

CDL BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE (

Corso di Biochimica Applicata (6 CFU)

Prof.ssa **Alessandra Olianas**

Lezioni : Martedì 11-13

Giovedì 9-11





Prof.ssa Alessandra Olianas

Dip. Scienze della Vita e dell'Ambiente

Sezione Biomedica (laboratorio di Biochimica)

Tel. 0706754507 (studio)

Ricevimento studenti: **si riceve per appuntamento**

olianas@unica.it



Prof Barbara Manconi
Corso di Laurea in CTF
Lezioni di Biochimica Applicata.

E' vietata la copia e la riproduzione dei contenuti e immagini in qualsiasi forma.

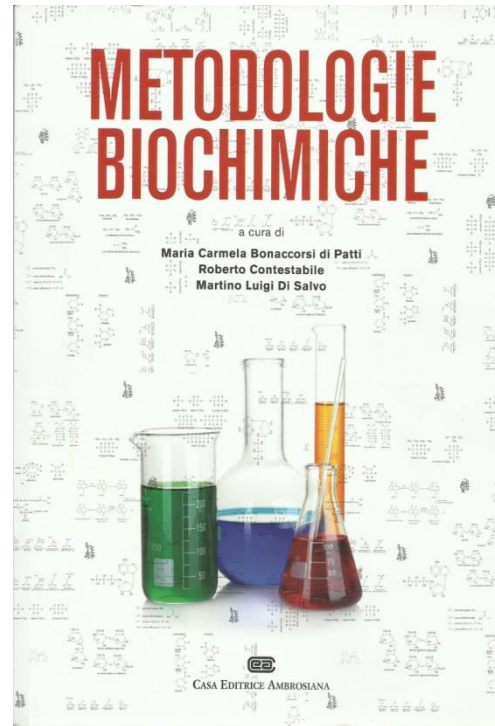
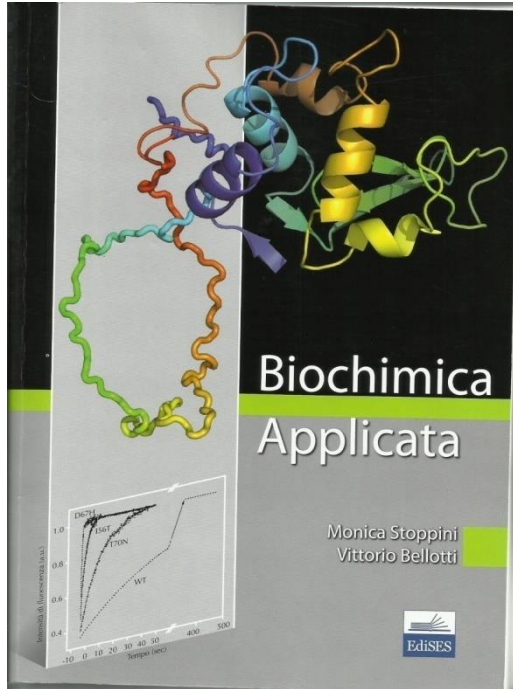
E' inoltre vietata la redistribuzione e la pubblicazione dei contenuti e immagini non autorizzate espressamente dall'autore.

Di seguito titolo, autore e editore delle fonti da cui sono state prese le immagini e i video mostrati durante le lezioni di Biochimica applicata come supporto didattico e utili per la preparazione dell'esame:

Biochimica applicata
(Stoppini- Bellotti, Ed. EdiSES)

Principi di Metodologie Biochimiche
(De Marco –Cini. Ed Piccin)

Testi consigliati:



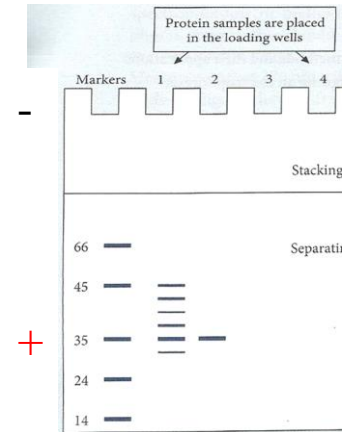
Materiale didattico del docente

PROTOCOLLO di PURIFICAZIONE

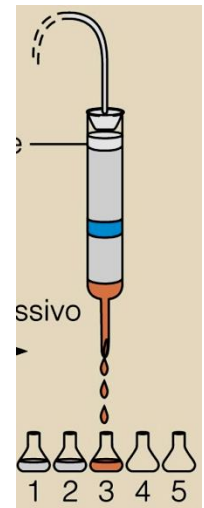
Insieme di **tecniche di separazione** che sfruttano principi diversi e vengono effettuate secondo un preciso ordine al fine di purificare una proteina a partire da una miscela complessa

Nelle **tecniche di separazione di tipo analitico** l'obiettivo è l'identificazione e la quantificazione di piccole quantità di un dato analita.

Gli analiti non vengono recuperati dopo la separazione: p.e. **tecniche elettroforetiche**



Nelle **tecniche di separazione di tipo preparativo** lo scopo principale è l'isolamento e il recupero con un alto grado di purezza di quantità (più grandi possibili) di un dato analita per studiarne successivamente le proprietà chimiche e/o biologiche: p.e. **tecniche cromatografiche**



PROTOCOLLO di PURIFICAZIONE

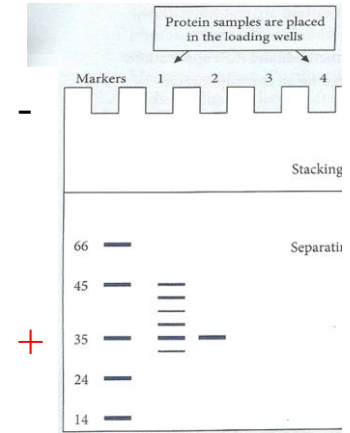
Insieme di **tecniche di separazione** che sfruttano principi diversi e vengono effettuate secondo un preciso ordine al fine di purificare una proteina a partire da una miscela complessa

Tecniche di separazione di tipo **analitico** obiettivo

- identificazione e quantificazione di piccole quantità di un dato analita.

- **Es: tecniche elettroforetiche**

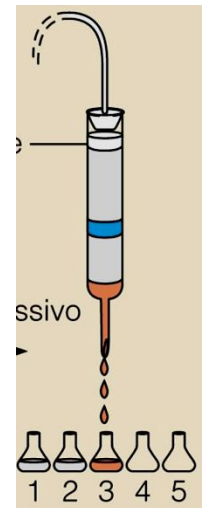
Gli analiti non vengono recuperati dopo la separazione:



Tecniche di separazione di tipo **preparativo** obiettivo

- isolamento e il recupero con un alto grado di purezza di quantità (più grandi possibili) di un dato analita per studiarne successivamente le proprietà chimiche e/o biologiche:

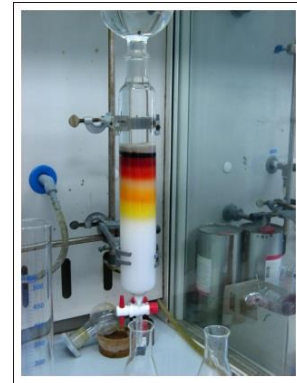
- **ES: tecniche cromatografiche**



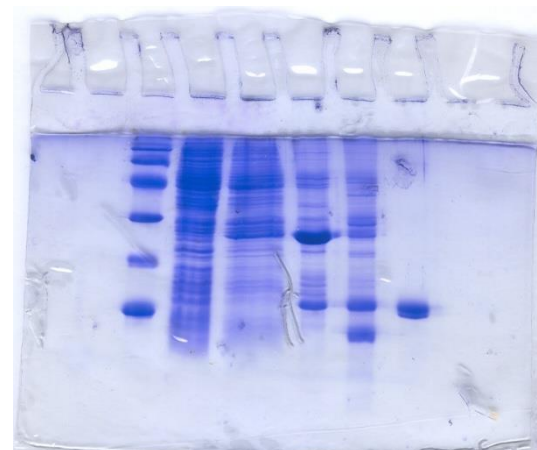
PROTOCOLLO di PURIFICAZIONE:

Insieme di **tecniche di separazione** che sfruttano principi diversi e vengono effettuate secondo un preciso ordine al fine di purificare una proteina a partire da una miscela complessa

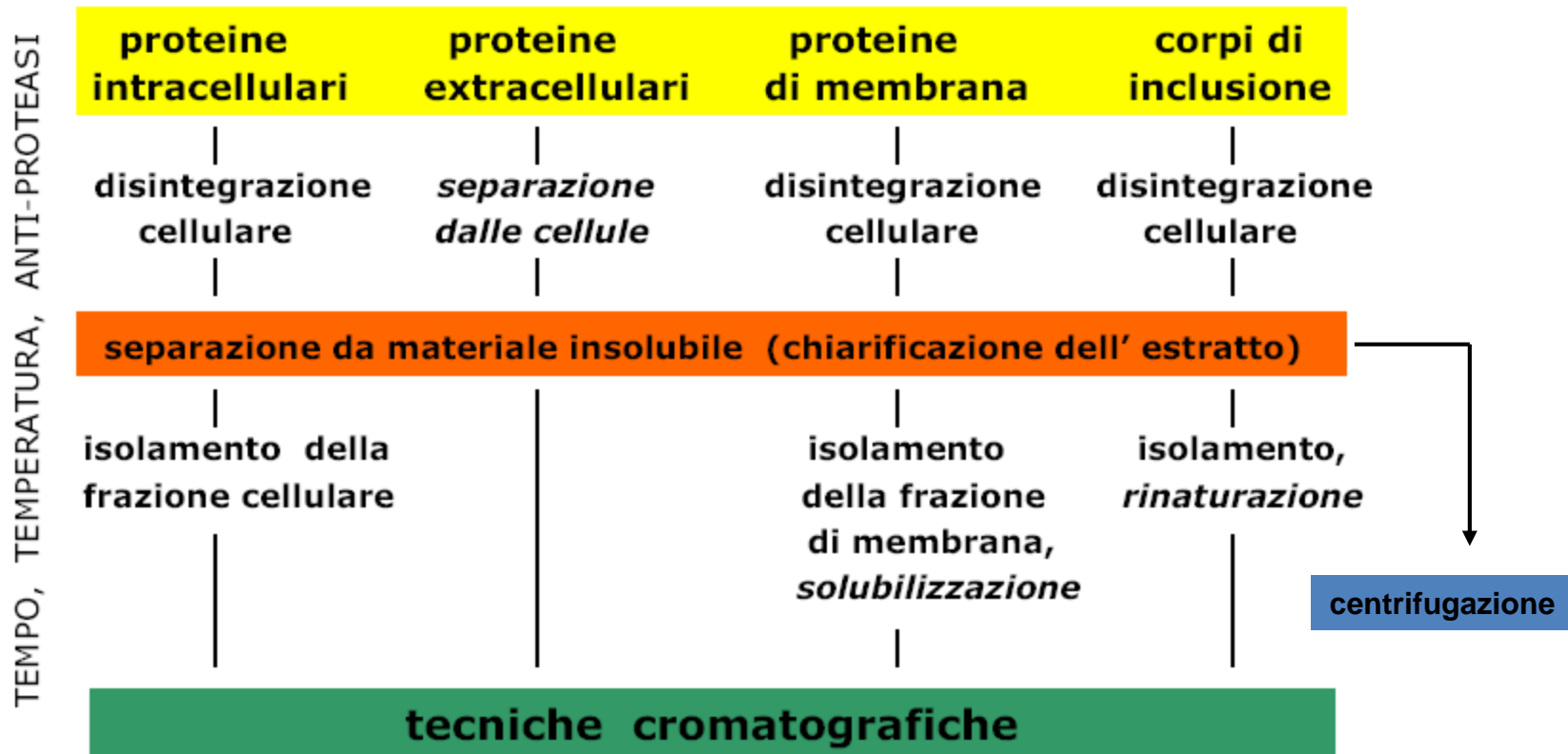
Tecniche di separazione di tipo preparativo



Per verificare il livello di purificazione raggiunto nelle diverse fasi della purificazioni dobbiamo usare tecniche di separazione analitiche



Solubilizzazione della proteina e sviluppo dei passaggi di purificazione



PROTOCOLLO DI PURIFICAZIONE

Serie di tecniche di separazione che sfruttano principi diversi per purificare una proteina a partire da una miscela complessa

Le diverse tecniche sfruttano diverse caratteristiche:

- SOLUBILITA'

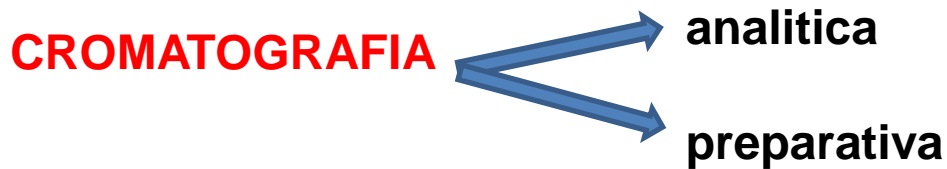
- MASSA MOLECOLARE

- CARICA ELETTRICA

- PROPRIETA' di ADSORBIMENTO

- AFFINITA' di LEGAME ad altre biomolecole

CROMATOGRAFIA



La cromatografia è una tecnica di separazione dei componenti di una miscela basata sulla distribuzione dei suoi componenti tra **due fasi**, una stazionaria e una mobile che si muove lungo una direzione definita.

- **Fase stazionaria** (solida o liquida o miscela solido/liquido)
- **Fase mobile** (liquida o gassosa)
- **La separazione delle molecole dipende dalle interazioni che le molecole instaurano con la fase stazionaria o la fase mobile**

La **MATRICE** e' il supporto della Fase Stazionaria

La matrice deve essere modificata con l'inserimento di specifici gruppi funzionali

MATRICI più utilizzate in CROMATOGRAFIA su colonna:

-INORGANICHE:

-**SILICE** : polimero dell'acido ortosilicico (idrofilica) -Si-OH
-Stabile tra pH 3 e 8

- POLISACCARIDICHE:

•**AGAROSIO** : D-galattosio e 3,6-anidro-L-galattosio Stabile tra pH 3 e 14

Sepharose o Biogel

•**CELLULOSA**: omopolisaccaride di glucosio (idrofilica) legami β 1-4 glicosidici
Stabile a diversi valori di pH

•**DESTRANO**: omopolisaccaride di glucosio (idrofilica) legami α 1,6 glicosidici
Stabile fino a pH 12 **Sephadex**

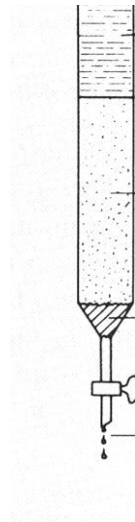
- POLIMERI ORGANICI SINTETICI:

•**POLIACRILAMIDE**: polimero formato da acrilamide e N,N'-metilen bis-acrilamide
(Stabile tra pH 2 e 11)

•**POLISTIRENE**: polimero formato da molecole di stirene
Buona stabilità a tutti i valori di pH

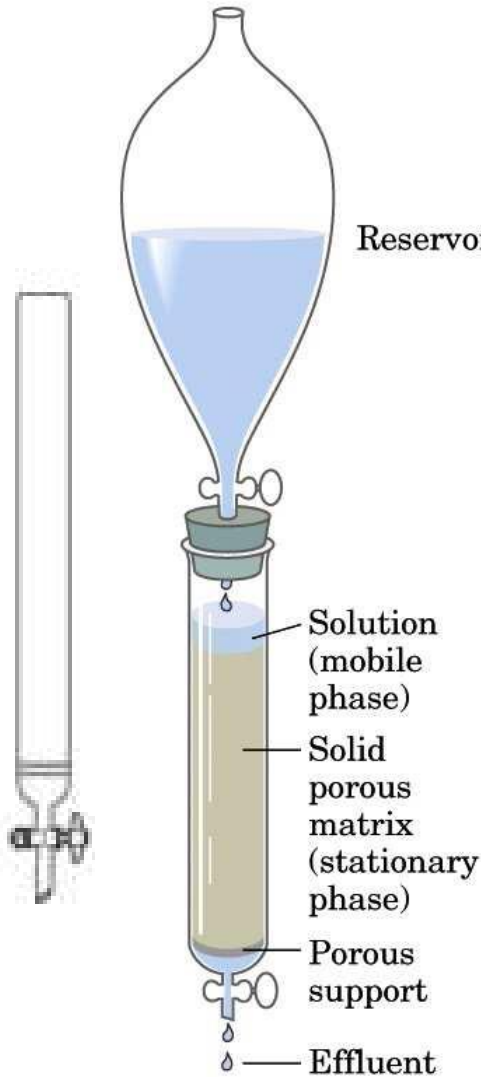
CARATTERISTICHE della **MATRICE**: deve possedere :

- Elevata Stabilità Meccanica (deve permettere flussi di fase mobile elevati)
- Buona stabilità chimica = Inerte e **Insolubile nella Fase Mobile** e nel Campione
- Gruppi funzionali opportuni x legare gruppi Funzionali della F. S.
- Elevata densità di gruppi funzionali = Elevata Capacità



CROMATOGRAFIA

Colonna



Reservoir Serbatoio

Solution (mobile phase)

Solid porous matrix (stationary phase)

Porous support

Effluent

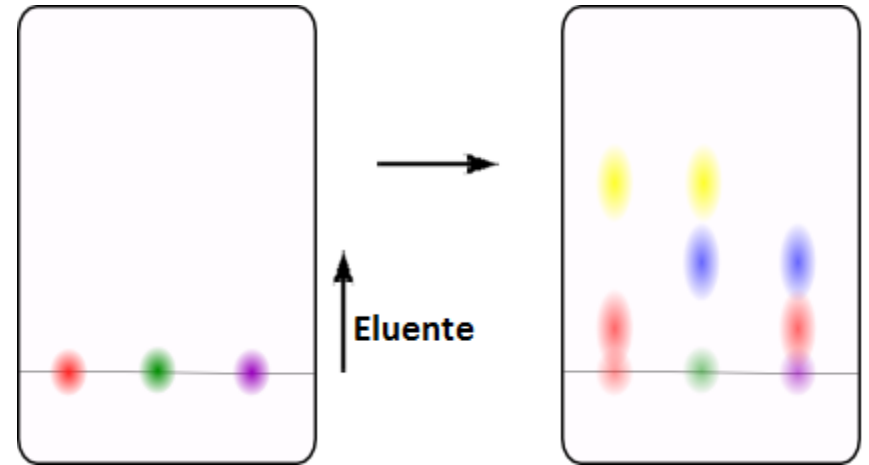
Fase mobile

Fase stazionaria

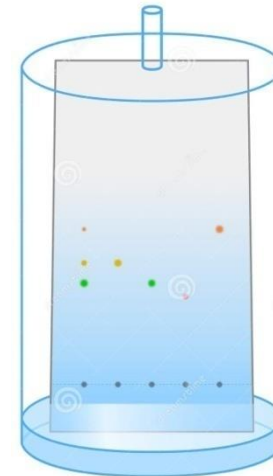
Setto poroso

eluato

Thin Layer Chromatography (TLC)



Eluente

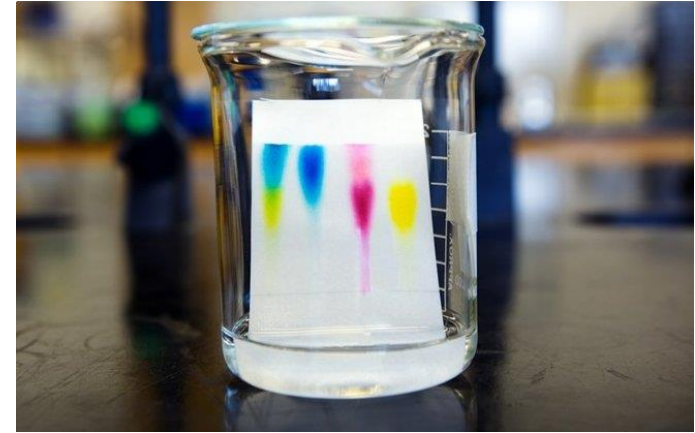


Download from Dreamstime.com

TECNICHE CROMATOGRAFICHE

TECNICHE di SEPARAZIONE dei componenti di una miscela basate sulla diversa distribuzione dei componenti della miscela in due fasi non miscibili tra loro:
FASE MOBILE e FASE STAZIONARIA

- **CROMATOGRAFIA** su **STRATO SOTTILE** o **TLC** (thin layer chromatography) in **MODALITA' ANALITICA**



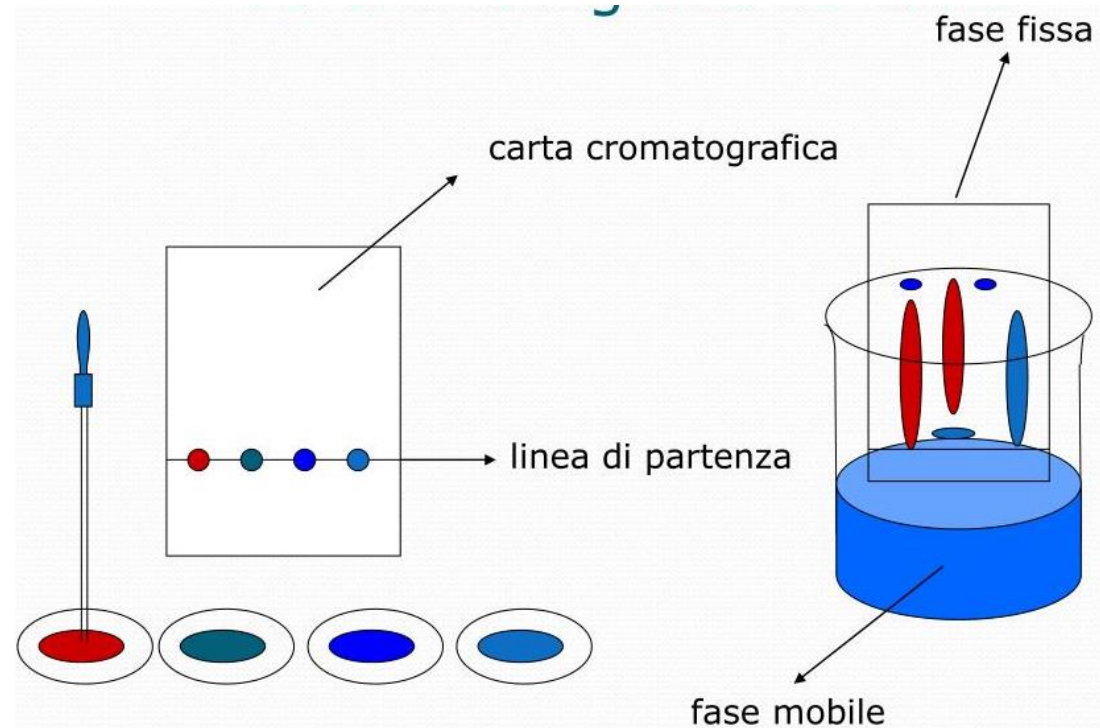
Nella TLC la fase stazionaria è rappresentata da uno strato sottile di materiale adsorbente, solitamente **gel di silice** o ossido di alluminio, depositato sulla superficie di una lastra di materiale inerte, generalmente vetro, plastica o alluminio. Si semina una goccia del campione su un'estremità della lastra da TLC che viene poi posizionata verticalmente in una camera chiusa contenente un **solvente organico (fase mobile)** sul fondo. La fase mobile risale lungo la superficie della lastra per capillarità; i componenti del campione migrano a distanze variabili, in base alle rispettive affinità differenziali per la fase stazionaria e quella mobile. Quando il solvente raggiunge l'estremità superiore della lastra, questa viene rimossa dalla camera di sviluppo e lasciata asciugare.

TECNICHE CROMATOGRAFICHE

-CROMATOGRAFIA su CARTA in MODALITA' ANALITICA

FASE STAZIONARIA: fibre di cellulosa

FASE MOBILI miscele di solventi organici =
SONO POCO UTILIZZATE x le PROTEINE
(denaturazione)



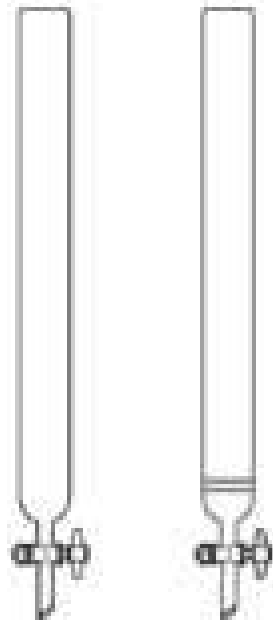
- CROMATOGRAFIA **su COLONNA** Liquid chromatography (LC)
con MODALITA' **sia ANALITICA che PREPARATIVA:**

- basse pressioni < 5 bar

Low Pressure Liquid Chromatography

- alte pressioni > 50 bar HPLC

buretta

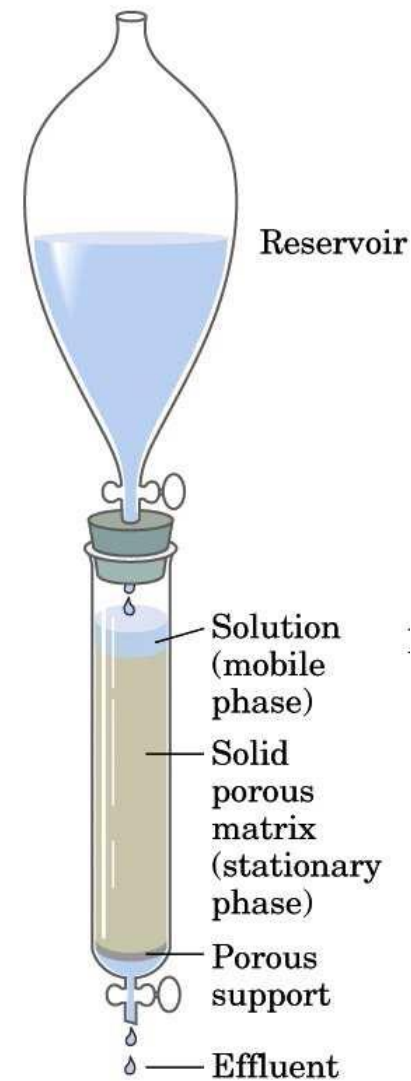


Colonna
cromatografica

Setto poroso
Trattiene la fase stazionaria

FASI OPERATIVE di una SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA:

- IMPACCAMENTO della COLONNA
- CARICAMENTO del CAMPIONE
- ELUIZIONE
- RIVELAZIONE degli analiti
- RACCOLTA delle FRAZIONI
- CONTROLLO della PURIFICAZIONE



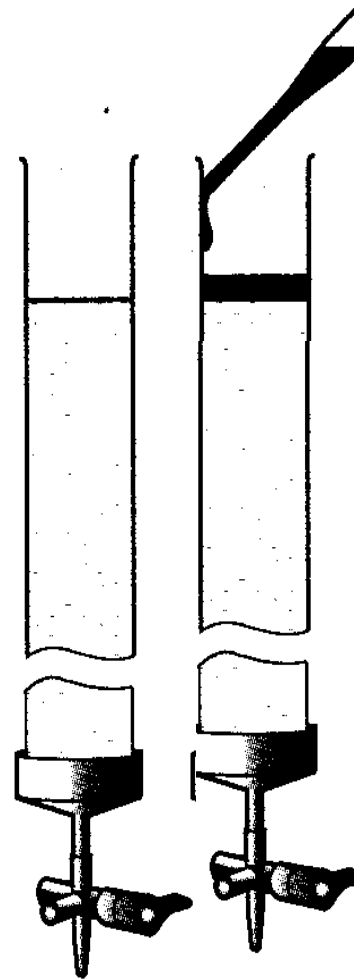
1) **IMPACCAMENTO** della **COLONNA**:

Equilibrare opportunamente la fase stazionaria:

- se in forma di polvere secca deve essere **sospesa** nella fase mobile (generalmente acquosa)
- se in sospensione in una miscela acqua/solventi organici (x conservazione a lungo termine) deve essere equilibrata fase mobile prescelta

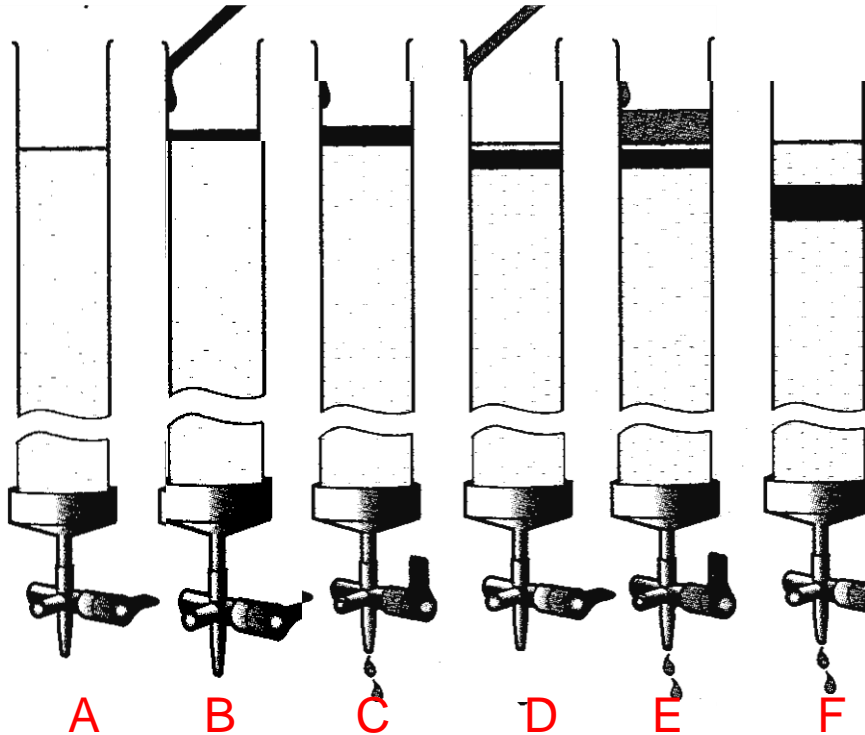
Tale sospensione deve essere versata **con continuità** e delicatamente in colonna avendo cura di tenere **chiuso il rubinetto**, evitando che bolle d'aria rimangano intrappolate tra le particelle di fase stazionaria durante l'impaccamento

Una volta che la colonna è impaccata **non deve mai essere lasciata andare a secco**, quindi sopra la resina deve sempre essere lasciato uno strato di fase mobile



2) CARICAMENTO DEL CAMPIONE

- A) Rimuovere dalla sommità della colonna l'eccesso di fase mobile e chiudere il rubinetto
- B) Applicare il campione (a rubinetto chiuso) sul top della F.S. utilizzando una pipetta e facendo attenzione a non alterare il letto di F.S.
- C) Aprire il rubinetto sino a far **adsorbire** tutto il campione con la F.S.
- D) Chiudere il rubinetto
- E) Aggiungere Fase Mobile delicatamente con una pipetta, aprire il rubinetto e fare scorrere la fase mobile sulla F.S.
- F) I componenti della miscela si muovono lungo la colonna in funzione della loro interazione con la Fase stazionaria e con la Fase mobile.





3) ELUIZIONE

I componenti della miscela vengono separati all'interno della colonna cromatografica durante il processo di **ELUIZIONE**

tempo di ritenzione = t_R

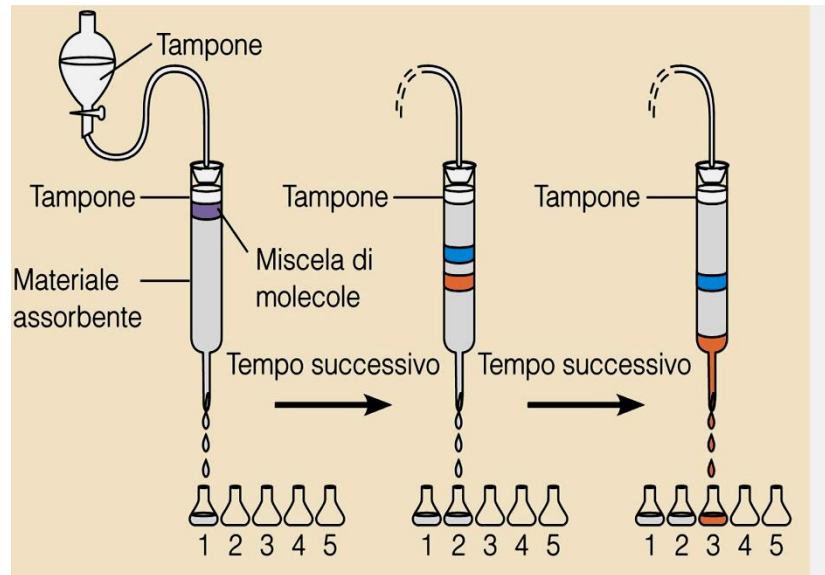
Il tempo impiegato da ciascun analita per fuoriuscire dalla colonna

volume di eluizione = V_e


Il volume di fase mobile richiesto per l'eluizione di ciascun analita

$$V_e = t_R F \quad F = \text{velocità del flusso}$$

E' importante che l'eluizione avvenga a flusso costante:
pompa peristaltica




ELUIZIONE ISOCRATICA



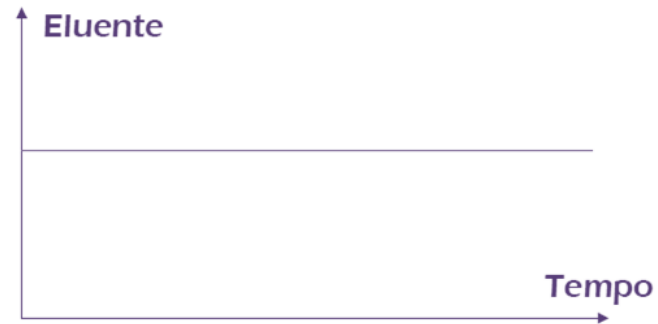
S_V
 I^u Sviluppo della colonna senza modificare
la composizione della FASE MOBILE

ELUIZIONE NON ISOCRATICA



Lo sviluppo della colonna avviene modificando una o più
caratteristiche della FASE MOBILE
(pH, Forza ionica)

**Se durante l'eluizione non
viene modificata la
composizione della fase
mobile =
ELUZIONE ISOCRATICA**



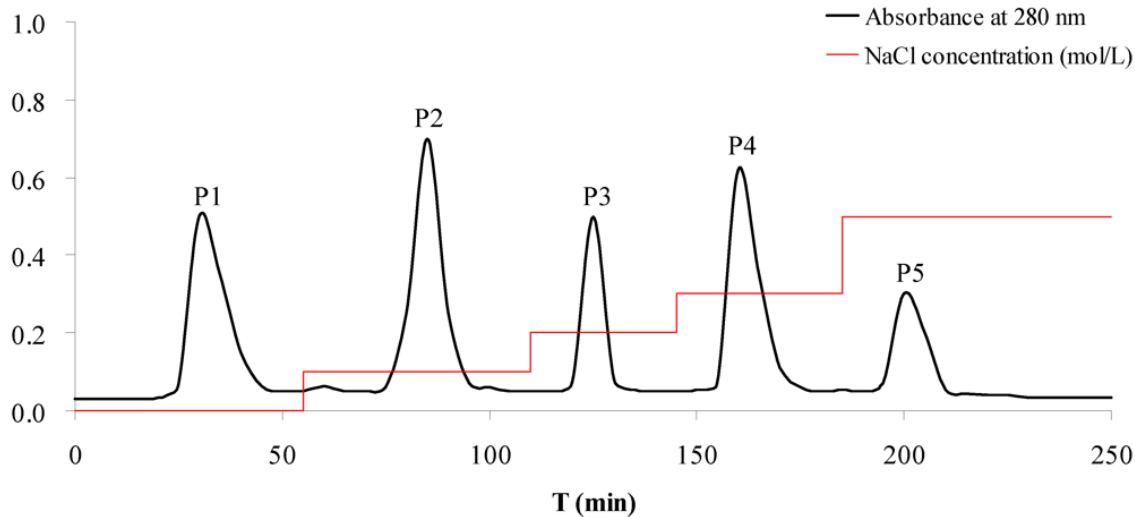
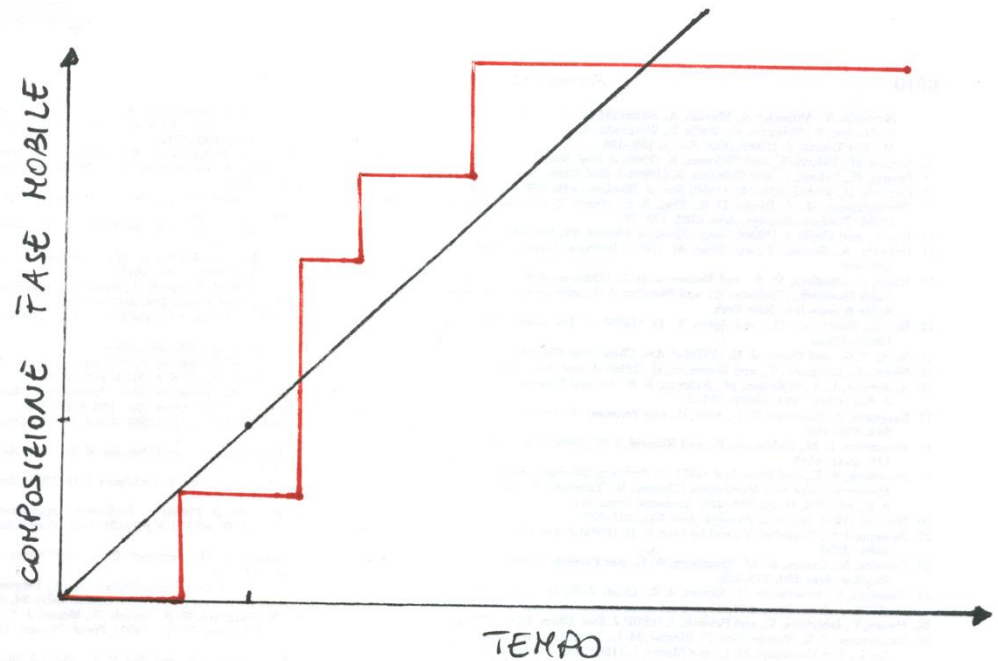
Se durante l'eluizione la fase mobile viene variata per uno o più parametri (pH, f. ionica): **ELUIZIONE NON ISOCRATICA**

ELUIZIONE A STEP

variazioni discontinue impartite manualmente dall'operatore

ELUIZIONE in GRADIENTE

variazioni continue mediante FORMATORE di GRADIENTE o DUE POMPE

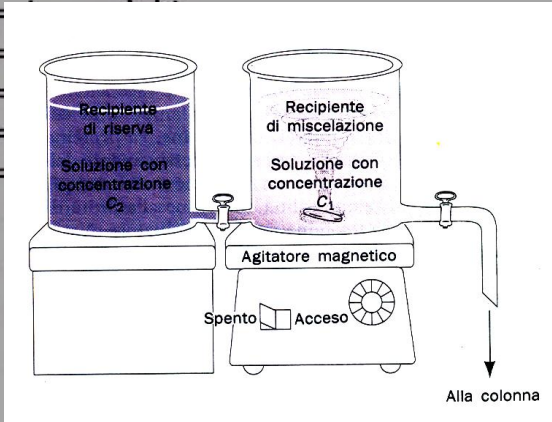


ELUIZIONE IN GRADIENTE

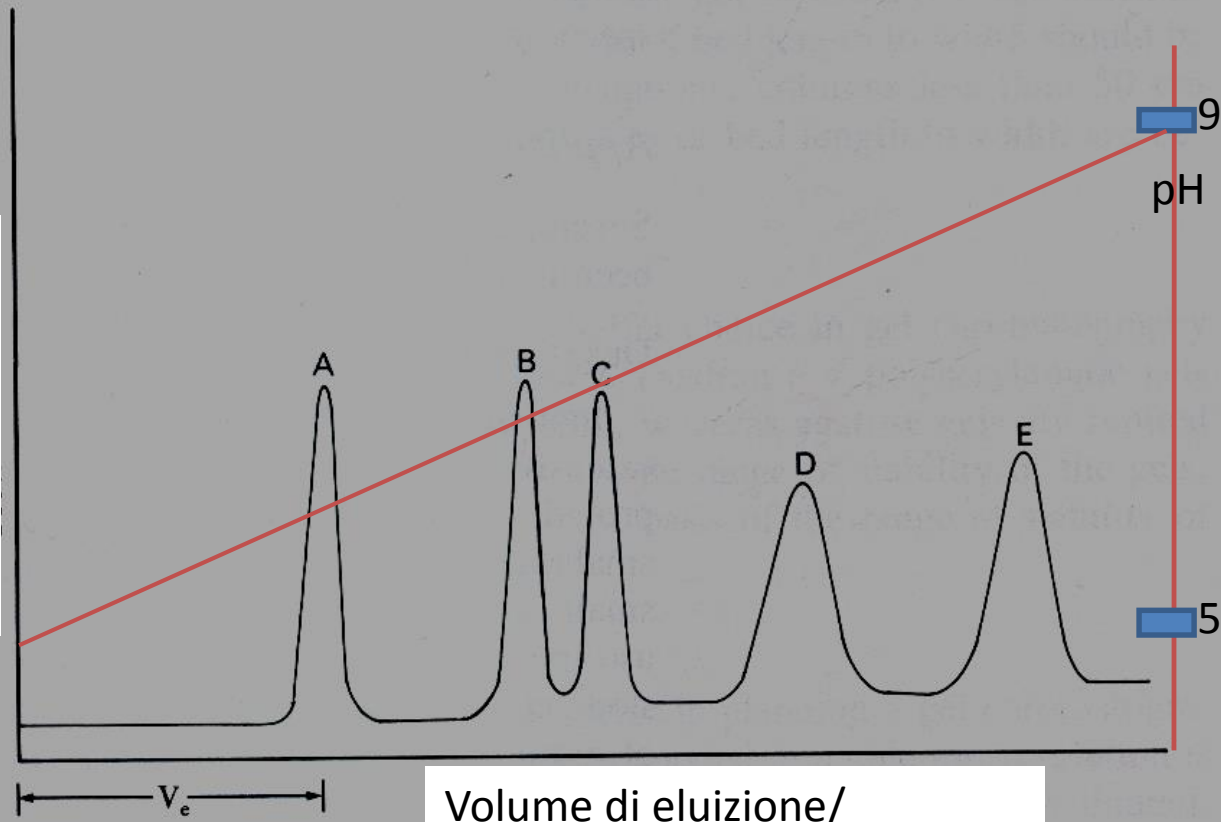
Figure 3.10

Elution curve for a mixture of several proteins.

A =
B =
C =
D =
E =



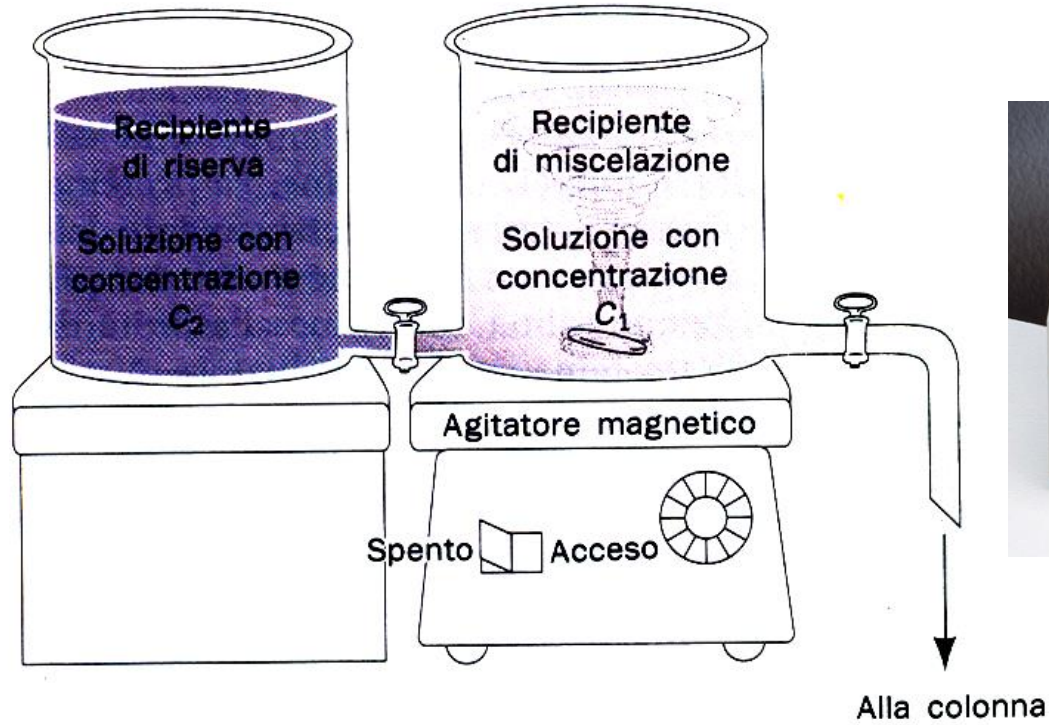
A_{280nm}



Volume di eluizione/
Tempo di eluizione/
Numero delle provette

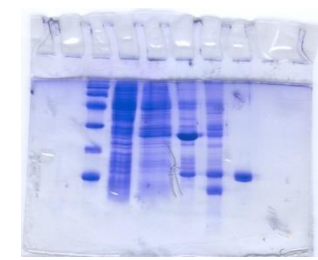
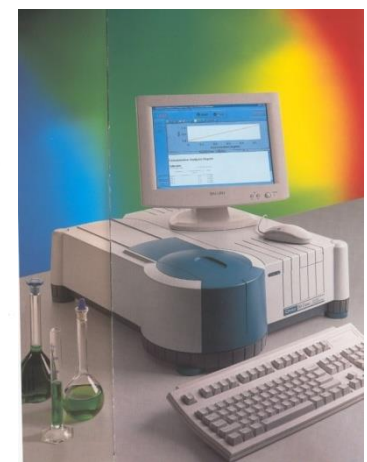
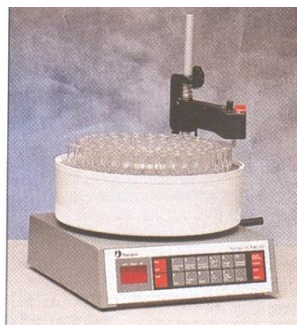
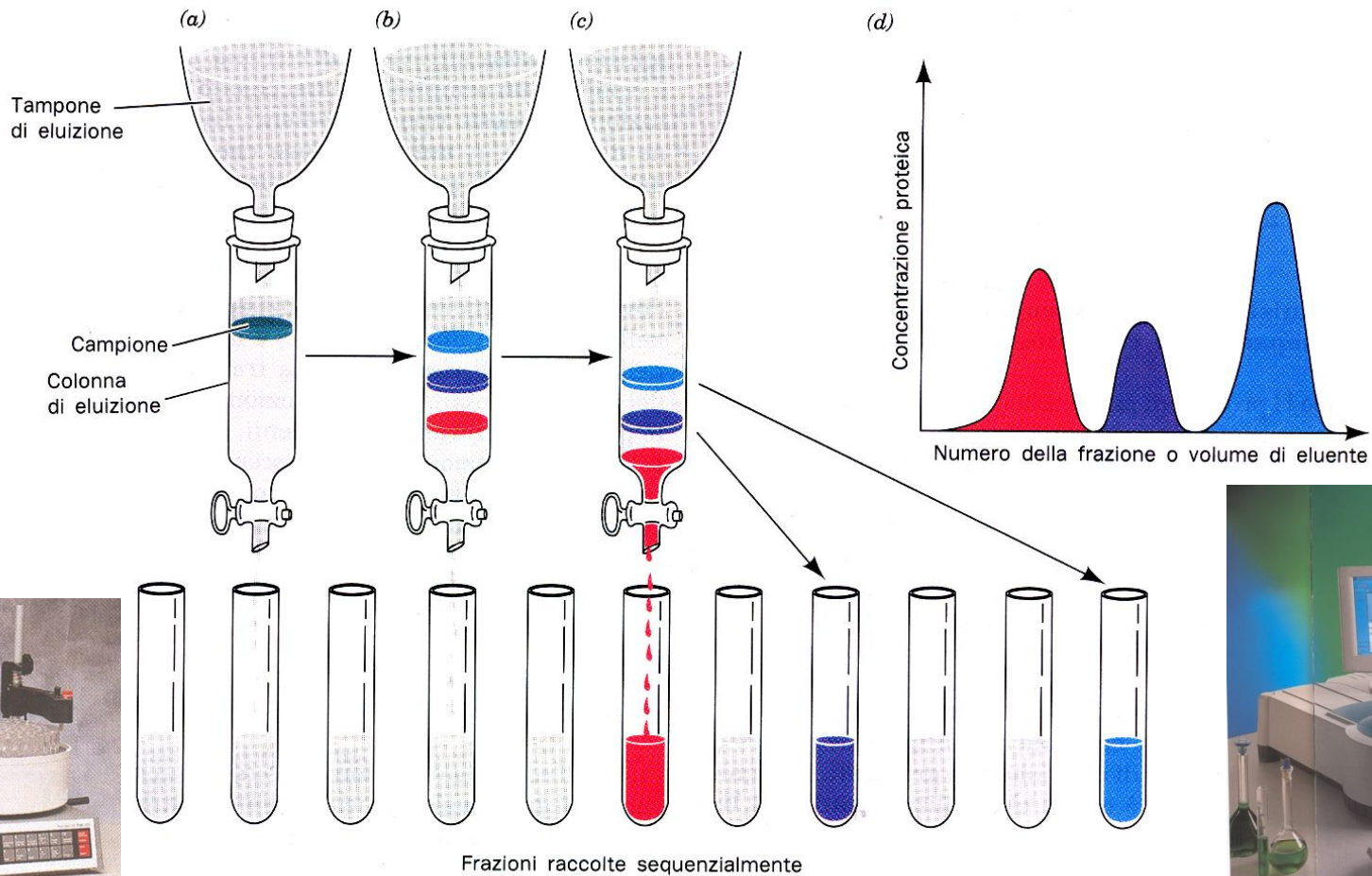
ELUIZIONE in GRADIENTE
variazioni continue mediante
FORMATORE di GRADIENTE o
DUE POMPE

FORMATORE DI GRADIENTE



POMPA PERISTALTICA

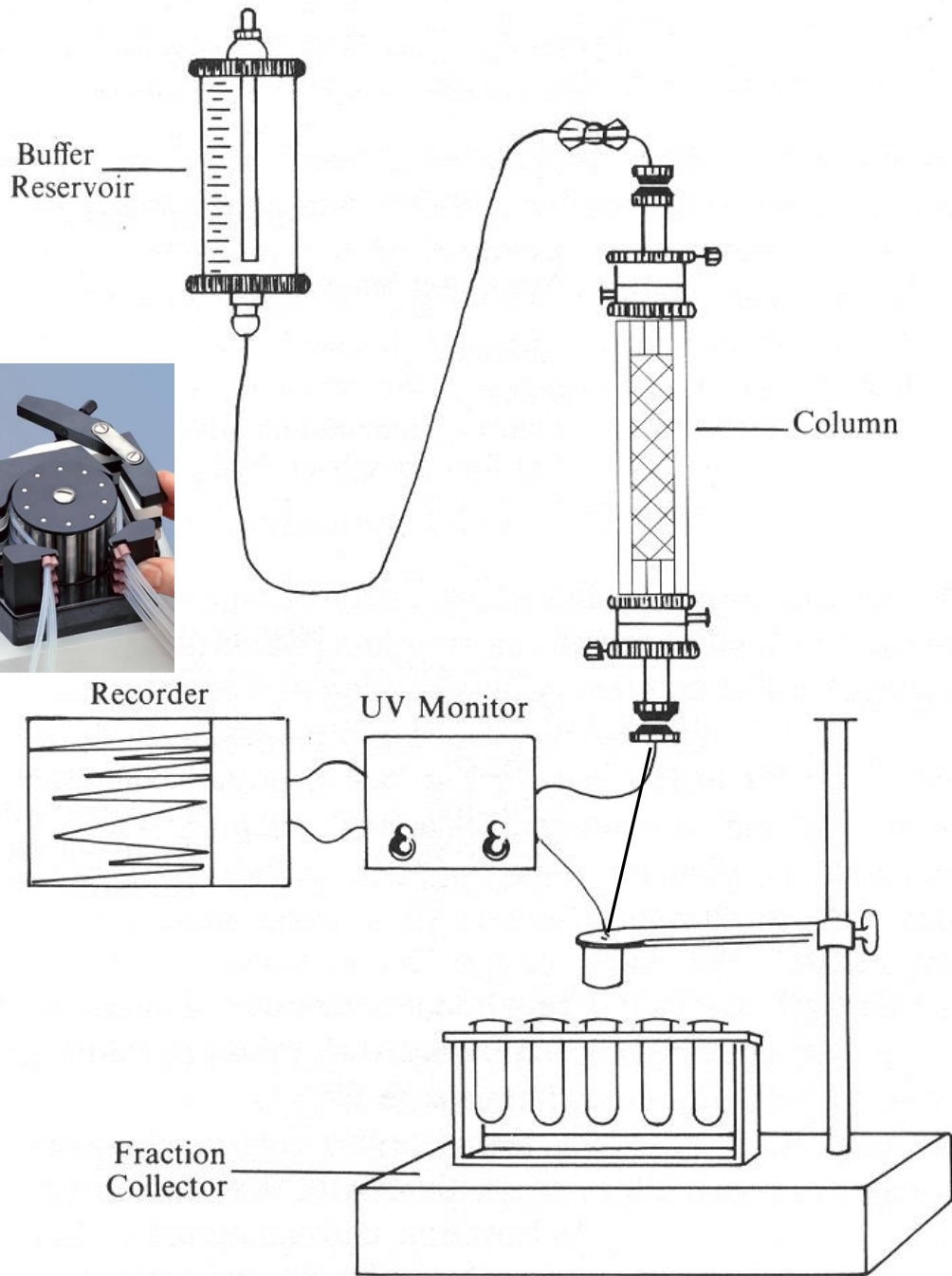




FASI OPERATIVE di una SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA:
IMPACCAAMENTO della COLONNA
CARICAMENTO del CAMPIONE
ELUIZIONE
RIVELAZIONE degli analiti
RACCOLTA delle FRAZIONI
CONTROLLO della PURIFICAZIONE mediante tecnica analitica (p.es. elettroforesi)



**POMPA
PERISTALTICA**



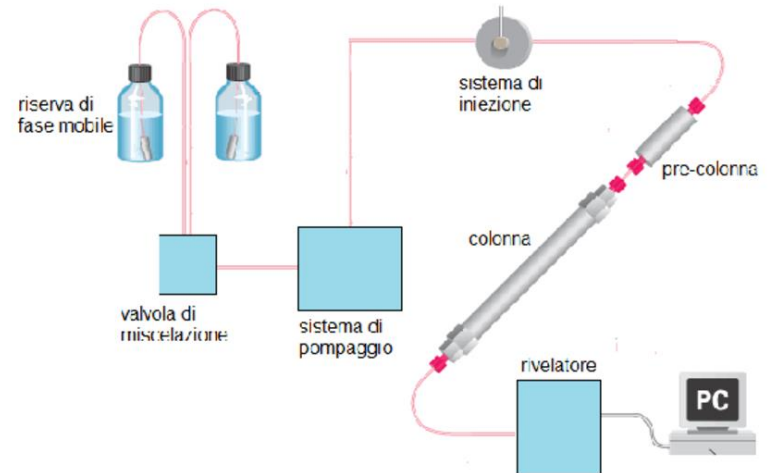
Fraction
Collector

Raccogliatore
di frazioni

Cromatografia Liquida (LC)

Sistema CROMATOGRAFICO

Un cromatografo liquido è costituito da



- 1) Una riserva di fase mobile (più un sistema di degassamento)
- 2) Una valvola di miscelazione
- 3) Un sistema di pompaggio
- 4) Un sistema di iniezione del campione
- 5) Una colonna di separazione contenente una opportuna fase stazionaria
- 6) Un rivelatore

PARAMETRI : coefficiente di distribuzione

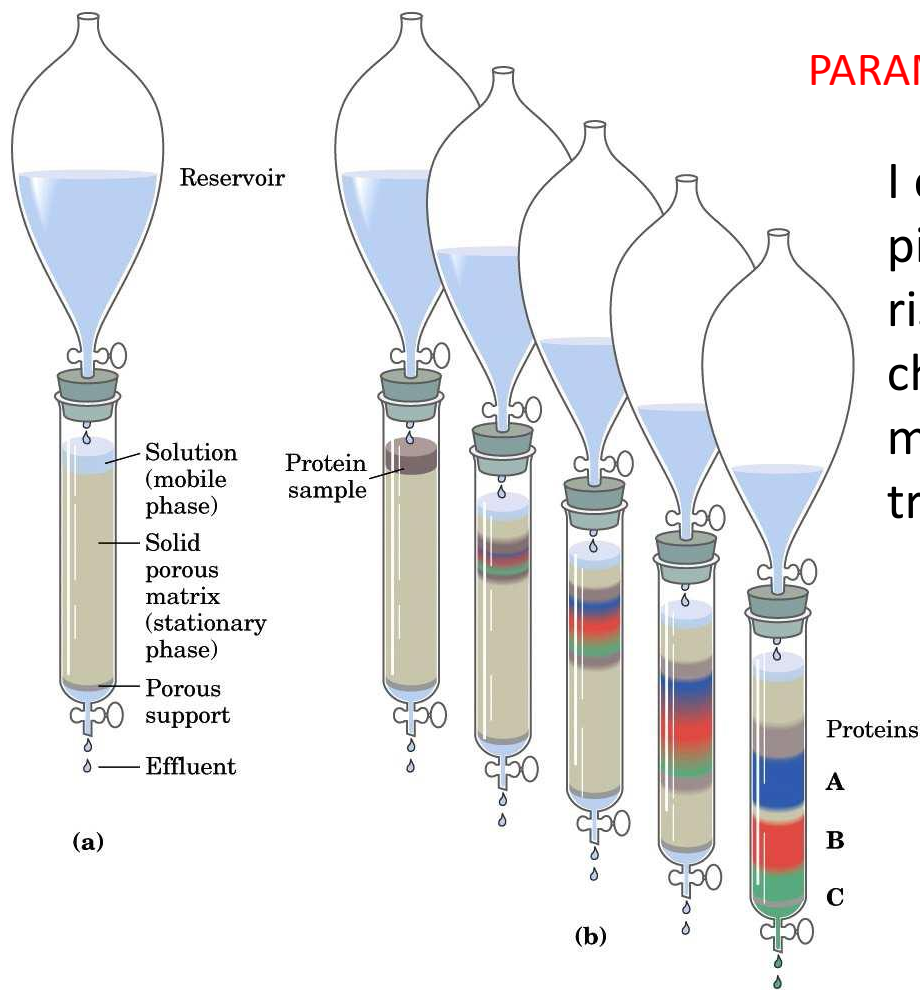
I componenti della miscela che **interagiscono** più fortemente con la FS **saranno rallentati** rispetto ad altri componenti della miscela che non interagiscono con la FS, che si muovono più velocemente lungo la colonna, trascinati dal flusso di FM

Ogni analita **A** della miscela è caratterizzato da un coefficiente di distribuzione K_d tra due **fasi immiscibili**

$[A]$ nella fase mobile

$K_d = \frac{[A]_{\text{mobile}}}{[A]_{\text{stationaria}}}$

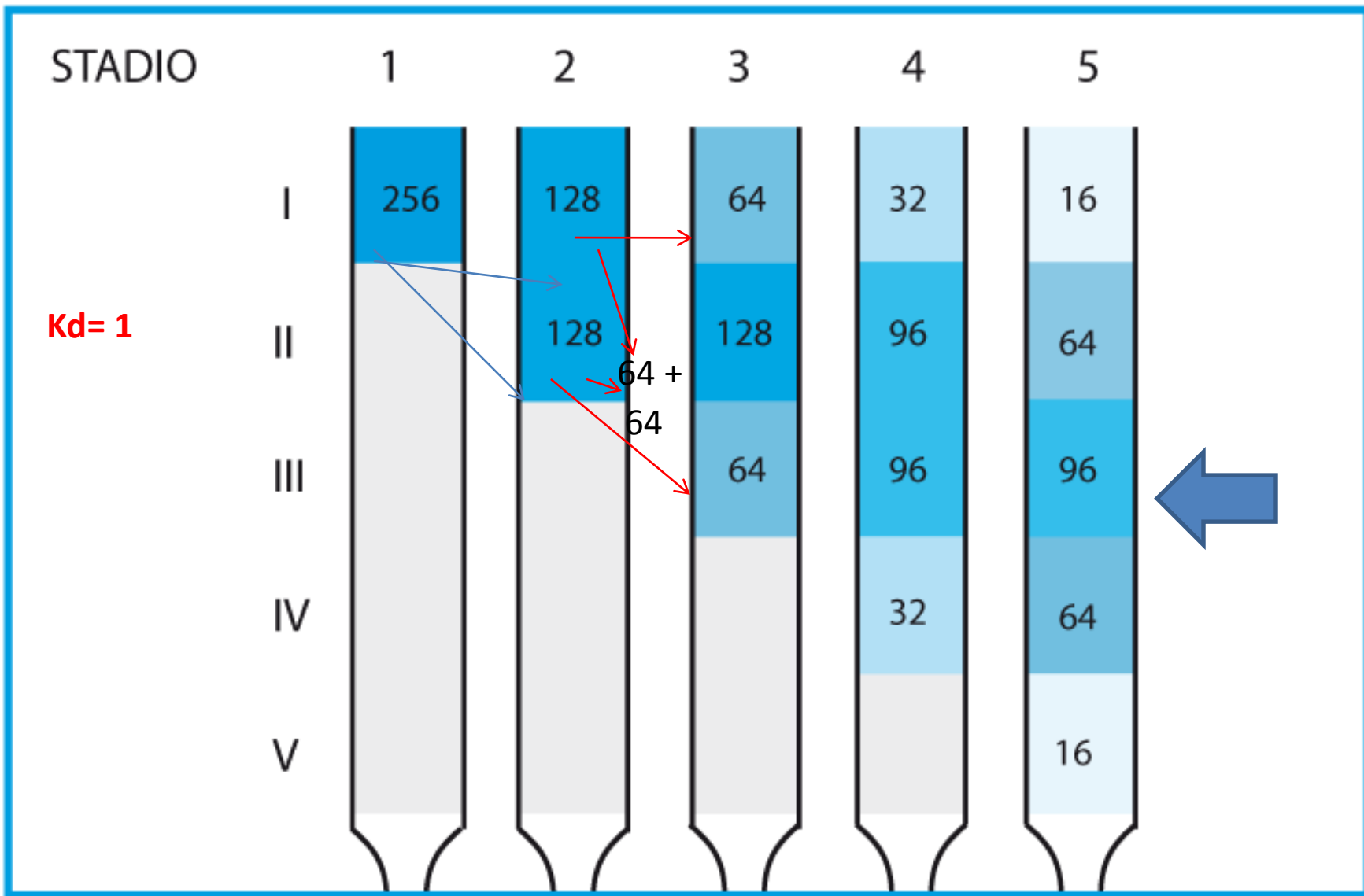
$[A]$ nella fase stazionaria



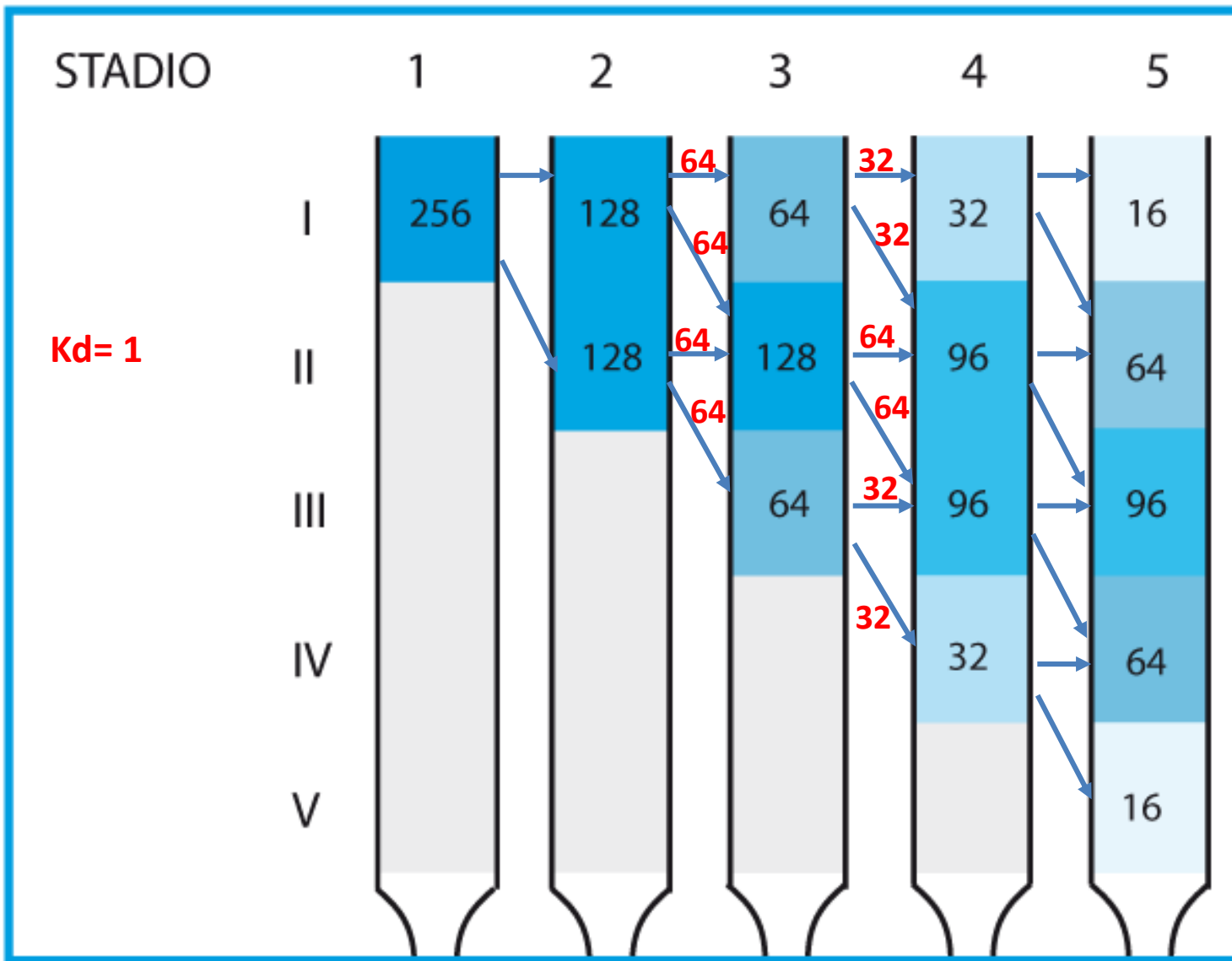
$K_d = 1$ indica che l'analita interagisce ugualmente con la fase mobile e la fase stazionaria

$K_d > 1$ indica che l'analita interagisce preferenzialmente con la fase mobile → si muove velocemente attraverso la colonna

$K_d < 1$ indicano che l'analita interagisce preferenzialmente con la fase stazionaria → si muove lentamente lungo la colonna



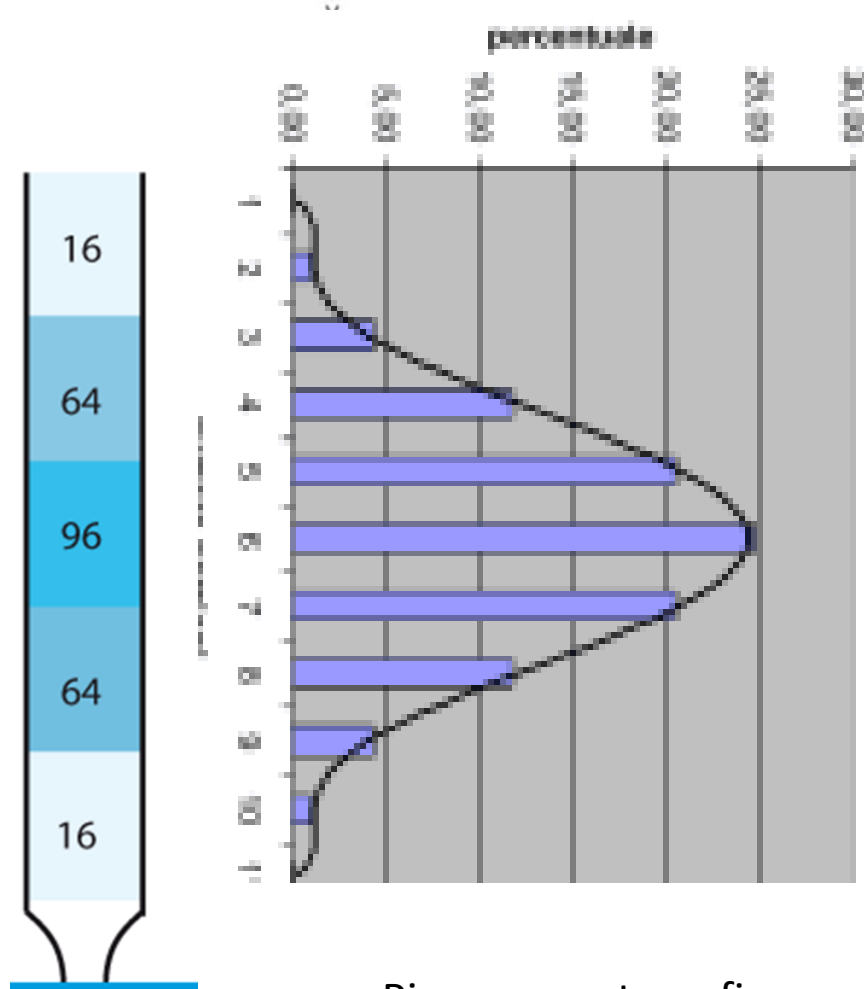
$K_d = 1$ indica che l'analita interagisce ugualmente con la fase mobile e la fase stazionaria



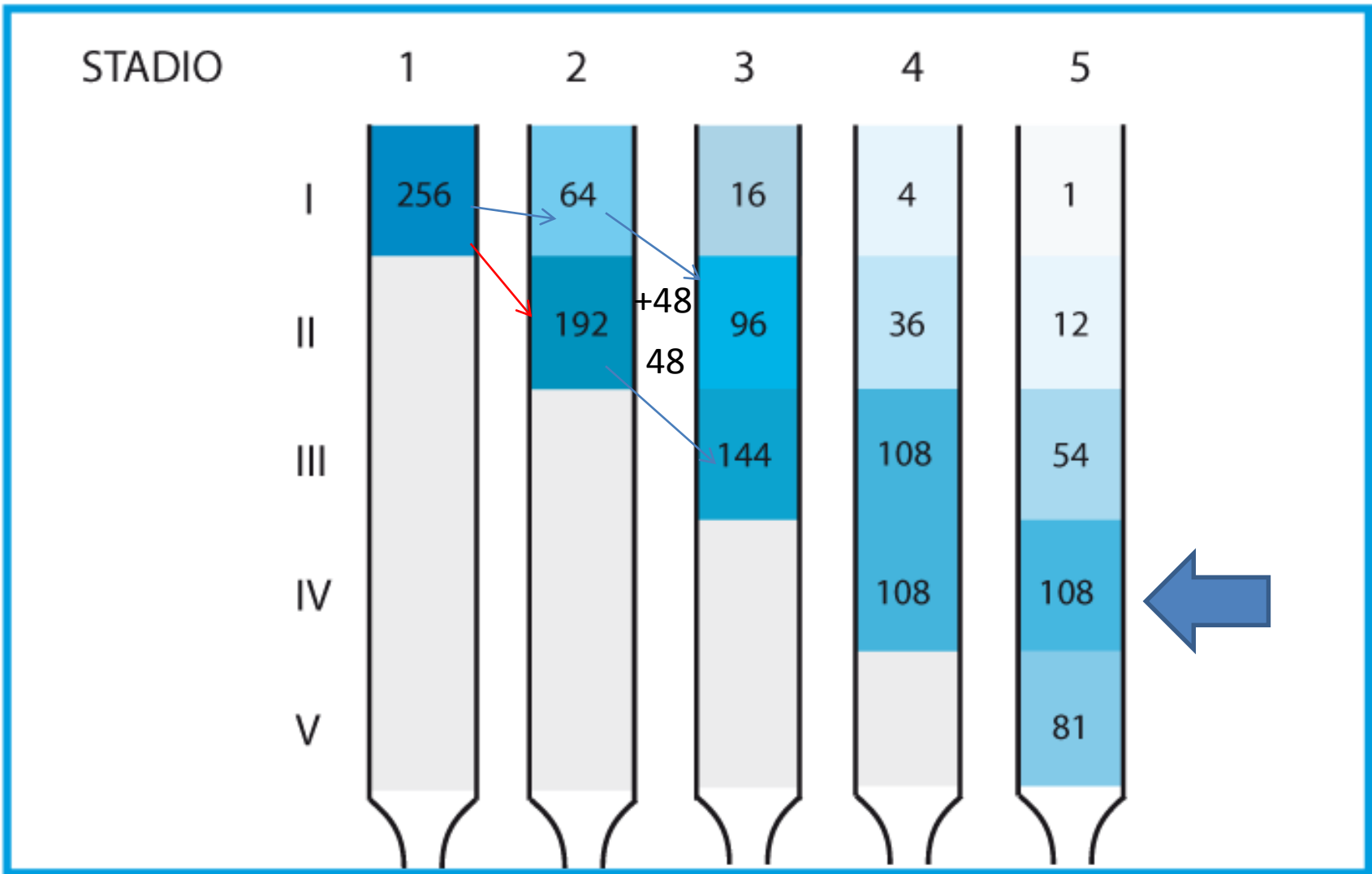
$K_d = 1$ indica che l'analita interagisce ugualmente con la fase mobile e la fase stazionaria

PICCO CROMATOGRAFICO= GAUSSIANA

Un processo separativo di tipo cromatografico ha quindi come risultato un **profilo di concentrazione** risolto nello spazio o nel tempo di **forma gaussiana**.



Picco cromatografico



SU 4 MOLECOLE:

- 3 parti FM
- 1 parte FS

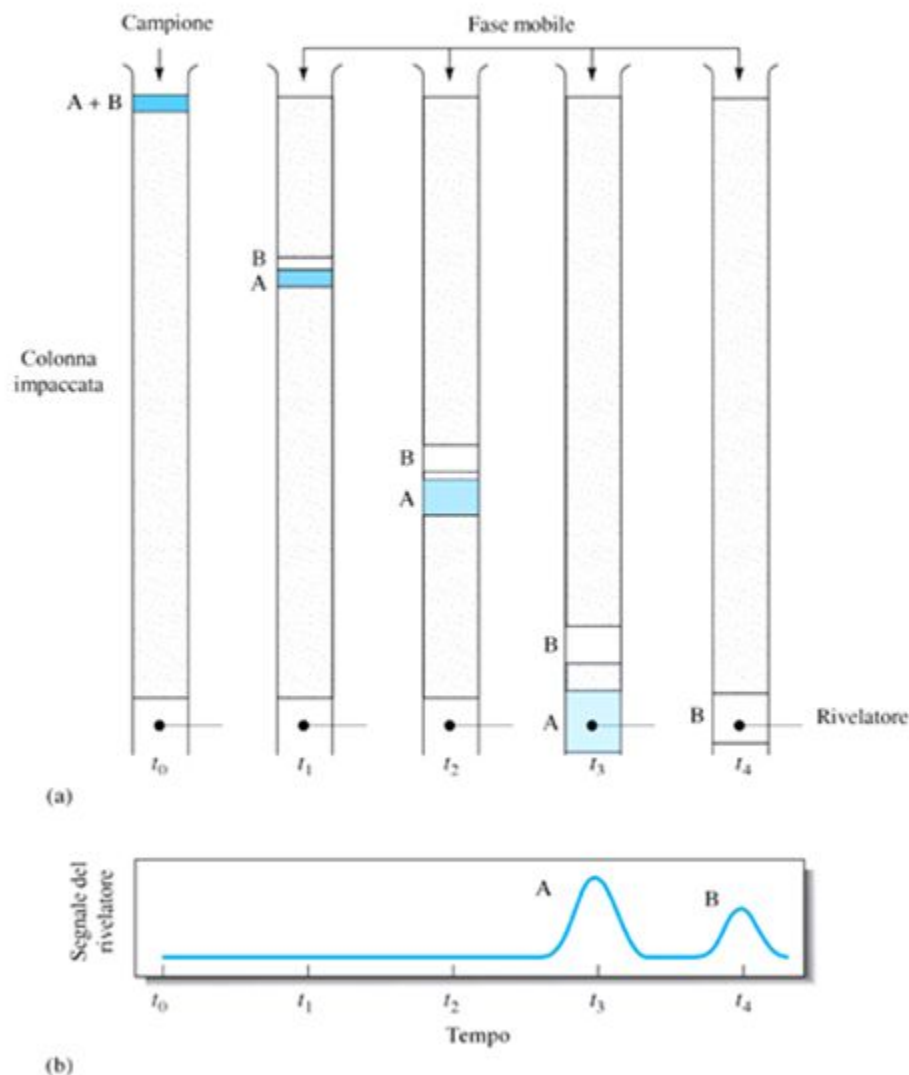
$$K_d = \frac{[A] \text{ nella fase mobile}}{[A] \text{ nella fase stazionaria}}$$

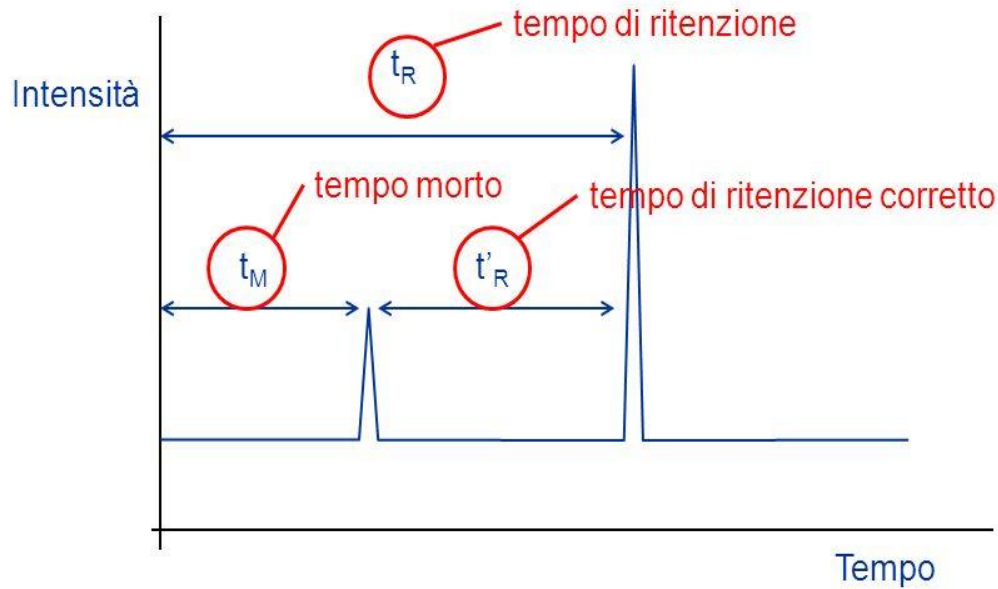
Visualizzazione della separazione

Ponendo all'uscita della colonna un rivelatore che misuri la concentrazione del soluto nell'*eluuto* (cioè la fase mobile che esce dalla colonna) e riportando il segnale in funzione del tempo si può ottenere un *cromatogramma*

La posizione dei picchi sull'asse dei tempi, o *tempo di ritenzione*, serve per identificare i componenti del campione

L'area sottesa dai picchi è proporzionale alla quantità di ogni singolo componente e può essere utilizzata a scopo quantitativo





▪ tempo di ritenzione = t_R

Il tempo impiegato da ciascun analita per fuoriuscire dalla colonna

tempo morto = t_M (tempo di un analita che si muove alla stessa v della fase mobile)

$$t'_R = t_R - t_M$$

tempo netto di ritenzione = t'_R

La **risoluzione di un picco** fornisce una misura delle capacità di un sistema cromatografico di separare un analita dagli altri della miscela=
PICCHI BEN SEPARATI

▪ **Selettività :**

▪ **Efficienza:**

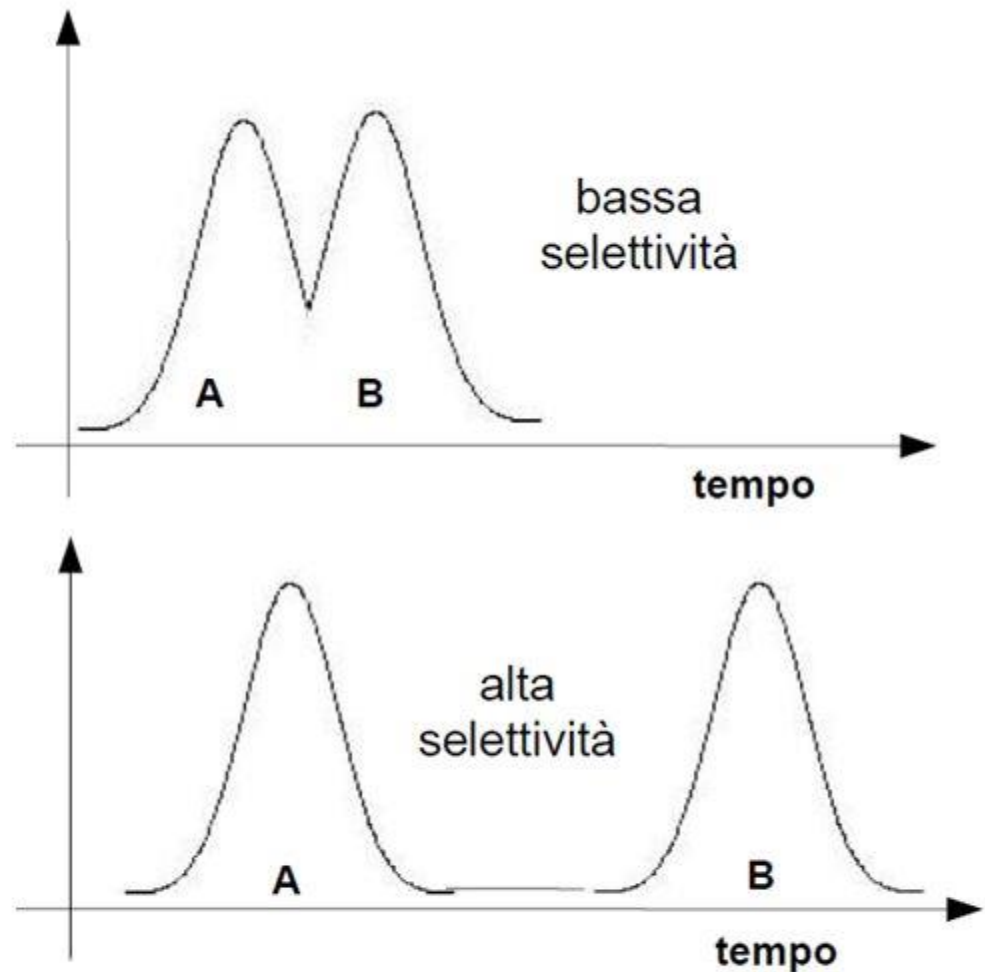
▪ **Selettività** : capacità di eluire specie chimiche diverse a velocità diverse (rapporto tra i tempi di ritenzione delle due sostanze)

○ **Selettività**

E' definita come la capacità di una colonna di fornire picchi distanziati e dipende dalla temperatura e dalla natura della fase stazionaria.

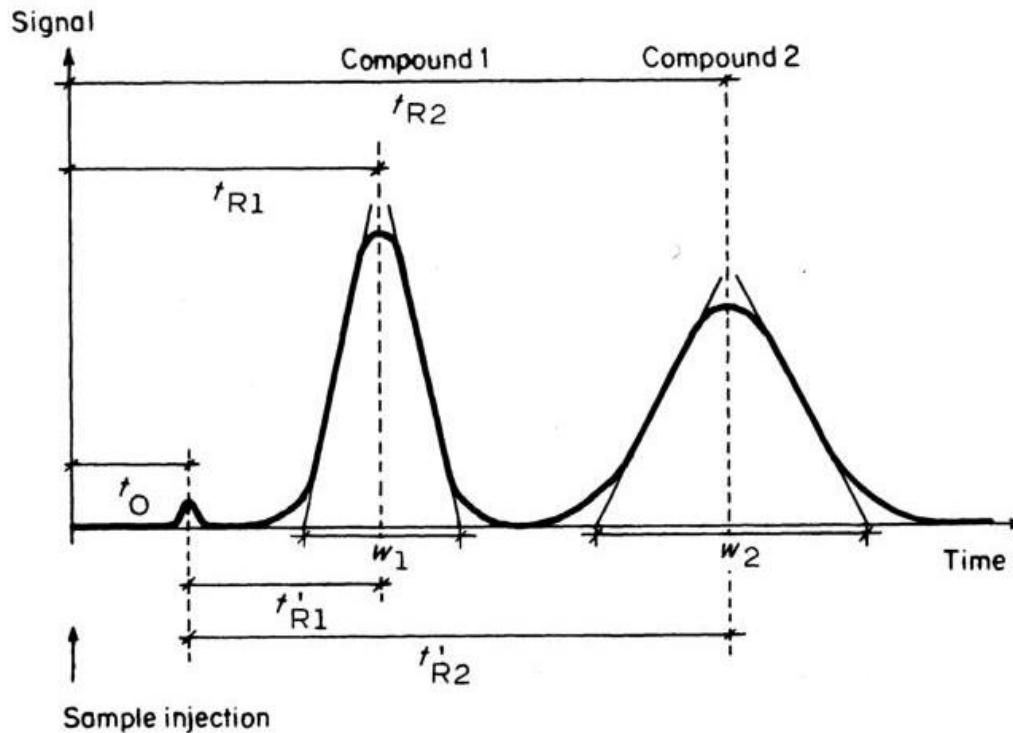
○ A fianco sono riportati due cromatogrammi, di una miscela di due composti, ottenuti con due diverse fasi stazionarie: nel secondo caso si ha una maggior selettività.

○ La misura sperimentale della selettività è il fattore di selettività α

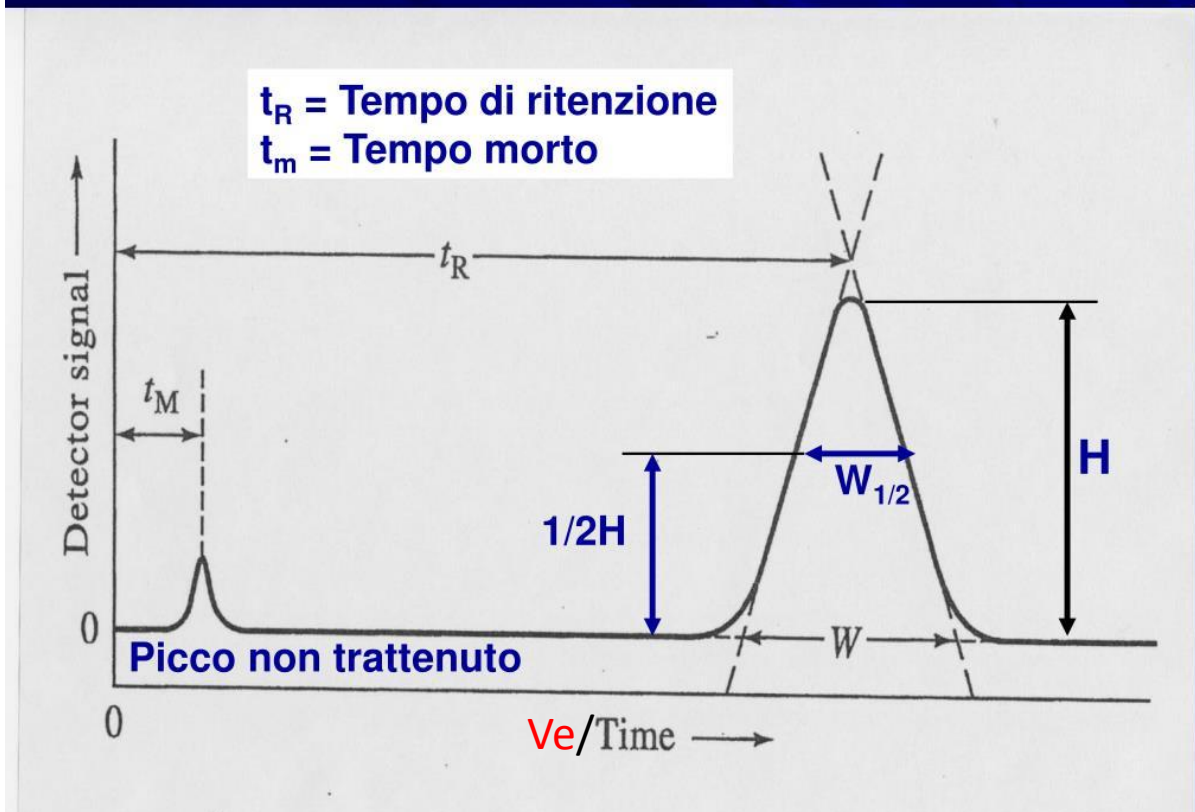


▪ **Selettività** : capacità di eluire specie chimiche diverse a velocità diverse (rapporto tra i tempi di ritenzione delle due sostanze)

$$\text{SELETTIVITA}' = t'_{R2} / t'_{R1}$$



Cromatogramma – Parametri di base



t_r viene misurato nel **punto di massimo** del picco;

W viene ottenuto tracciando le **tangenti al punto di flesso** e misurando l'intercetta sulla linea di base

$W_{1/2}$ è la **larghezza del picco** misurata al **50% dell'altezza**

V_e è **volume di eluizione** = Il volume di fase mobile richiesto per l'eluizione di ciascun analita

▪ **Efficienza:** ampiezza relativa dei picchi (capacità del sistema di raggruppare tutte le molecole di un soluto in un volume ristretto)



▪ L'efficienza di una colonna si quantifica con il *numero di piatti teorici, N*

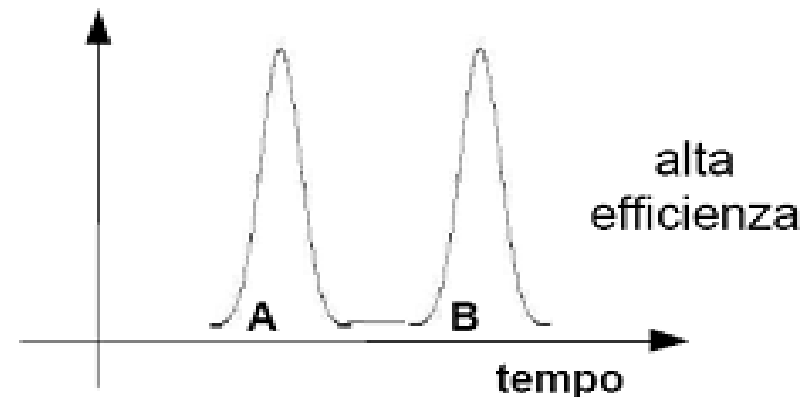
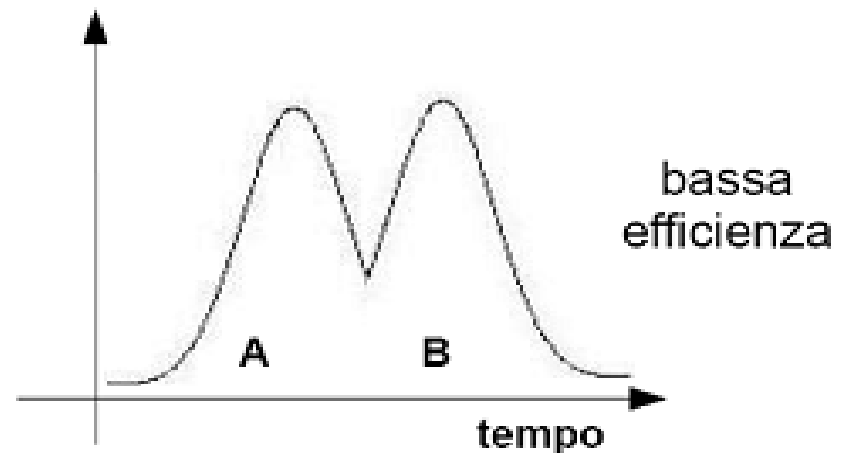
Efficienza.

E' la capacità del sistema cromatografico di mantenere compatta la banda di eluizione di una sostanza lungo tutto il percorso della fase mobile.

Ciò significa ottenere picchi alti e stretti all'uscita della colonna. La cosa è di grande importanza, perché qualora due sostanze avessero tempi di ritenzione molto vicini se ne potrebbe ottenere ugualmente la separazione.

Quindi, quanto più stretti sono i picchi tanto più efficiente risulta la colonna.

A fianco sono riportati due cromatogrammi di una miscela di due sostanze effettuati con colonne diverse; in ambedue i casi si ha la stessa selettività, ma nel secondo caso si ha una maggior efficienza.



▪ **Efficienza:** ampiezza relativa dei picchi
rapporto tra il t_R e l'ampiezza del picco

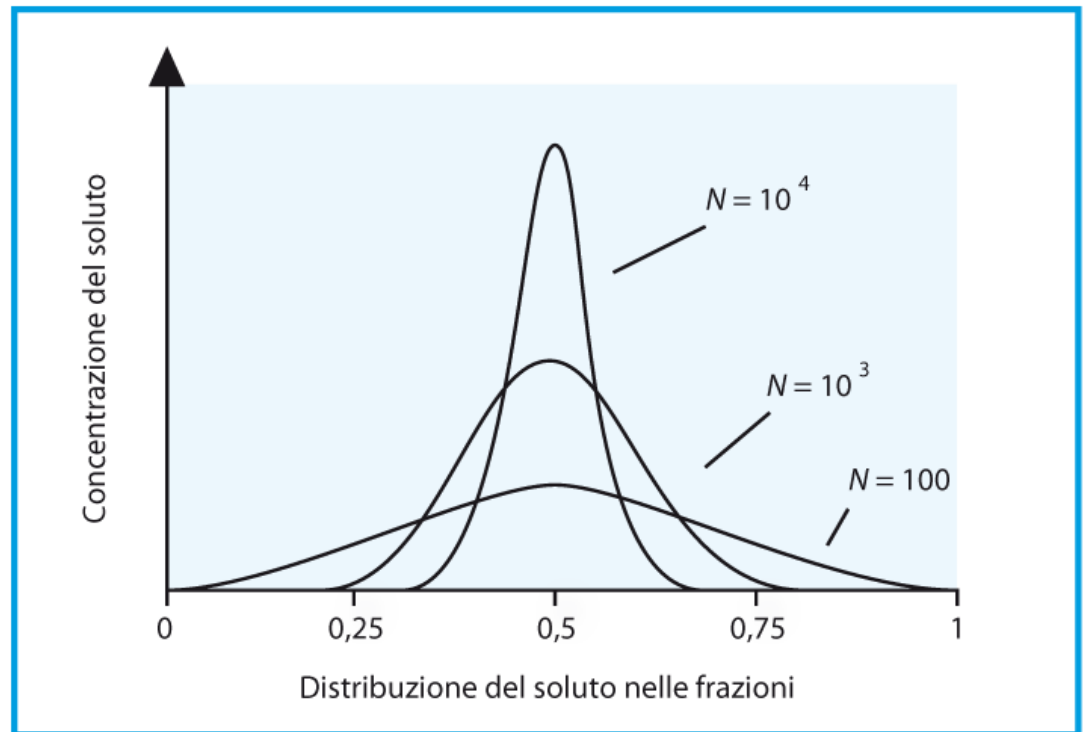
▪ L'efficienza di una colonna si quantifica con il **numero di piatti teorici, N**

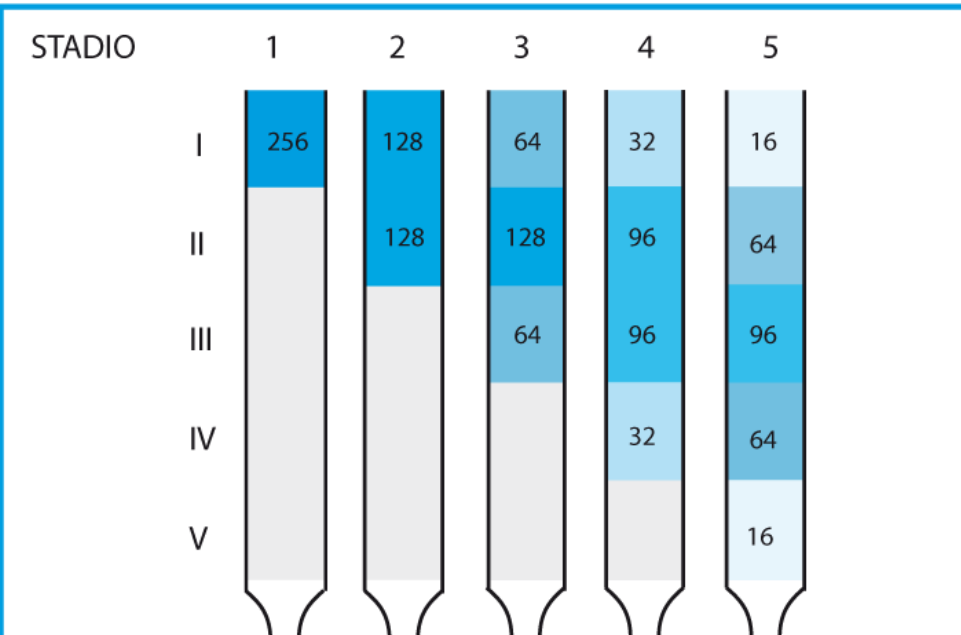
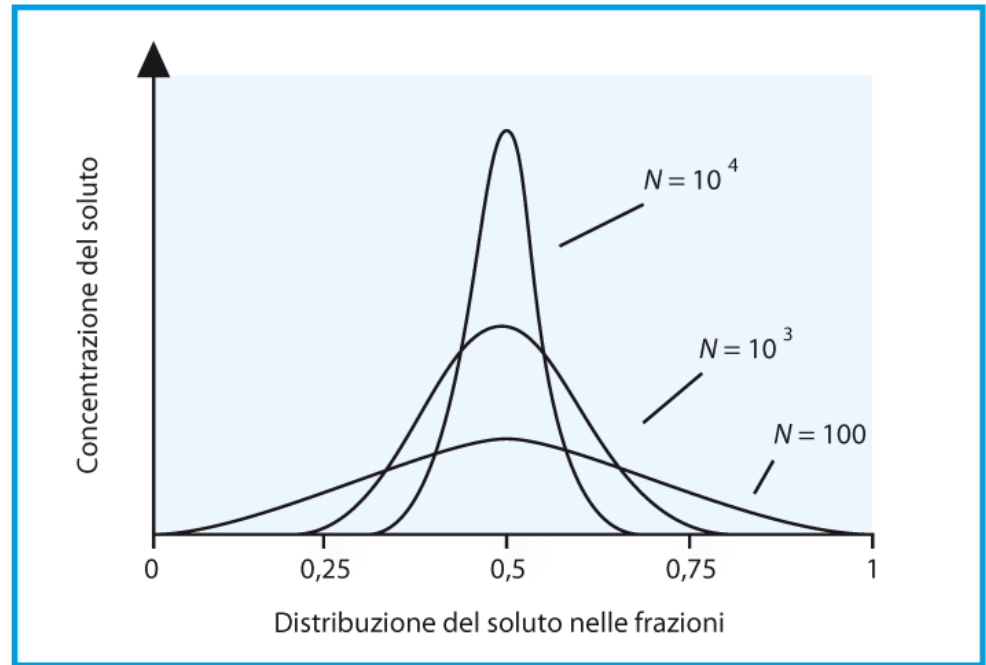
Un piatto teorico è la più piccola zona all'interno della colonna in cui il soluto raggiunge un equilibrio di ripartizione tra la FM e la FS

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2$$

W = larghezza della base del picco

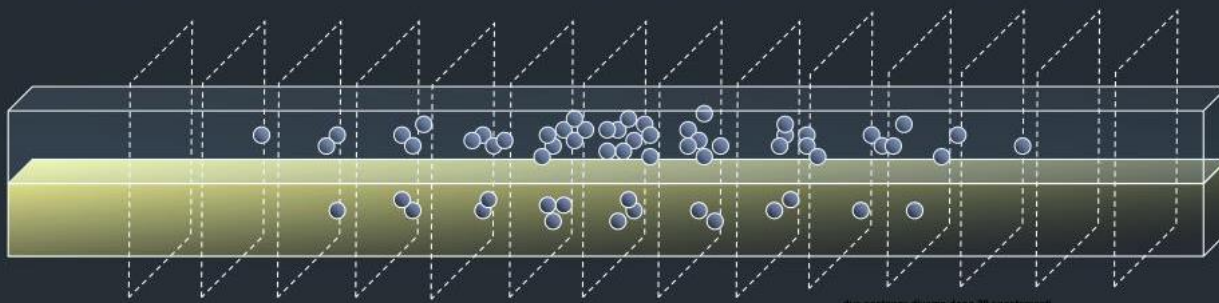
W_h = larghezza del picco a metà altezza





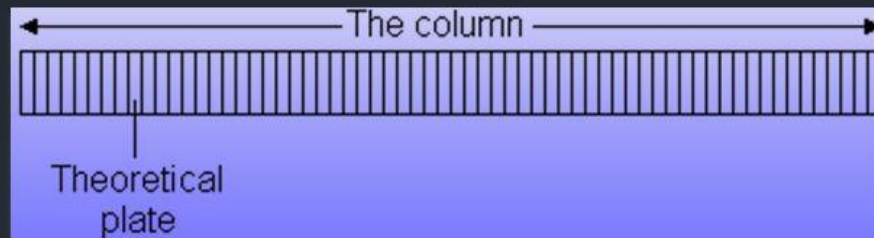
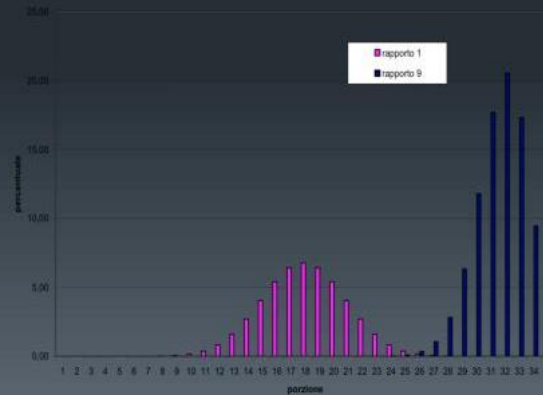
Colonna con 5 PIATTI TEORICI

$K_d = 1$ indica che l'analita interagisce ugualmente con la fase mobile e la fase stazionaria



due sostanze diverse dopo 30 spostamenti

Quindi l'efficienza di una colonna aumenta con il numero di piatti, tanto maggiore è N , tanto più è compatta la banda in uscita e quindi tanto più stretto è il picco sul cromatogramma.

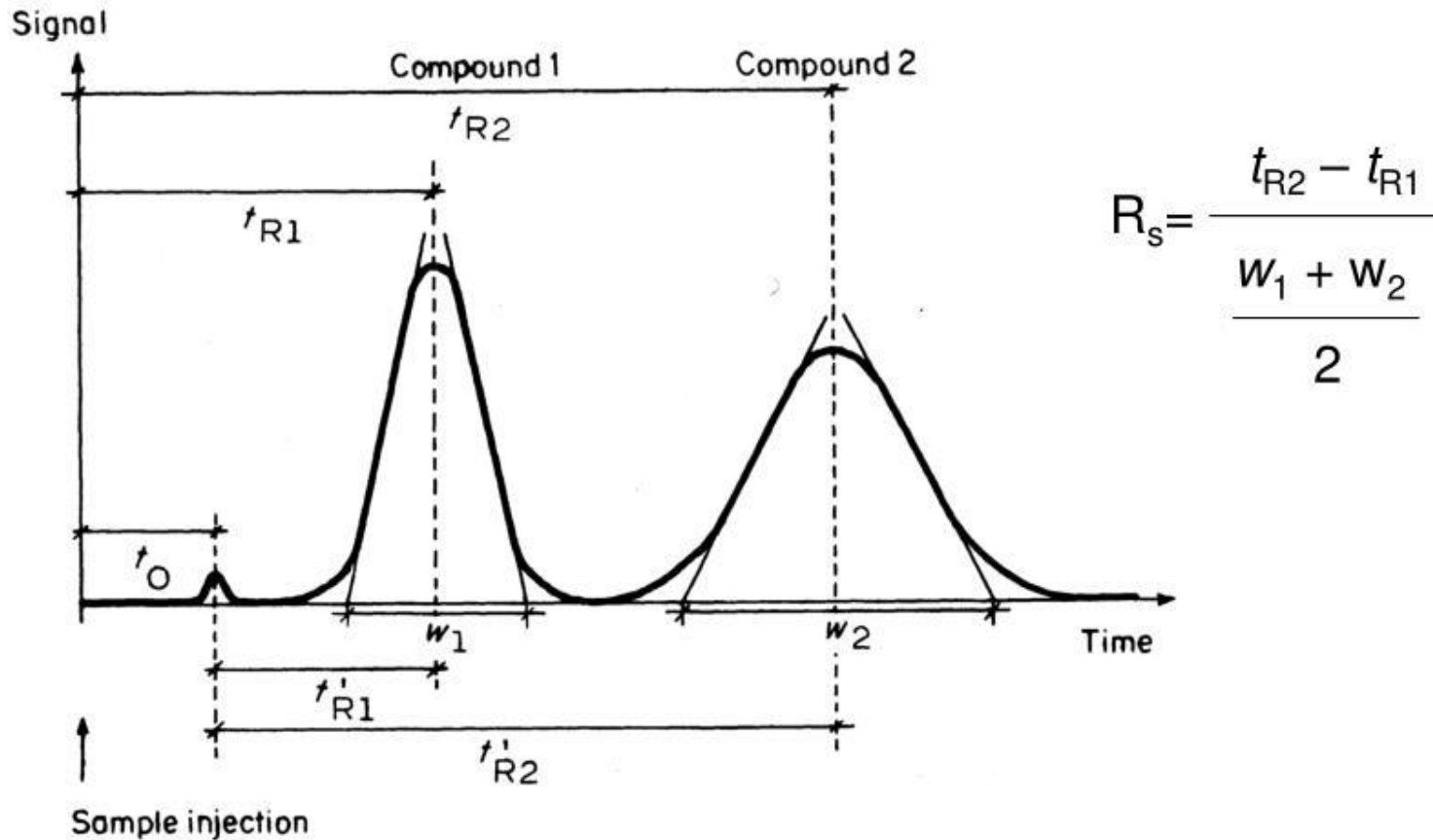


- La sostanza si sposta verso la fine della colonna attraverso la fase mobile che, in equilibrio su un piatto, si passa al piatto successivo.
- È importante sottolineare che, a differenza della colonna di distillazione, i piatti *non esistono realmente* all'interno della colonna ma sono solo un modello per facilitare la comprensione del processo che avviene.

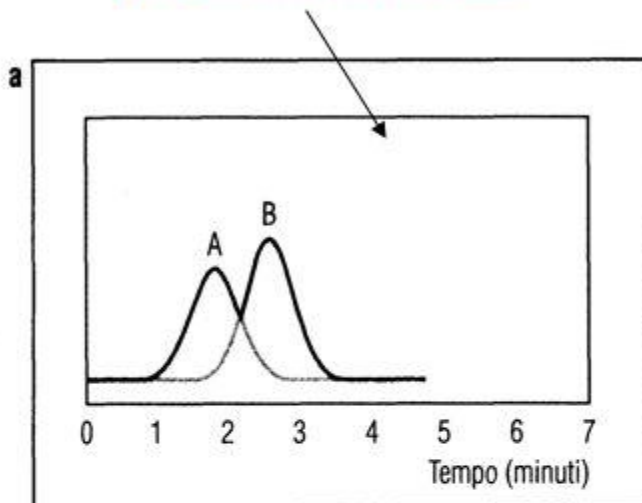
Risoluzione

La risoluzione indica il grado di separazione dei picchi e dipende dalla selettività ed efficienza.

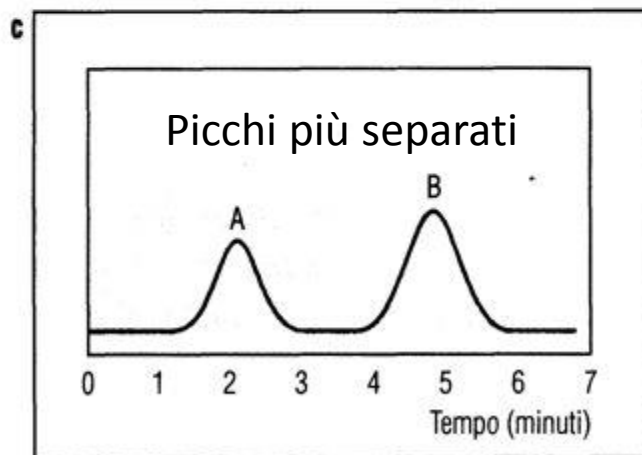
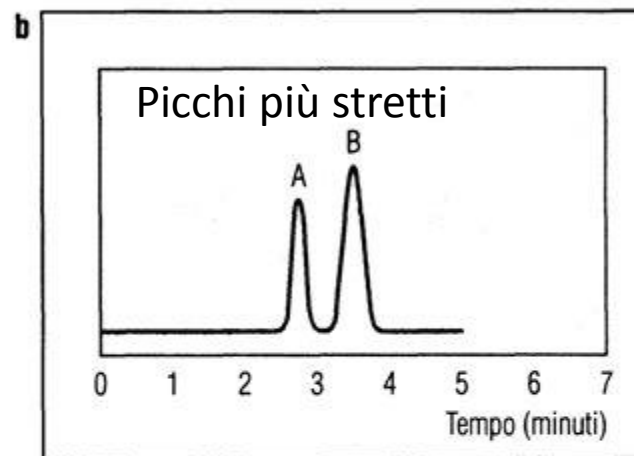
In termini matematici la risoluzione tra due picchi adiacenti (R_s) è espressa dal rapporto fra le loro distanze e la semisomma delle rispettive larghezze alla base



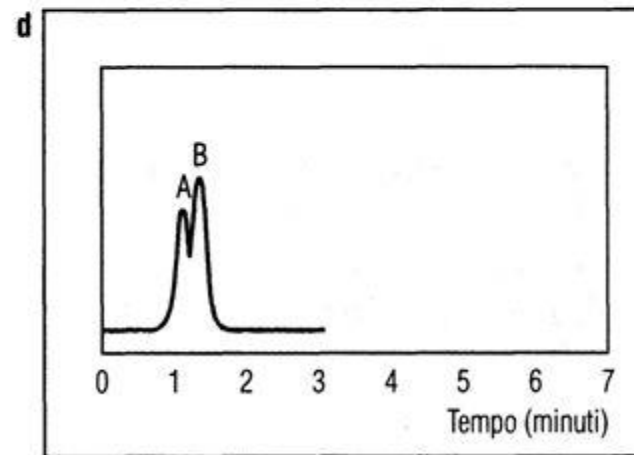
**Scarsa selettività ed efficienza
= picchi non risolti**



Aumento di efficienza



Aumento di selettività

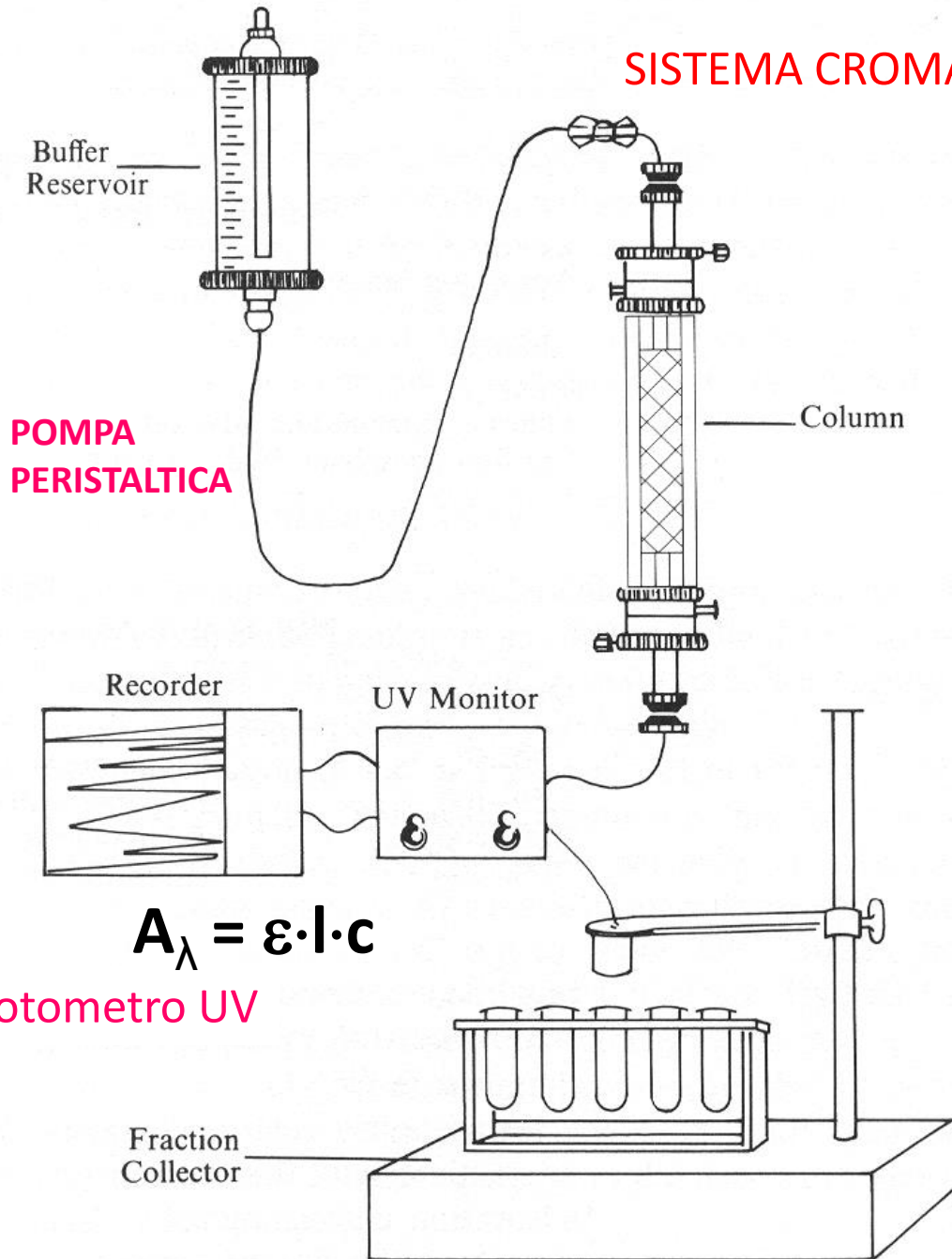


**Aumento di efficienza ma
non di selettività**

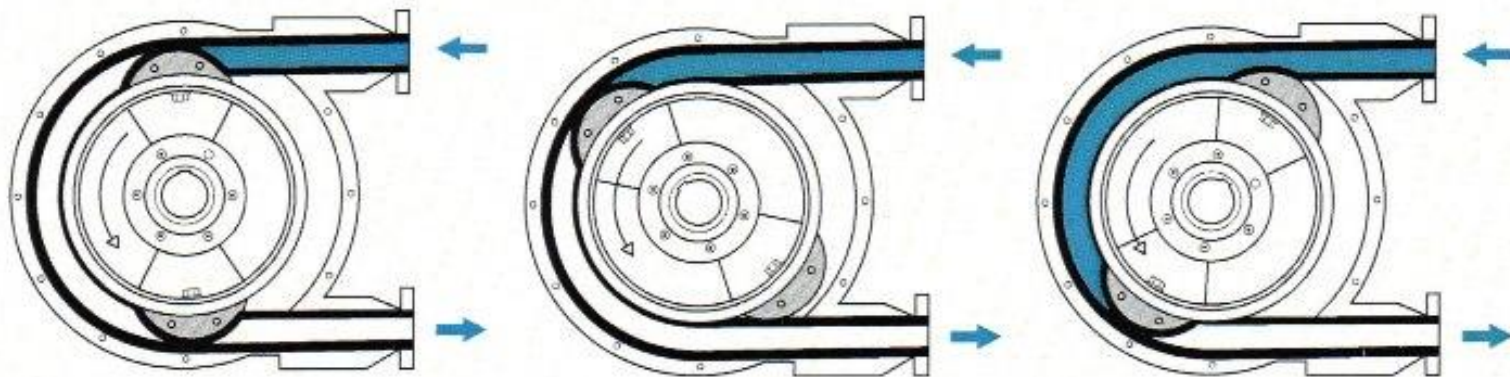
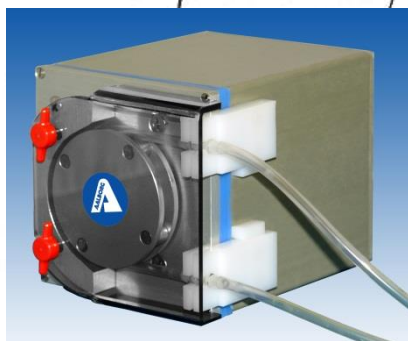
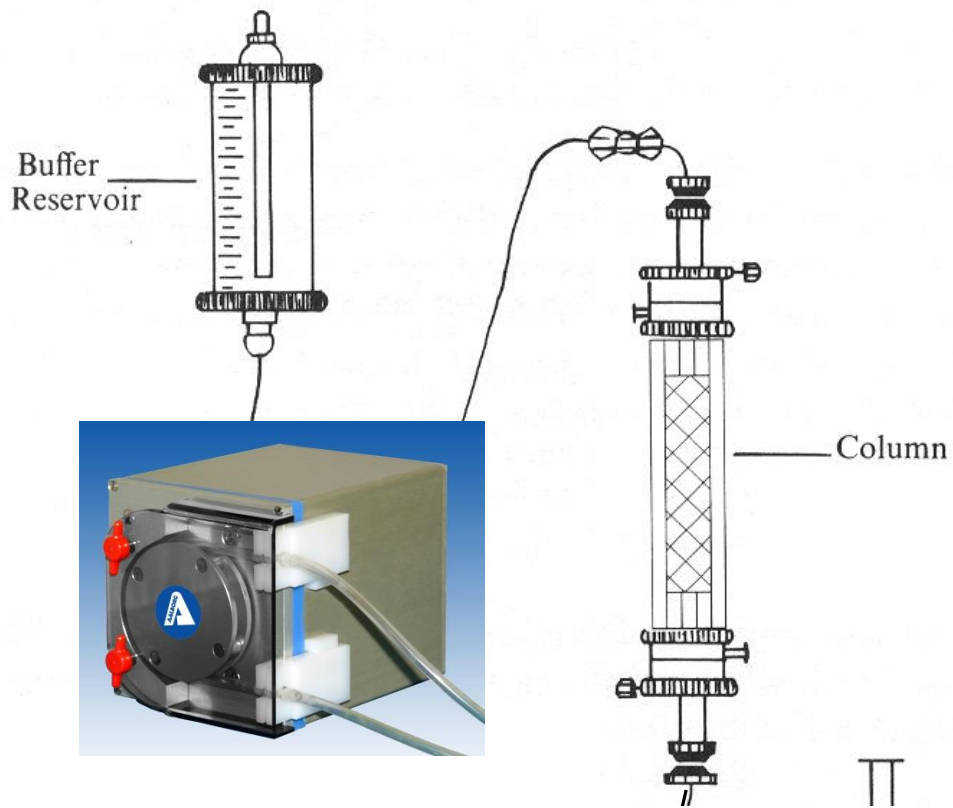
Capacità:

- **Misura della quantità di materiale che può essere risolto senza sovrapposizione dei picchi.**

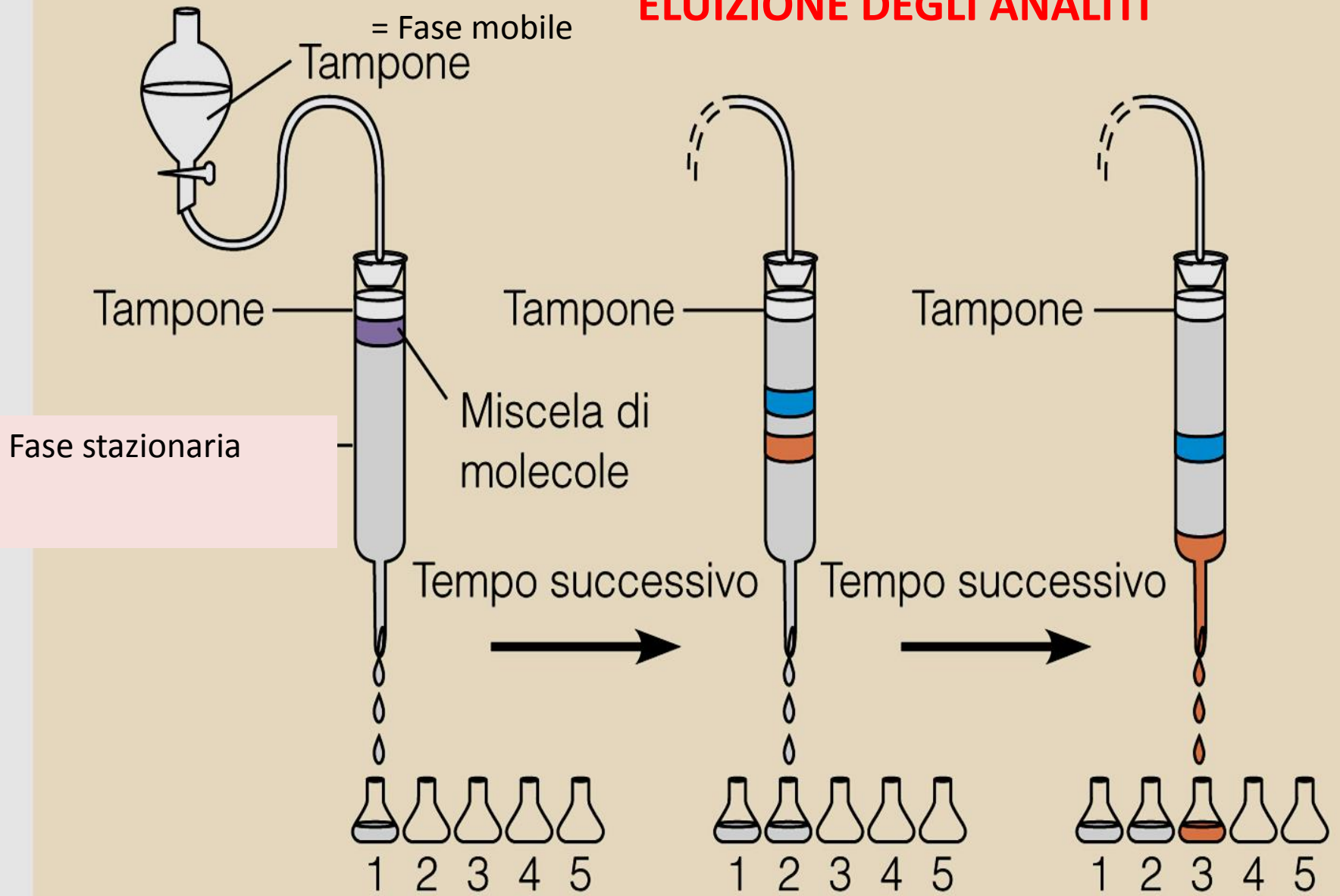
SISTEMA CROMATOGRAFICO AUTOMATIZZATO



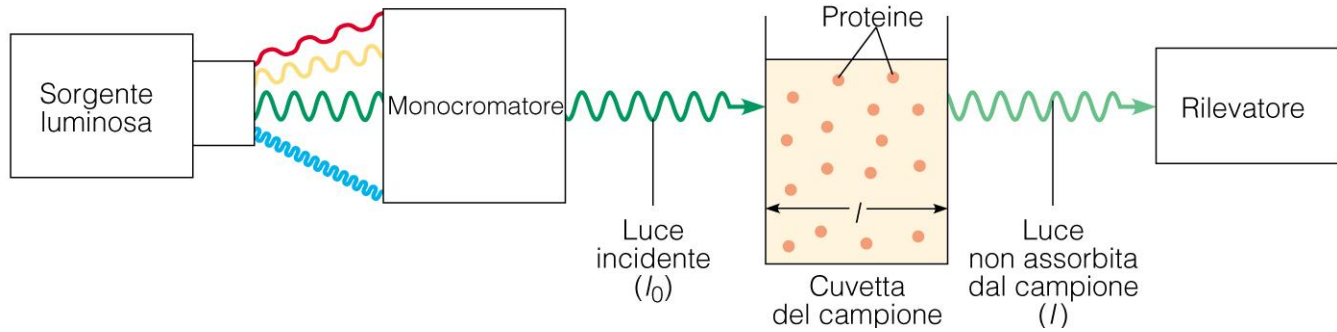
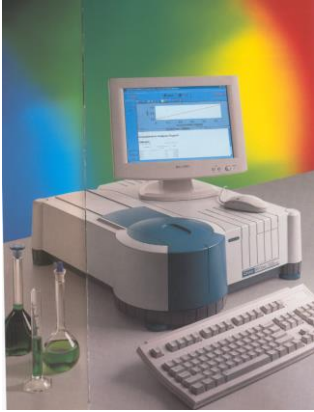
**POMPA
PERISTALTICA**



ELUIZIONE DEGLI ANALITI



...uso un fotometro UV/VIS



Cromatogramma o grafico di eluizione

che mostra la separazione completa dei componenti il campione da analizzare

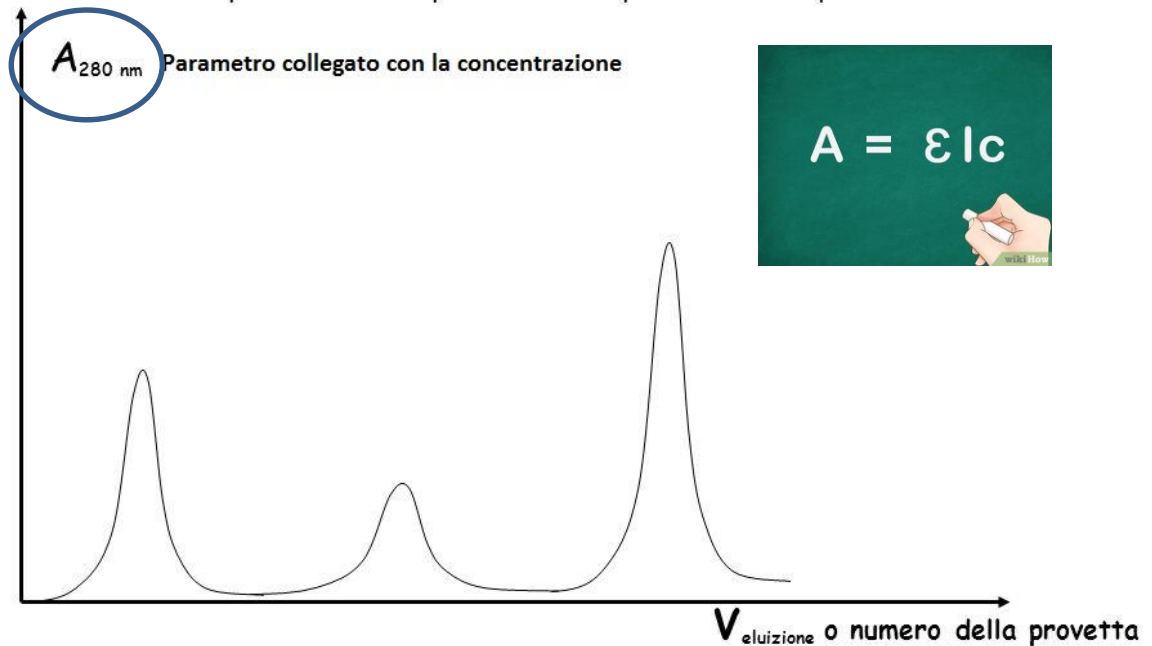
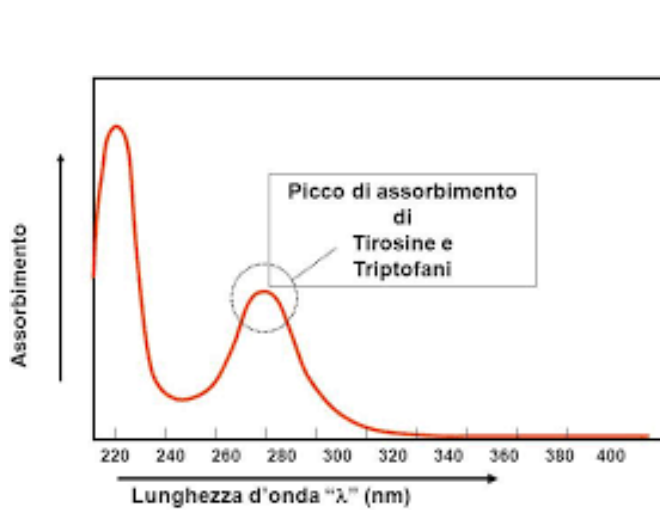


Figure 3.10
Elution curve for a mixture

A
B
C
D
E

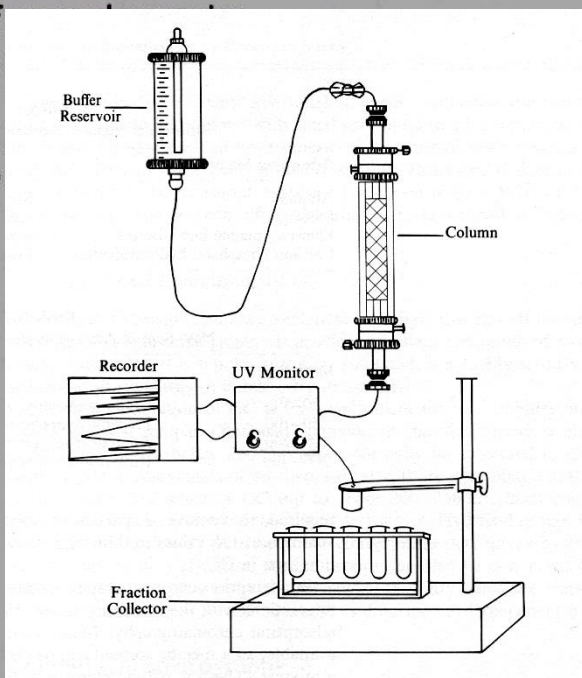
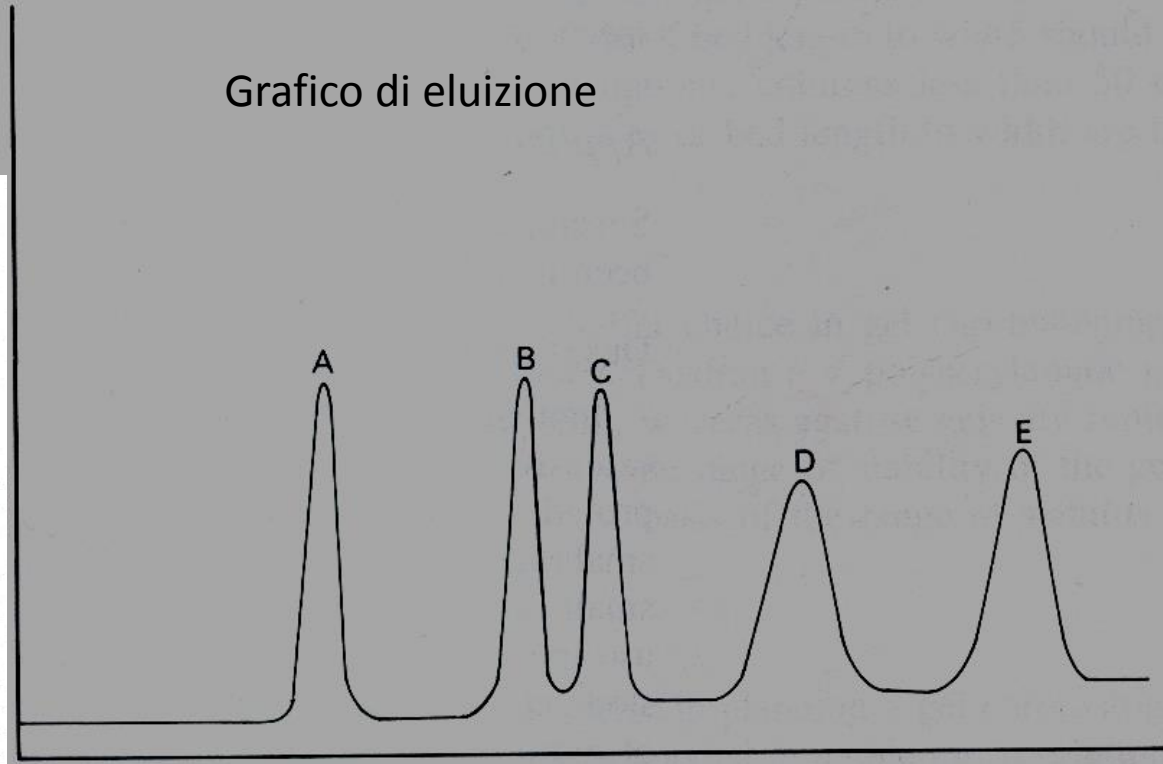


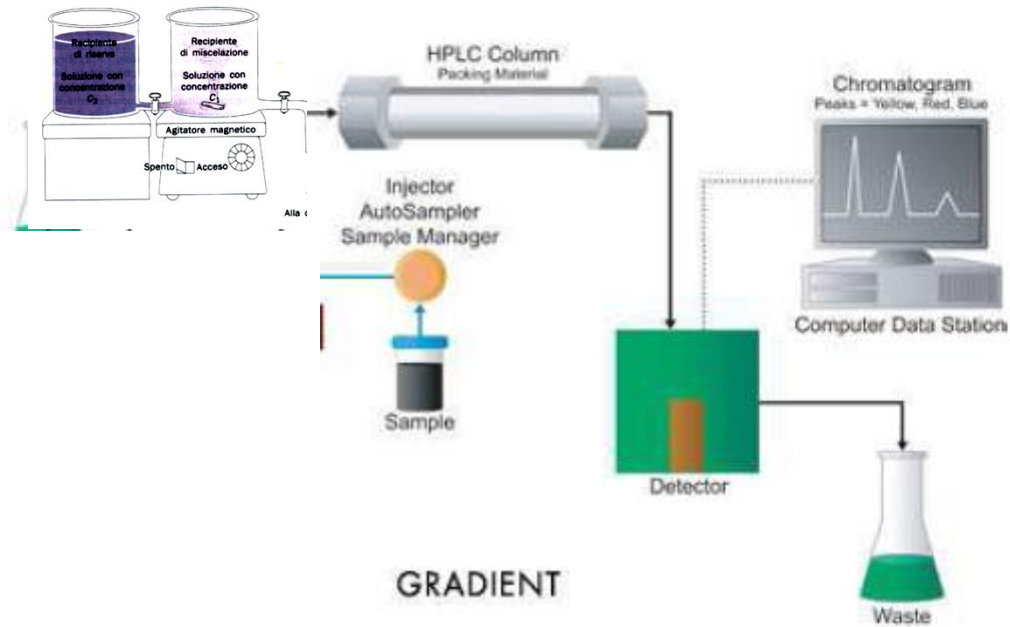
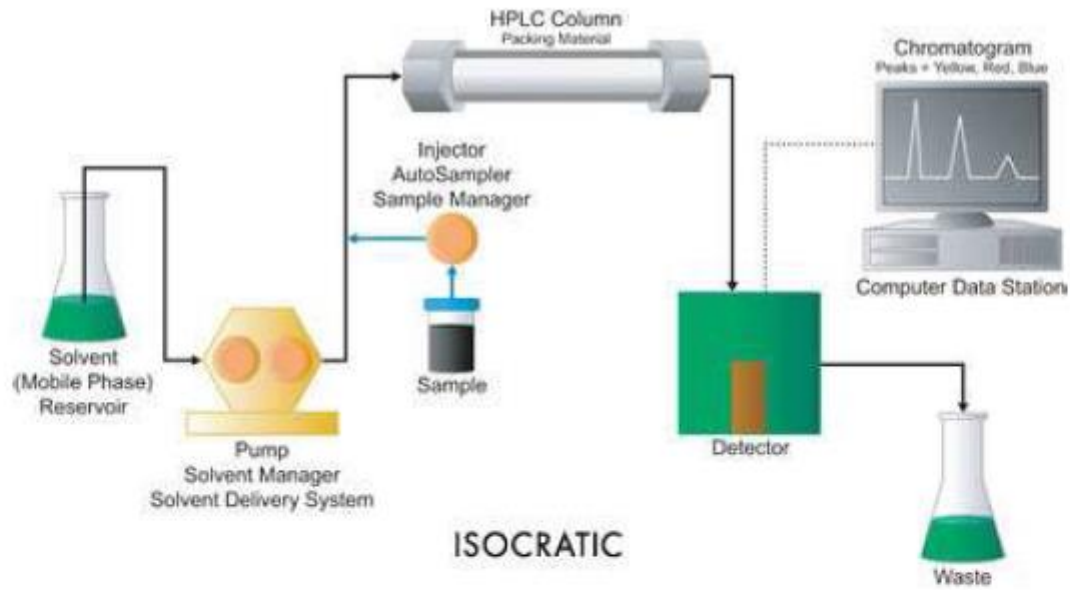
Grafico di eluizione

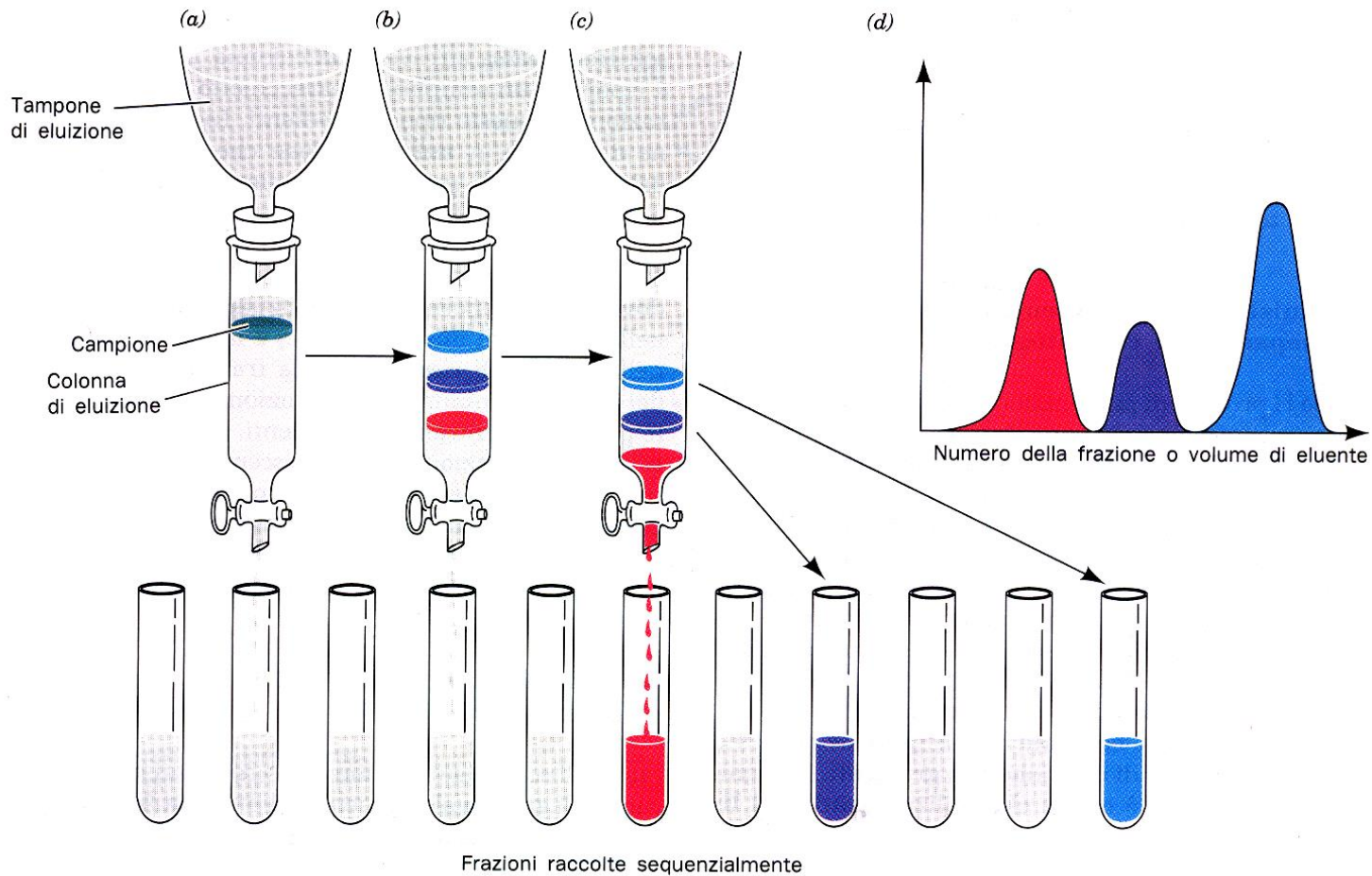


V_e

Numero delle provette







FASI OPERATIVE di una SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA:

IMPACCAMENTO della COLONNA

CARICAMENTO del CAMPIONE

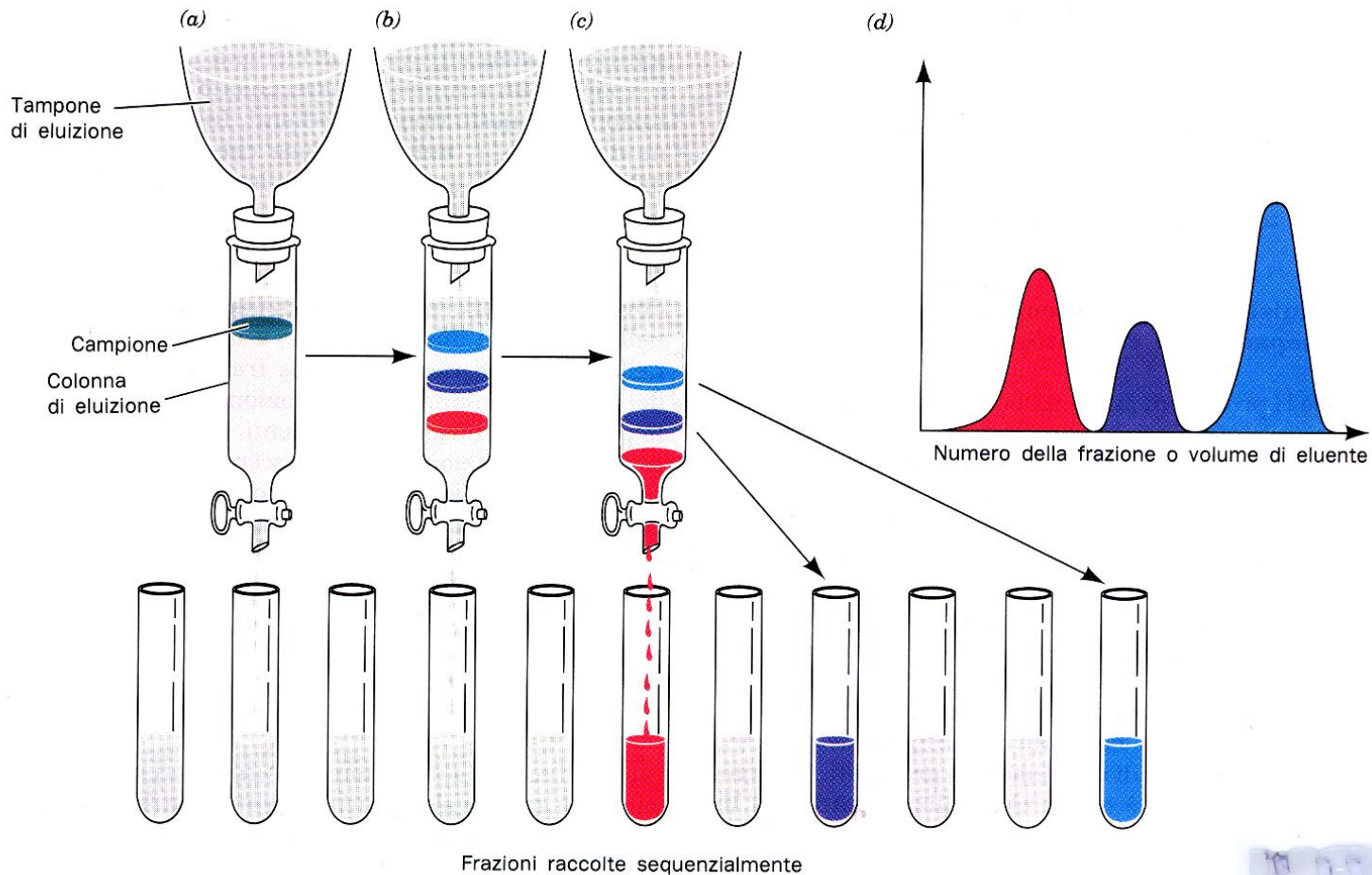
ELUIZIONE

RIVELAZIONE degli analiti

RACCOLTA delle FRAZIONI

CONTROLLO della PURIFICAZIONE





FASI OPERATIVE di una SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA:

IMPACCAMENTO della COLONNA

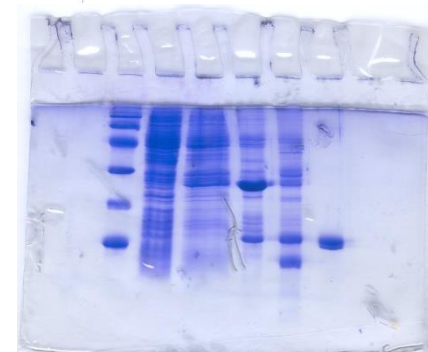
CARICAMENTO del CAMPIONE

ELUIZIONE

RIVELAZIONE degli analiti

RACCOLTA delle FRAZIONI

CONTROLLO della PURIFICAZIONE mediante tecnica analitica (p.es. elettroforesi)





POMPA PERISTALTICA



Raccogliatore di frazioni

Fast protein liquid chromatography (FPLC)

