

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.

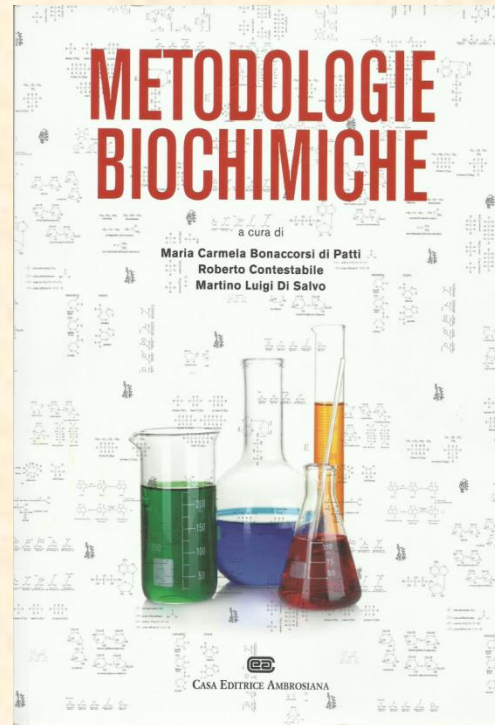
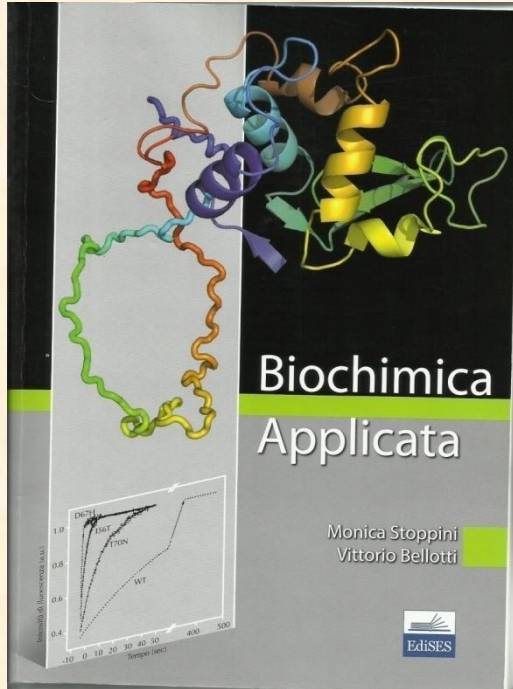
E' vietata la copia e la riproduzione dei contenuti e immagini in qualsiasi forma. E' inoltre vietata la redistribuzione e la pubblicazione dei contenuti e immagini non autorizzate espressamente dall'autore.

**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 di affinità

La cromatografia di affinità è impiegata nella separazione di molecole di interesse prevalentemente biochimico

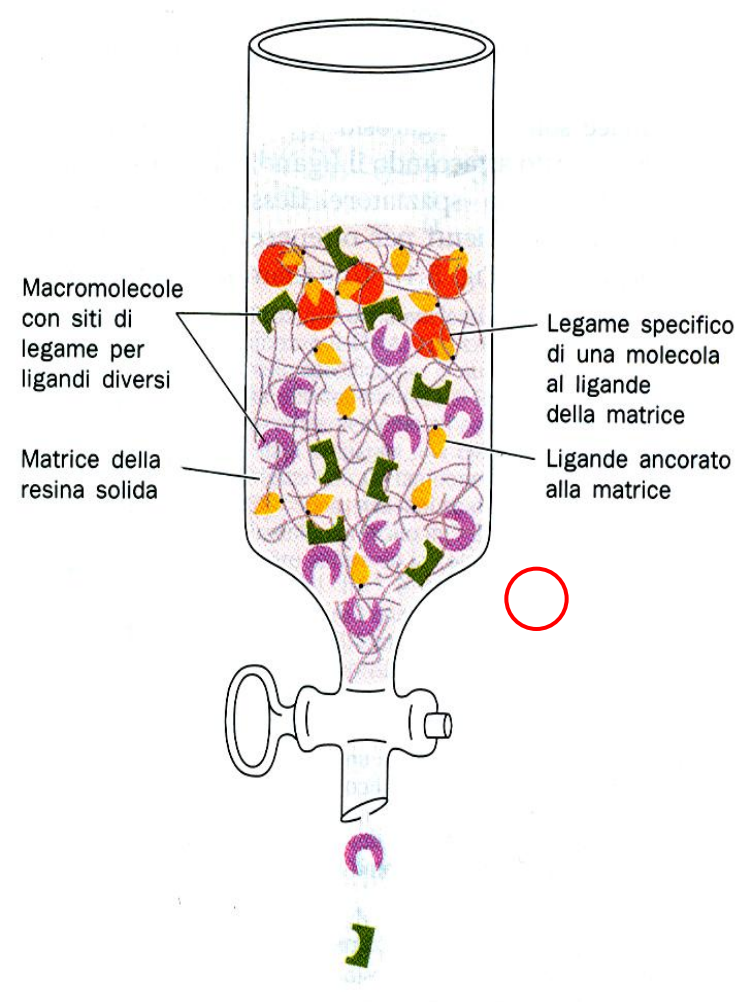
**Sfrutta l'attività biologica delle molecole**

**Sfrutta la capacità delle macromolecole di interagire con determinati ligandi**

Antigene-anticorpo  
Ormone-recettore  
Enzima-substrato.

Sono richieste conoscenze preliminari della specificità biologica della proteina da purificare

Purificazione assoluta anche a partire da miscele complesse in un unico step



## Fase stazionaria:

Solido derivatizzato in superficie con “ligandi” in grado di legare solo la molecola in esame.

### Caratteristiche:

- Gruppi che legano il ligando covalentemente
- Stabile nelle condizioni di legame con il ligando
- Stabile nelle condizioni di eluizione del ligando

### Particelle sferiche e rigide

destrano (Sephacryl S)

Agarosio ( Sepharose 4B, Bio-Gel A)

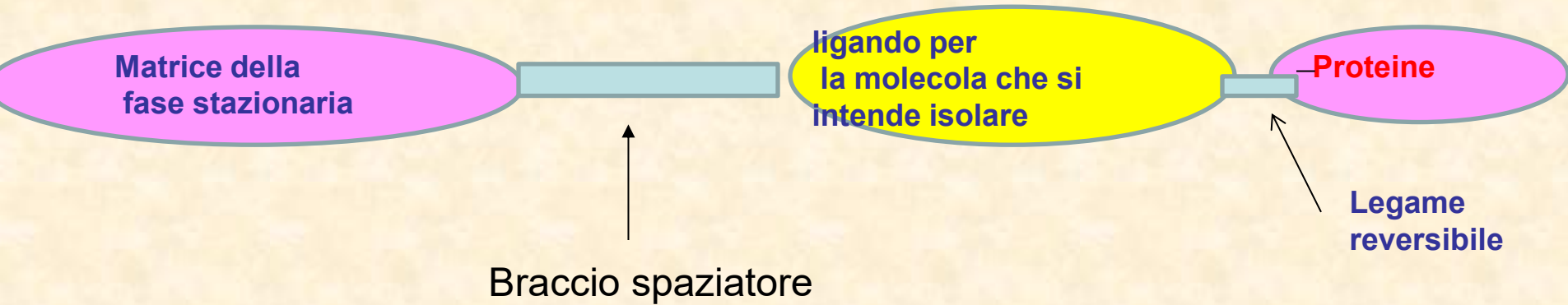
Poliacrilammide (Biogel-P)



**Attivate con un ligando**

## **Attivazione della matrice**

- **Bromuro di cianogeno (CNBr) a pH 11-12 (tossico)**
- **N-idrossisuccinammide (coniugare ligandi con gruppi amminici)**



## **Caratteristiche del braccio spaziatore:**

**-possiedono due gruppi funzionali, uno per la matrice e uno per il ligando**

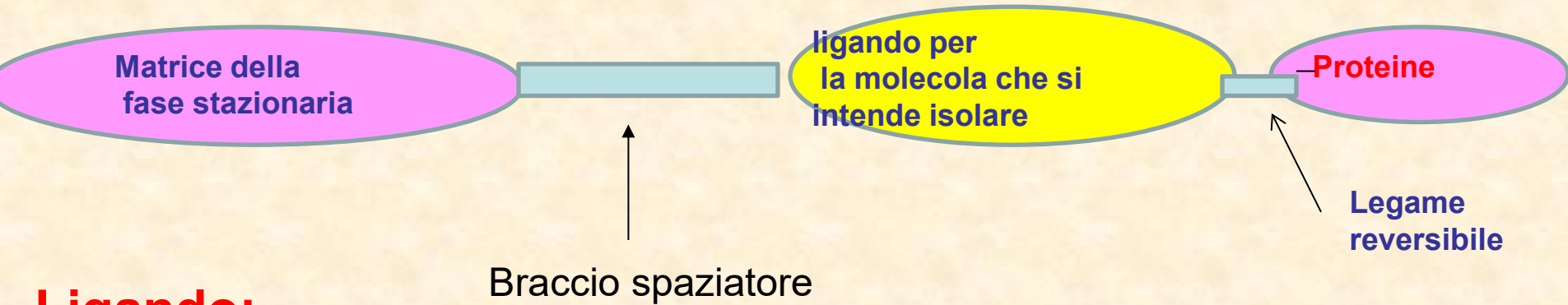
**(gruppi amminici, carbossilici, tiolici)**

**- Lunghezza di 6-8 atomi di carbonio**

## **Ligando:**

**1- specifico per la molecola da isolare**

**2- gruppo-specifici**



## Ligando:

1- specifico per la molecola da isolare

2- gruppo-specifici (nucleotidi, eparina)

# Eluizione non isocratica

L'eluizione della proteina legata può avvenire per competizione (aggiunta di ligando libero) o variando le condizioni di forza ionica o di pH o di temperatura

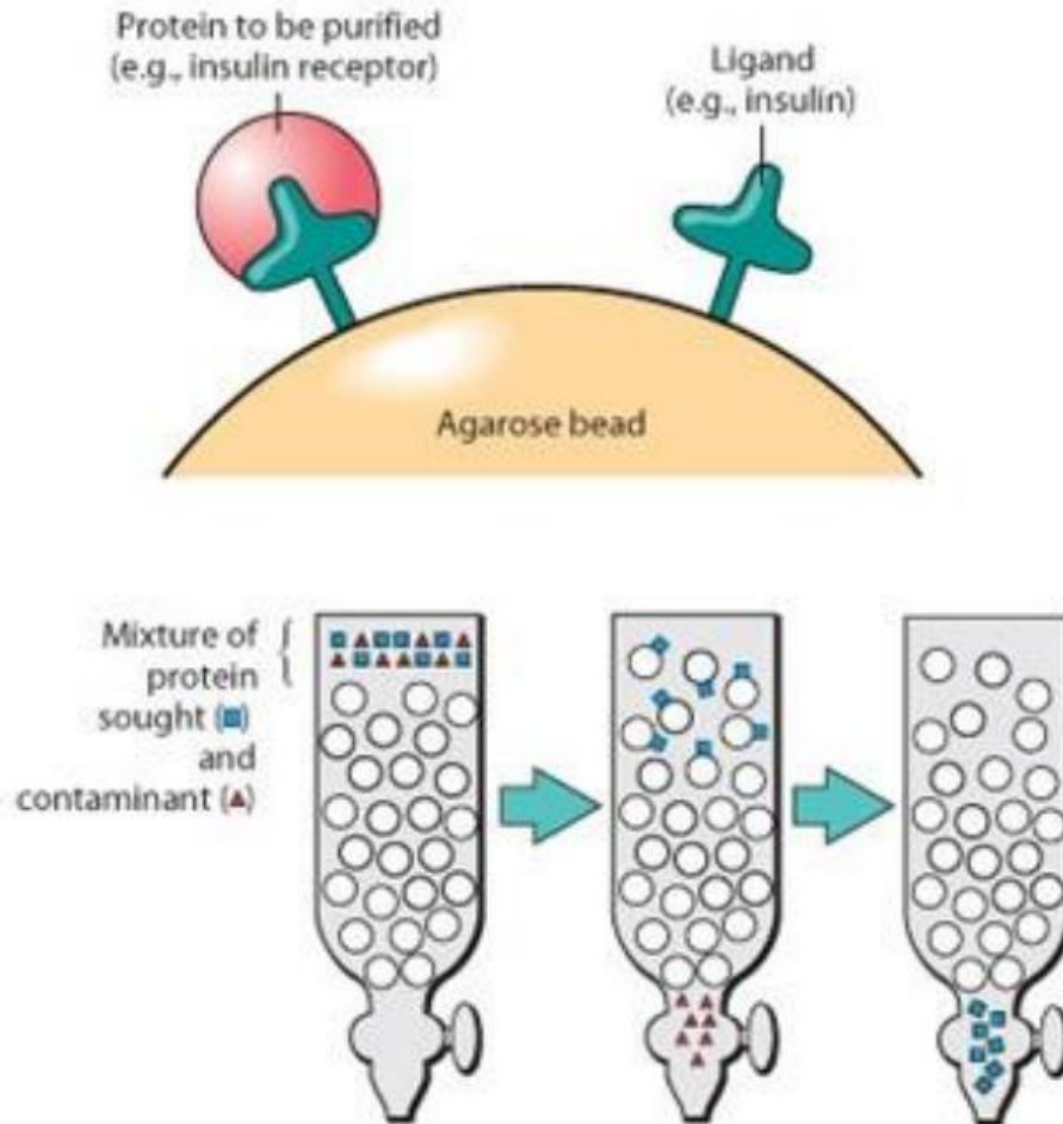
## Specifica

- Alte concentrazioni di substrato o di un suo analogo
- Inibitori competitivi
- Ligandi ad alta affinità

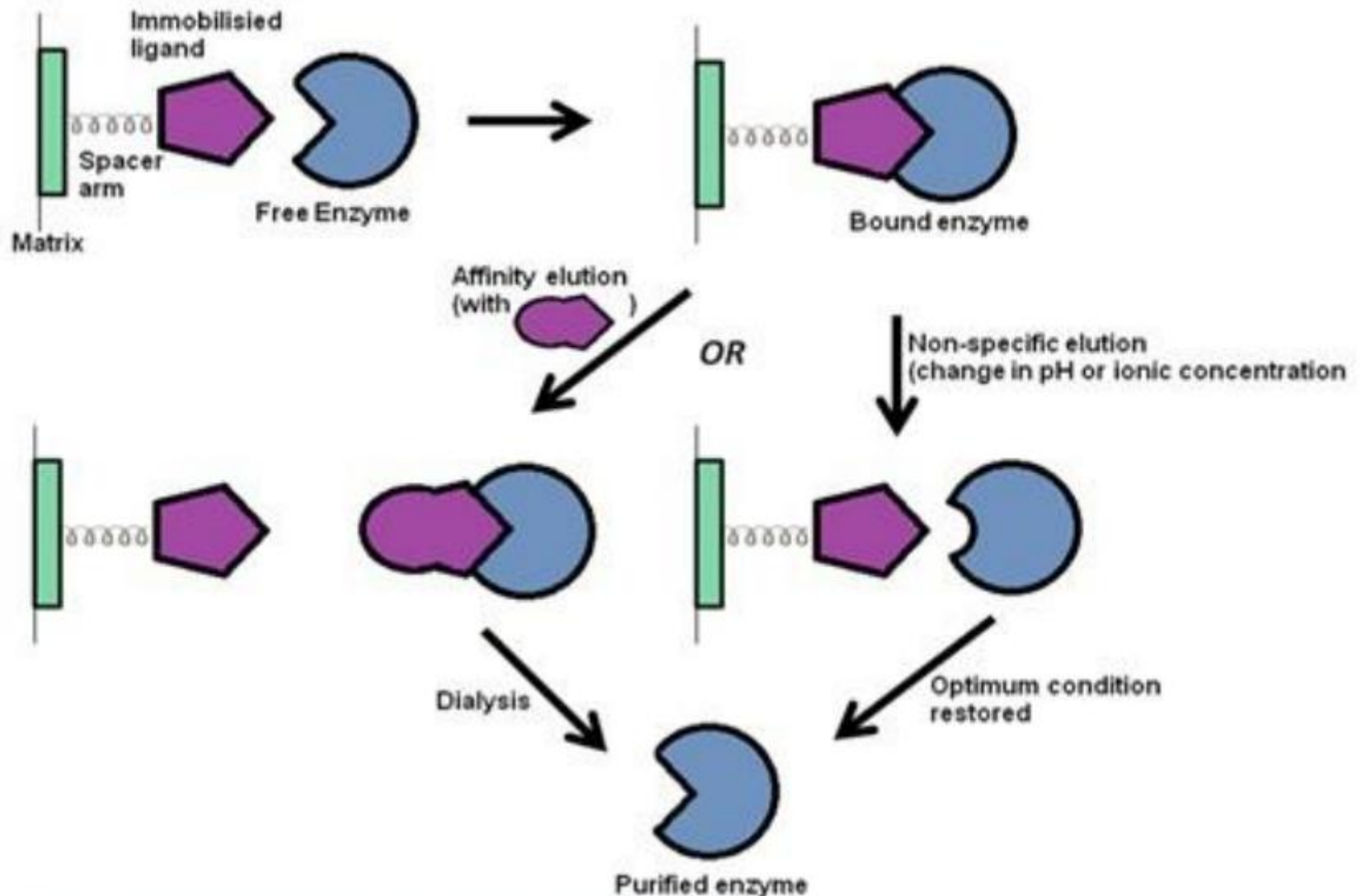
## Non specifica:

- variazioni di pH
- variazione di Forza ionica fino a NaCl 1M

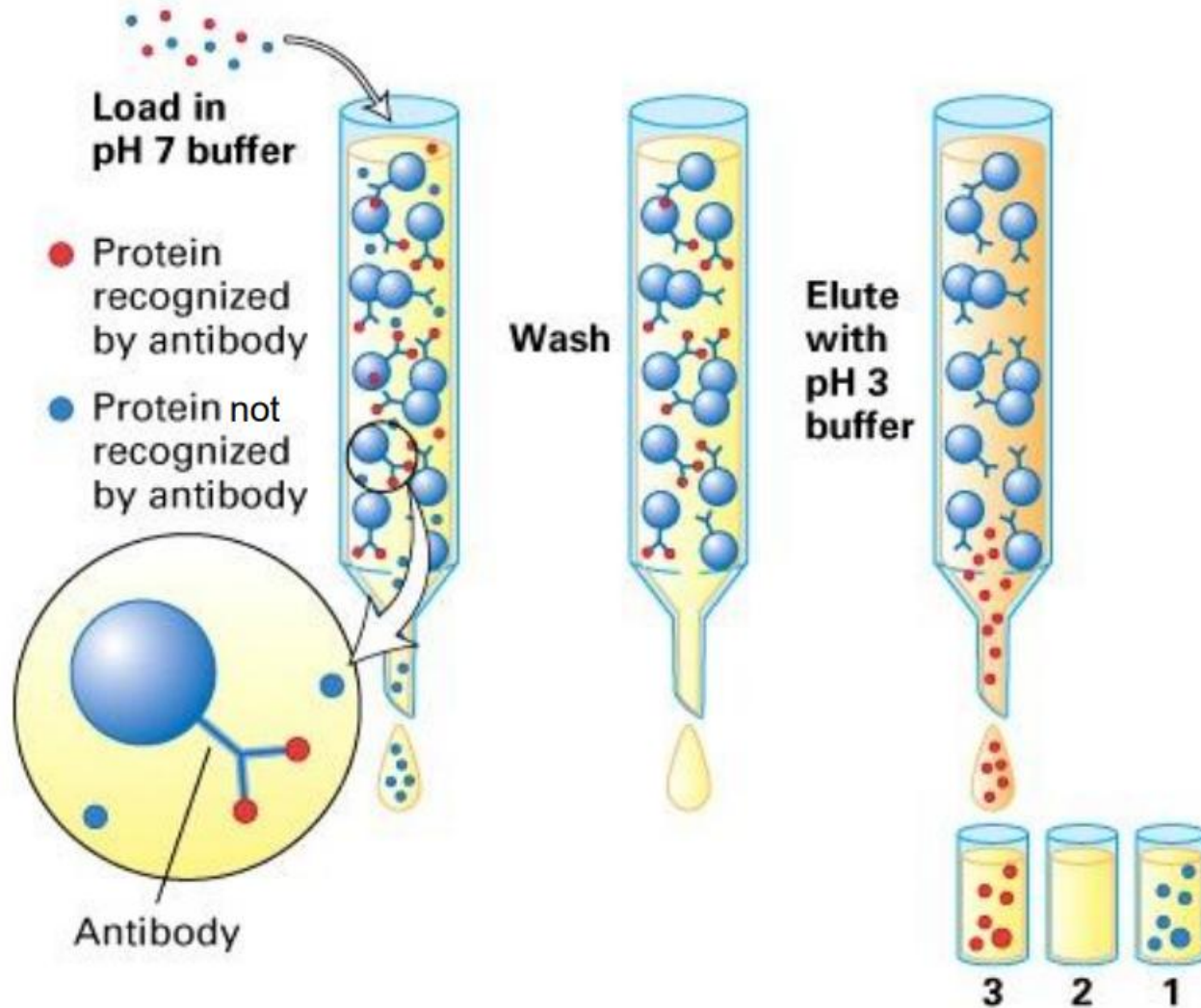
# Recettore Insulina



# Purificazione enzima



# Purificazione di un antigene



# TECNICHE CROMATOGRAFICHE

**TECNICHE** che permettono la **SEPARAZIONE** dei componenti di una miscela a seguito della loro interazione con due fasi: **FASE MOBILE** e **FASE STAZIONARIA**

in **MODALITA' ANALITICA**: - **STRATO SOTTILE** (TLC thin layer chromatography)  
- **CARTA**

in **MODALITA' SIA ANALITICA CHE PREPARATIVA**: **COLONNA**

a basse pressioni **LPLC**: low pressure liquid chromatography

a medie pressioni **MPLC**: medium pressure

**ad alte pressioni HPLC**: high pressure > 50 bar

(1 atm = 1 Bar = 14.7 psi)

> 50 bar > 50 atm

800 psi



## FPLC

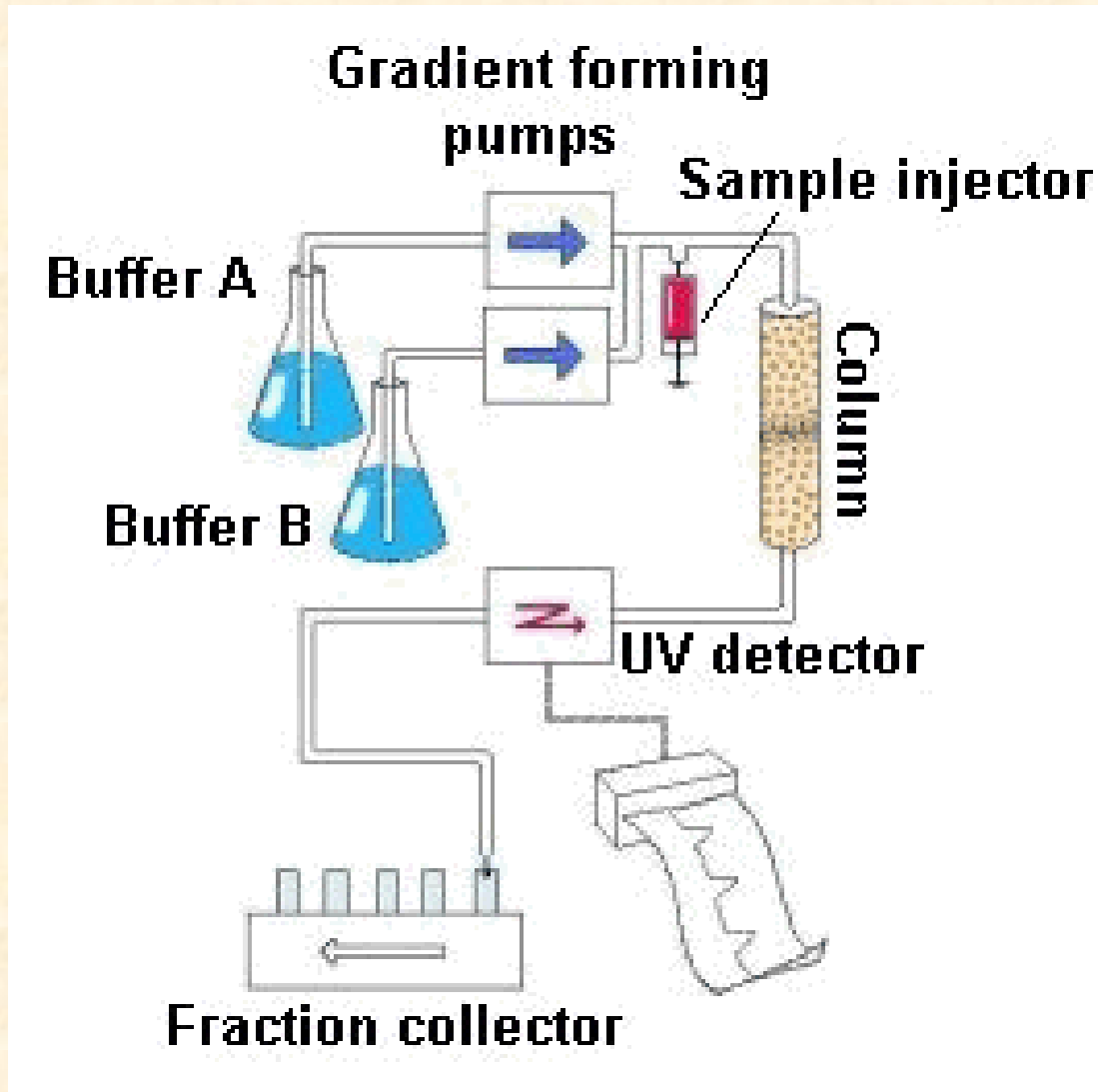
### Fast Pressure Liquid Chromatography

- 0-600 psi (pressione)
- 1-8 mL (flusso)
- Buffer acquosi e salini



(1 atm = 1 Bar = 14.7 psi)

# SISTEMA CROMATOGRAFICO



**HPLC = HIGH PRESSURE LIQUID CROMATOGRAPHY**

**HPLC = HIGH PERFORMANCE LIQUID CROMATOGRAPHY**

### **Fase stazionaria**

↓ **Diametro delle particelle (3-10  $\mu\text{m}$ ) anziché 150-200  $\mu\text{m}$**

↑ **Superficie disponibile per la separazione**

↑ **Risoluzione del sistema**

### **Fase mobile**

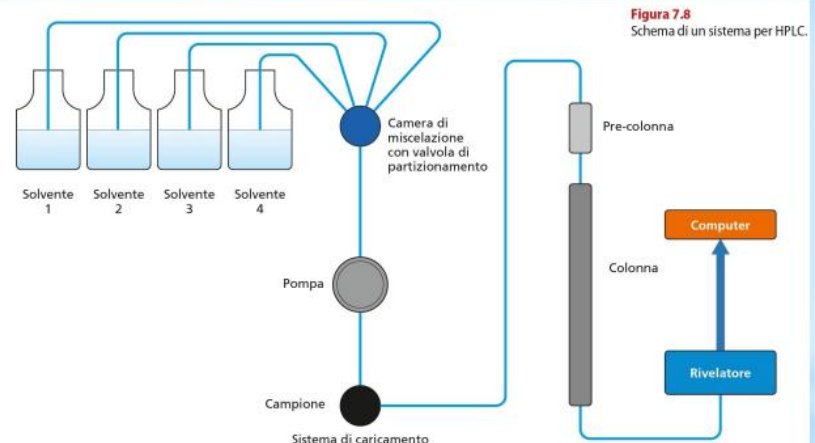
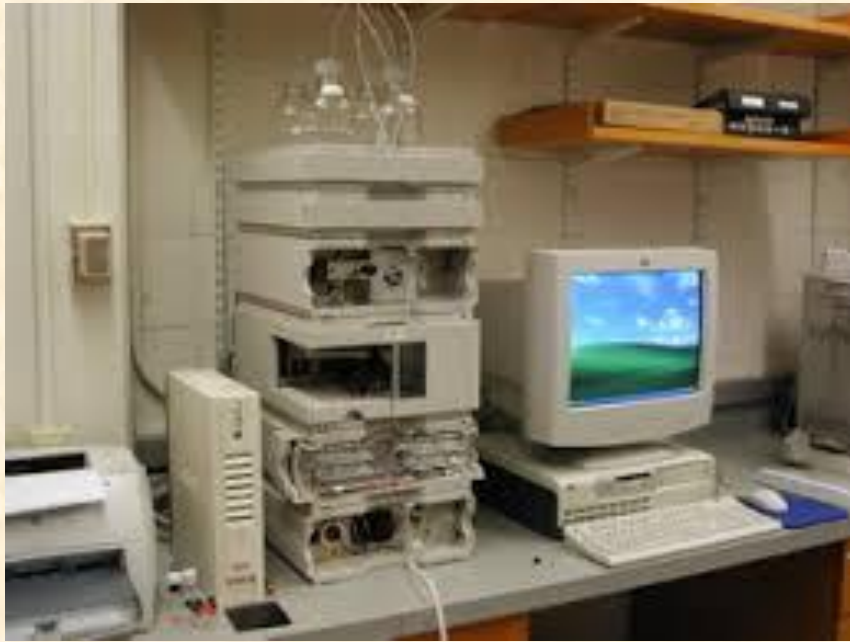
**Utilizzo di pompe in grado di generare una pressione che spinga la FM in colonna.**

**La Fase stazionaria utilizzata non deve venire danneggiata dalle alte pressioni utilizzate:  
utilizzo di FS resistenti alle elevate pressioni.**

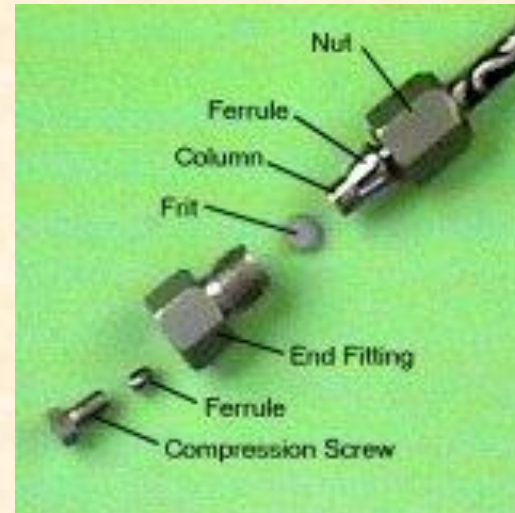
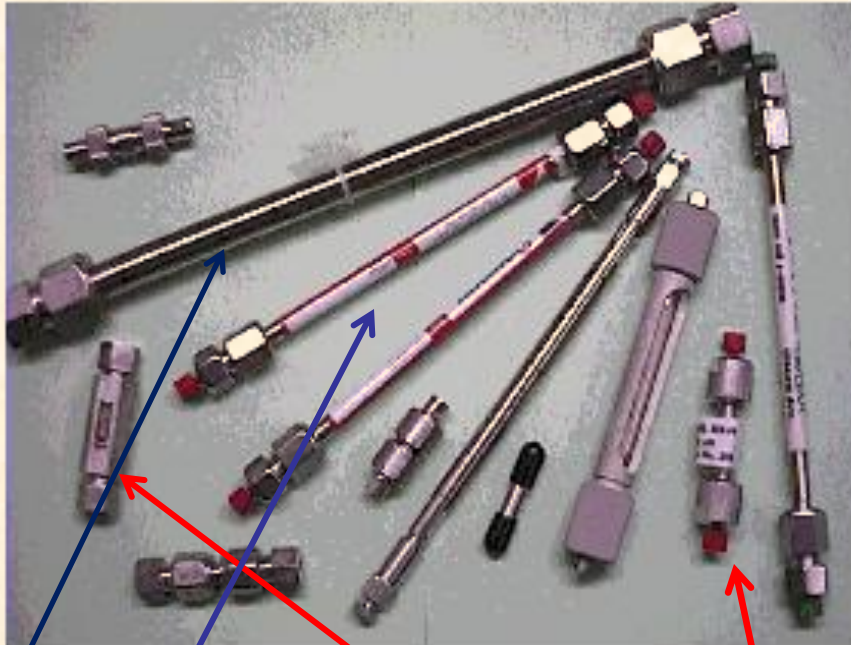
## Un cromatografo HPLC è costituito dalle seguenti parti:

- **Riserva di solventi:** uno o più solventi che possono essere utilizzati singolarmente o in miscela;
- **Pompa:** con pressione fino a 400 atm e flusso stabile tra 0.1 e 10 ml/min;
- **Sistema di iniezione:** costituito da una valvola a più vie e da un circuito a volume fisso (o loop) nel quale mettere il campione;
- **Colonna cromatografica (ed eventuale precolonna);**
- **Rivelatore** per monitorare gli eluati;
- **PC** per gestire il sistema e i dati.

43



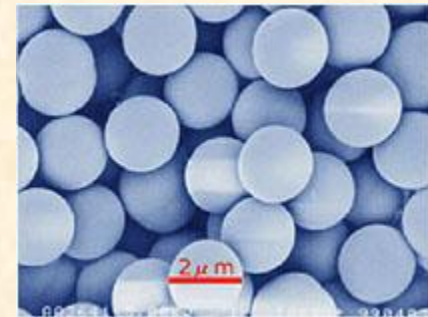
# Colonne per HPLC

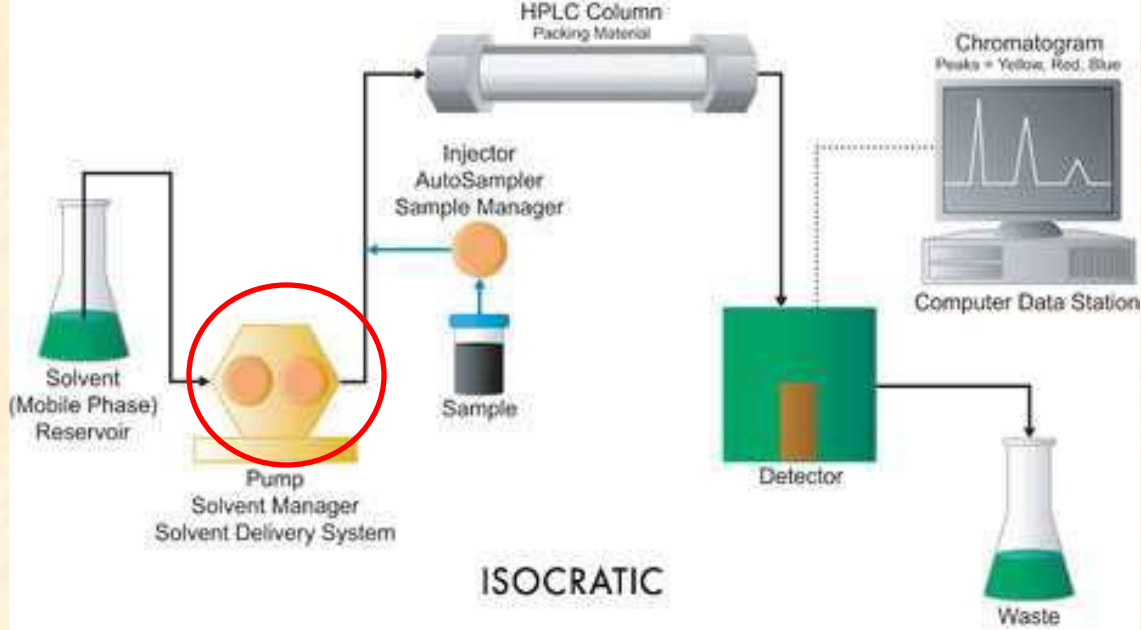


Colonne Cromatografiche x HPLC:  
in acciaio inossidabile (pressioni elevate: sino a  $5 \times 10^7$  Pa  $\sim$  500 bar)  
Lunghezza: 20-50 cm  
Diametro: 1-4 mm x scopi analitici  
sino a 25 mm x scopi prep

Tubi di connessione:  
Acciaio  
PEEK

Pre-colonne : in testa alla colonna può essere montata una piccola colonna dello stesso diametro, impaccata con la stessa FS x trattenere i contaminanti

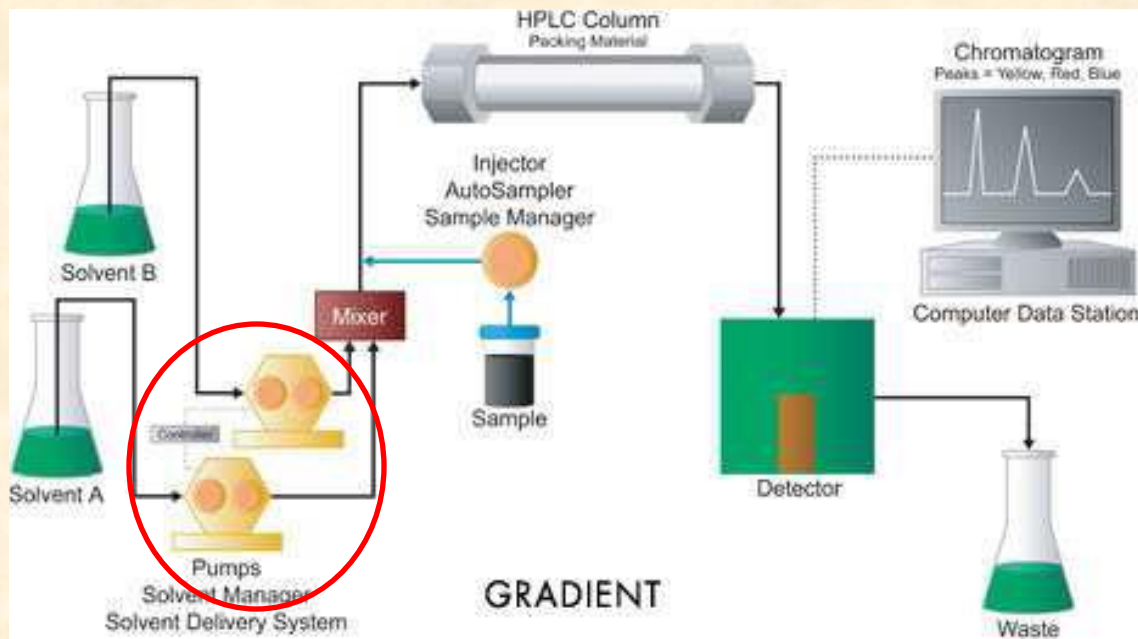




ELUZIONE:

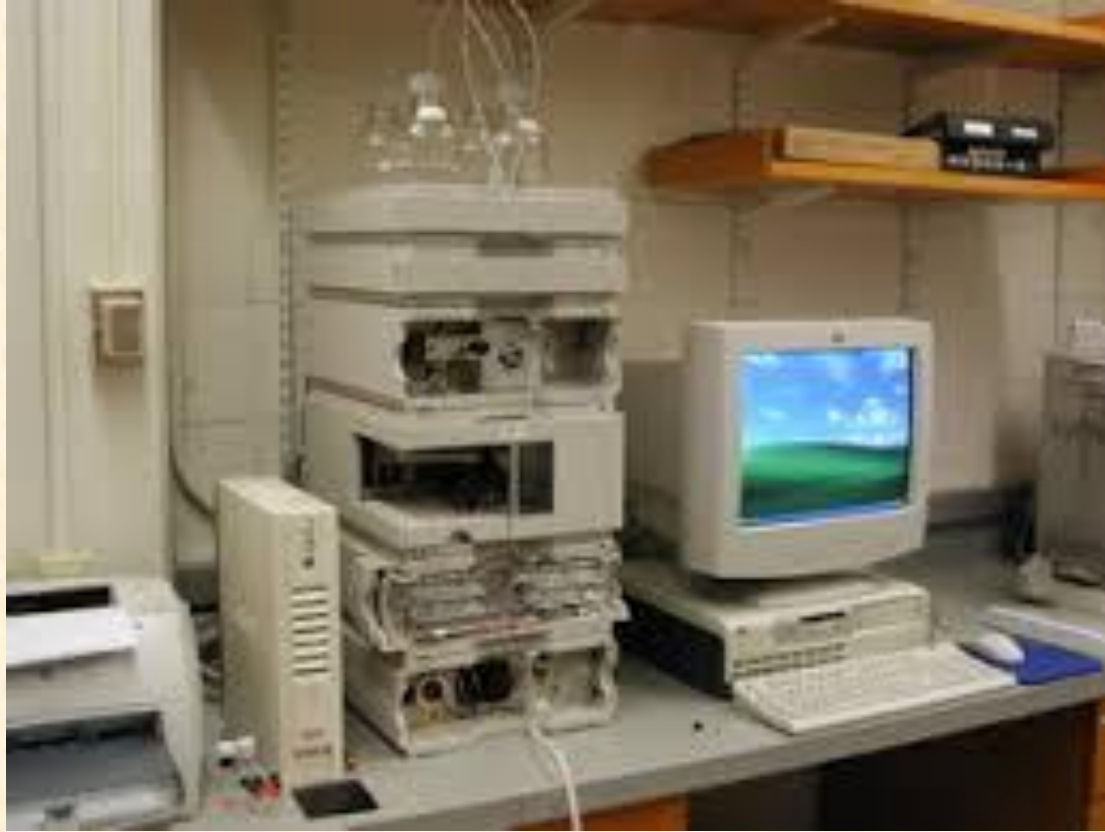
raramente ISOCRATICA

quasi sempre IN GRADIENTE (tra due differenti solventi) → 2 POMPE



Tubi di connessione:  
Acciaio  
PEEK

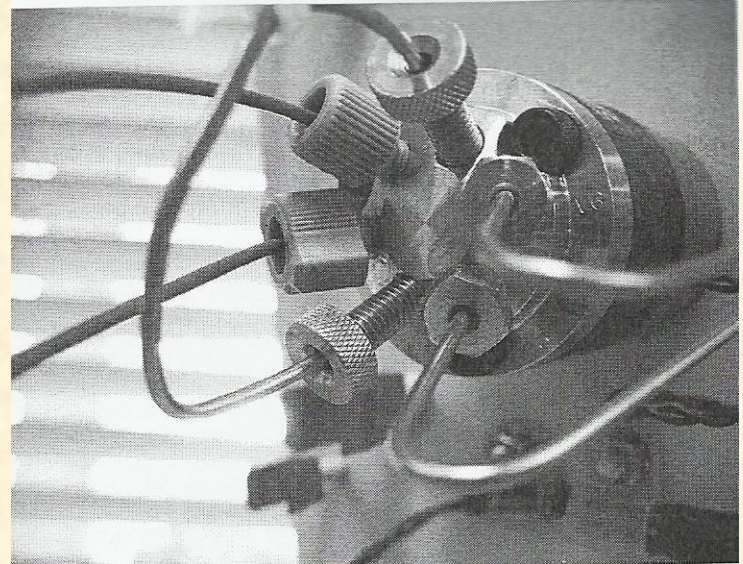
# Sistema HPLC



## **FASE MOBILE:**

- Solventi ad elevato grado di purezza
- Filtrati (1-5  $\mu\text{m}$  filtro)
- Degasati ( p.es. flusso di Elio, vuoto, ultrasuoni)

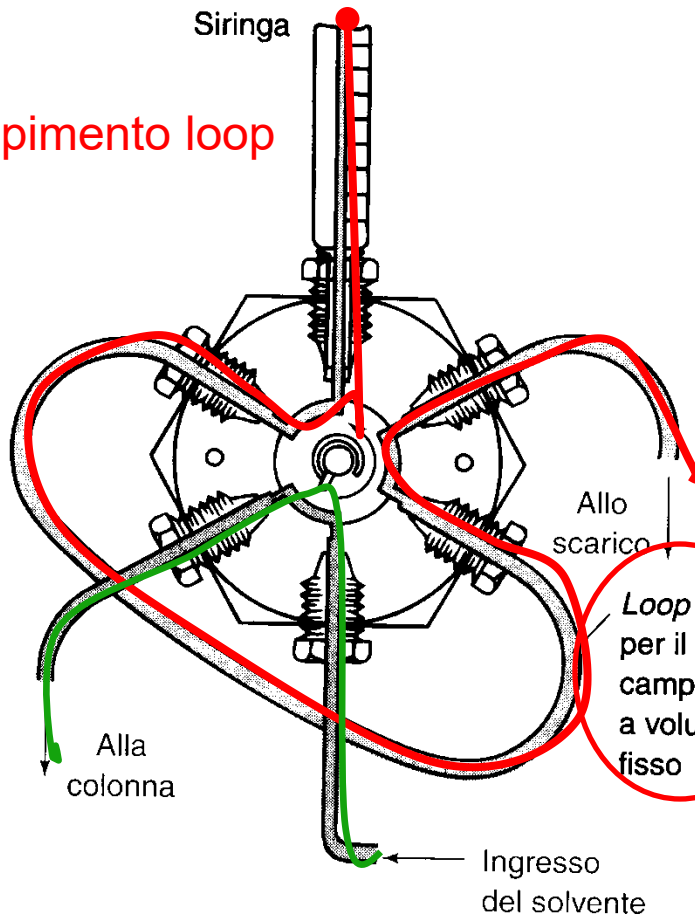
# INIETTORE



## Valvola di iniezione

Il campione viene immesso in colonna dal loop senza interrompere il flusso di FM in colonna

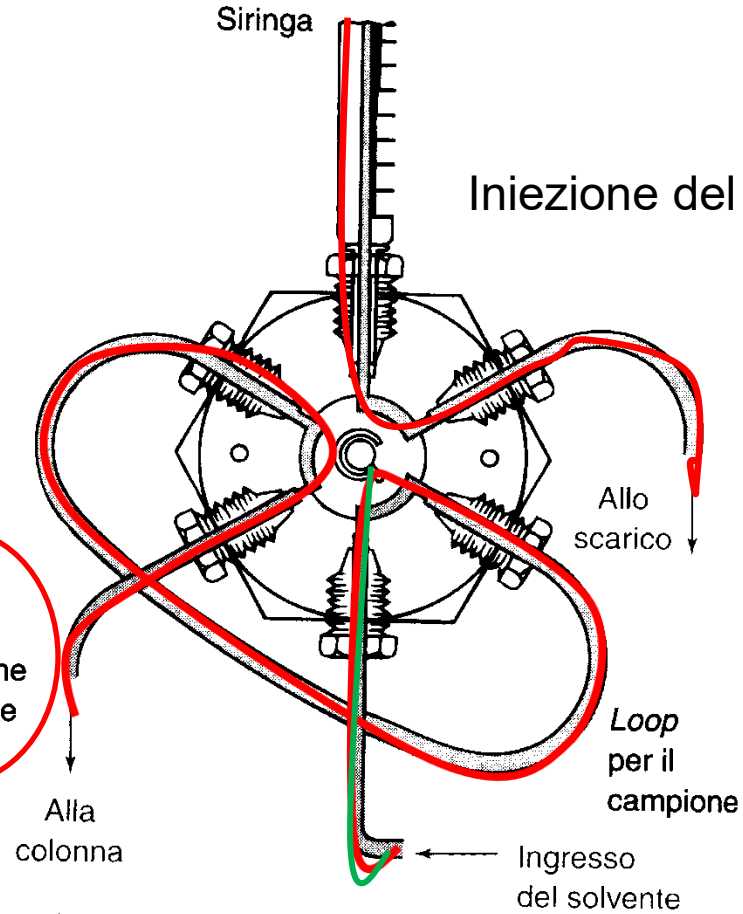
Riempimento loop



Posizione di caricamento

(a)

Iniezione del campione



Posizione di iniezione

(b)

Dal momento che vengono utilizzati dei volumi molto piccoli, i metodi di rivelamento devono essere molto sensibili e sono scelti in base alle singole esigenze:

- Rilevatore spettrofotometrico UV/visibile;
- Rilevatore a indice di rifrazione (RI);
- Rilevatore a fluorescenza;
- Spettrofotometro di massa.

## HPLC: caratteristiche

- ❖ Fase stazionaria costituita da particelle molto piccole 3 - 10  $\mu\text{m}$
- ❖ Colonne di piccolo diametro 2 - 5 mm
- ❖ Pressioni di ingresso elevate
- ❖ Precisione nell'introduzione del campione
- ❖ Portata della fase mobile controllata
- ❖ Rivelatori in linea



**Elevata risoluzione  
Analisi rapide**

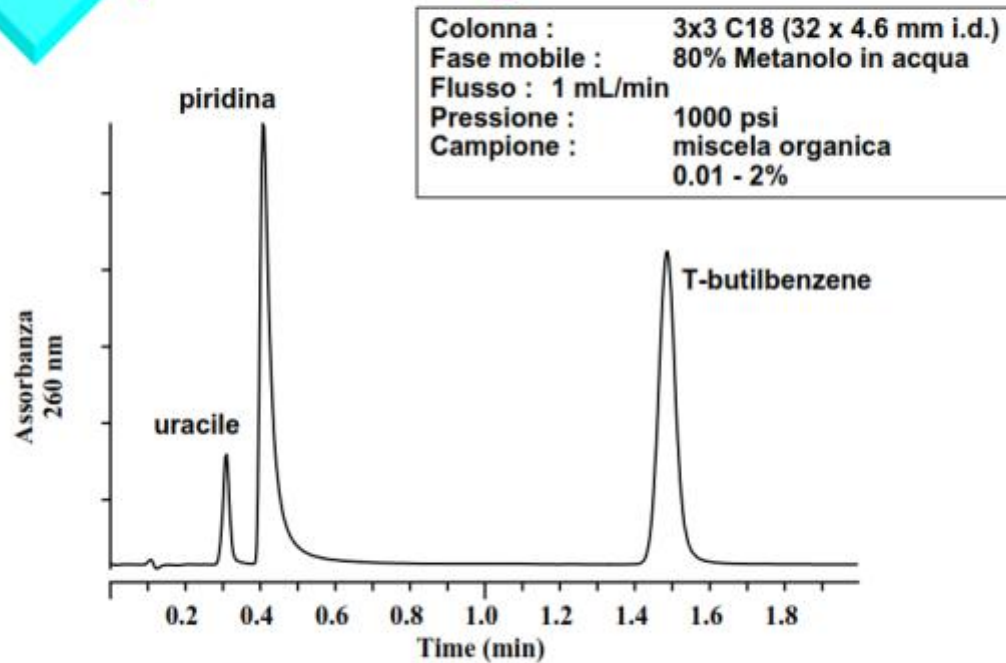
*NB: L'HPLC non è un metodo di separazione nuovo rispetto a quelli già illustrati, ma solo un sistema più sofisticato per sfruttare gli stessi principi al fine di ottenere prestazioni molto più elevate.*

## HPLC Vantaggi



- ❖ **Rapidità e precisione in analisi quantitative**
  - Tipico tempo di analisi di 5 - 20 min.
  - Precisione RSD < 0.5 - 1%
- ❖ **Analisi automatizzate**
  - Usando autocampionatori ed elaboratori di dati
- ❖ **Alta sensibilità**
  - Limite di rivelabilità (LOD) di ng a pg
- ❖ **Recupero del campione quantitativo**
  - Tecniche preparative da  $\mu\text{g}$  a g
- ❖ **Adatta a diversi tipi di campioni**
  - Può analizzare > 60% di tutti i composti vs. 15% della GC

## Esempio di cromatogramma HPLC



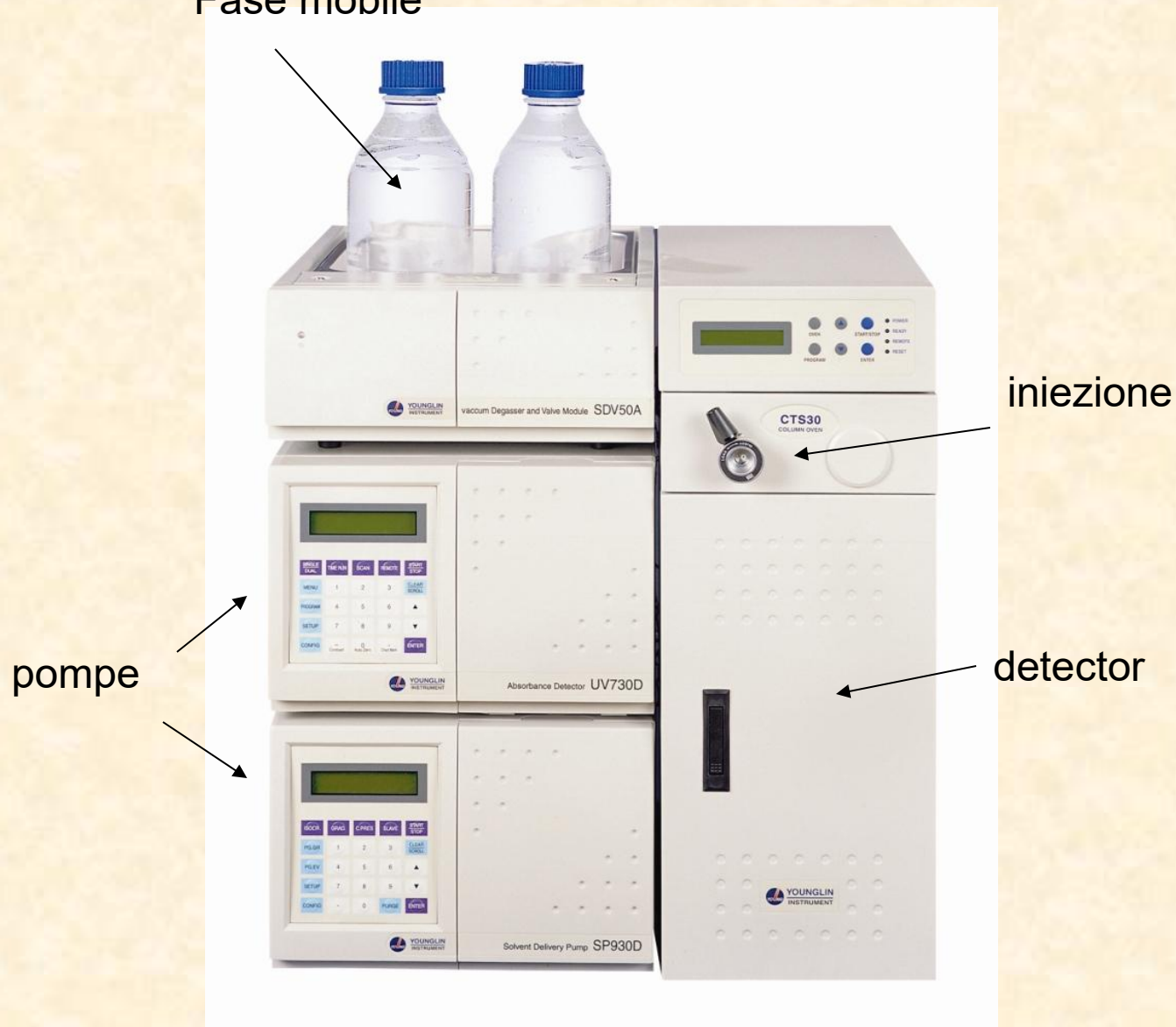
## High-Performance Liquid Chromatography ( HPLC )

### Caratteristiche Generali :

1. alta risoluzione e possibilità di eseguire analisi in tempi molto brevi rispetto alle tecniche classiche.
2. le colonne per l'HPLC possono essere usate diverse volte senza bisogno di riimpaccarle o rigenerarle.
3. alta riproducibilità
4. strumentazione automatizzata
5. adattabilità a tutti i tipi di cromatografia

**IMPORTANTE!!!!!!**

Fase mobile

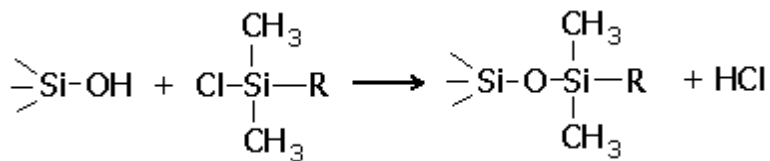


[https://www.youtube.com/watch?v=Nho\\_zV-Pjbs](https://www.youtube.com/watch?v=Nho_zV-Pjbs)

<https://www.youtube.com/watch?v=V2jz3m310kk>

<https://www.youtube.com/watch?v=f50BE4oGJNQ>

<https://www.youtube.com/watch?v=e0rA6e4WHrw>



### **crom. liquida in fase normale**

*fase stazionaria* polare

alchilammina legata alla silice

Fase mobile (esano)

Eluizione in gradiente a polarità crescente

Serie eluotropica (solventi a polarità crescente): esano, cicloesano, triclorometano, diclorometano, tetraidrofurano, acetonitrile, etanolo, metanolo, acqua

Eccellente per separazione di analiti non polari

### **crom liquida in fase inversa**

*fase stazionaria* apolare

butile (C4), ottile (C8), ottadecile (C18)

Fase mobile: acqua/metanolo o acqua/acetonitrile

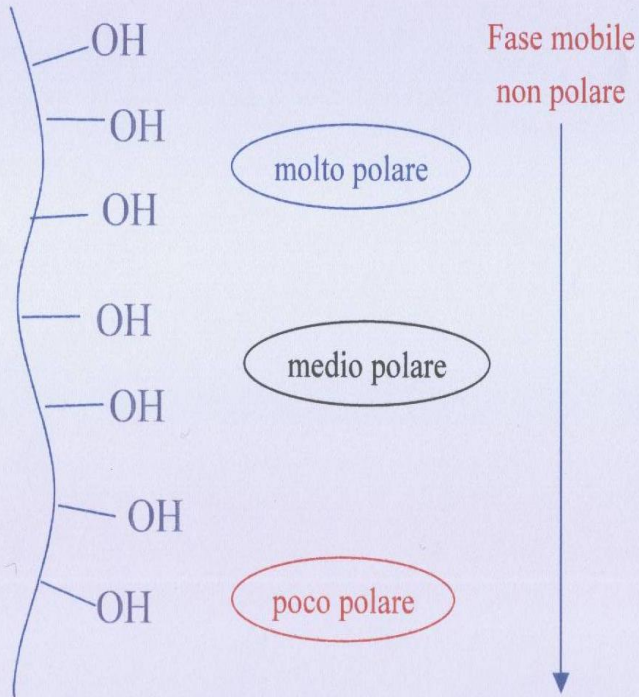
eluizioni in gradiente a polarità decrescente

ordine di eluizione: analiti in ordine di polarità decrescente

Per analiti polari  
(solubili in acqua),  
di media polarità,

## Cromatografia a fase normale

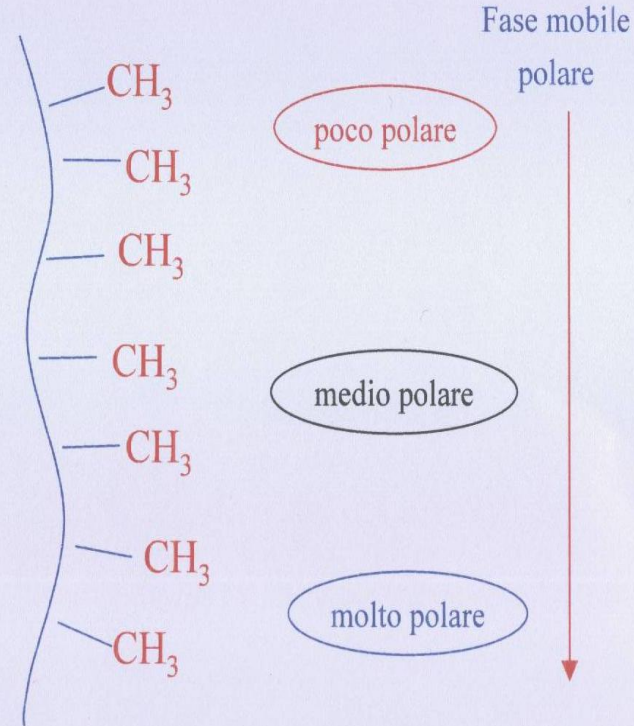
Il letto stazionario è polare, la fase mobile è non polare o meno polare



Eccellente per separazione di analiti non polari

## Cromatografia a fase inversa

Il letto stazionario è apolare, la fase mobile è polare o più polare



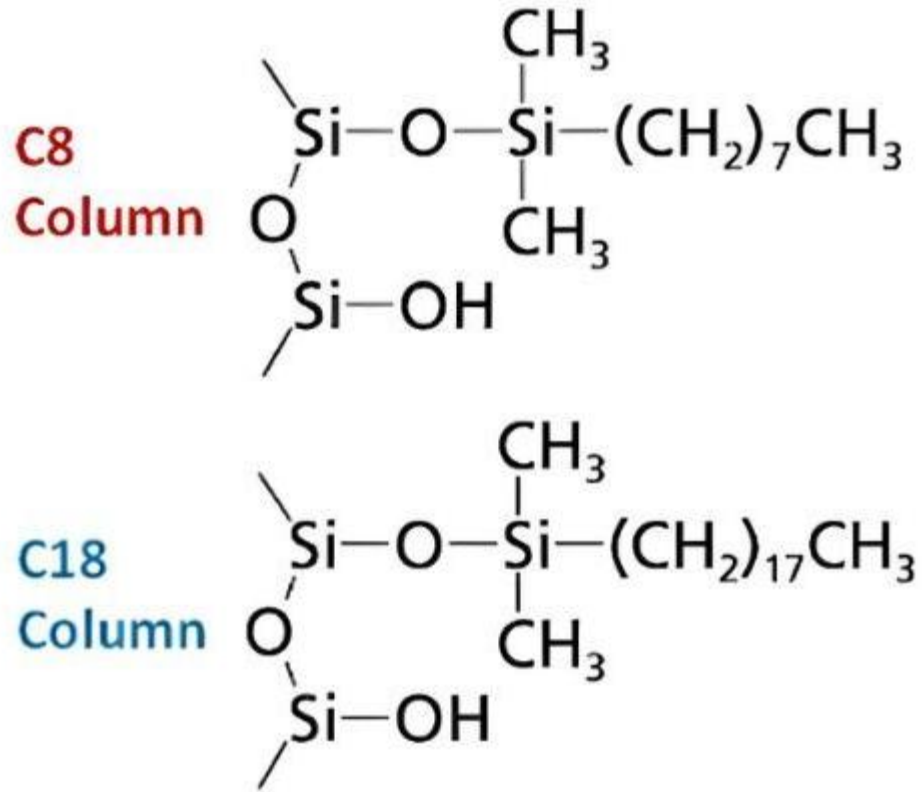
Per analiti polari (solubili in acqua), di media polarità,

# RP-HPLC

Fase stazionaria: matrice di silice

Gruppi butile (C4)  
ottile (C8)  
ottadecile (C18)

Legati chimicamente alla matrice



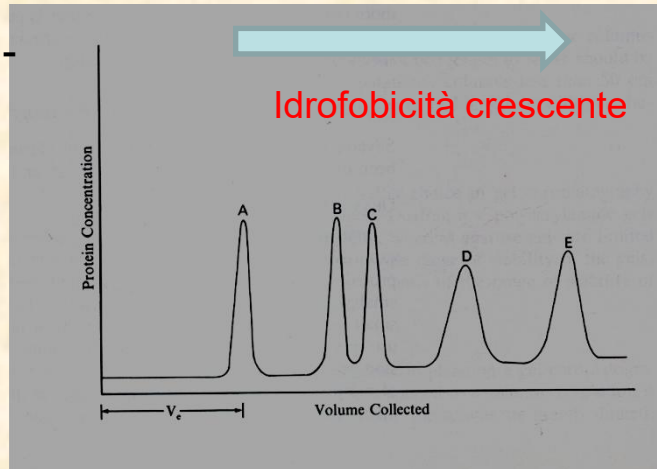
**Fase mobile: Acqua /metanolo acqua /acetonitrile (degasati)**

**Eluizione in gradiente con polarità decrescente si aumenta [acetonitrile] o [metanolo]**

- **Notevoli similitudini con cromatografia ad interazioni idrofobiche**
- **L'utilizzo di solventi organici e le elevate pressioni causano denaturazione**
- **È un ottimo sistema analitico di separazione**

## CROMATOGRAFIA x INTERAZIONI IDROFOBICHE

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

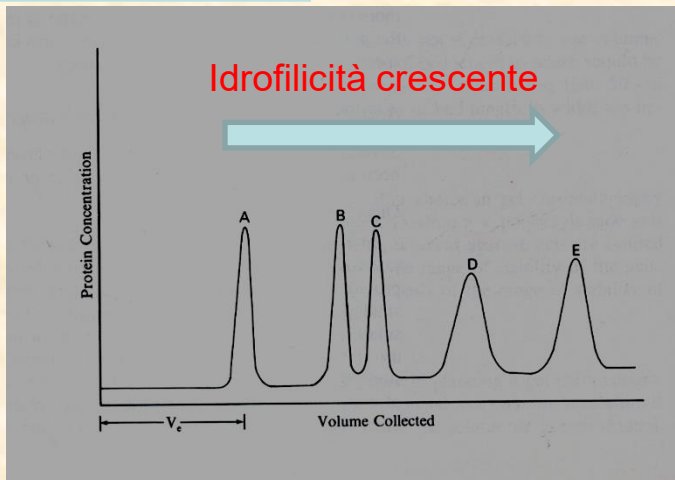


PROTEINA MENO IDROFOBICHE:

PROTEINA PIÙ IDROFOBICHE

NP-HPLC

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

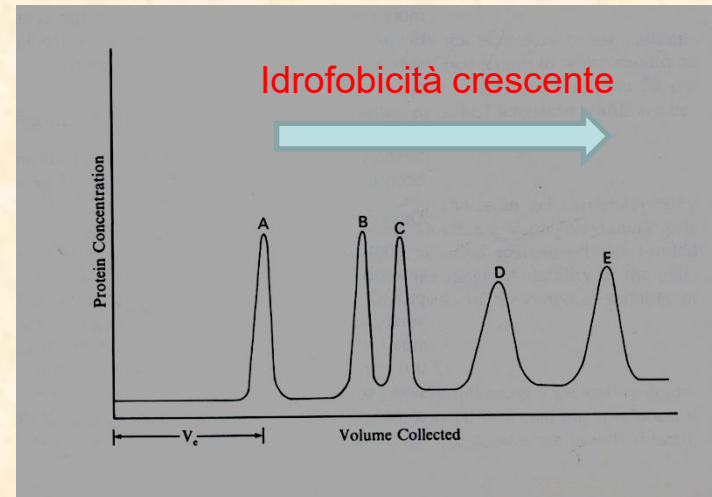


PROTEINA PIÙ IDROFOBICHE

PROTEINA MENO IDROFOBICHE:

RP-HPLC

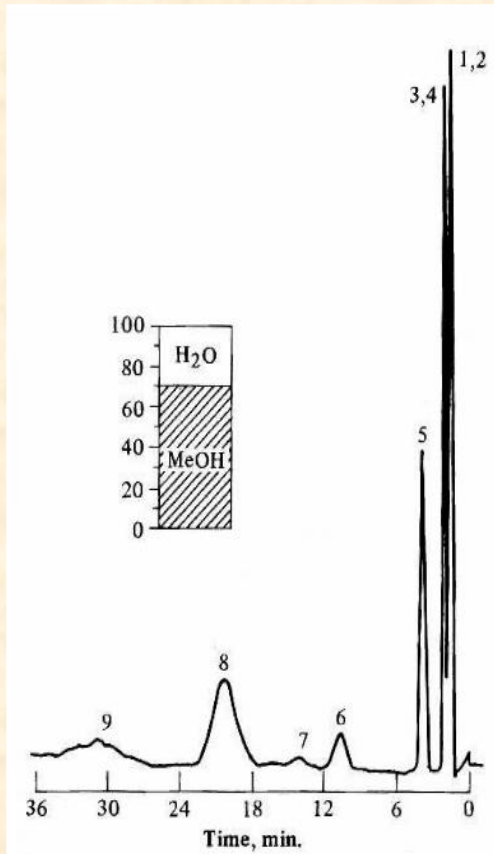
Fase stazionaria: **apolare**  
Fase mobile: **polare**



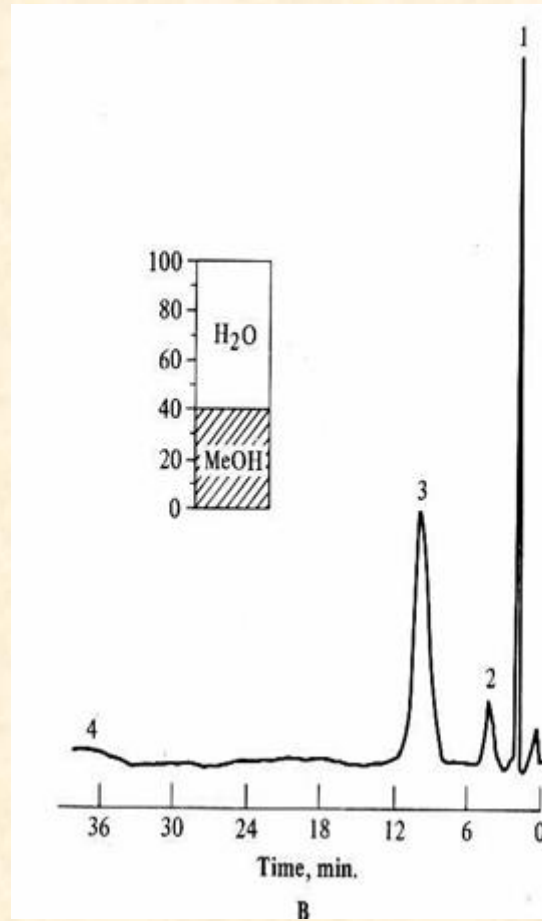
PROTEINA MENO IDROFOBICHE:

PROTEINA PIÙ IDROFOBICHE

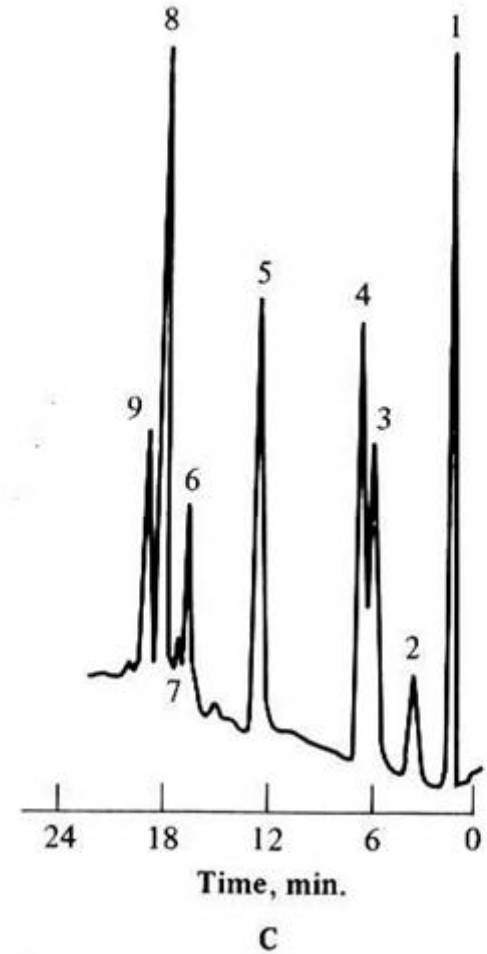
# Isocratica o gradiente?



isocratica  
(più forte)

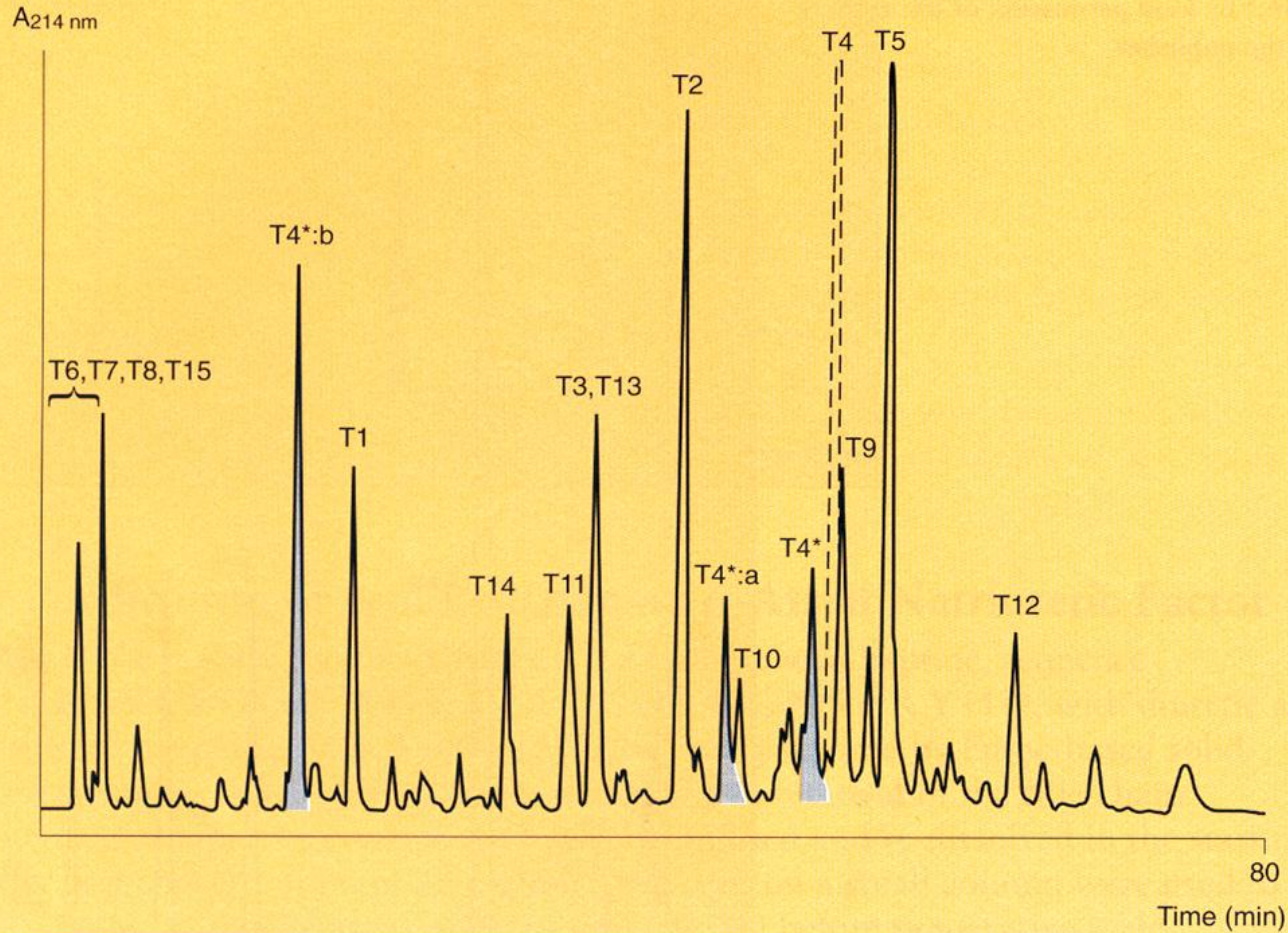


isocratica  
(meno forte)



gradiente

Sample: Tryptic digest of haemoglobin  
Column: PepRPC HR 5/5 (i.d. 5 mm, length 50 mm)  
Eluent A: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (49 mM, pH 2.9) in water  
Eluent B: 50% acetonitrile in Eluent A  
Gradient: 0-75% B in 80 min  
Flow rate: 0.5 ml/min;

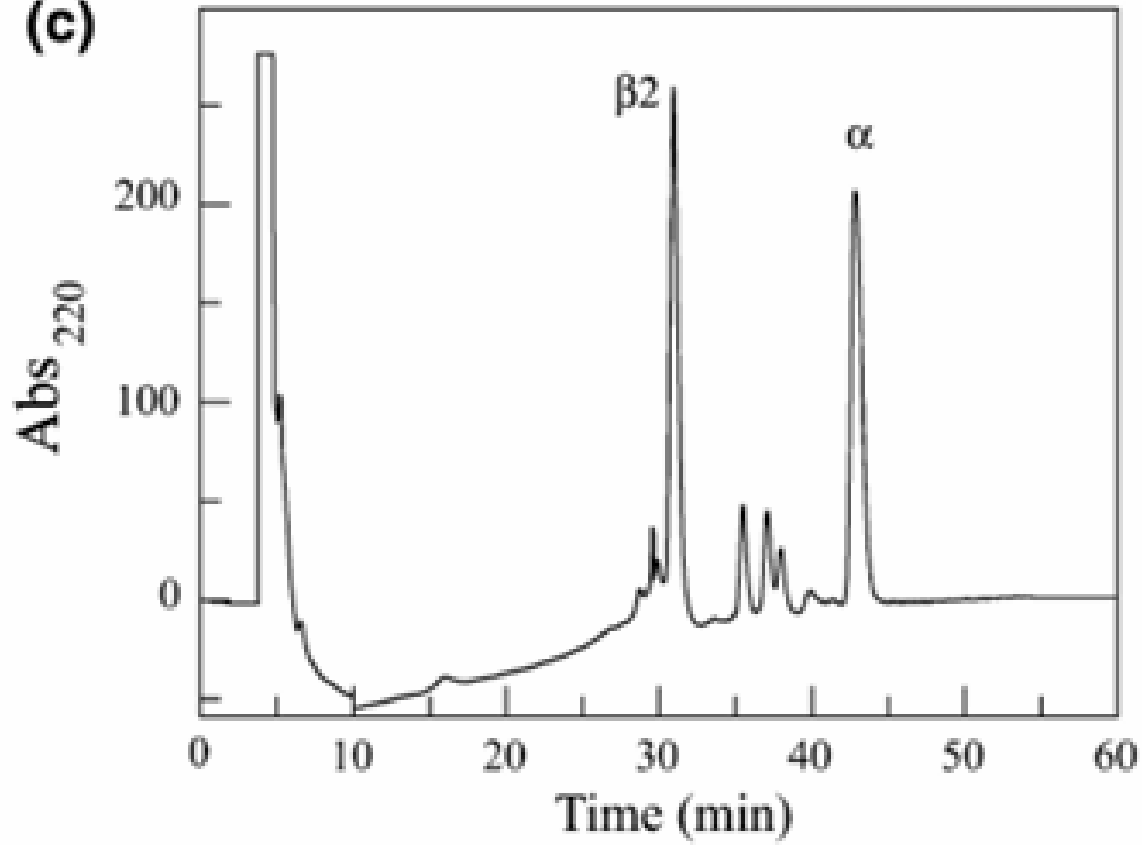


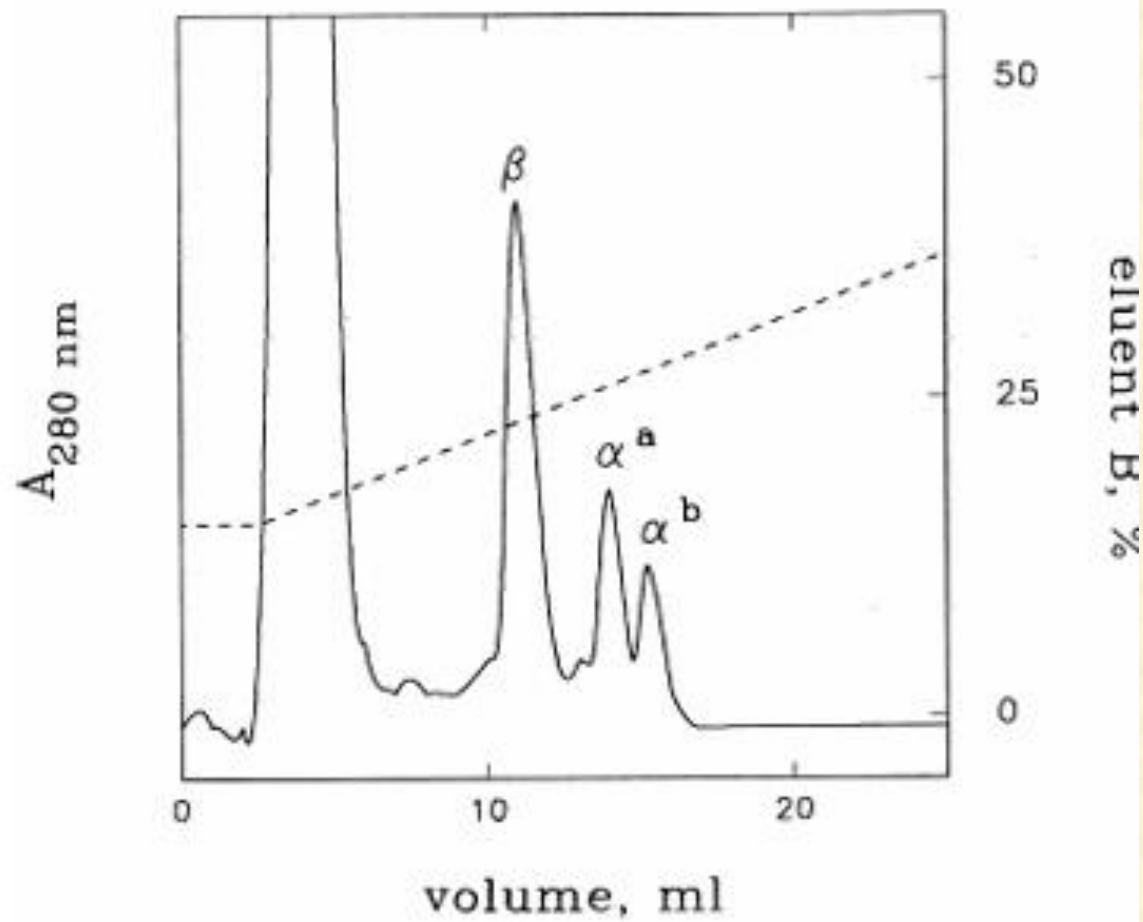
Picchi molto stretti=  
Alta efficienza

Fig. 41. Fractionation of a tryptic digest of  $\beta^*$ -chain. The hatched peaks correspond to the abnormal T4\* and related peptides. The elution position of the normal T4 peptide, obtained from a digest of the normal  $\beta$ -chain, is indicated by the broken line. (Jeppson et al. J. Chromatogr. 297 (1984) 31-36.)

By kind permission of the authors and the publisher.

(c)





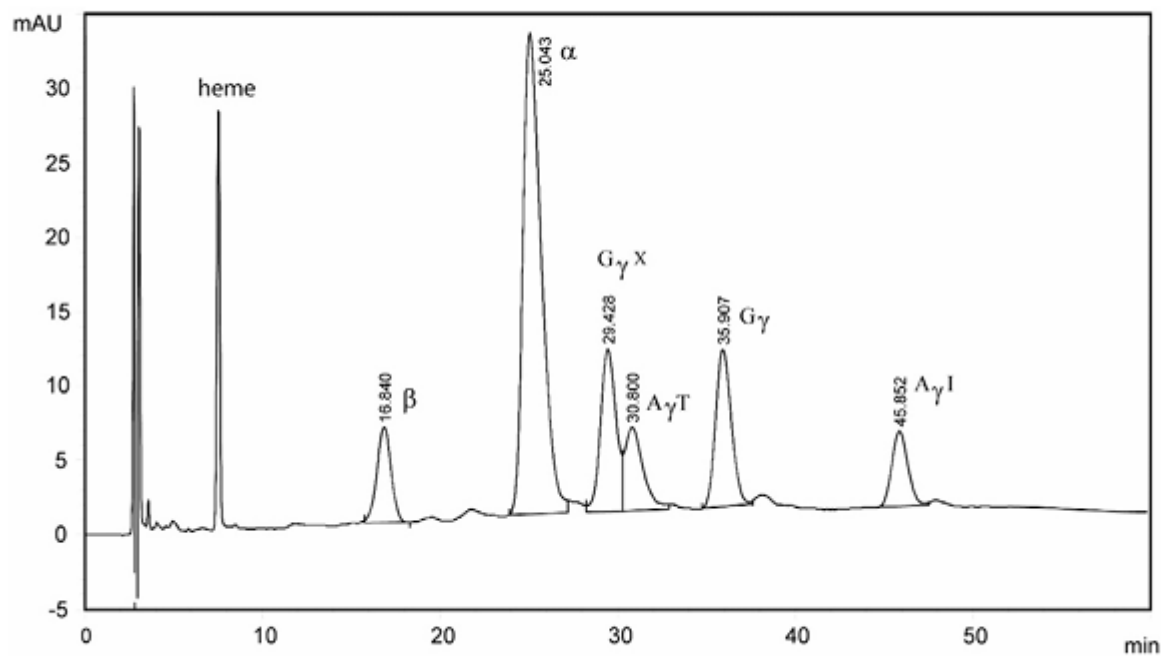


Fig. 3. Elution pattern of globin chains from proband's lysate obtained by RP-HPLC showing a decreased retention time of the abnormal G<sub>γ</sub> chain.

Fase Staz.	F. Mobile	Tipo di Cromatografia	Modalità
<b>Liquido</b>	<b>Liquido</b>	<b>Crom. di ripartizione in Fase normale (F.S polare-F.M. apolare)</b>	<b>su carta/TLC</b>
<b>Liquido</b>	<b>Liquido</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Crom. di ripartizione in Fase normale (F.S polare-F.M. apolare)</li> <li>•Crom. di ripartizione in Fase inversa (F.S. apolare-F.M. polare)</li> </ul>	<b>HPLC</b>
<b>Liquido</b>	<b>Gas</b>	<b>Gas cromatografia</b>	<b>su colonna</b>
<b>Solido</b>	<b>Liquido</b>	<b>Crom. Interaz. Idrofobiche</b>	<b>su colonna</b>
<b>Solido</b>	<b>Liquido</b>	<b>Crom. a Scambio Ionico</b>	<b>su colonna</b>
<b>Solido</b>	<b>Liquido</b>	<b>Crom. di Affinità</b>	<b>su colonna</b>
<b>Gel</b>	<b>Liquido</b>	<b>Crom. per Filtraz Molecol</b>	<b>su colonna</b>