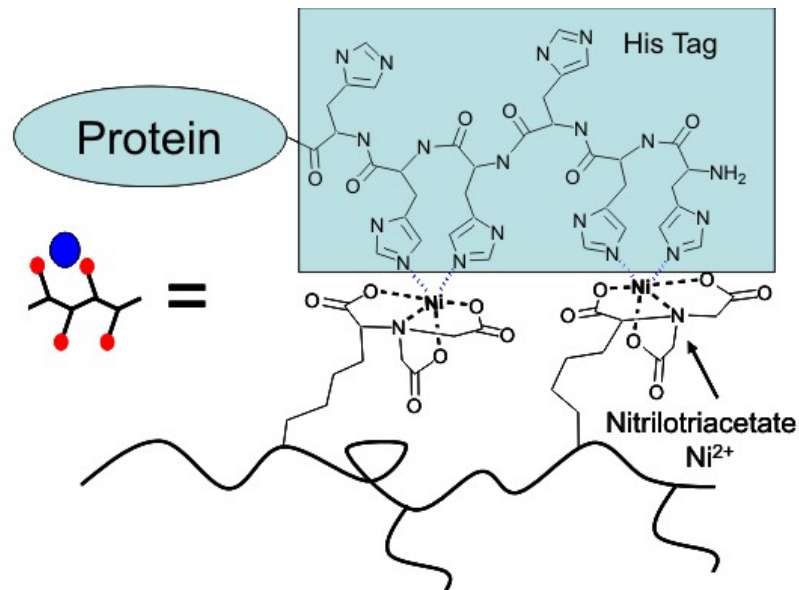
CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ

Sistema Poli His-Nichel (His tag)

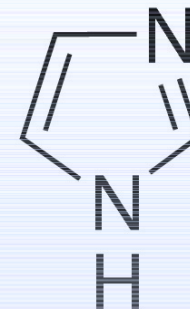


Coda di 6 Istidine

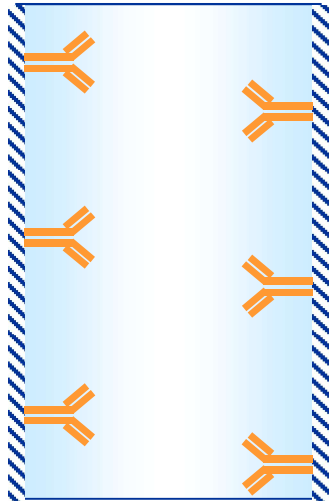
Acido nitrilotriacetico (NTA)
chelante dello ione Ni^{2+}








Eluizione:
Alte []
di imidazolo



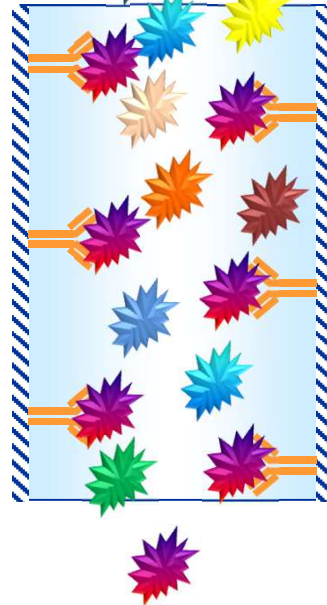
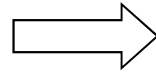
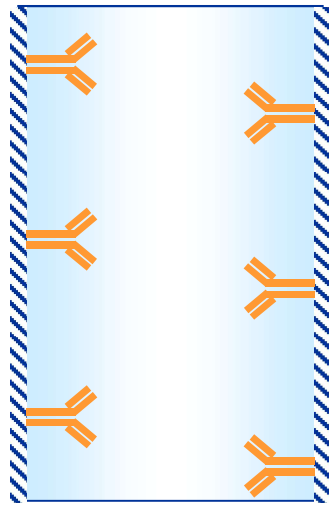
CROMATOGRAFIA PER IMMUNOAFFINITA'



Vengono
utilizzati
**ANTICORPI
SPECIFICI**

-  Colonna
cromatografica
-  Anticorpo
anti-proteina
-  Molecola di interesse
-  Altre molecole
-  Eluente

CROMATOGRAFIA PER IMMUNOAFFINITA'



Vengono
utilizzati
**ANTICORPI
SPECIFICI**



Colonna
cromatografica



Anticorpo
anti-proteina



Molecola di interesse

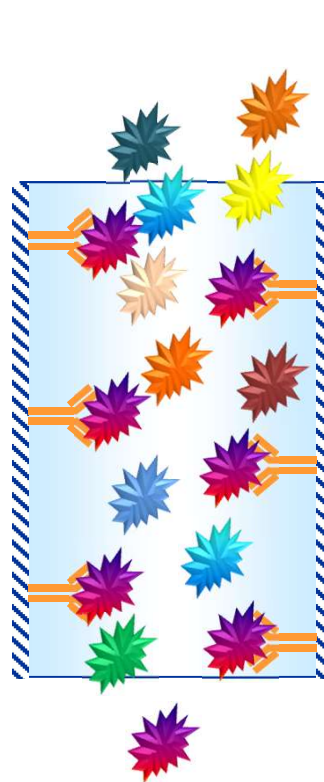
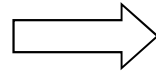
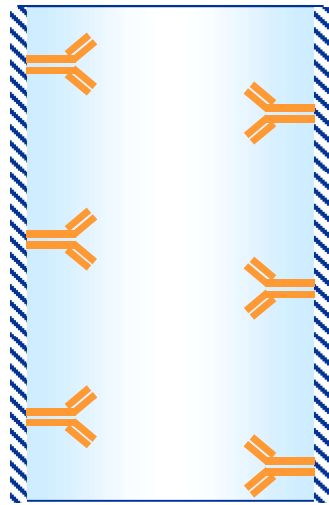


Altre molecole



Eluente

CROMATOGRAFIA PER IMMUNOAFFINITA'



Vengono utilizzati
ANTICORPI SPECIFICI



Colonna
cromatografica



Anticorpo
anti-proteina



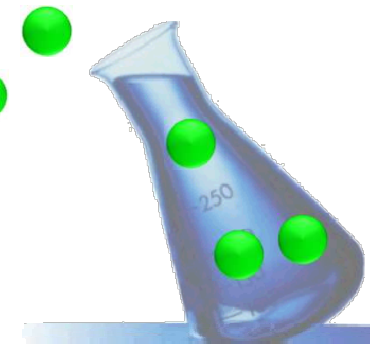
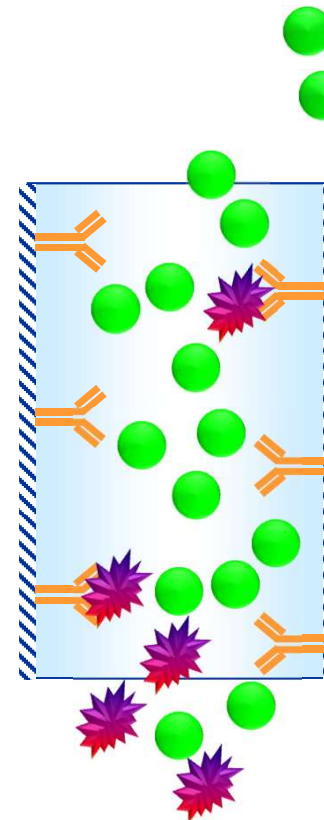
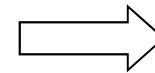
Molecola di interesse



Altre molecole



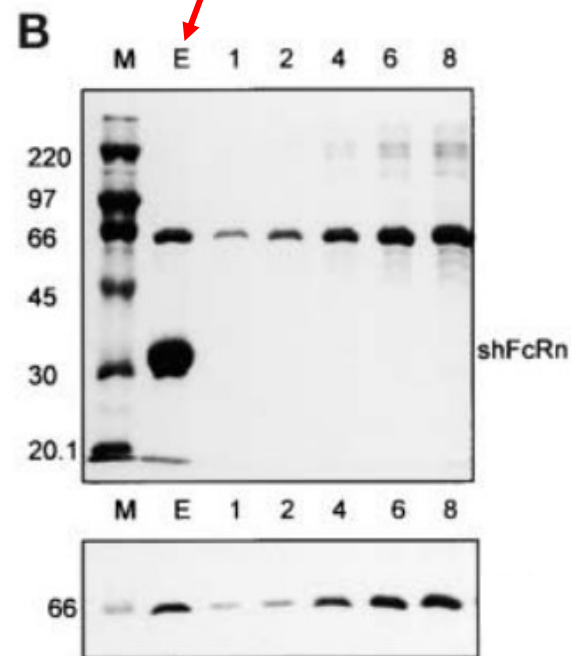
Eluente



ESEMPIO REALE DI CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ.....



SDS-PAGE e colorazione



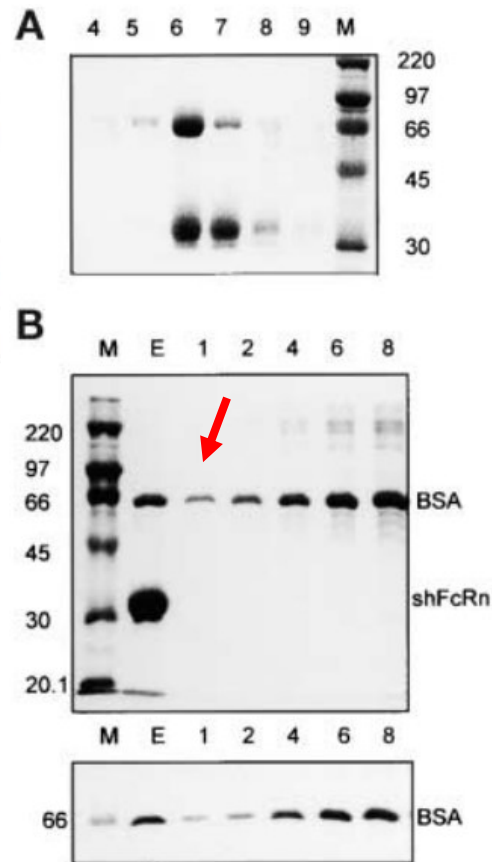
SDS-PAGE e colorazione
+
Confronto con
proteina nota

Western blotting

ESEMPIO REALE DI CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ.....

Upon eluting recombinant soluble human FcRn (shFcRn) from an IgG affinity matrix by raising the pH from 5.8 to 8.1 we noted a 67-kD protein copurifying in abundance with shFcRn.

Elution of the 67-kD molecule was dependent on the presence of shFcRn; i.e., it was not affinity purified in like manner from culture supernatant of CHO cells not secreting shFcRn.



SDS-PAGE e colorazione

SDS-PAGE e colorazione
+
Confronto con
proteina nota

Western blotting

ESEMPIO REALE DI CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ.....

FcRn binds IgG and albumin in a pH dependent fashion simultaneously

IgG Fc

C_H2

C_H3

His310
Ile253
His435

Albumin

DIII

DI

DII

His464
His510
His535

$\alpha1-\alpha2$ platform

Asp130
Trp131
Glu115
Glu116
Ile1

His166

FcRn

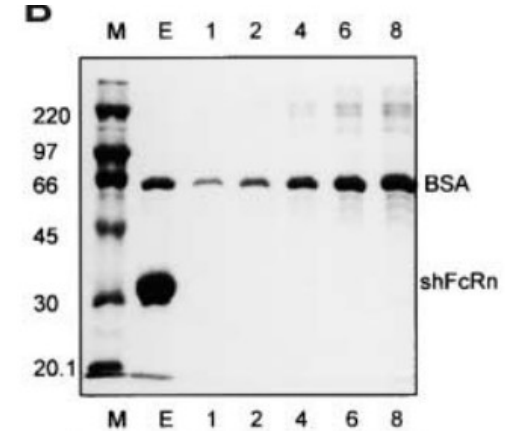
$\beta2m$

$\alpha3$

- Binding at acidic pH (pH 6.0).
- No binding at neutral pH.

Chaudhury et al. JEM.2003.

Deisenhofer, 1981.
Sugio et al., 1999.
West and Bjorkman, 2000.
Andersen et al. EJI 2006.
Andersen et al. FEBS 2008.
Andersen et al. JBC 2010.
Andersen et al. JBC 2011.
Andersen et al. JBC 2012.
Andersen et al. Nature Com
Andersen et al. JBC 2014.
Sand et al. JBC 2014.
Sand et al. JBC 2014.
Bern et al, JCR, 2015.

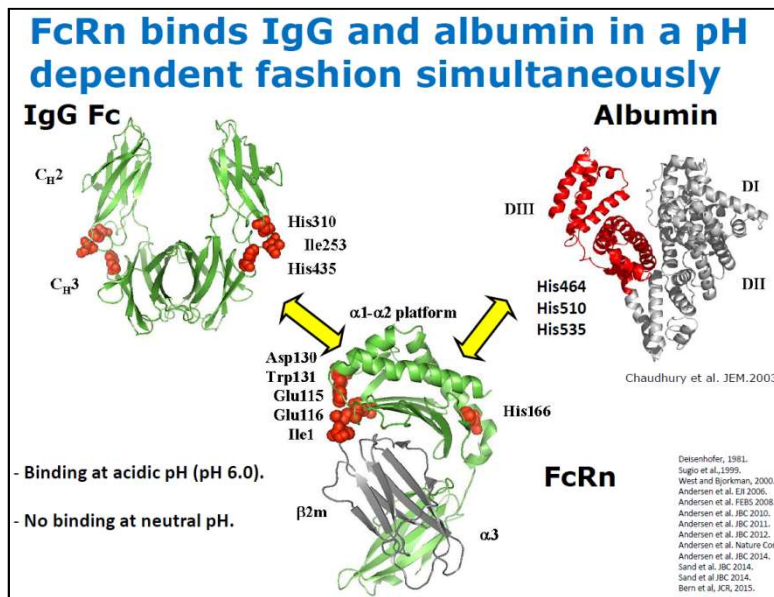


... e SERENDIPITY

ESEMPIO REALE DI CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ.....

First, we found fortuitously that albumin binds FcRn to form a tri-molecular complex with IgG. Upon eluting recombinant soluble human FcRn (shFcRn) from an IgG affinity matrix by raising the pH from 5.8 to 8.1 we noted a 67-kD protein copurifying in abundance with shFcRn.

Elution of the 67-kD molecule was dependent on the presence of shFcRn; i.e., it was not affinity purified in like manner from culture supernatant of CHO cells not secreting shFcRn.



Chaudhury C, Mehnaz S, Robinson JM, Hayton VL, Pearl DK, Roopenian DC, Anderson CL. The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. *J Exp Med.* 2003 Feb 3;197(3):315-22.

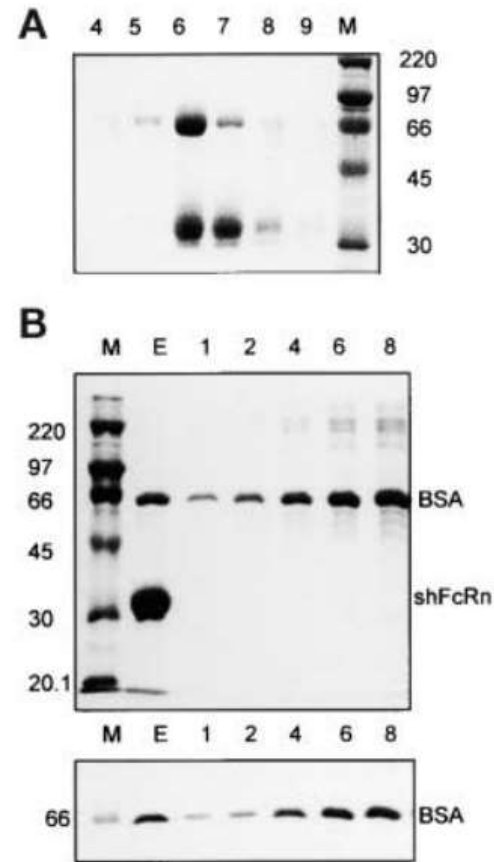


Figure 1. Copurification of BSA and shFcRn by affinity chromatography on Sepharose-hIgG. (A) Culture supernatant from CHO cells secreting recombinant shFcRn was acidified to pH 5.8 and applied to a Sepharose-hIgG chromatography column. Bound shFcRn was eluted at pH 8.1. Six fractions of the elution peak (4–9) were analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions and Coomassie blue staining. The molecular weight markers (M, in kD) allow identification of the α -chain of shFcRn at \sim 35kD and another copurifying protein at 67kD. (B) The elution peak (E) from a Sepharose IgG column was analyzed by SDS-PAGE on two identical gels along with molecular weight standards (M) and graded amounts (lanes 1–8; in μ g per lane) of BSA. One gel (top) was stained with Coomassie blue and the other (bottom) was immunoblotted with anti-BSA antibody. (C)

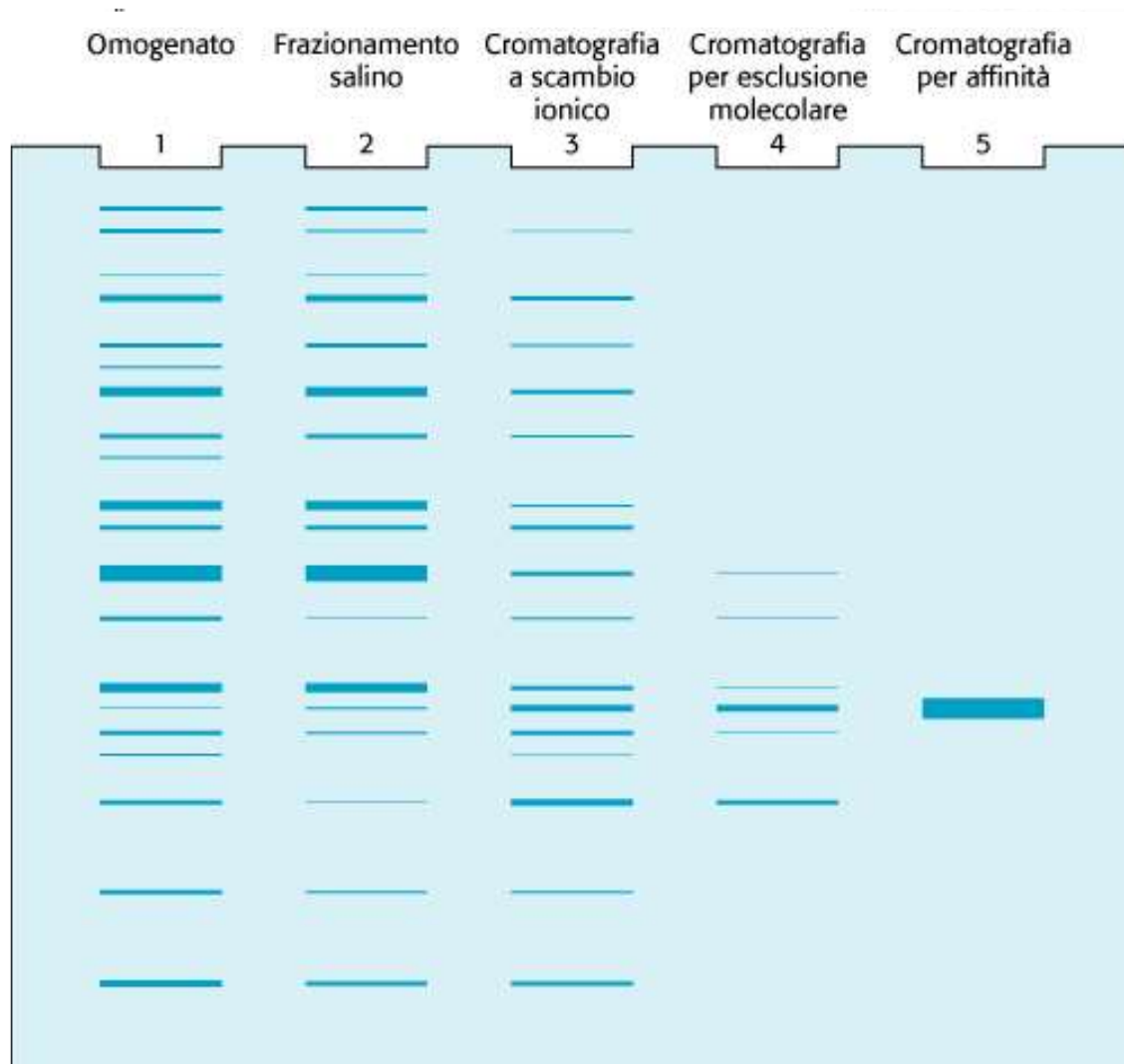
... e SERENDIPITY

Confronto 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.

Sarà l'**utilizzo finale** della proteina a decidere la purezza richiesta.

ATTIVITÀ SPECIFICA

Durante le fasi di purificazione occorrono **2 test**:

- valutare se la proteina possiede la propria **attività** biologica (specifico, sensibile, rapido, riproducibile).
- valutare la **quantità** di proteina ottenuta.

$$\text{Attività specifica} = \frac{\text{Attività}}{\text{Quantità di proteina}}$$

In un processo di purificazione si cerca di massimizzare l'attività specifica.



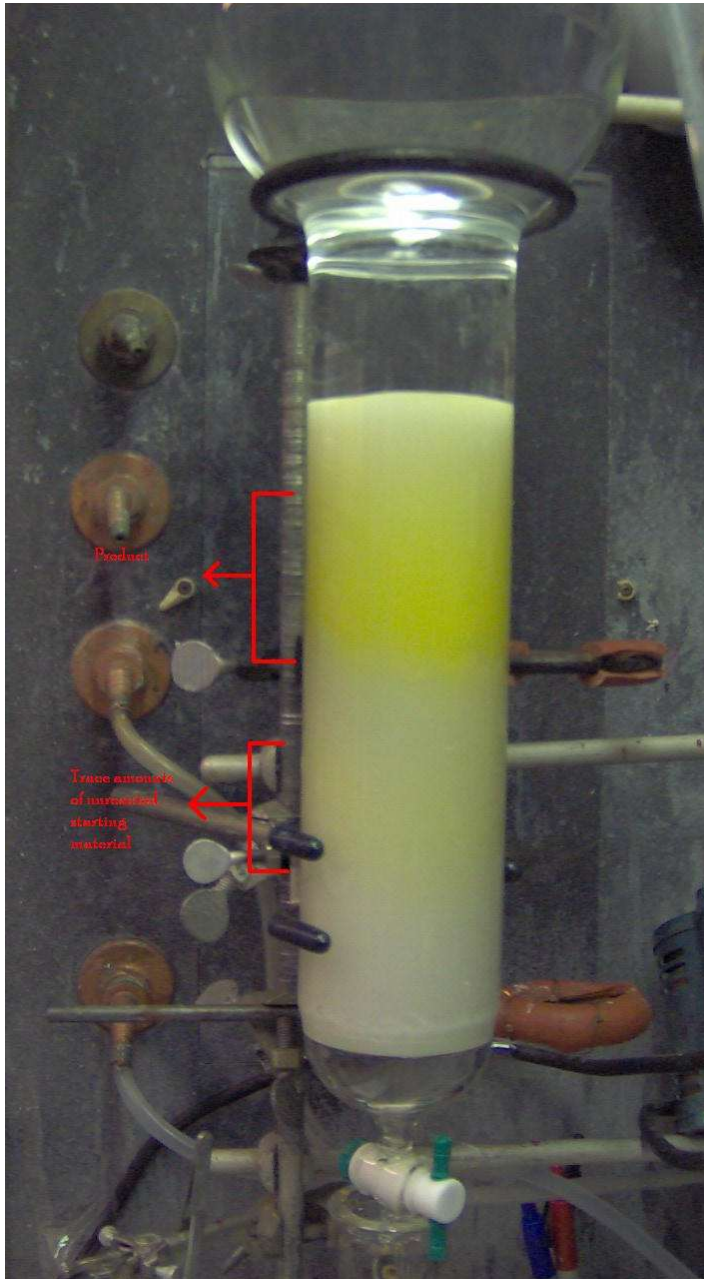
PURIFICAZIONE DI UNA PROTEINA

Non vi è a priori una tecnica migliore di un'altra.

Bisogna valutare:

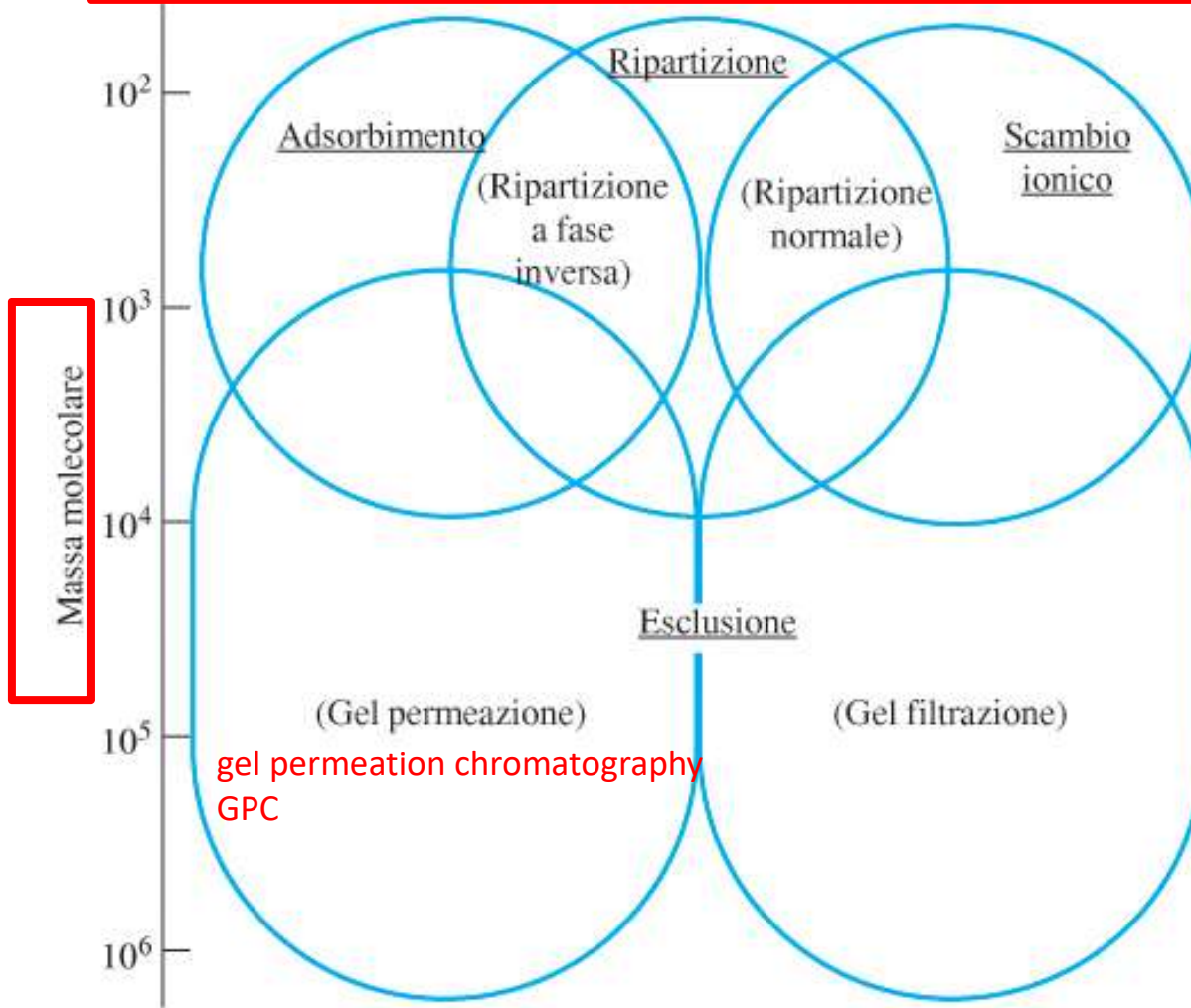
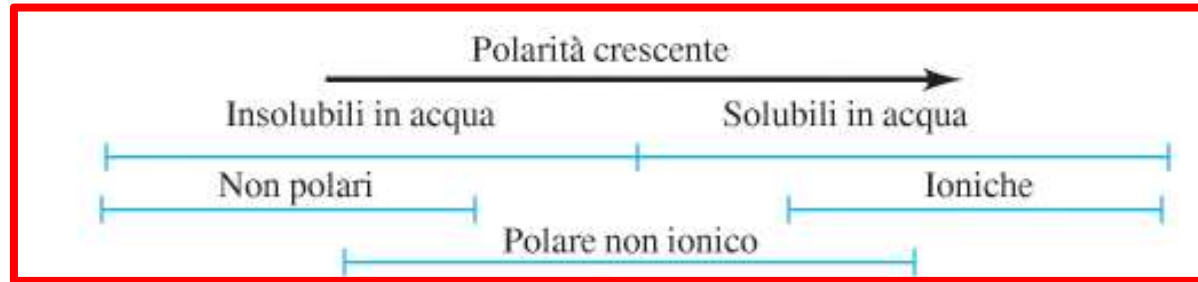
- quanto **puro** deve esser il prodotto finale,
- **quanta** proteina mi occorra alla fine,
- se mi interessa la forma **attiva/conformazione nativa**
oppure no,
- quanto **lavoro/tempo** richiede il metodo,
- il **rappporto resa/costo** del metodo,
- **fallibilità** del metodo.

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)

CROMATOGRAFIE



cromatografia di ripartizione

la fase stazionaria è un liquido che impregna un solido granulare inerte, in cui le sostanze da separare si solubilizzano

Durante l'eluizione le molecole delle sostanze si dispongono (ripartiscono) dinamicamente tra le due fasi a seconda della loro affinità in esse.

le fasi (stazionaria e mobile) devono essere immiscibili fra loro.

ESEMI gascromatografia e la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)

Il fenomeno della ripartizione viene sfruttato per la separazione in colonna degli analiti, che a seconda delle caratteristiche chimico fisiche si legheranno più o meno stabilmente alla fase stazionaria e quindi avranno diverso tempo di ritenzione.

Cromatografia in fase inversa

La cromatografia in fase inversa è una tecnica di separazione in cromatografia liquida molto utilizzata

la cromatografia in fase inversa comprende:

- una fase mobile polare (solitamente miscele di acqua o tampone con solventi polari come il metanolo, l'acetonitrile o il tetraidrofurano)
- una fase stazionaria non polare come, ad es. un idrocarburo a catena lunga legato ad un supporto di silice o ibrido

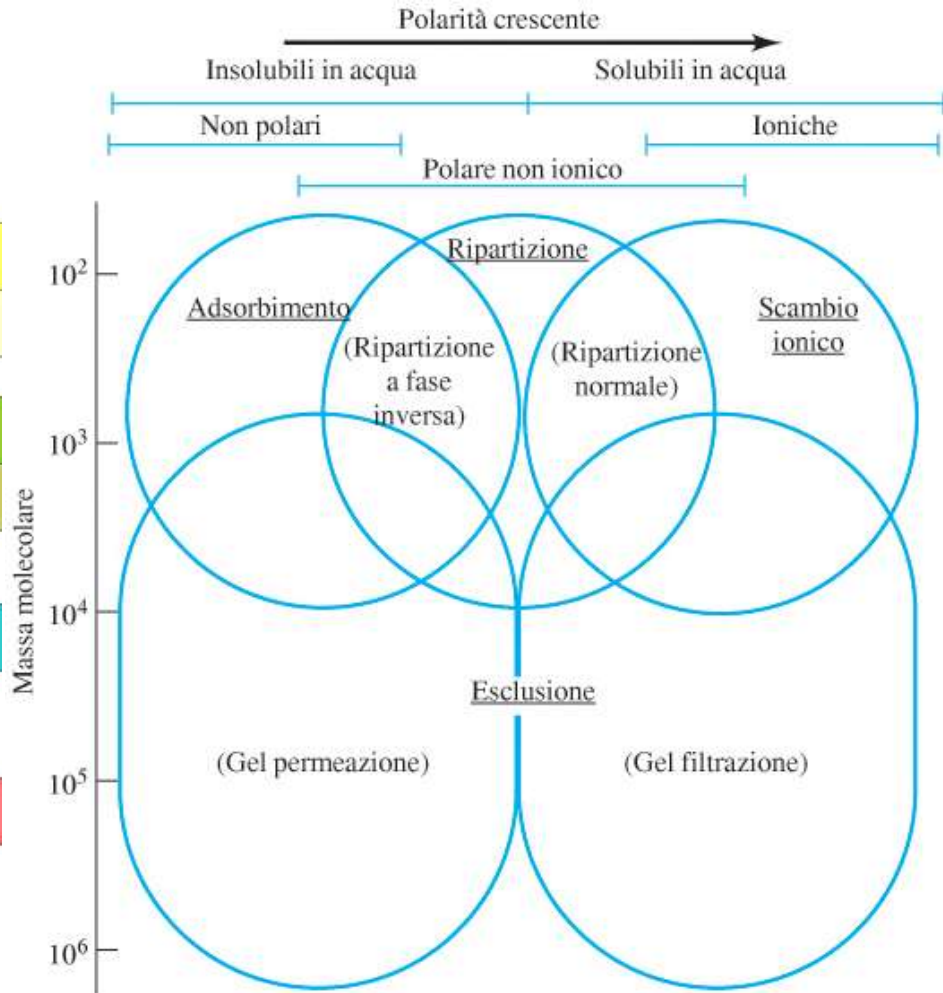
... il primo componente a eluire dalla colonna è il più polare (meno trattenuto nella fase stazionaria e più solubile in quella mobile)....

CLASSIFICAZIONE

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

CLASSIFICAZIONE

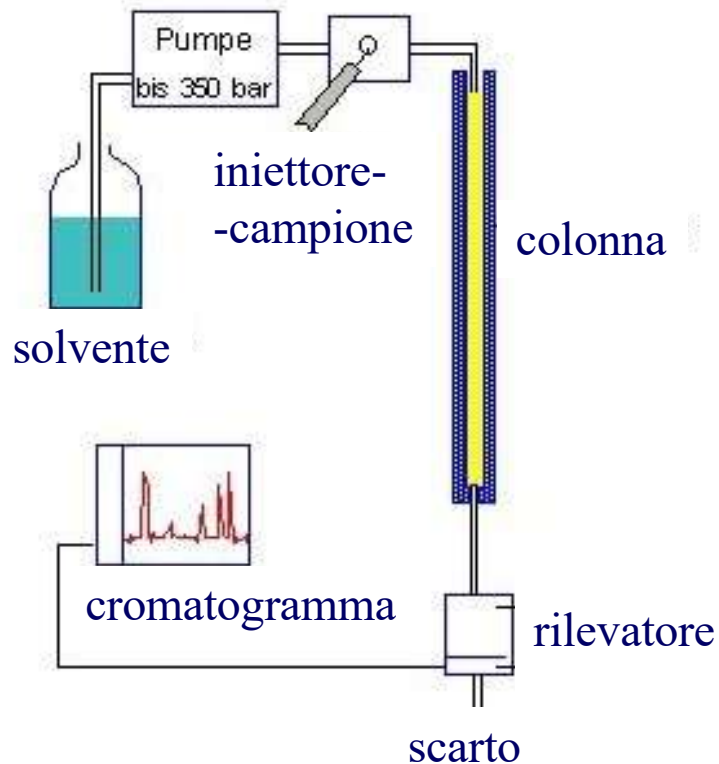
CHROMATOGRAPHIC PRINCIPLE	Physical state of mobile phase	Type of Chromatography
Adsorption Chromatography Competition between a solid adsorbent and mobile phase	Gas	GC / GSC
	Liquid	LC / HPLC TLC / PC
Partition Chromatography Competition between a liquid stationary phase and mobile phase	Gas	GC / GLC 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 LIQUIDA AD ALTE PRESTAZIONI (HPLC)



Evoluzione strumentale delle cromatografie in fase liquida su colonna classica.



Separazioni efficienti in tempi ridotti e di effettuare analisi qualitative e/o quantitative.

In HPLC il flusso di fase mobile è garantito da un sistema di pompe.

CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTE PRESTAZIONI (HPLC)



Evoluzione strumentale delle cromatografie in fase liquida su colonna classica.

