

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](mailto:olianas@unica.it)



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

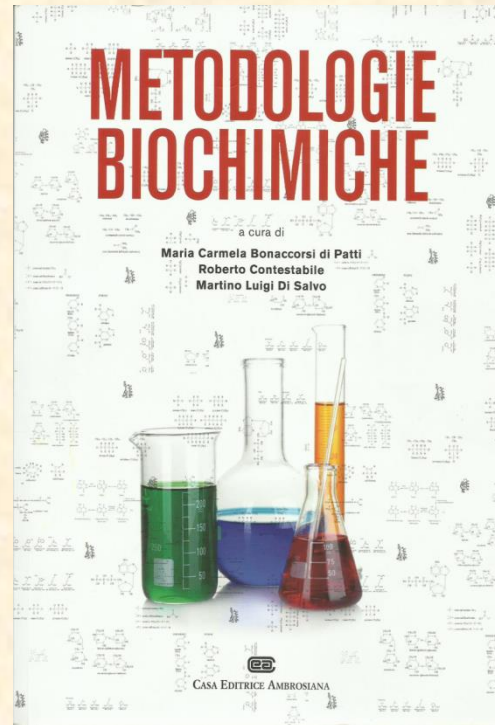
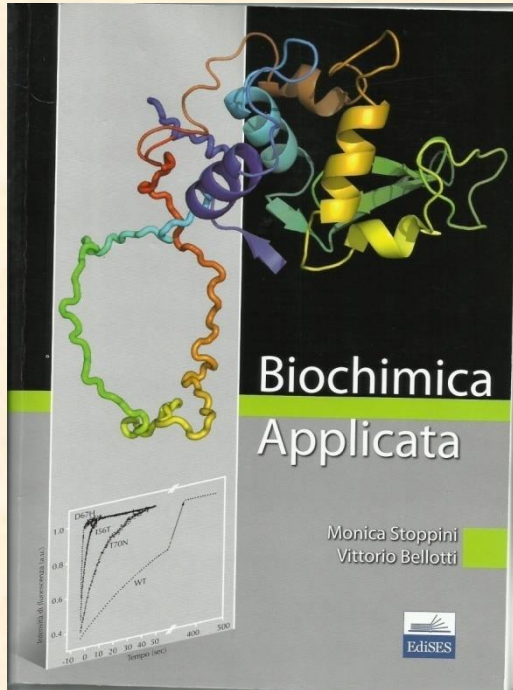
E' vietata la copia e la riproduzione dei contenuti e immagini in qualsiasi forma. E' inoltre vietata la redistribuzione e la pubblicazione dei contenuti e immagini non autorizzate espressamente dall'autore.

**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:



Materiali didattici del docente

# CROMATOGRAFIA

- CARICA ELETTRICA (cromatografia a scambio ionico)
- MASSA MOLECOLARE (gel filtrazione o esclusione molecolare)
- PROPRIETA' di ADSORBIMENTO (cromatografia per interazioni idrofobiche)
- AFFINITA' di LEGAME ad altre biomolecole (cromatografia di affinità)

# CROMATOGRAFIA a SCAMBIO IONICO

**Sfrutta l'interazione elettrostatica tra molecole di segno opposto**

**Separa miscele di aminoacidi e proteine: possiedono gruppi ionizzabili al variare del pH**

**1) Cromatografia a scambio cationico**

**2) Cromatografia a scambio anionico**

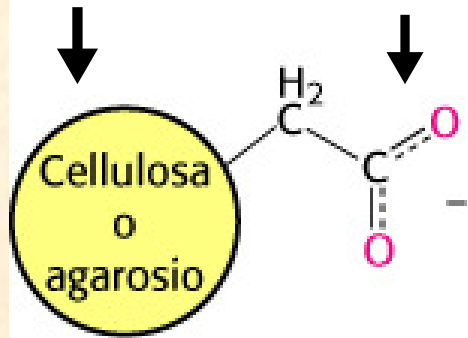
# CROMATOGRAFIA a SCAMBIO IONICO

## Cromatografia a scambio cationico

Scambiatore di cationi

FASE STAZIONARIA:

MATRICE + GRUPPO FUNZIONALE



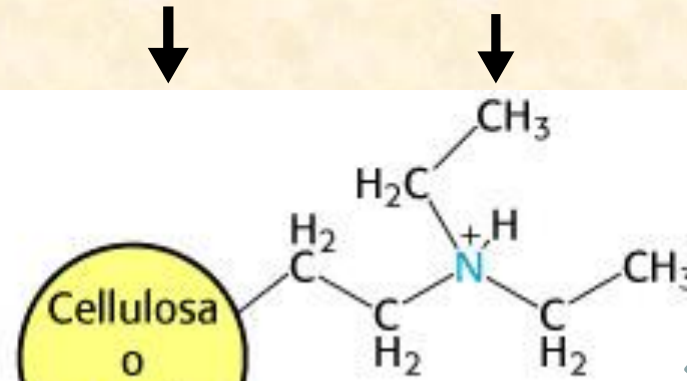
Gruppo  
carbrossimetilico (CM)  
(forma ionizzata)

## Cromatografia a scambio anionico

Scambiatore di anioni

FASE STAZIONARIA:

MATRICE + GRUPPO FUNZIONALE



Gruppo  
dietilamminoetilico (DEAE)  
(forma protonata)

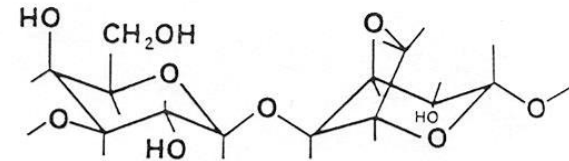
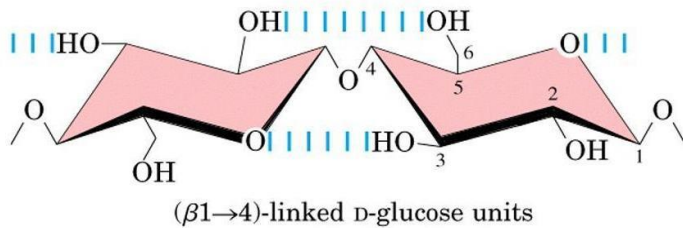
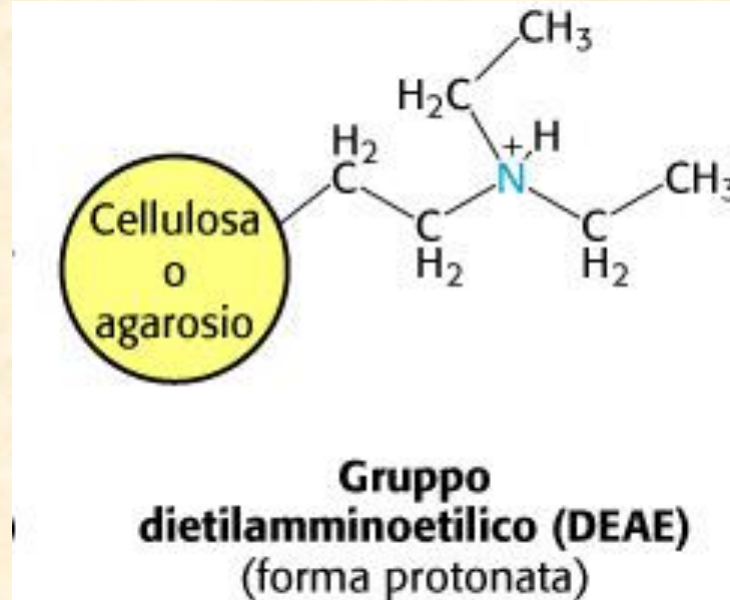
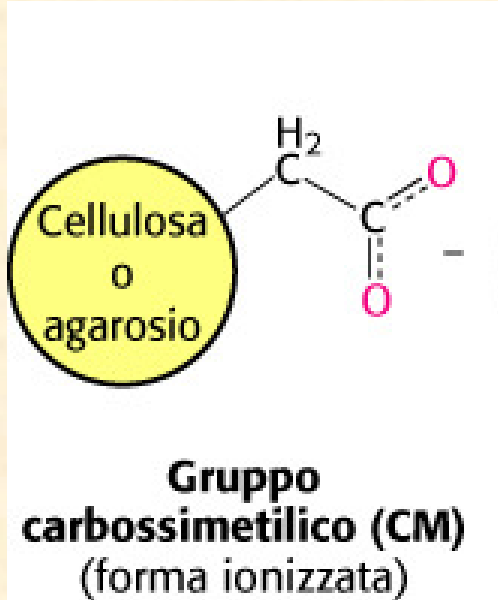
Attenzione:

Scambiatore di anioni: scambia anioni – carico positivamente

Scambiatore di cationi: scambia cationi: carico negativamente

DEAE





**agarosio**

D-galattosio e 3,6-galattosio

**cellulosa**

polisaccaride lineare del glucosio

contenente legami glicosidici  $\beta$  1 $\rightarrow$  4.

# FASI STAZIONARIE per CROMATOGRAFIA a SCAMBIO IONICO:

## Scambiatori deboli:

completamente ionizzati solo a determinati valori di pH (pKa)

▪acidi deboli Gruppo carbossimetilico (CM)  $-\text{CH}_2\text{COO}^-$  pKa = 5.0

▪basi deboli Gruppo dietilaminoetilico DEAE  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$  pKa= 9.0

Utilizzabili in un range di pH più ristretto

## Scambiatori forti:

completamente ionizzati a tutti i valori di pH

acidi forti Gruppo solfonico  $-\text{SO}_3^-$



pKa < 1 -

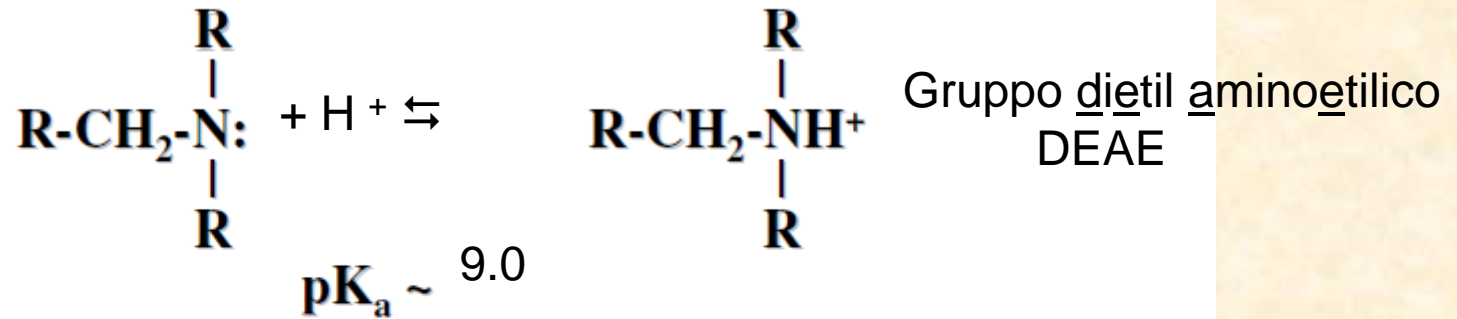
basi forti Gruppo trimetil ammino metilico

$\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  pKa > 13

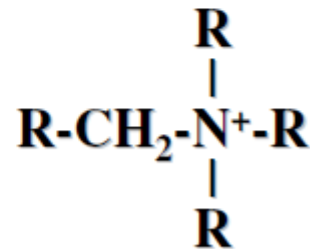
-Utilizzabili in un range di pH più ampio

## Scambiatori di anioni

### Gruppo amminico terziario scambiatore debole di anioni



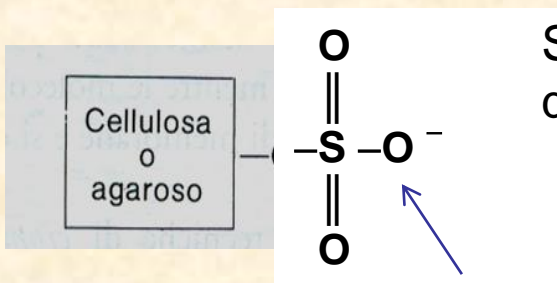
### Ammina quaternaria scambiatore forte di anioni



Gruppo trimetil amminometilico

$\text{pK}_a > 13$

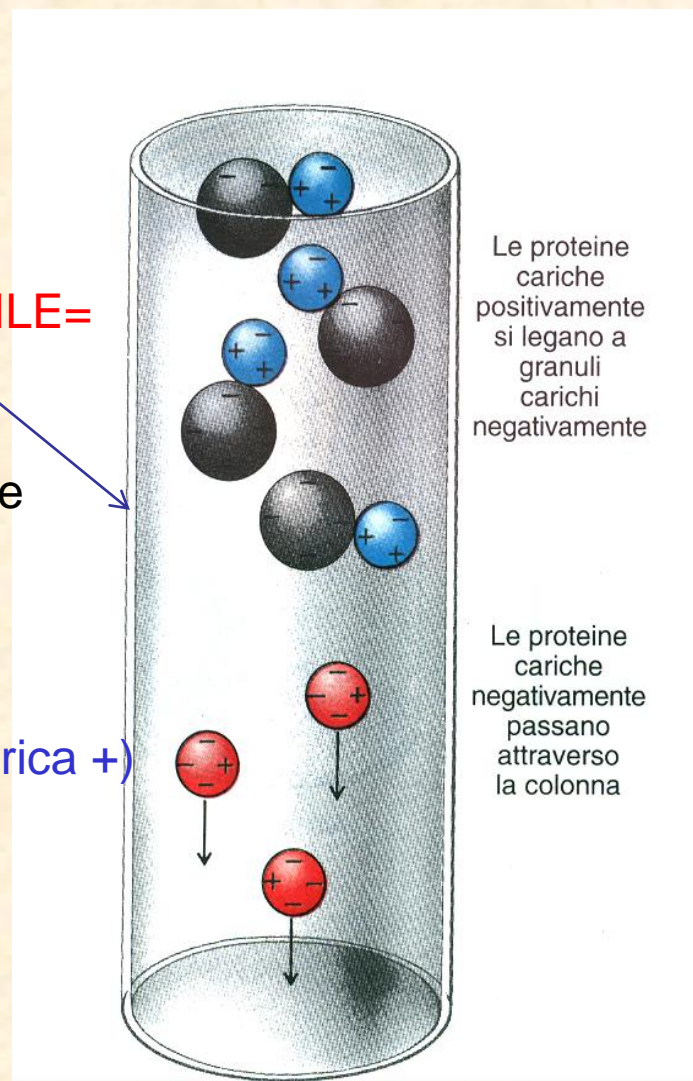
# CROMATOGRAFIA a SCAMBIO CATIONICO con SCAMBIATORE FORTE



Sempre ionizzato a qualunque valore di pH  
 $pK_a < 1$

Proteine (cariche +)

FASE MOBILE=  
 $pH < pI$  delle proteine



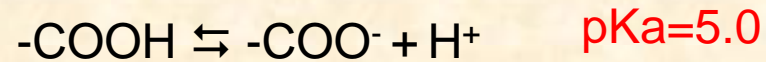
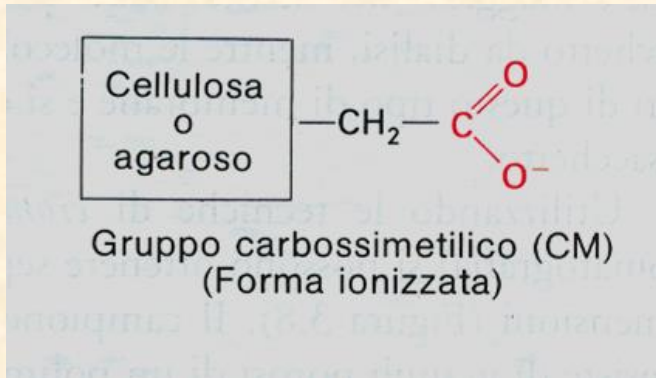
Le proteine cariche positivamente si legano a granuli carichi negativamente

Le proteine cariche negativamente passano attraverso la colonna

Eluizione NON ISOCRATICA (step o in gradiente)

- Variazione del pH → aumento del pH (perdita della carica +)
- Variazione della forza ionica (+ Na<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>) ( $I = \frac{1}{2} \cdot c \cdot z^2$ )

p.es. CM-cellulosa: carbossimetil cellulosa



$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[-\text{COO}^-]}{[-\text{COOH}]}$$

**A quali valori di pH il gruppo carbossilico è ionizzato?**

**Equazione di Henderson-Hasselbach**

Se  $\text{pH} = \text{pKa} = 5.0$

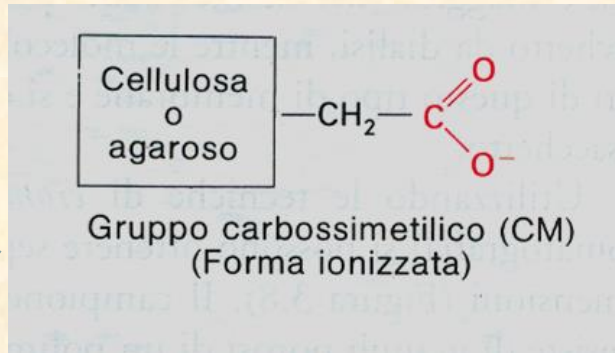
50% gruppi sono protonati  
50% dei gruppi deprotonati

Se si utilizza un  $\text{pH} > 1$  unità rispetto al  $\text{pKa}$   $\text{pH} 6.0 \rightarrow \% \text{ deprotonaz} = 90\%$  ←

Se si utilizza un  $\text{pH} > 2$  unità rispetto al  $\text{pKa}$   $\text{pH} 7.0 \rightarrow \% \text{ deprotonaz} = 99\%$  ←

# CROMATOGRAFIA a SCAMBIO CATIONICO con SCAMBIATORE DEBOLE

p.es. CM-cellulosa: carbossimetil cellulosa



$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[-\text{COO}^-]}{[-\text{COOH}]}$$

**pKa=5.0**

A pH= 6.0 < deprotonazione

A pH=7 > deprotonazione



A quali valori di pH le Proteine  
(+)  
???

pH < pI

a pH 6.0 un maggior numero di proteine (+)

a pH 7.0 un minor numero di proteine (+)

Eluizione NON ISOCRATICA (a step o in gradiente): **Aumento pH / Aumento della forza ionica**

**pH di lavoro della CM-cellulosa = 1 unità pH > pKa**

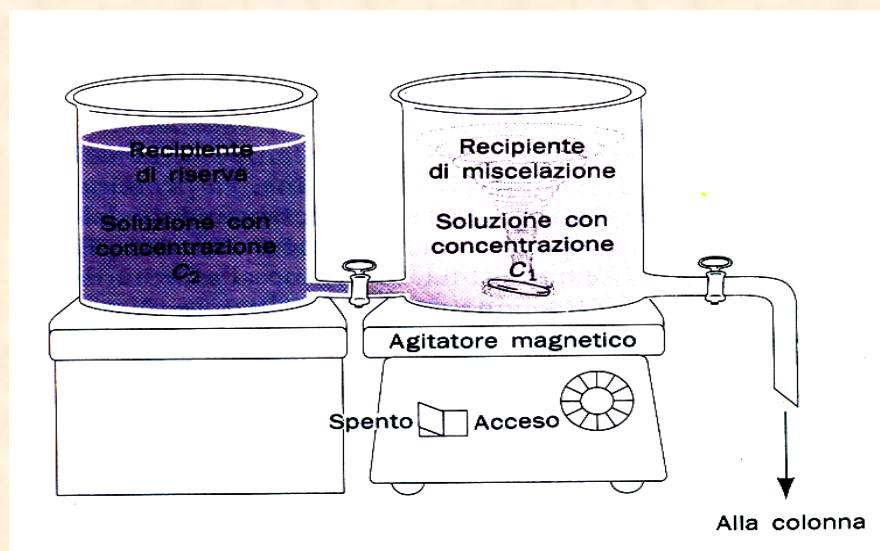
Pianificare la separazione delle seguenti proteine utilizzando una colonna cromatografica contenente lo scambiatore di cationi

CM-cellulosa.

A quale valore di pH dobbiamo equilibrare la Fase stazionaria? pH 6

Stabilire la carica di ciascuna proteina nelle condizioni prescelte

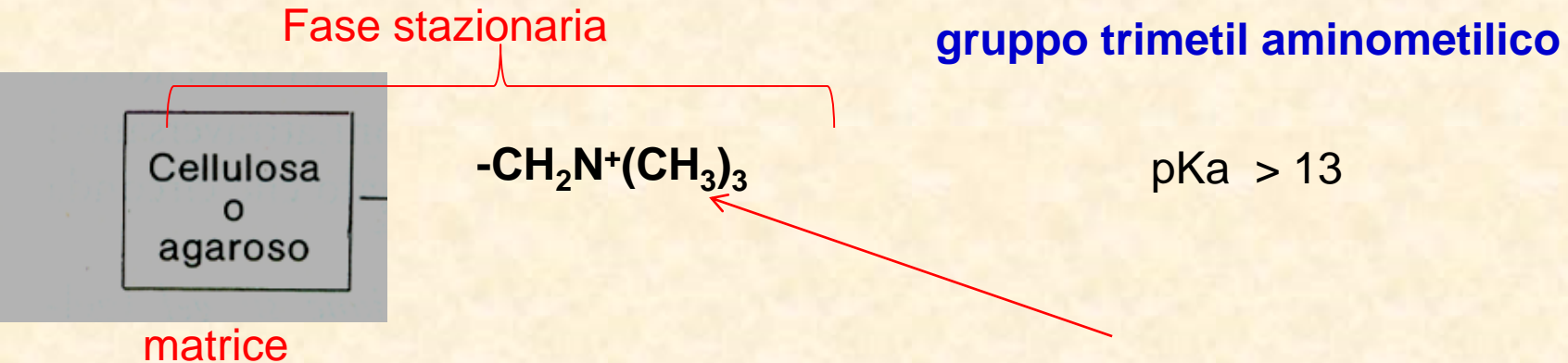
	pI	carica
Emoglobina	7,1	
Citocromo c	10,6	
Fibrinogeno	5,8	
Ribonucleasi	7,8	
Lisozima	11,0	



In quali condizioni sperimentali possiamo eluire le proteine? .....

Ipotizzare il grafico di eluizione corrispondente

# Cromatografia a scambio anionico con **SCAMBIATORE FORTE**



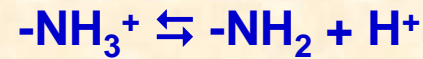
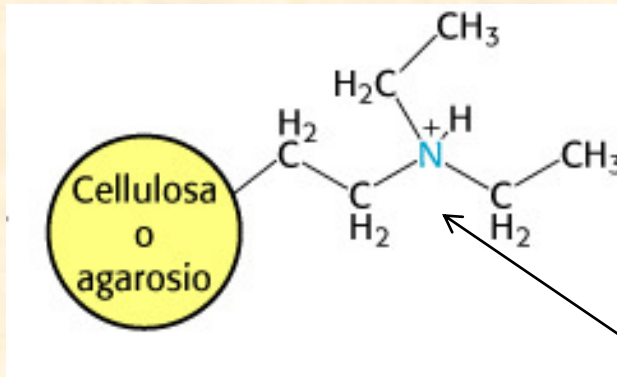
Fase stazionaria sempre carica (+) **proteine cariche** (—)

FASE MOBILE = Soluzione tampone a pH > pI delle proteine **ES: pH =8**  
a bassa forza ionica

**Eluizione NON ISOCRATICA (a step o in gradiente):**

- 1) Diminuzione pH → perdita della carica (—)
- 2) Aumento forza ionica ( $I = \frac{1}{2} \cdot c \cdot z^2$ ) → scambio per azione di massa  
Es: aumento della concentrazione di **Na<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>**

# Cromatografia a SCAMBIO ANIONICO con **SCAMBIATORE DEBOLE**: ad esempio DEAE-cellulosa



$$\text{pKa} = 9.0$$

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[-\text{NH}_2]}{[-\text{NH}_3^+]}$$

Equazione di Henderson-Hasselbach

**pH = pKa = pH 9.0 → 50% gruppi protonati  
50% gruppi deprotonati**

Se  $\text{pH} < \text{pKa}$  aumenta la % protonazione

# Cromatografia a SCAMBIO ANIONICO

## con SCAMBIATORE DEBOLE: ad esempio DEAE-cellulosa

Dietil aminoetil-cellulosa:

**Fase stazionaria carica (+) in quali condizioni?**

Se  $\text{pH} < \text{pKa}$  aumenta la % protonazione

Se si utilizza un  $\text{pH} < 1$  unità rispetto al  $\text{pKa} \rightarrow \% \text{ protonaz} = 90\%$

Se si utilizza un  $\text{pH} < 2$  unità rispetto al  $\text{pKa} \rightarrow \% \text{ protonaz} = 99\%$

**Affinché proteine (-)  $\text{pH} > \text{pI}$**  a  $\text{pH} 8.0$  un maggior numero di proteine (-)  
a  $\text{pH} 7.0$  un minor numero di proteine (-)

$6 < \text{pI} > 8$

$\text{pH}$  di lavoro della DEAE-cellulosa 1 unità  $\text{pH} < \text{pKa}$

**FASE MOBILE= Sol. Tampone a  $\text{pH} = 8.0$**

---

**Eluizione (a step o in gradiente):**

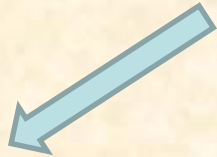
1) Diminuzione  $\text{pH} \rightarrow$  perdita della carica -

2) Aumento forza ionica ( $I = \frac{1}{2} \cdot c \cdot z^2$ )  $\rightarrow$  scambio per azione di massa

**es: aumento della concentrazione di  $\text{Na}^+\text{Cl}^-$**



# Cromatografia a SCAMBIO ANIONICO con SCAMBIATORE DEBOLE: ad esempio DEAE-cellulosa


$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[-\text{NH}_2]}{[-\text{NH}_3^+]}$$

**Equazione di Henderson-Hasselbach**

**pH = pKa = pH 9.0**

**50% gruppi protonati**  
**50% gruppi deprotonati**

**proteine (-)**

a pH 8.0 un maggior numero  
di proteine (-)

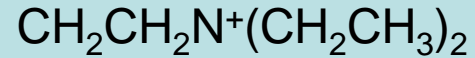
a pH 7.0 un minor numero di  
proteine (-)

**pH di lavoro della DEAE-cellulosa    1 unità pH < pKa**  
**pH = 8.0**

# Cromatografia a scambio anionico

## Scambiatore di anioni

Gruppo dietilaminoetilico DEAE



Buffer Tris 10 mM pH 7.7

Proteina pI = 8

Proteina pI = 5

Carica positivamente

Carica negativamente

Eluizione NON ISOCRATICA (a step o in gradiente):

- Aumento pH → perdita della carica (+)
- Aumento della forza ionica ( $I = \frac{1}{2} \cdot c \cdot z^2$ ) +  $\text{Na}^+\text{Cl}^-$  → scambio x azione massa

Grafico di eluizione  
Eluizione NON Isocratica

## ***ELUIZIONE A STEP***

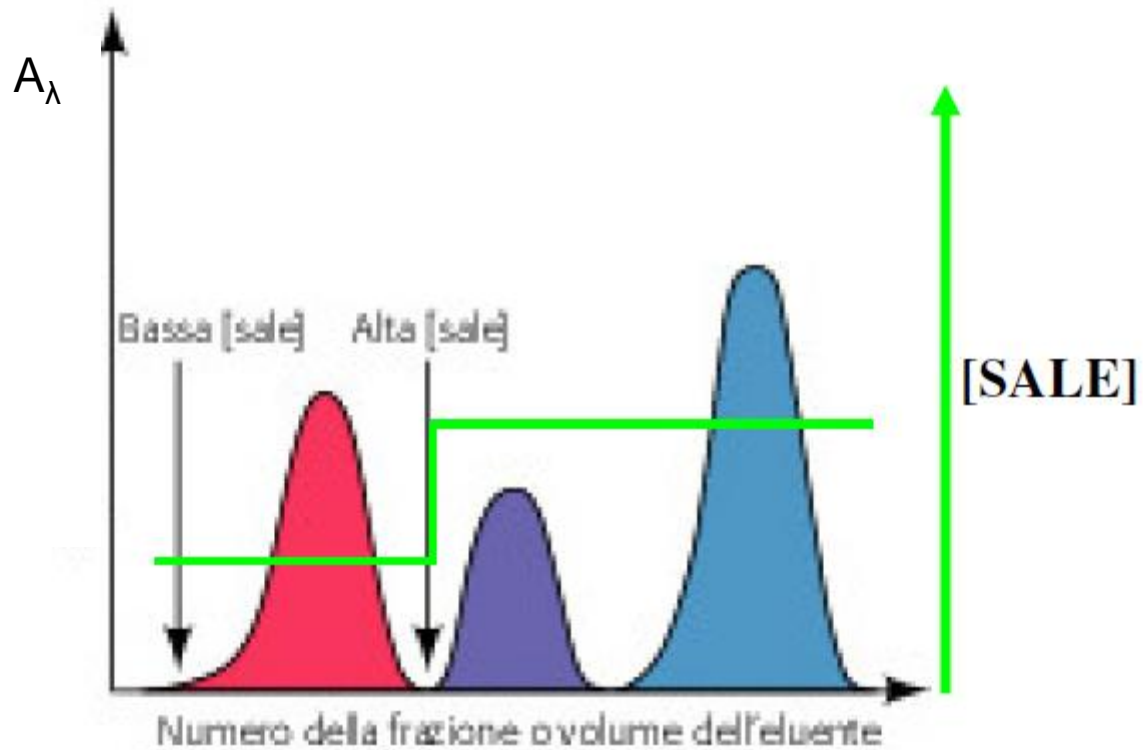
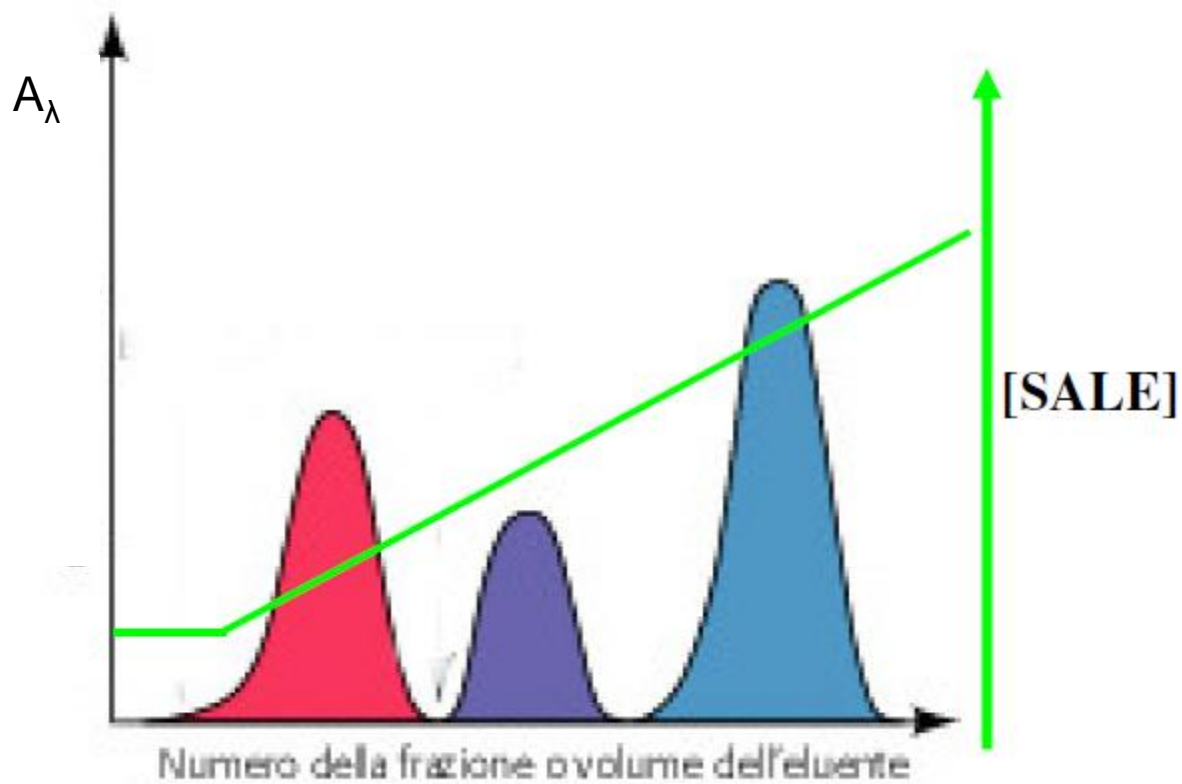


Grafico di eluizione  
Eluizione NON Isocratica

## ELUIZIONE IN GRADIENTE



Scegliere le condizioni sperimentali più opportune per purificare le seguenti proteine a partire da una miscela contenente:

	pI	PM (kDa)
Emoglobina	7.1	64
Albumina	4.9	69
Ribonucleasi	7.8	13.7
Lisozima	11.0	14.0
Insulina	5.4	6.5
Citocromo c	10.6	14.0

**Possiamo utilizzare uno scambiatore debole?**

In che condizioni sperimentali?

Ipotizzare il grafico di eluizione corrispondente

# Cromatografia a scambio ionico

## • VANTAGGI

- Possono essere utilizzati grandi volumi di campione e grandi quantità di proteine (1-5 g proteina per 100 ml di Fase Stazionaria),
- Alta flessibilità nelle condizioni sperimentali (pH, I)

## • SVANTAGGI

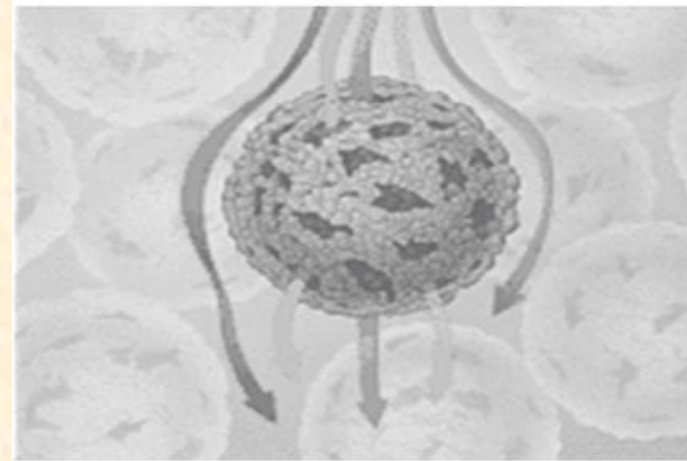
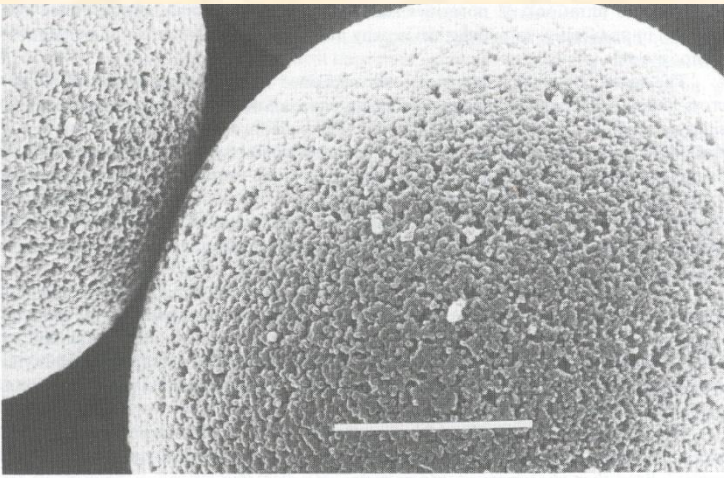
- Separa solo molecole cariche
- Eluizione NON Isocratica (variazioni di pH o forza ionica)  
Prima della cromatografia può essere necessario eliminare i sali presenti o modificare il pH.

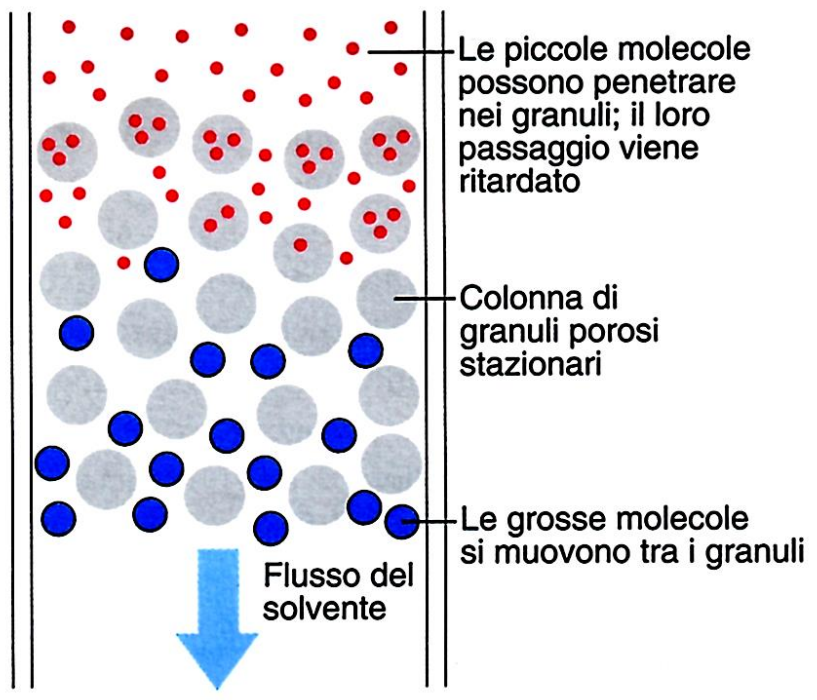
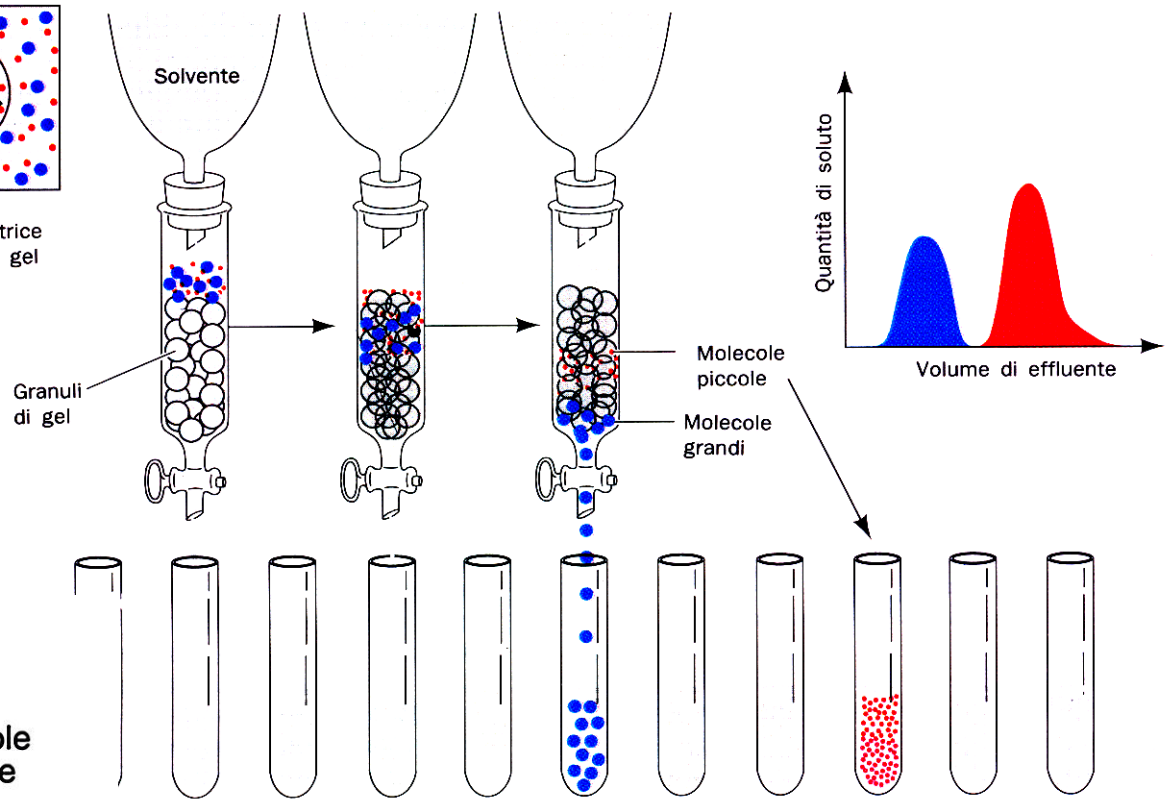
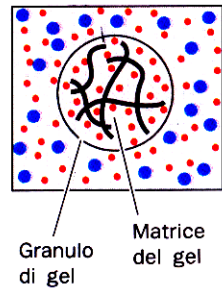
[http://www.agbooth.com/pp\\_java/](http://www.agbooth.com/pp_java/)

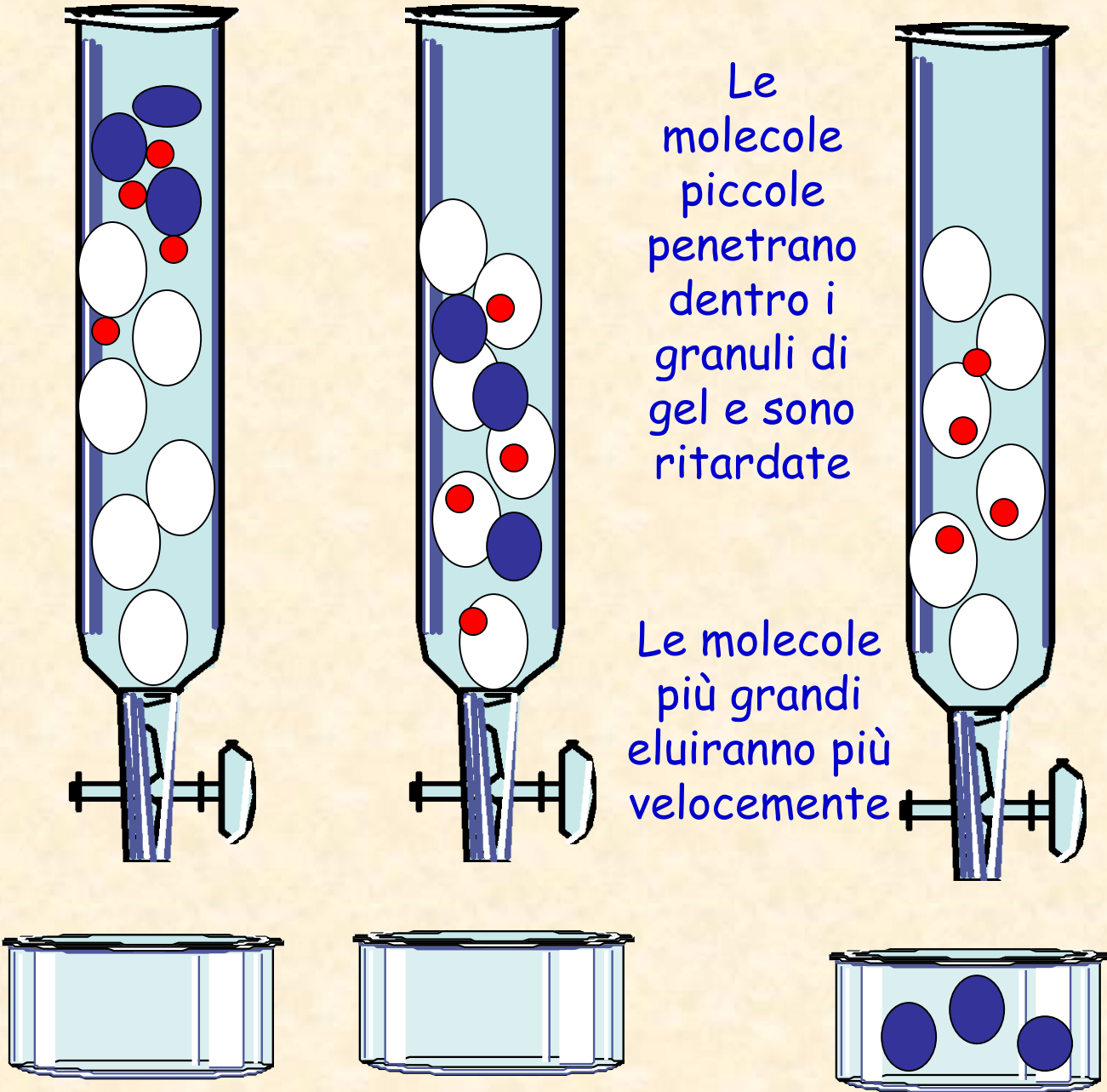
# Cromatografia per GEL FILTRAZIONE o Cromatografia ad ESCLUSIONE MOLECOLARE

**SEPARA** le **MOLECOLE** in base alle **DIMENSIONI**

**FASE STAZIONARIA** costituita da matrici di **destrano, agarosio o poliacrilamide** modificate industrialmente per acquisire la forma di **SFERETTE** idratate, con **PORI** di dimensioni controllate che regolano l'ingresso delle molecole







## Range di frazionamento

Polimero	Nome commerciale	Intervallo di frazionamento <sup>a</sup> ( $M_r \times 10^3$ )		
Destrano	Sephadex	G10	< 0.7	
		G25	1.0-5	
		G50	1.5-30	
		G100	4.0-150	
		G200	5.0-600	
	Sephacryl	S200	5.0-250	
		S300	10.0-1500	
		S400	20.0-8000	
	Agarosio	Sepharose	6B	10.0-4000
			4B	60.0-20000
2B			70.0-40000	
Bio-Gel		A5m	10.0-5000	
		A15m	40.0-15000	
		A50m	100.0-50000	
		A150m	1000.0-150 000	
Poliacrilammide	Bio-Gel	P2	0.1-1.8	
		P6	1.0-6.0	
		P30	2.5-40.0	
		P100	5.0-100.0	
		P300	60.0-400.0	

(kDa)

<u>Nome commerciale</u>	<u>Materiale</u>	<u>Campo di frazionamento (kD)</u>
Sephadex G-10	Destrano	0.05 - 0.7
Sephadex G-25	Destrano	1 - 5
Sephadex G-50	Destrano	1 - 30
Sephadex G-100	Destrano	4 - 150
Sephadex G-200	Destrano	5 - 600
Bio-Gel P-2	Poliacrilammide	0.1 - 1.8
Bio-Gel P-6	Poliacrilammide	1 - 6
Bio-Gel P-10	Poliacrilammide	1.5 - 20
Bio-Gel P-30	Poliacrilammide	2.4 - 40
Bio-Gel P-100	Poliacrilammide	5 - 100
Bio-Gel P-300	Poliacrilammide	60 - 400
Sepharose 6B	Agarosio	10 - 4000
Sepharose 4B	Agarosio	60 - 20000
Sepharose 2B	Agarosio	70 - 40000

# Sephadex

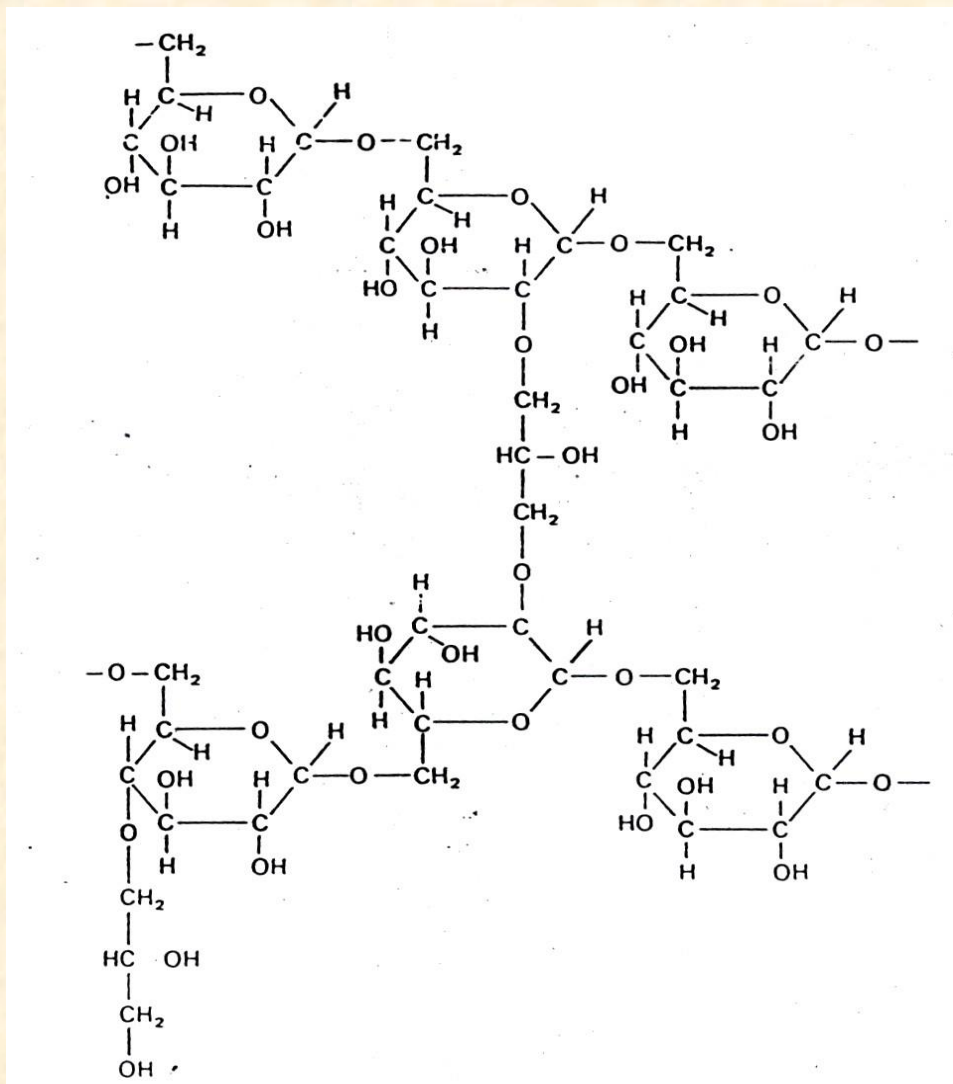
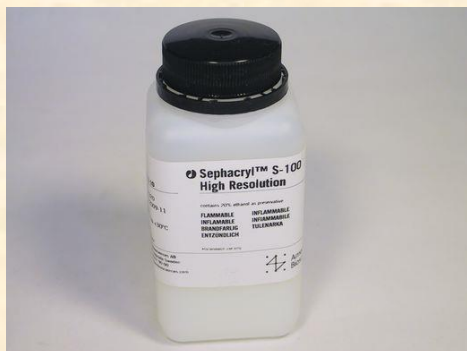
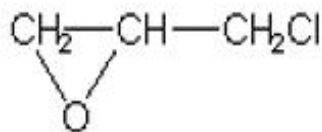
# Sephacryl

## destrano

E' un carboidrato polimerico ramificato. La ramificazione determina le dimensioni dei pori della matrice.

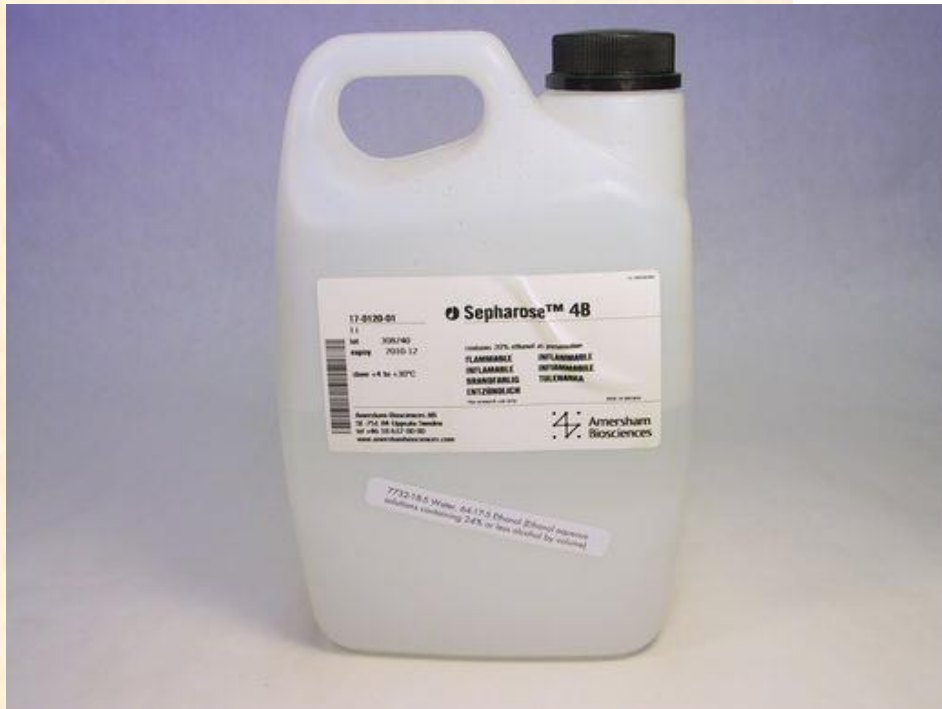
Può essere ulteriormente ramificato impiegando epiclorina

Epicloridrina:

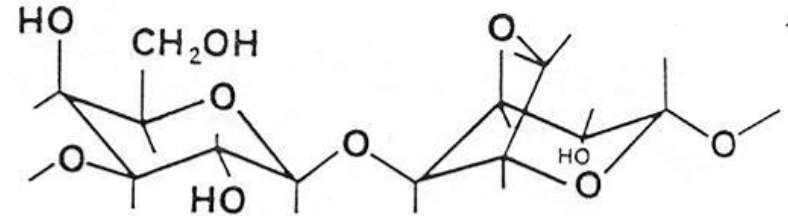


# Sepharose

E' un polisaccaride costituito da residui alternati di D-galattosio e 3,6-galattosio anidro

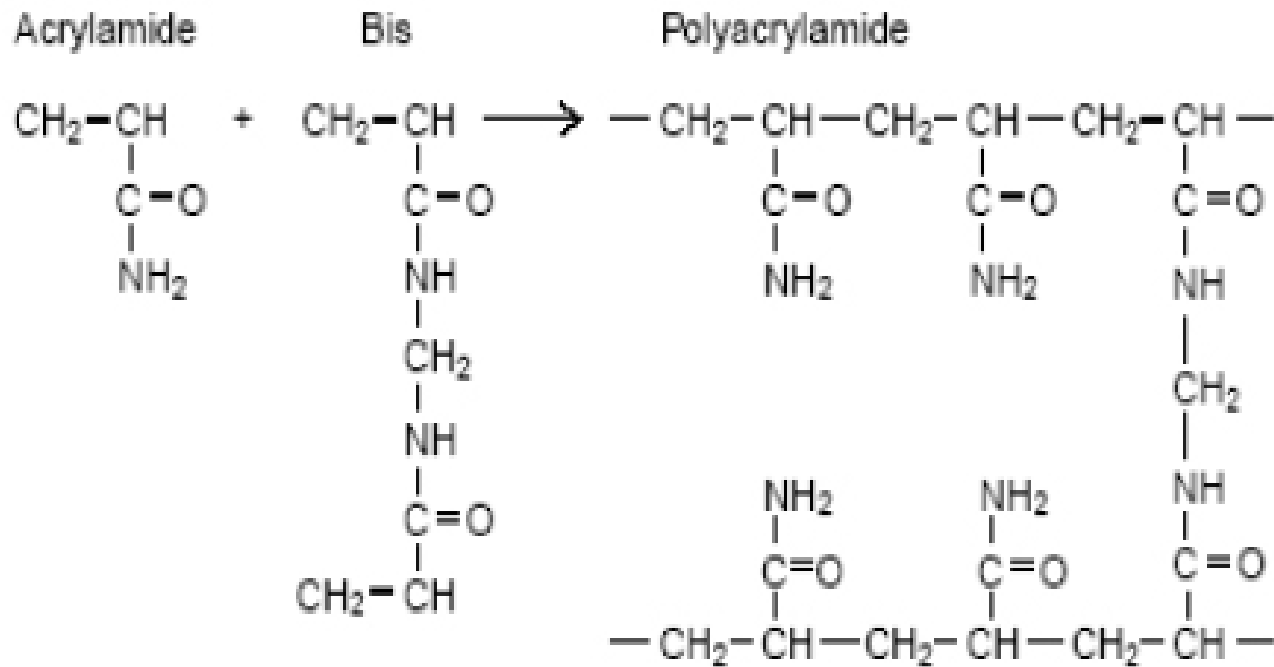


# agarosio

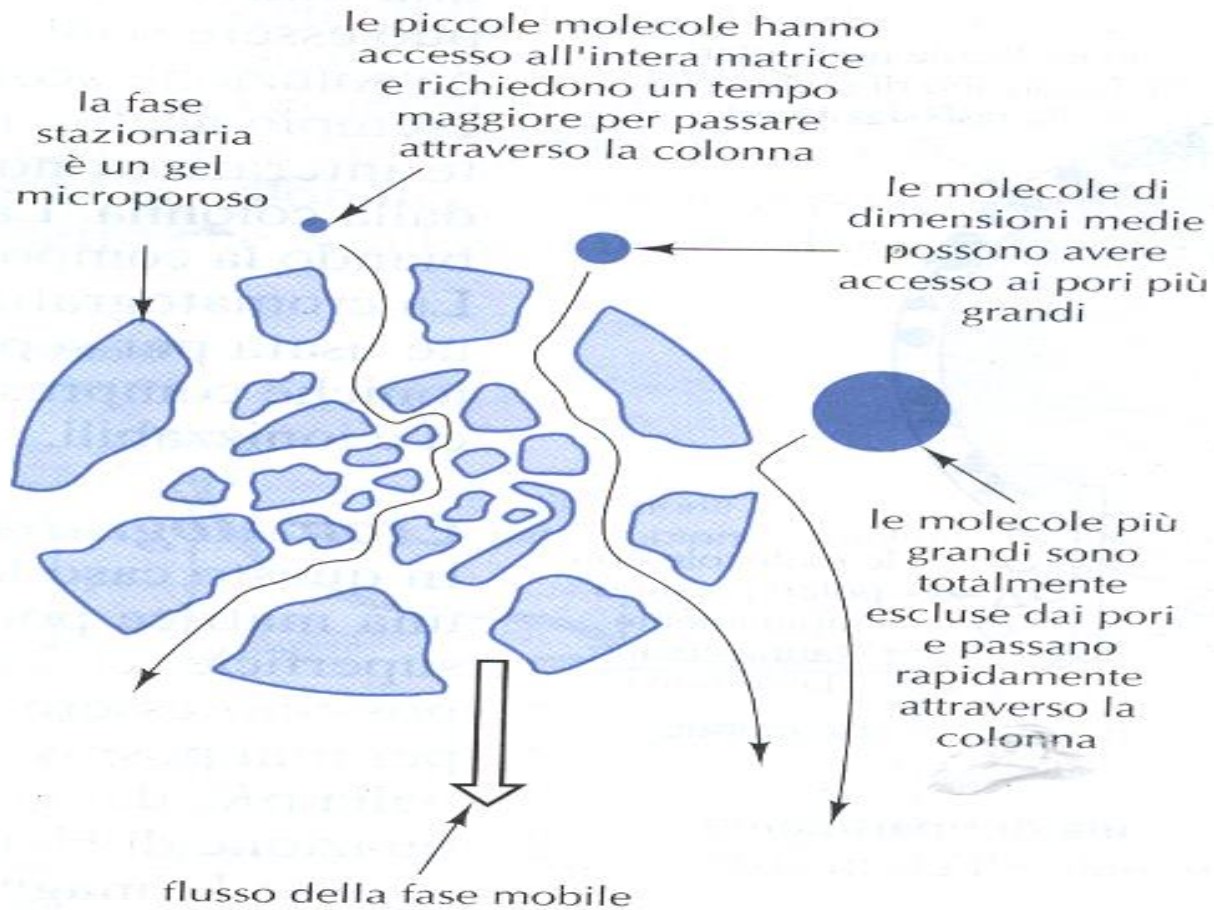


Bio-Gel

poliacrilammide



le sfere hanno pori di dimensioni comprese in un certo intervallo



I volumi di eluizione delle proteine con PM  $\neq$  ma compresi all'interno del range di frazionamento sono diversi  $\rightarrow$  separazione delle molecole in base al PM

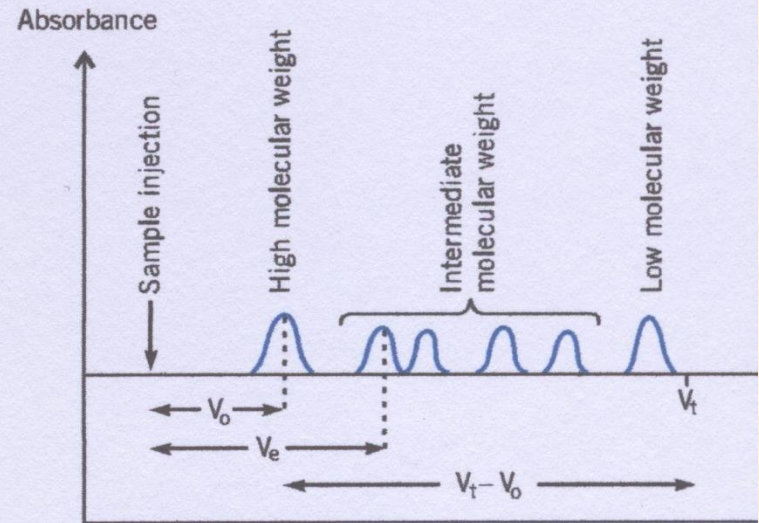
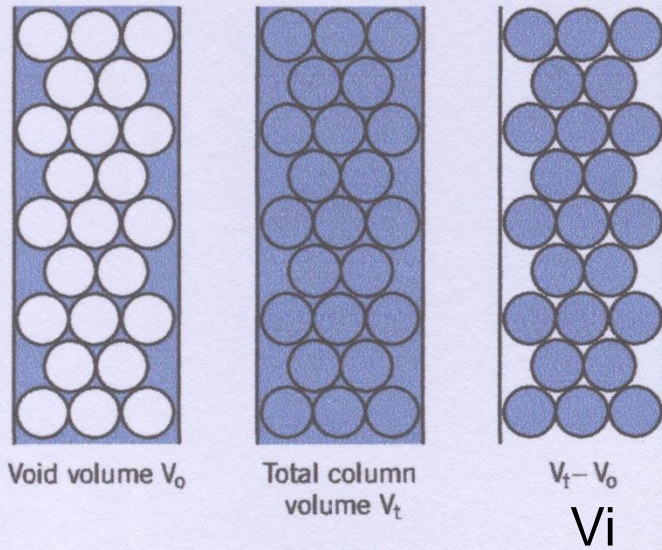


Fig. 2. Common terms in gel filtration.

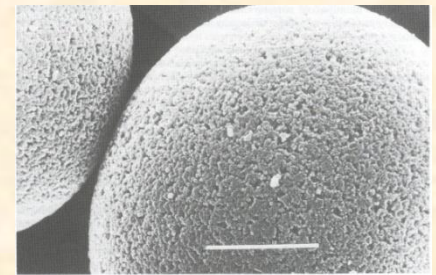
**$V_e$  = volume di eluizione = volume di fase mobile necessario per eluire un dato analita**

**$V_o$  = spazio tra i granuli**

$$V_t = V_o + V_i$$

**$V_i$  = spazio all'interno dei granuli**

Polimero	Nome commerciale	Intervallo di frazionamento <sup>a</sup> ( $M_r \times 10^3$ )
Destrano	G10	< 0.7
	G25	1.0-5
	G50	1.5-30
	G100	4.0-150
	G200	5.0-600



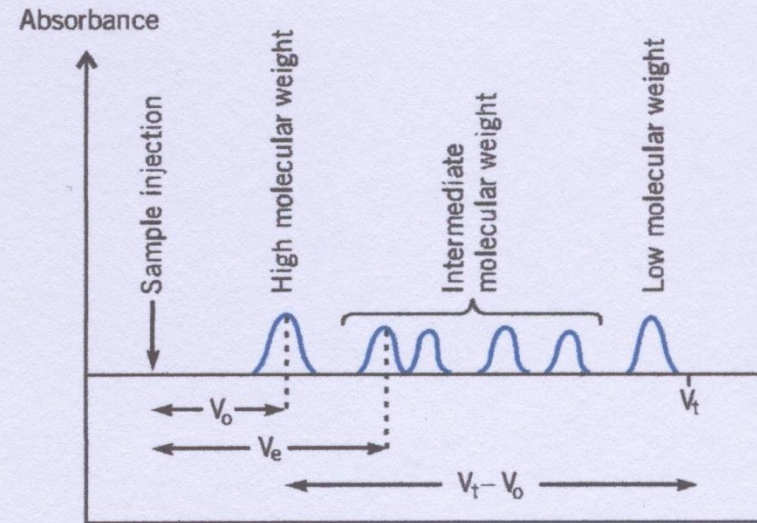
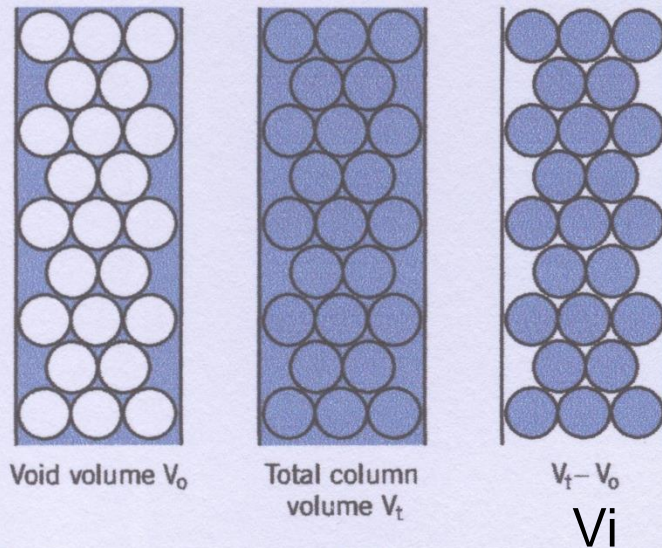


Fig. 2. Common terms in gel filtration.

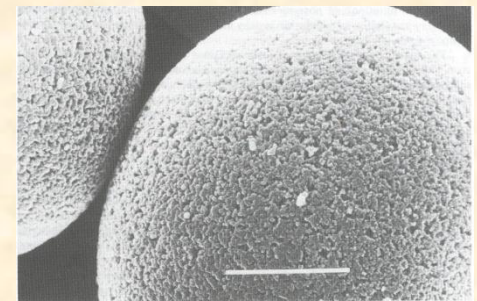
$V_o$  = spazio tra i granuli

$V_e$  = volume di eluizione = volume di fase mobile necessario per eluire un dato analita

$V_e = V_o$  per molecole completamente escluse dalle sferette di FS  
( $PM >$  limite superiore del range di frazionamento)

$V_e = V_t$  per molecole completamente incluse nelle sferette di FS  
( $PM <$  limite inf. del range di frazionam.)

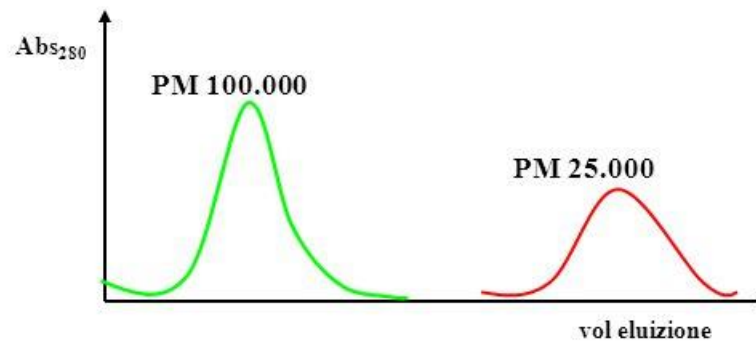
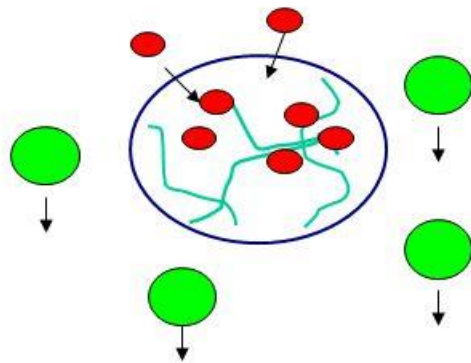
Polimero	Nome commerciale	Intervallo di frazionamento <sup>a</sup> ( $M_r \times 10^3$ )	
Dextrano	Sephadex	G10	< 0.7
		G25	1.0-5
		G50	1.5-30
		G100	4.0-150
		G200	5.0-600



Cromatografia per gel-filtrazione

# Cromatografia per esclusione molecolare o filtrazione su gel

- ◆ Le molecole proteiche fluiscono lungo una colonna riempita con granuli di un materiale inerte poroso (gel).
- ◆ Il gel consiste in una rete aperta, tridimensionale. I pori all'interno del gel sono di dimensioni tali che non sono accessibili a grandi molecole ma sono accessibili a piccole molecole.
- ◆ Le molecole grandi non possono entrare e restano nel volume escluso.
- ◆ Le molecole piccole entrano nei pori e sono ritardate nella colonna.



## **APPLICAZIONI della GEL CROMATOGRAFIA:**

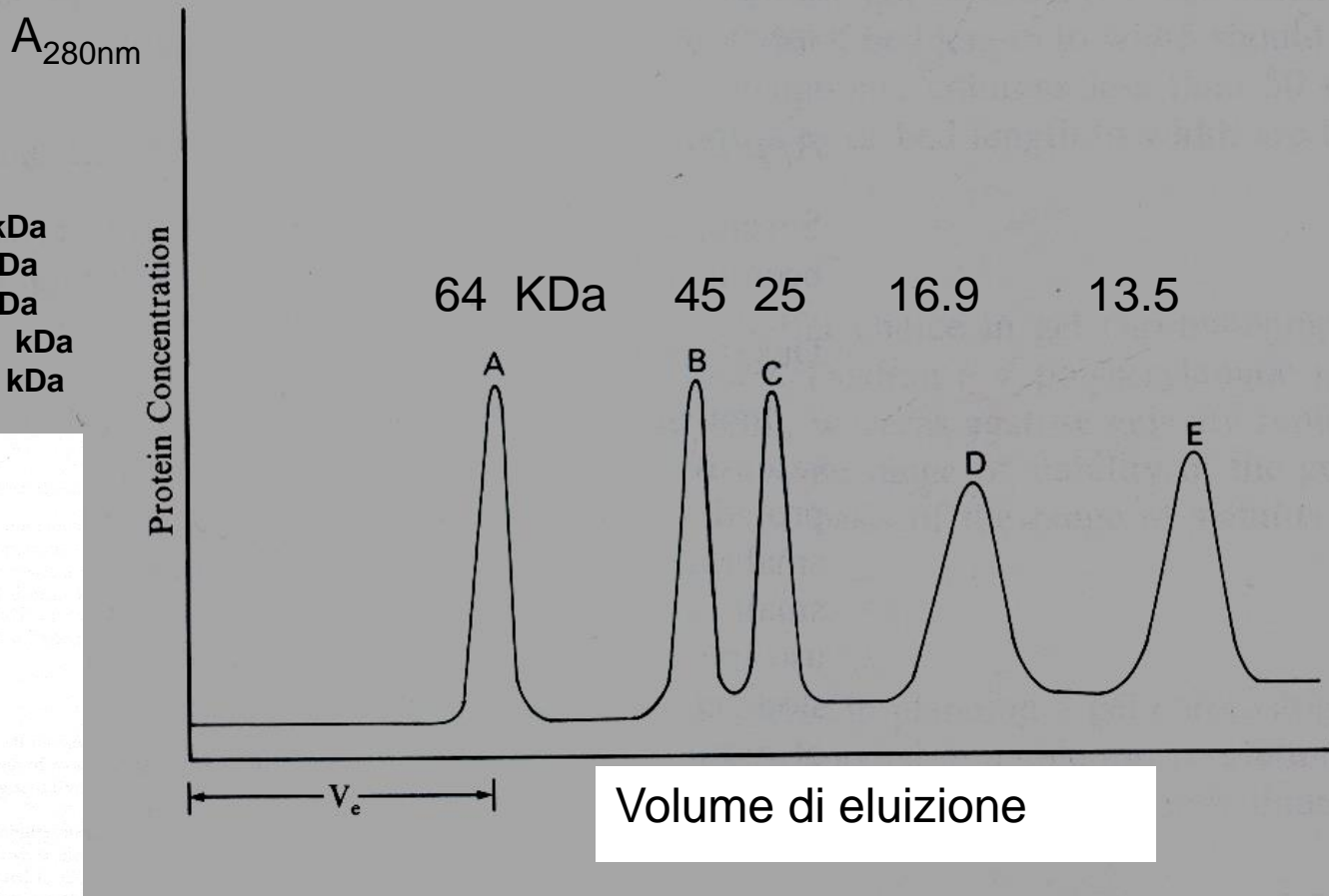
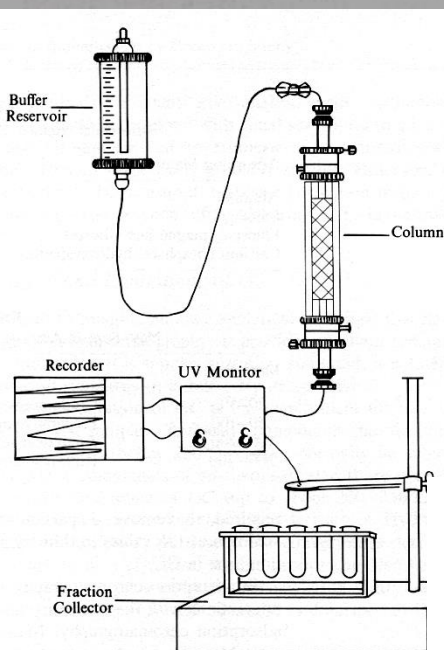
- **PURIFICAZIONE di MACROMOLECOLE**
- **DETERMINAZIONE del Peso Molecolare**
- **DESALIFICAZIONE** =Modificazione della soluzione tampone in cui è solubilizzata la soluzione proteica (forza ionica e pH)

## Purificazione di macromolecole

**Figure 3.10**

Elution curve for a mixture of several proteins.

A = hemoglobin, 64 kDa  
 B = egg albumin, 45 kDa  
 C = chymotrypsinogen, 25 kDa  
 D = myoglobin, 16.9 kDa  
 E = cytochrome c, 13.5 kDa



Polimero	Nome commerciale	Intervallo di frazionamento <sup>a</sup> ( $M_r \times 10^3$ )
Destrano	G10	< 0.7
	G25	1.0-5
	G50	1.5-30
	G100	4.0-150
	G200	5.0-600

?

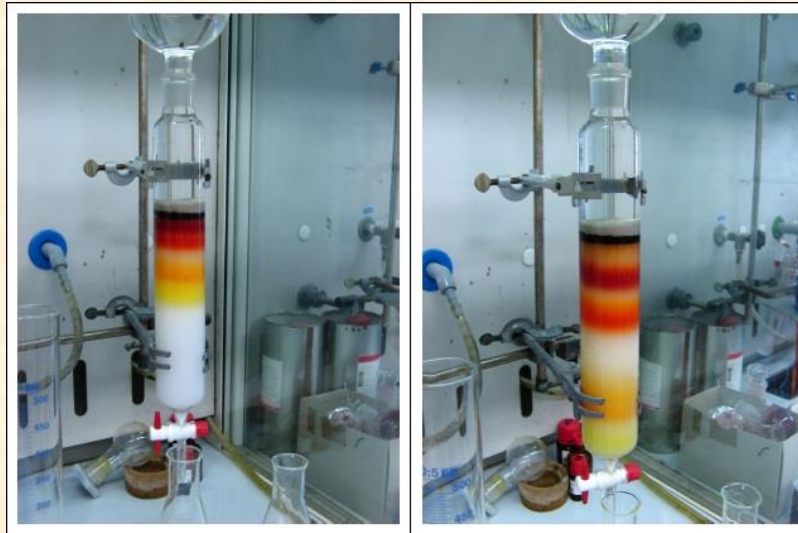
La capacità di separare gli analiti in Gel-cromatografia dipende da:  
in genere  $<2\% V_t$

- Volume di campione caricato rispetto a  $V_t$
- Intervallo di dimensioni dei pori delle particelle di FS

più l'intervallo è ristretto, maggiore è la risoluzione

- lunghezza della colonna

Vengono generalmente utilizzate **colonne più lunghe** rispetto ad altre cromatografie al fine di aumentare il percorso compiuto dalle molecole del campione attraverso la F.S. e quindi differenziare maggiormente i volumi di eluizione delle diverse proteine



**Processo di eluizione non prevede variazioni di Fase Mobile =  
Eluizione isocratica**

**Composizione della F.M. = ?**

**Per questo tipo di cromatografia non è indispensabile l'utilizzo di soluzioni tampone, teoricamente si può utilizzare anche acqua distillata, ma è sempre preferibile utilizzare una soluzione tampone x controllare il pH.**

**Si lavora generalmente in **condizioni non denaturanti**, per cui viene rispettata la conformazione nativa delle proteine, ma si può decidere di lavorare anche in **condizioni denaturanti****

## APPLICAZIONI della **GEL CROMATOGRAFIA**:

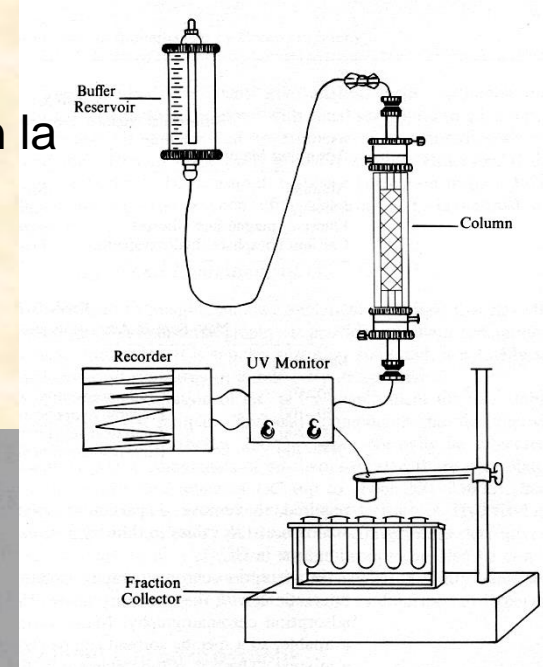
- **PURIFICAZIONE** di **MACROMOLECOLE**
- **DETERMINAZIONE** del **Peso Molecolare**
- **DESALIFICAZIONE** = Modificazione della soluzione tampone in cui è solubilizzata la soluzione proteica (forza ionica e pH)



## Determinazione del PM

1) Carichiamo sulla colonna per gel-filtrazione impaccata con la fase stazionaria prescelta una miscela di proteine a PM noto  
(Attenzione al Range di frazionamento!!!)

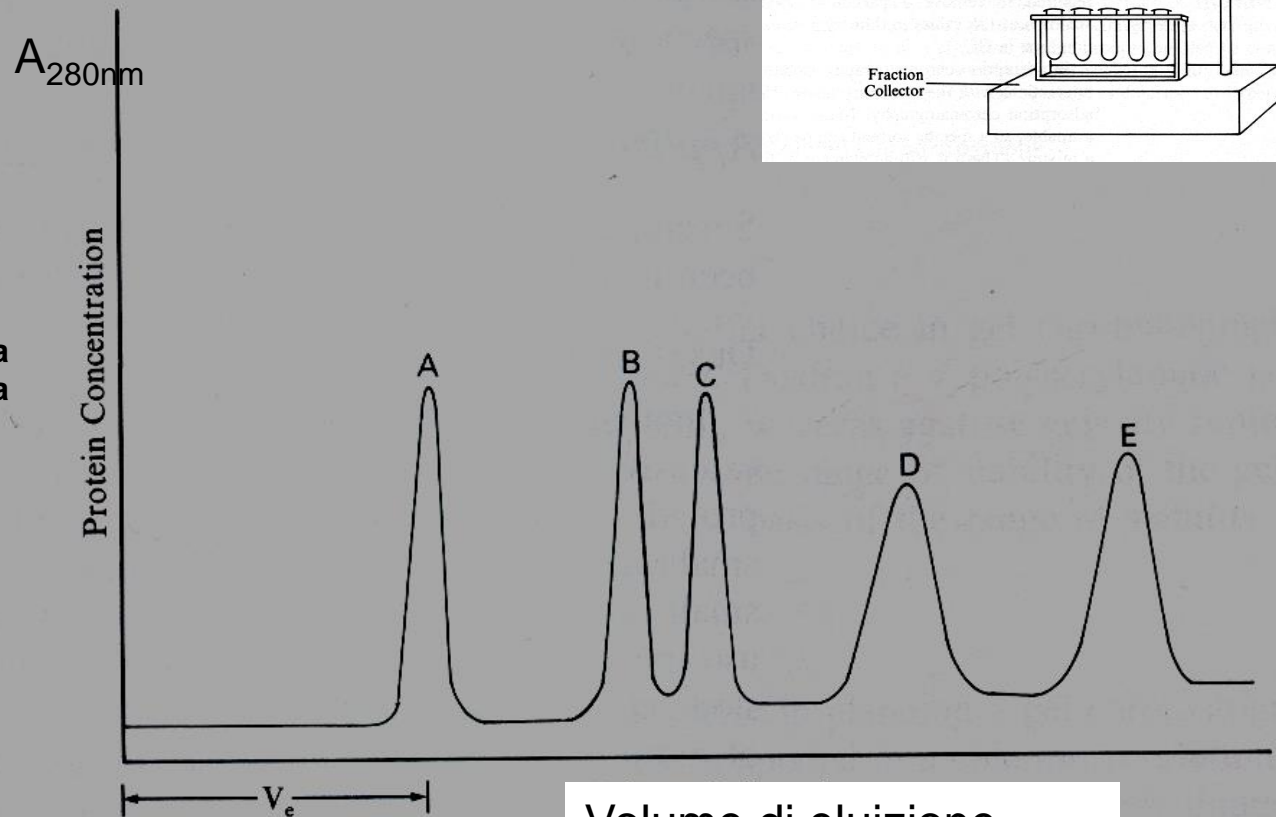
2) Determiniamo  $V_e$  di ciascuna proteina



**Figure 3.10**

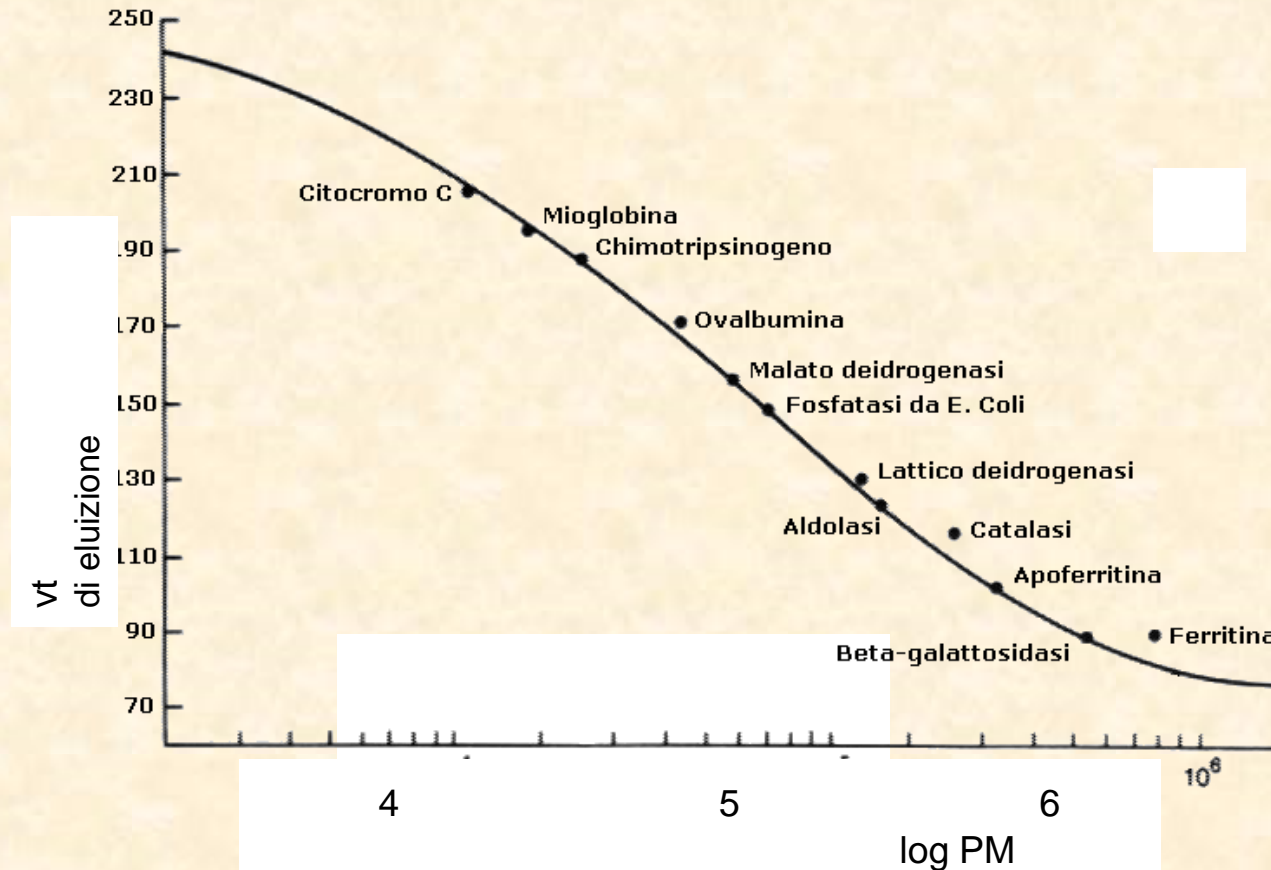
Elution curve for a mixture of several proteins.

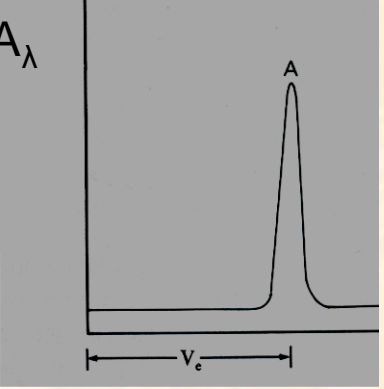
A = hemoglobin,	64 kDa
B = egg albumin,	45 kDa
C = chymotrypsinogen,	25 kDa
D = myoglobin,	16.9 kDa
E = cytochrome c.	13.5 kDa



# Determinazione peso molecolare: Costruzione curva di taratura

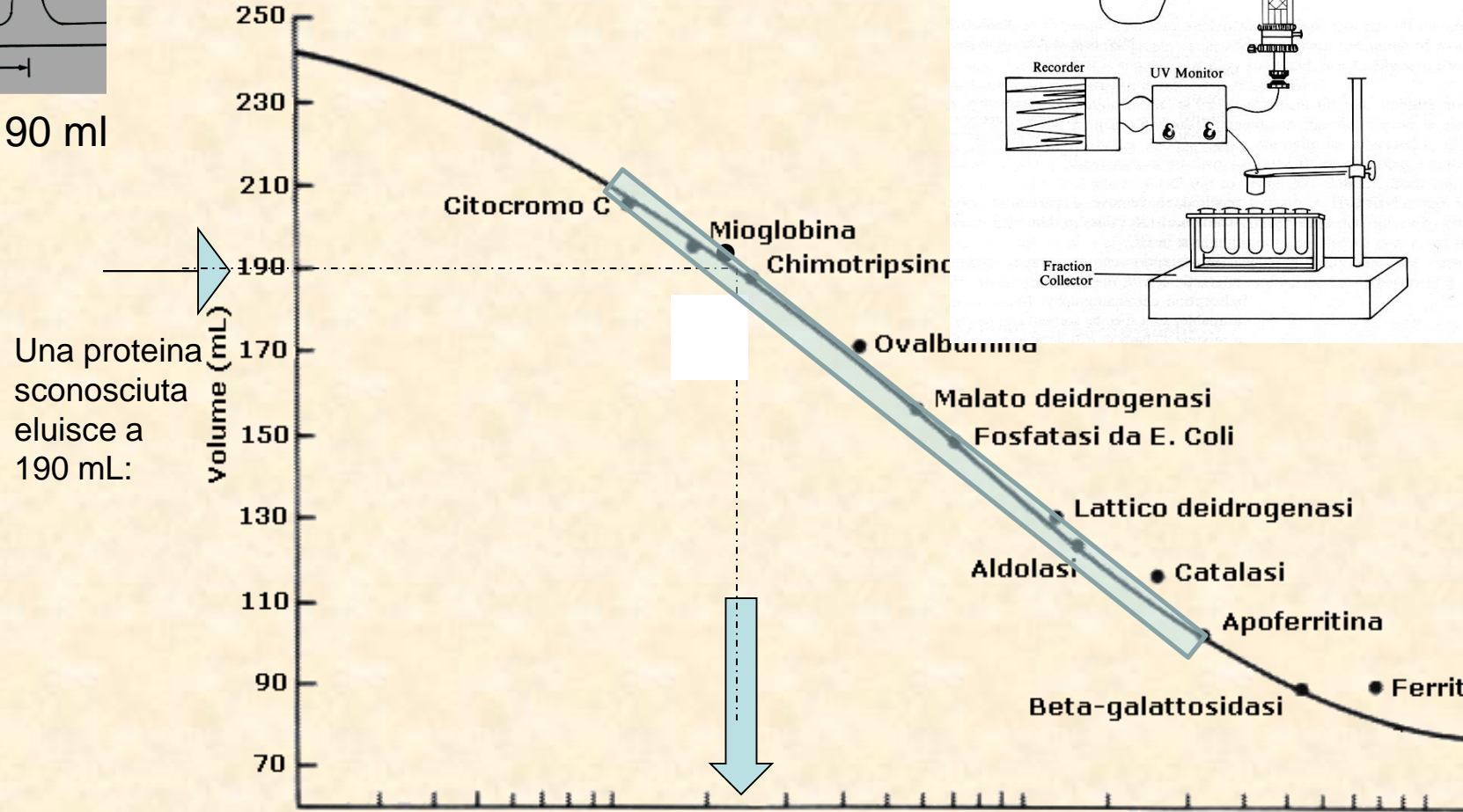
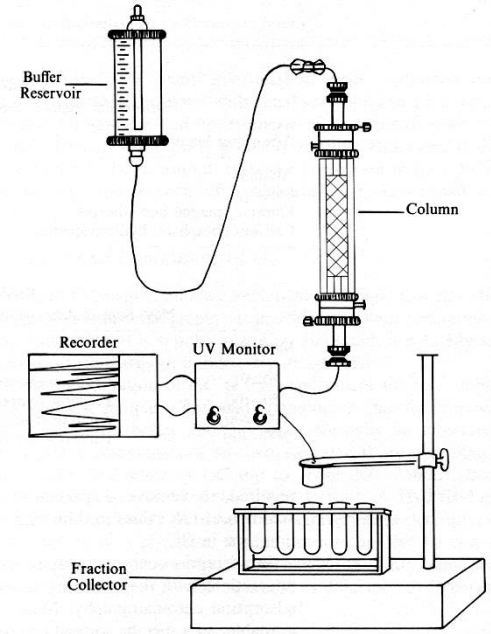
- Devo caricare in colonna un campione costituito da una miscela di Proteine a PM noto
- Misurare il volume di eluizione per ogni proteina
- Costruire una grafico  $V_e$  in funzione del  $\log PM$





$V_e = 190 \text{ ml}$

# 4) Determinazione PM proteina incognita

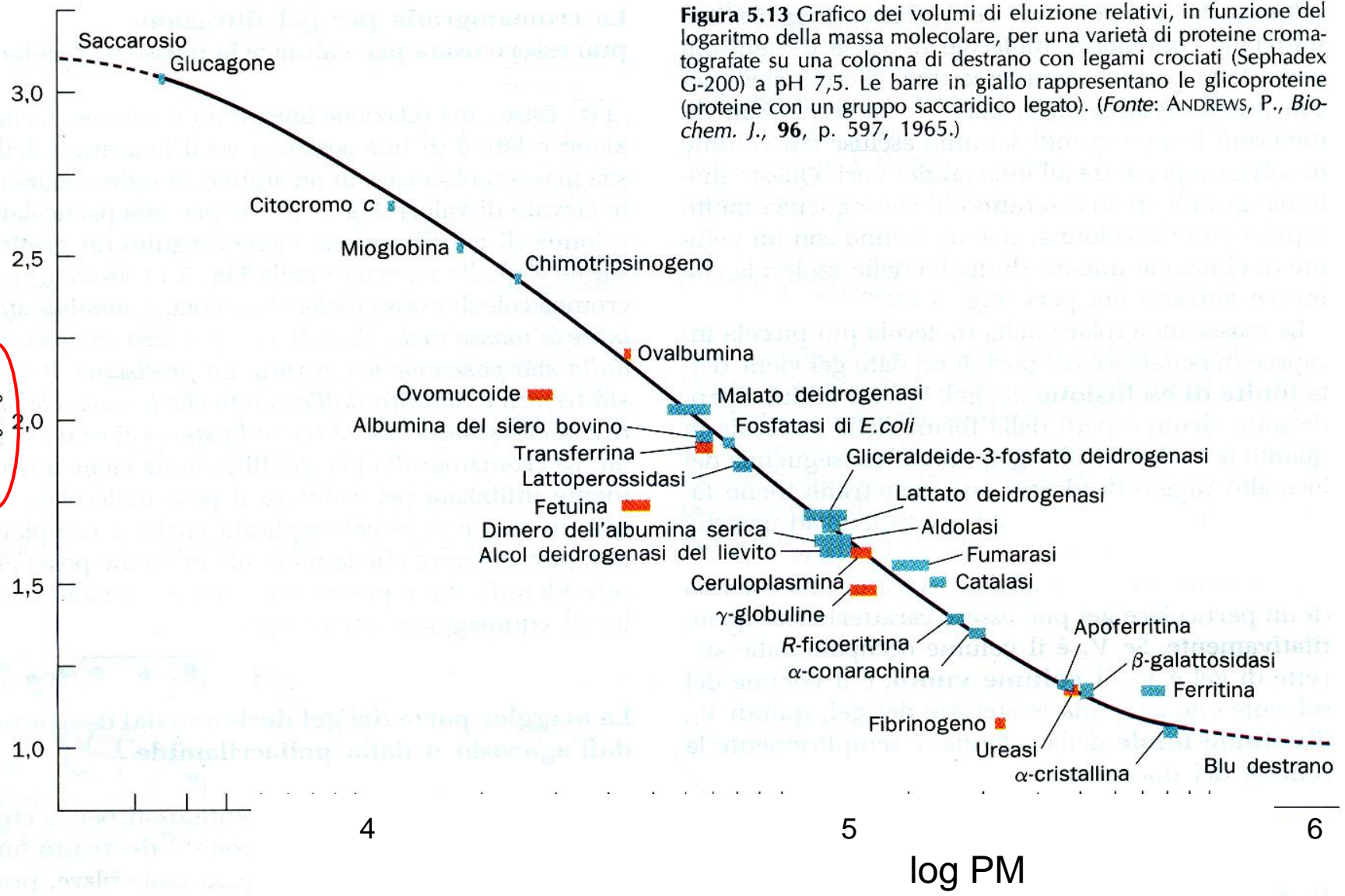


Una proteina sconosciuta eluisce a 190 mL:

$\log PM = 4.12$     $PM = 13.180 \text{ Da}$

5  
log PM

$V_e/V_0$



**Figura 5.13** Grafico dei volumi di eluizione relativi, in funzione del logaritmo della massa molecolare, per una varietà di proteine cromatografate su una colonna di destrano con legami crociati (Sephadex G-200) a pH 7,5. Le barre in giallo rappresentano le glicoproteine (proteine con un gruppo saccaridico legato). (Fonte: ANDREWS, P., *Biochem. J.*, **96**, p. 597, 1965.)

## APPLICAZIONI della **GEL CROMATOGRAFIA**:

- **PURIFICAZIONE di MACROMOLECOLE**

- **DETERMINAZIONE del Peso Molecolare**

- **DESALIFICAZIONE** = Modificazione della soluzione tampone in cui è solubilizzata la soluzione proteica (forza ionica e pH)

# DESALIFICAZIONE:

Si utilizza una Fase Stazionaria che esclude completamente le molecole proteiche (vengono eluite con  $V_0$ ) mentre le molecole di PM inferiore vengono rallentate

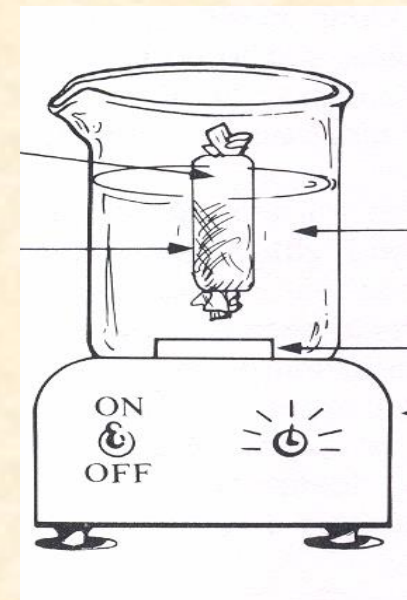
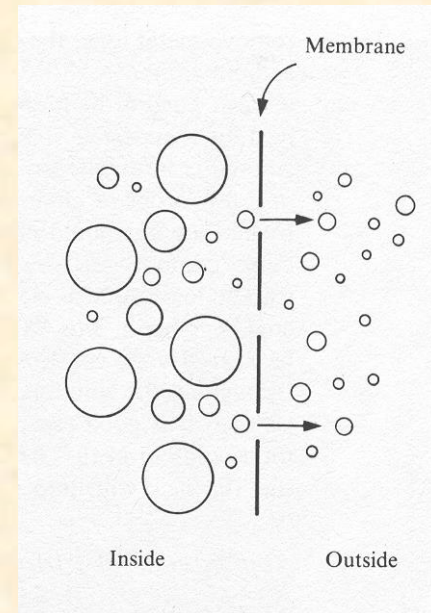
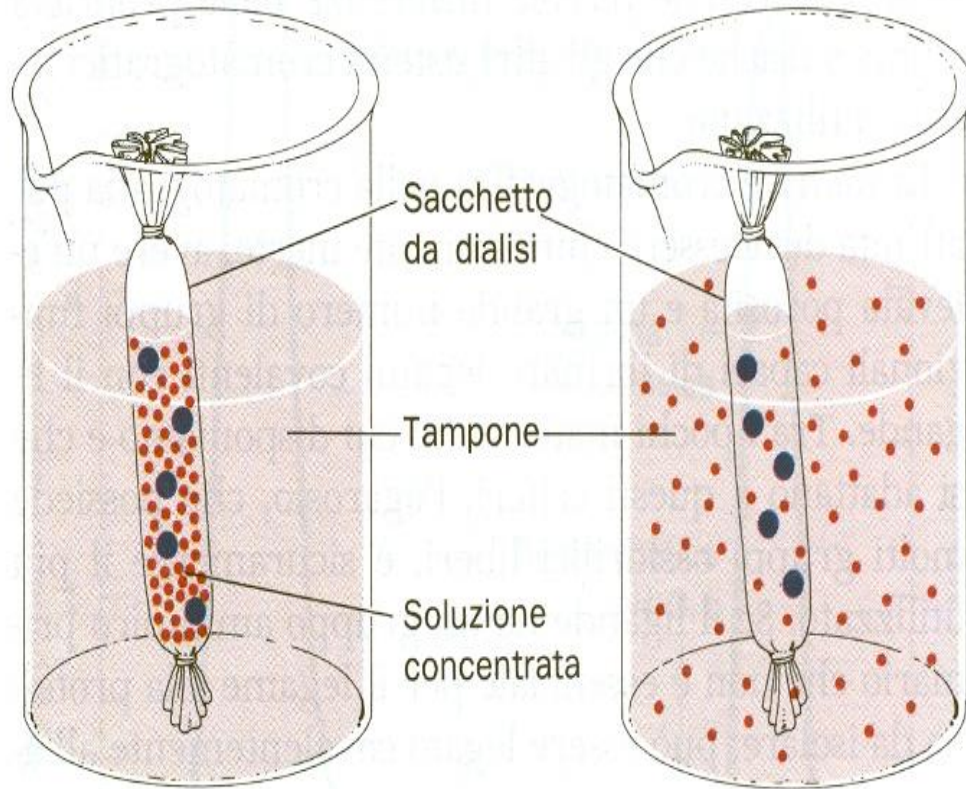
ES: Sephadex G25 (range di frazionamento 1000-5000 Da)

Polimero	Nome commerciale	Intervallo di frazionamento <sup>a</sup> ( $M_r \times 10^3$ )
Destrano	G10	< 0.7
	G25	1.0-5
	Sephadex G50	1.5-30
	G100	4.0-150
	G200	5.0-600

kDa

(a) Inizio della dialisi

(b) All'equilibrio



Membrane semipermeabili  
p.es. acetato di cellulosa a porosità  
tale da non permettere la fuoriuscita delle proteine

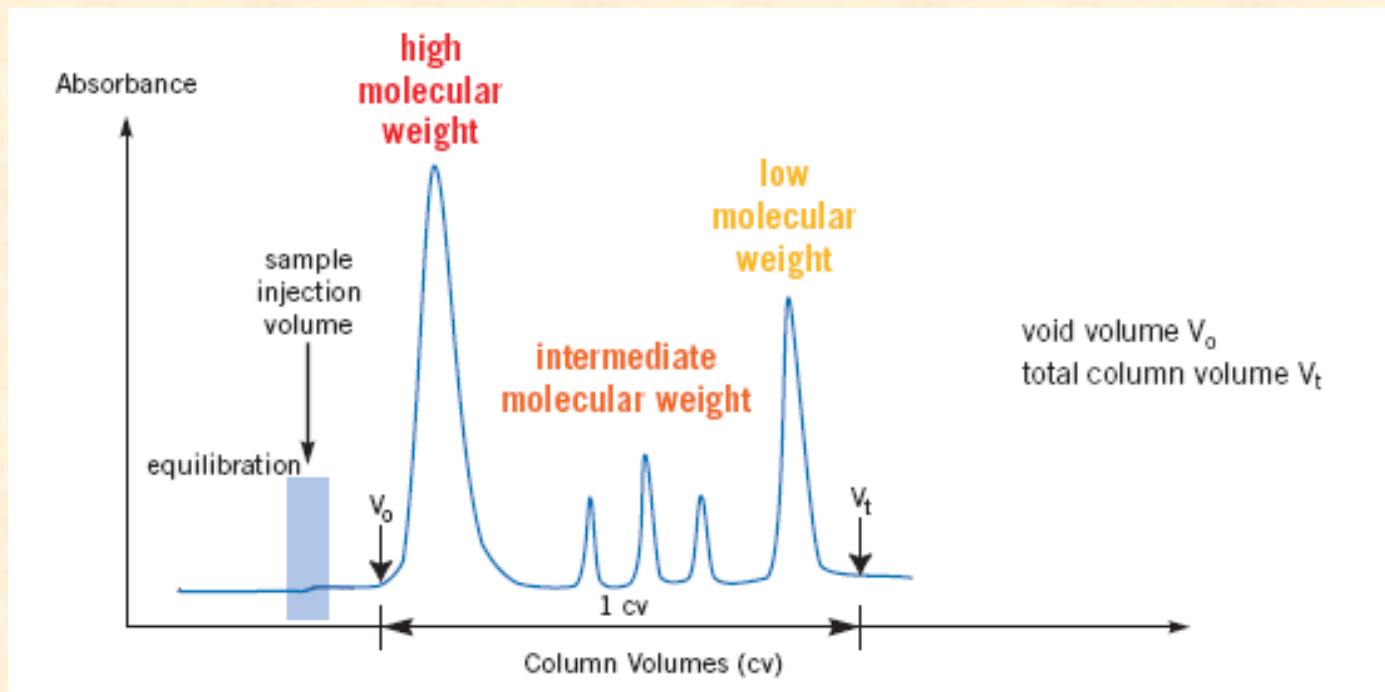
DIALISI



centricon

# Gel filtrazione

- Vantaggi
  - Semplice
  - Prevedibile
- Svantaggi
  - Bassa capacità (piccoli volumi)



Quale metodo cromatografico è più adatto a separare le seguenti coppie di proteine:

Emoglobina/mioglobina

Lisozima/ribonucleasi

	pI	PM (kDa)
Mioglobina	7,0	16,9
Emoglobina	7,1	64,5

Ribonucleasi	7,8	12,6
Lisozima	11,0	14,6

Qual'è l'ordine di eluizione delle proteine elencate da una colonna di Sephadex G-100

(Range di frazionamento = 4.000 – 150.000 Da)

equilibrata a pH 7.0?

Ipotizzare il grafico di eluizione

## CROMATOGRAFIA a SCAMBIO IONICO

interazione elettrostatica  
tra molecole di segno opposto

gruppi ionizzabili al variare  
del pH

Maggiori volumi di campione  
e maggiori quantità di proteine

Alta flessibilità nelle condizioni sperimentali (pH, I)

Lunghezza della colonna (non importante)

1) Cromatografia a  
scambio cationico

2) Cromatografia a  
scambio anionico

## Gel filtrazione

SEPARA le MOLECOLE  
in base alle **DIMENSIONI**

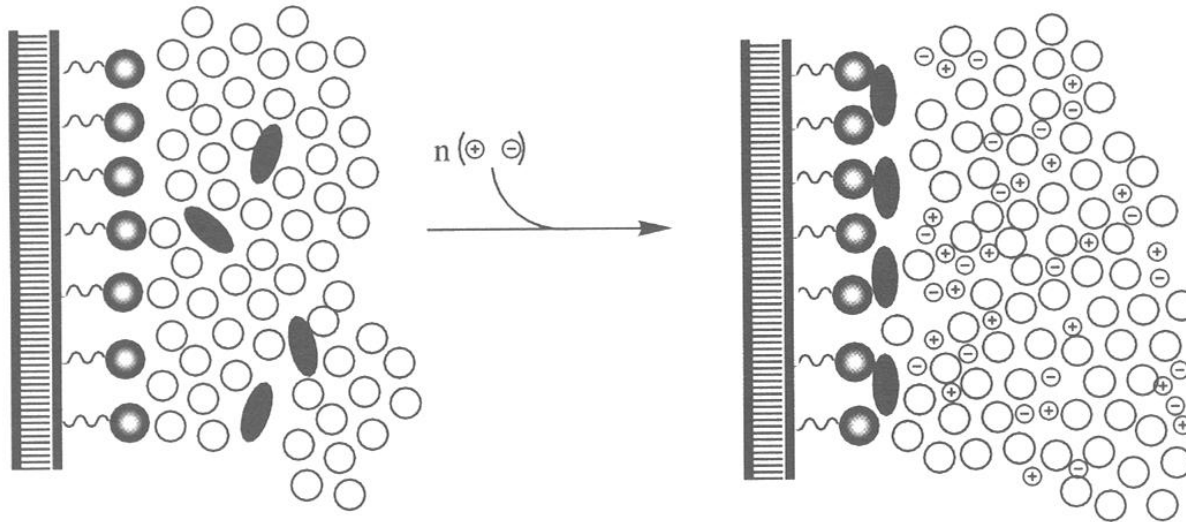
- Minori volumi di campione  
(2% volume totale)
- minori quantità di proteine
- Importante lunghezza della colonna  
cromatografica

<https://www.youtube.com/watch?v=S89mAyh6yHU>

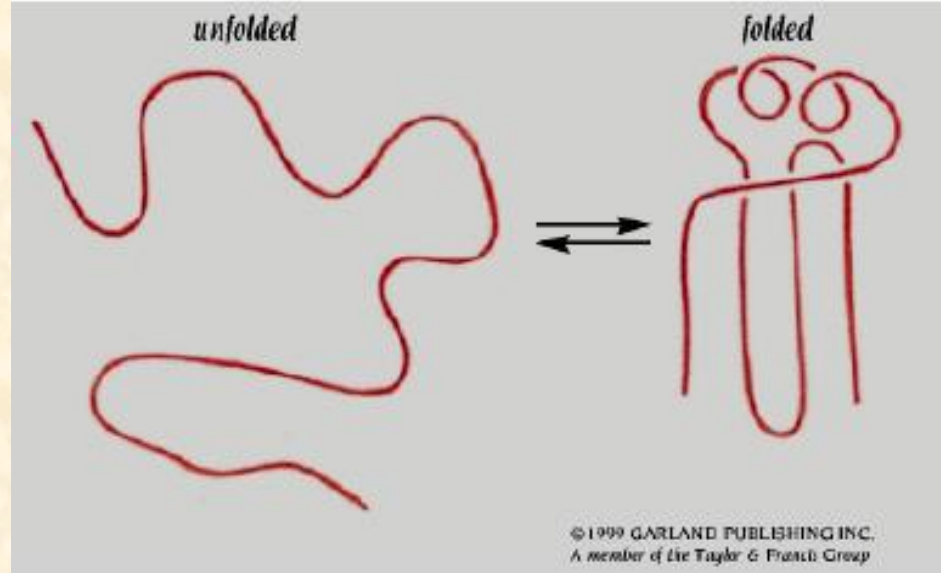
# CROMATOGRAFIA x INTERAZIONI IDROFOBICHE (cromatografia di adsorbimento):

- Sfrutta l'idrofobicità delle porzioni idrofobiche superficiali delle proteine

Vengono utilizzate matrici di **agarosio** a cui sono state legate catene idrocarburiche in modo da permettere le interazioni idrofobiche tra fase stazionaria e le porzioni idrofobiche superficiali delle proteine



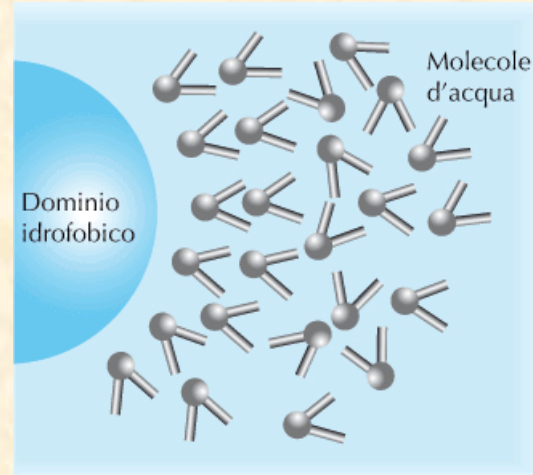
Nella maggior parte delle proteine globulari l'avvolgimento comporta la disposizione della maggior parte delle porzioni idrofobiche verso l'interno, e le porzioni idrofiliche all'esterno, a contatto con l'acqua



Ma ci sono anche porzioni idrofobiche superficiali

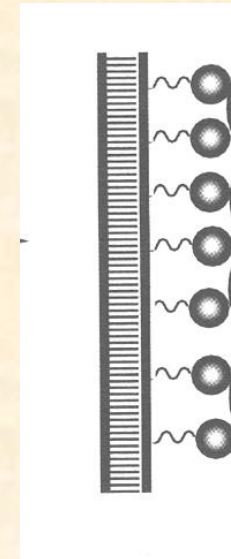
Le proteine in soluzione sono circondate da molecole di acqua di idratazione

Le molecole di  $H_2O$  si organizzano intorno alle regioni idrofobiche superficiali in strutture molto ordinate denominate **clatrati**



Utilizzando dei Sali che sottraggono l'  $H_2O$  di idratazione i clatrati vengono distrutti

**Le regioni idrofobiche superficiali delle proteine private delle molecole d'acqua d'idratazione sono esposte e possono interagire con la fase stazionaria (che presenta gruppi idrofobici) mediante interazioni idrofobiche**



L'aggiunta di ioni ad una soluzione contenente proteine sottrae le molecole d'acqua di idratazione che rivestono le porzioni idrofobiche superficiali delle proteine  
→ le porzioni idrofobiche superficiali sono "scoperte"

### Salting out

Si utilizzano Forze Ioniche molto elevate



#### Scopo:

Aggregazione delle molecole proteiche mediante interaz. idrofobiche tra le loro porzioni idrofobiche "scoperte"



precipitazione

### Crom.per interazioni idrofobiche

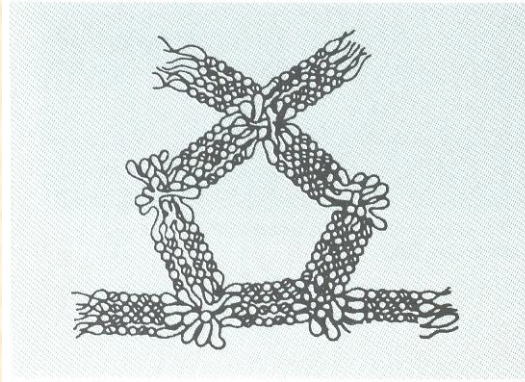
Si utilizzano Forze Ioniche meno elevate



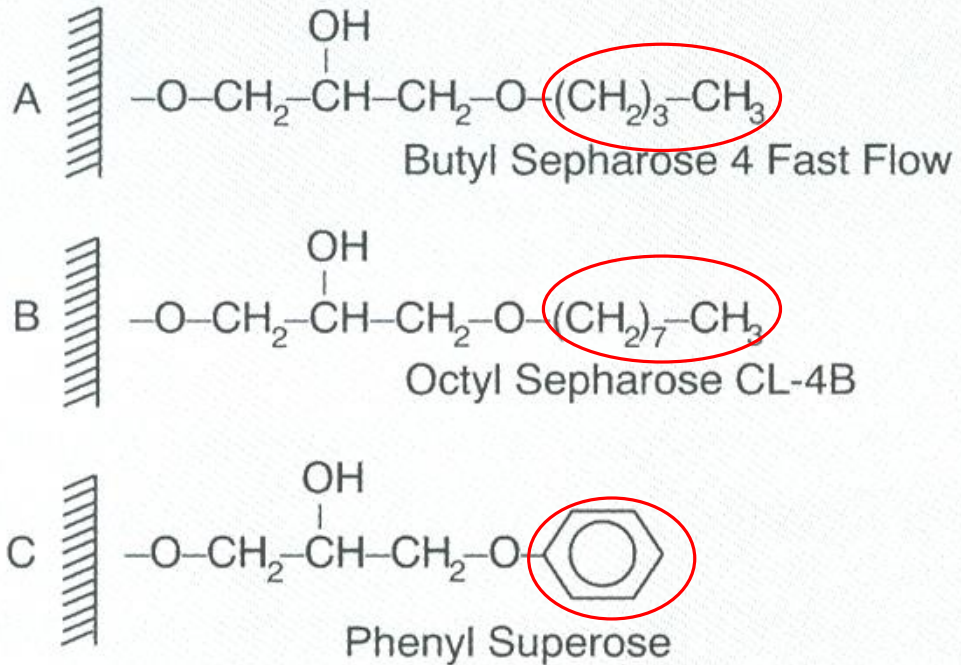
#### Scopo:

le proteine si **legano** ai gruppi idrofobici della Fase stazionaria mediante interazioni idrofobiche con le porzioni idrofobiche superficiali "scoperte"

FASI STAZIONARIE utilizzate nella cromatografia per interazioni idrofobiche:



MATRICE di AGAROSIO



Gruppi alchilici: esile, ottile

Gruppi fenilici : phenil sepharose

## CROMATOGRAFIA x INTERAZIONI IDROFOBICHE:

Fase mobile;

Tampone contenente:

-fosfato di potassio

-solfato d'ammonio

ES: tampone fosfato 20 mM + solfato d'ammonio 1 M

**IMPORTANTE:**

Forza Ionica < a quella che causa salting out

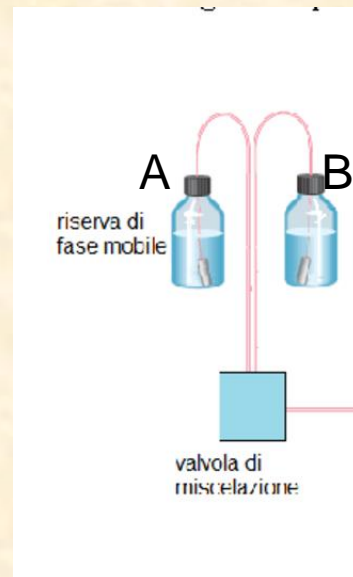
# ELUIZIONE NON ISOCRATICA

## Gradiente decrescente di forza ionica

### ESEMPIO

A: tampone fosfato 20 mM + solfato d'ammonio 1 M

B: tampone fosfato 20 mM + solfato d'ammonio 0,1 M



Gradiente:

Dal 100% A allo 0 % A

Le proteine che si legano fortemente alla fase stazionaria devono essere eluite con uno “spiazzatore” con elevata affinità per fase stazionaria:

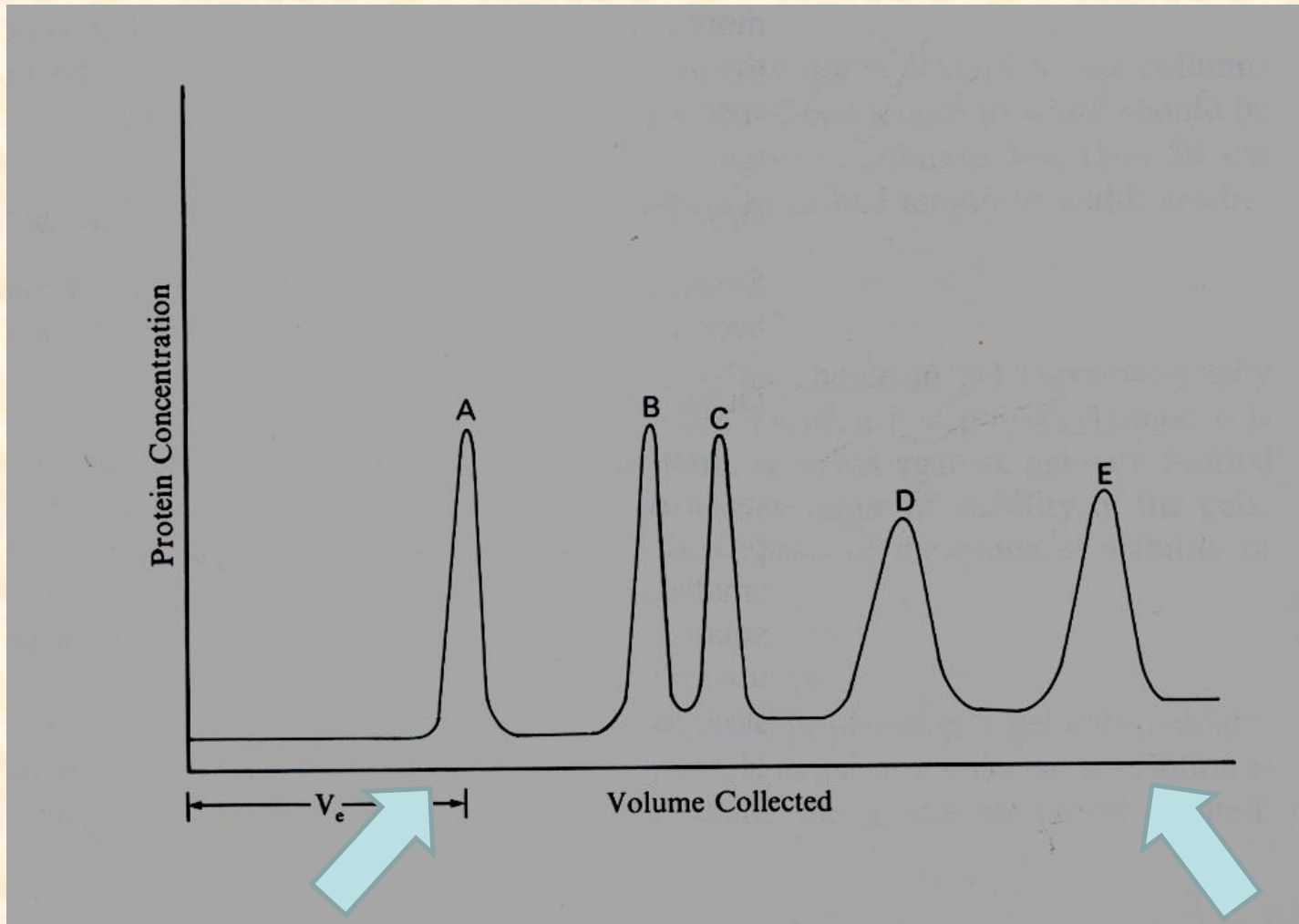
- detergenti non-ionici come Triton X-100,
- solventi non polari *glicole propilenico*

# Complementare alla cromatografia a scambio ionico

Cromatografia a scambio ionico e idrofobica  
utilizzate in sequenza

(prima o dopo una cromatografia a scambio ionico)

# CROMATOGRAFIA x INTERAZIONI IDROFOBICHE:

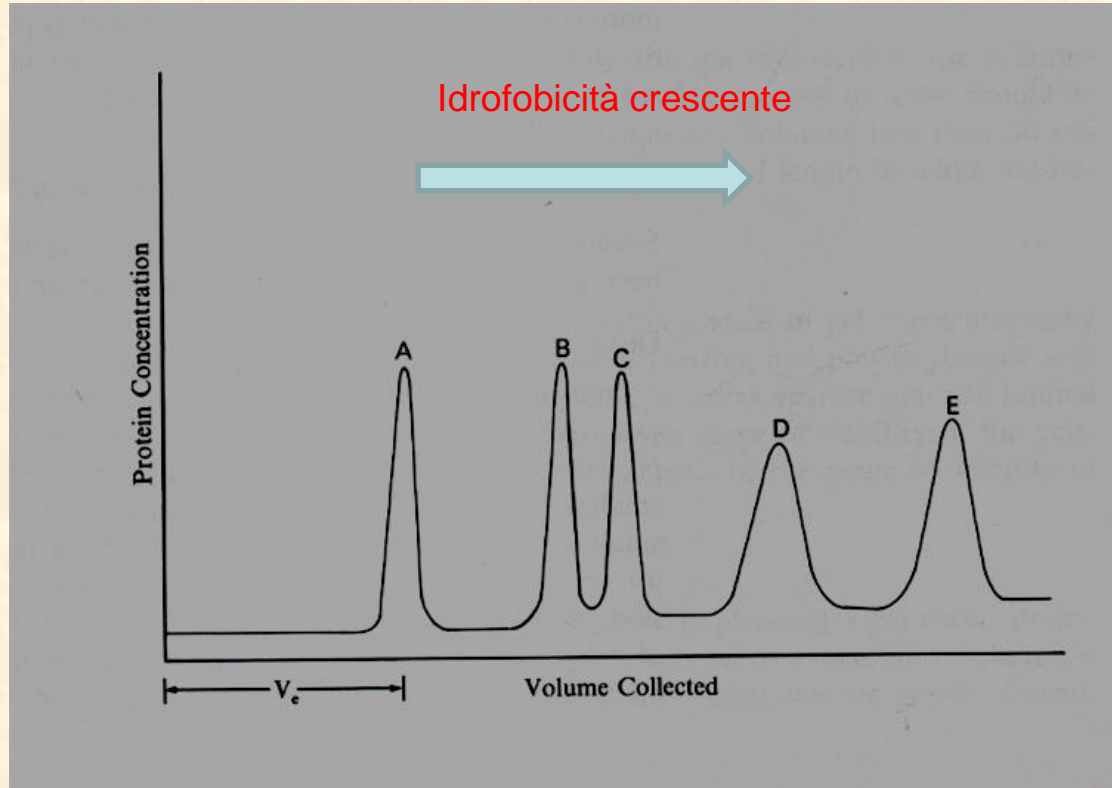


PROTEINA MENO IDROFOBICHE:

PROTEINA PIU' IDROFOBICHE:

## CROMATOGRAFIA x INTERAZIONI IDROFOBICHE :

Fase stazionaria: **apolare**  
Fase mobile: **polare**



PROTEINA MENO IDROFOBICHE:

PROTEINA Più IDROFOBICHE

# CROMATOGRAFIA x INTERAZIONI IDROFOBICHE (HIC):

Utilizzata:

▪ dopo salting out utilizzando:

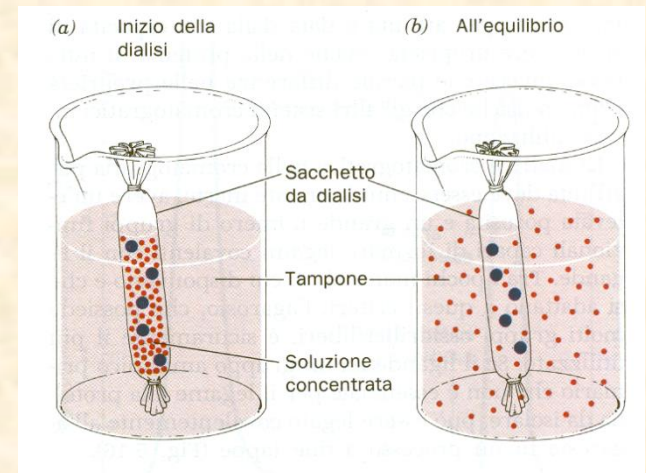
- **il supernatante contenente la proteina non precipitata**
- **il precipitato risolubilizzato per aggiunta di sol. tampone a bassa FI**

-dopo eluizione da cromatografia a scambio ionico per  $\uparrow$  Forza Ionica evitando la dialisi e caricando il campione direttamente su HIC

SVANTAGGIO:

Il comportamento di ciascuna proteina è difficilmente prevedibile

È necessario uno studio preliminare



Cromatografia su idrossiapatite (fosfato di calcio idrossido)  
(cromatografia di adsorbimento)  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$

## PRINCIPIO

Interazione tra gli ioni fosfato e calcio (matrice)  
e le molecole da separare

## Utilizzo:

Separazione di proteine

Separazione DNA a singolo filamento e doppio filamento

**Eluizione** con concentrazioni crescenti di fosfato (300 mM)

**NON UTILIZZARE EDTA** (chela gli ioni calcio della matrice)