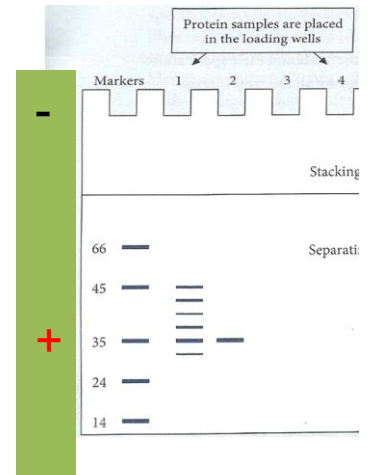


PROTOCOLLO di PURIFICAZIONE:

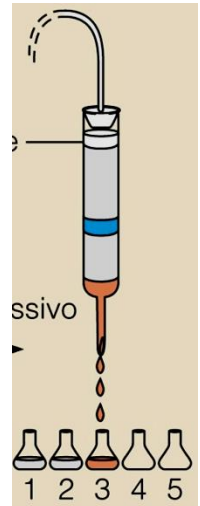
???

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 preparativo

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

Dalla matrice alla proteina purificata

Una sequenza di separazioni progressive aumenta la purezza della proteina d'interesse.



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'

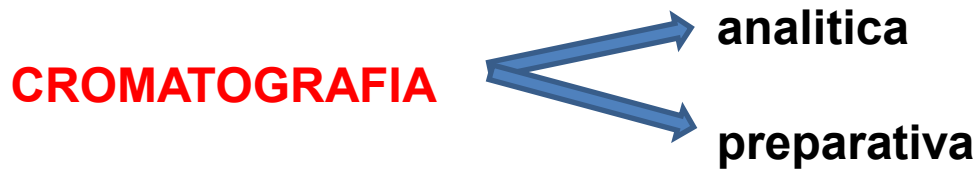
- MASSA MOLECOLARE

- CARICA ELETTRICA

- PROPRIETA' di ADSORBIMENTO

- AFFINITA' di LEGAME ad altre biomolecole

CROMATOGRAFIA



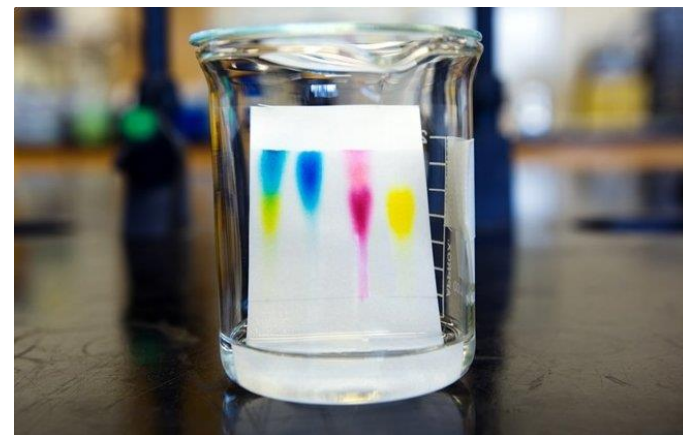
La cromatografia (dal greco χρῶμα, traslitterato in khrôma, "colore") è una tecnica di separazione dei componenti di una miscela basata sulla distribuzione dei suoi componenti tra **due fasi**, una stazionaria e una mobile che si muove lungo una direzione definita.

- **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**

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.

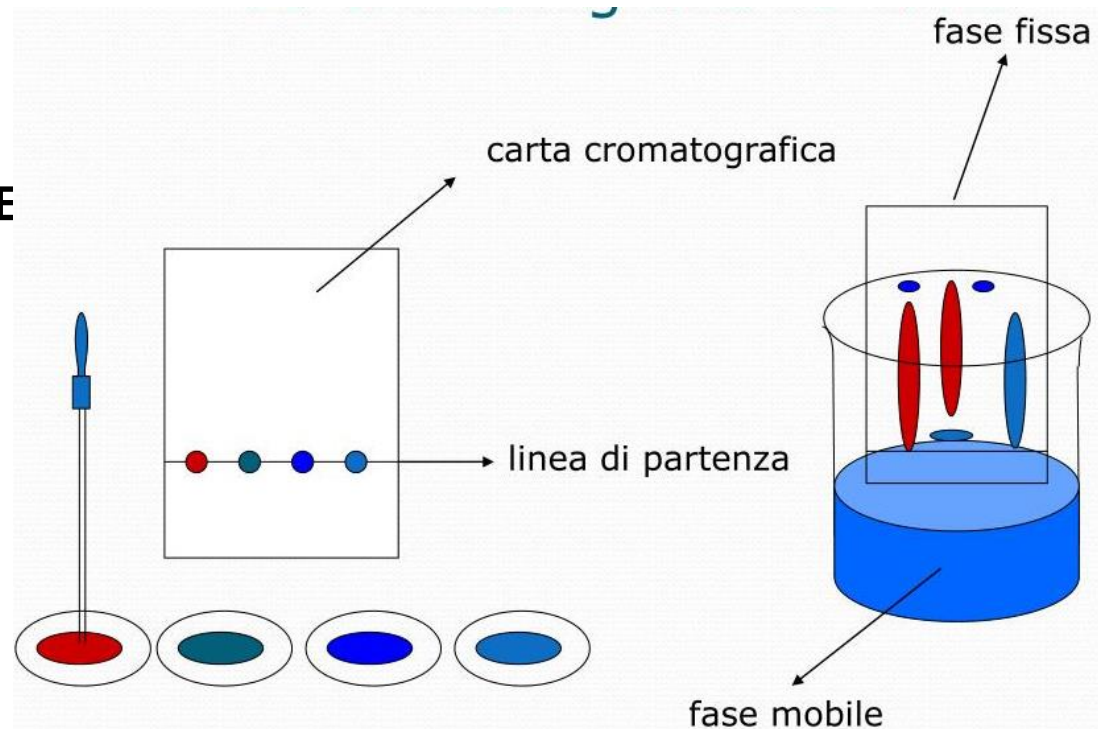
TECNICHE CROMATOGRAFICHE

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 CARTA in MODALITA' ANALITICA

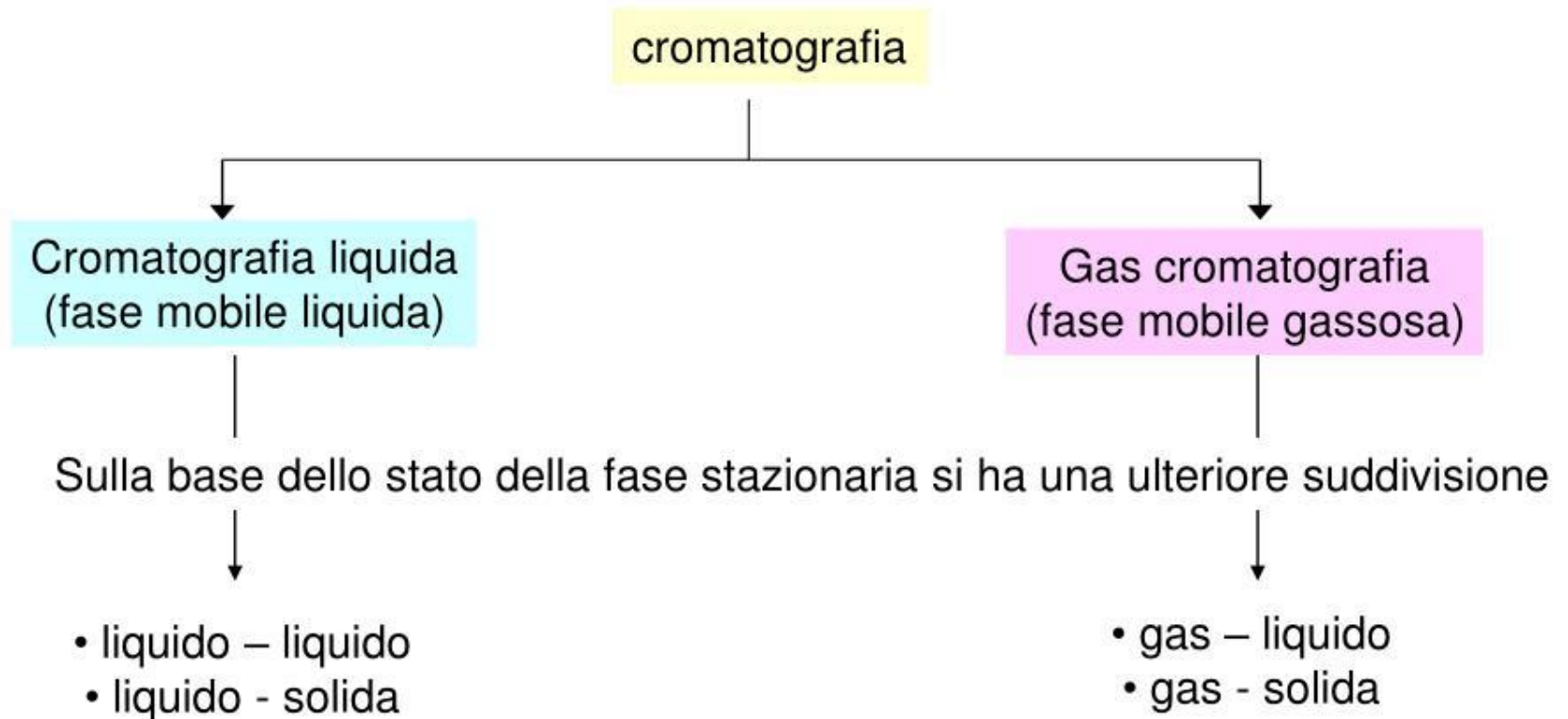
FASE STAZIONARIA: fibre di cellulosa

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



Classificazione dei metodi cromatografici

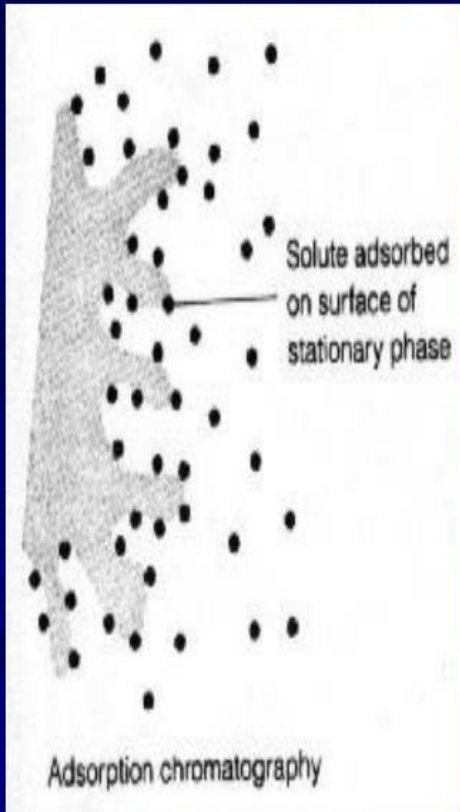
Un metodo di classificazione dei metodi cromatografici si basa sullo stato della fase mobile (liquido – gassoso)



Cromatografia – Meccanismo separazione

- ❖ **Adsorbimento**
- ❖ **Partizione**
- ❖ **Scambio Ionico – Interazione ionica**
- ❖ **Esclusione dimensionale**
- ❖ **Affinità (interazione anticorpo-antigene; interazione chimica; attrazione)**
- ❖ **Complessazione - Chelazione**

Adsorbimento



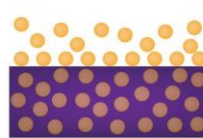
Problemi di assorbimento!!!!

Absorbimento

Adsorbimento



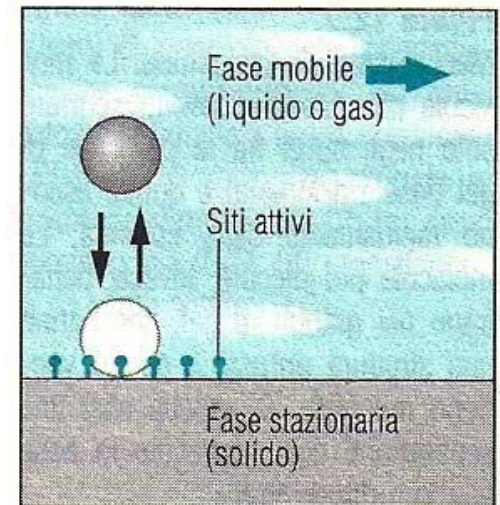
Diversi tipi di assorbimento



ABSORPTION



ADSORPTION

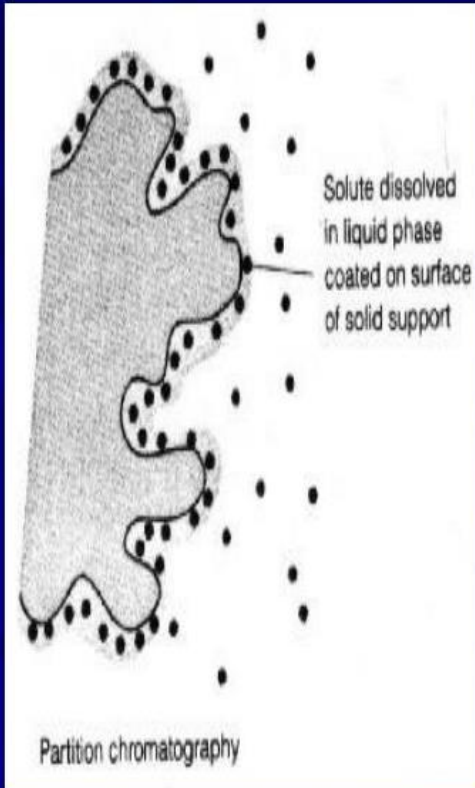


La **cromatografia per adsorbimento** è una delle tecniche di separazione più classiche e fondamentali della chimica analitica. Si basa su un fenomeno di superficie chimico-fisico chiamato, appunto, **adsorbimento**.

In questa tecnica, la **fase stazionaria è un solido** sulla cui superficie si trovano dei siti attivi in grado di stabilire legami deboli (interazioni dipolo-dipolo, legami a idrogeno o forze di Van der Waals) con le molecole del campione.

La separazione avviene perché i diversi componenti della miscela competono con la **fase mobile (un liquido o un gas)** per legarsi ai siti attivi della fase stazionaria.

Partizione

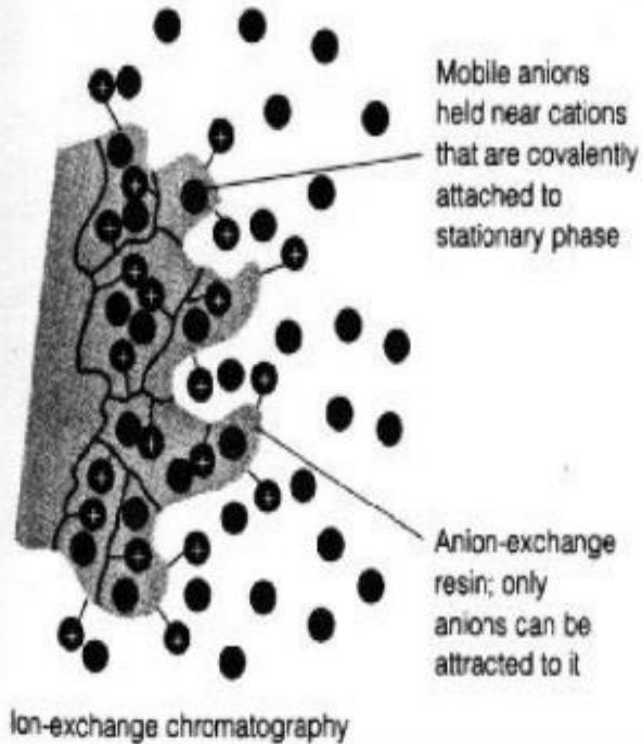


La **cromatografia per partizione** (o di ripartizione) è la tecnica cromatografica oggi più diffusa in assoluto: basti pensare che la stragrande maggioranza delle analisi **HPLC** moderne si basa su questo principio.

A differenza della cromatografia per adsorbimento (dove la fase stazionaria è un solido), nella cromatografia per partizione la **fase stazionaria è un liquido** (o un film liquido ancorato chimicamente a un supporto solido).

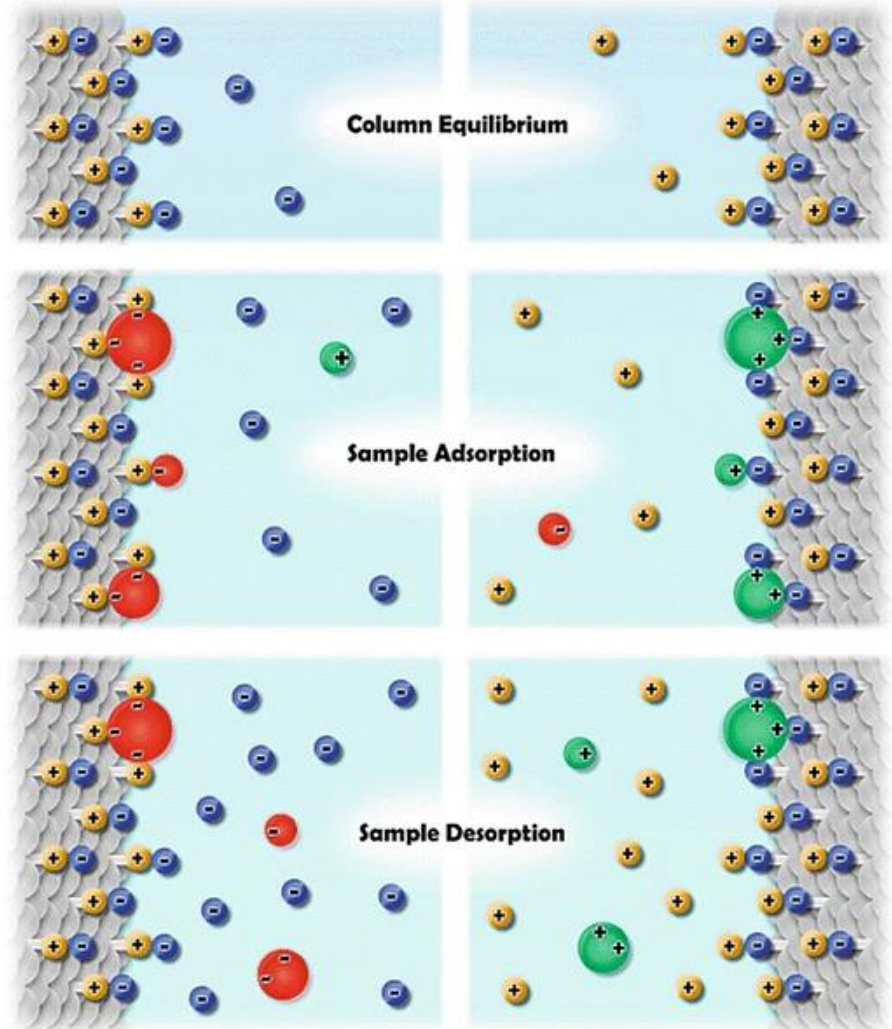
Il meccanismo di separazione si basa sulla **differente solubilità** dei componenti della miscela tra due liquidi immiscibili (la fase mobile e la fase stazionaria).

Scambio ionico



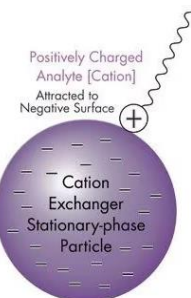
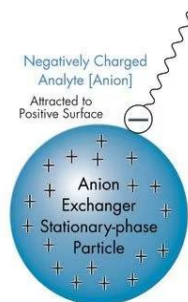
La fase stazionaria è costituita da una matrice solida polimerica (chiamata **resina**) a cui sono legati chimicamente dei gruppi funzionali dotati di carica fissa (positiva o negativa).

Per mantenere la neutralità elettrica, questi gruppi carichi trattengono inizialmente dei piccoli ioni di segno opposto, detti **controioni** (es. Na^+ o Cl^-).



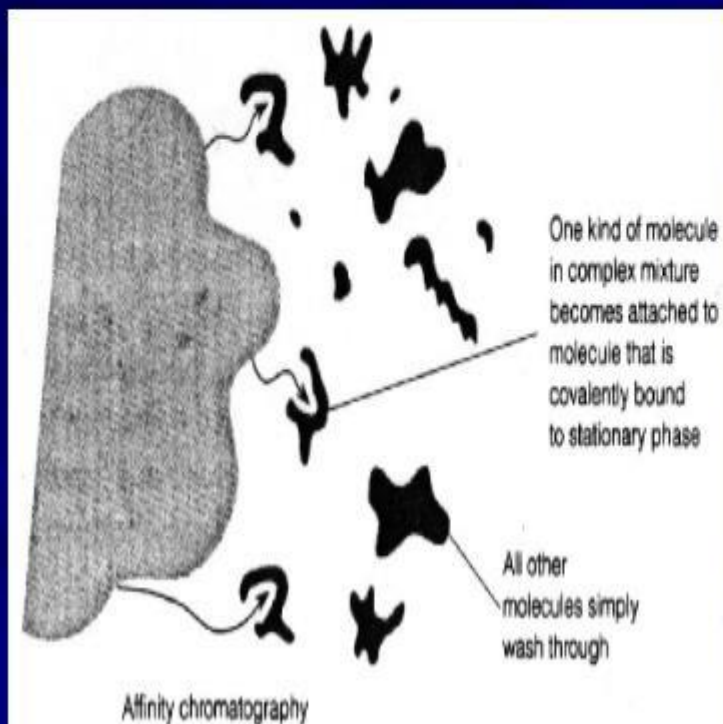
Anion Exchange

Cation Exchange

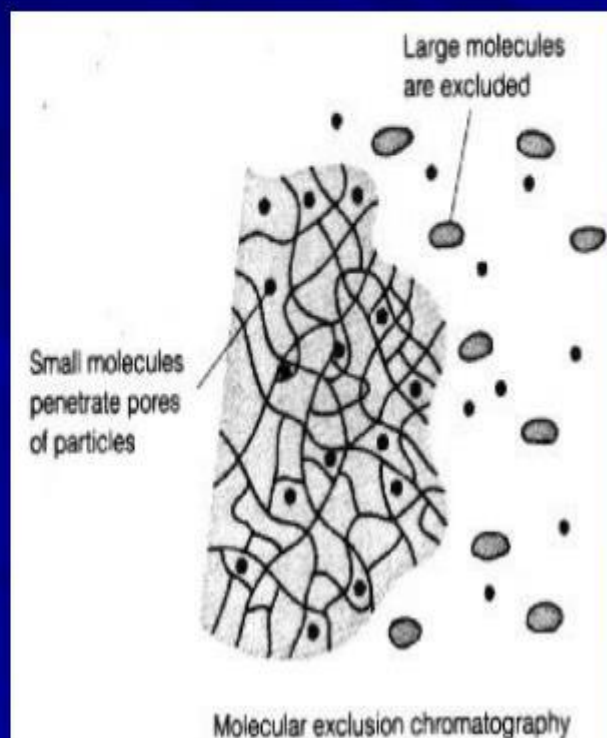


Cromatografia – Meccanismo di Separazione

Affinità



Esclusione dimensionale



Classificazione delle tecniche cromatografiche

1. Stato fisico delle due fasi

- cromatografia liquida
- gascromatografia

2. Meccanismo di ritenzione

- adsorbimento
- ripartizione
- scambio ionico
- esclusione
- affinità

3. Apparato strumentale

- cromatografia su colonna
- cromatografia su strato sottile

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

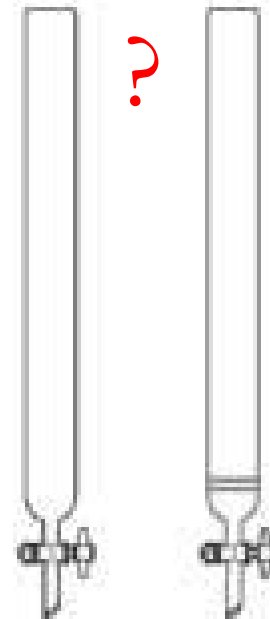
- CROMATOGRAFIA **su COLONNA** Liquid chromatography (LC)
con MODALITA' **sia ANALITICA che PREPARATIVA**:

a basse pressioni < 5 bar

Low Pressure Liquid Chromatography

ad alte pressioni > 50 bar HPLC

buretta

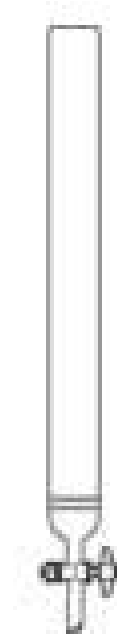
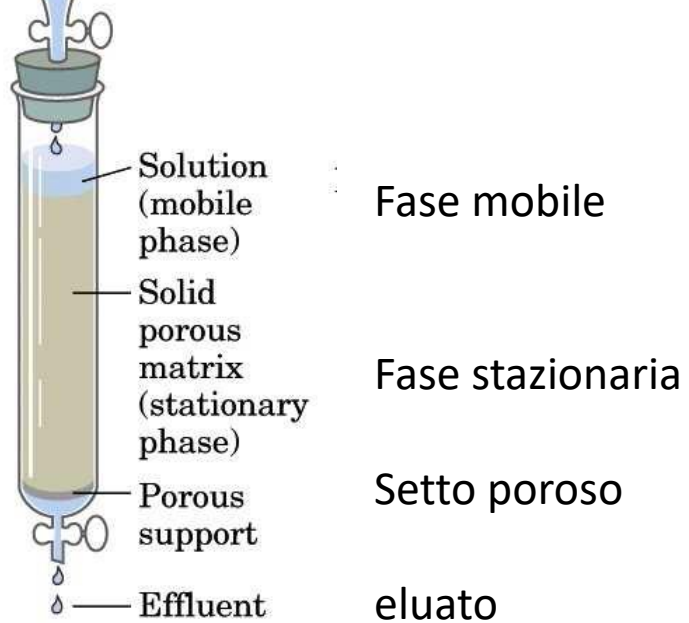
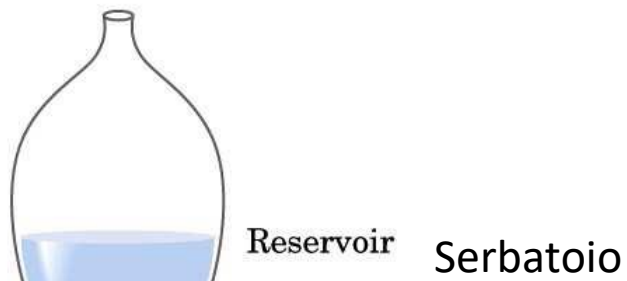


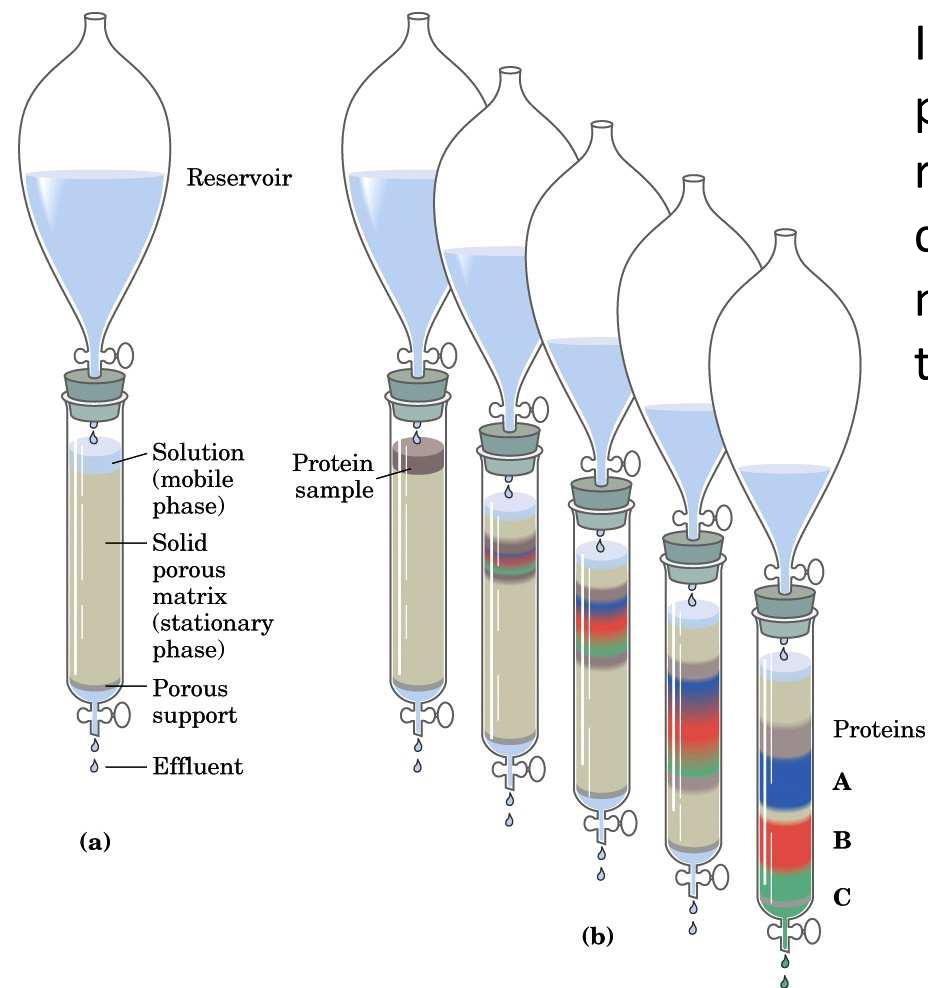
Colonna
cromatografica

Setto poroso

Trattiene la fase stazionaria

COLONNA CROMATOGRAFICA





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

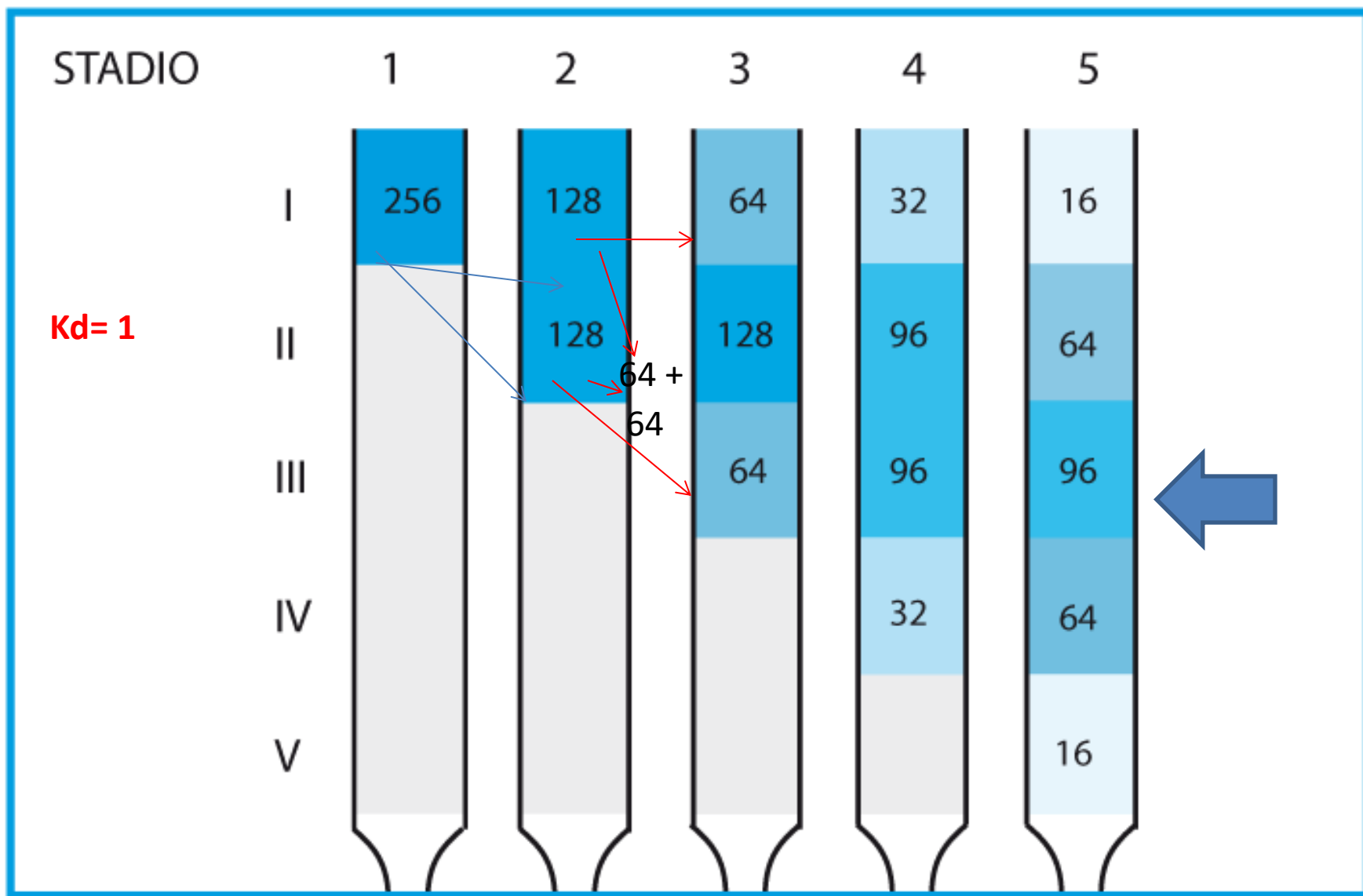
Ogni analita **A** della miscela è caratterizzato da un coefficiente di distribuzione K_d tra due **fasi immiscibili**

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

$K_d = 1$ 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

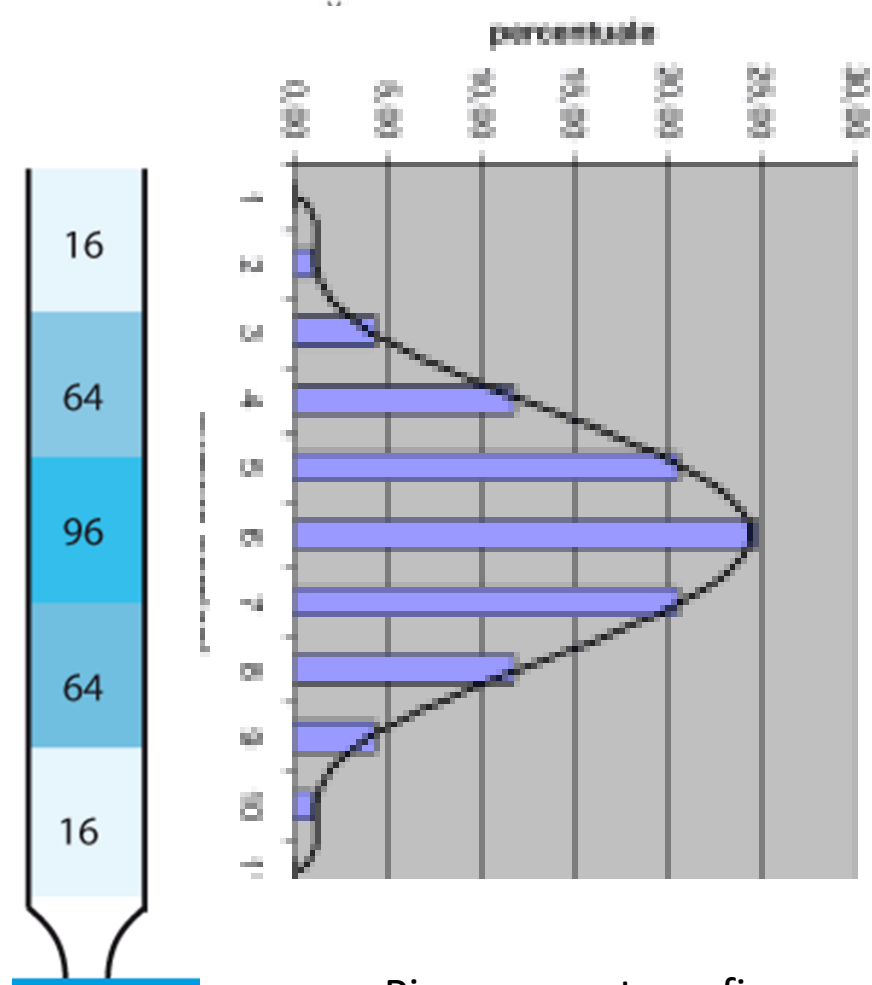
$K_d < 1$ indicano che l'analita interagisce preferenzialmente con la fase stazionaria → si muove lentamente lungo la colonna



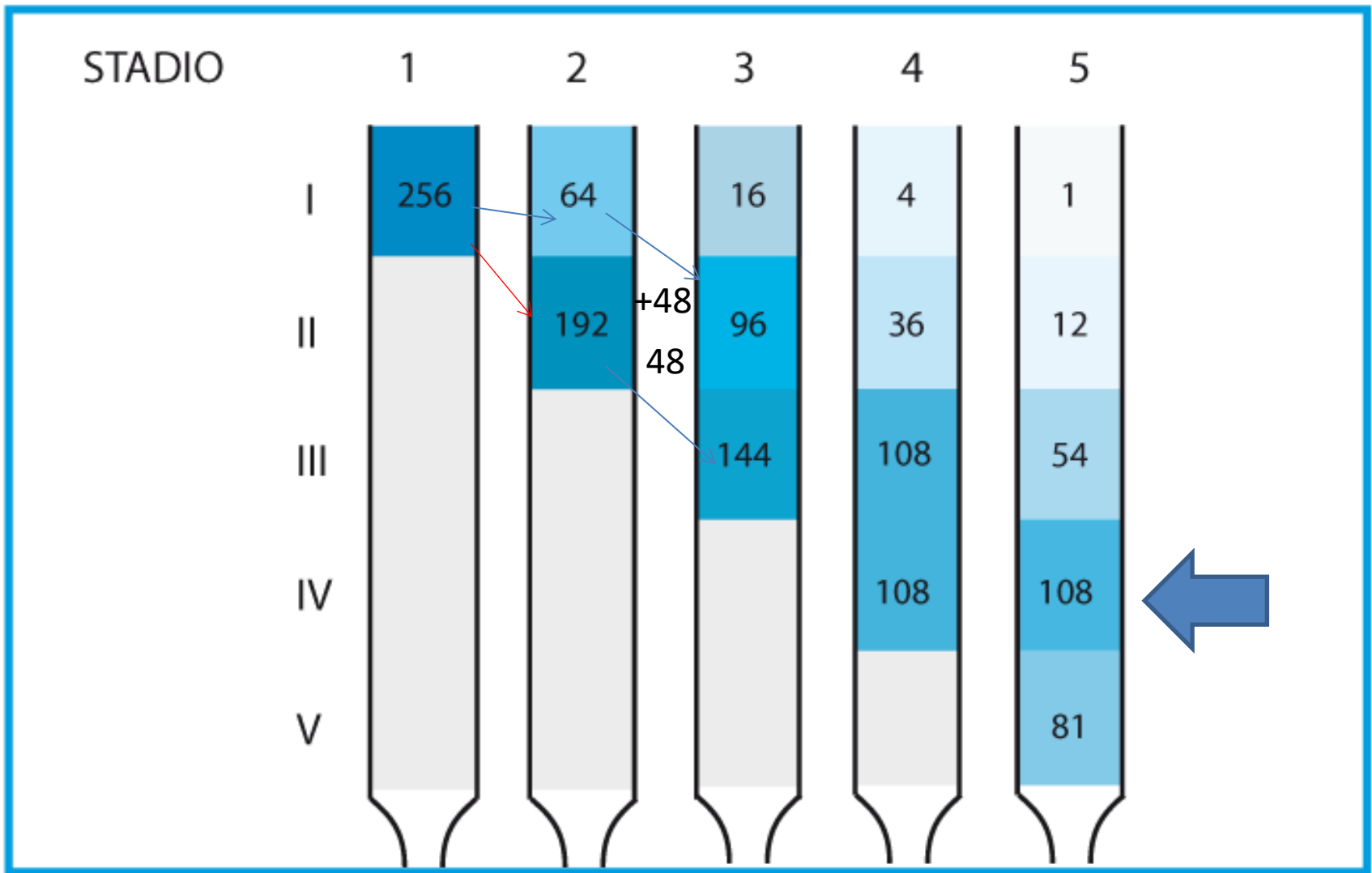
$K_d = 1$ indica che l'analita interagisce ugualmente con la fase mobile e la fase stazionaria

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



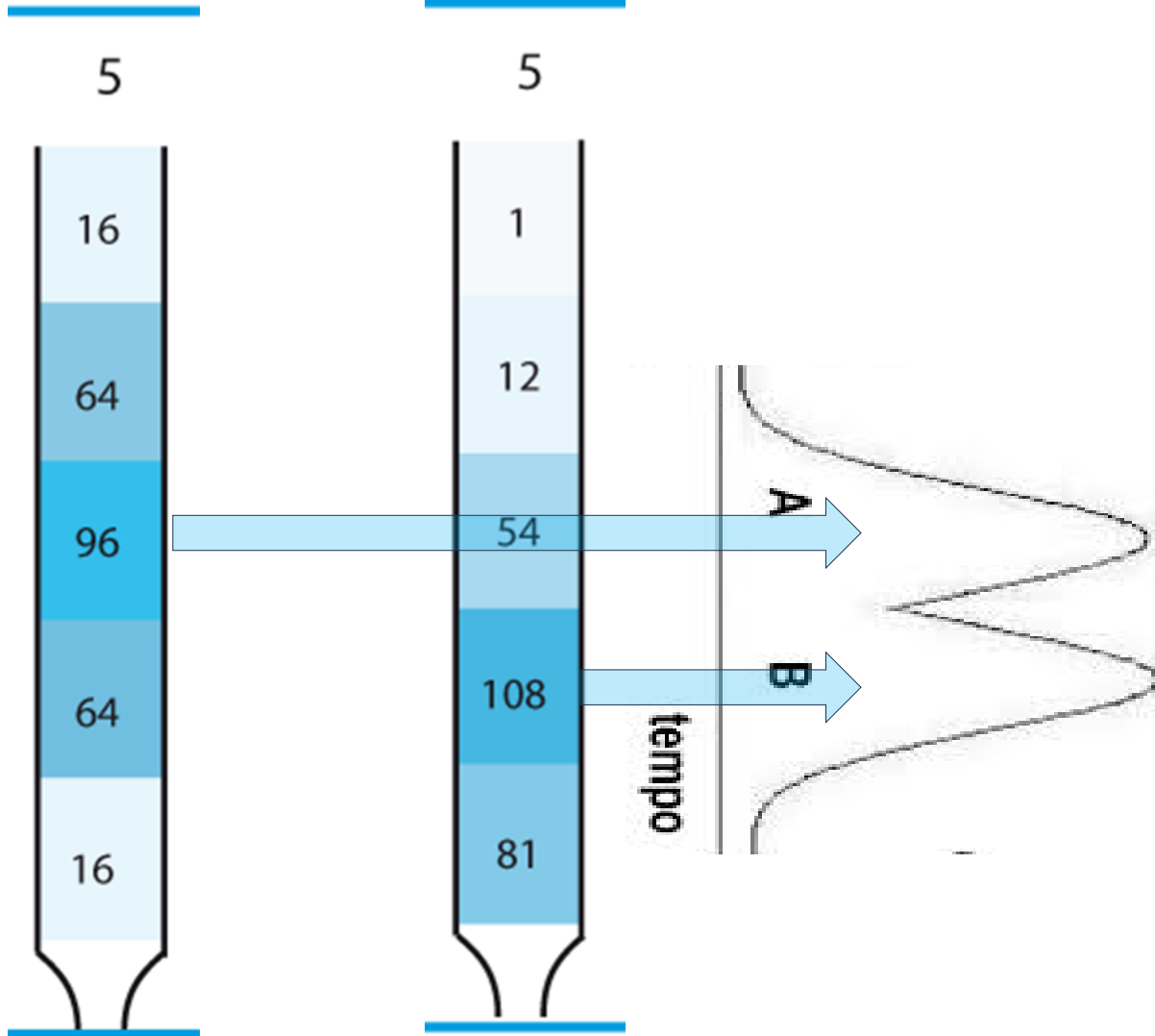
SU 4 MOLECOLE:

- 3 parti FM
- 1 parte FS

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

A: $K_d=1$

B: $K_d>1$

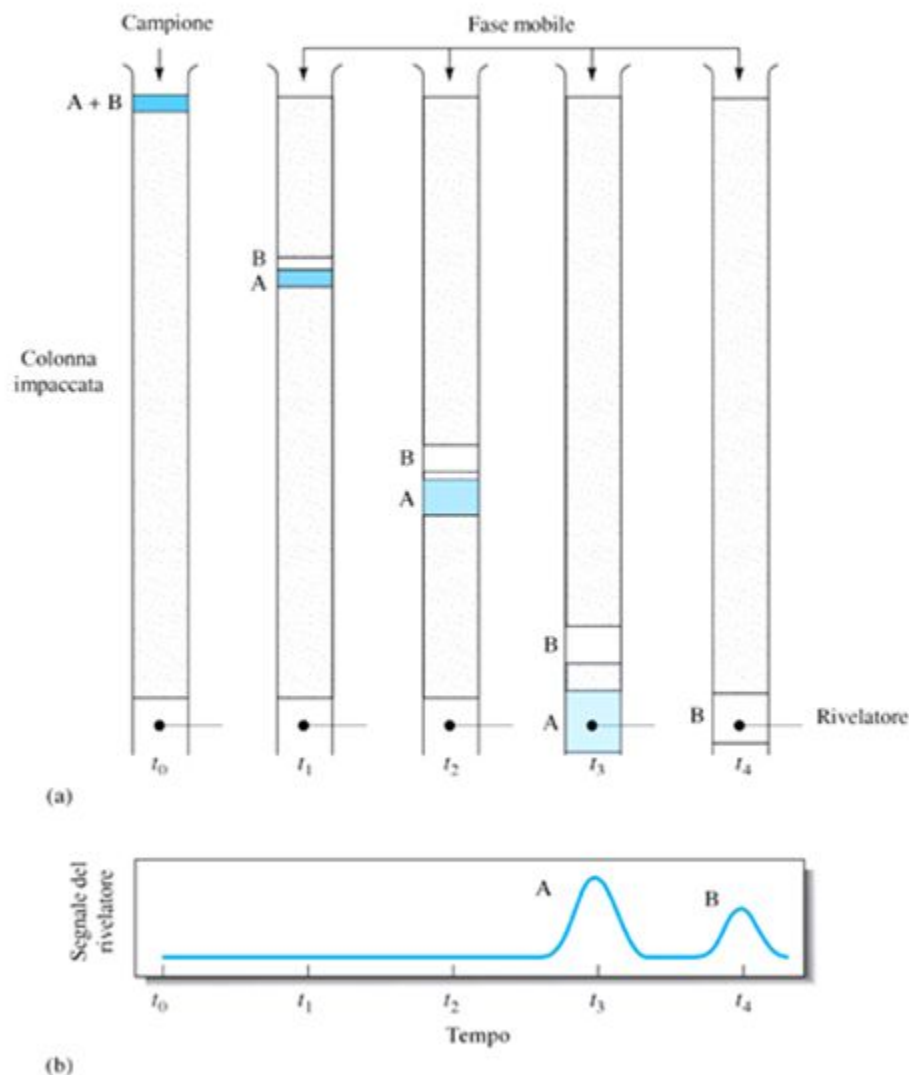


Visualizzazione della separazione

Ponendo all'uscita della colonna un rivelatore che misuri la concentrazione del soluto nell'*eluato* (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

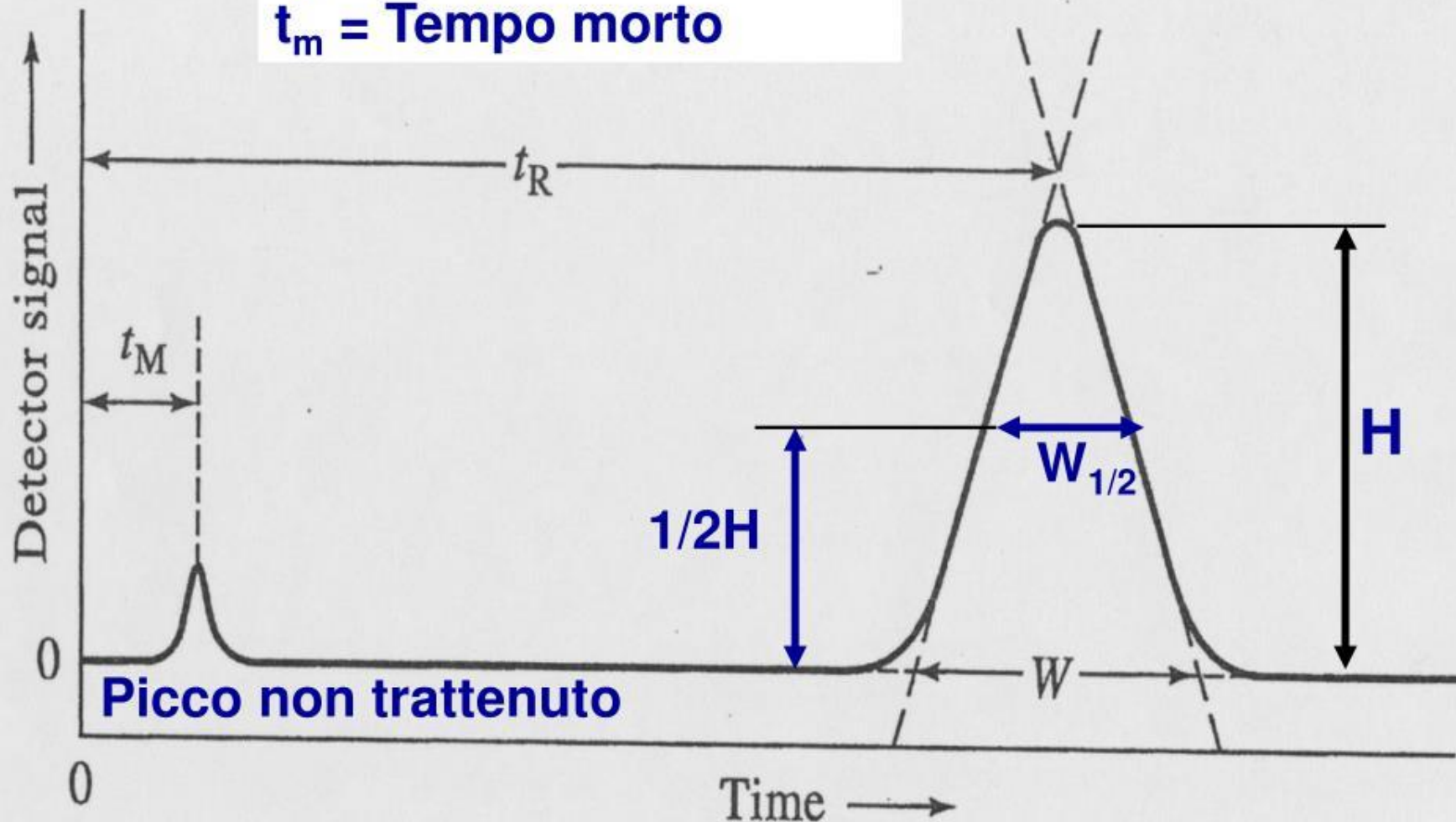
L'area sottesa dai picchi è proporzionale alla quantità di ogni singolo componente e può essere utilizzata a scopo quantitativo



Cromatogramma – Parametri di base

t_R = Tempo di ritenzione

t_m = Tempo morto

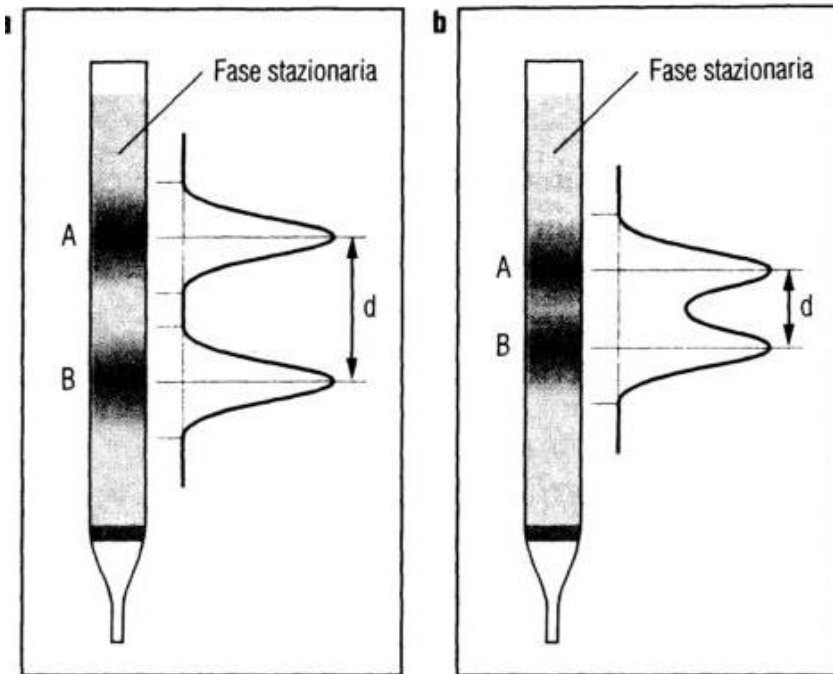


La **risoluzione di un picco fornisce una misura delle capacità di un sistema cromatografico di separare un analita dagli altri della miscela=
PICCHI BEN SEPARATI**

▪ **Selettività :**

▪ **Efficienza:**

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



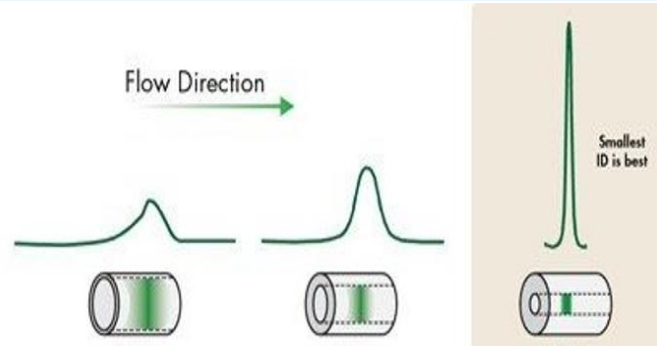
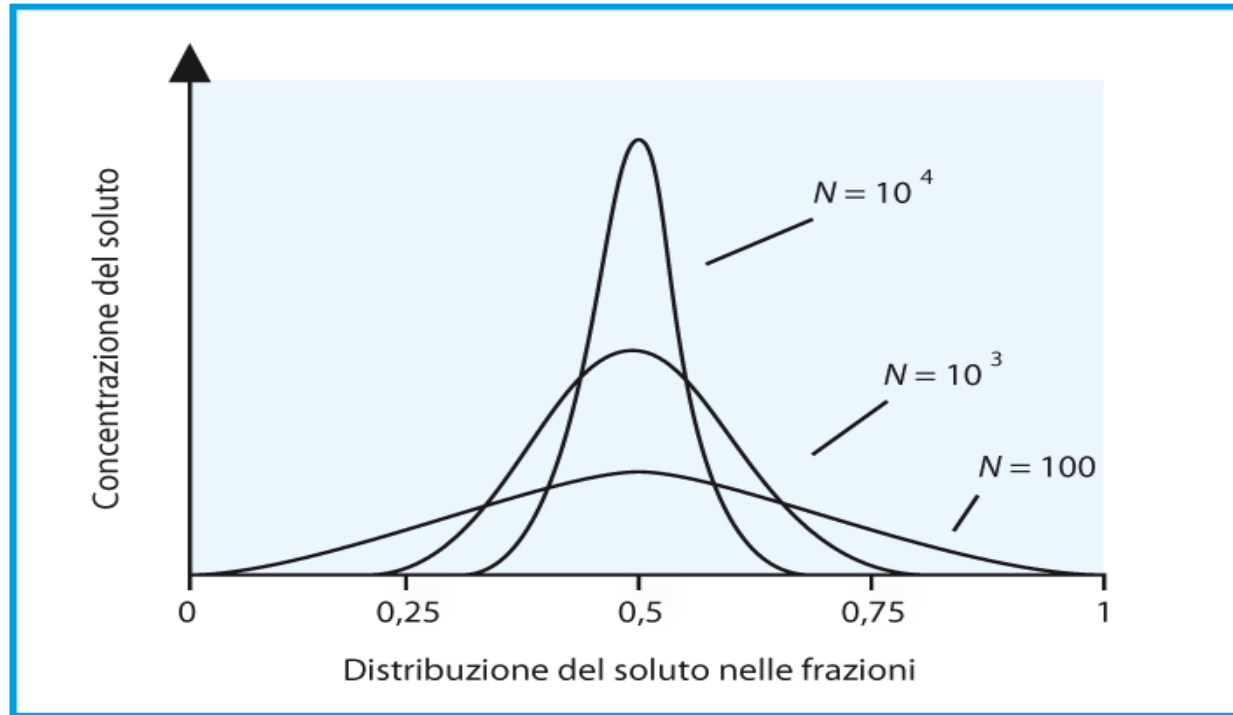
Ogni analita della miscela è caratterizzato da un coefficiente di ripartizione o di distribuzione K_d

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

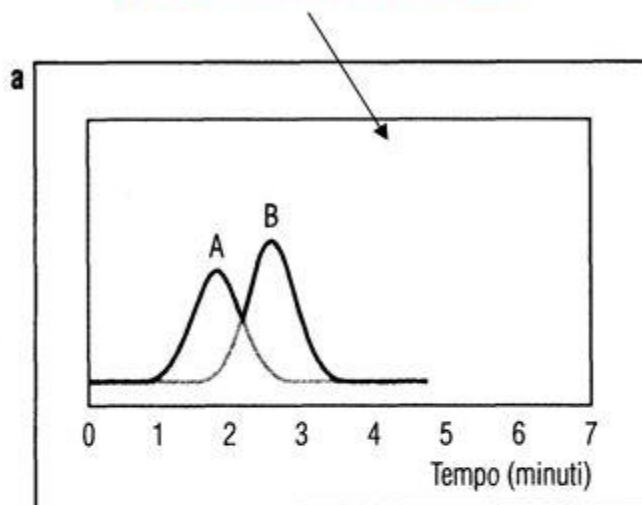
$K_d > 1$ indica che l'analita interagisce preferenzialmente con la fase mobile → si muove velocemente attraverso la colonna

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

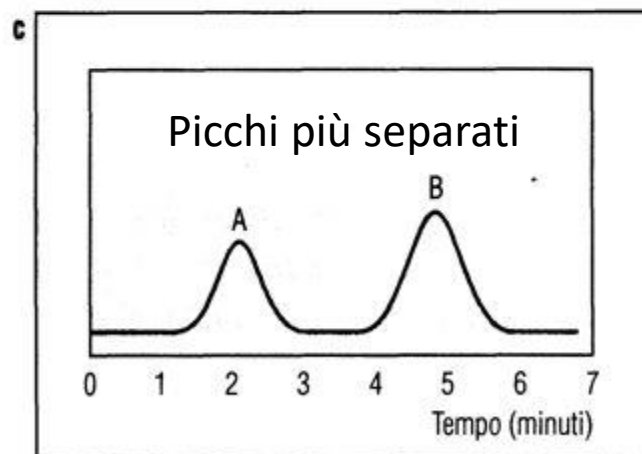
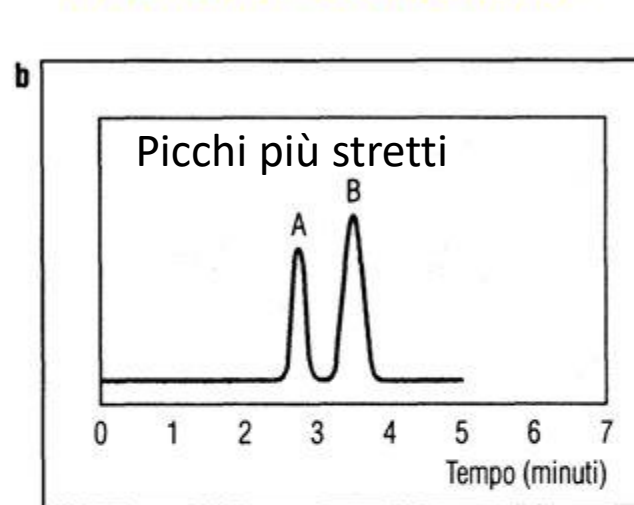
-Efficienza: ampiezza relativa dei picchi (capacità del sistema di raggruppare tutte le molecole di un soluto in un volume ristretto)



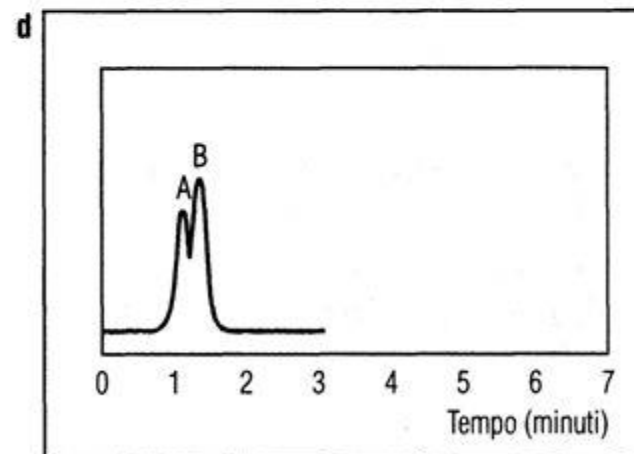
**Scarsa selettività ed efficienza
= picchi non risolti**



Aumento di efficienza



Aumento di selettività



**Aumento di efficienza ma
non di selettività**

Parametri importanti

Capacità:

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

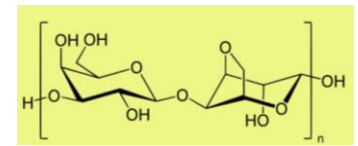
La **MATRICE** e' il supporto della Fase Stazionaria

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

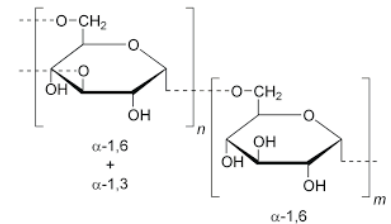


- POLISACCARIDICHE:

- AGAROSIO** : D-galattosio e 3,6-anidro-L-galattosio (ESTRATTO DALL'ALGA AGAR) 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 F. Mobile e nel Campione**
- **Gruppi funzionali opportuni x legare gruppi Funzionali della F. S.**
- **Elevata densità di gruppi funzionali = Elevata Capacità**

FASI OPERATIVE di una SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA:

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

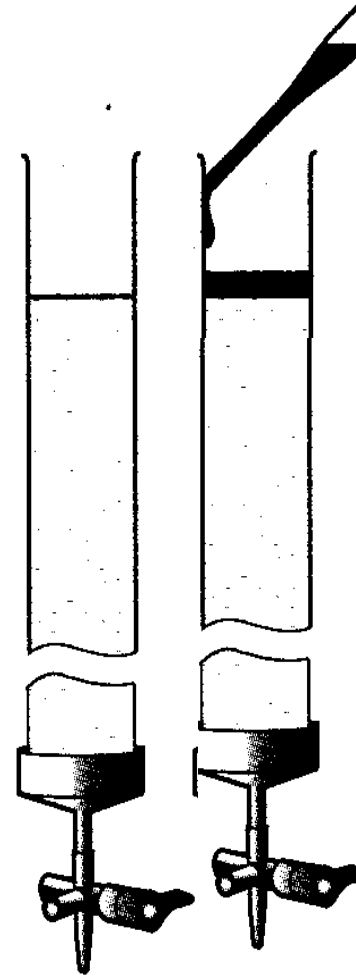
IMPACCAMENTO della COLONNA:

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 nella fase mobile prescelta

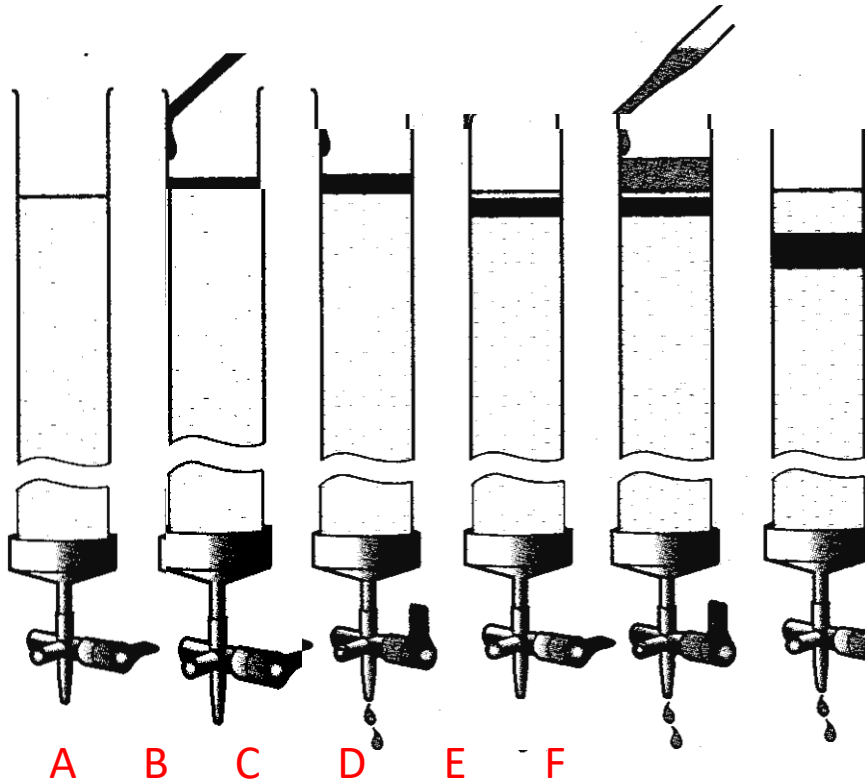
Tale sospensione deve essere versata **con continuità** e delicatamente in colonna avendo cura di tenere **chiuso il rubinetto**, evitando che bolle d'aria rimangano intrappolate tra le particelle di fase stazionaria durante l'impaccamento

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



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 disturbare il letto di F.S.
- C)** Aprire il rubinetto sino a far interagire 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 F.S. e con la F.M.



SVILUPPO DELLA COLONNA: ELUIZIONE

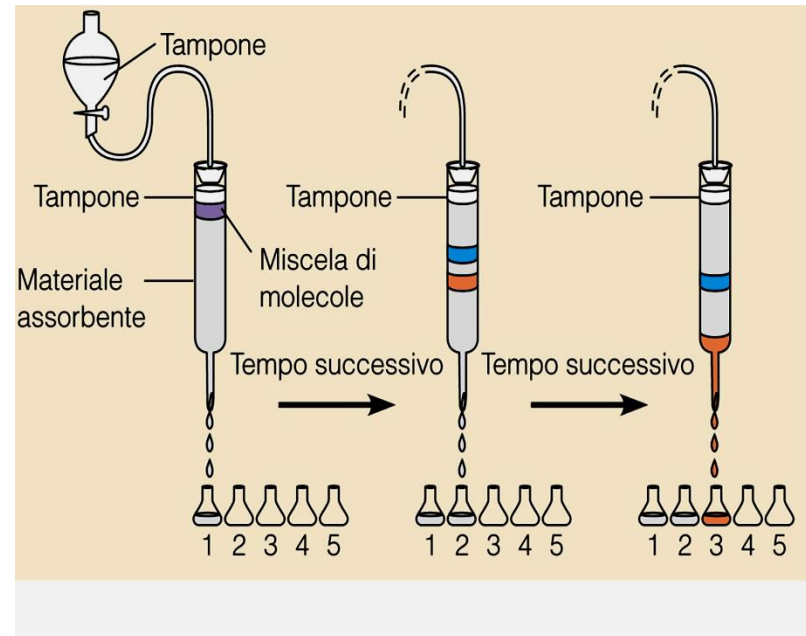
I componenti della miscela vengono separati all'interno della colonna cromatografica durante il processo di **ELUIZIONE**

Il tempo impiegato da ciascun analita per fuoriuscire dalla colonna = **tempo di eluizione**

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

$$V_e = t_e F$$

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



ELUIZIONE ISOCRATICA



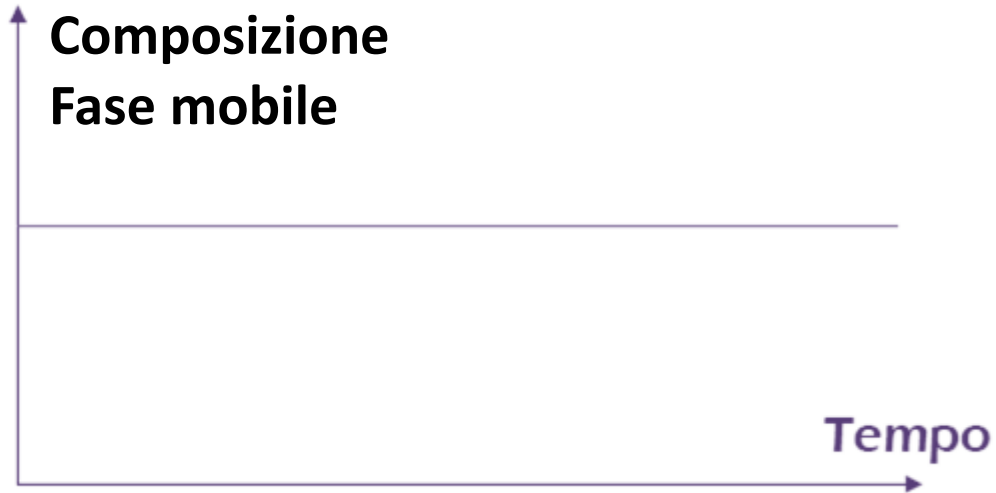
Sviluppo della colonna senza modificare la composizione della FASE MOBILE

ELUIZIONE NON ISOCRATICA



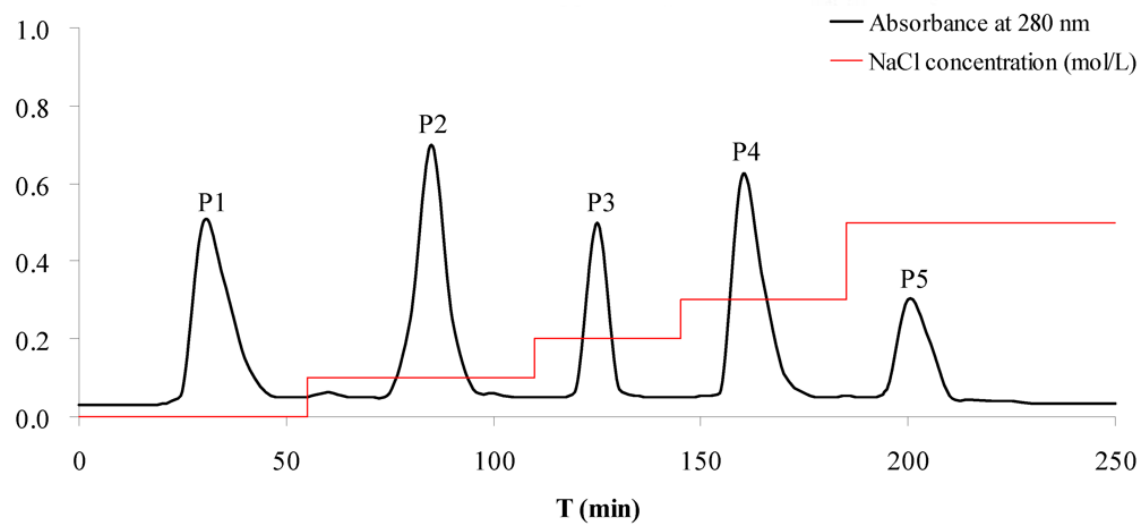
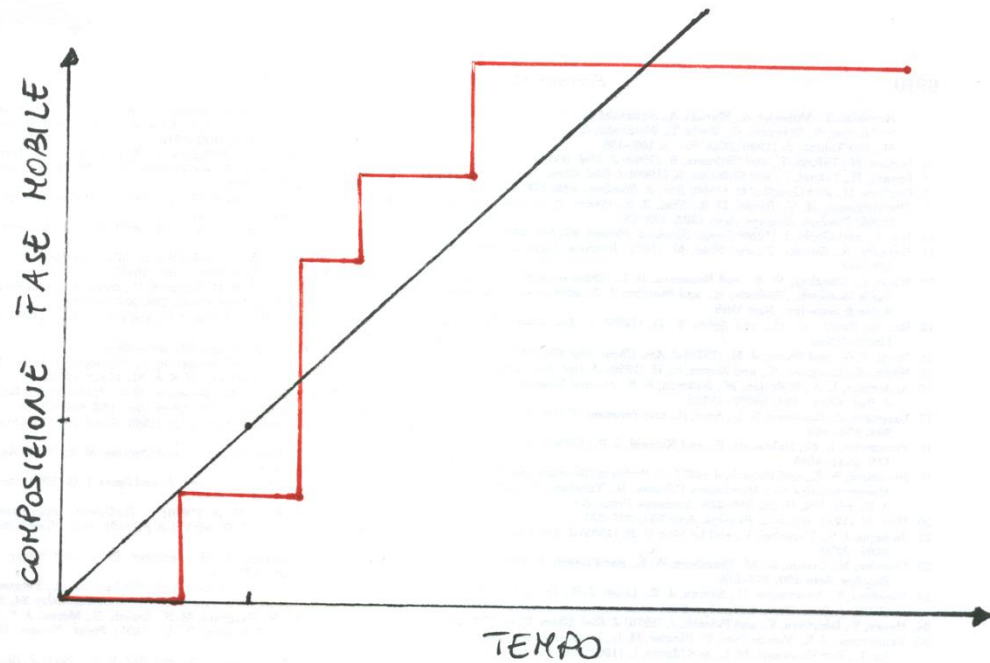
Lo sviluppo della colonna avviene modificando una o più caratteristiche della FASE MOBILE (pH, Forza ionica)

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

Figure 3.10

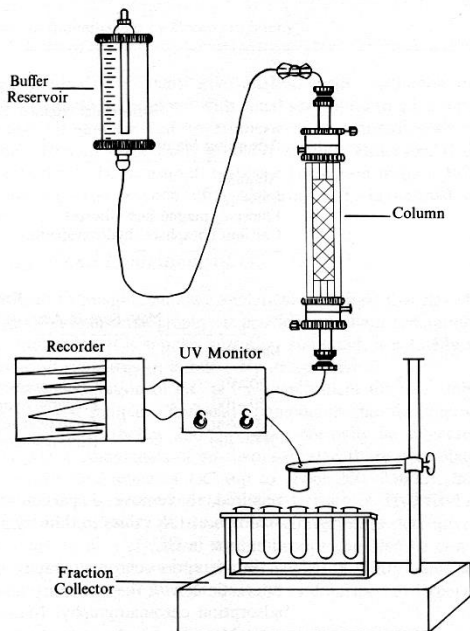
Elution curve for a mixture of several proteins.

A = hemoglobin,

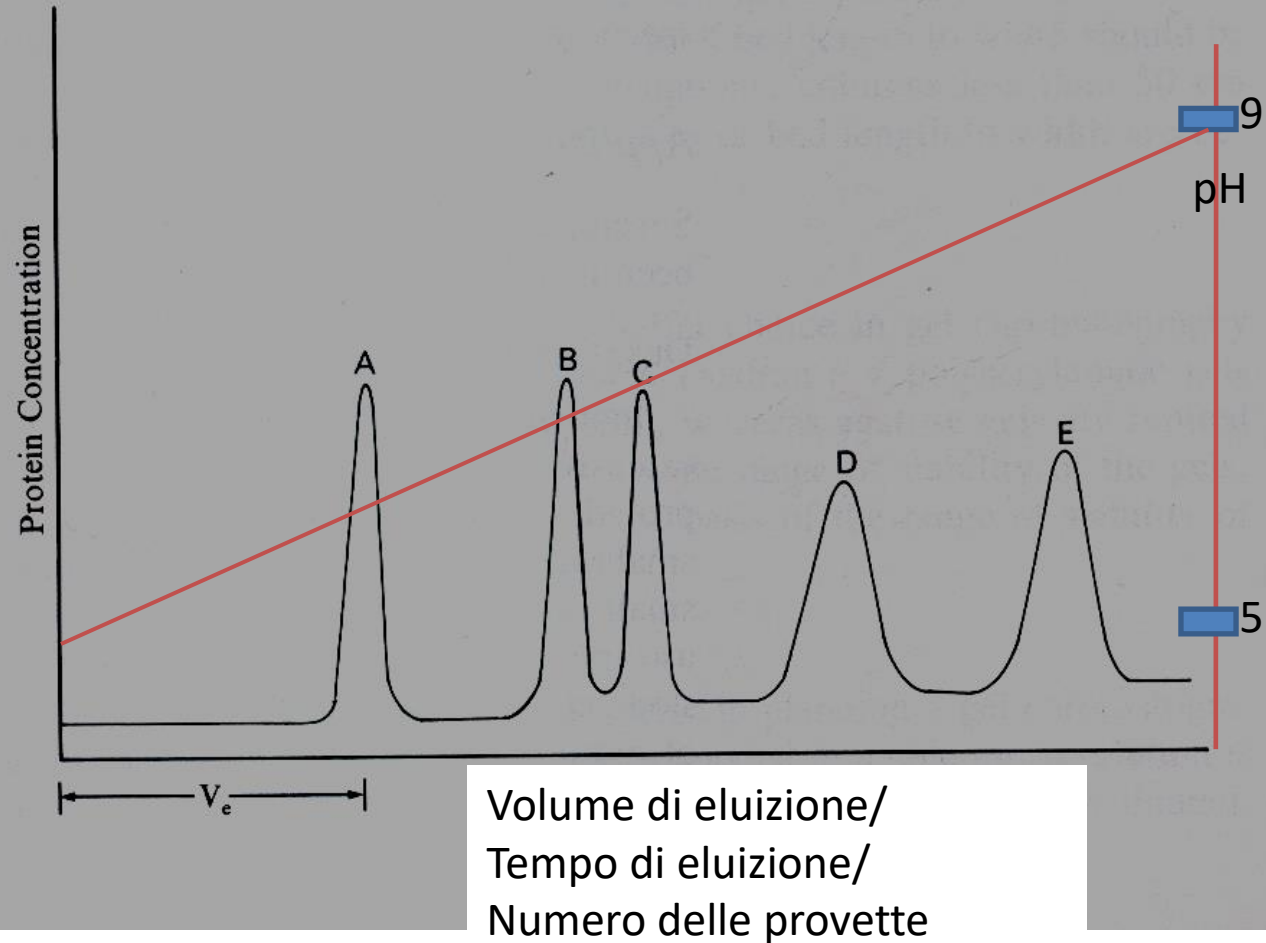
B = egg albumin,

C = chymotrypsinogen,

D = myoglobin,



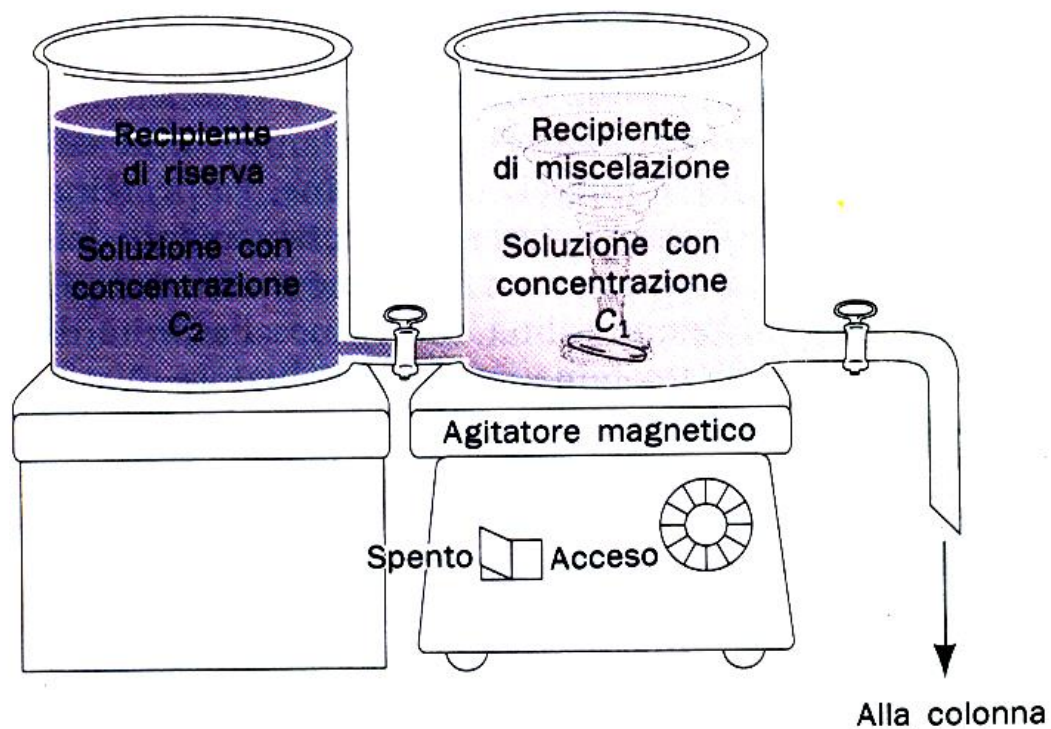
A_{280nm}

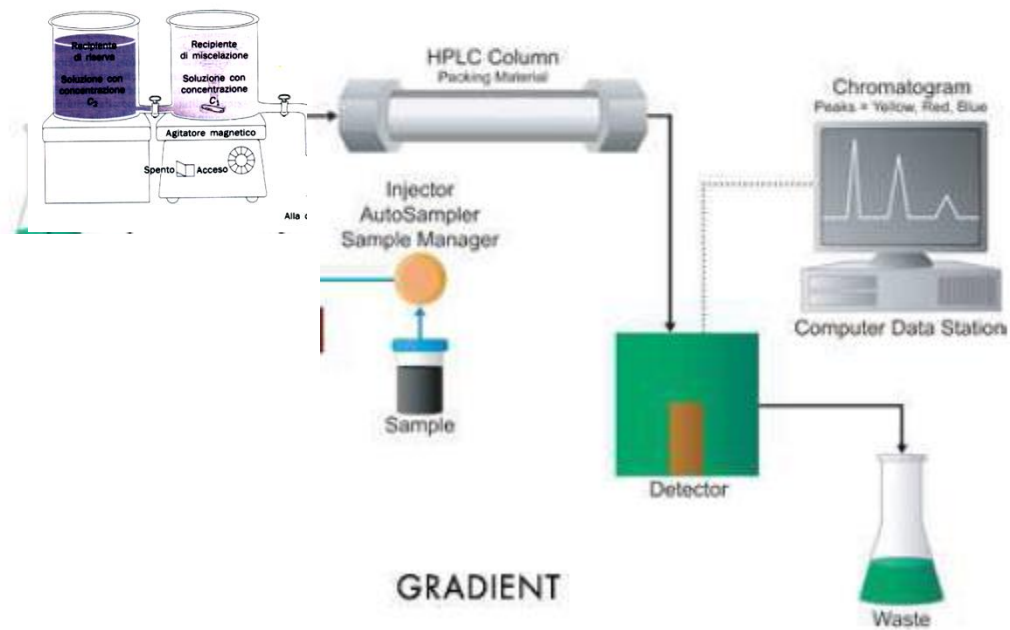
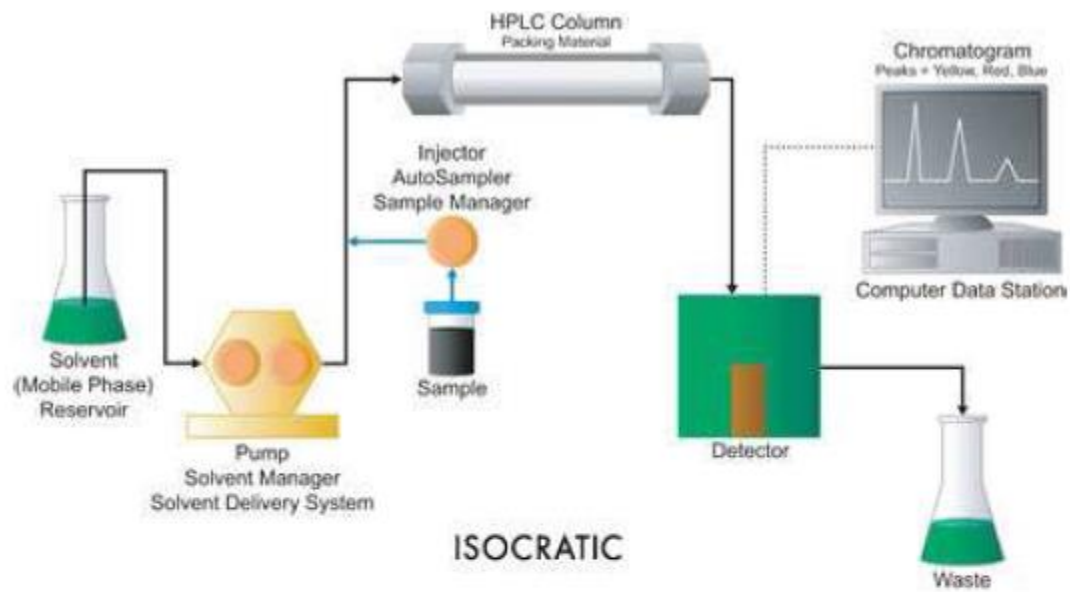


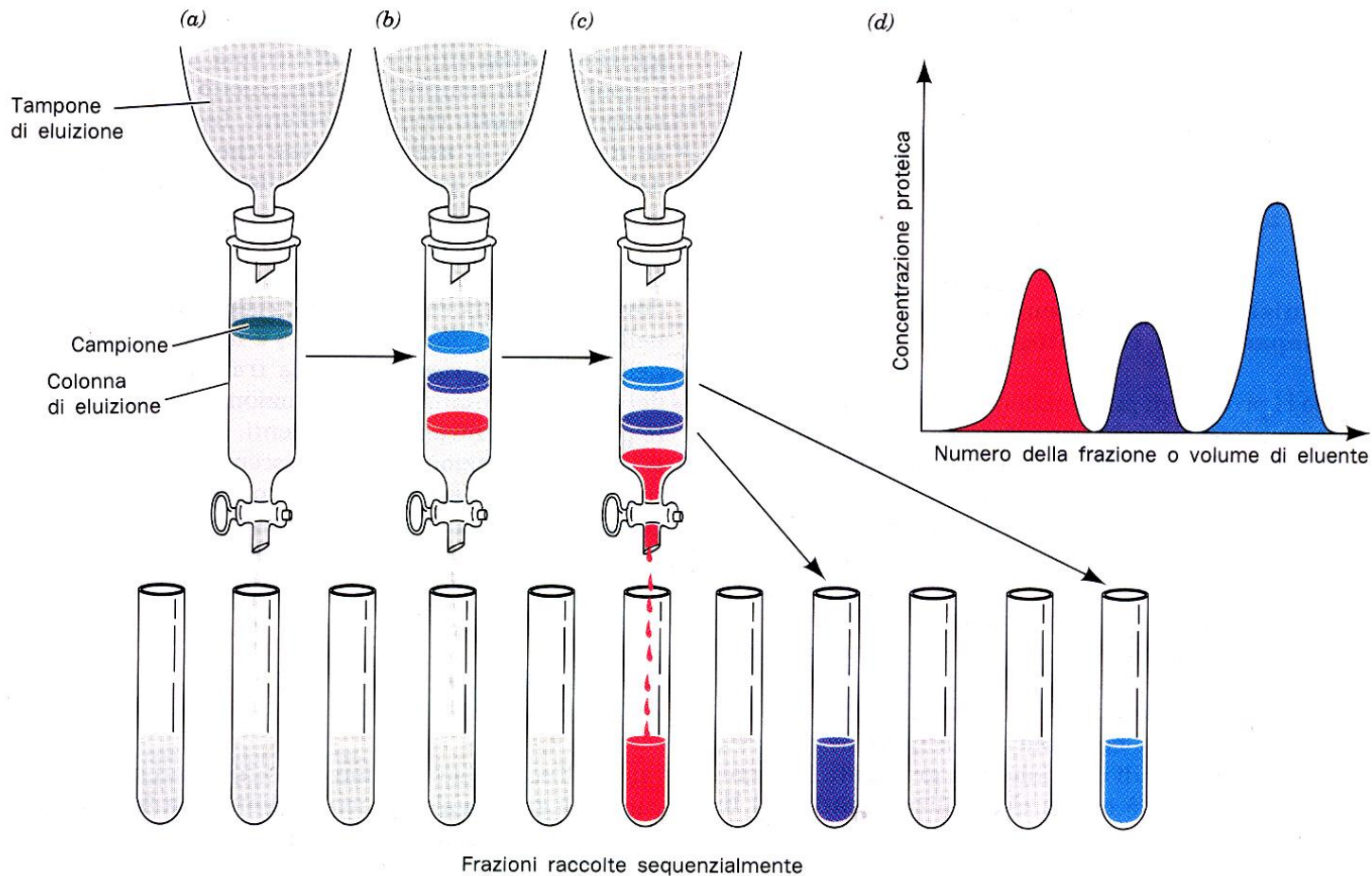
ELUIZIONE in GRADIENTE

variazioni continue mediante
FORMATORE di GRADIENTE o
DUE POMPE

FORMATORE DI GRADIENTE







FASI OPERATIVE di una SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA:

IMPACCAMENTO della COLONNA

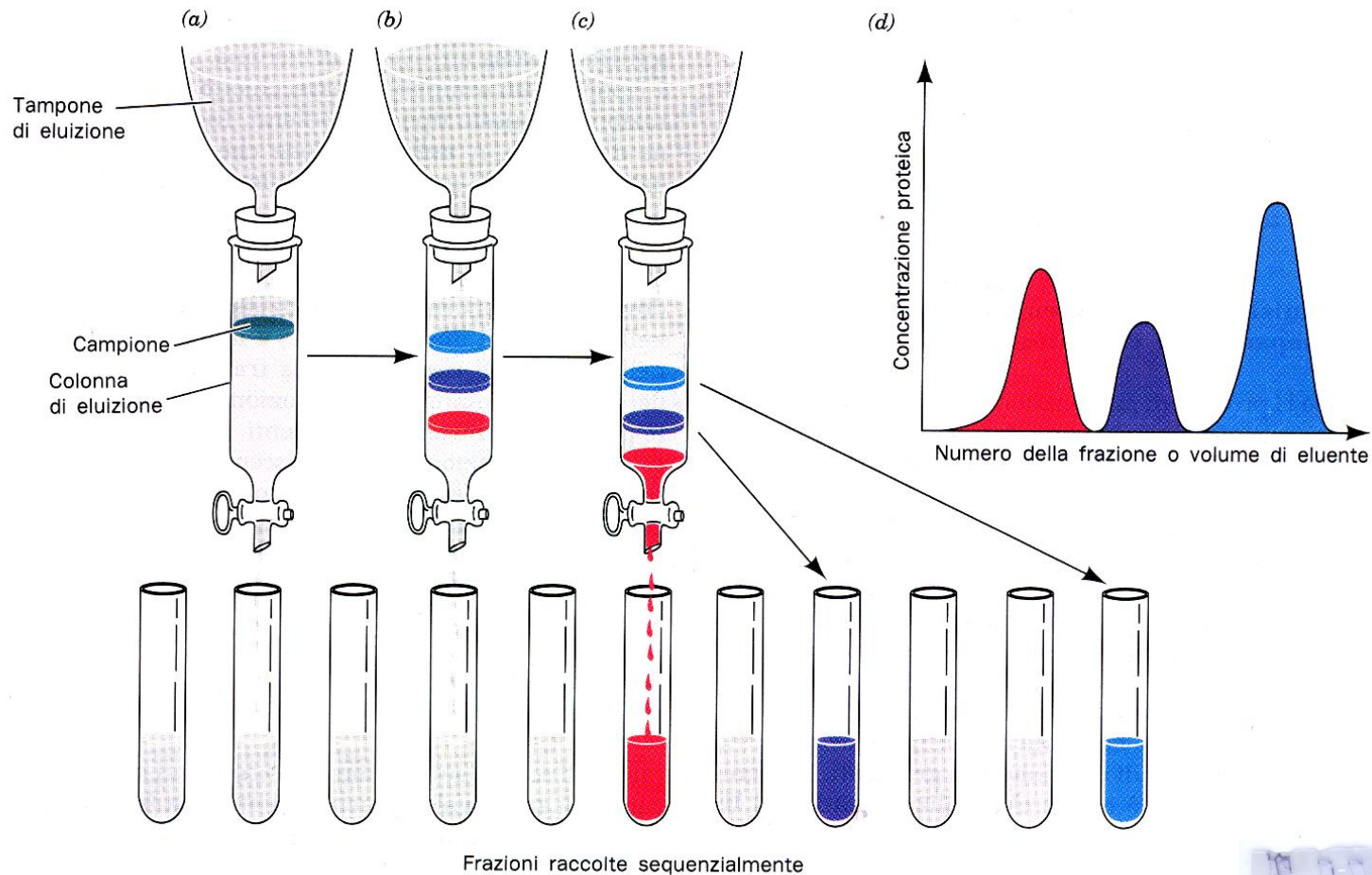
CARICAMENTO del CAMPIONE

ELUIZIONE

RIVELAZIONE degli analiti

RACCOLTA delle FRAZIONI

CONTROLLO della PURIFICAZIONE



FASI OPERATIVE di una SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA:

IMPACCAIMENTO della COLONNA

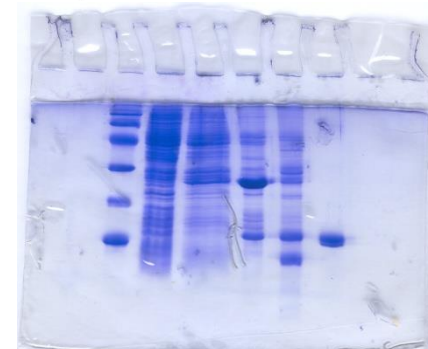
CARICAMENTO del CAMPIONE

ELUIZIONE

RIVELAZIONE degli analiti

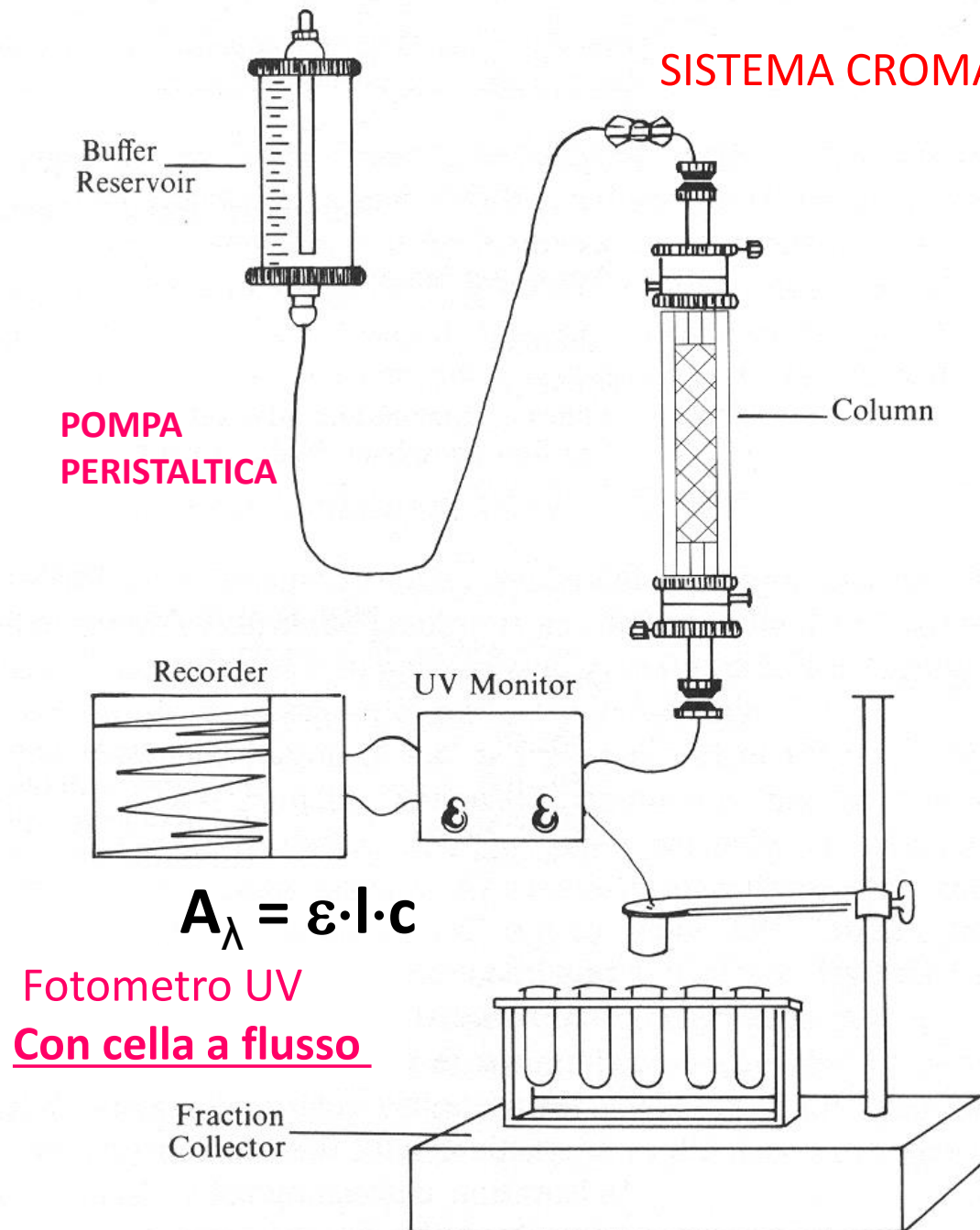
RACCOLTA delle FRAZIONI

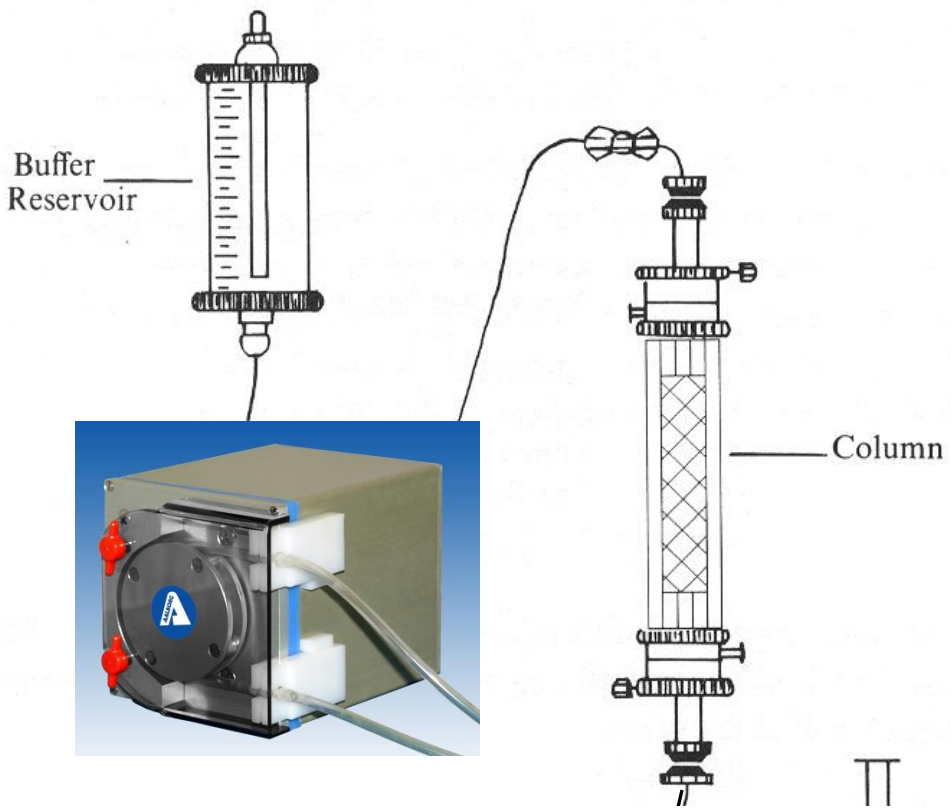
CONTROLLO della PURIFICAZIONE mediante tecnica analitica (p.es. elettroforesi)



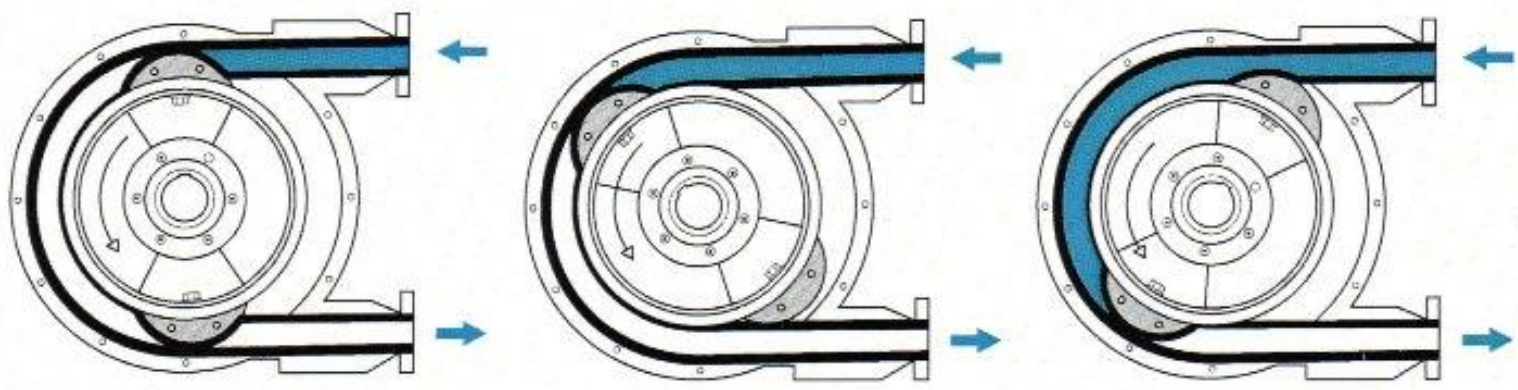


SISTEMA CROMATOGRAFICO AUTOMATIZZATO

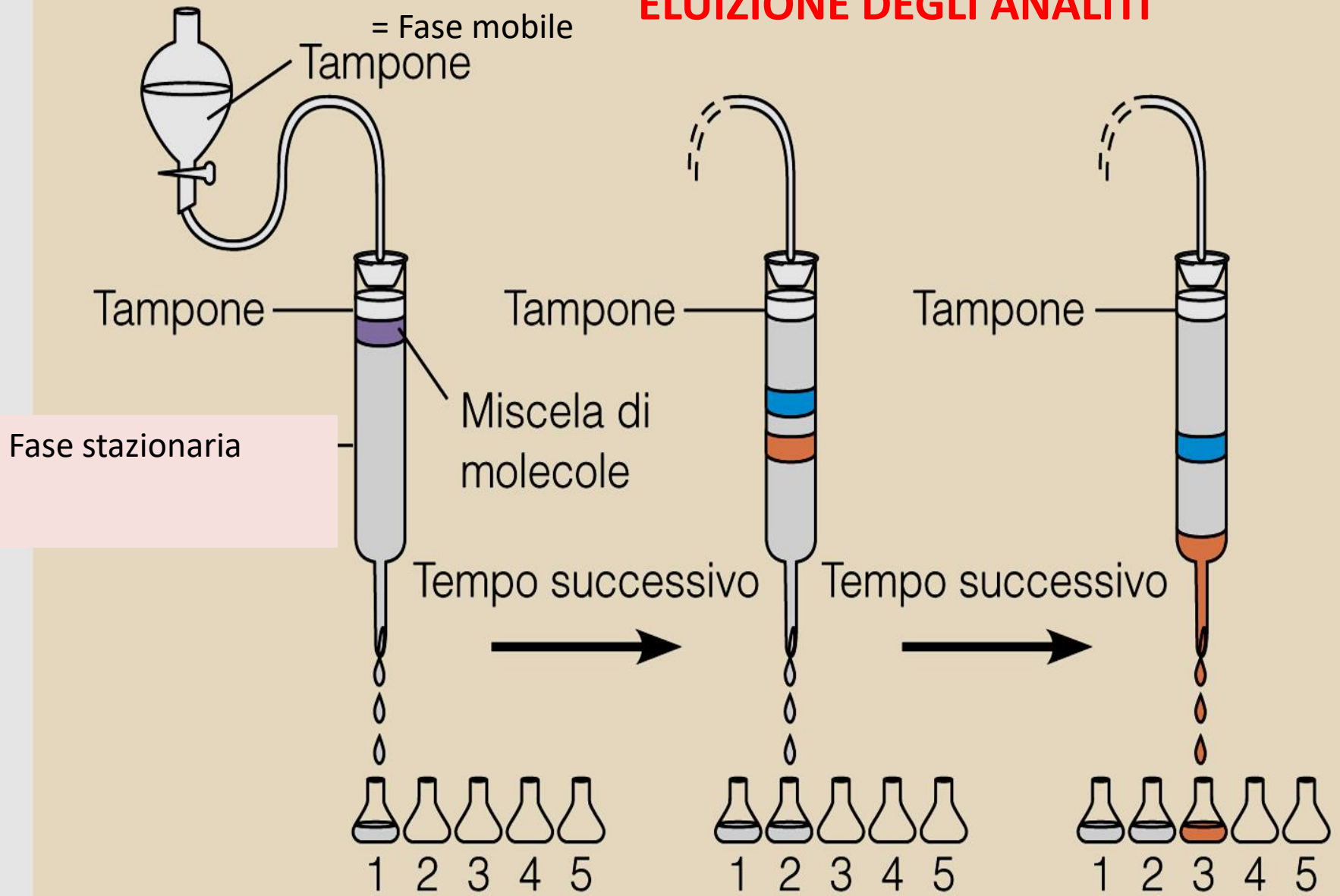




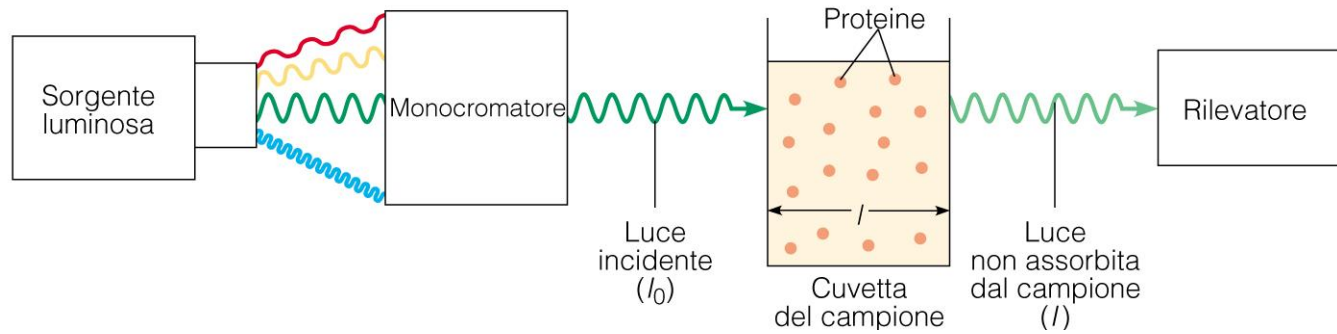
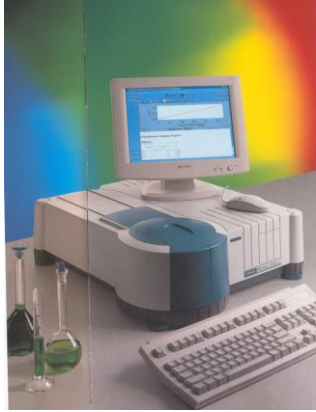
POMPA
PERISTALTICA



ELUIZIONE DEGLI ANALITI

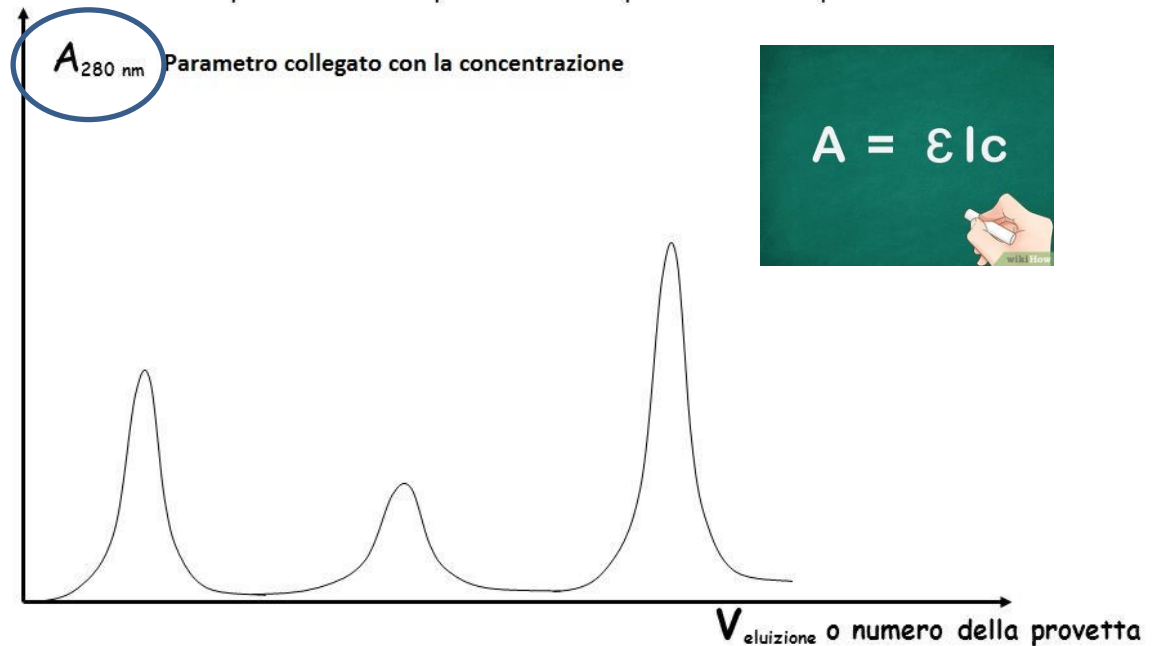
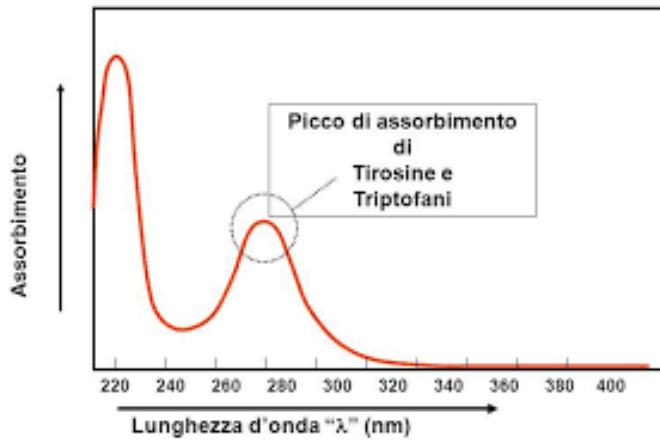


RIVELAZIONE degli analiti....uso un fotometro UV/VIS



Cromatogramma o grafico di eluizione

che mostra la separazione completa dei componenti il campione da analizzare



A_{λ}

Figure 3.10

Elution curve for a mixture of several proteins.

A = hemoglobin,

B = egg albumin,

C = chymotrypsinogen,

D = myoglobin,

Grafico di eluizione

