

# 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

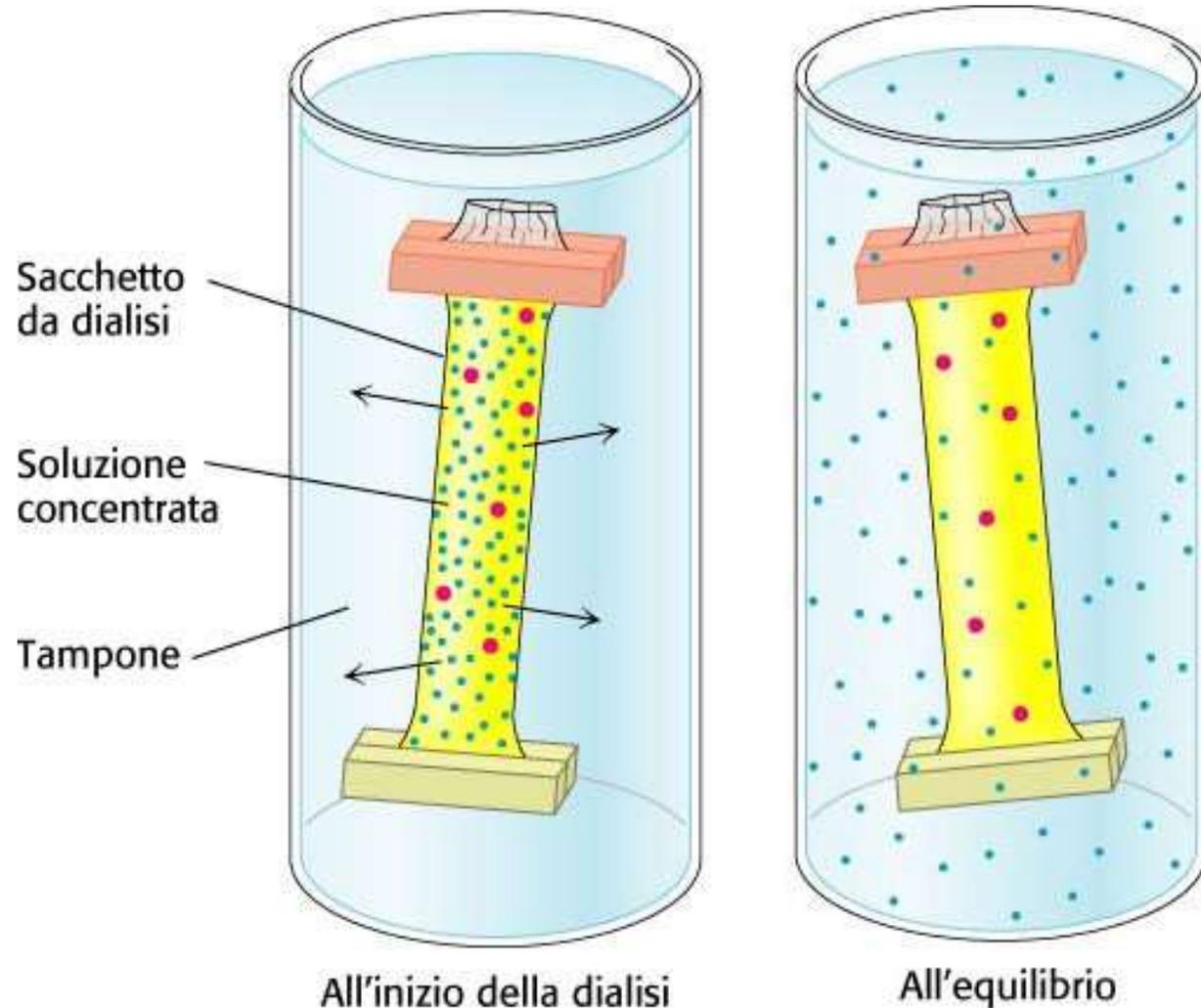
# PROPRIETÀ DELLE PROTEINE SFRUTTATE PER PURIFICARLE (1)

- 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)

# 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.

# 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

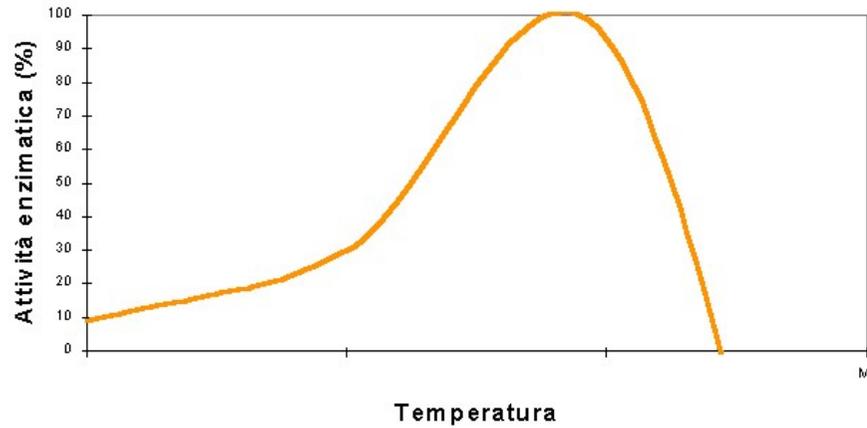
pI

forma, dimensione, densità

forma, dimensione

# FRAZIONAMENTO PER DENATURAZIONE

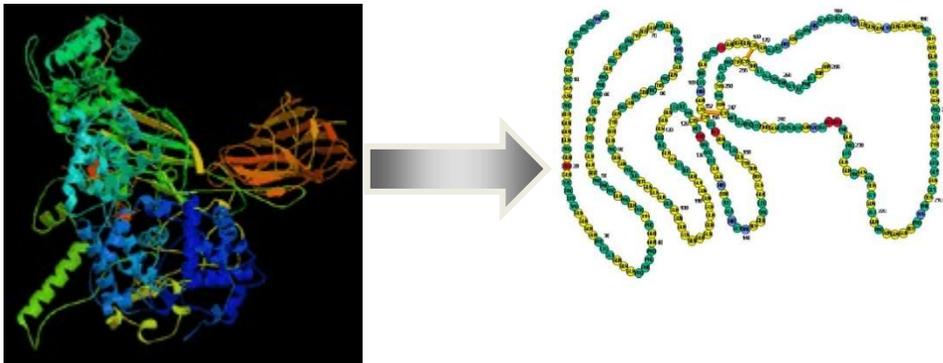
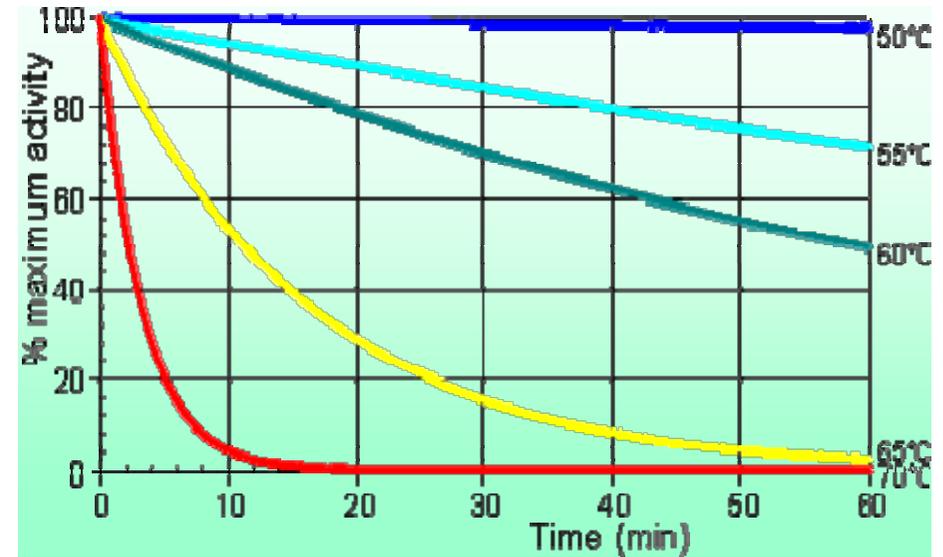
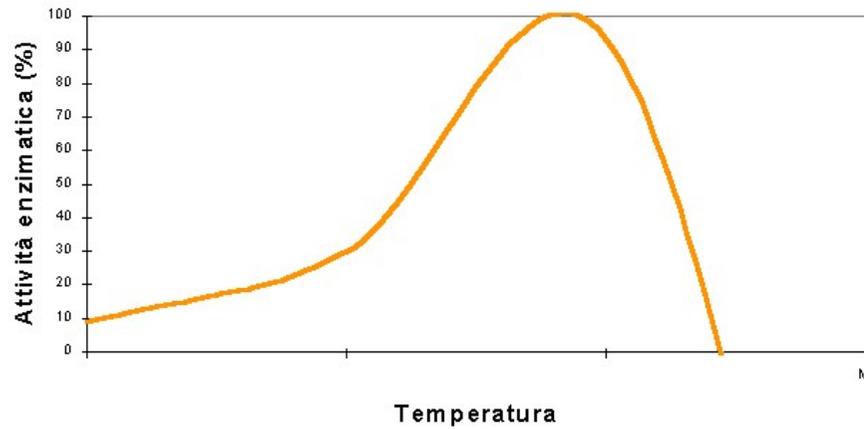
Influenza della temperatura sull'attività enzimatica (Kunze, 1999)



Proprietà sfruttata:  
**STABILITÀ** delle proteine.

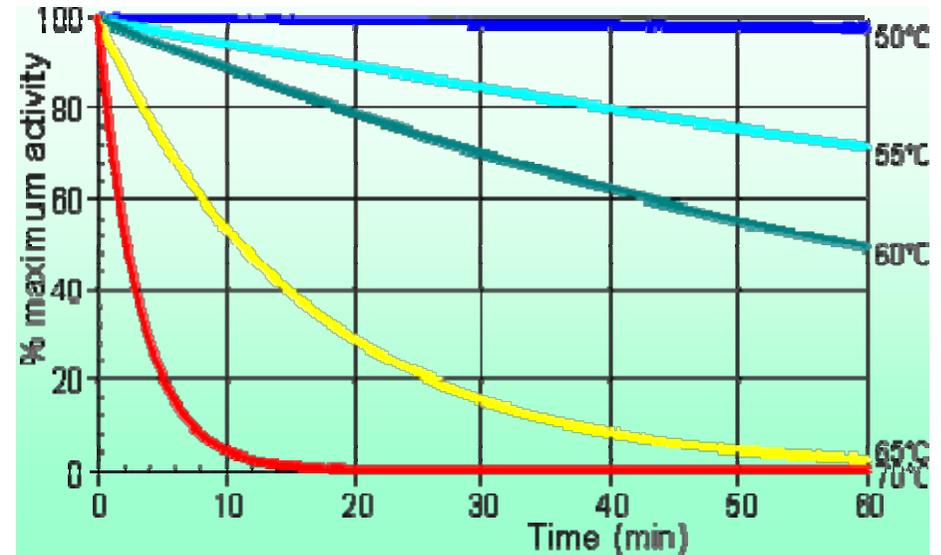
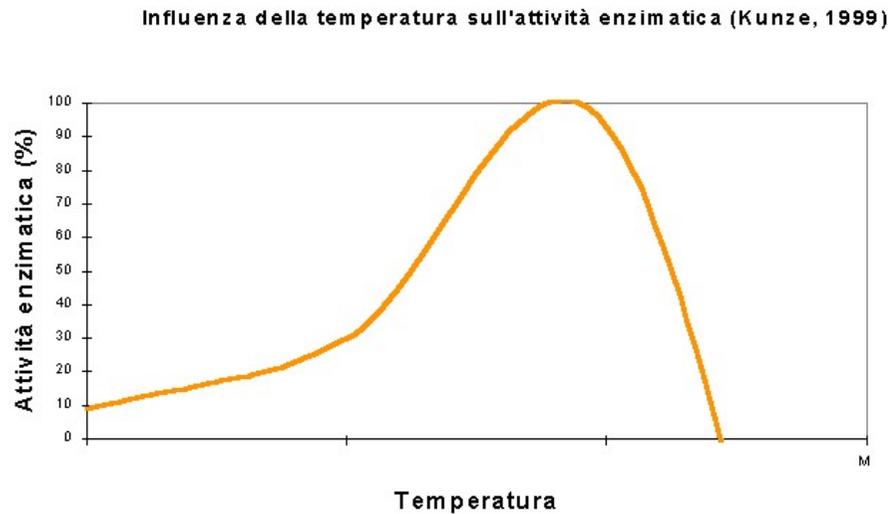
# FRAZIONAMENTO PER DENATURAZIONE

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

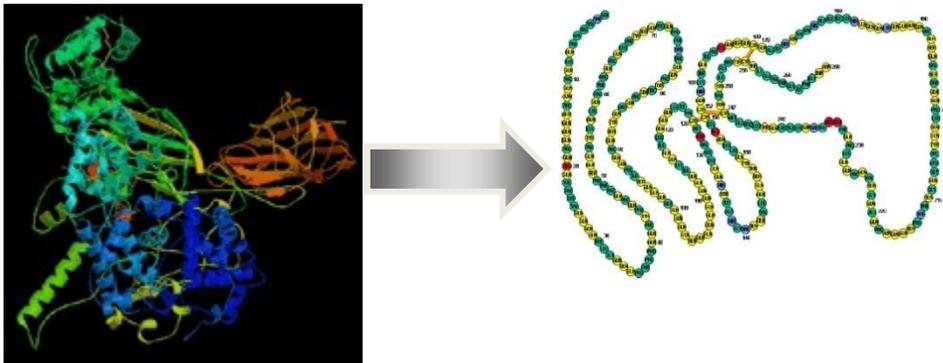


Proprietà sfruttata:  
**STABILITÀ** delle proteine.

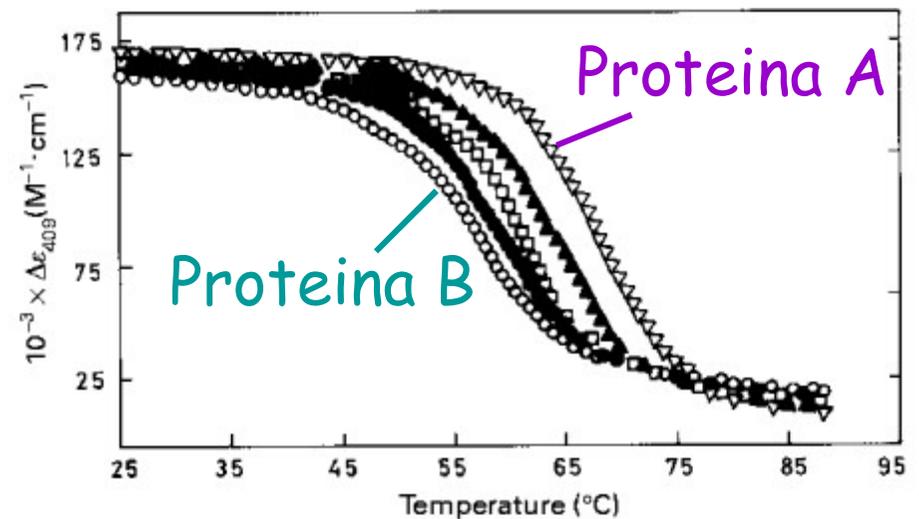
# FRAZIONAMENTO PER DENATURAZIONE



Differente sensibilità delle proteine al calore

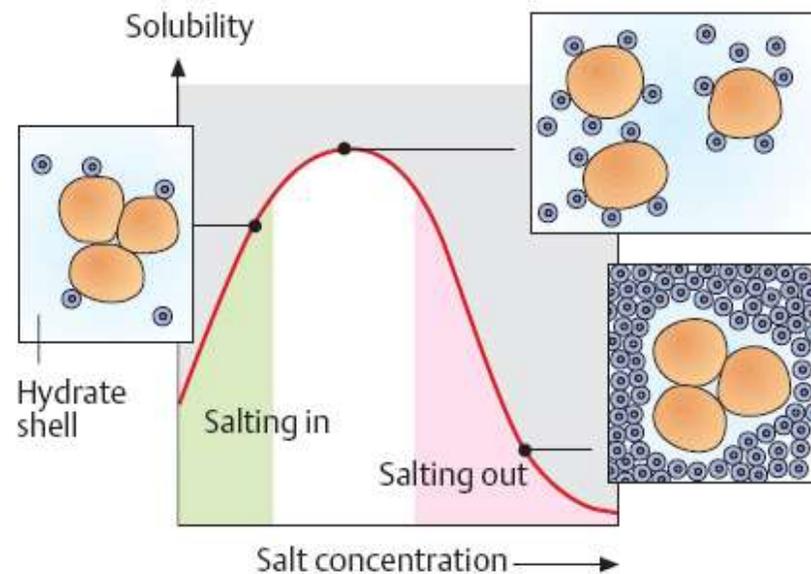


Proprietà sfruttata:  
**STABILITÀ** delle proteine.



# FRAZIONAMENTO SALINO o SALTING OUT

Proprietà sfruttata:  
**SOLUBILITÀ**  
delle proteine.



Solfato  
d'ammonio

Soluzione di  
fibrinogeno  
ed albumina



Precipitazione

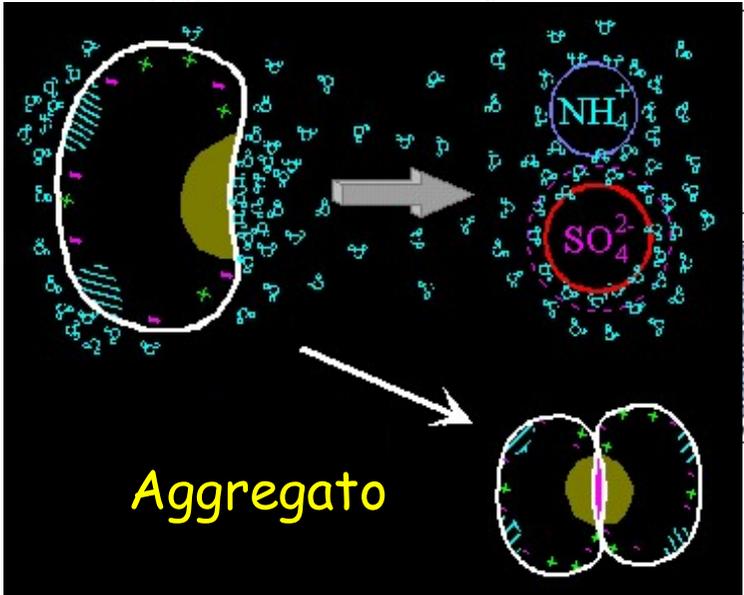


Albumina solubile

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

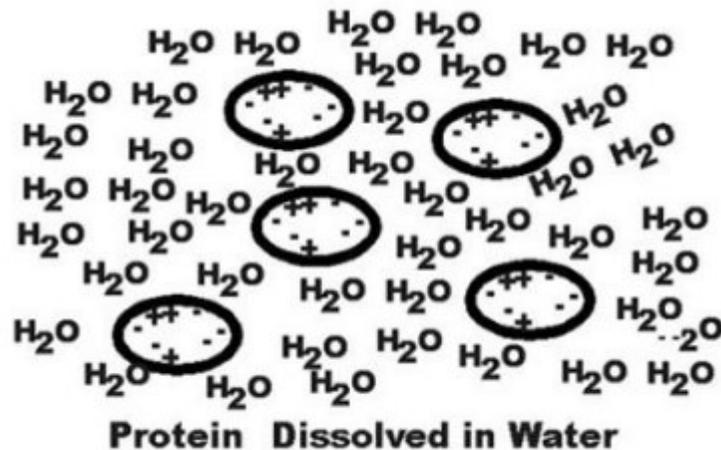


## FRAZIONAMENTO SALINO o SALTING OUT

Proprietà sfruttata:

**SOLUBILITÀ**

delle proteine.



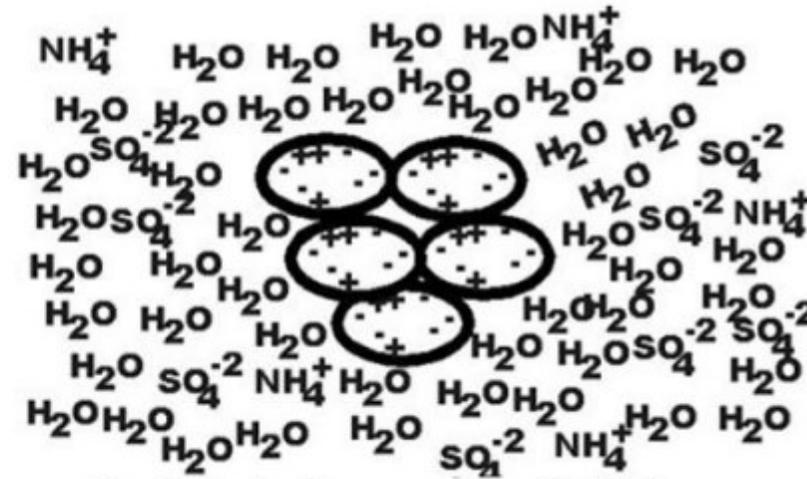
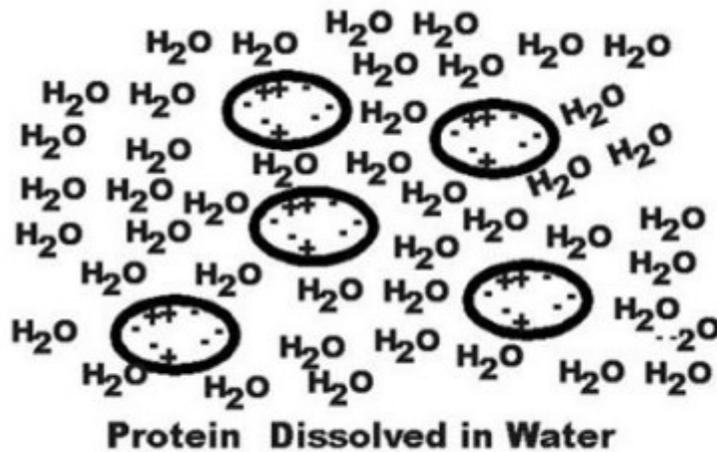
L'eccesso di cariche, dopo aver saturato la proteina, la destabilizzano  
entrando in **competizione** con essa **per il solvente**

## 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.**

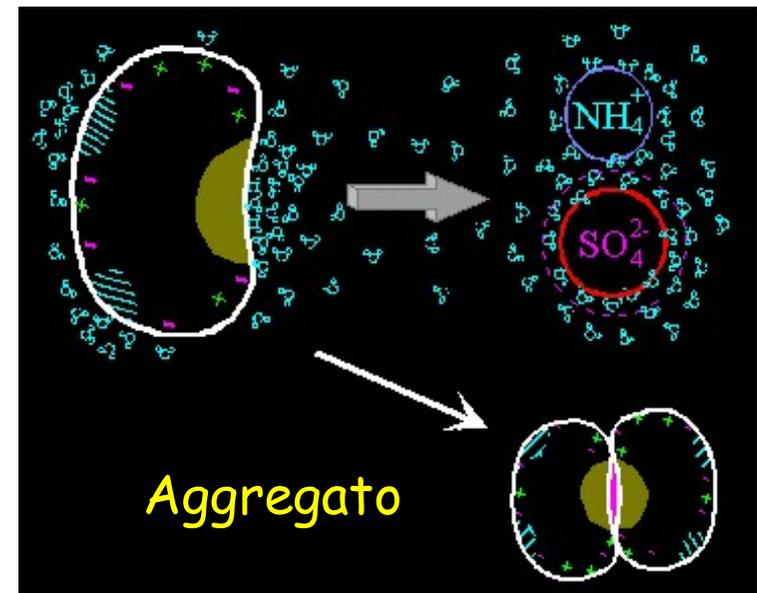
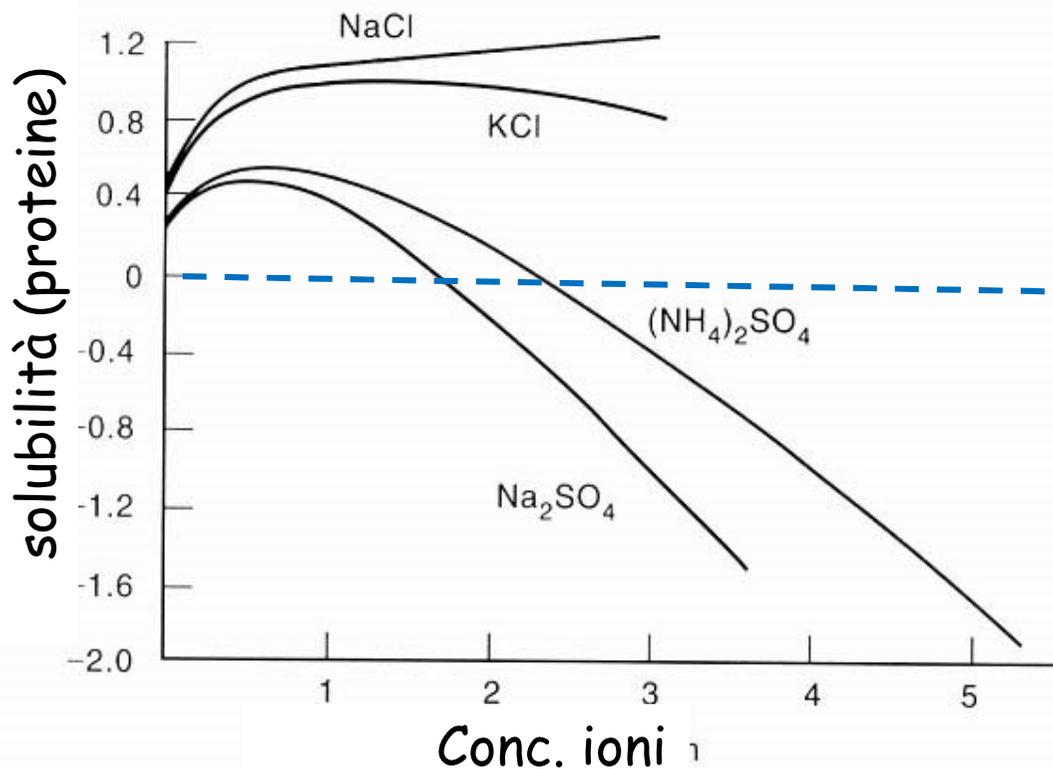
Poiché le cariche di superficie delle varie specie di proteine sono differenti, ognuna di esse ha un proprio punto di precipitazione che corrisponde ad una determinata **concentrazione di sale**. In questo modo, usando una concentrazione di sale ad hoc, possiamo isolare una o un gruppo di proteine da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

# FRAZIONAMENTO SALINO o SALTING OUT

Proprietà sfruttata:  
**SOLUBILITA'**  
delle proteine.

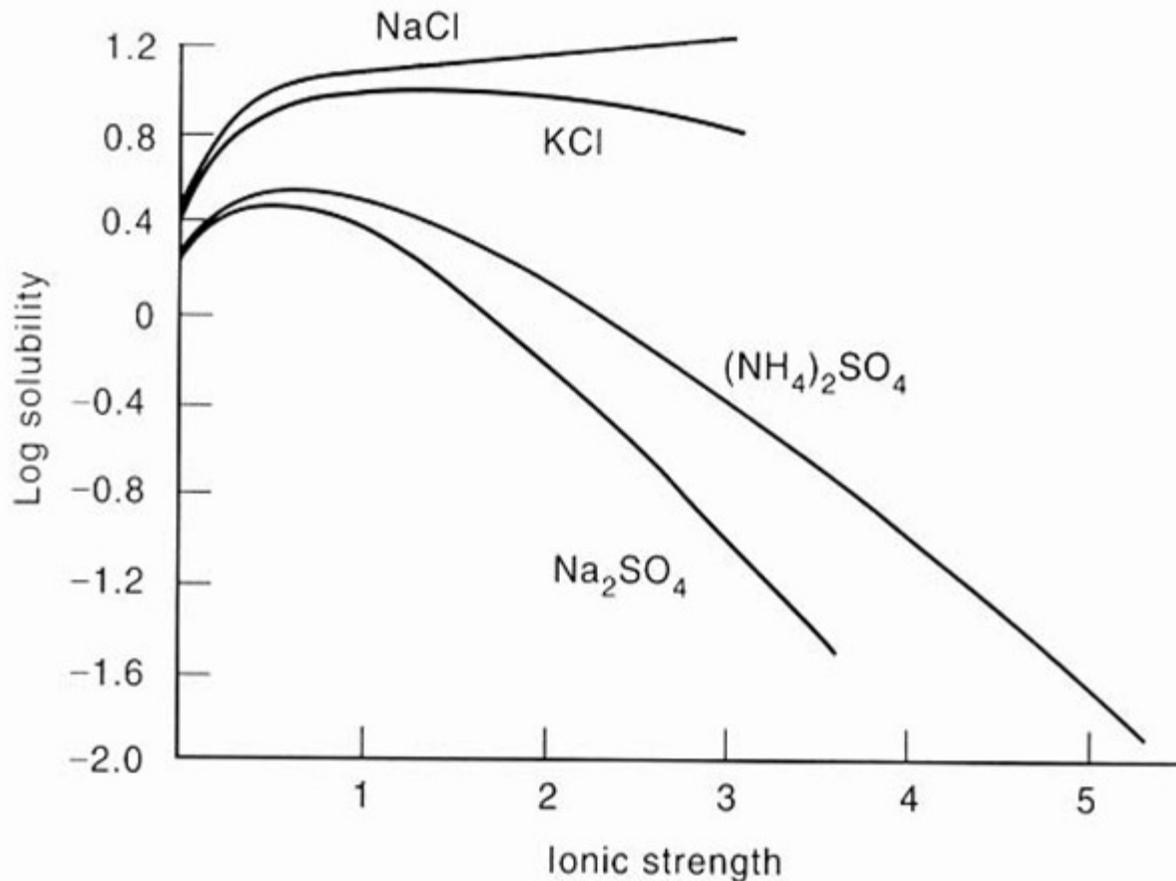
Le proteine sono solitamente solubili in  $H_2O$ ; tale solubilità è anche in funzione della forza ionica della soluzione.

## 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.)

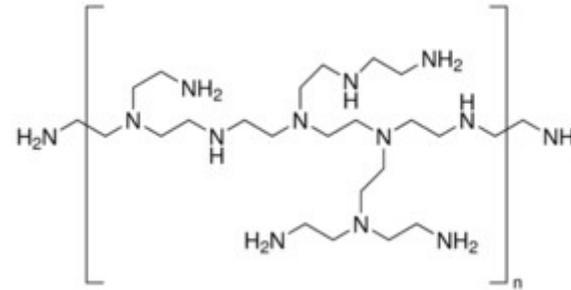


In condizioni normali le proteine si aggregano per attrazione tra le cariche di superficie e precipitano. Quando viene aggiunto il sale gli ioni da esso derivanti interagiscono con le cariche elettriche di superficie delle proteine neutralizzandole e impedendo la formazione di aggregati.

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 H<sub>2</sub>O

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.

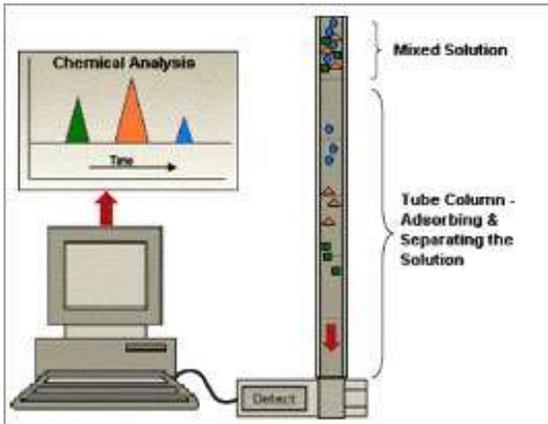
## Low ionic strength

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

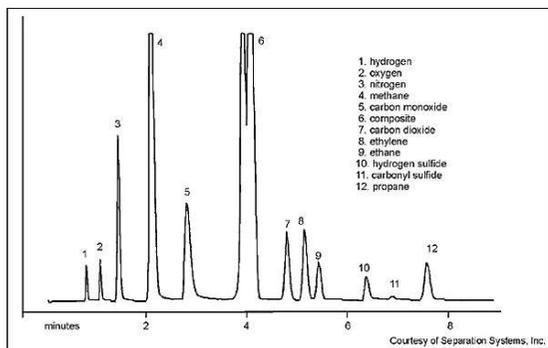
## Removal of PEI

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](#).





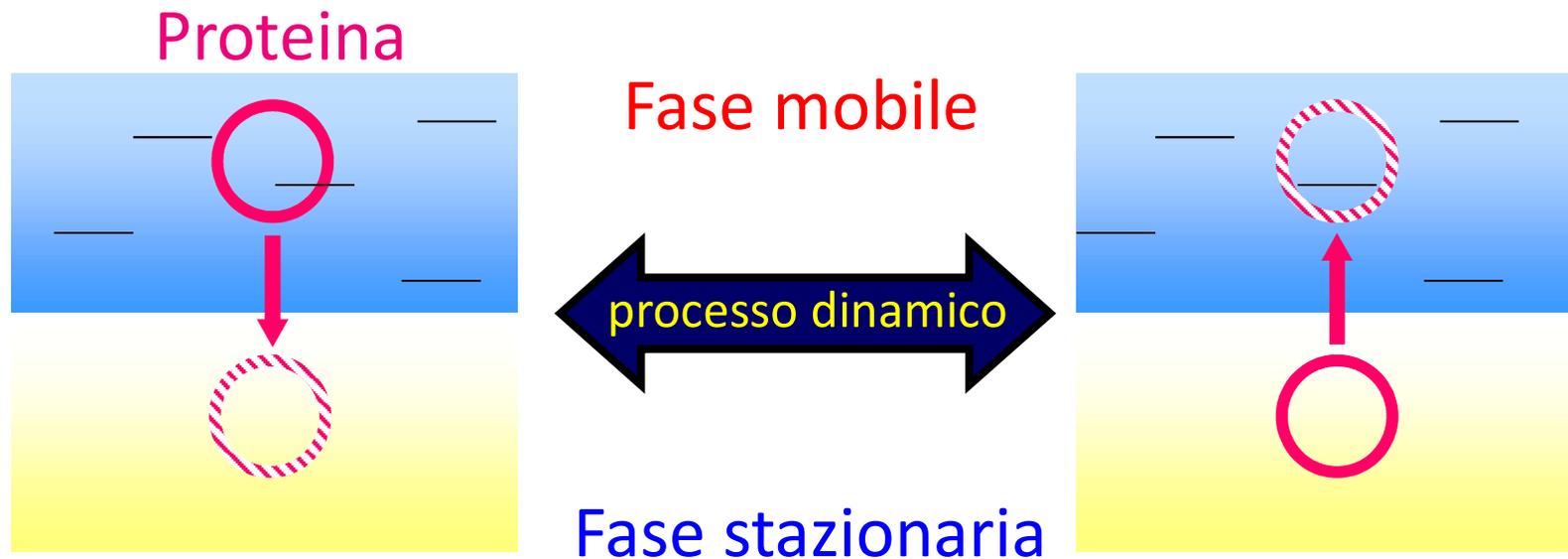
# TECNICHE CROMATOGRAFICHE



# 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**.



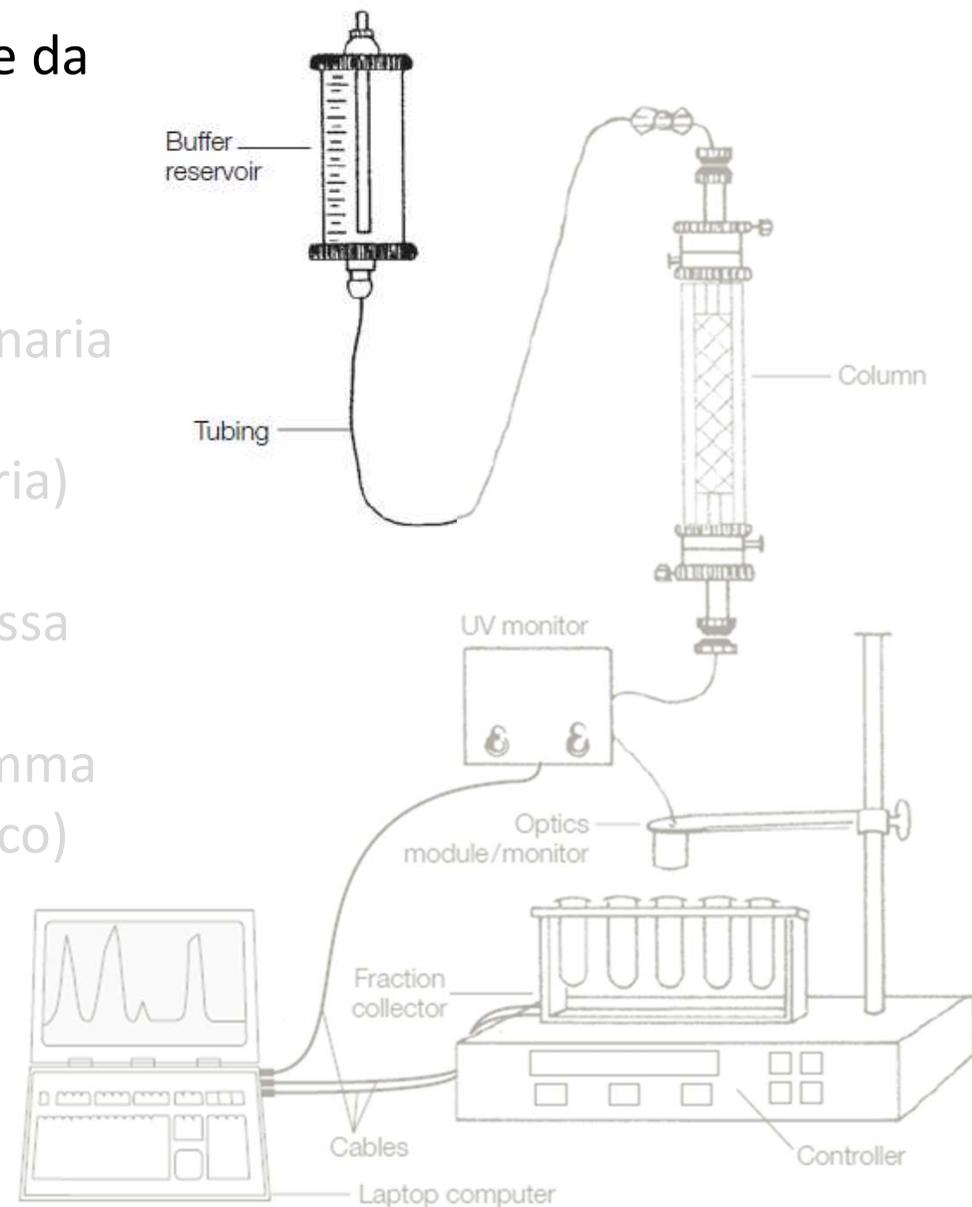
# SCHEMA SISTEMA CROMATOGRAFICO SU COLONNA

- **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)

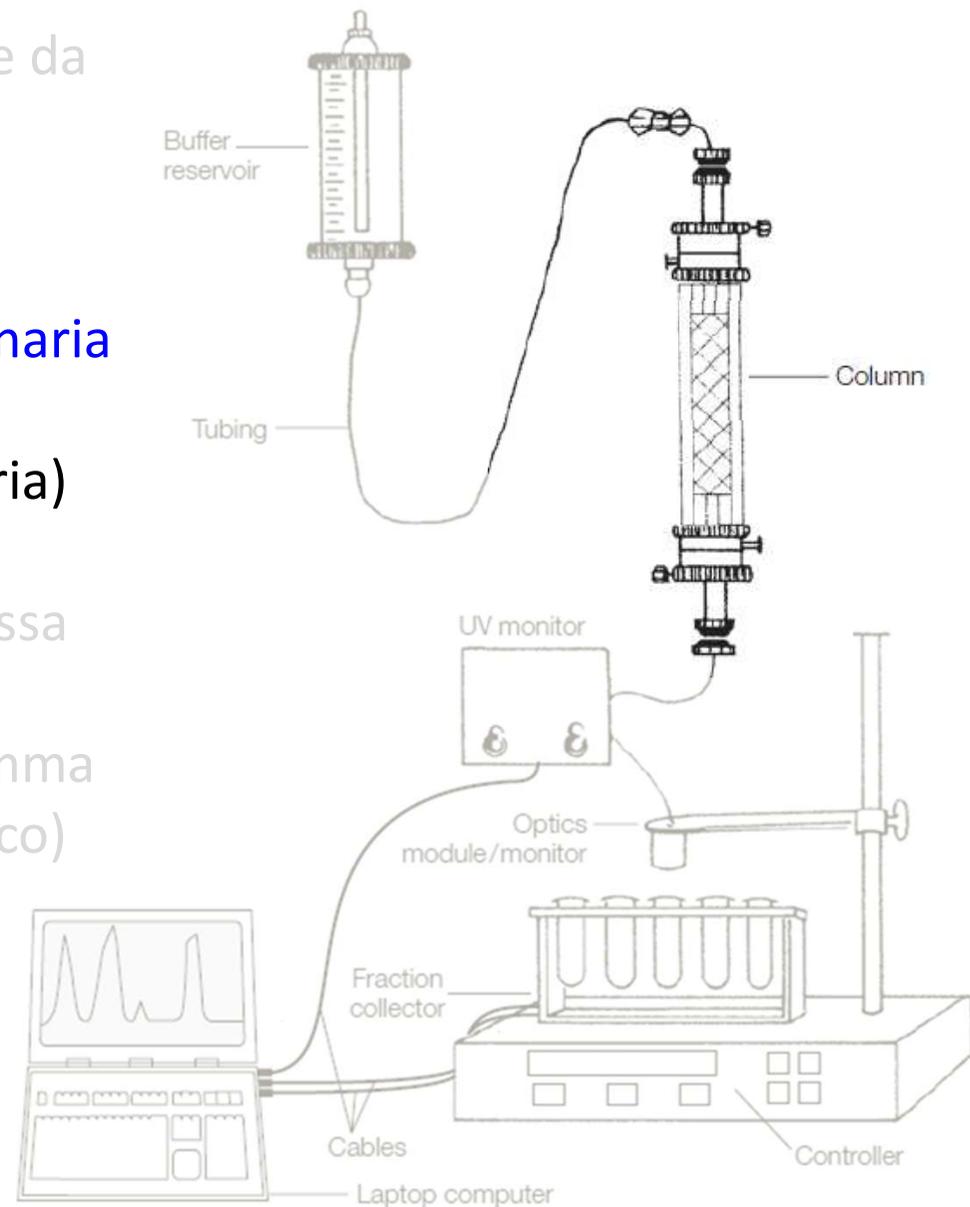
- Rivelatore (es. UV) attraverso cui passa l'eluato in uscita dalla colonna  
Segnale registrato come cromatogramma (ogni composto identificato come picco)

- Raccoglitore di frazioni collegato al rivelatore, raccoglie un volume prefissato in più provette



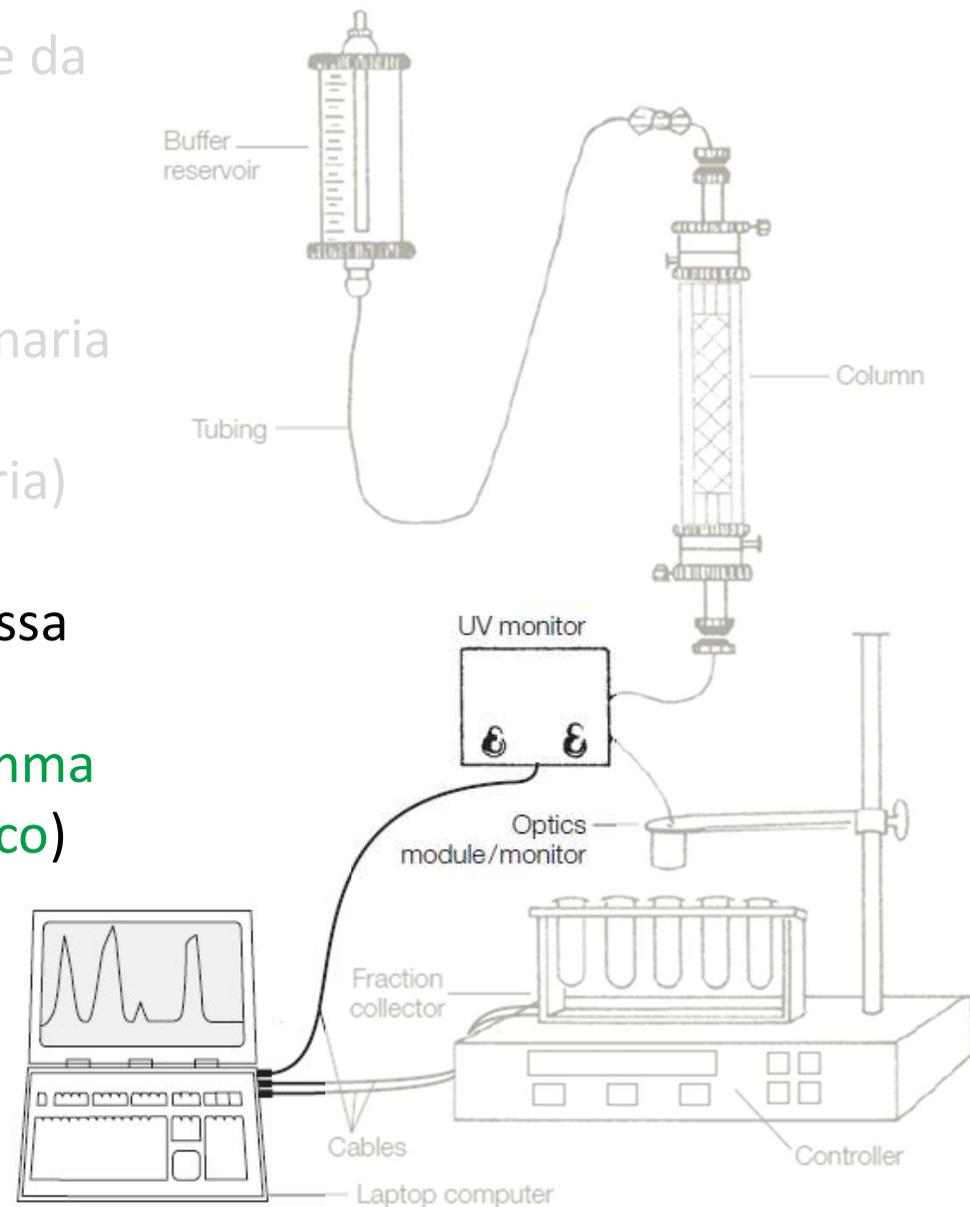
# SCHEMA SISTEMA CROMATOGRAFICO SU COLONNA

- 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



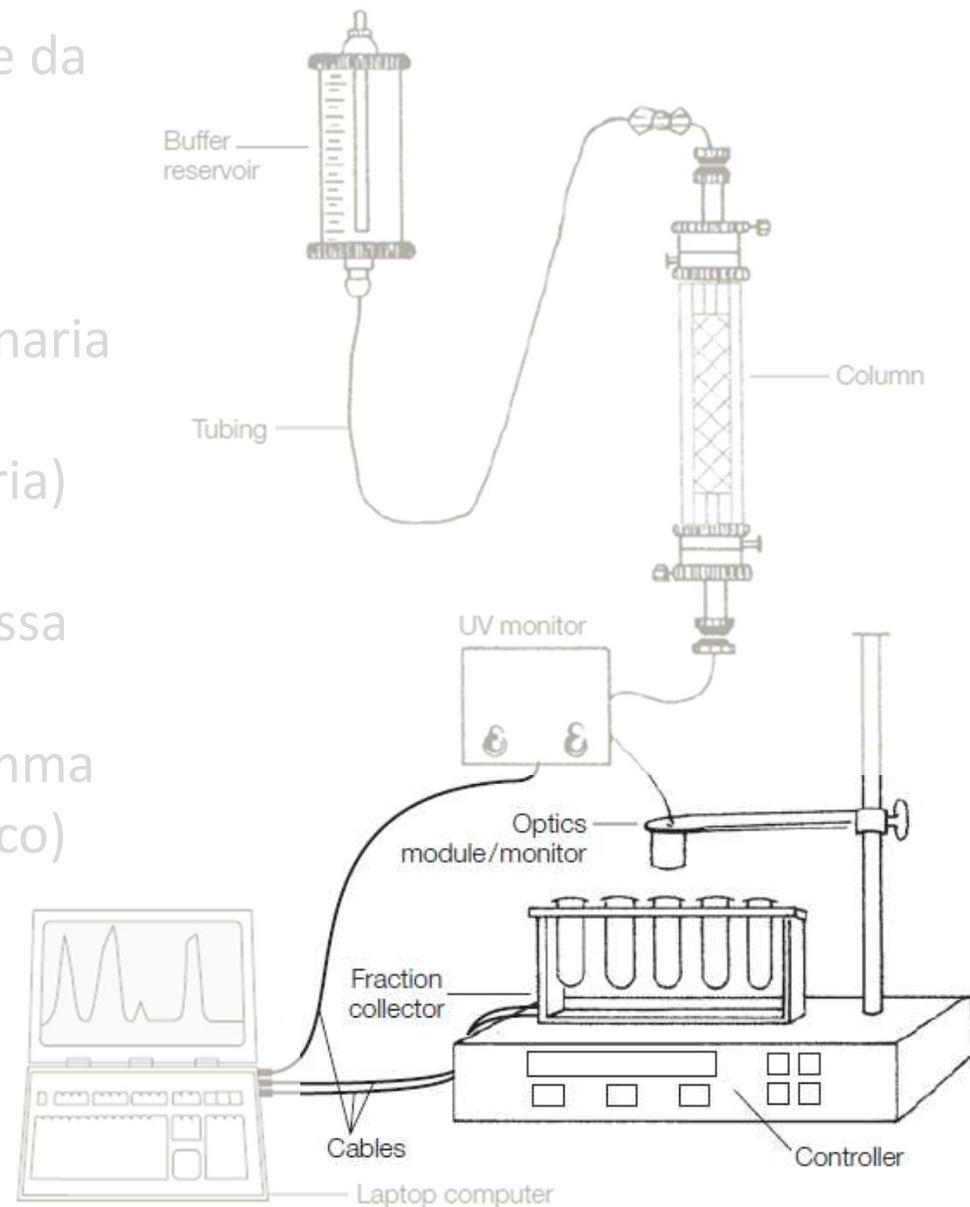
# SCHEMA SISTEMA CROMATOGRAFICO SU COLONNA

- 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



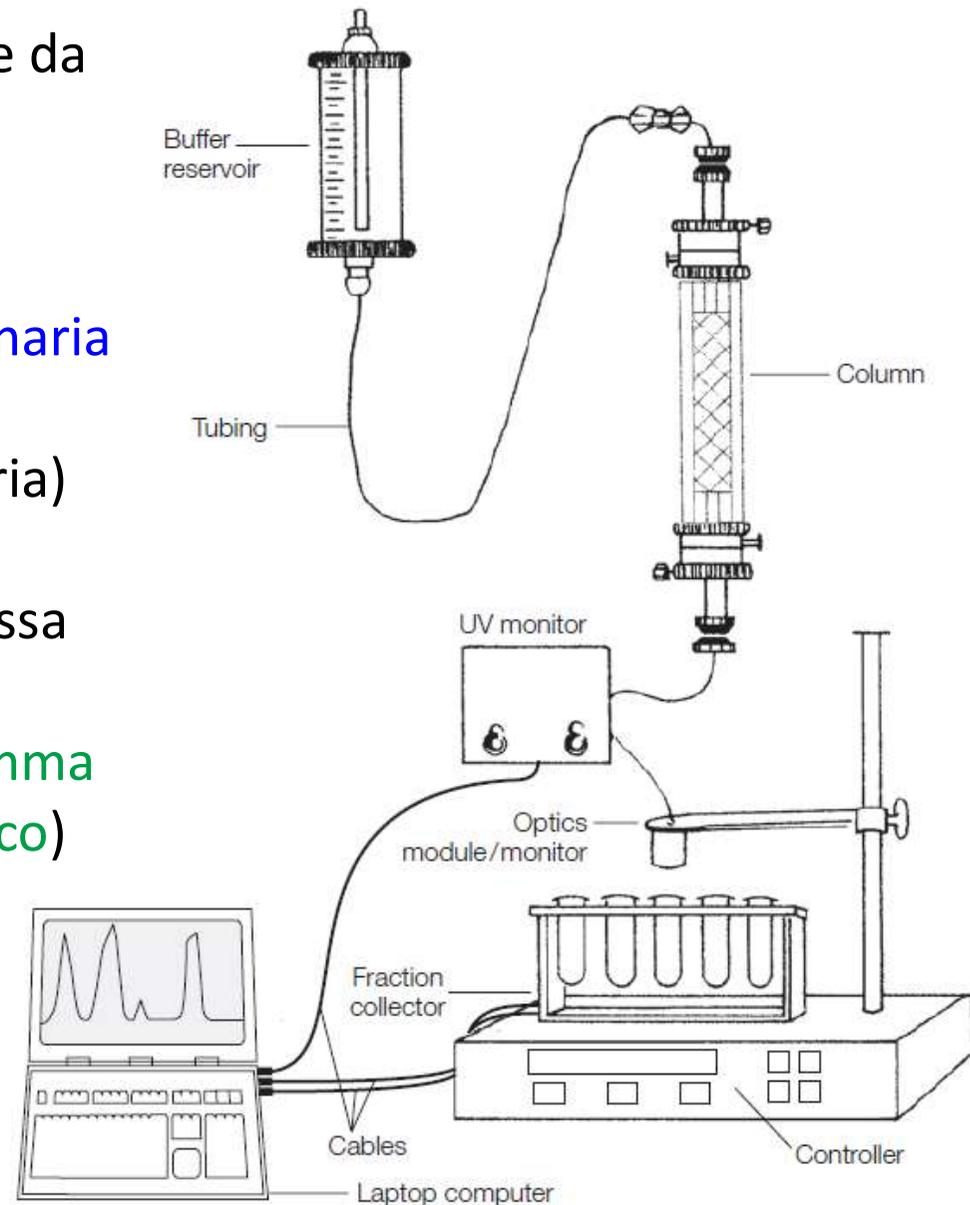
# SCHEMA SISTEMA CROMATOGRAFICO SU COLONNA

- 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



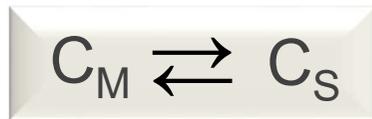
# SCHEMA SISTEMA CROMATOGRAFICO SU COLONNA

- **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



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

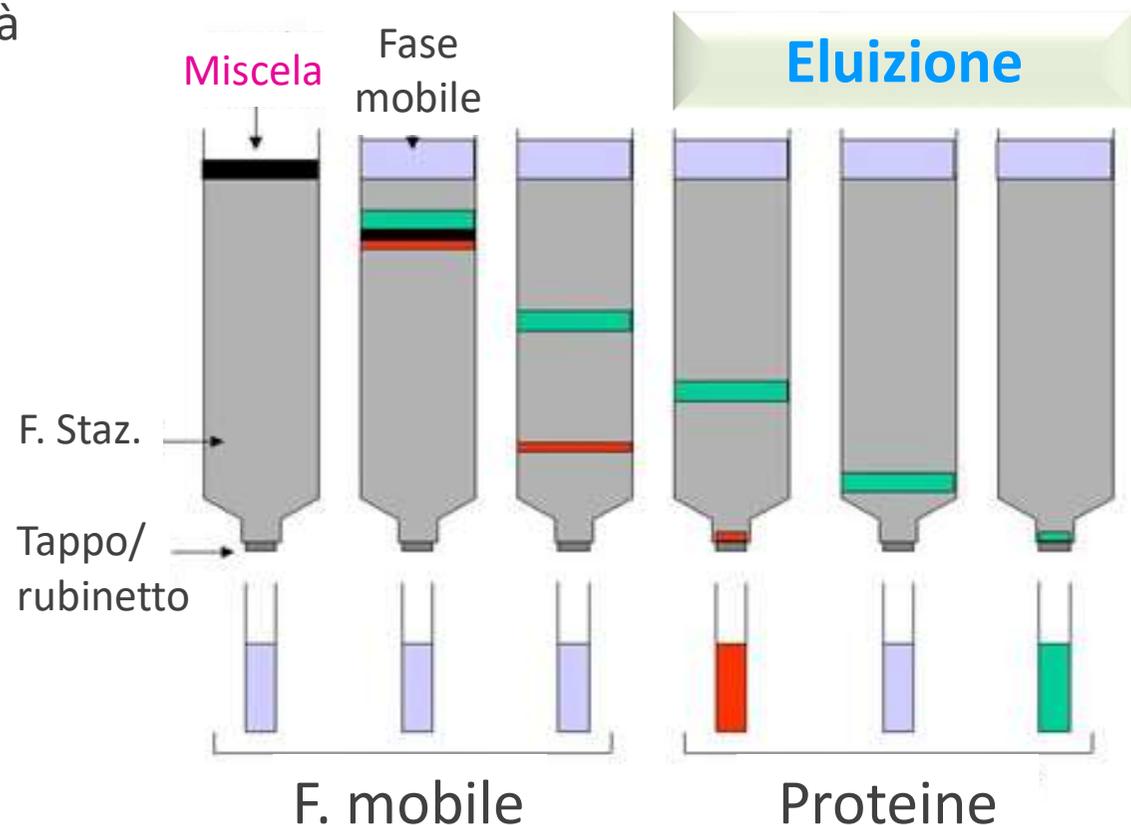
$K$  = coefficiente di distribuzione  
(diverso per ogni componente)

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

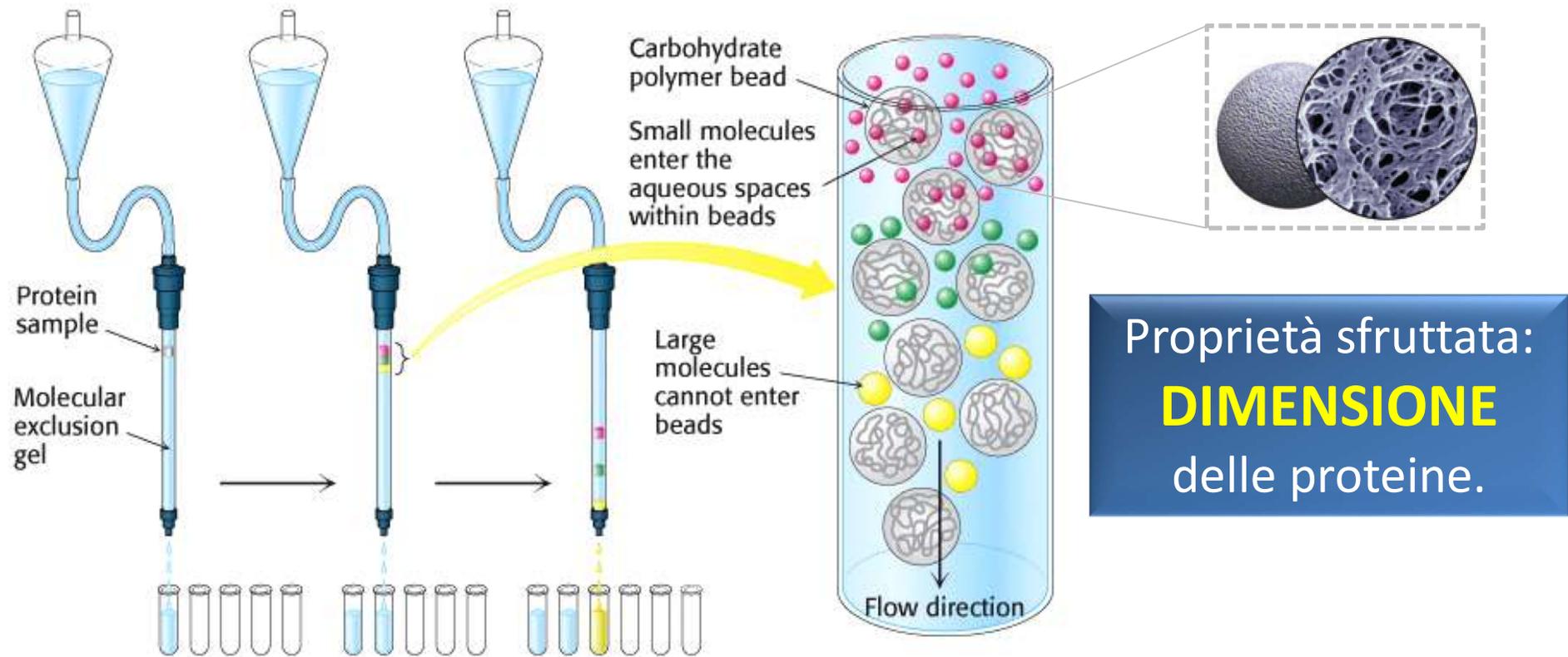
**Velocità di flusso (flow rate):**

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





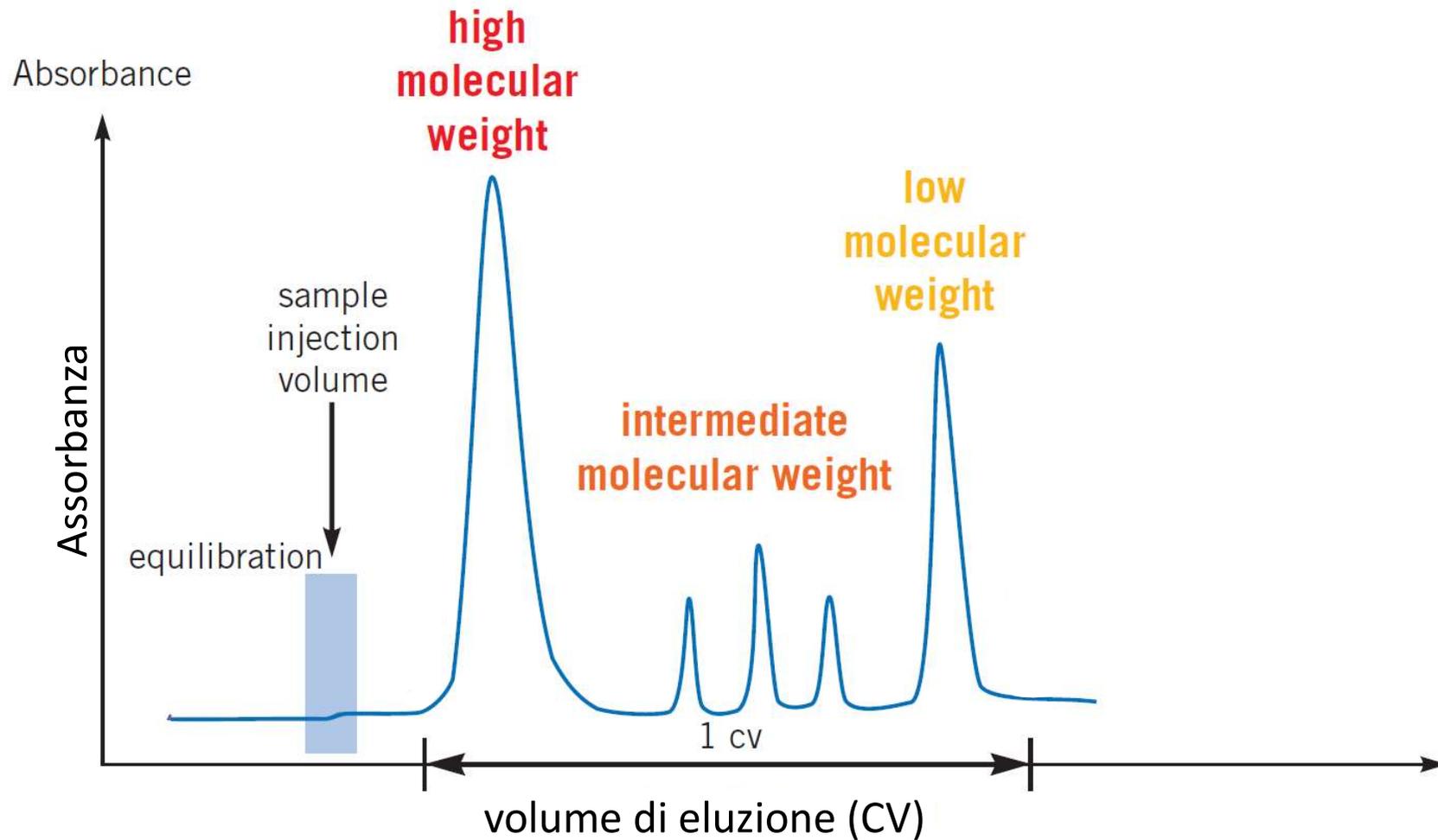
# CROMATOGRAFIA PER FILTRAZIONE SU GEL (o "size-exclusion")



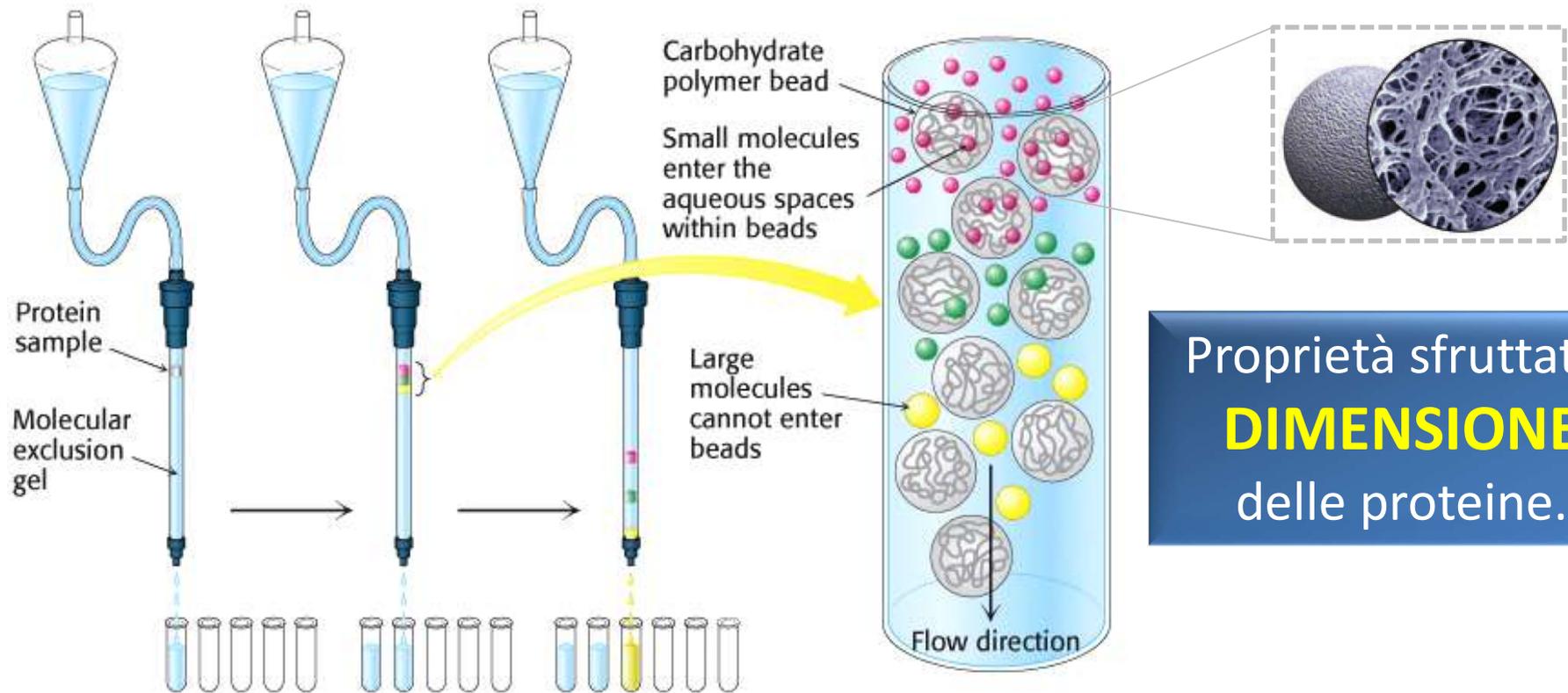
Quali molecole escono prima dalla colonna??

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

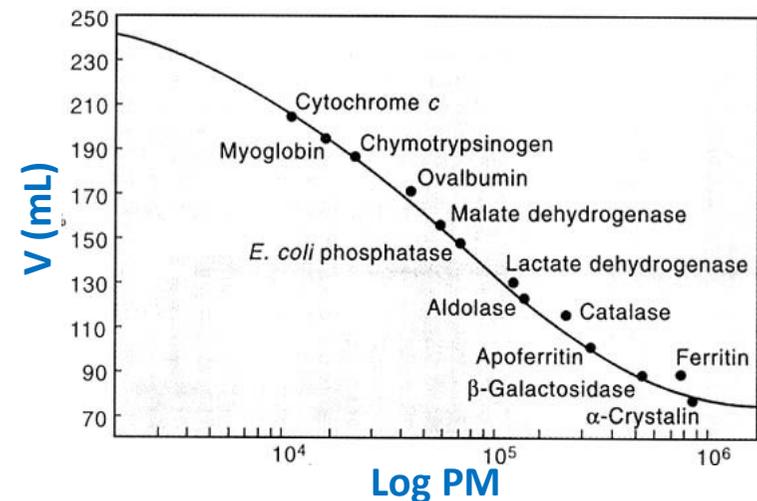
Le prime ad essere eluite sono le molecole grandi



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



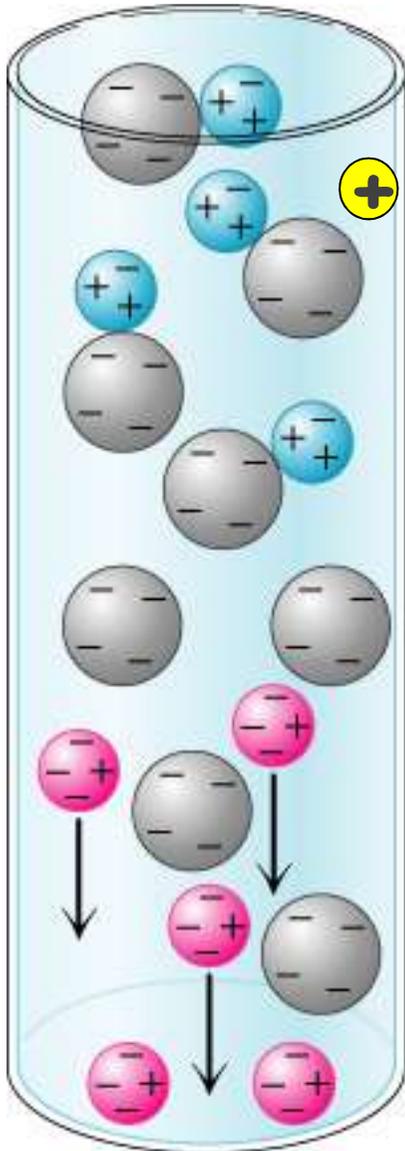
Ordine di uscita dei campioni **opposto** rispetto all' SDS-PAGE.





# CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

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



## Fase stazionaria

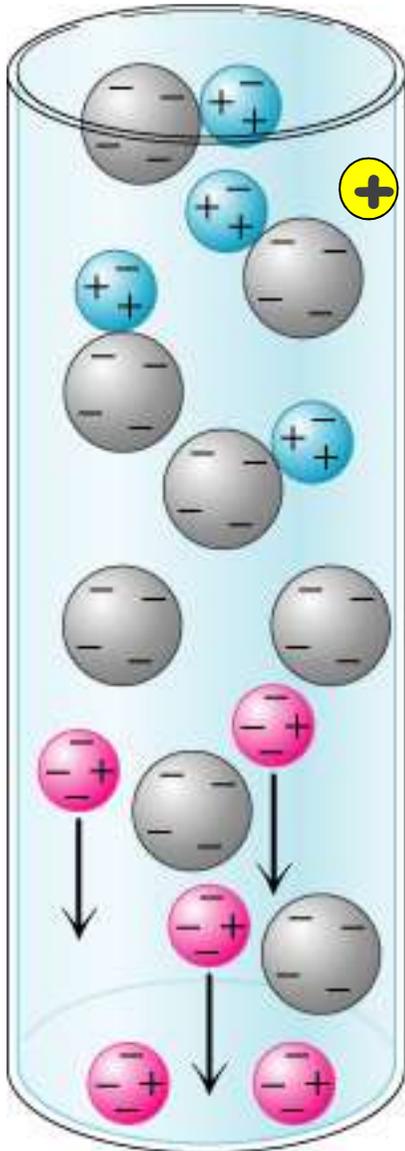
Resine che hanno la funzione di:

- 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 (+)

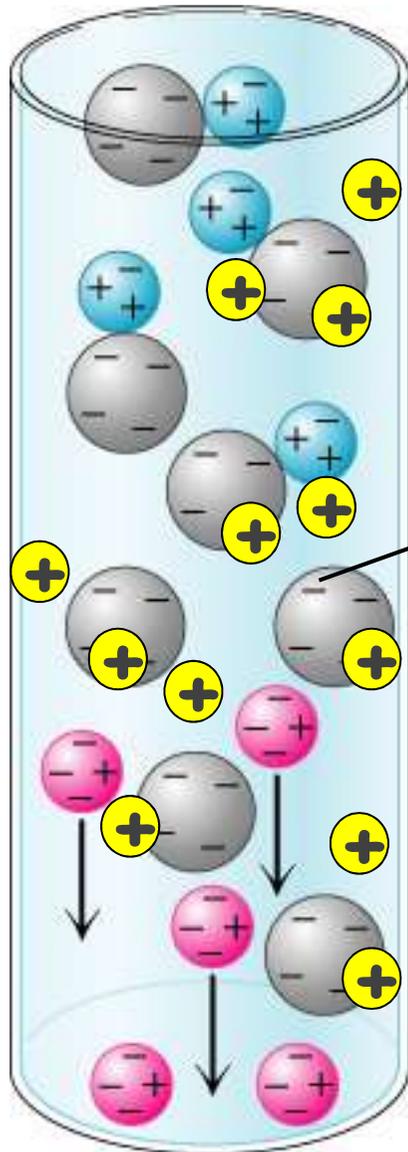
Proprietà sfruttata:  
**CARICA NETTA**  
delle proteine.

Separazione della molecola di interesse  
conoscendone la carica.

# CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

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

1<sup>a</sup> fase: **legame**



Le proteine cariche positivamente si legano a granuli carichi negativamente

Scambiatore cationico

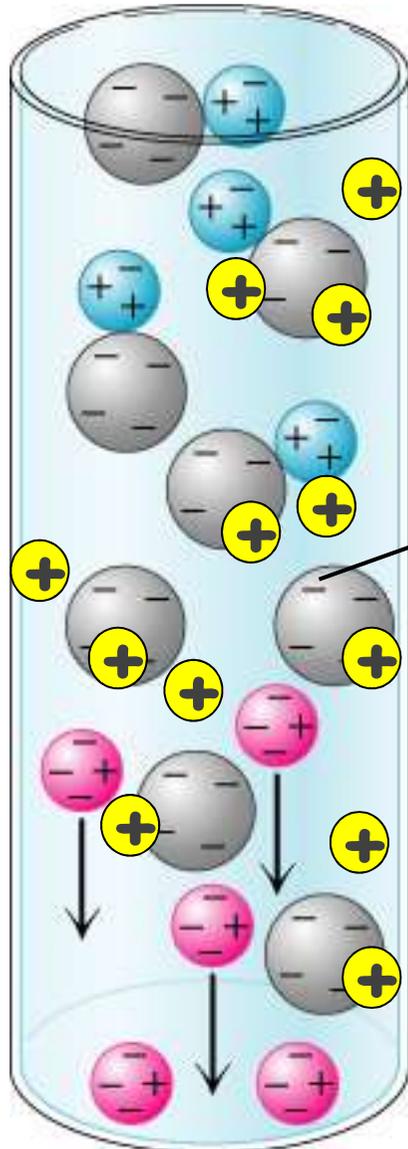
Le proteine cariche negativamente passano attraverso la colonna

Separazione della molecola di interesse **conoscendone la carica.**

# CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

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

1<sup>a</sup> fase: **legame**

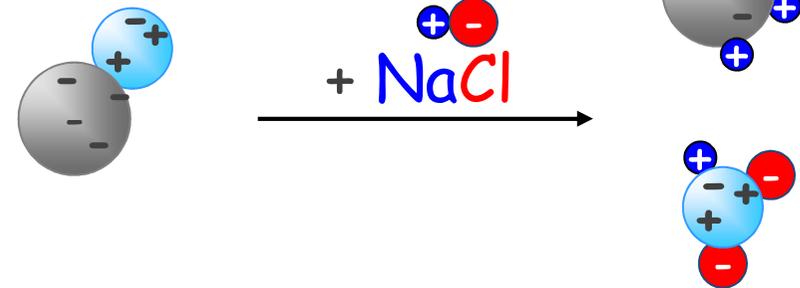


Le proteine cariche positivamente si legano a granuli carichi negativamente

Scambiatore cationico

Le proteine cariche negativamente passano attraverso la colonna

2<sup>a</sup> fase: **eluizione**



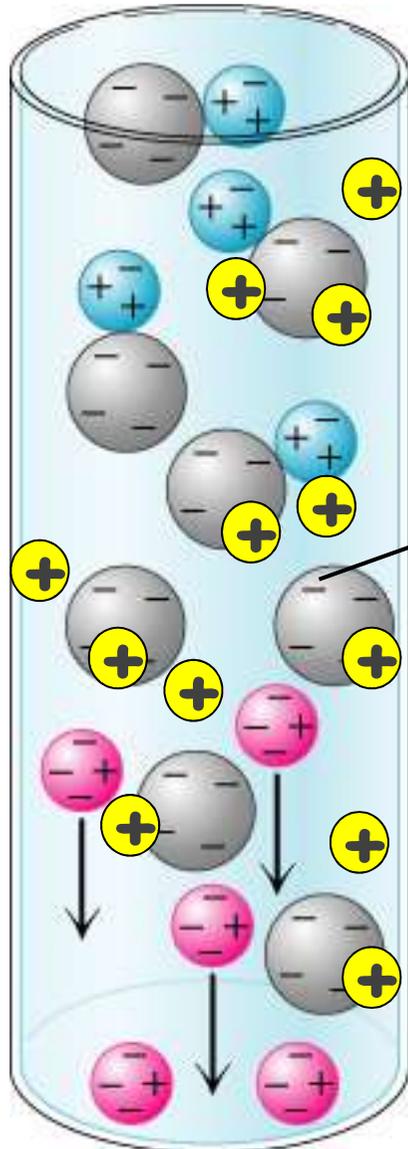
Proprietà sfruttata:  
**CARICA NETTA**  
delle proteine.

Separazione della molecola di interesse conoscendone la carica.

# CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

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

1<sup>a</sup> fase: **legame**

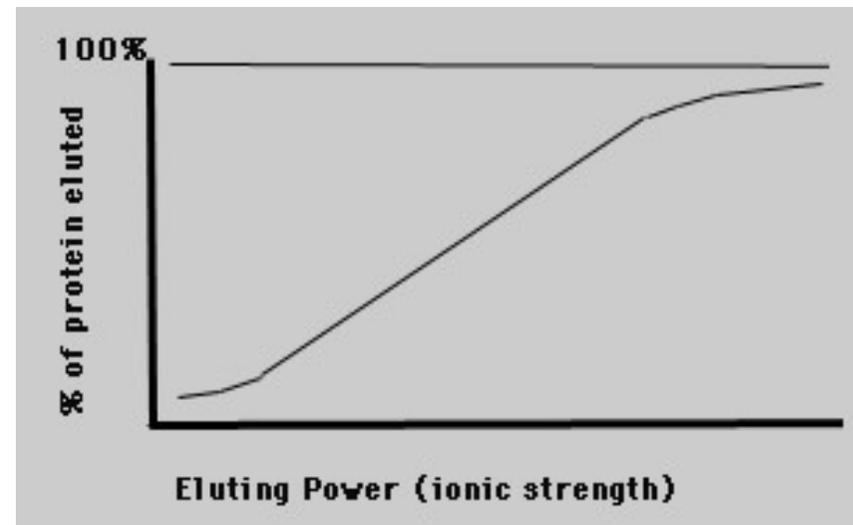
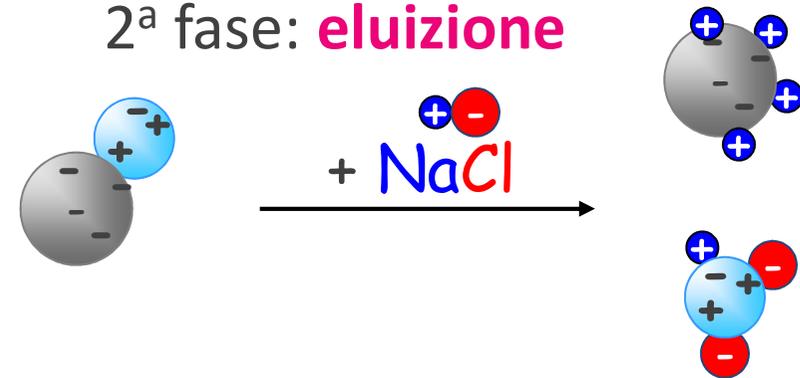


Le proteine cariche positivamente si legano a granuli carichi negativamente

Scambiatore cationico

Le proteine cariche negativamente passano attraverso la colonna

2<sup>a</sup> fase: **eluizione**

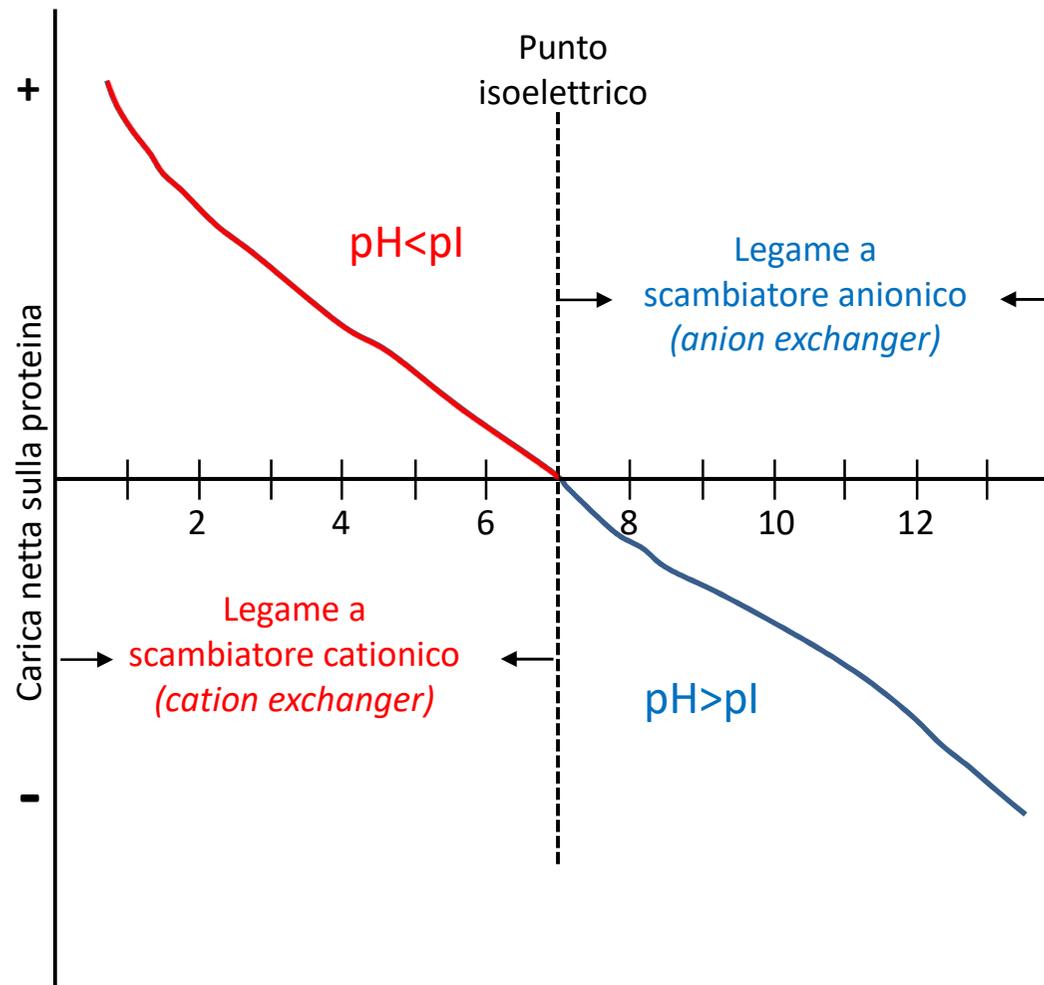


Separazione della molecola di interesse conoscendone la carica.

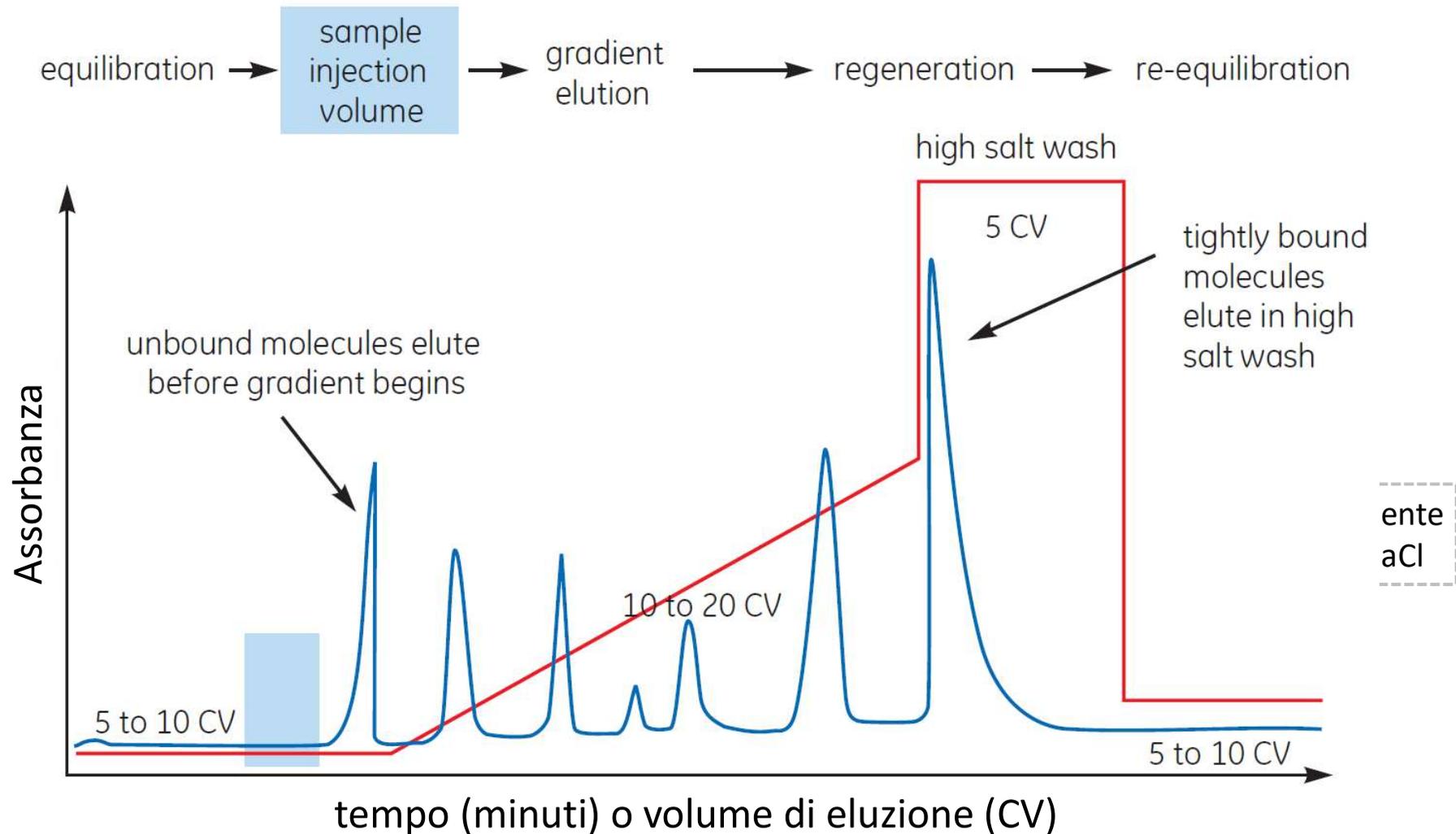
## CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO - Effetto del pH

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

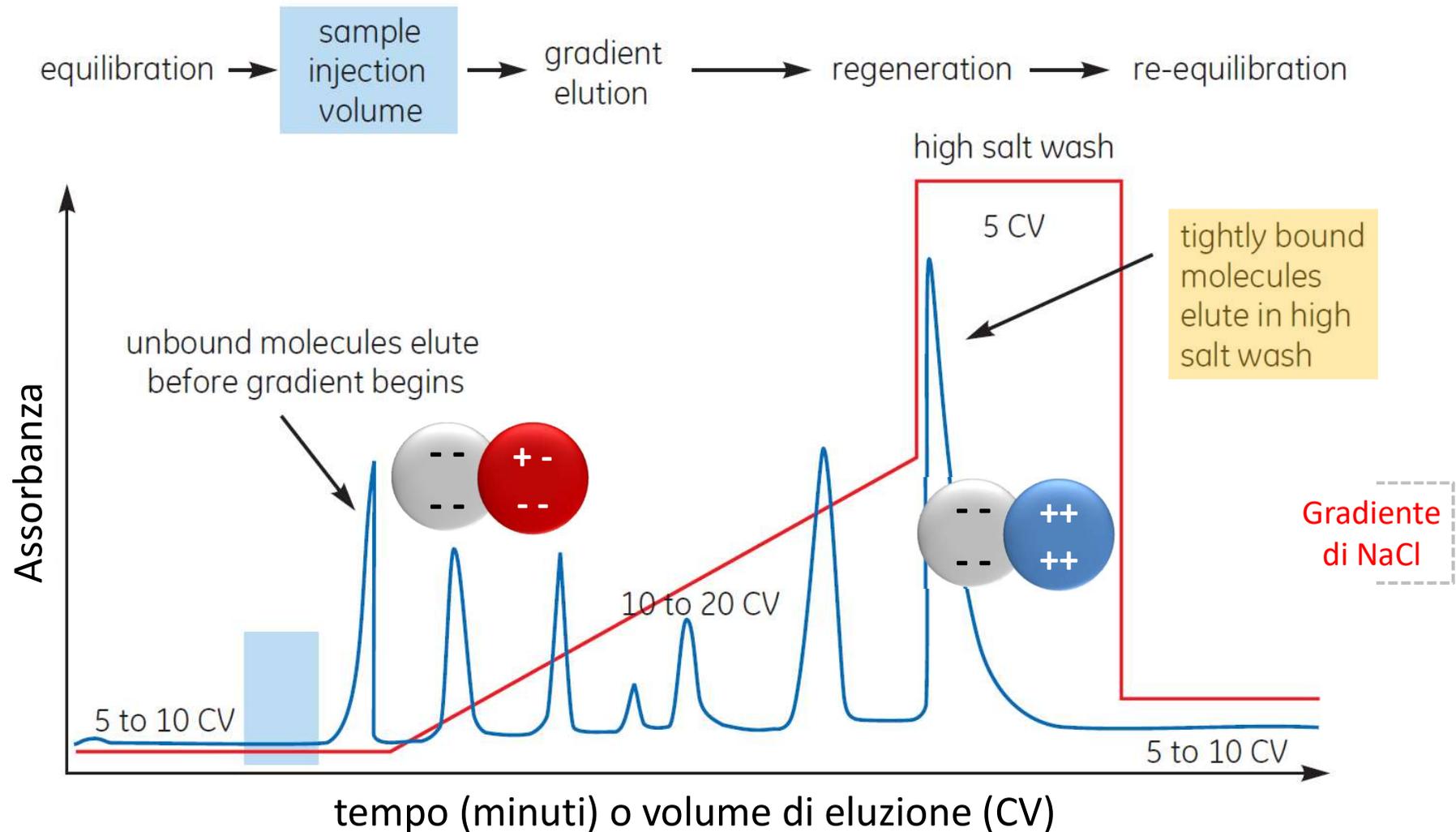


# ELUIZIONE IN GRADIENTE DI CONCENTRAZIONE



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
<b>NaCl</b>	<b>100 mM</b>
EDTA	5 mM
Benzamidina	10 mM

**EQUILIBRAZIONE  
RESINA**

**pH 7.5**

TRIS	50 mM
EDTA	5 mM
Benzamidina	10 mM
<b>+ CAMPIONE</b>	

**FISSAZIONE  
RESINA**

**pH 7.5**

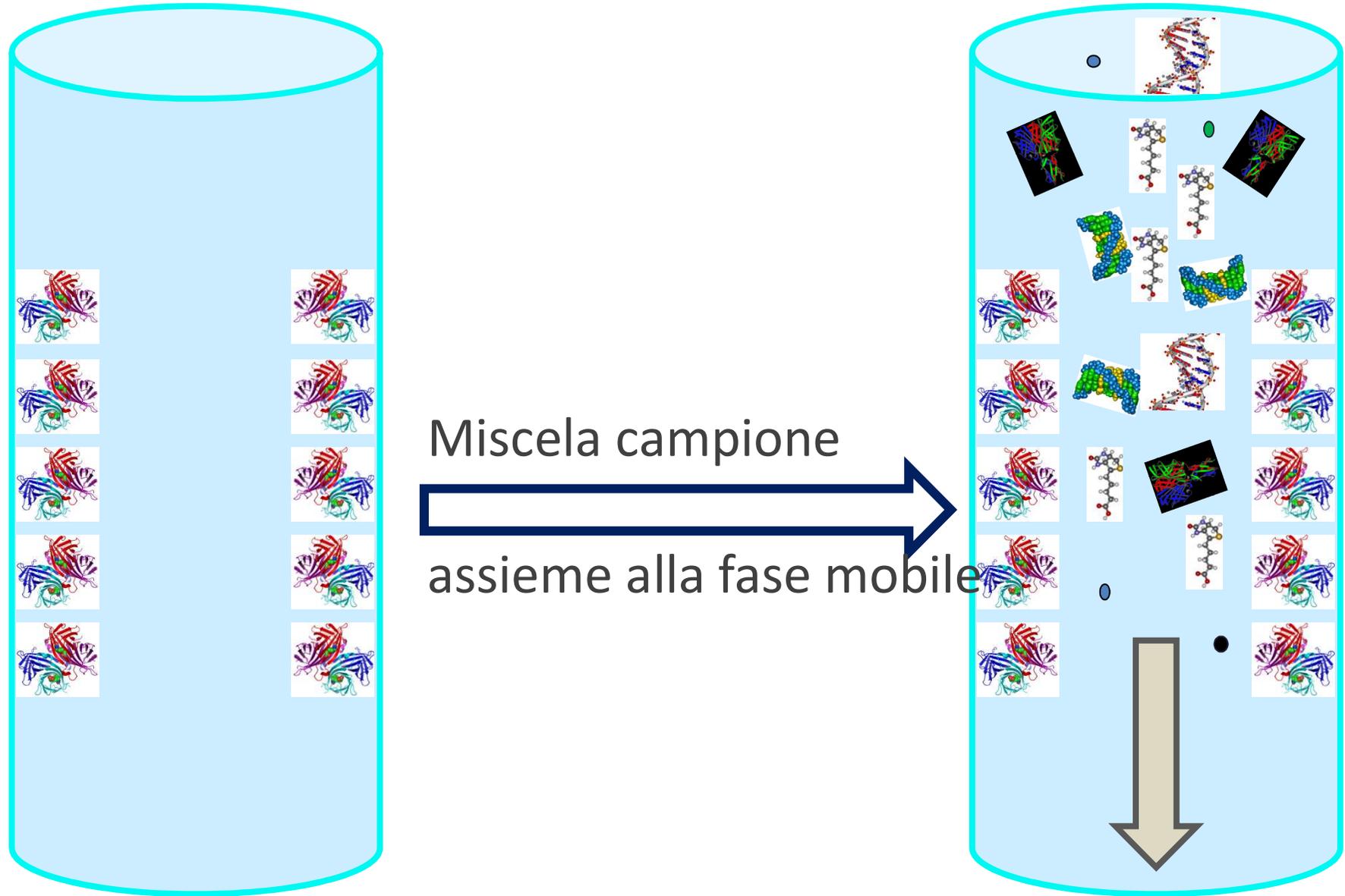
TRIS	50 mM
<b>NaCl</b>	<b>500 mM</b>
EDTA	5 mM
Benzamidina	10 mM

**ELUIZIONE**

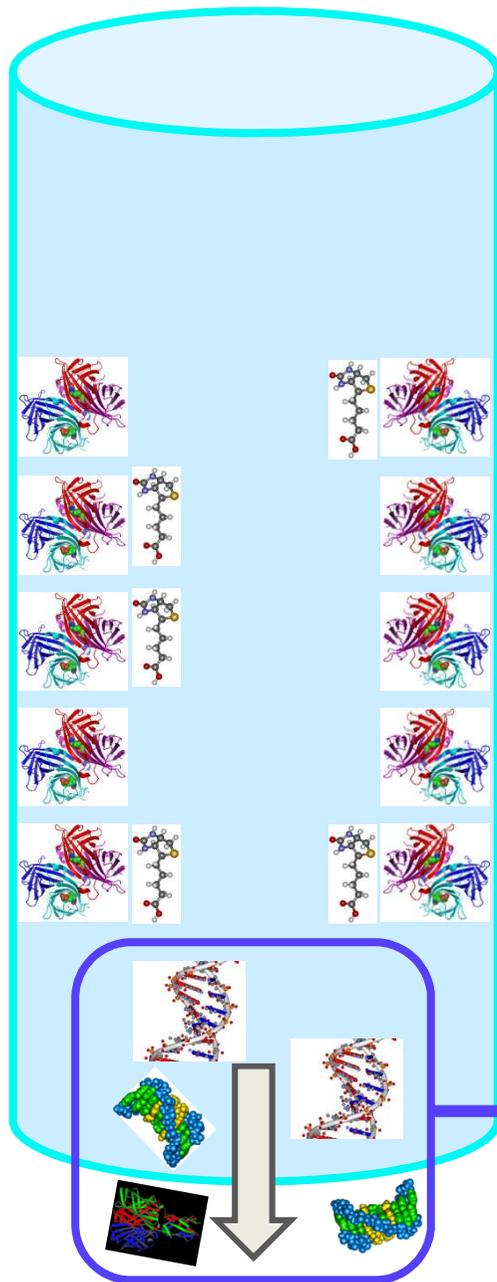
**pH 7.5**



# CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ



# CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ

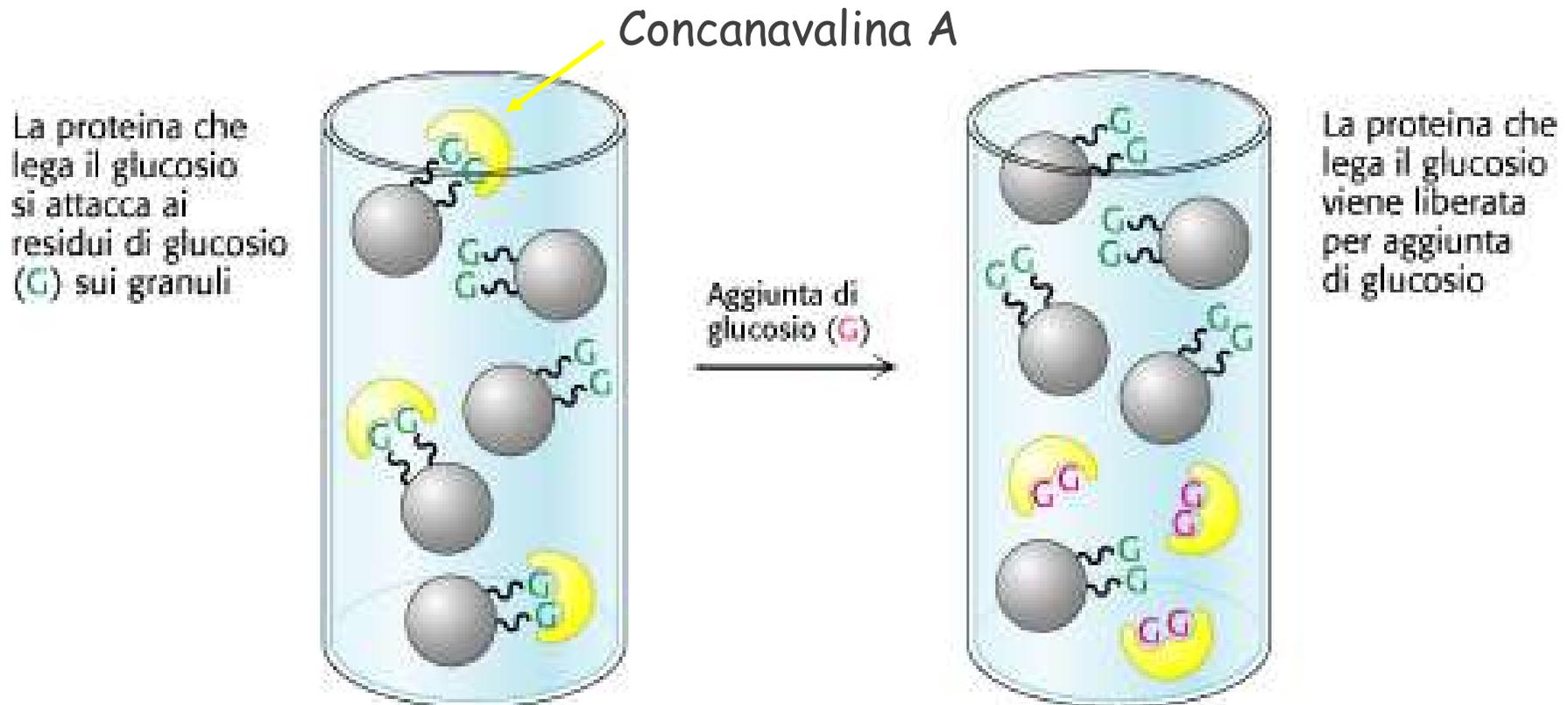


Recupero della molecola di interesse per alterazione delle condizioni di legame.

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

Molecole non affini

# ESEMPIO DI CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ

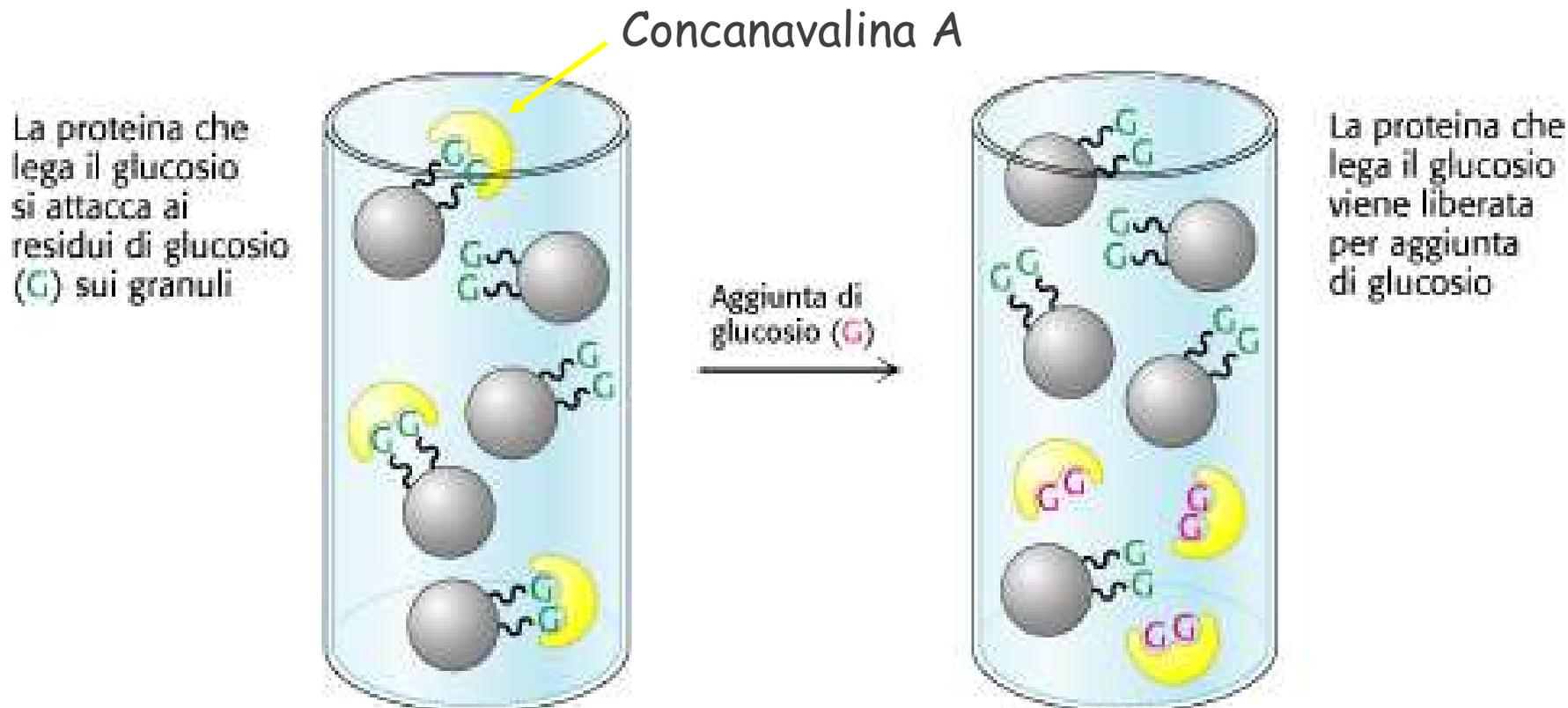


- Legare **covalentemente** un composto ad un supporto solido.
- Aggiungere la miscela proteica.
- Lavare con tampone.
- E per eluire??



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

## ESEMPIO DI CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ

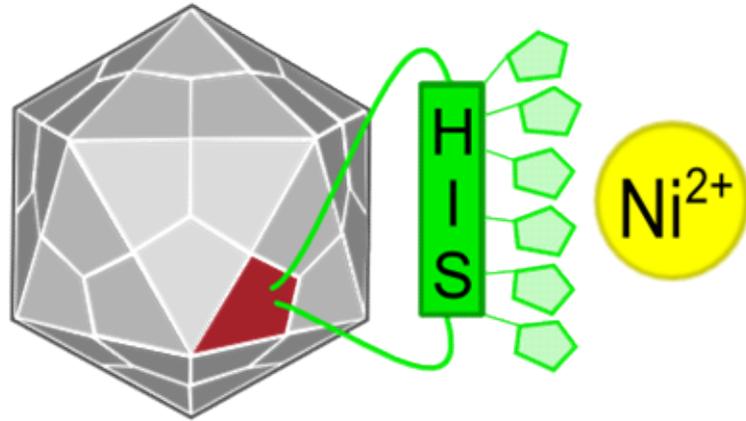


- Legare **covalentemente** un composto ad un supporto solido.
- Aggiungere la miscela proteica.
- Lavare con tampone.
- Eluire la proteina desiderata con una **elevata concentrazione** di composto in forma **solubile**.

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

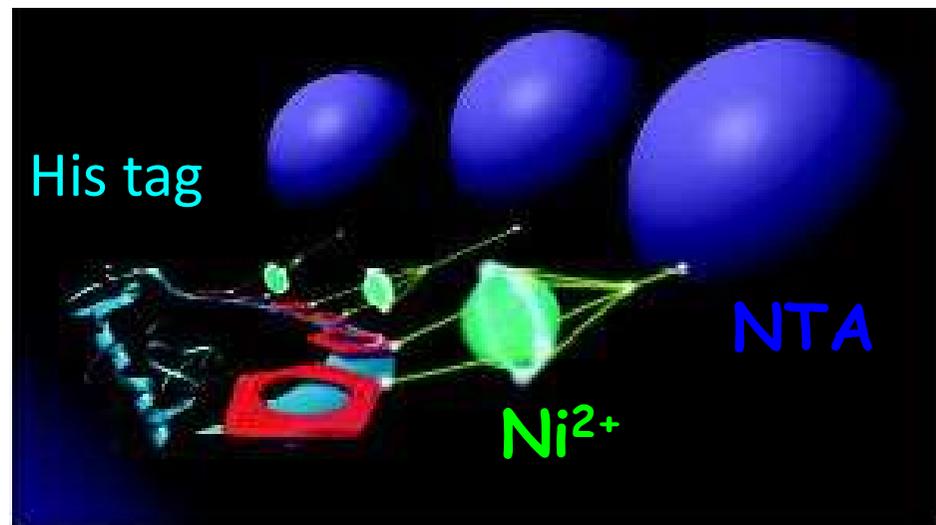
# CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ

## Sistema Poli His-Nichel (His tag)



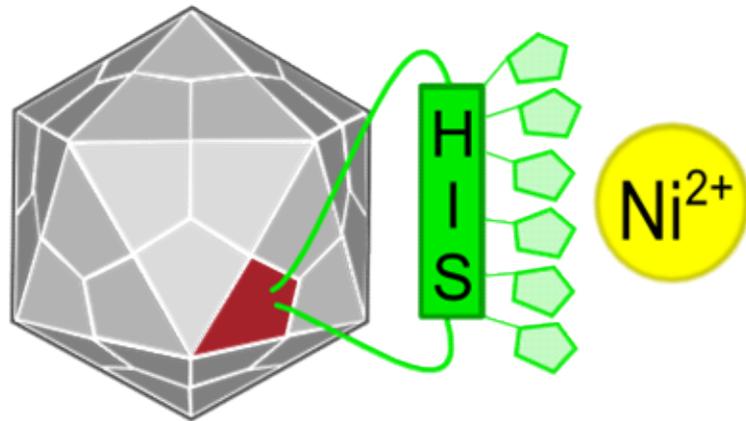
Coda di 6 Istidine

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



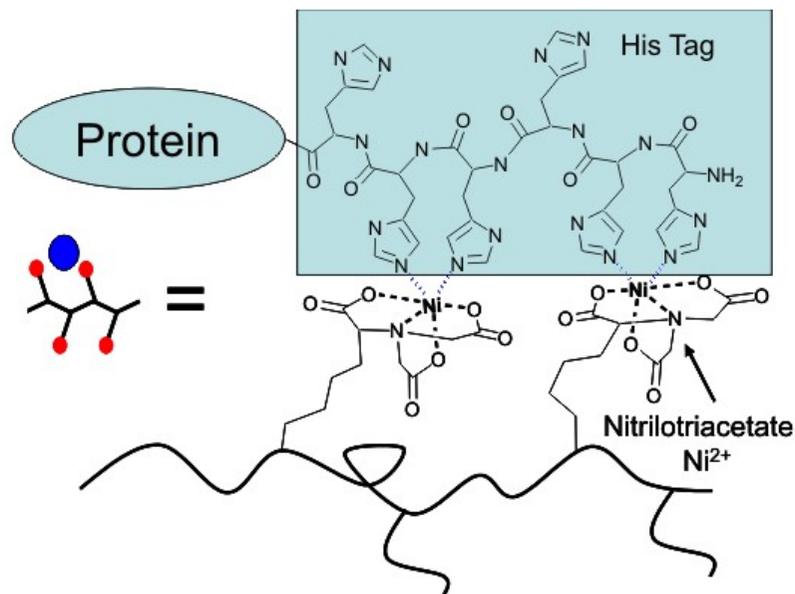
# CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ

## Sistema Poli His-Nichel (His tag)



Coda di 6 Istidine

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

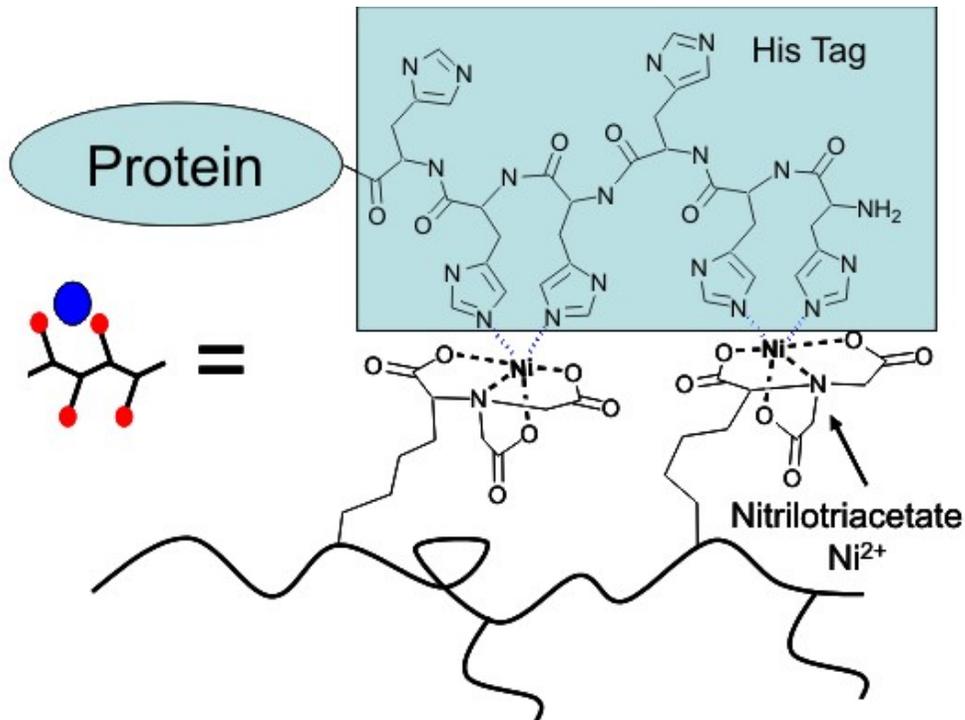
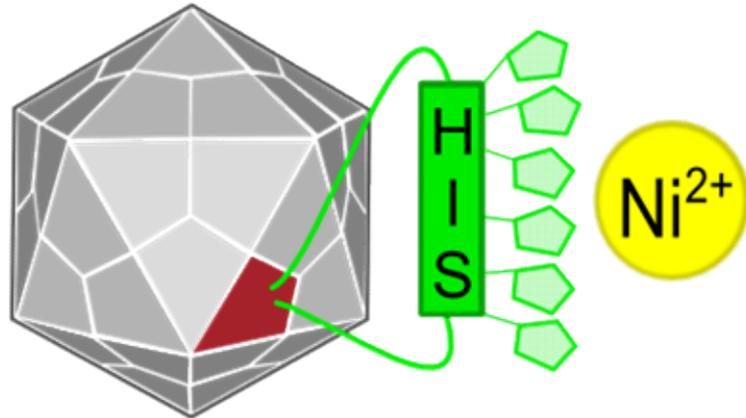


Eluizione:



# CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ

## Sistema Poli His-Nichel (His tag)

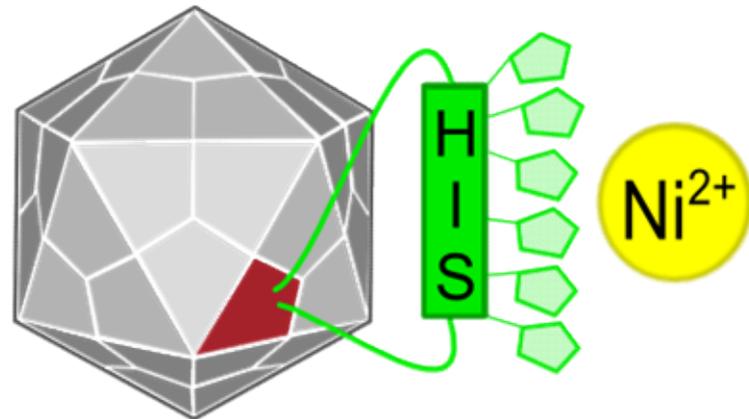


**Coda di 6 Istidine**

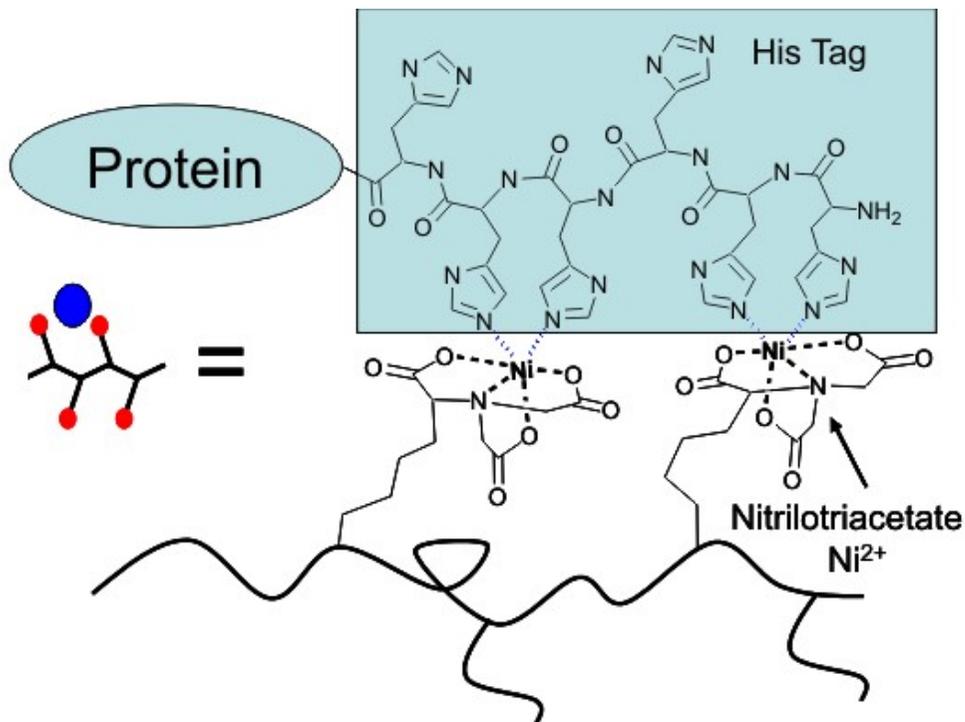
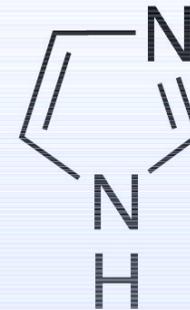
**Acido nitrilotriacetico (NTA)**  
chelante dello ione  $Ni^{2+}$

# CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ

## Sistema Poli His-Nichel (His tag)



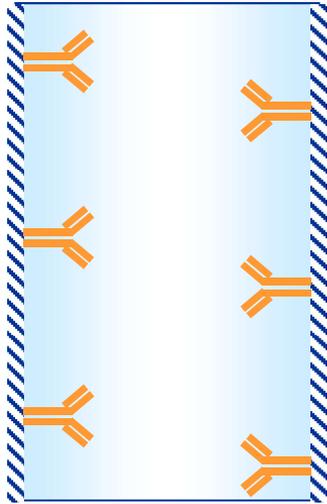
Eluizione:  
Alte [ ]  
di imidazolo



**Coda di 6 Istidine**

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

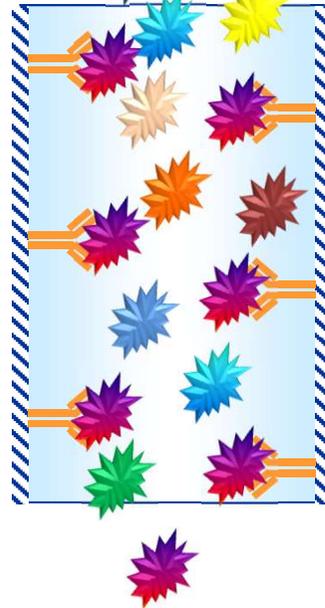
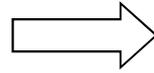
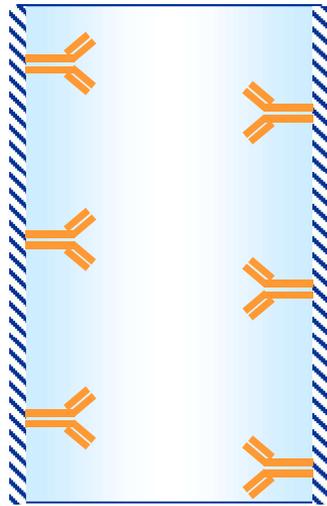
# CROMATOGRAFIA PER IMMUNOAFFINITA'



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

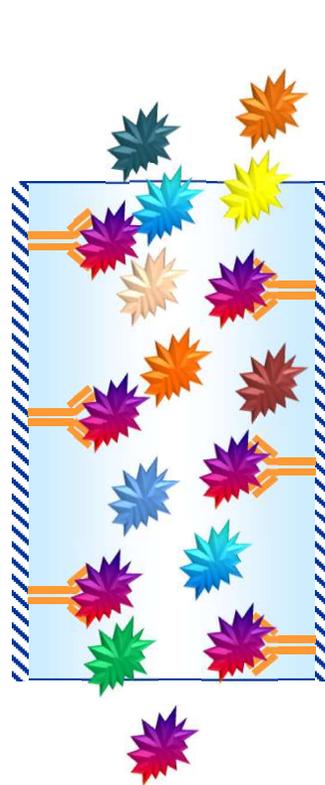
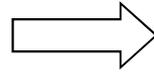
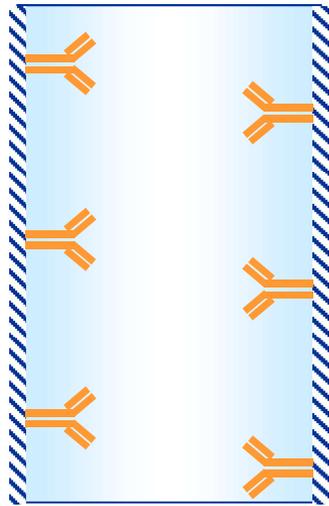


Altre molecole



Eluente

# CROMATOGRAFIA PER IMMUNOAFFINITA'



Vengono utilizzati  
**ANTICORPI SPECIFICI**



Colonna  
cromatografica



Anticorpo  
anti-proteina



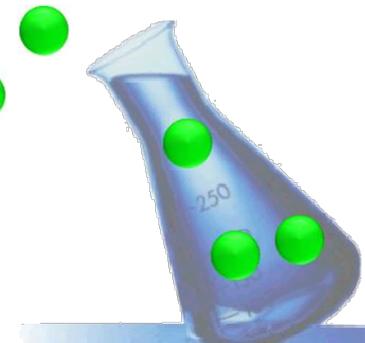
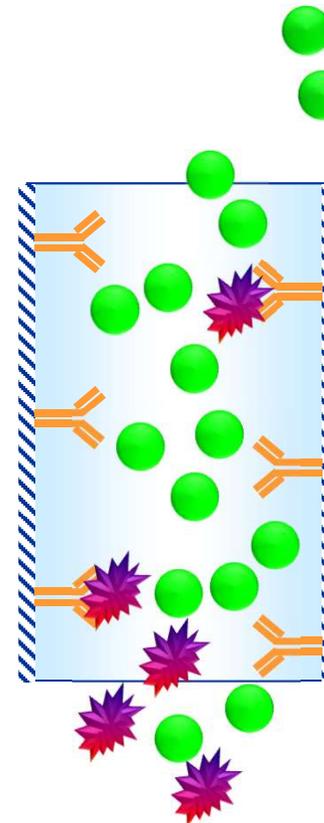
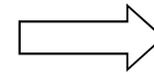
Molecola di interesse



Altre molecole



Eluente

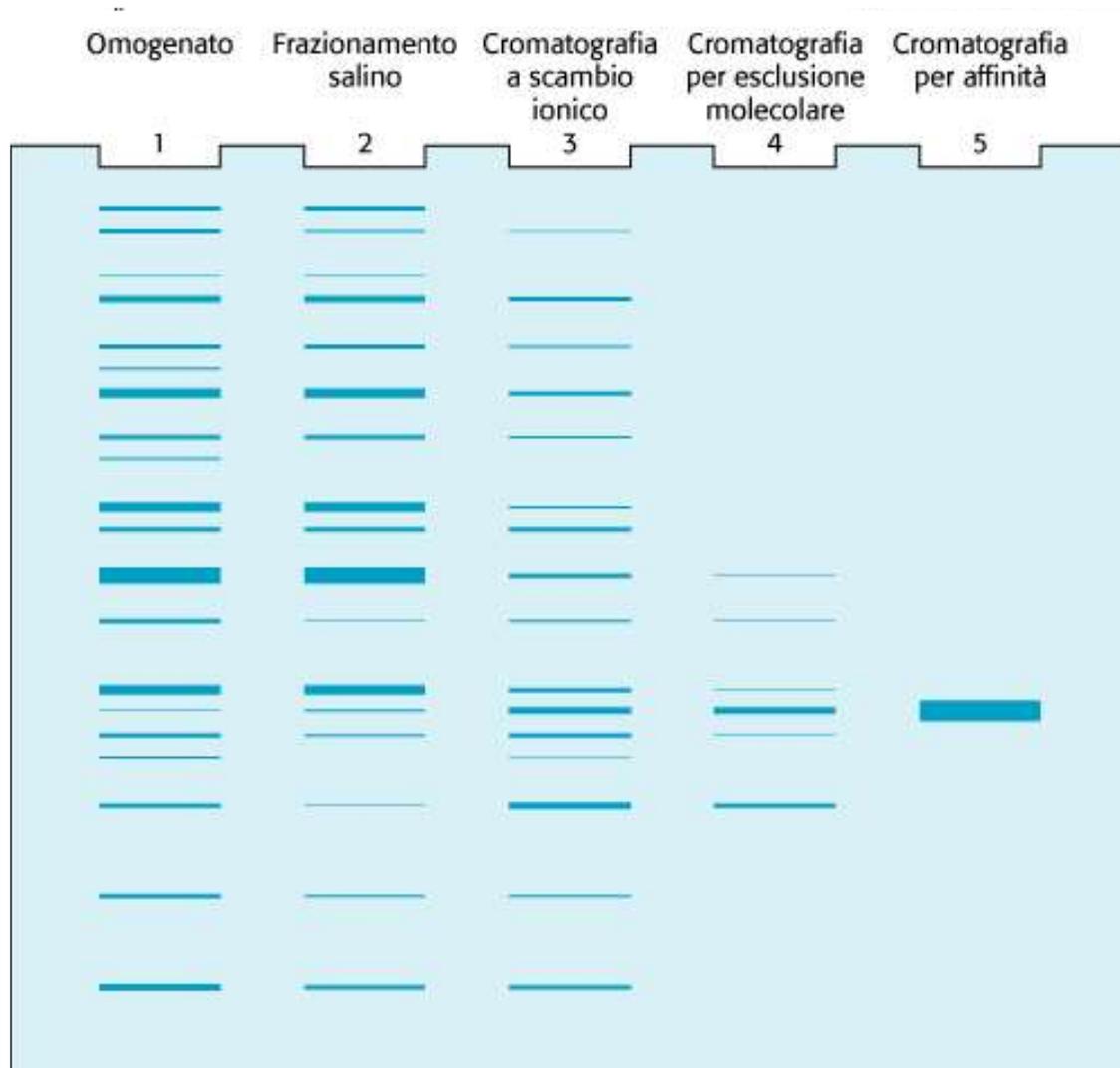


# Confronto tecniche di separazione

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.

**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.