

**CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA PER LA
SOSTENIBILITÀ**



**BIOCHIMICA APPLICATA
(6 CFU)**

LEZIONE 2

Prof. Paola Di Donato

Dipartimento di Scienze e Tecnologie

Stanza 520, V piano lato NORD

Tel. 081 547 6625

E-mail: paola.didonato@uniparthenope.it

Tappe della purificazione delle proteine

1. Omogeneizzazione;
2. centrifugazione: differenziale, in gradiente di densità;
3. separazione mediante variazioni solubilità*;
4. separazione con membrane*;
5. cromatografia

Purificazione delle proteine: 5) cromatografie

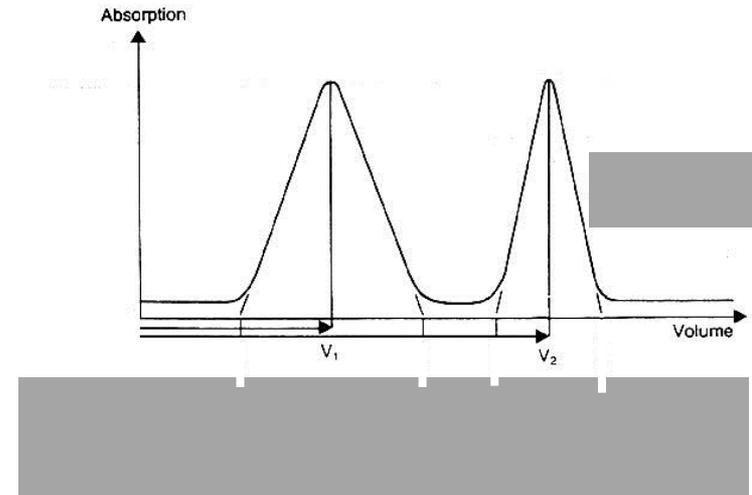
❖ cromatografia liquida (LC), ad elevata risoluzione (HPLC),

Fast Protein LC (FPLC);

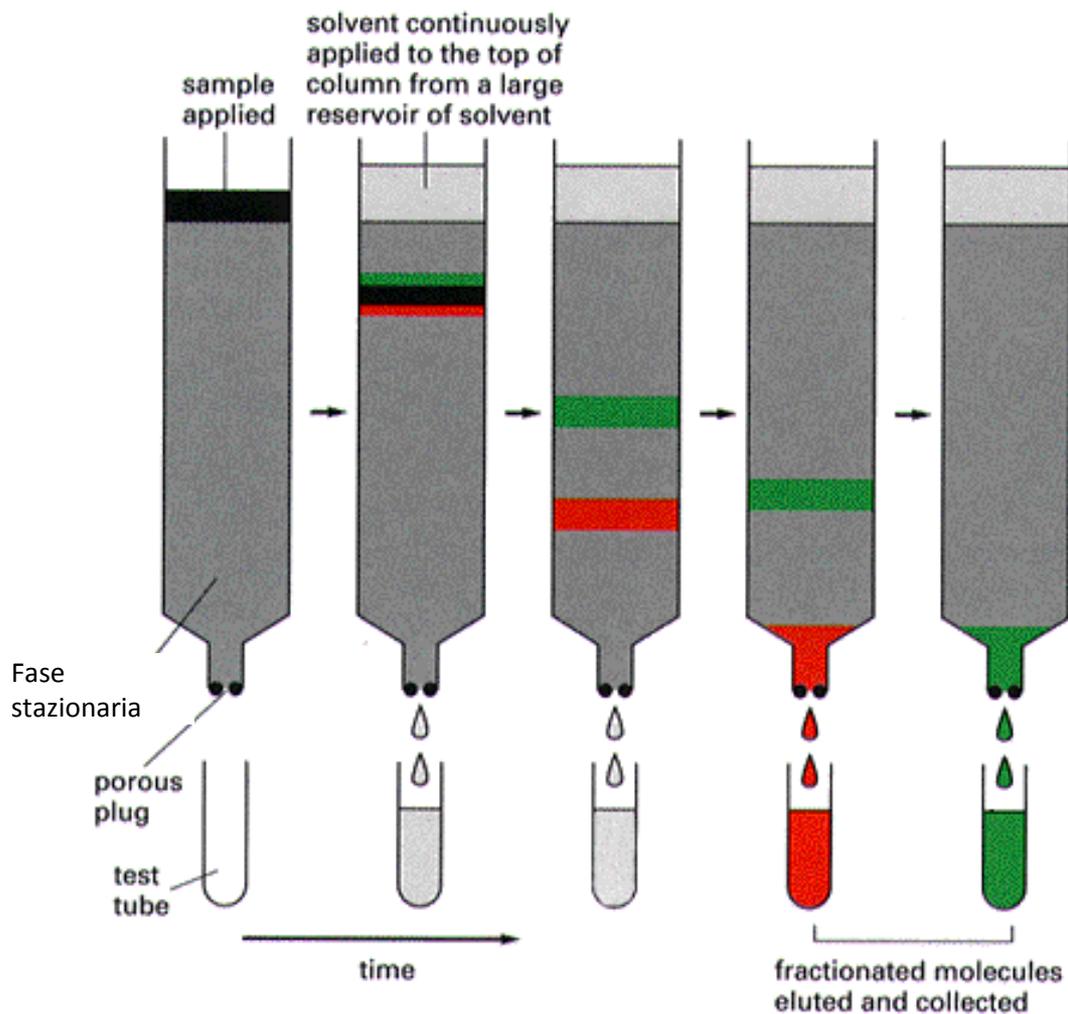
❖ cromatografie:

- ✓ scambio ionico,
- ✓ esclusione molecolare,
- ✓ affinità,
- ✓ adsorbimento,
- ✓ partizione,
- ✓ interazione idrofobica,

❖ *downstream processing.*



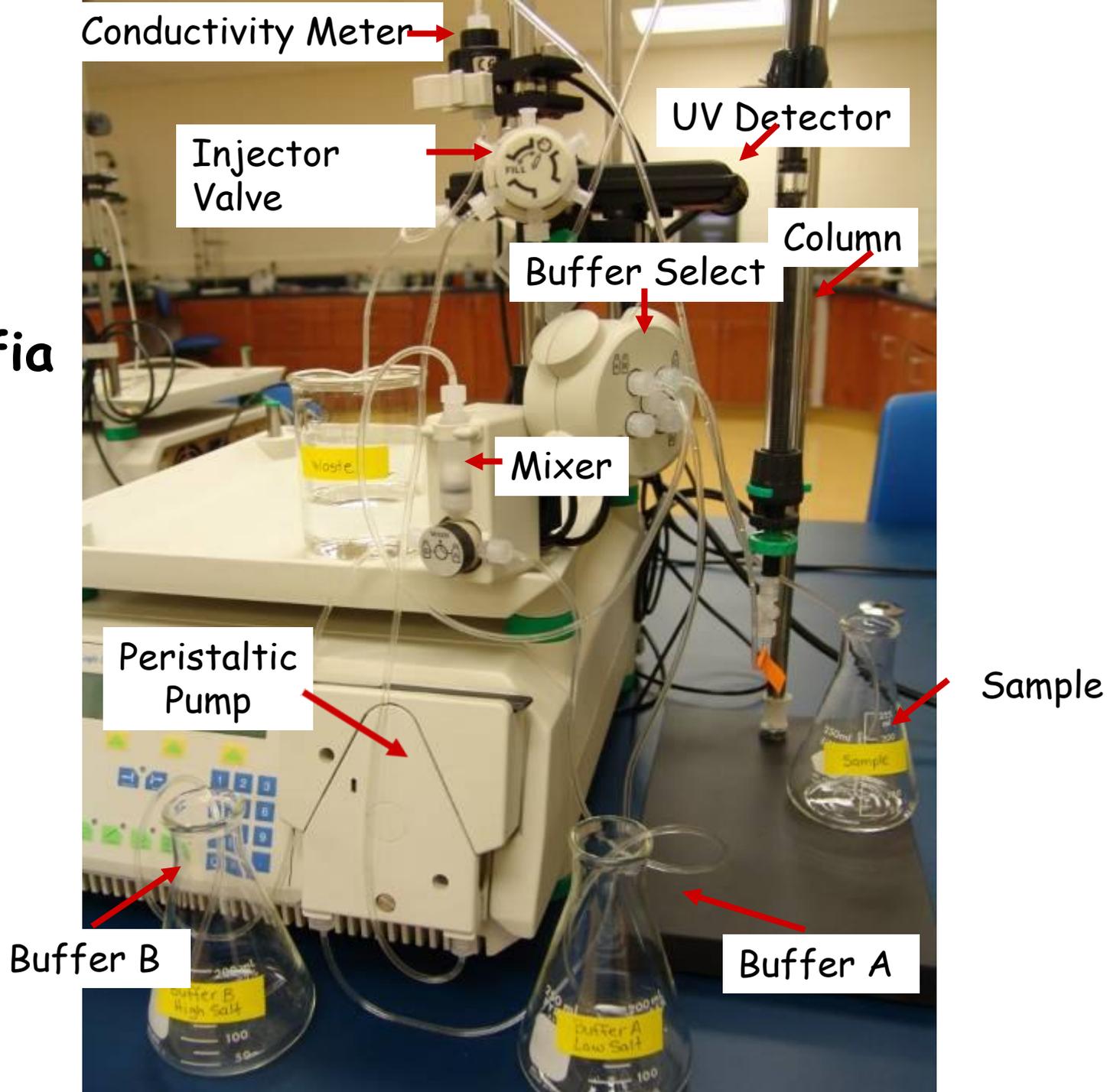
Il principio della separazione cromatografica su colonna



Il campione è caricato sulla fase stazionaria; gli analiti si muovono a differenti velocità attraverso la fase stazionaria in funzione delle loro proprietà, della natura della fase stazionaria e di quella mobile (coefficiente di distribuzione /ripartizione).

Mentre gli analiti della miscela si separano in colonna, l'eluato è raccolto in una serie di tubi che vengono definiti **frazioni**

Cromatografia líquida (LC)



Cromatografia liquida ad elevate prestazioni HPLC

High-performance Liquid Chromatography



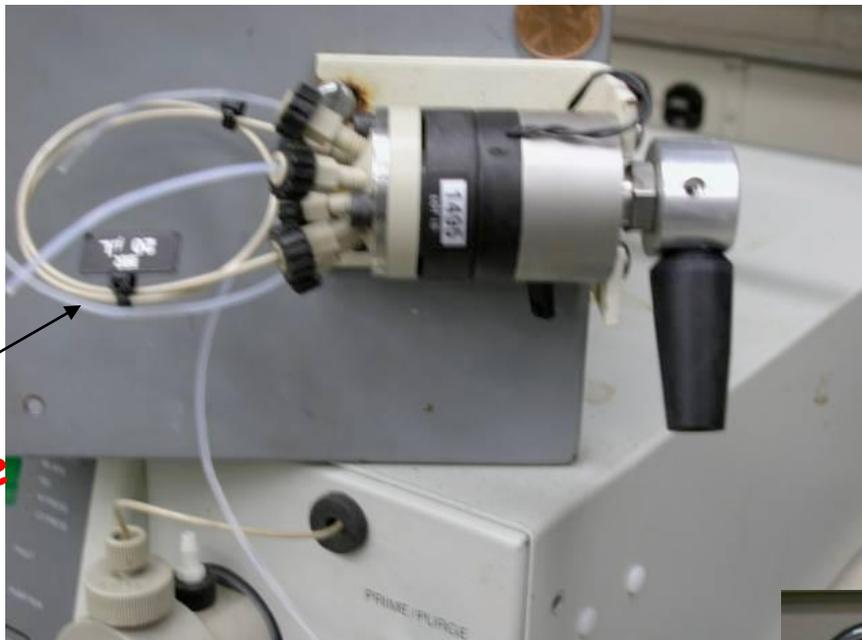
HPLC 50 MPa

pound-force per square inch (psi) (lbf/in²) kilopascal (kPa) 6,894757

Colonne cromatografiche



Injector Manual

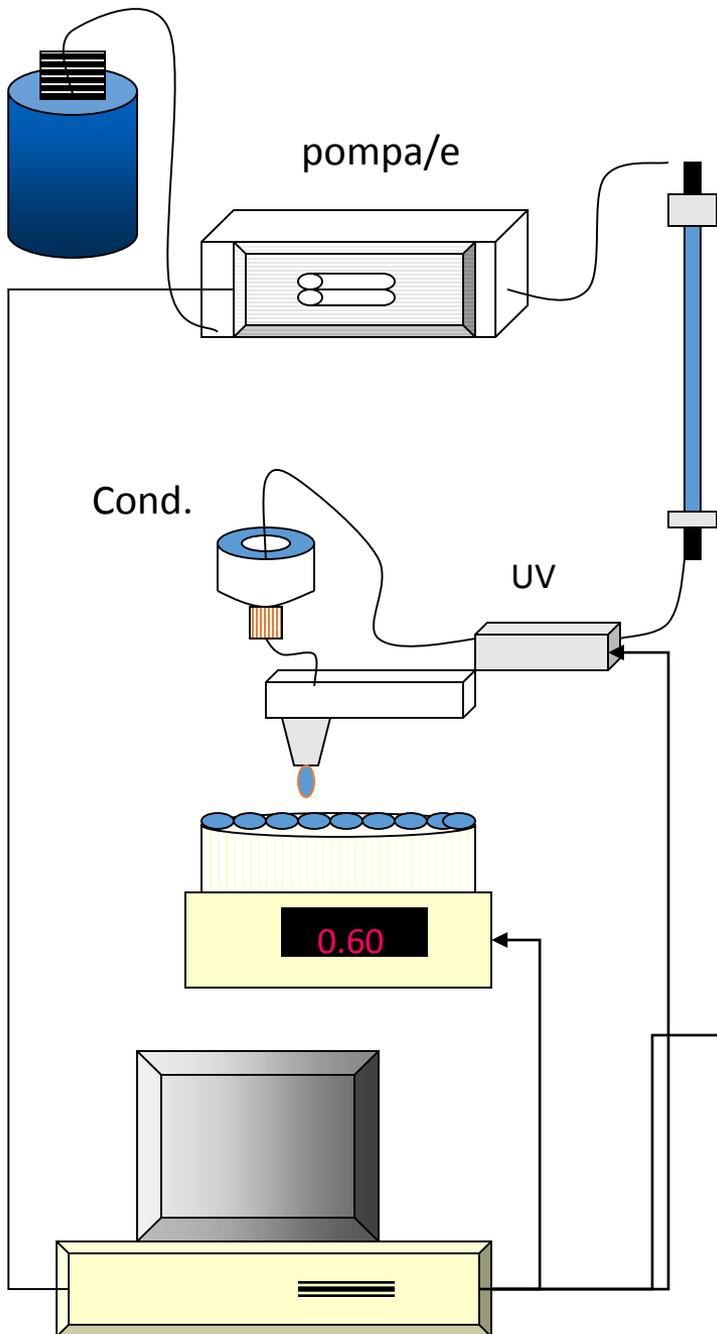


Sample
loop

Pump



FPLC: paradigma dei sistemi automatizzati



Tipo di tecnica

pressione

pompe

FPLC LP

10-50 psi

peristaltiche

FPLC MP

20-350 psi

pistone

FPLC HP

100-2500 psi

reciprocanti

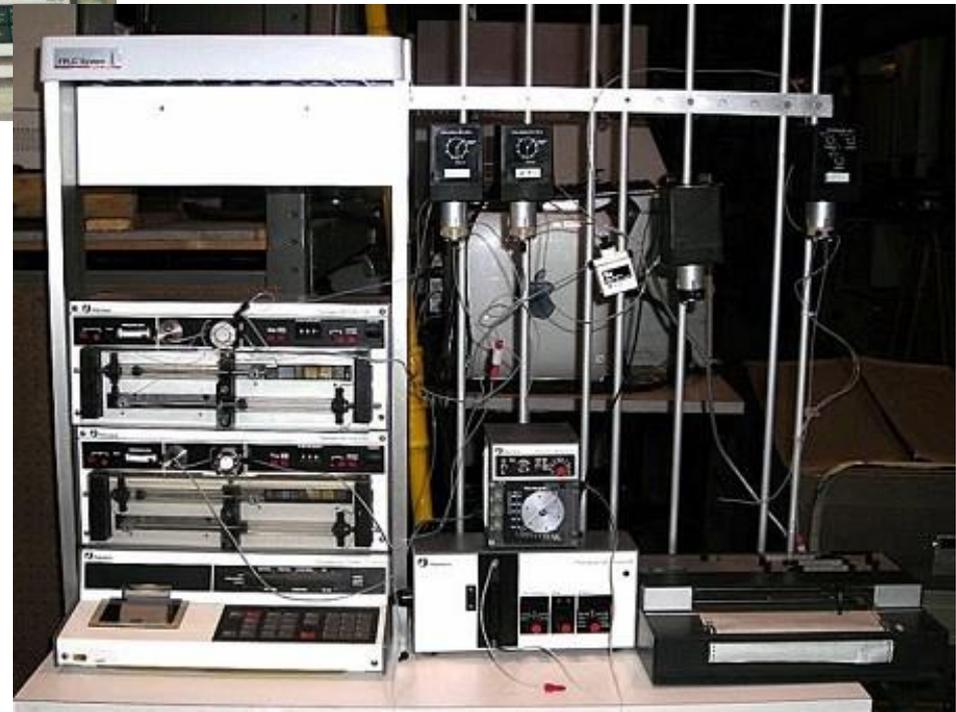
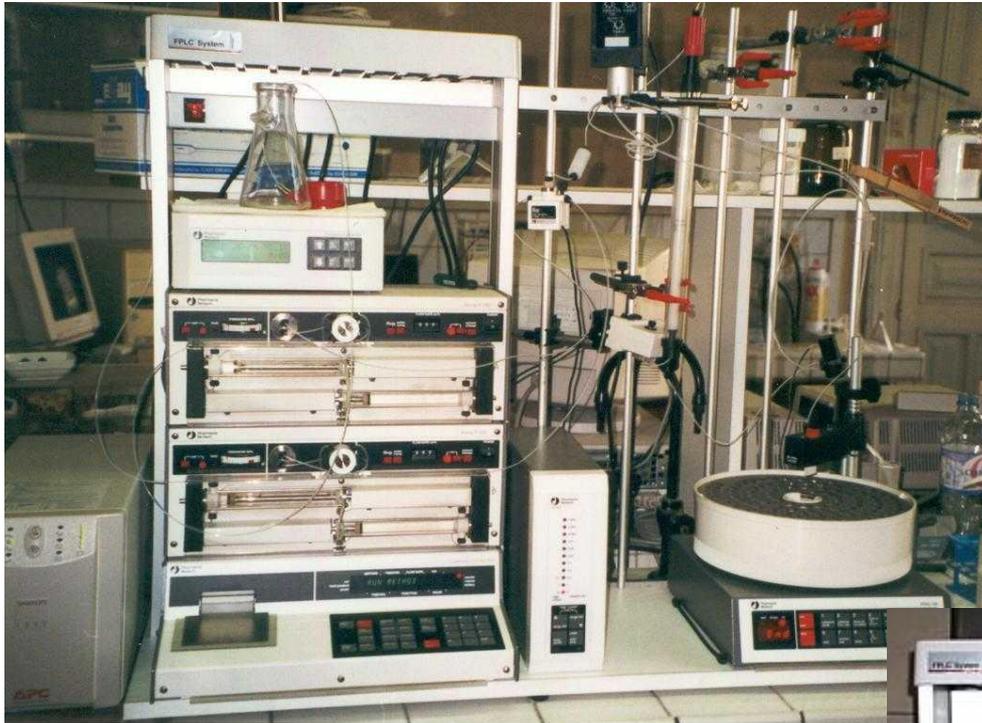
registratore

pound-force per square inch (psi) (lbf/in²)

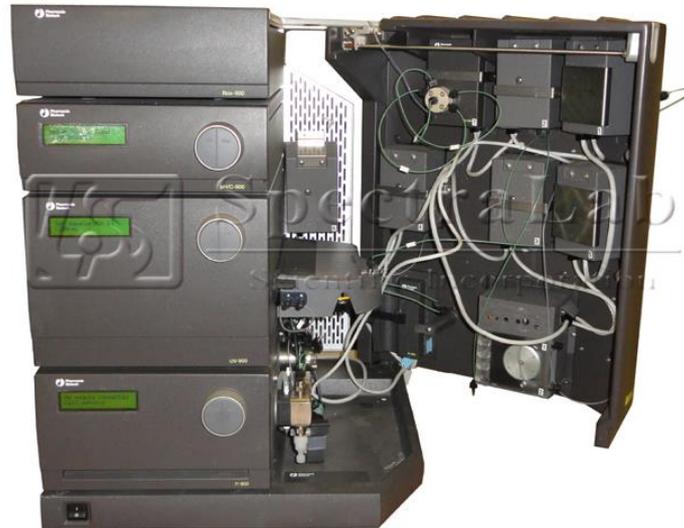
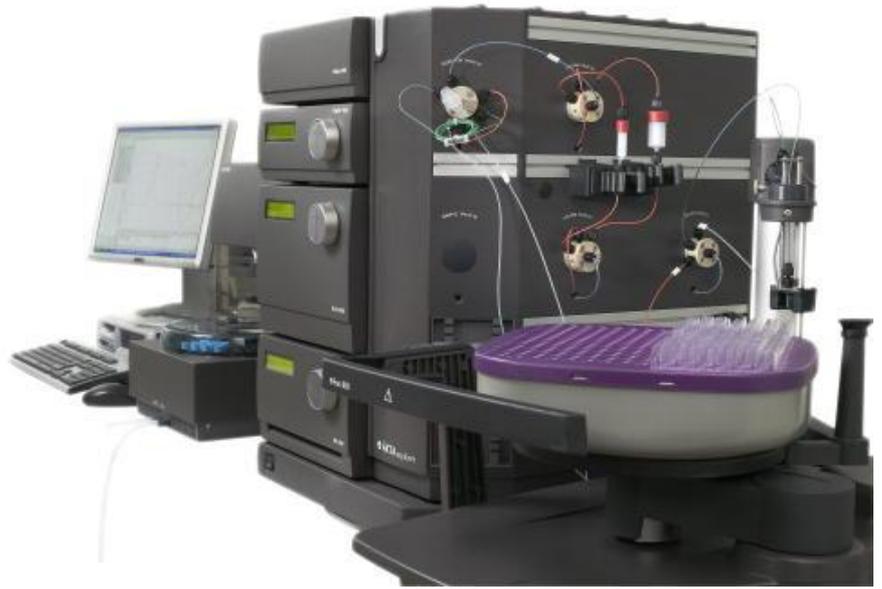
kilopascal (kPa)

6,894757

Sistema FPLC



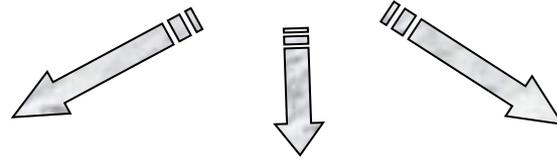
Sistema AKTA Explorer



ÄKTA pure



CROMATOGRAFIA LIQUIDA (L.C.)



Scambio ionico

(~~Ion exchange chromatography~~)

Esclusione molecolare

(~~Size-exclusion chromatography~~)

Affinità

(~~Affinity chromatography~~)

- Separa sulla base delle dimensioni molecolari

- Utilizzo nelle fasi tardive di una purificazione

- La risoluzione dipende:
 - dalla lunghezza della colonna
 - dalle proprietà della resina
 - materiale (silice, gel)
 - granulometria
 - porosità
 - resistenza (rigidità)
 - dal volume del campione caricato

- Requisiti strumentali da semplici a sofisticati (per caduta, FPLC, HPLC)

- Sulla base di affinità molecolari

- nelle fasi precoci

- La risoluzione dipende:
 - dalla sua affinità
 - dalla "capacità" della resina (porosità)

- Requisiti strumentali semplici o nessuno (per caduta, *batch*)

- Sulla base della carica netta (+ o -)

- nelle fasi precoci, ma non solo

- La risoluzione dipende:
 - dal pH dell'eluente
 - dal pl delle proteine da separare
 - dalla "capacità della resina (porosità)

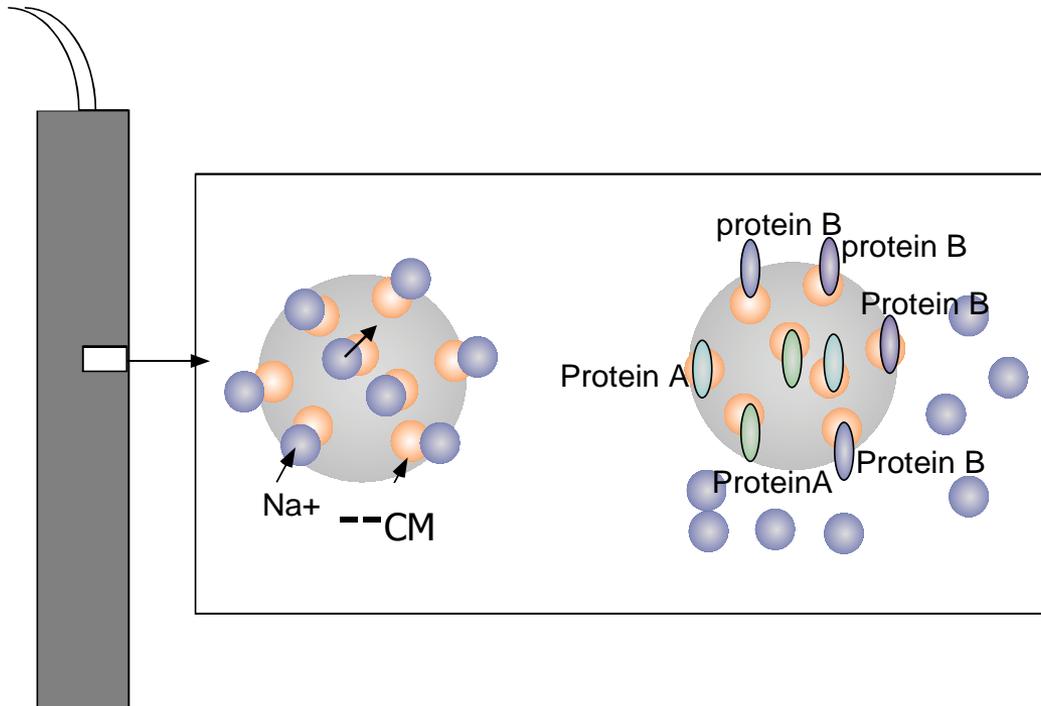
- Requisiti strumentali da semplici a sofisticati (per caduta, FPLC e sue evoluzioni)

Cromatografia a scambio ionico

La cromatografia a scambio ionico sfrutta le proprietà elettrostatiche delle proteine. Sulla matrice insolubile si immobilizzano i gruppi ionizzabili (la fase stazionaria). Le proteine di carica opposta si legano alla fase stazionaria, mentre altre proteine eluiscono attraverso la colonna. Dopo il lavaggio, le proteine legate possono essere eluite incrementando la forza ionica o variando il pH.

Le proteine sono cariche positivamente se il pH della soluzione è $< pI$; e dovrebbero legarsi a fasi stazionarie con gruppi carichi negativamente, ovvero a scambiatori cationici.

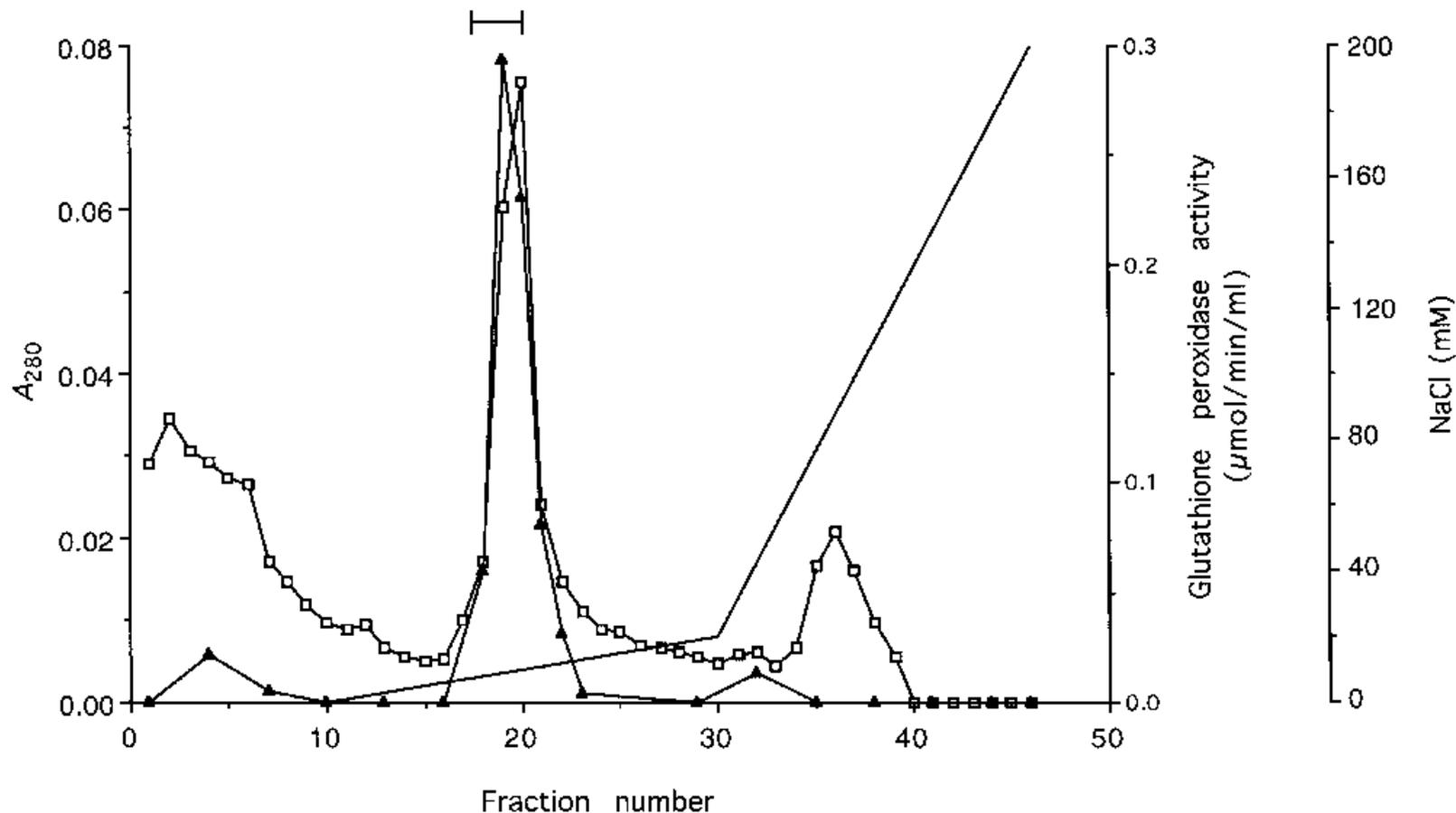
Le proteine sono invece cariche negativamente se il pH della soluzione è $> pI$; dovrebbe legarsi a gruppi carichi positivamente ovvero a scambiatori anionici.



Esempi di scambiatori cationici sono il carbossimetile (CM) e il sulfopropile (SP). Esempio di scambiatori anionici è il dietilamminoetile (DEAE).

Purificazione delle proteine: cromatografie

Purification of recombinant GSTT2-2 by Mono Q FPLC anion-exchange chromatography



Biochemical Journal

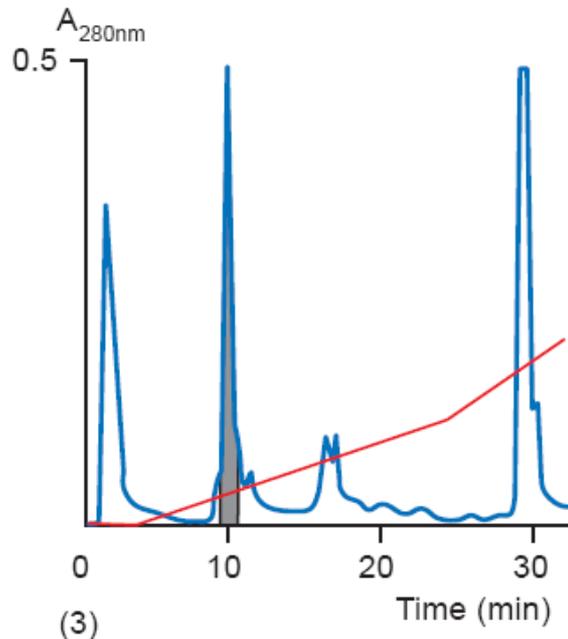
www.biochemj.org

Biochem. J. (1996) 315, 727-732

Purificazione in due passaggi di una cellulasi

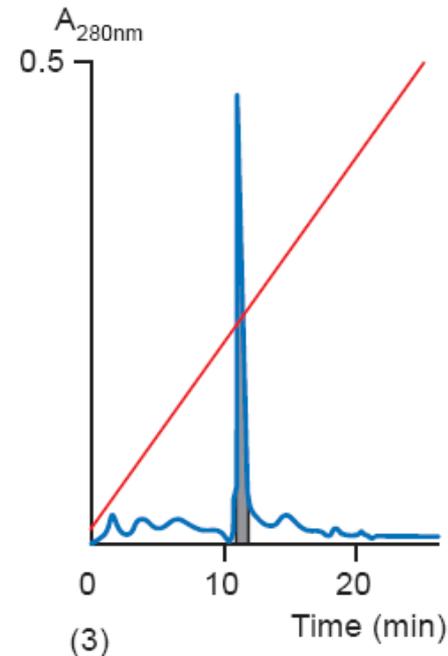
Scambo anionico

Sample: 500 μ l of *Trichoderma reesei* crude cellulases in buffer A, 2.5 mg
Column: Mono Q™ HR 5/5
Flow: 1.0 ml/min
Buffer A: 20 mM Tris-HCl, pH 7.6
Buffer B: A + 0.5 M NaCl
Gradient: 0% B for 4 min, 0-40% in 21 min, 40-100% B in 15 min



Scambo cationico

Sample: Peak 3 from step 1
Column: Mono S™ HR 5/5
Flow rate: 1.0 ml/min
Buffer A: 20 mM acetate, pH 3
Buffer B: A + 0.2 M NaCl
Gradient: 0-100% B in 26 min



Cromatografia ad esclusione molecolare

La separazione delle proteine è basata sulle loro dimensioni:

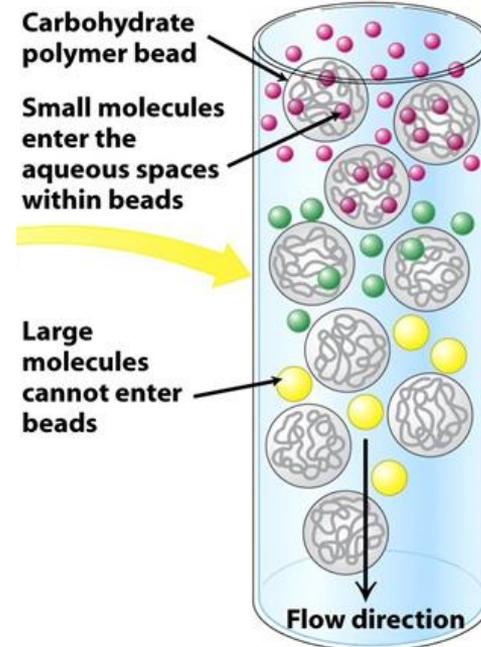
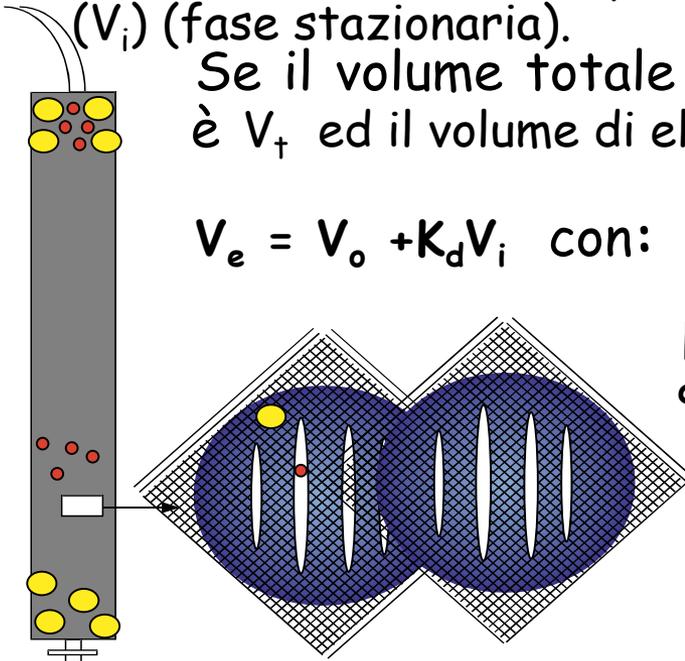
Il gel è costituito da polimeri di destrano (Sephadex), agarosio (Sepharose), poliacrilammide (Sephacryl or BioGel P).

Ogni particella che costituisce la matrice contiene pori di una certa dimensione; le molecole più grandi passano all'esterno dei pori e quindi eluiscono più velocemente: le molecole più piccole attraversano i pori e quindi eluiscono più lentamente. Le molecole quindi si distribuiscono tra il volume all'esterno delle particelle (V_0) (fase mobile) e il volume all'interno (V_i) (fase stazionaria).

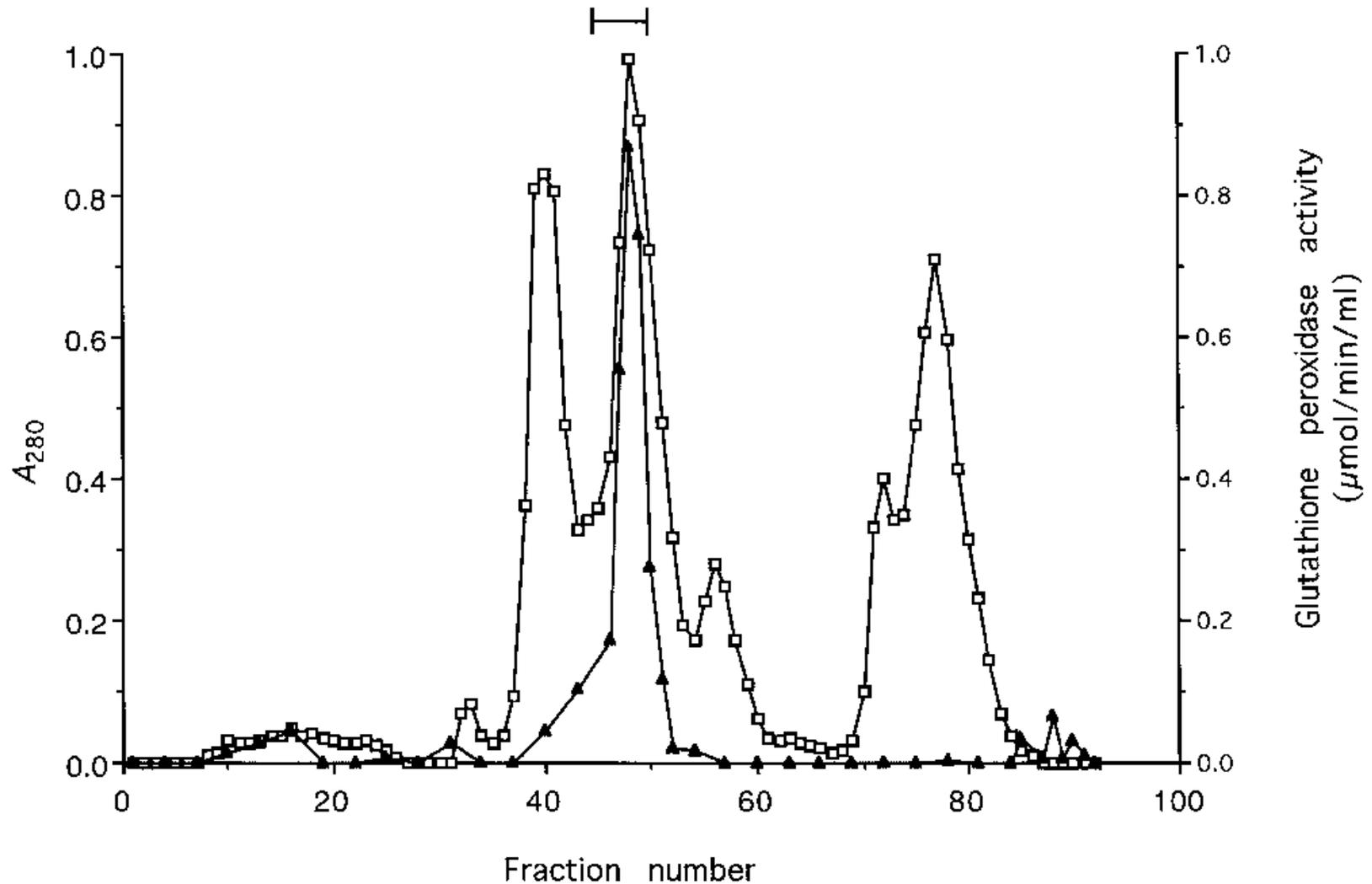
Se il volume totale della colonna è V_t ed il volume di eluizione è V_e

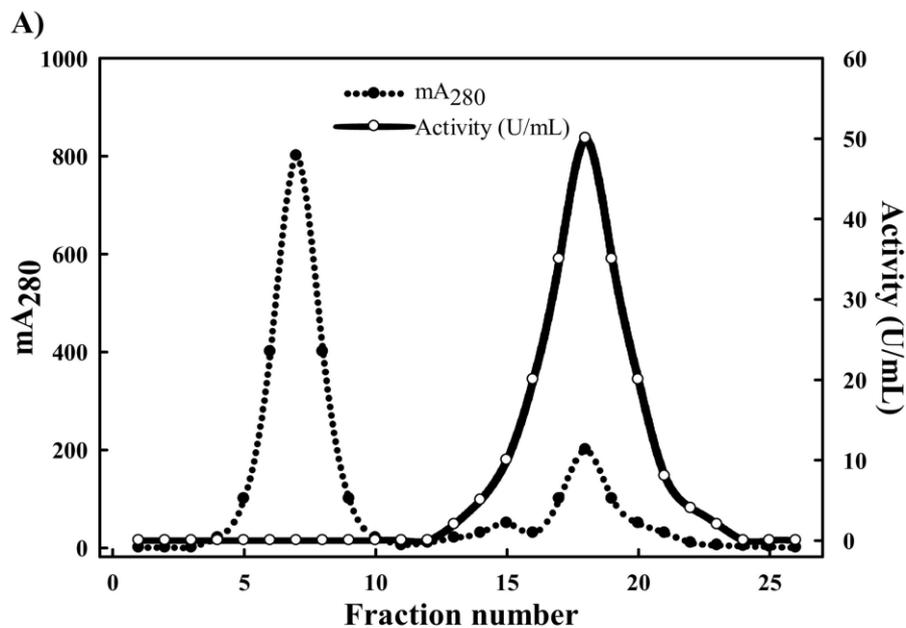
$$V_e = V_0 + K_d V_i \quad \text{con: } 0 \leq K_d \leq 1$$

K_d = coefficiente di distribuzione

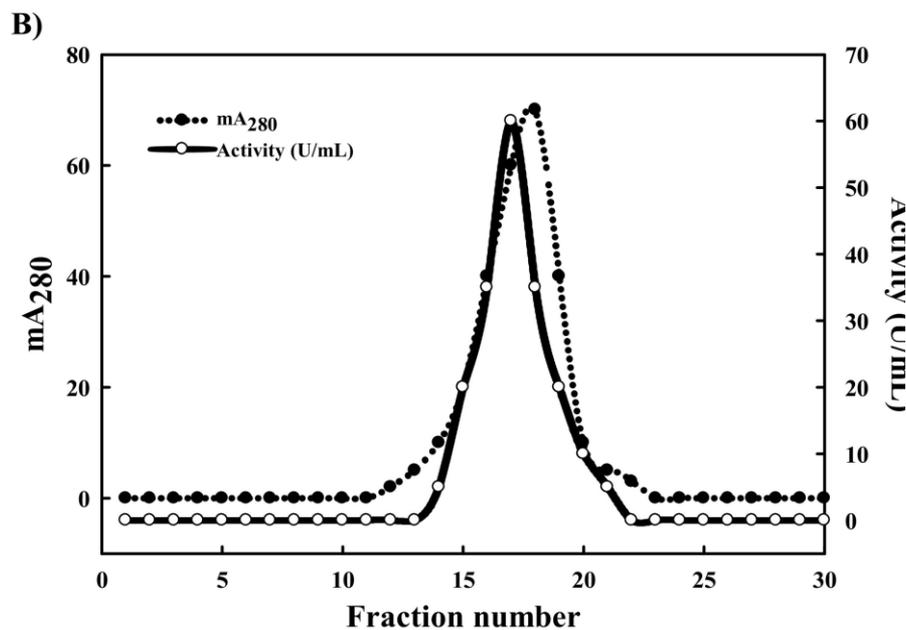


Gel-filtration chromatography of recombinant GSTT2-2 on Sephacryl S-200





(A) Elution profile for size exclusion chromatography of β -amylase on Superdex 200 column performed on ÄKTA FPLC. Elution was carried out with 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 containing 0.1 M NaCl.
 (B) purified β -amylase elution profile on Superdex 200.



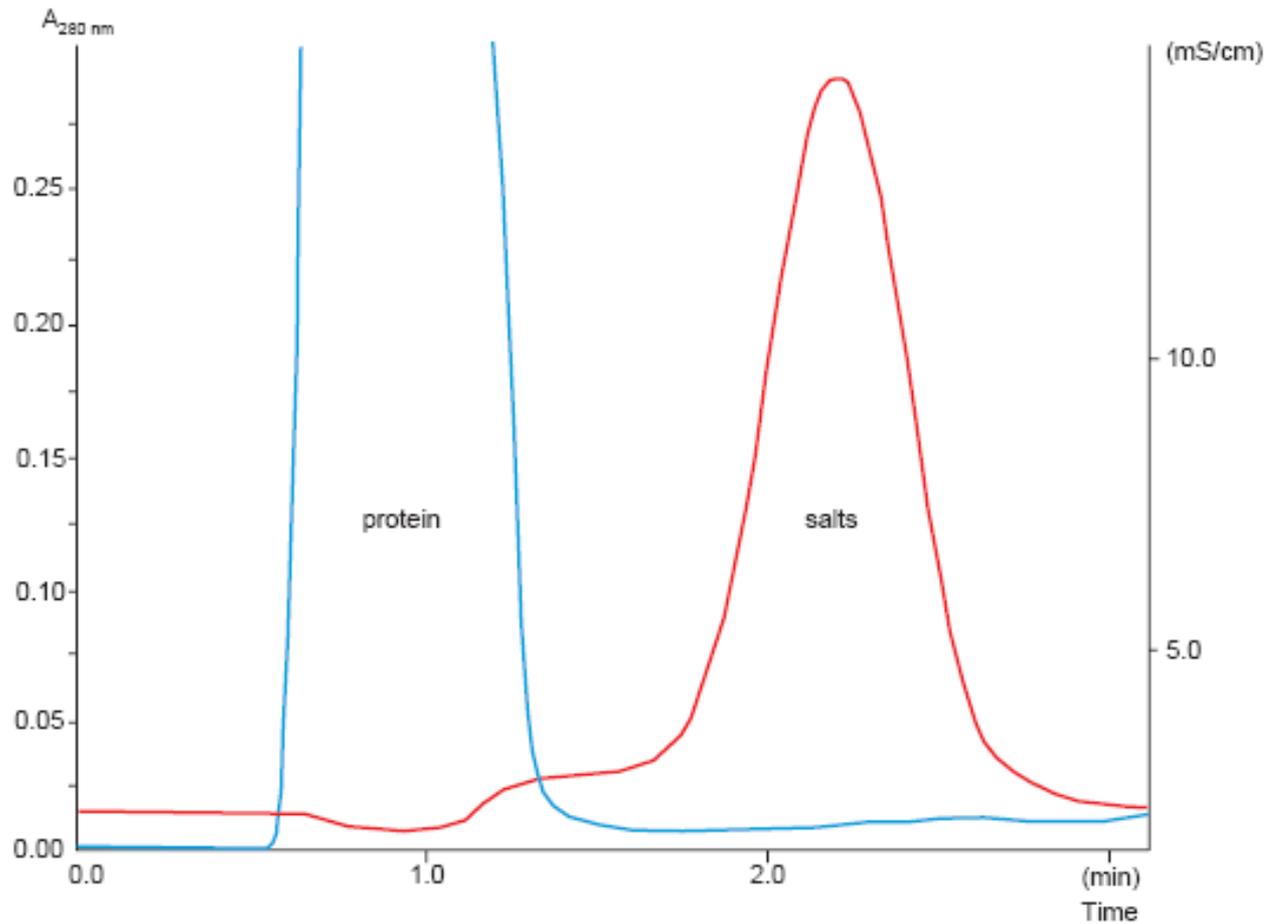
[International Journal of Biological Macromolecules](#)

[Volume 111](#), May 2018, Pages 148-157

An antioxidant rich novel β -amylase from peanuts (*Arachis hypogaea*): Its purification, biochemical characterization and potential applications



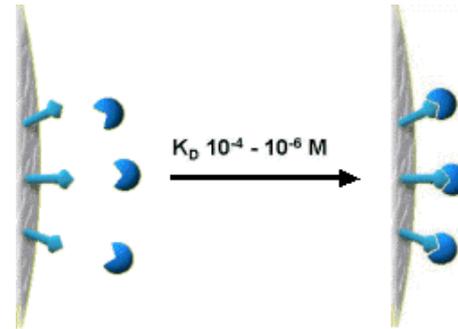
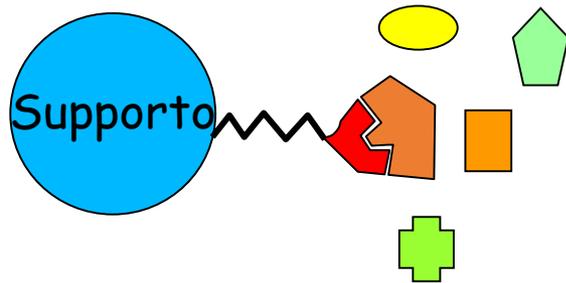
Desalting



Purificazione delle proteine: cromatografie

Cromatografia d'affinità

legame specifico tra due molecole, una delle quali è immobilizzata su di una matrice solida e costituisce quindi la fase stazionaria.



Valori ottimali di affinità

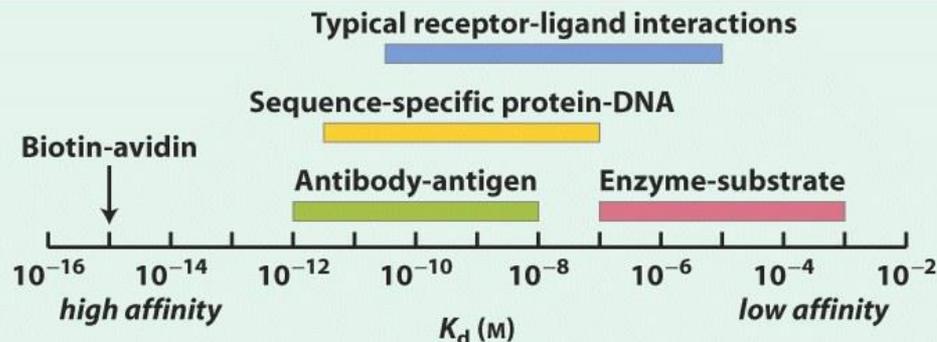
- $K_D > 10^{-4} \text{ M}$: legame troppo debole. Eluzione spontanea e picco allargato
- $K_D < 10^{-16} \text{ M}$: difficile eluire senza usare condizione drastiche

K_D = costante di dissociazione del complesso proteina-ligando

TABLE 5-1

Some Protein Dissociation Constants

Protein	Ligand	K_d (M)*
Avidin (egg white) [†]	Biotin	1×10^{-15}
Insulin receptor (human)	Insulin	1×10^{-10}
Anti-HIV immunoglobulin (human) [‡]	gp41 (HIV-1 surface protein)	4×10^{-10}
Nickel-binding protein (<i>E. coli</i>)	Ni^{2+}	1×10^{-7}
Calmodulin (rat) [§]	Ca^{2+}	3×10^{-6} 2×10^{-5}



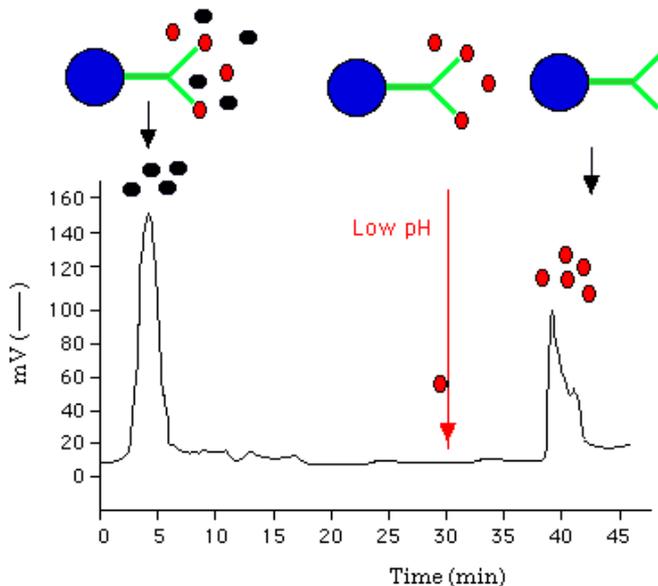
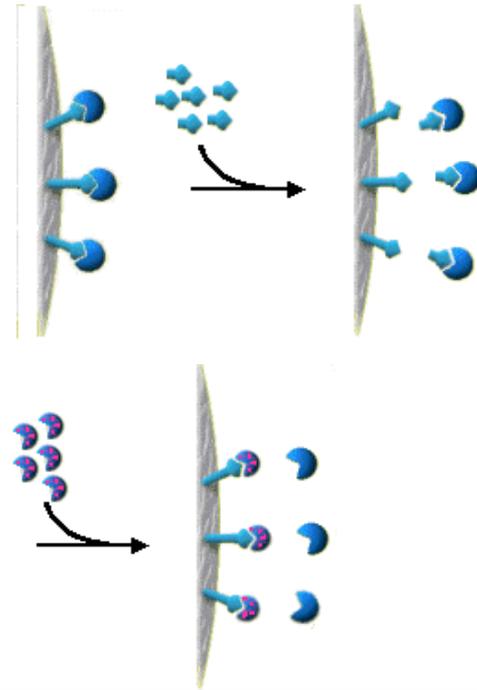
The range of dissociation constants for interactions in biological systems. Colors denote the range for each class of interaction. A few interactions, such as that between the protein avidin and the enzyme cofactor biotin, fall outside the normal ranges. The avidin-biotin interaction is so tight it may be considered irreversible. Sequence-specific protein-DNA interactions reflect proteins that bind to a particular sequence of nucleotides in DNA, as opposed to general binding to any DNA site.

*A reported dissociation constant is valid only for the particular solution conditions under which it was measured. K_d values for a protein-ligand interaction can be altered, sometimes by several orders of magnitude, by changes in the solution's salt concentration, pH, or other variables.

‡Calmodulin has four binding sites for calcium. The values shown reflect the highest- and lowest-affinity binding sites observed in one set of measurements.

Eluzione specifica

- Ligando libero (ad es., un altro inibitore)
- Competitore (imidazolo per proteine "His tagged")



← Eluzione aspecifica

Some commercially available affinity media

macromolecule

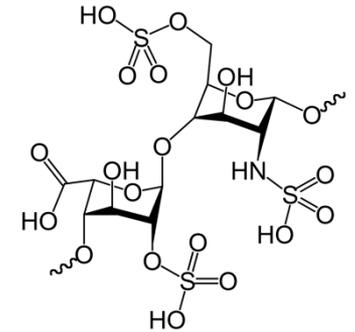
- ❖ Many growth factors,
- ❖ coagulation factors,
- ❖ restriction endonucleases
- ❖ nucleic acid binding proteins

Calmodulin-regulated

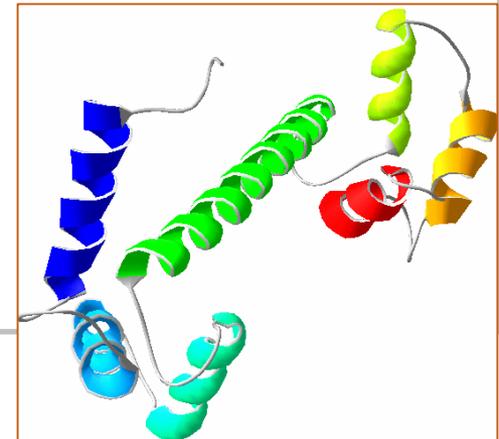
- ❖ kinases,
- ❖ phosphodiesterases,
- ❖ cyclases and other enzymes

ligand

Heparin



Calmodulin



Some commercially available affinity media

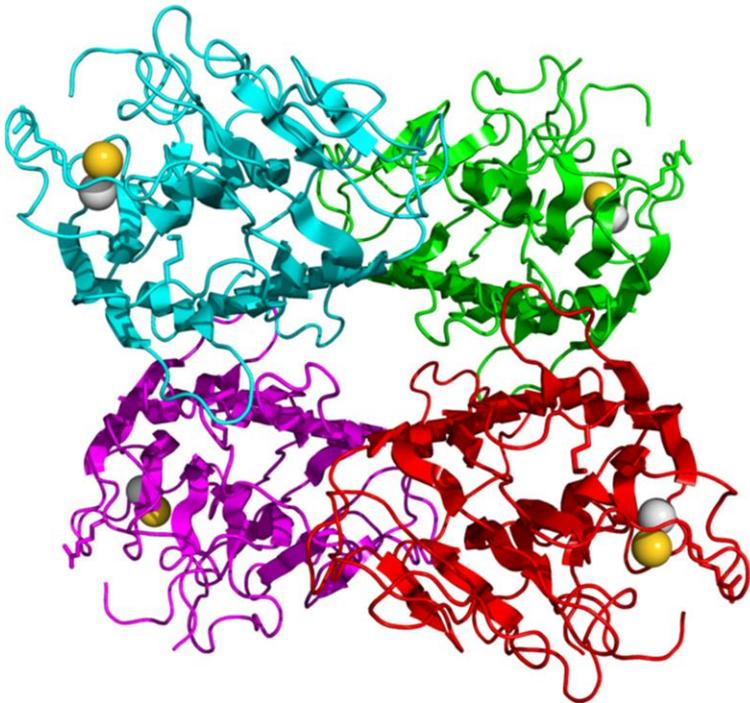
for antibodies

Protein A → binds to Fc region of IgG,
(*Staphylococcus aureus*) especially from mammals,
more specific for certain IgG
subclasses

Protein G → does not cross-react with human
(*Streptococcus*) IgA and IgM; binds to more
subclasses of IgG and from a
broader range of eukaryotic
species

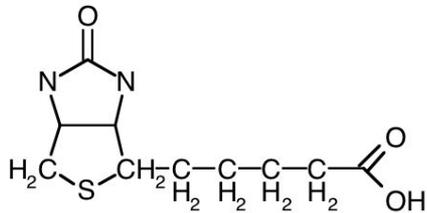
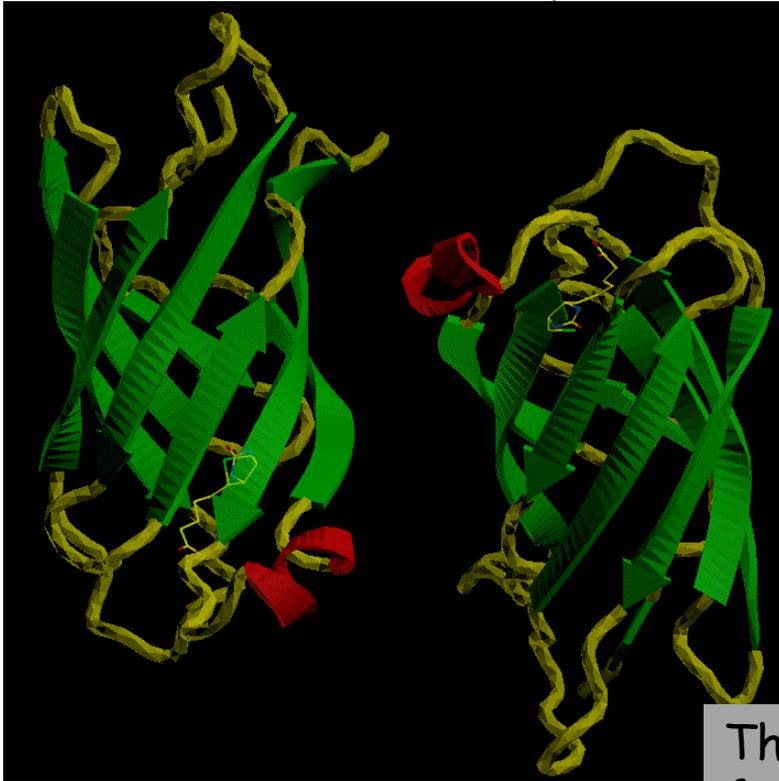
Cromatografia su lectine

- Le lectine interagiscono con **residui glucidici specifici**
- Isolamento di glicoproteine enzimatiche e di membrana (antigeni di superficie), proteine plasmatiche (immunoglobuline), ormoni glicoproteici (HCG, LH, FSH), cellule
- Eluzione per competizione specifica con uno zucchero
- Le lectine possono essere isolate immobilizzando glucidi

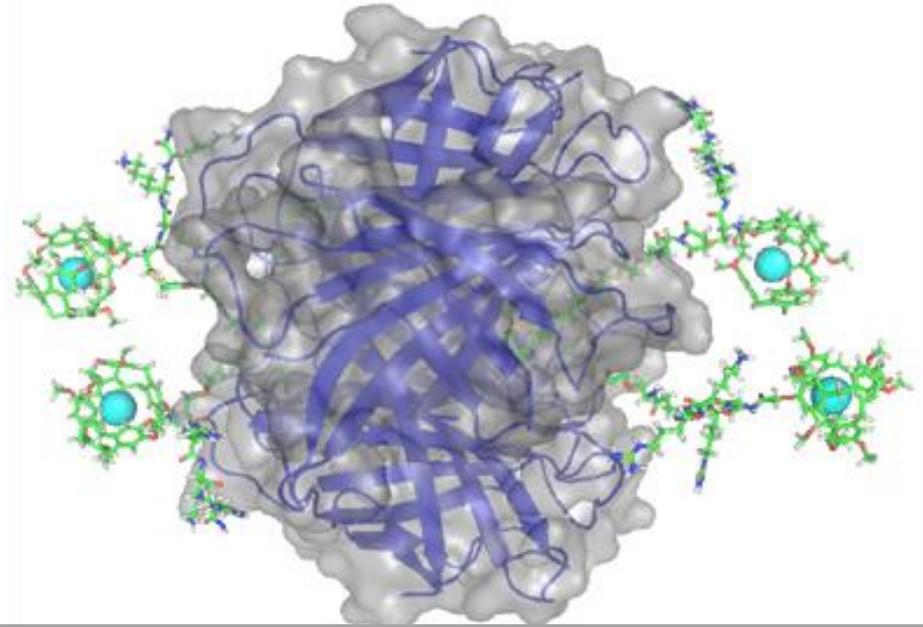


Crystallographic structure of a tetramer of jack bean **concanavalin A** (the monomers are colored cyan, green, red, and magenta respectively). Calcium (gold) and manganese cations (grey) are depicted as spheres.

Avidin and streptavidin



Tetramero di avidina con le quattro molecole di biotina



The avidin fold is dominated by 8 β -strands which form an antiparallel β -barrel enclosing the internal biotin binding site. These 8 strands are linked by a succession of seven +1 connections (L1 to L7). These loops, although they vary in size and conformation, are all typical of short β -hairpins. The loop L1 is a short, typical β -hairpin. A short 3_{10} helix, directly before strand A, helps to close off one end of the barrel.

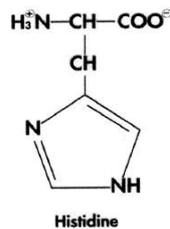
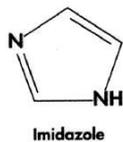
Ion Metal Chelate Affinity Chromatography

L'**IMAC**^o si basa sul legame differenziale di alcune molecole per gli ioni metallici (**Zn, Cu, Cd, Mg, Co, Ni**) immobilizzati su matrici tradizionali.

Alcuni amminoacidi (**His, Cys, Trp**) formano complessi con i metalli. Le proteine o i peptidi che contengono questi amminoacidi si legano al supporto ad un pH intorno alla neutralità.

L'eluizione si effettua:

- Riducendo il pH
- Con l'aggiunta di un competitore (**imidazolo per l'His**)
- Con l'aggiunta di EDTA nel tampone



Purificazione delle proteine: cromatografie

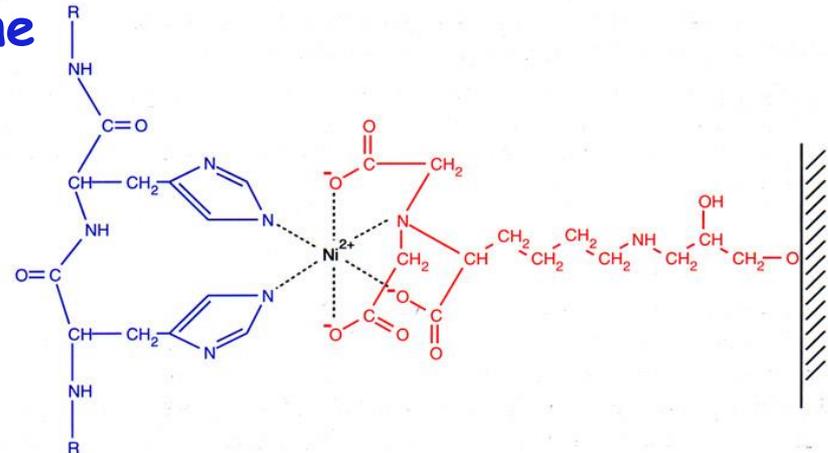
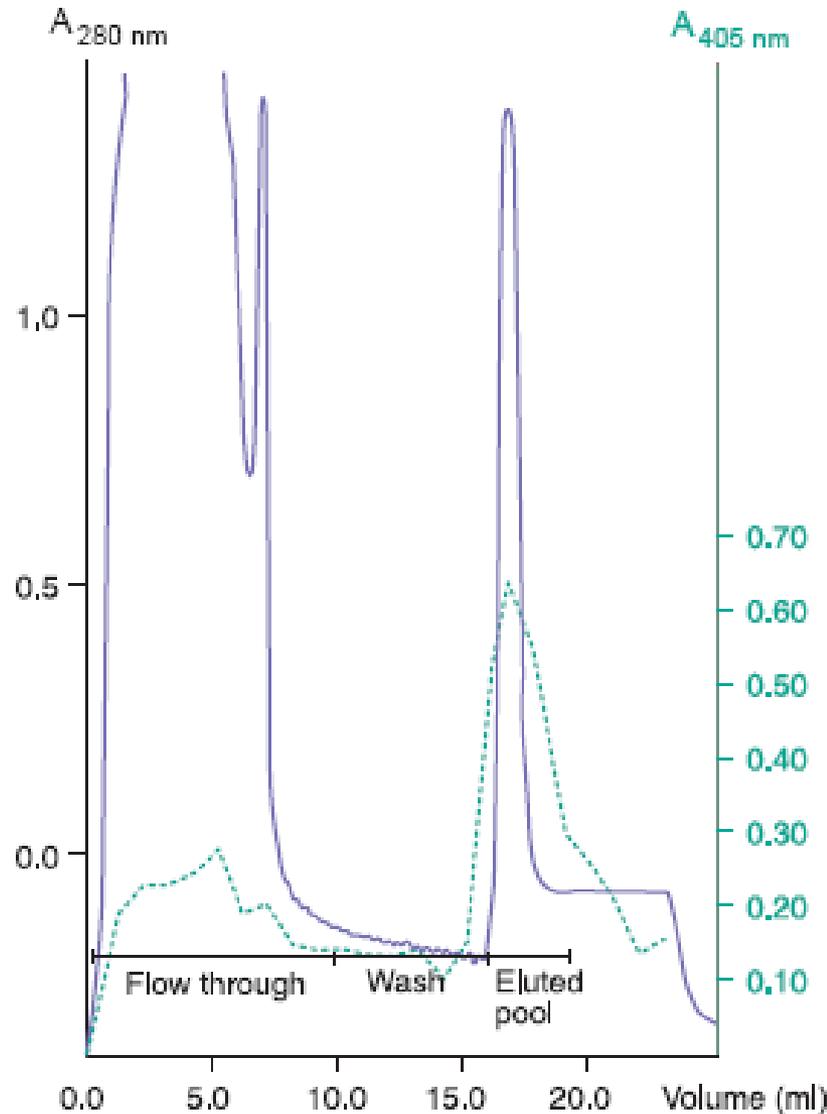
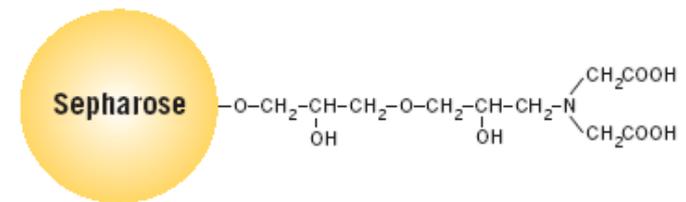


Figure 5. Interaction between neighboring residues in the 6xHis tag and Ni-NTA matrix.

Immobilized metal ion Affinity Chromatography (IMAC)



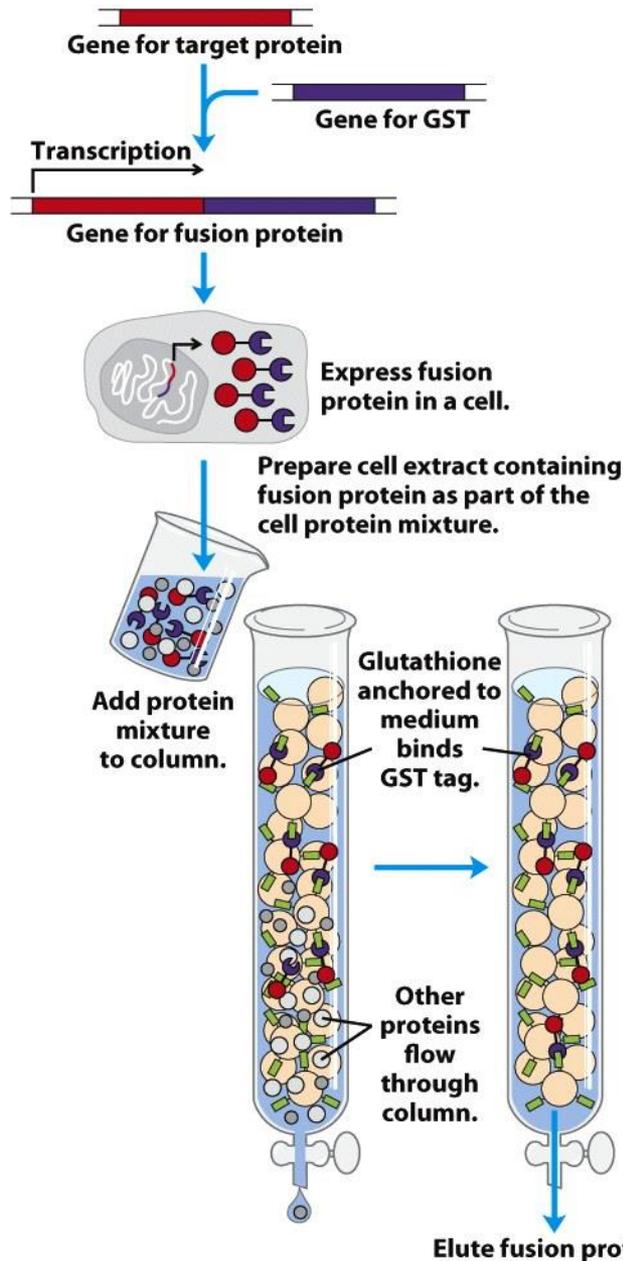
Column: HiTrap Chelating, 1 ml
Sample: 5 ml cytoplasmic extract containing (His)-tagged glutathione-S-transferase
Binding buffer: 20 mM phosphate buffer, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4
Elution buffer: 20 mM phosphate buffer, 0.5 M NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.4
Flow: 2 mL/min (312 cm/h)



Purificazione di proteine ricombinanti marcate ("*tagged*")

- Si sfrutta l'interazione specifica di un ligando immobilizzato con un polipeptide ("*tag*") fuso con la proteina da purificare
- Si può inserire anche una giunzione per favorire il "taglio" dopo l'eluzione del "*tag*"
- Alcuni esempi:
 - Glutathione S-transferasi (26 kDa): GSH
 - 6 x His IMAC

The use of tagged proteins in protein purification

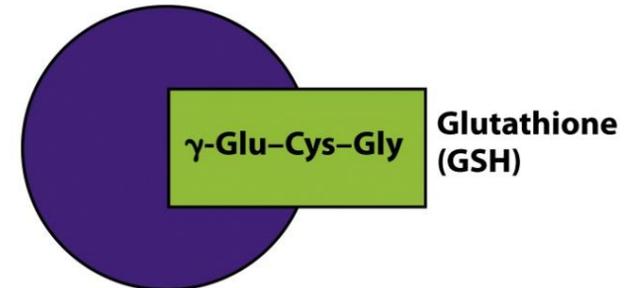


Ligando immobilizzato



GLUTATHIONE (GSH)

gamma-glutamyl-cysteinyl-glycine

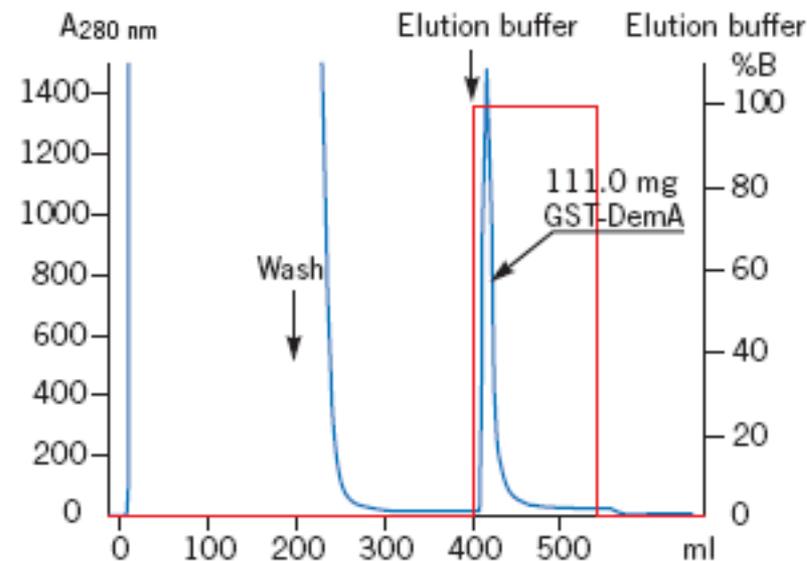


Glutathione-S-transferase (GST)

Figure 9-12a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

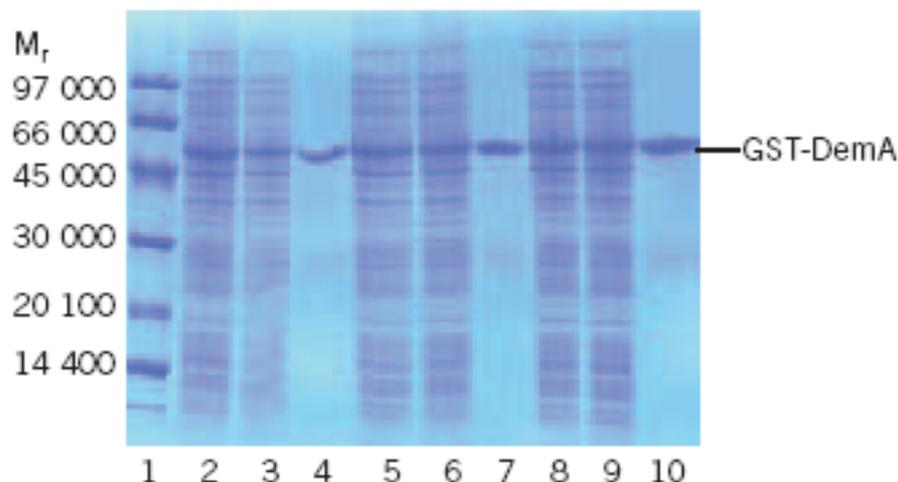
Purificazione delle proteine: cromatografie

c) GSTPrep FF 16/10



<i>Column:</i>	GSTPrep FF 16/10
<i>Sample:</i>	200 ml extract from <i>E. coli</i> expressing GST-DemA
<i>Binding buffer:</i>	PBS, pH 7.4
<i>Elution buffer:</i>	50 mM Tris-HCl, pH 8.0 with 10 mM reduced glutathione
<i>Flow:</i>	Sample loading: 5 ml/min Wash and elution: 10 ml/min
<i>Chromatographic procedure:</i>	100 ml binding buffer, 200 ml sample, 200 ml binding buffer, 140 ml elution buffer, 100 ml binding buffer
<i>System:</i>	AKTAexplorer

Electrophoresis: SDS-PAGE, 12.5% gel, Coomassie Blue staining



- Lane 1:** Low Molecular Weight (LMW) calibration kit, reduced
- Lane 2:** Extract of *E. coli* expressing GST-DemA, 1 g cell paste/5 ml
- Lane 3:** Flow-through from GStrap FF 1 ml
- Lane 4:** GST-DemA eluted from GStrap FF 1 ml
- Lane 5:** Extract of *E. coli* expressing GST-DemA, 1 g cell paste/5 ml
- Lane 6:** Flow-through from GStrap FF 5 ml
- Lane 7:** GST-DemA eluted from GStrap FF 5 ml
- Lane 8:** Extract of *E. coli* expressing GST-DemA, 1 g cell paste/5 ml
- Lane 9:** Flow-through from GSTPrep FF 16/10
- Lane 10:** GST-DemA eluted from GSTPrep FF 16/10

Cromatografia di adsorbimento (solido-liquido)

Alcuni materiali solidi hanno la capacità di trattenere le molecole alla loro superficie - sono coinvolte interazione deboli, forze di van der Waals e legami a idrogeno.

I diversi analiti si ripartiscono tra fase mobile e adsorbente in modo diverso a seconda delle relative forze di interazione.

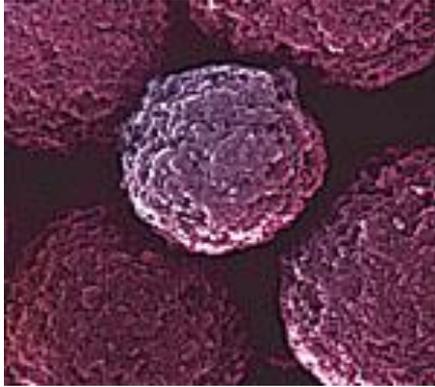
Queste dipendono dalla natura chimica dell'adsorbente, della fase mobile e degli analiti.

Cromatografia di adsorbimento (solido-liquido)

- Un tipico adsorbente è la silice. E' un polimero prodotto a partire dall' acido ortosilicico. I molti gruppi silanolo (Si-OH) rendono la matrice altamente idrofilica. Il loro eccesso puo' essere eliminato derivatizzando con triclorometilsilano.
- Altri adsorbenti comunemente usati sono allumina (ossido d'alluminio) carbone, carbonato di calcio, carbonato di magnesio, carbonato di zinco, ossido di magnesio o cellulosa.
- Fase mobile alcoli, acetone, esteri, idrocarburi.
- La cromatografia di adsorbimento può essere condotta sia su colonna che su strato sottile.
- E' il metodo più comunemente usato per la separazione di composti non ionici, insolubili in acqua, quali trigliceridi, PTH-amminoacidi, vitamine, vari farmaci.

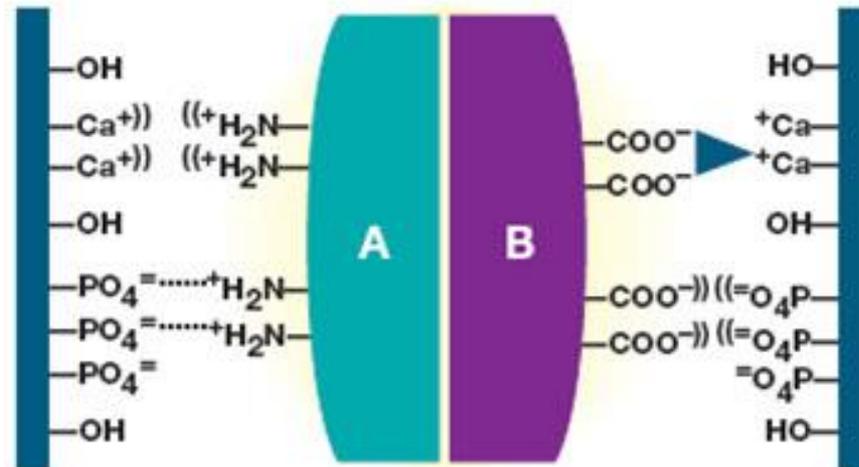
Cromatografia di Adsorbimento

Hydroxyapatite



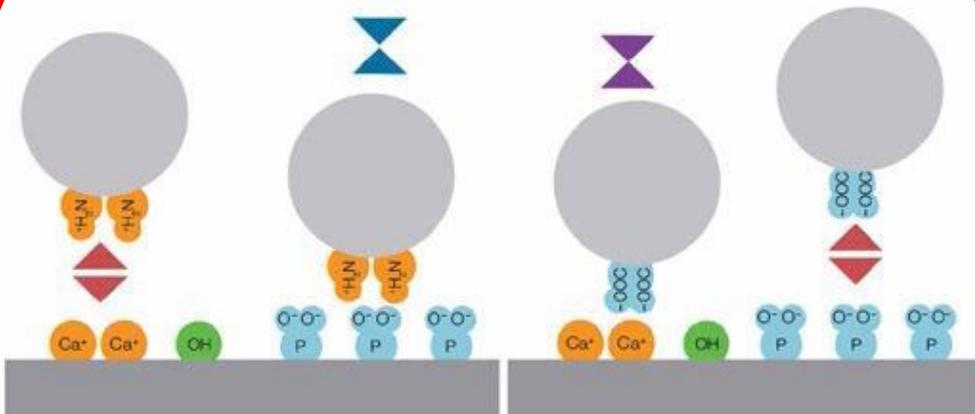
Hydroxyapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$)₂ is a form of calcium phosphate which can be used for the separation and purification of proteins, enzymes, nucleic acids, viruses, and other macromolecules. Hydroxyapatite has unique separation properties and unparalleled selectivity and resolution. It often separates proteins shown to be homogeneous by other chromatographic and electrophoretic techniques.

Il meccanismo di adsorbimento coinvolge ioni Ca^{2+} e PO_4^{--} interazioni elettrostatiche e dipolo-dipolo



Cation exchange

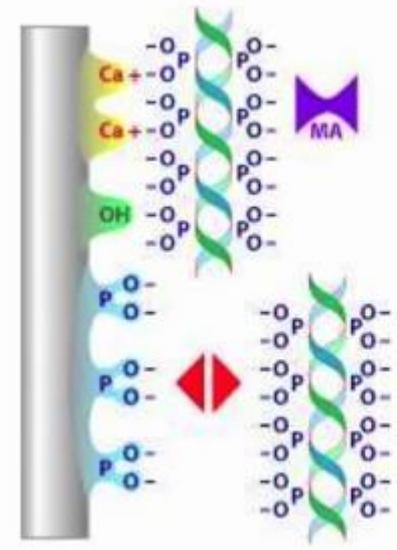
Metal-affinity carboxyl clusters



Schematic representation of CHT binding mechanism. Biomolecule (+); metal affinity (X); electrostatic repulsion (◊); electrostatic attraction (X).

CHT is a spherical, macroporous form of hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), which is formed from the chemical combination of calcium and phosphate salts. Proteins interact at the negatively charged phosphate (P) site via cation exchange and at the positively charged calcium (C) site via metal affinity

Applications of hydroxyapatite chromatography include separation of monoclonal and polyclonal antibodies of different classes, antibodies which differ in light chain composition, antibody fragments, isozymes, supercoiled DNA from linear duplexes, and single-stranded from double-stranded DNA.

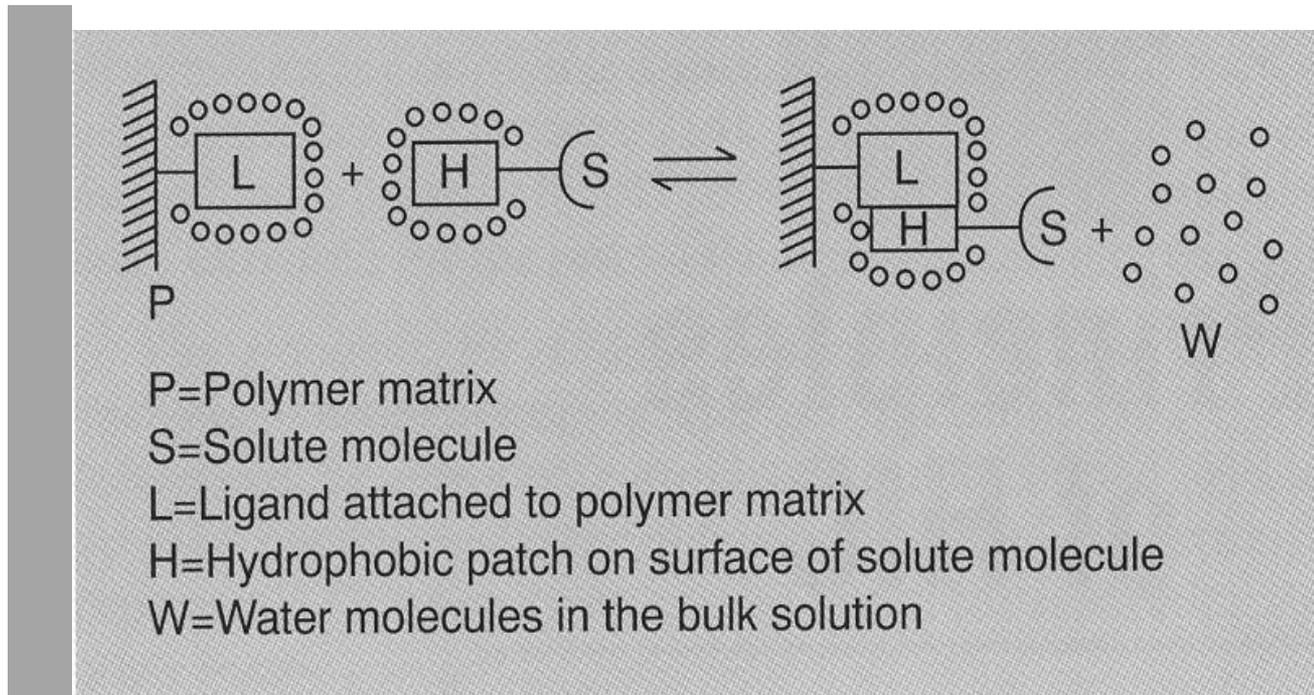


- Phosphoryl residues**
- Similar to carboxyl clusters
 - NaCl causes *stronger* DNA binding by suppressing charge repulsion between phosphates

Cromatografia di adsorbimento: **cromatografia per interazione idrofobica (HIC)**

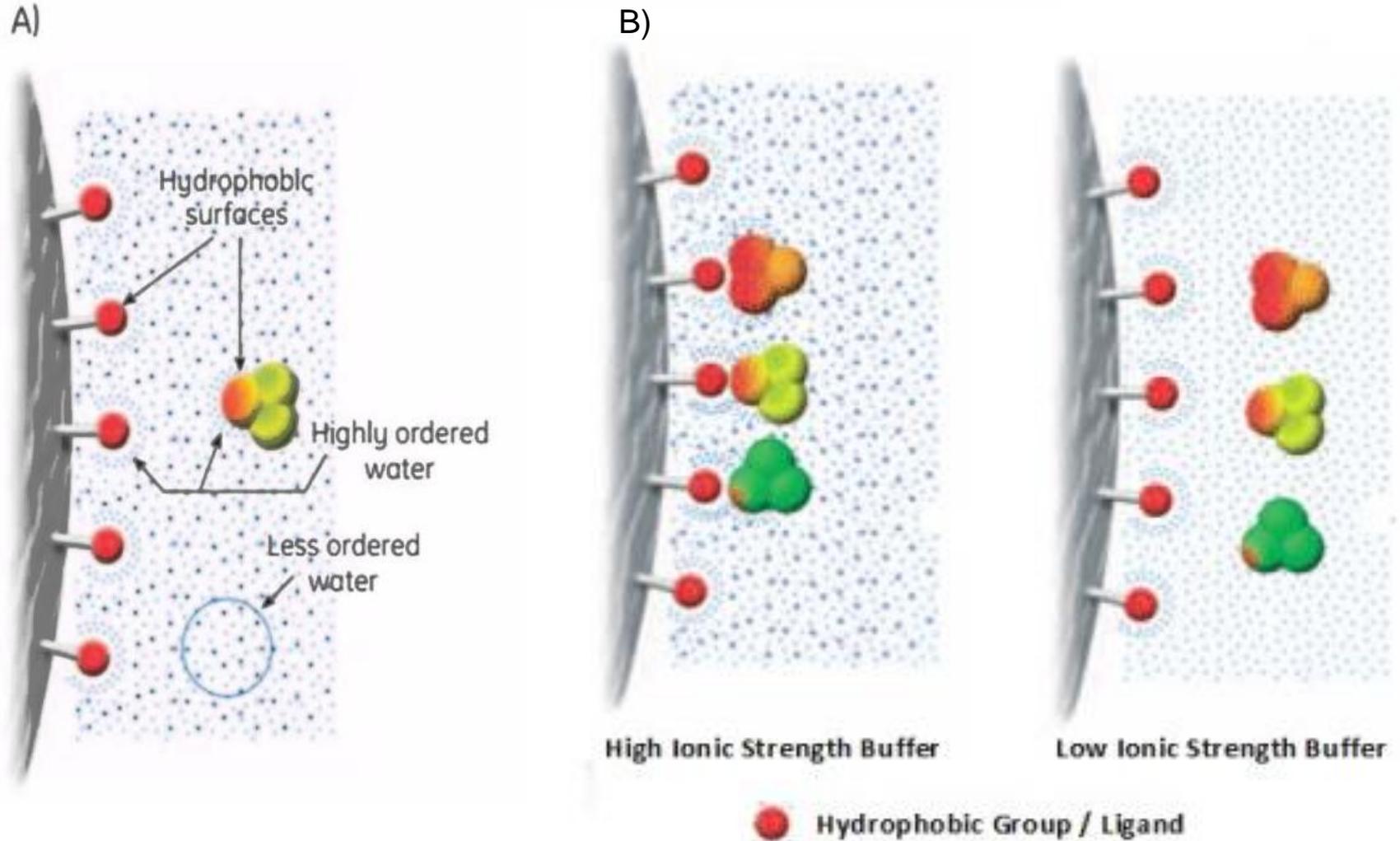
- E' un tipo di cromatografia sviluppato per la purificazione di proteine, le separa sulla base della loro idrofobicità di superficie.
- I sali ad alta concentrazione riescono ad esporre le regioni idrofobiche sottraendo le molecole d'acqua ordinate, le proteine tendono così ad interagire fra loro ("*salting out*"). Nella HIC queste regioni così esposte tendono ad interagire con una fase stazionaria costituita da gruppi idrofobici.
- E' vantaggiosa dopo il frazionamento con ammonio solfato.
- L'eluizione puo' essere fatta con forza ionica decrescente o per 'spiazzamento' con detergenti non ionici (Tween 20, Triton X-100)
- Potenziali svantaggi:
 - in alcuni casi le condizioni di eluizione possono provocare denaturazione

Cromatografia per interazione idrofobica (HIC)



Close to the surface of the hydrophobic ligand and solute molecule (L and H), the water molecules are highly ordered than in the bulk water and appear to “shield off” the hydrophobic ligand and solution molecules. Added salt interacts strongly with the water molecules leaving less water available for the “shielding off” effect, which is the driving force for L and H to interact with each other.

HIC – Salting out



A) Highly ordered water shells surround the hydrophobic surfaces of ligands and proteins. Hydrophobic substances are forced to merge to minimize the total area of such shells (maximize entropy). Salts enhance the hydrophobic interaction. B) The equilibrium of the hydrophobic interaction is controlled predominantly by the salt concentration.

Efficacia precipitante dei sali (serie di Hofmeister)

Cationi: NH_4^+ > K^+ > Na^+ > Mg^{++} > Ca^{++} > guanidinio

increasing "salting out" effect



antichaotropic

chaotropic

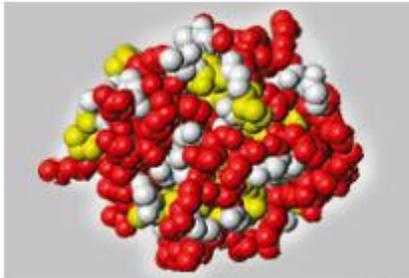
increasing "salting in" effect



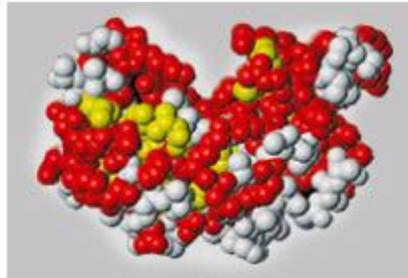
Anioni: SO_4^{--} > HPO_4^{--} > acetato > citrato > tartrato >
 Cl^- > NO_3^- > ClO_3^- > I^- > ClO_4^- > tiocianato

Cromatografia per interazione idrofobica (HIC)

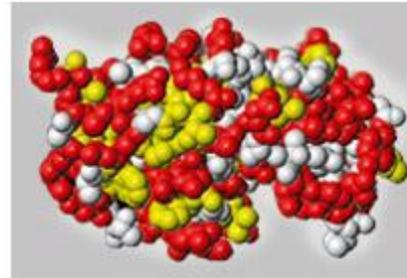
Cytochrome c



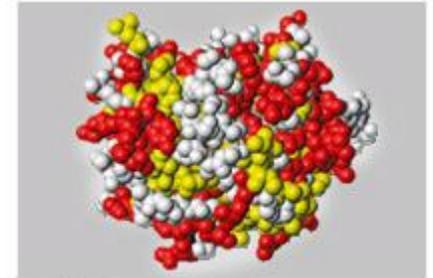
RNAse A



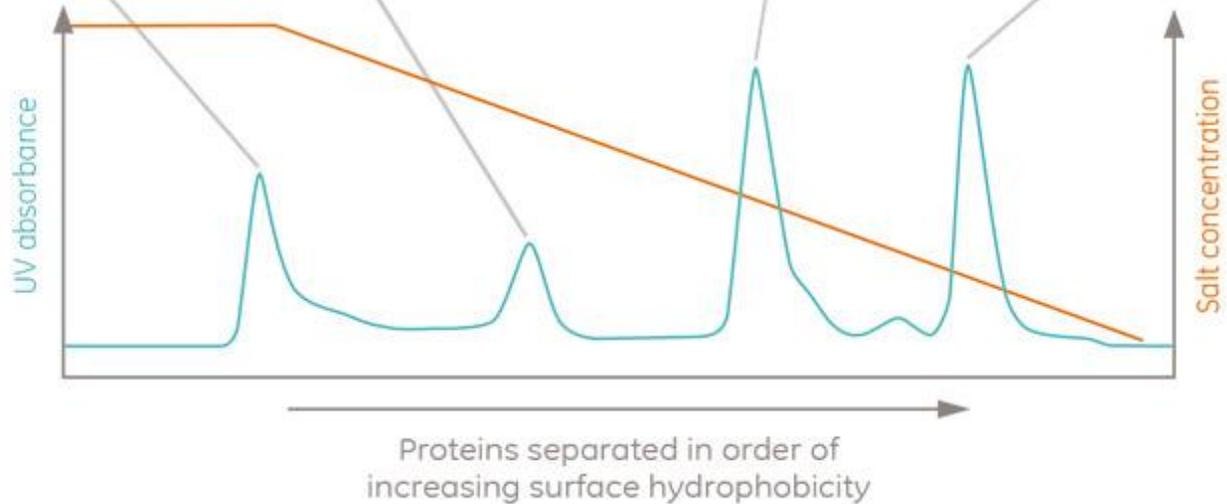
Lysozyme

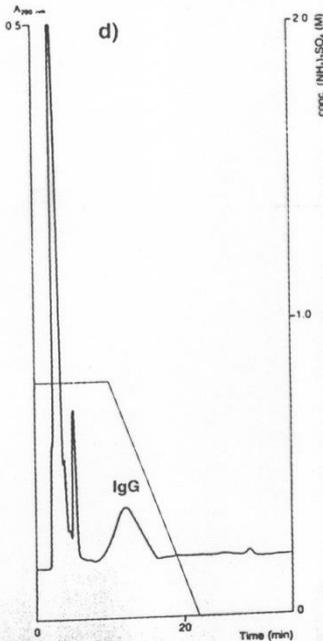
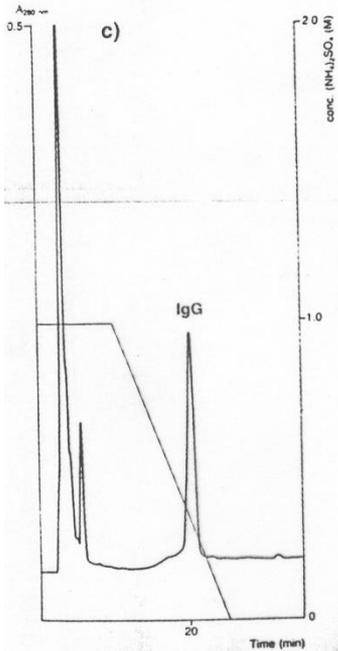
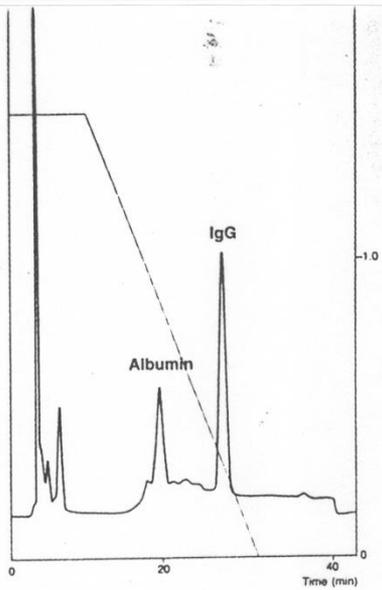
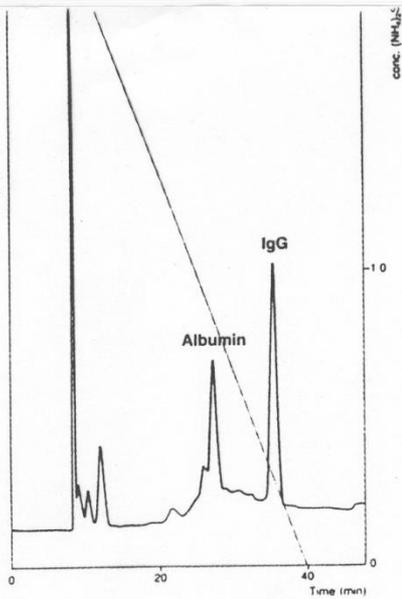


α -chymotrypsin



Yellow :
hydrophobic residues





Sample, 100 μ l MAB (-IgG₁) from mouse ascites; column. Alkyl Superose HR 5/5; flow rate, 0.5 ml min⁻¹; buffer A, 0.1 M sodium phosphate, pH 7.0,

(a) Sample applied in 2 M (NH₄)₂SO₄: both albumin and IgG are absorbed.

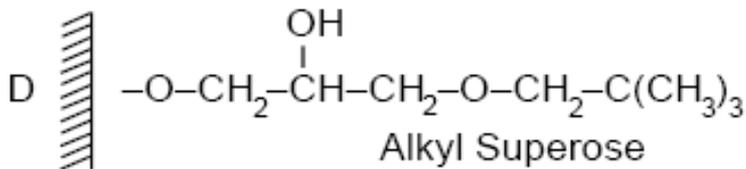
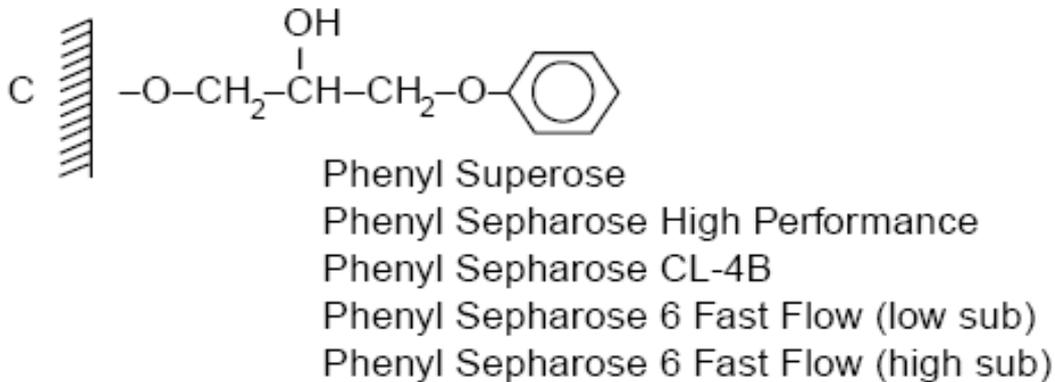
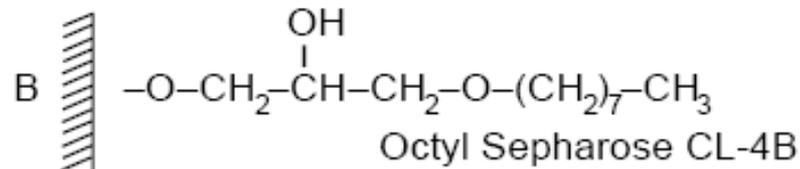
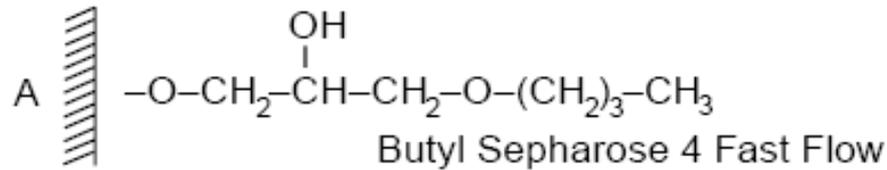
(b) Sample applied in 1.5 M (NH₄)₂SO₄: less albumin binds and IgG elutes earlier in the gradient.

(c) Sample applied in 1.0 M (NH₄)₂SO₄: albumin does not bind and, therefore, the column has a greater capacity for binding IgG.

(d) Sample applied in 0.8 M (NH₄)₂SO₄: albumin does not bind; IgG is retarded, but elutes in a broad peak.

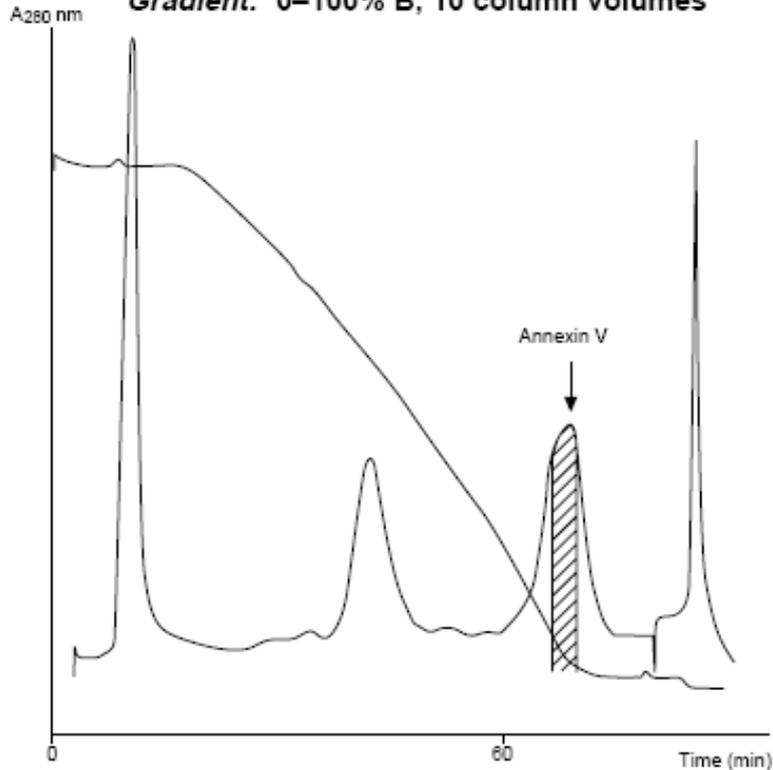
The effect of starting conditions in HIC

Different hydrophobic ligands coupled to cross-linked agarose matrices.



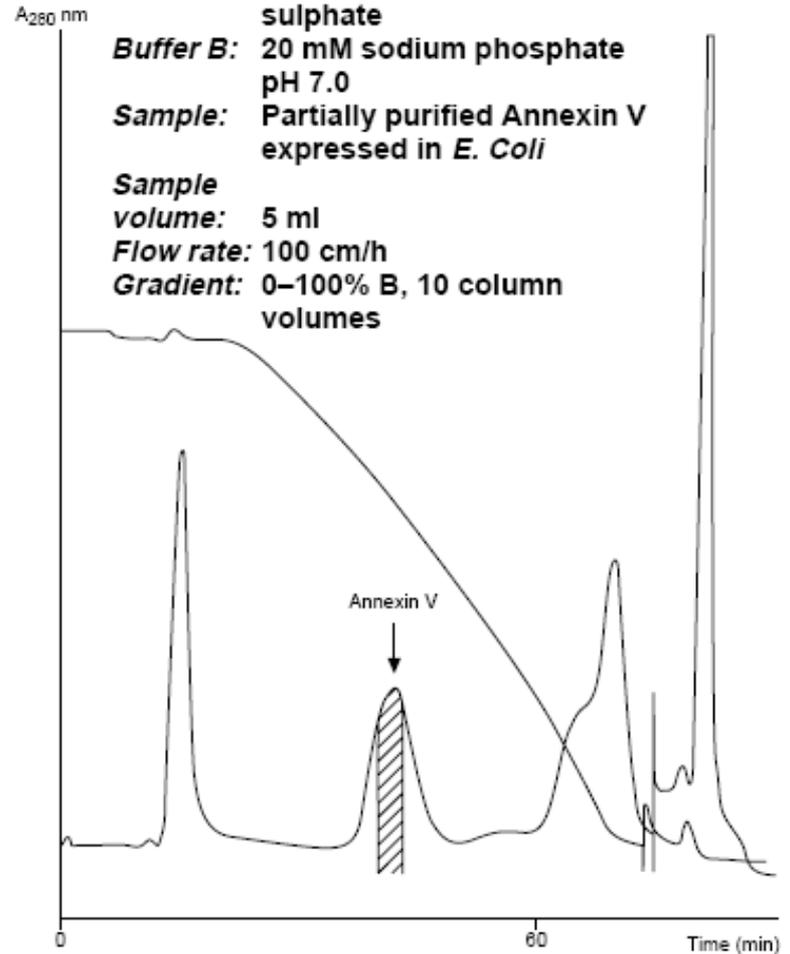
Medium: Butyl Sepharose 4 Fast Flow
Column: XK 16/20
Buffer A: 20 mM sodium phosphate pH 7.0 + 1.0 M ammonium sulphate
Buffer B: 20 mM sodium phosphate pH 7.0
Sample: Partially purified Annexin V expressed in *E. Coli*

Sample volume: 5 ml
Flow rate: 100 cm/h
Gradient: 0–100% B, 10 column volumes



Medium: Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub.)
Column: XK 16/20
Buffer A: 20 mM sodium phosphate pH 7.0 + 1.0 M ammonium sulphate
Buffer B: 20 mM sodium phosphate pH 7.0
Sample: Partially purified Annexin V expressed in *E. Coli*

Sample volume: 5 ml
Flow rate: 100 cm/h
Gradient: 0–100% B, 10 column volumes



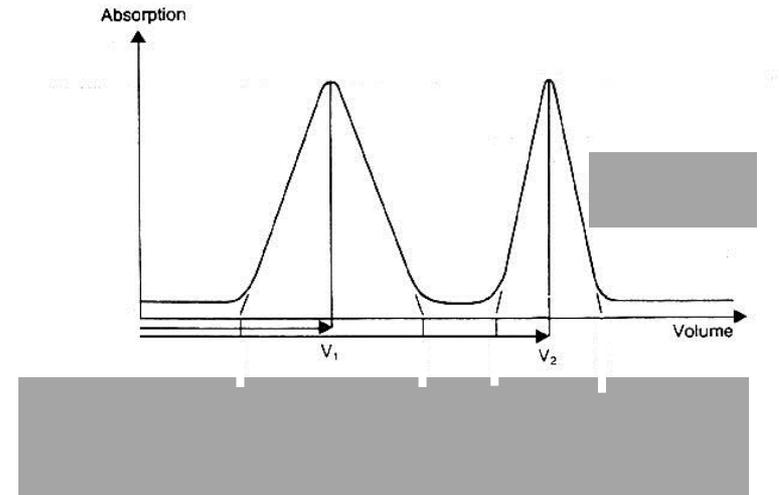
Purificazione delle proteine

❖ cromatografie:

- ✓ scambio ionico,
- ✓ esclusione molecolare,
- ✓ affinità,
- ✓ covalente,
- ✓ adsorbimento,
- ✓ interazione idrofobica,
- ✓ partizione,

❖ cromatografia liquida ad elevata risoluzione (HPLC), FPLC;

❖ *downstream processing.*



Cromatografia di partizione

cromatografia liquido-liquido

cellulosa

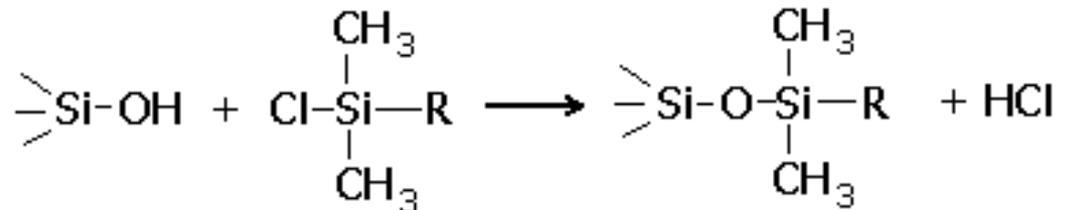
amido

silice

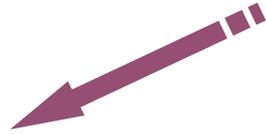
legano fino al
50% di acqua

cromatografia liquida a fase legata

In questo caso la maggior parte delle fasi legate utilizza come matrice la silice, derivatizzata con organoclorosilani:



Cromatografia di partizione



cr. liquida in fase normale

fase stazionaria polare
ad es. alchilammina

fase mobile è di solito
un solvente organico
in gradiente a polarità
crescente

ordine di eluizione
polarità crescente



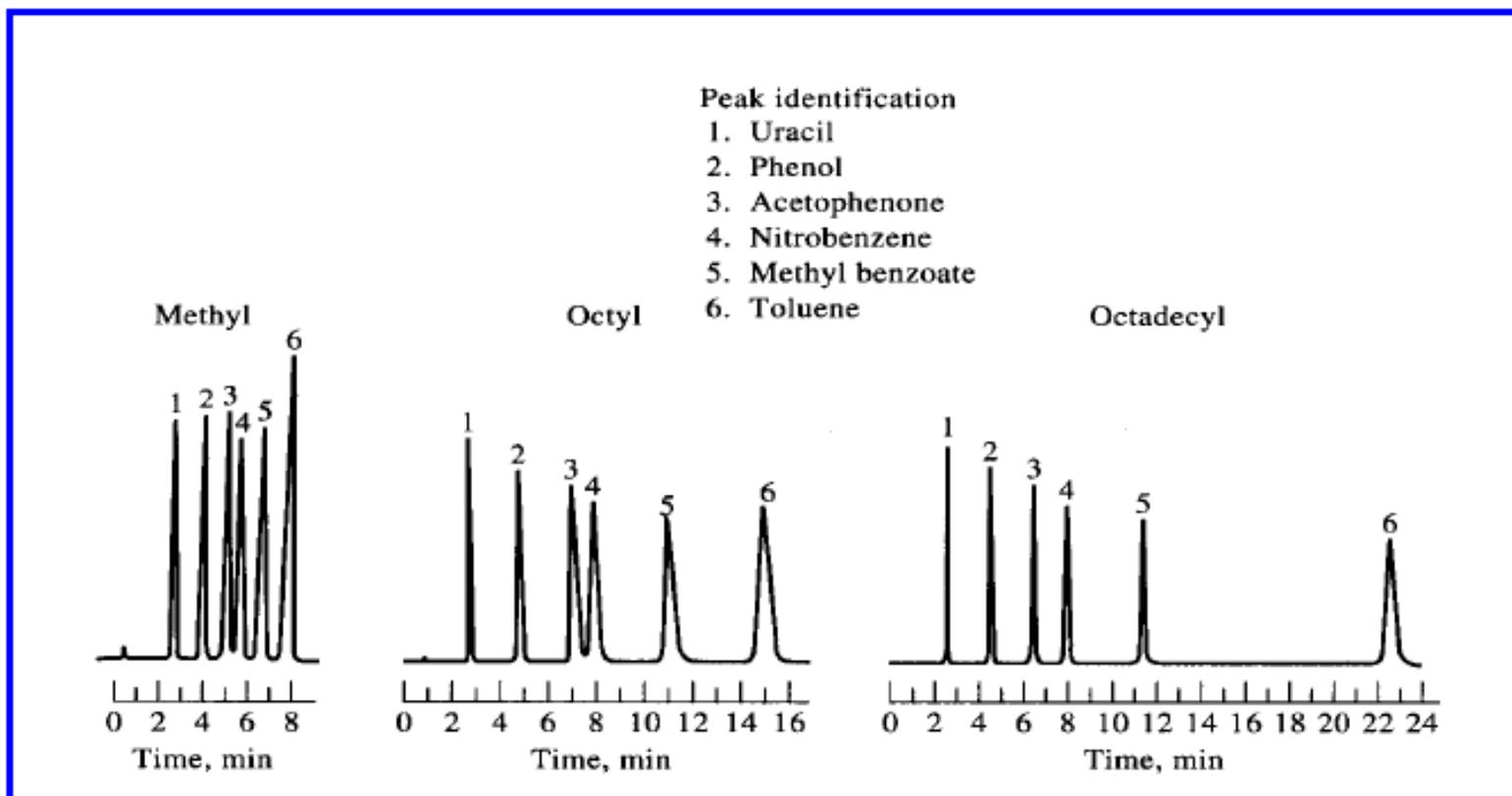
cr. liquida in fase inversa

fase stazionaria e' apolare
butile (C₄), ottile (C₈), ottadecile (C₁₈)

fase mobile può essere un
tampono acquoso con metanolo,
acetonitrile, tetraidrofurano,
o miscele a polarità decrescente

ordine di eluizione
polarità decrescente

Effetto della variazione di fase stazionaria in RPC: un esempio



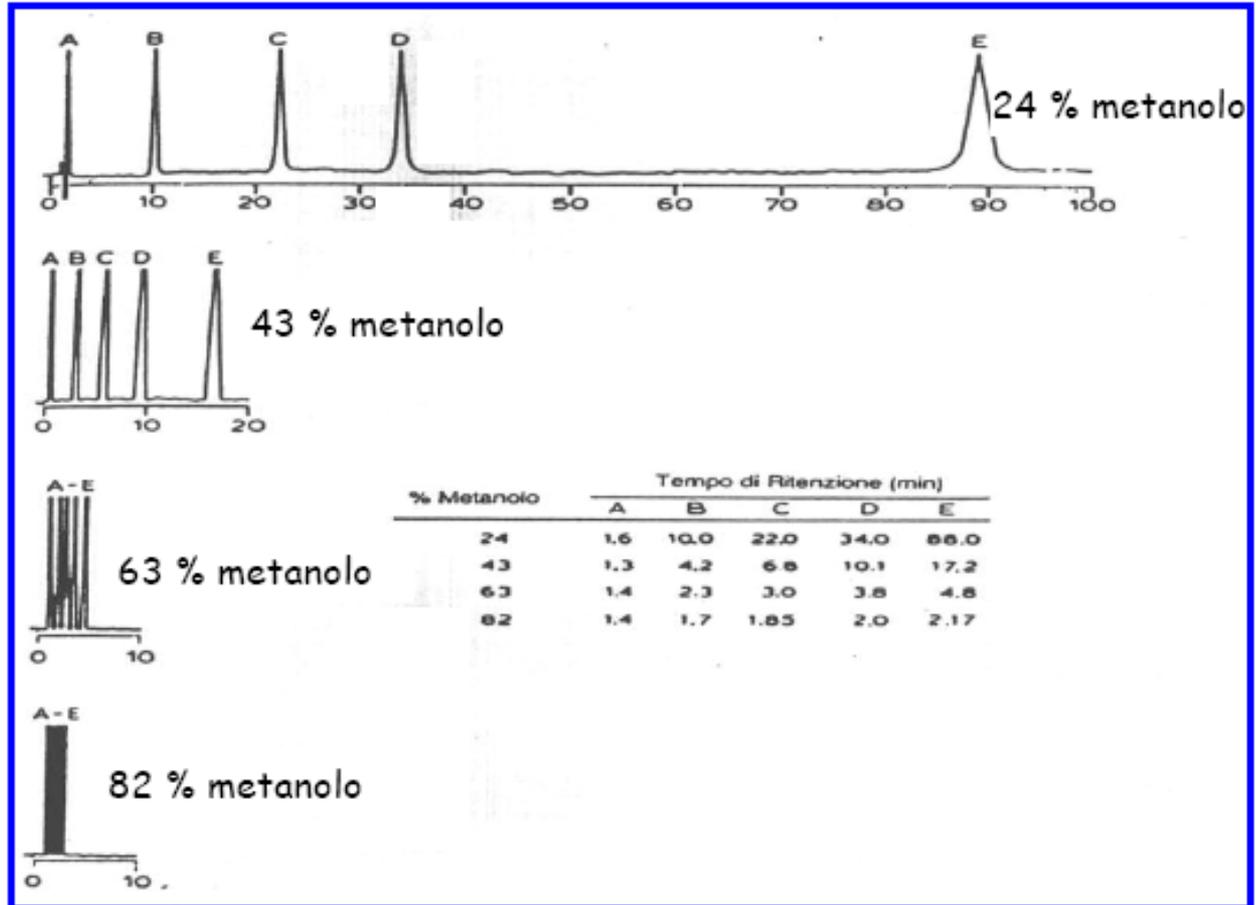
La diminuzione della polarità della fase stazionaria ($C1 \rightarrow C8 \rightarrow C18$) aumenta il tempo di ritenzione dei composti meno polari, migliorando la separazione, anche se a scapito del tempo totale di analisi.

Effetto della variazione di fase mobile in RPC: un esempio

Separazione su
colonna C18 di:

- A uracile
- B fenolo
- C benzaldeide
- D nitrobenzene
- E metil-benzoato

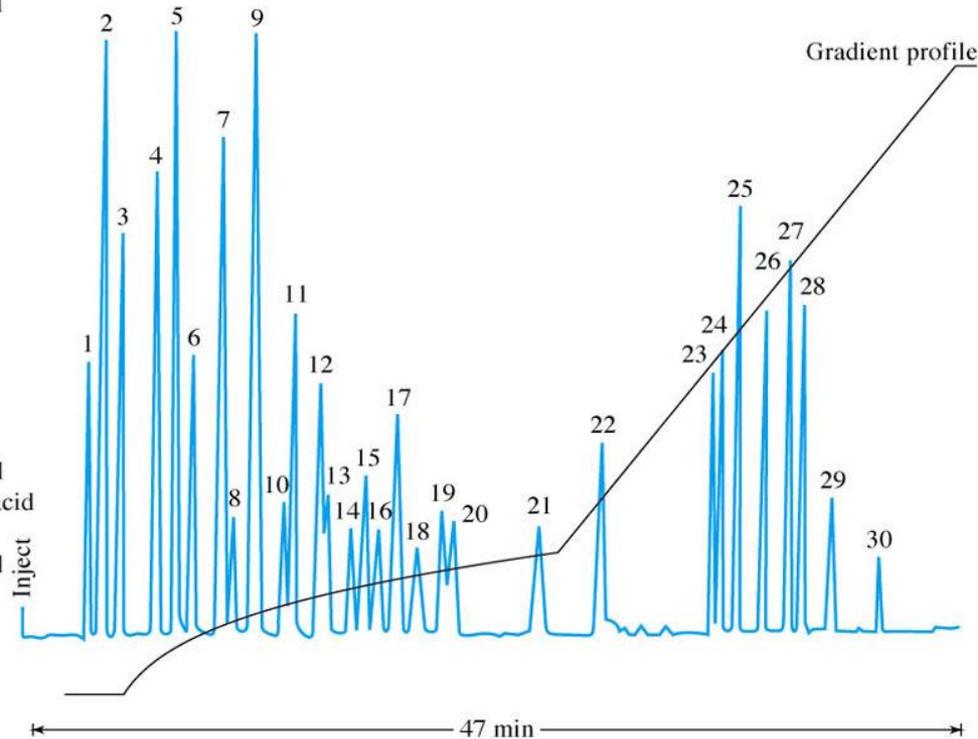
Fase mobile:
acqua-metanolo



L'aumento della percentuale di metanolo abbassa la polarità complessiva della fase mobile, avvicinando gli analiti meno polari (C, D, E) a quelli più polari. La condizione ideale corrisponde al 43 % di metanolo.

Un esempio raffinato di RPC a gradiente di eluizione

1. Phosphoserine
2. Aspartic acid
3. Glutamic acid
4. α -Amino adipic acid
5. Asparagine
6. Serine
7. Glutamine
8. Histidine
9. Glycine
10. Threonine
11. Citrulline
12. 1-Methylhistidine
13. 3-Methylhistidine
14. Arginine
15. β -Alanine
16. Alanine
17. Taurine
18. Anserine
19. β -Aminobutyric acid
20. β -Aminoisobutyric acid
21. Tyrosine
22. α -Aminobutyric acid
23. Methionine
24. Valine
25. Tryptophan
26. Phenylalanine
27. Isoleucine
28. Leucine
29. δ -Hydroxylysine
30. Lysine



© 2007 Thomson Higher Education

Il profilo indica la percentuale di acetonitrile nella miscela con acqua usata come fase mobile. Il gradiente consente un'eluizione in tempi ragionevoli e con buona risoluzione anche degli aminoacidi meno polari.

Purificazione delle proteine: cromatografie

Cromatografia in fase inversa per accoppiamento ionico

si generano coppie ioniche con carattere lipofilo

Controione:

Composti acidi-contro catione (alchilammina quaternaria)
tetrabutilammonio

Basi—contro anione (alchilsolfonato)- sodio eptansolfonato

fase mobile H_2O /metanolo

H_2O /acetoneitrile

separa composti polari (aa peptidi) e apolari

Separazione in RP HPLC di una miscela di peptidi triptici

