

“Never waste pure thoughts on an impure protein”

**PURIFICAZIONE
DI
PROTEINE**

PURIFICARE

Purificare significa ottenere “solamente” la nostra molecola di interesse.

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

Purificare una proteina per:

Le proteine differiscono per :

- Dimensione e forma
- Carica
- Solubilità
- Attività biologica

PROPRIETA' DELLE PROTEINE SFRUTTATE PER PURIFICARLE

- 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)
- 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

solfato 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

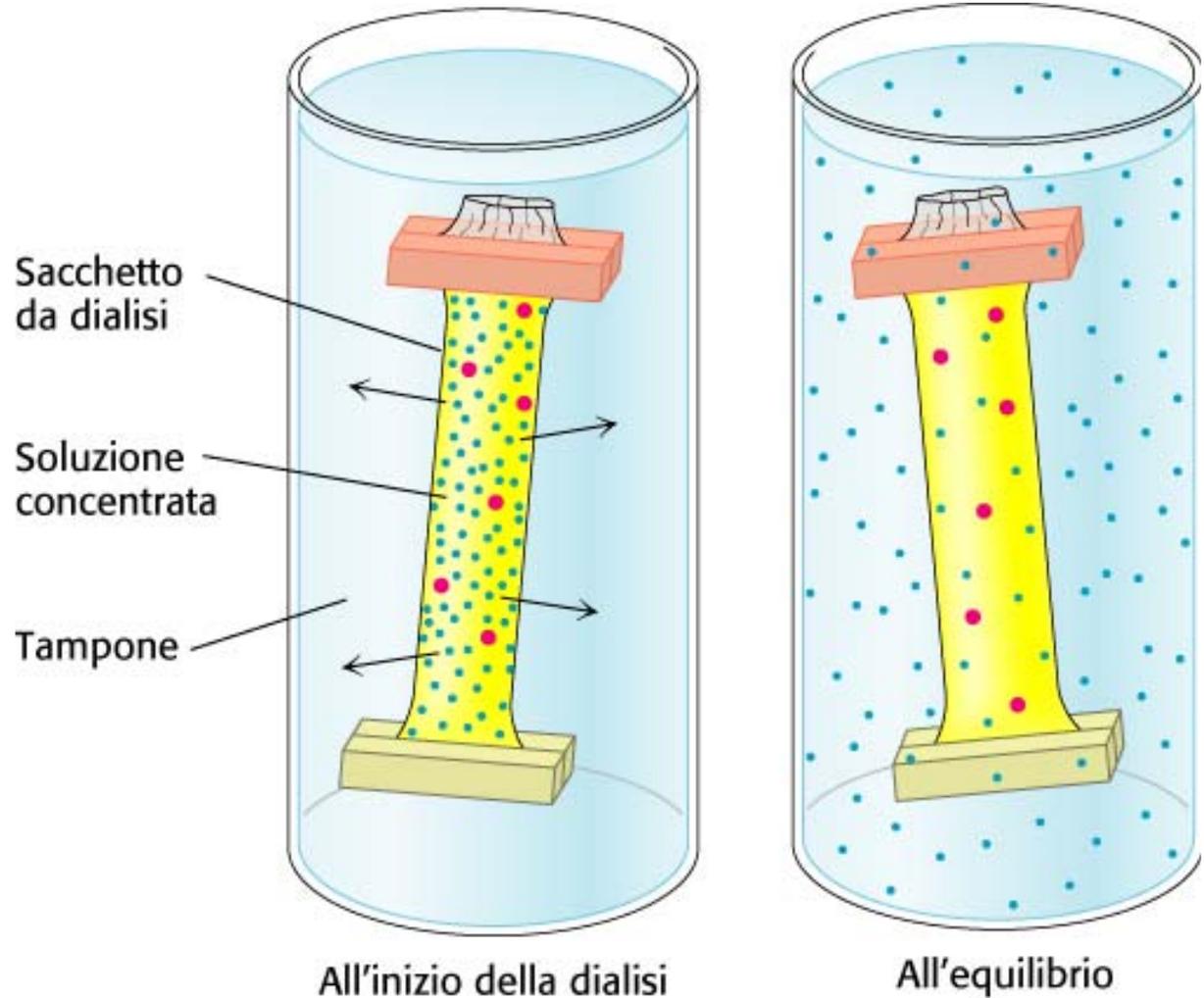
forma, dimensione, densità

forma, dimensione

DIALISI

Proprietà sfruttata:
DIMENSIONE
delle proteine.

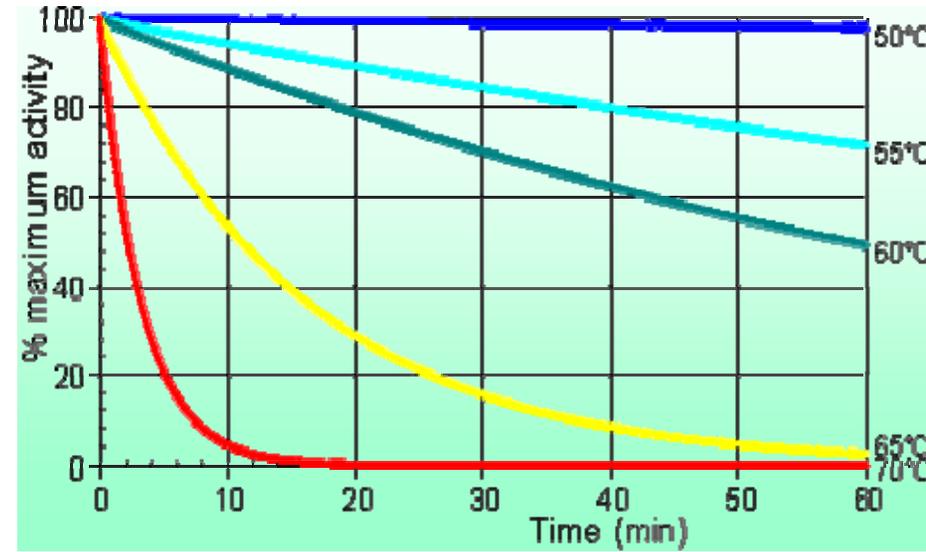
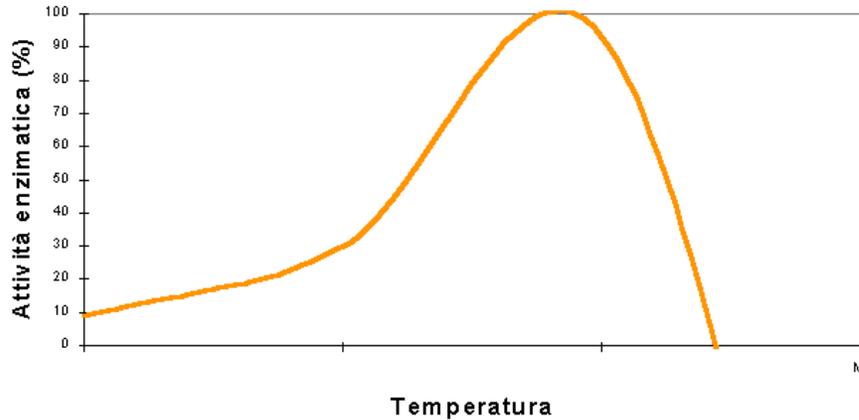
Vengono utilizzate
membrane
semi-permeabili
(es. cellulosa).



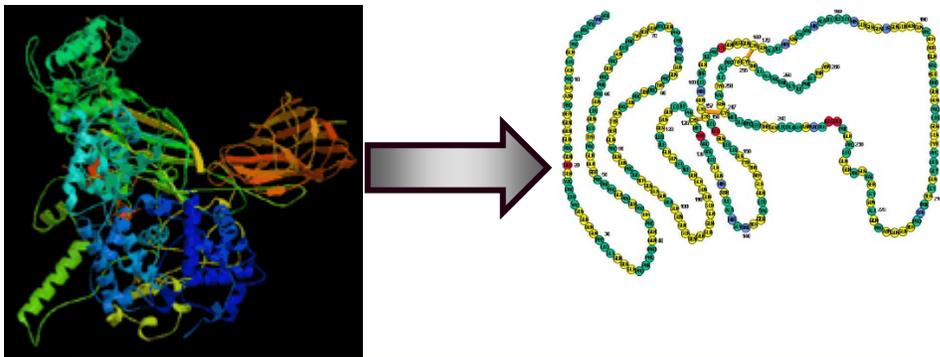
Per una dialisi esaustiva occorrono **diverse ore** ed è necessario sostituire periodicamente il tampone.

FRAZIONAMENTO PER DENATURAZIONE

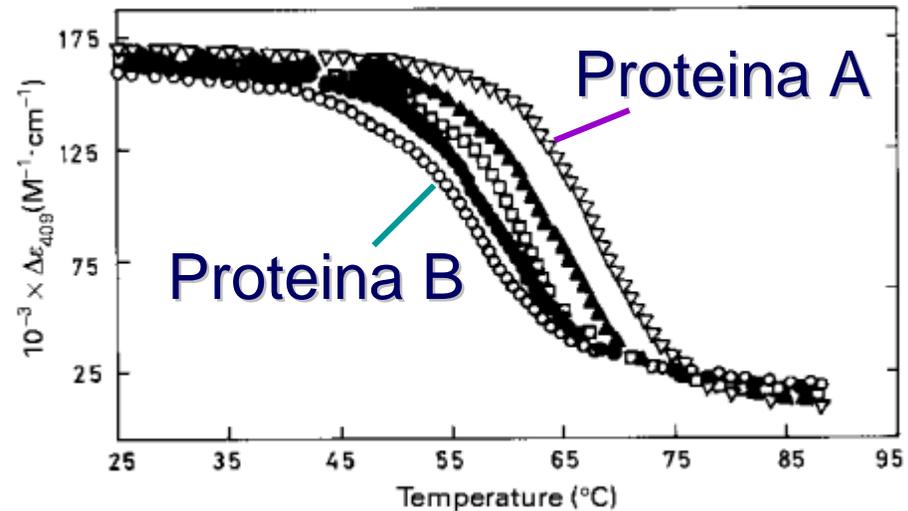
Influenza della temperatura sull'attività enzimatica (Kunze, 1999)



Differente sensibilità al calore delle proteine



Proprietà sfruttata:
STABILITA' delle proteine.



FRAZIONAMENTO SALINO o SALTING OUT

Proprietà sfruttata:
SOLUBILITA'
delle proteine.

Le proteine sono solitamente solubili in H₂O; tale solubilità è anche in funzione della forza ionica della soluzione.

$$\mu = \frac{1}{2} \sum c \cdot z^2$$

Solfato
d'ammonio

Soluzione di
fibrinogeno
ed albumina

precipitazione

albumina solubile

ppt fibrinogeno



FRAZIONAMENTO SALINO o SALTING OUT

Proprietà sfruttata:
SOLUBILITA'
delle proteine.

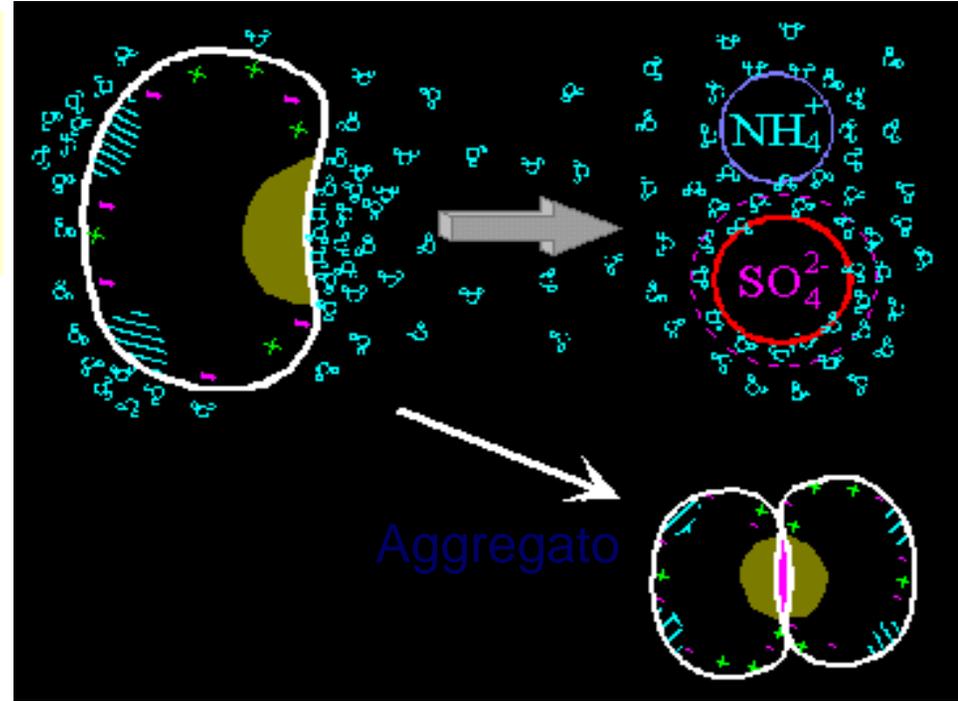
Solfato
d'ammonio

Soluzione di
fibrinogeno
ed albumina

precipitazione

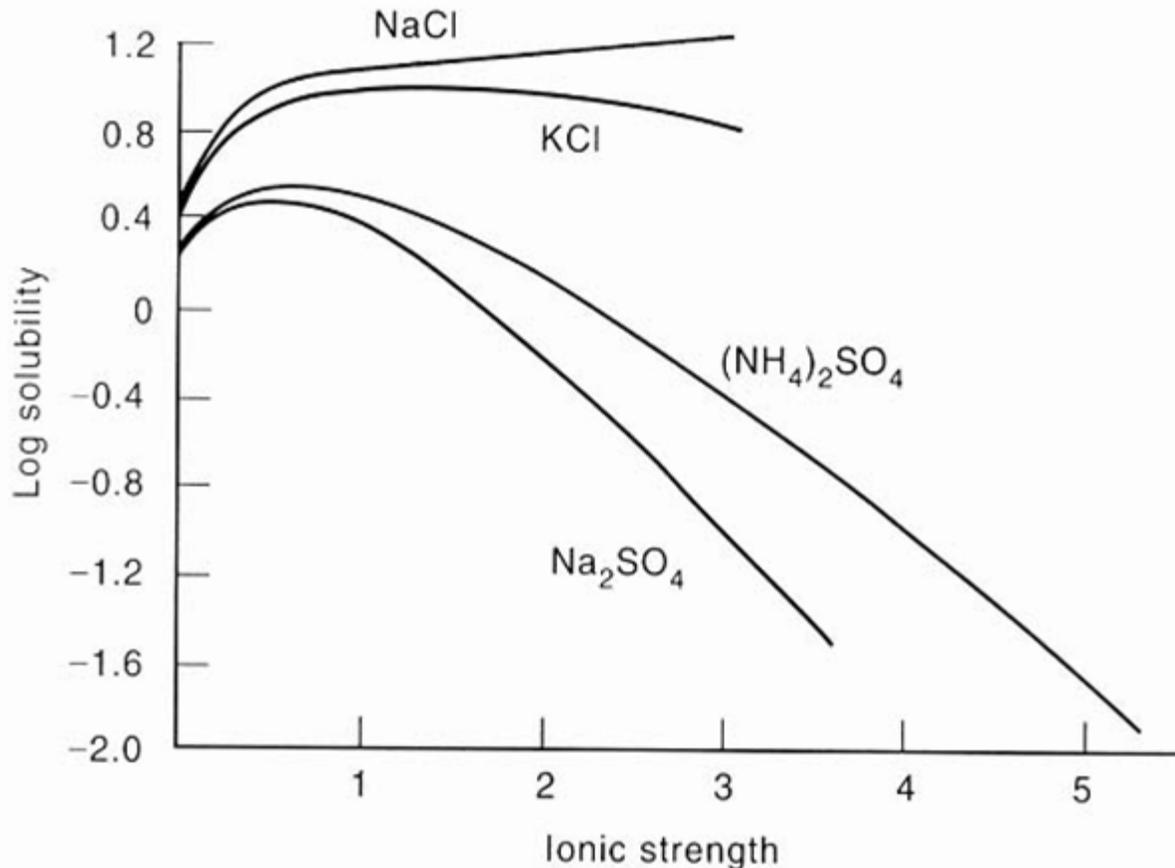
albumina solubile

ppt fibrinogeno



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.

CENTRIFUGAZIONE

Centrifuga: motore centrale che fa ruotare un rotore contenente i campioni da separare.

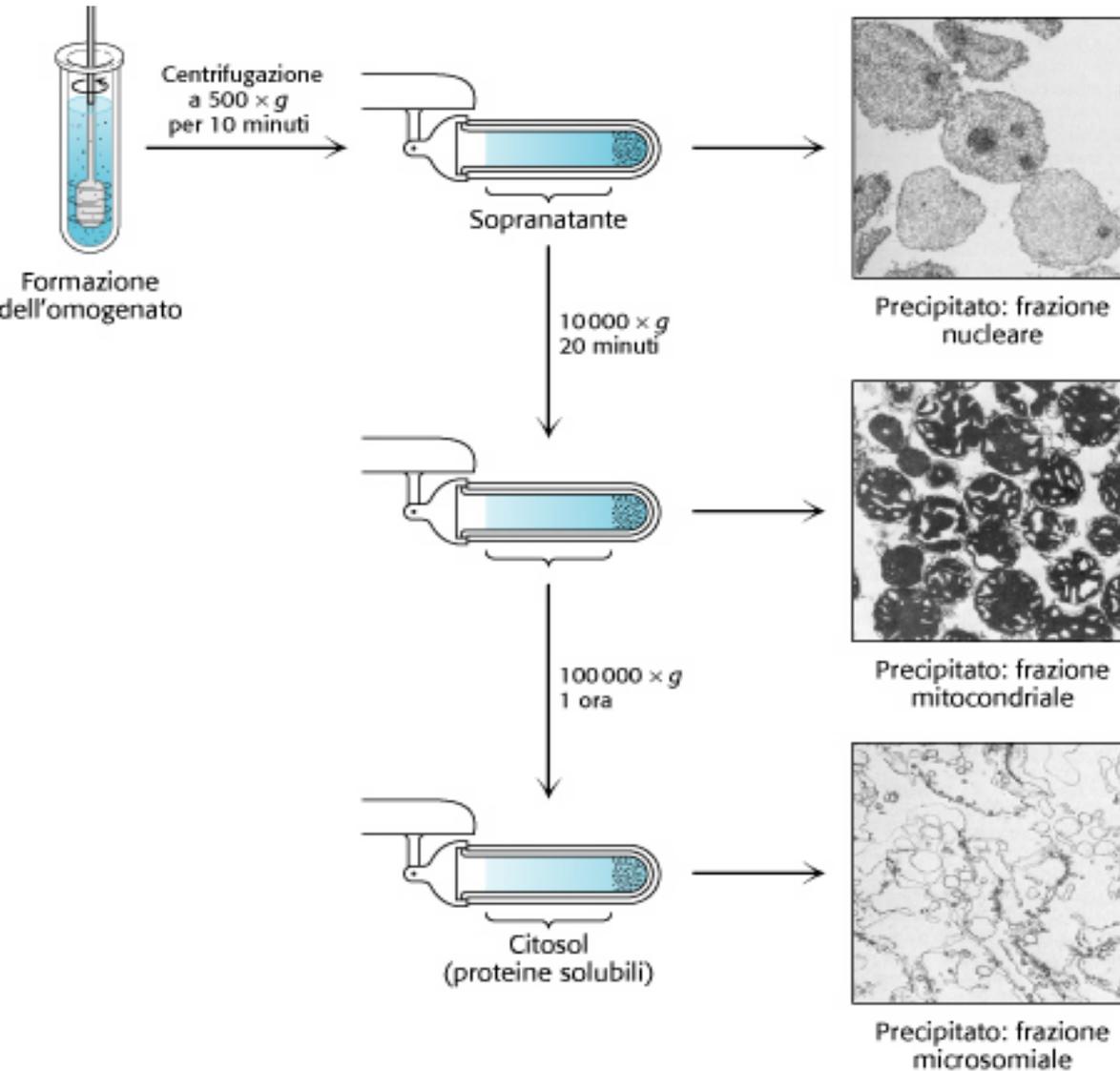


L'uso di una centrifuga è ottimale per la separazione di particelle con un diverso **coefficiente di sedimentazione (S)**.

A valori di **S** > corrispondono velocità di sedimentazione >.

Ogni particella sedimenta con una velocità direttamente proporzionale al **campo centrifugo**.

CENTRIFUGAZIONE

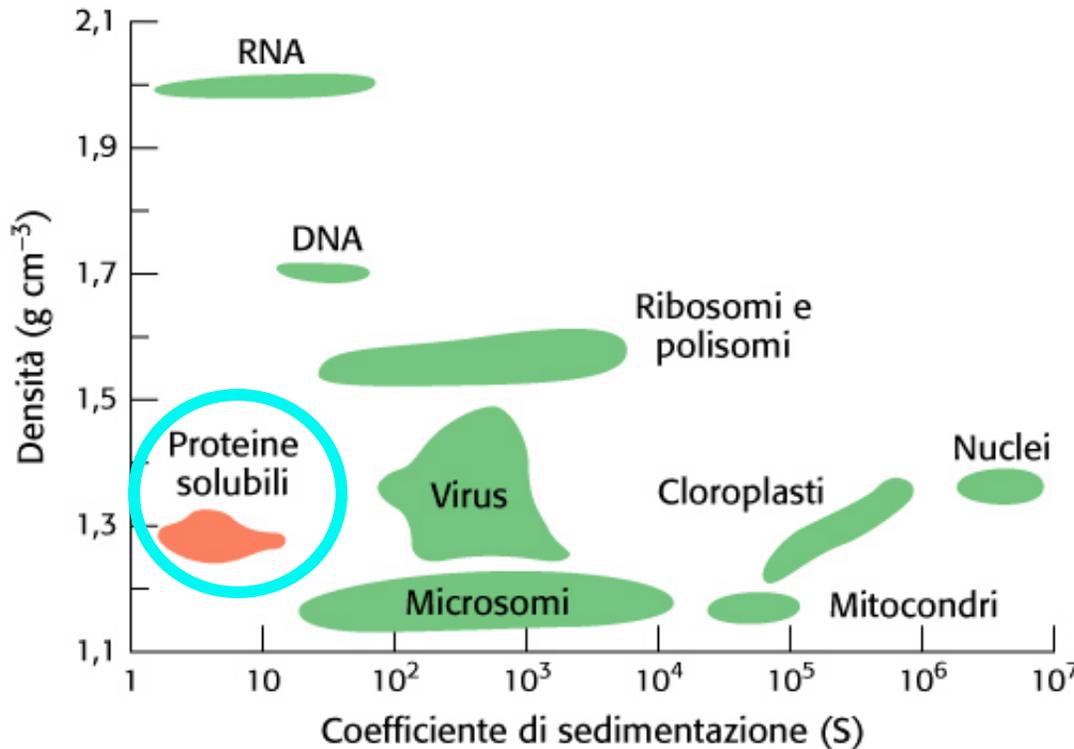


L'uso di una centrifuga è ottimale per la separazione di particelle con un diverso **coefficiente di sedimentazione (S)**.

A valori di **S** > corrispondono velocità di sedimentazione >.

Ogni particella sedimenta con una velocità direttamente proporzionale al **campo centrifugo**.

CENTRIFUGAZIONE NELLA SEPARAZIONE DI PROTEINE



S dipende da caratteristiche della particella e della soluzione in studio.

L'S dipende dalla sua:

- densità
- PM
- forma e dimensione

- densità soluzione
- viscosità soluzione

Proteina

S

PM

(Svedberg)

(kDa)

Inibitore della tripsina

1

6.5

Ribonucleasi A

1.78

13.7

Citocromo C

1.83

12.3

Mioglobina

1.97

17.8

Concanavalina A

3.8

51.3

$$v = \frac{2R^2(d_e - d_i)g}{9\eta}$$

Legge di Stokes

$$v = \frac{2R^2(d_e - d_i)g}{9\eta}$$

v = velocità di sedimentazione;

R = raggio della particella;

d_i = densità del mezzo;

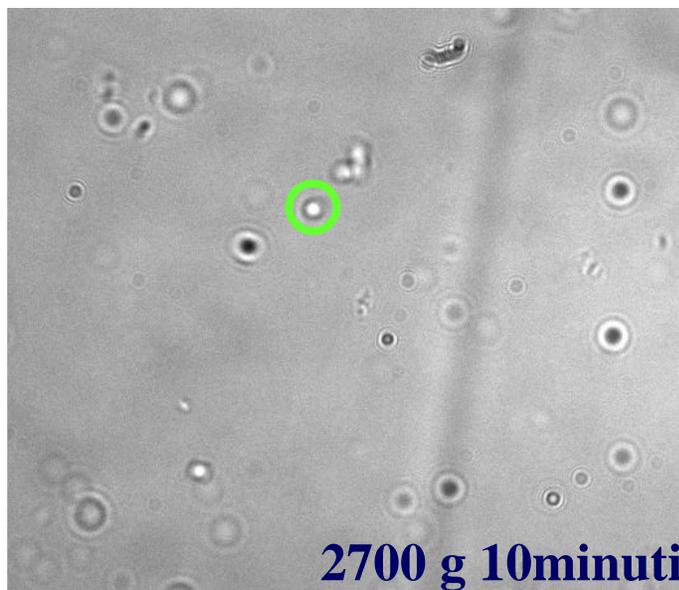
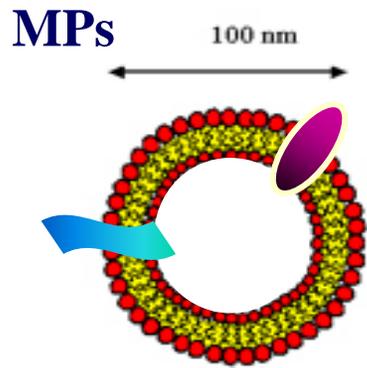
d_e = densità della particella;

g = accelerazione di gravità;

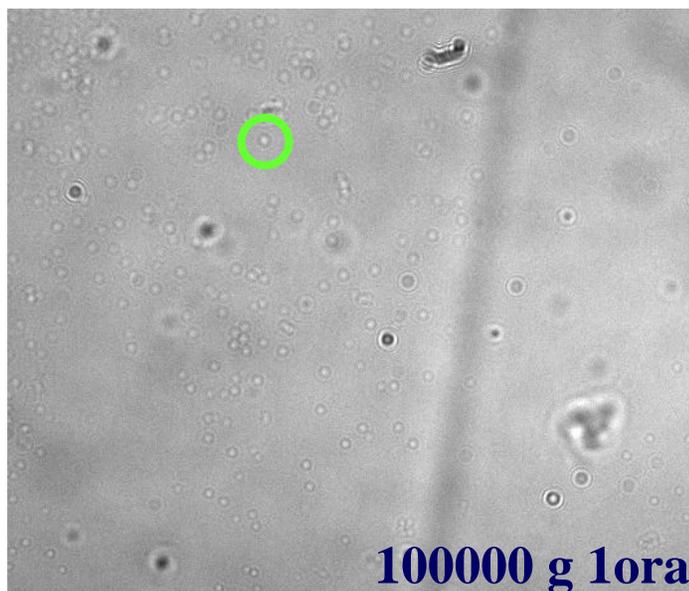
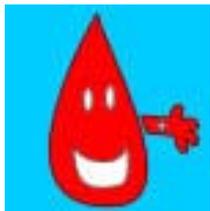
η = viscosità del mezzo;

$2/9$ = costante di forma per una sfera

ESEMPI DI CENTRIFUGAZIONI



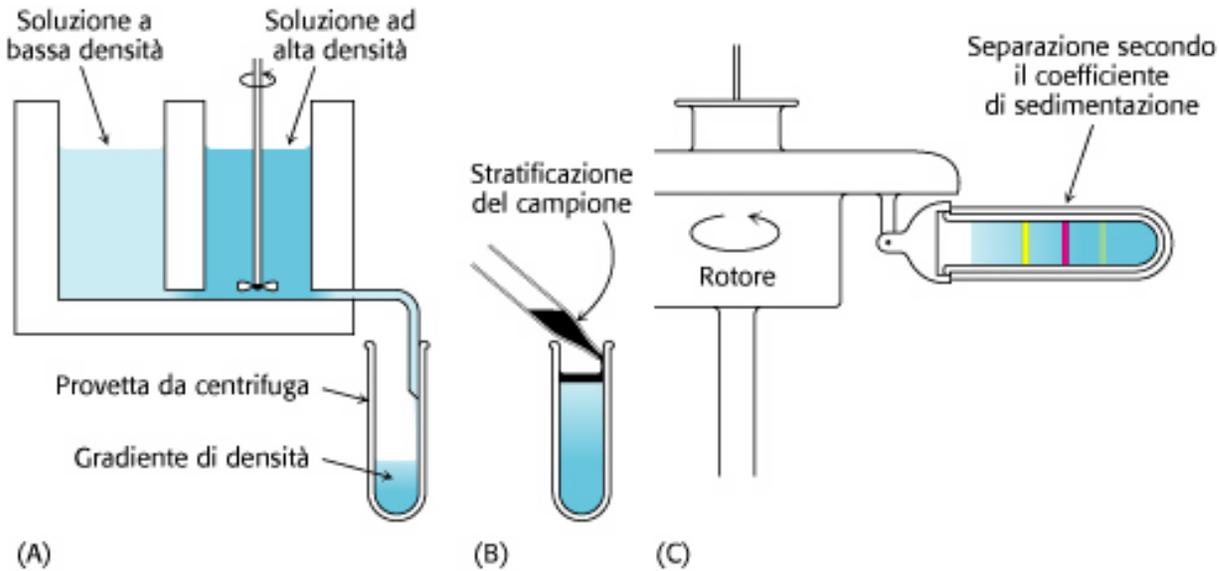
Plasma



ULTRACENTRIFUGA



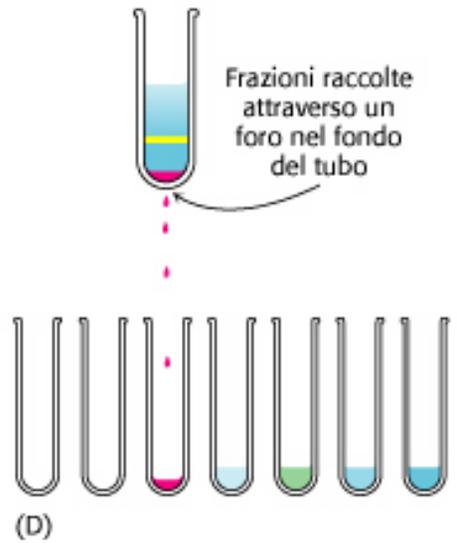
CENTRIFUGAZIONE IN GRADIENTE DI DENSITA'



Separazione isopicnica

Centrifugazione di una miscela proteica in un **gradiente di densità** in saccarosio o CsCl_2 .

La centrifugazione può terminare quando le proteine sono sedimentate in zone definite, ma ancora in sospensione



TECNICHE CROMATOGRAFICHE

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.



TECNICHE CROMATOGRAFICHE

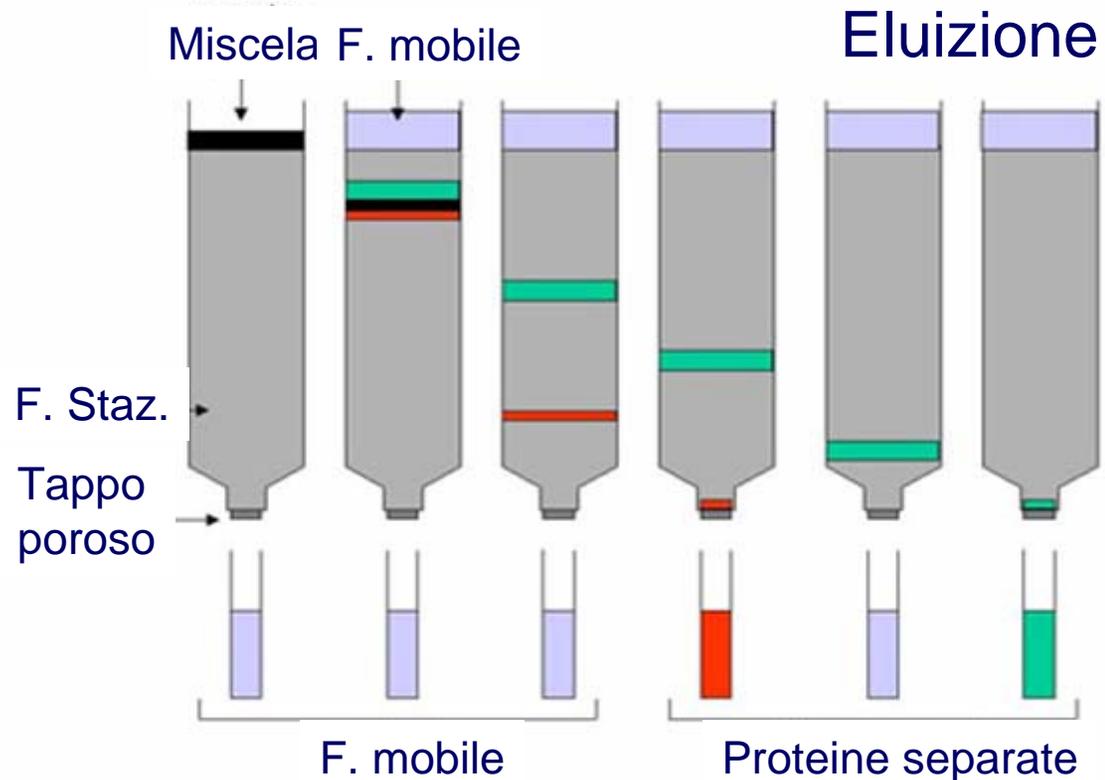
Ogni componente della miscela sarà in equilibrio fra le 2 fasi.



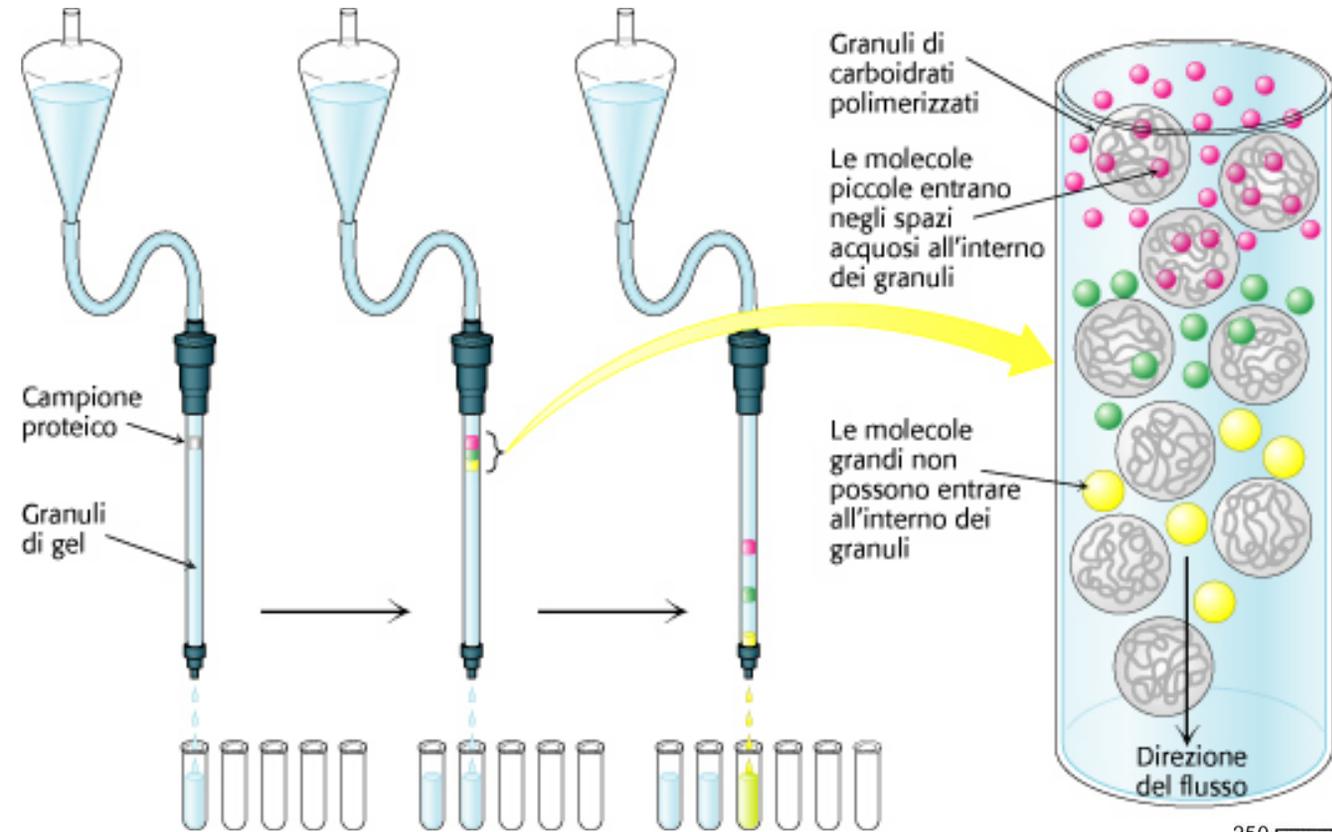
$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

K = coefficiente di
distribuzione
(diverso per ogni componente)

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



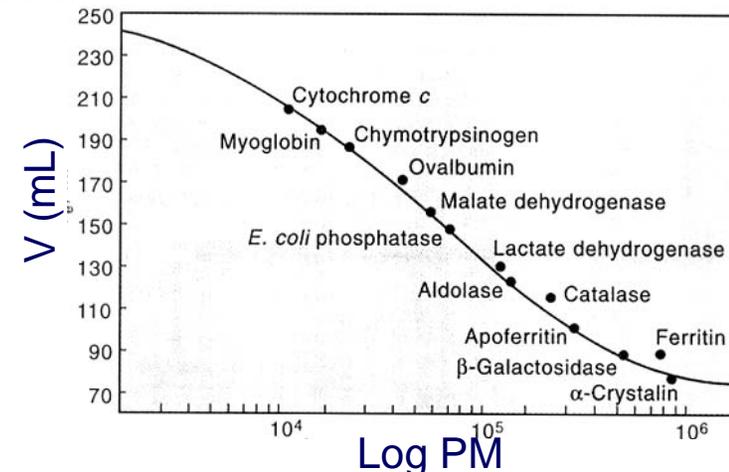
CROMATOGRAFIA PER FILTRAZIONE SU GEL



Proprietà sfruttata:
DIMENSIONE
delle proteine.

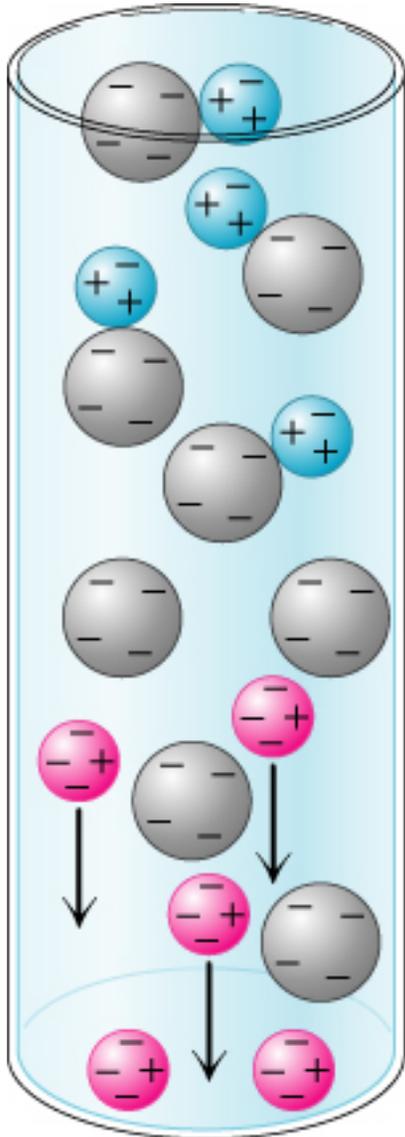
Separazioni più nette rispetto alla DIALISI.

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



CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

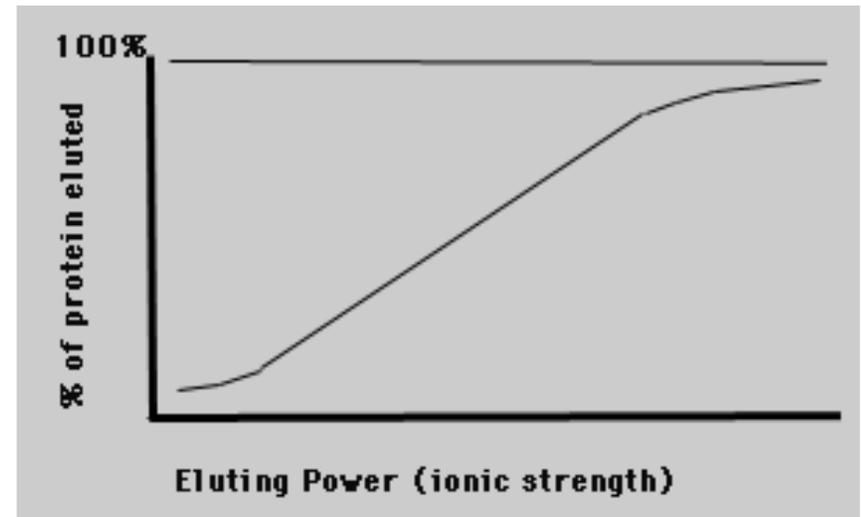
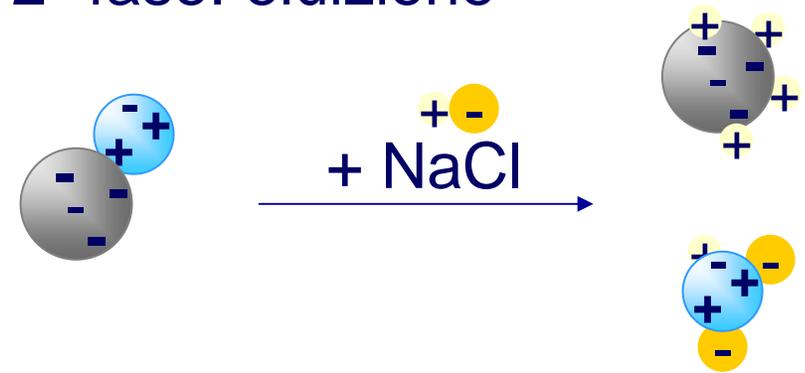
1^a fase: legame



Le proteine cariche positivamente si legano a granuli carichi negativamente

Le proteine cariche negativamente passano attraverso la colonna

2^a fase: eluizione



Proprietà sfruttata: CARICA NETTA delle proteine.

ESEMPIO DI CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

Scambiatore di anioni forte:
ammine quaternarie
(QAE sephadex)



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

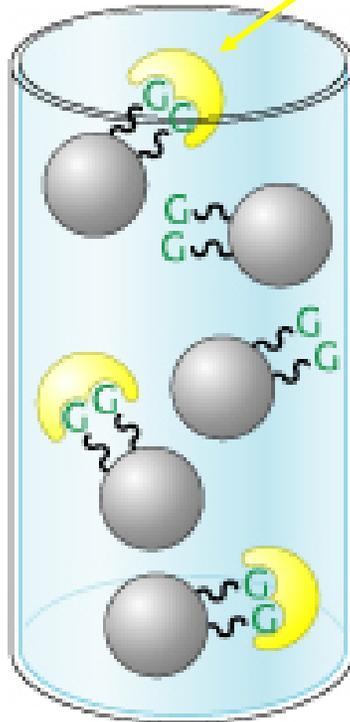
TRIS	50 mM	FISSAZIONE
EDTA	5 mM	RESINA
Benzamidina	10 mM	pH 7.5

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

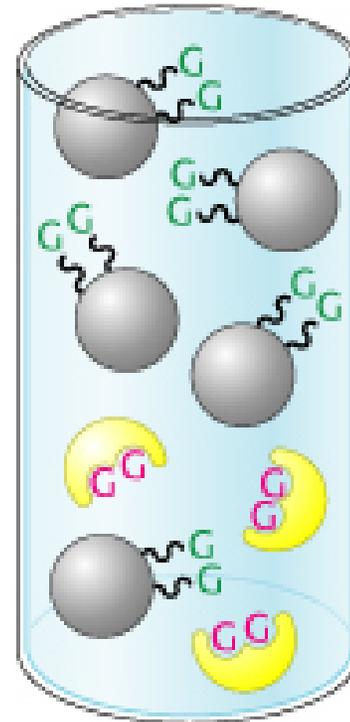
CROMATOGRAFIA PER AFFINITA'

Concanavalina A

La proteina che lega il glucosio si attacca ai residui di glucosio (G) sui granuli



Aggiunta di glucosio (G)

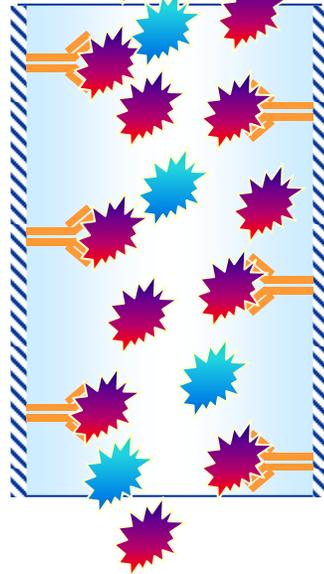
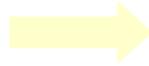
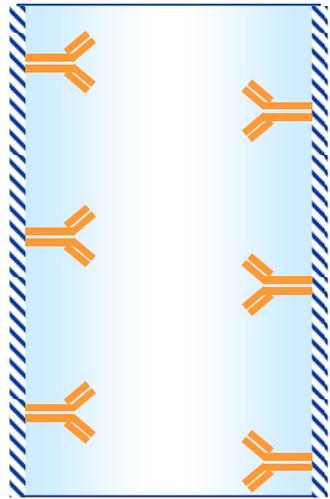


La proteina che lega il glucosio viene liberata per aggiunta di glucosio

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

- 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.

CROMATOGRAFIA PER IMMUNOAFFINITA'



Vengono
utilizzati
**ANTICORPI
SPECIFICI**



Colonna
cromatografica



Anticorpo
anti-proteina



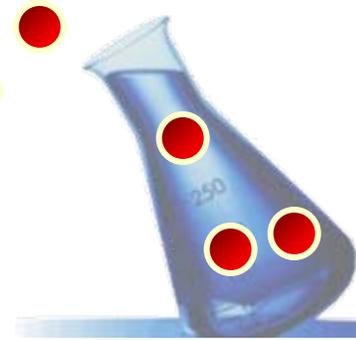
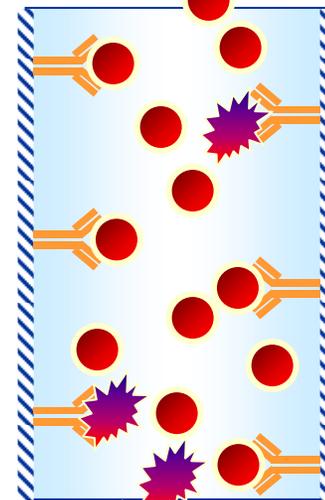
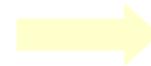
Proteina d'interesse



Altre proteine



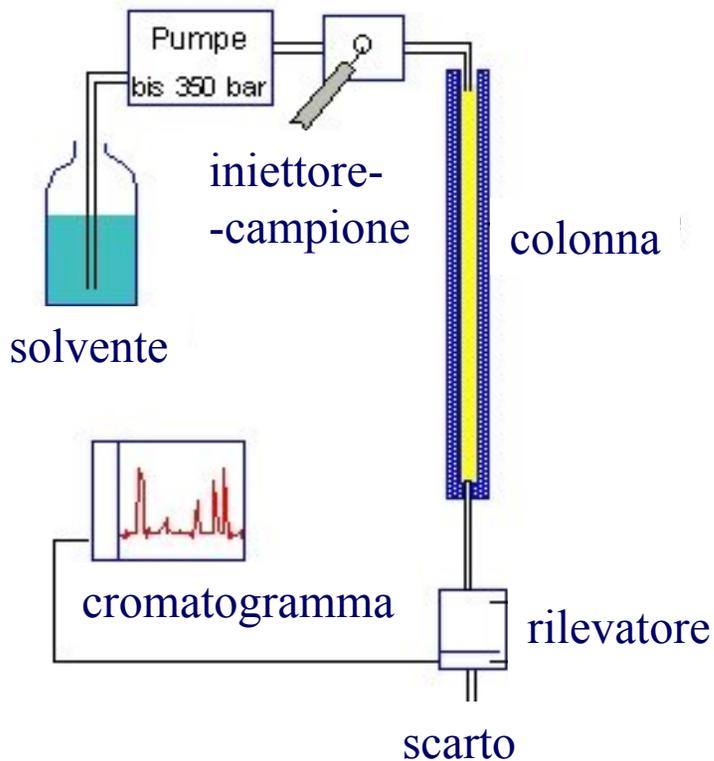
Eluente



CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTE PRESTAZIONI



Evoluzione strumentale della cromatografia in fase liquida su colonna classica.



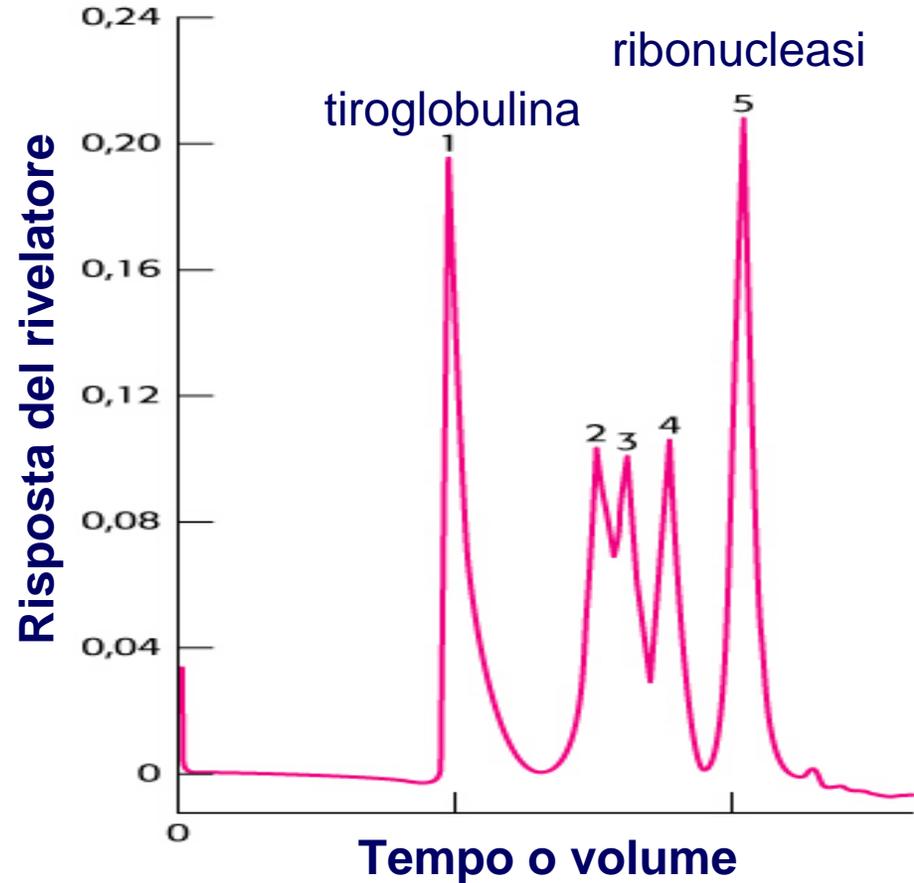
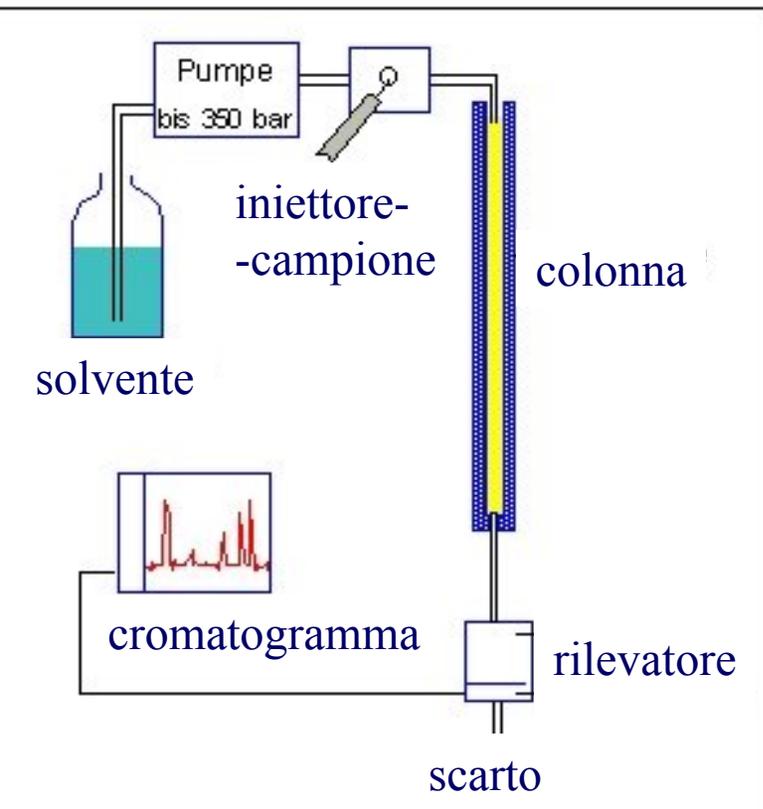
Separazioni efficienti in tempi ridotti e di effettuare analisi qualitative e/o quantitative.

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

CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTE PRESTAZIONI



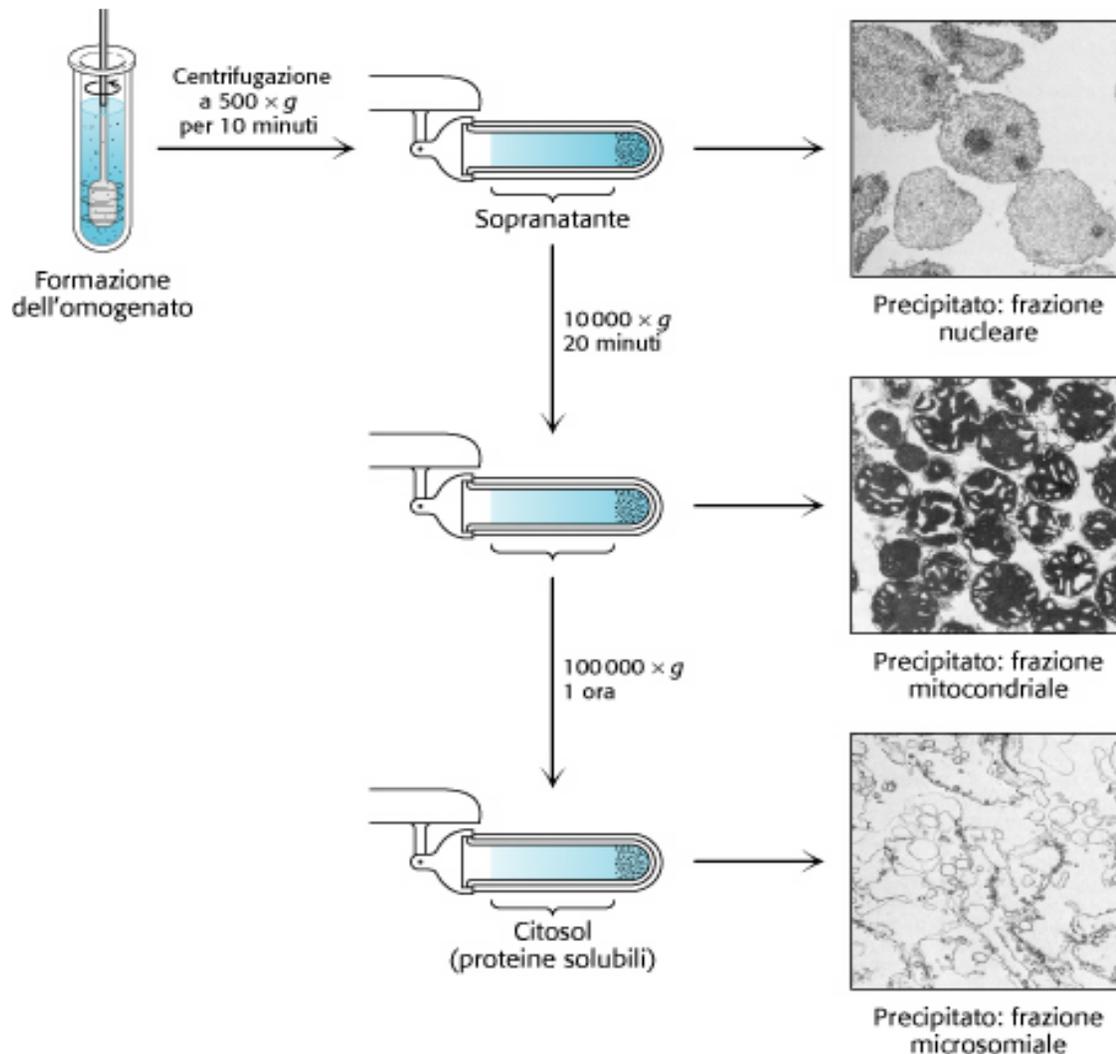
Evoluzione strumentale della cromatografia in fase liquida su colonna classica.



Confronto tecniche di separazione

Campione di partenza: la cellula.

Distruggendo la membrana cellulare si ottiene l'omogenato.

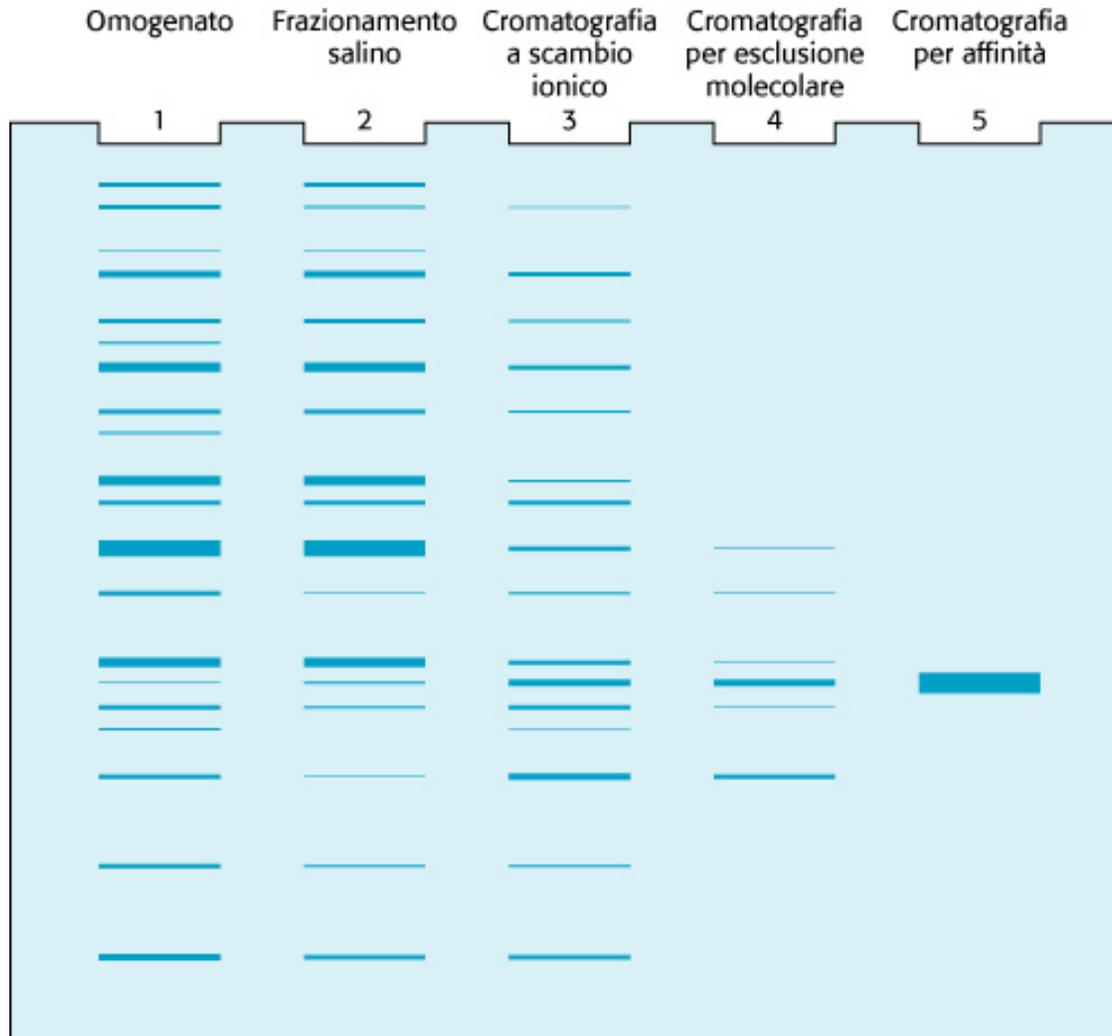


Sarà il successivo utilizzo della proteina a determinarne il target di purezza finale

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 il successivo utilizzo della proteina a determinarne il target di purezza finale

ATTIVITA' SPECIFICA

Durante il/i processo/i di purificazione occorrono 2 tests:

- uno per valutare se la proteina possiede la propria **attività** biologica (specifico, sensibile, rapido, riproducibile)
- l'altro per 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 occorre alla fine
- se mi interessa la forma attiva/conformazione nativa oppure no
- quanto **lavoro/tempo** richiede il metodo
- il **rapporto resa/costo** del metodo
- **fallibilità** del metodo

Primo Levi

“Il sistema periodico”

L’anidride carbonica [...] questo gas che costituisce la materia prima della vita, la scorta permanente a cui tutto ciò che cresce attinge, e il destino ultimo di ogni carne, non è uno dei componenti principali dell’aria, bensì un rimasuglio ridicolo, un’ “impurezza” trenta volte meno abbondante dell’argon di cui nessuno si accorge [...] è un’acrobazia ironica, uno scherzo da giocoliere, una incomprensibile ostentazione di onnipotenza-prepotenza, poichè da questa sempre rinnovata impurezza dell’aria veniamo noi: noi animali e noi piante, e noi specie umana, coi nostri quattro miliardi di opinioni discordi, i nostri millenni di storia, le nostre guerre e vergogne e nobiltà e orgoglio.

Su questo cammino all’ingiù, che conduce all’equilibrio e cioè alla morte, la vita disegna un’ansa e ci si annida.