

CROMATOGRAFIA

Complesso delle tecniche che:

- **consentono di separare i diversi componenti di una miscela (risolvere la miscela)**
- **permettono la determinazione qualitativa e quantitativa dei vari componenti**

Tutte le tecniche cromatografiche si basano sulla migrazione differenziale dei vari componenti fra due fasi immiscibili:

- ***fase fissa* o *fase stazionaria***
- ***fase mobile* o *eluente***

CROMATOGRAFIA

- **fase fissa** o **fase stazionaria**

fase liquida o fase solida	
disposta all'interno di una colonna	disposta su di una superficie piana
↓	↓
cromatografia su colonna	cromatografia su strato sottile (TLC)

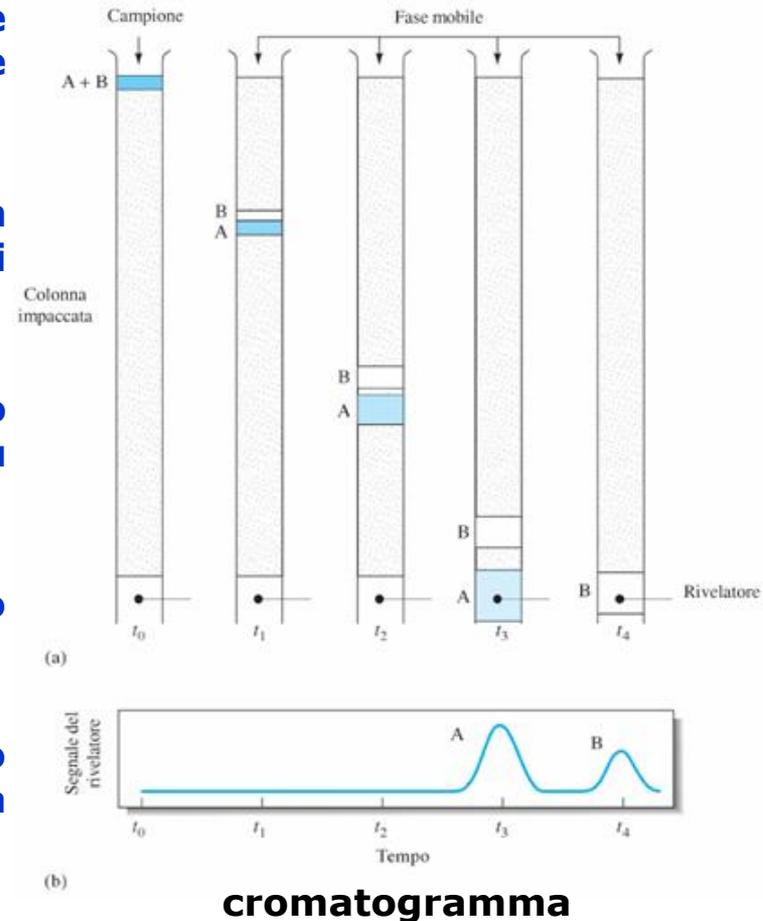
le fasi stazionarie solide sono costituite da particelle insolubili nella fase mobile e hanno diversa granulometria (ovvero dimensione della particelle solide) a seconda del tipo di cromatografia; le fasi stazionarie liquide sono adsorbite su supporti solidi a loro volta costituiti da particelle solide chimicamente inerti.

- **fase mobile** o **eluente**

fase liquida	fase gassosa
↓	↓
cromatografia liquida	gas cromatografia

CROMATOGRAFIA: processo di separazione

- la fase mobile fluisce in continuo attraverso la fase stazionaria (eluizione) che deve essere immiscibile nell'eluente
- la fase mobile e la fase stazionaria sono scelte in modo che i componenti della miscela da separare si distribuiscano tra le due fasi
- i componenti più affini alla fase stazionaria passano più tempo in questa fase, quindi si spostano più lentamente attraverso il sistema
- i componenti più affini alla fase mobile si spostano invece più velocemente
- la separazione dei componenti avviene in quanto ogni sostanza ha una distribuzione caratteristica tra le due fasi (costante di ripartizione $K_d = C_s / C_m$)



CROMATOGRAFIA: processo di separazione

- **La separazione dei componenti avviene in quanto ogni sostanza ha una distribuzione caratteristica tra le due fasi (costante di ripartizione $K_d = C_s / C_m$)**
- **La diversa distribuzione dei componenti della miscela dipende dalle interazioni che essi sono in grado instaurare con le due fasi**
- **Le interazioni che il singolo componente è in grado di stabilire dipendono dalle sue caratteristiche chimico-fisiche**
- **Il tipo di interazione che il componente stabilisce con la fase stazionaria costituisce il meccanismo o principio di separazione cromatografica**
- **I diversi principi cromatografici comprendono: adsorbimento, ripartizione, scambio ionico, esclusione ed affinità**

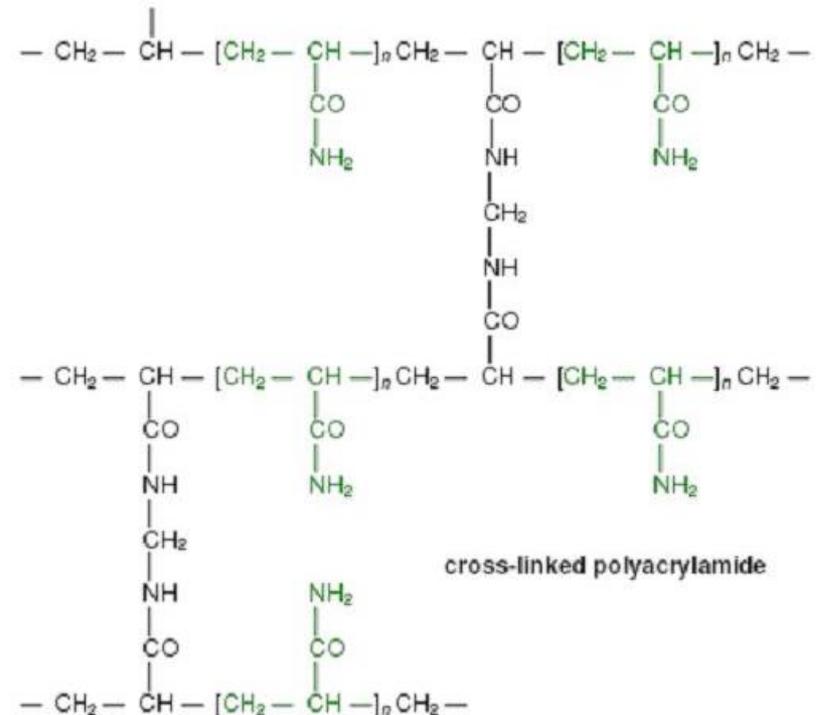
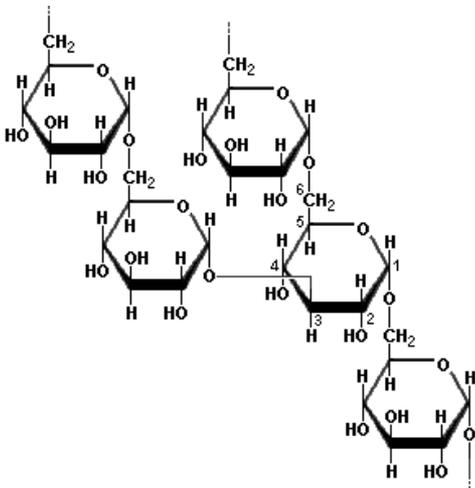
CROMATOGRAFIA: processo di separazione

I diversi principi cromatografici comprendono:

- **adsorbimento**: la fase stazionaria è un solido, e la separazione si basa sulla formazione di legami deboli (legami H, legami dipolo-dipolo) tra fase ed analiti; se il legame è di tipo idrofobico si parla di *cromatografia di interazione idrofobica* (impiegata soprattutto per la separazione di proteine ed acidi nucleici)
- **ripartizione**: la fase stazionaria è un liquido adsorbito su supporto solido inerte, la separazione si basa sull'equilibrio di ripartizione degli analiti tra le due fasi mobile e stazionaria.
- **scambio ionico**: la fase stazionaria è un solido costituito da macromolecole dotate di gruppi ionizzati, la separazione si basa sulla interazione elettrostatica tra i gruppi carichi sulla superficie della fase fissa e gli analiti che siano dotati di un o più cariche elettriche di segno opposto.
- **esclusione**: la fase stazionaria è un solido poroso (gel poroso), la separazione si basa sulla dimensione delle particelle di analita; solo quelle di dimensioni adatte entrano nei pori del gel, quelle più grandi ne vengono escluse.
- **affinità**: la fase stazionaria è un supporto solido su cui sono legati chimicamente molecole che sono ligandi specifici di proteine ed enzimi che in tal modo vengono separati dalle altre componenti di miscele complesse.

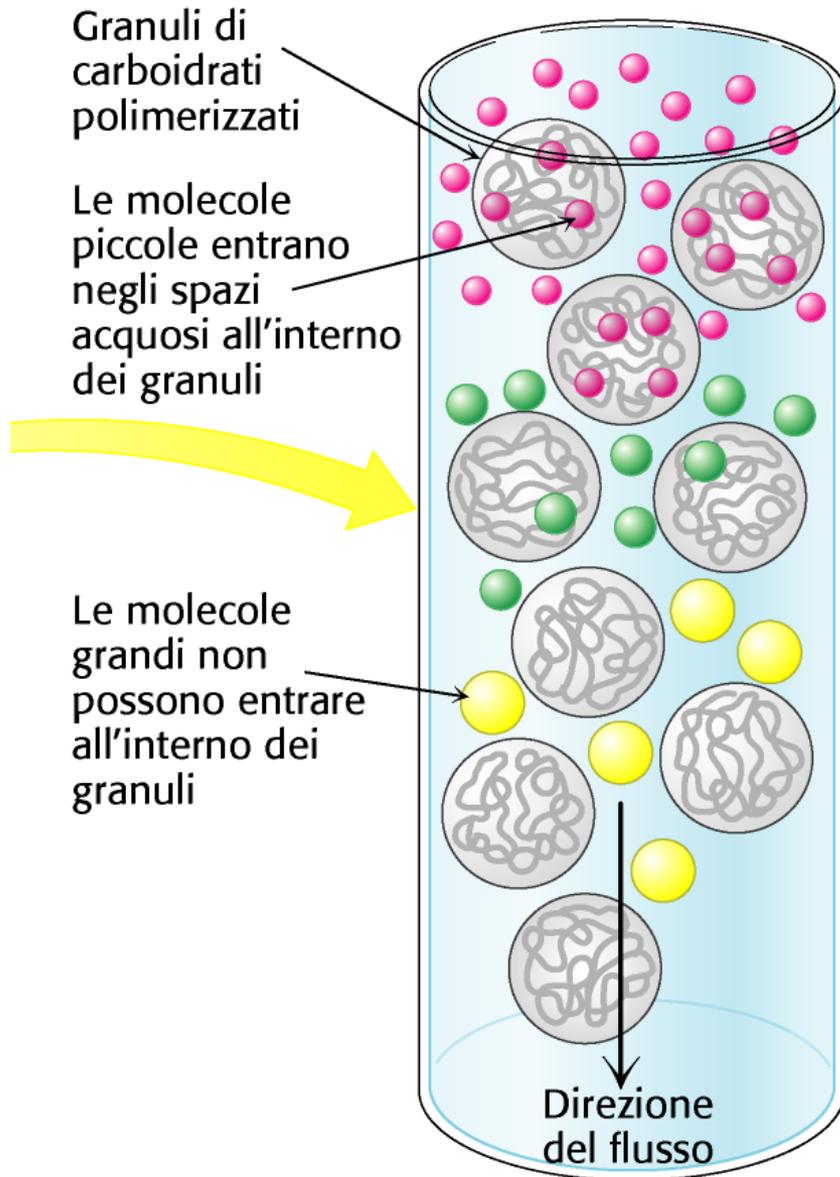
1. CROMATOGRAFIA PER FILTRAZIONE SU GEL (esclusione)

- L'eluizione avviene in base alla dimensione (peso e forma della proteina): le proteine di dimensioni maggiori sono eluite per prime, quelle più piccole fuoriescono dalla colonna in ordine decrescente di dimensioni
- Può essere impiegata per la determinazione del peso molecolare delle proteine
- Fasi stazionarie più comuni: polimeri di destrano (sephadex) o poliacrilammide (biogel)

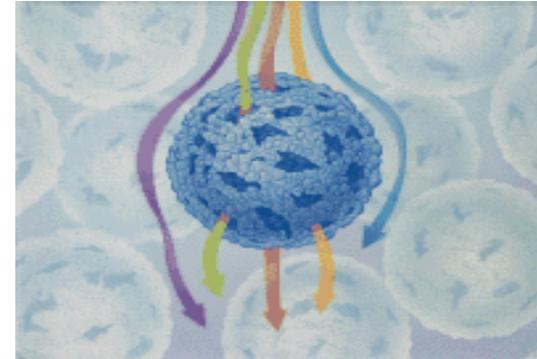


- Fasi mobili: soluzioni tampone

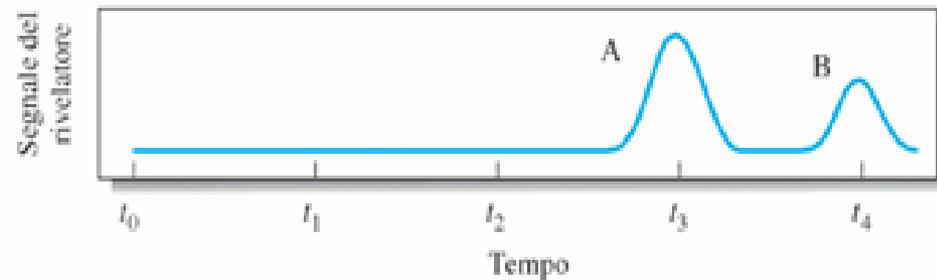
1. CROMATOGRAFIA PER FILTRAZIONE SU GEL (esclusione)



Microstruttura della matrice per gel-filtrazione



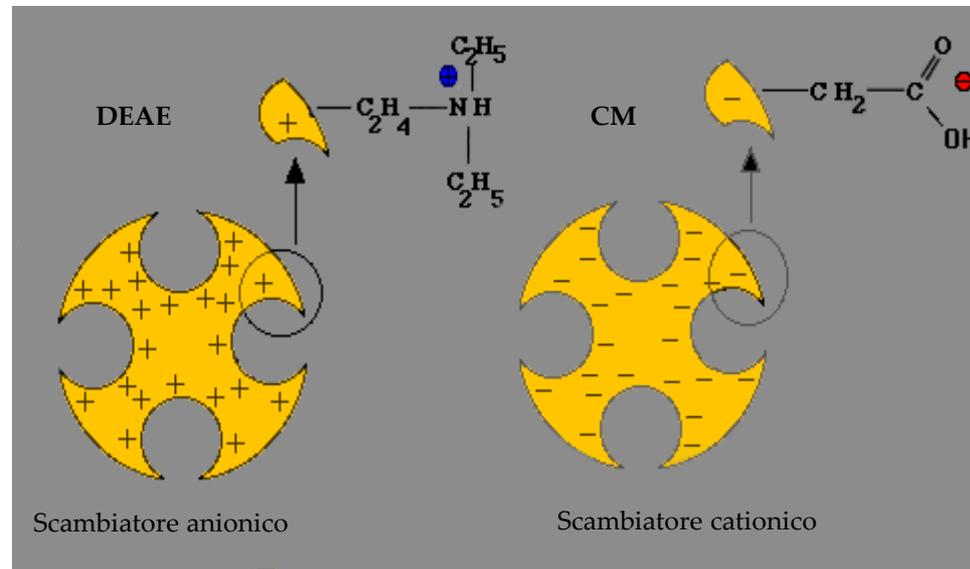
cromatogramma



$$PM_A > PM_B$$

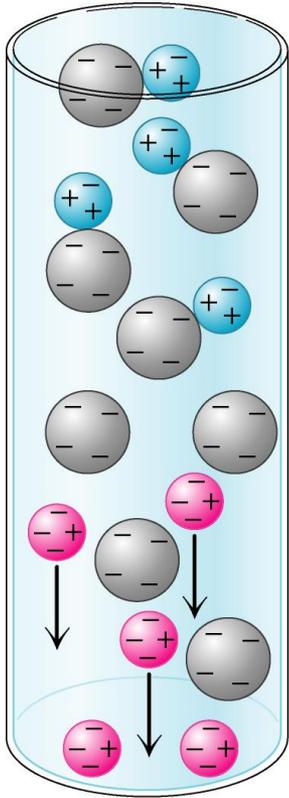
2. CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO (carica elettrica)

- La separazione avviene in base alla diversa forza di attrazione elettrostatica tra proteine e particelle della fase stazionaria
- Proteine con maggior densità di carica si legano più fortemente alla fase stazionaria e vengono eluite per ultime
- Fasi stazionarie più comuni: carbossimetilcellulosa; dietilamminoetil cellulosa (DEAE-cellulosa)
- Due tipi di "scambiatori": anionici (carichi positivamente, separano proteine con carica netta negativa) oppure cationici (carichi negativamente, separano proteine con carica netta positiva)



- Fasi mobili: soluzioni tampone; gradienti di forza ionica (NaCl) o pH per l'eluizione

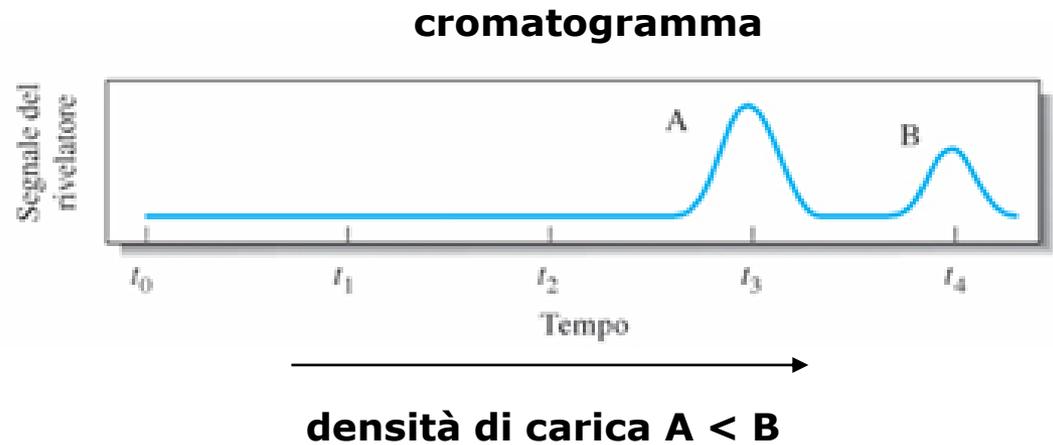
2. CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO (carica elettrica)



Le proteine cariche positivamente si legano a granuli carichi negativamente

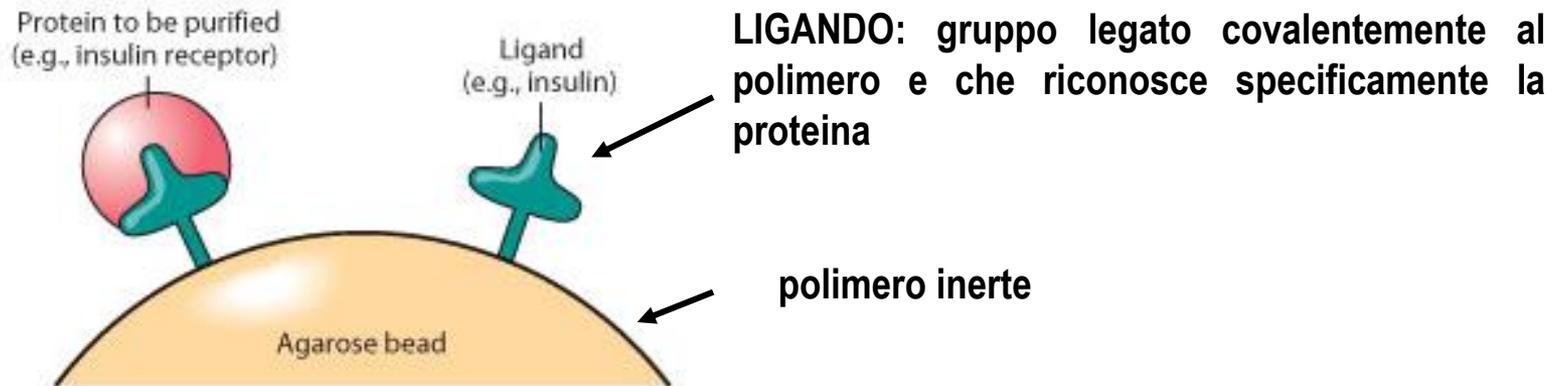
Le proteine cariche negativamente passano attraverso la colonna

esempio di separazione di proteine cationiche (scambio cationico)



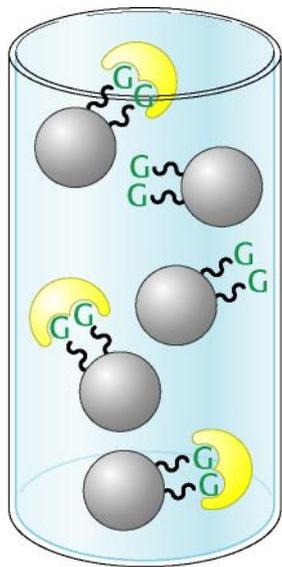
3. CROMATOGRAFIA DI AFFINITA' (riconoscimento di un ligando)

- L'eluizione avviene in base alla diversa affinità che le proteine mostrano per gruppi chimici o molecole legati sulla superficie della fase stazionaria
- È molto usata per la separazione di anticorpi o di fattori di trascrizione
- Fasi stazionarie più comuni: polimeri inerti su cui è legato covalentemente il gruppo che riconosce specificamente la proteina (o una classe di proteine) che si intende isolare da una miscela complessa

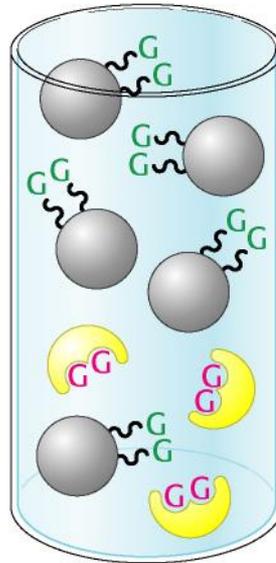


- Fasi mobili: soluzioni che contengono molecole in grado di competere con la proteina per il ligando che è presente sulla fase stazionaria

3. CROMATOGRAFIA DI AFFINITA' (riconoscimento di un ligando)



Aggiunta di glucosio (G)

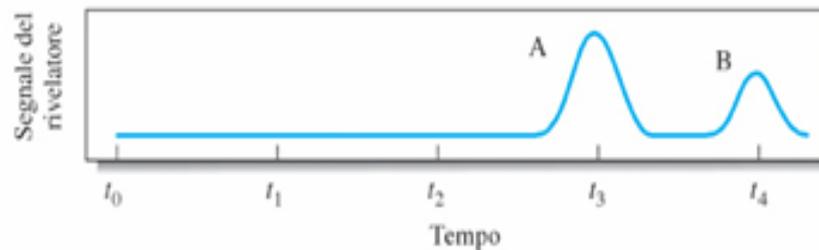


ESEMPIO: eluizione di una proteina che lega specificamente il glucosio

La proteina che lega il glucosio si attacca ai residui di glucosio (G) presenti sui granuli di fase stazionaria

La proteina che lega il glucosio viene eluita per aggiunta di glucosio

cromatogramma



affinità: A < B

ELETTROFORESI

L'elettroforesi è una tecnica analitica e separativa basata sulla velocità con cui particelle dotate di carica elettrica, immerse in un opportuno fluido, si muovono in esso per effetto di un campo elettrico.

$$v = E z / f$$

v → velocità della particella

E → forza del campo elettrico

z → carica netta della proteina

f → coefficiente frizionale

Le particelle si spostano verso il catodo se hanno carica positiva e verso l'anodo se hanno carica negativa.

La migrazione delle proteine (che sono particelle dotate di carica elettrica) avviene in un supporto solido ed è influenzata da diversi fattori.

Principi generali

Velocità di migrazione di una particella carica in un campo elettrico

$$v = Eq / f$$

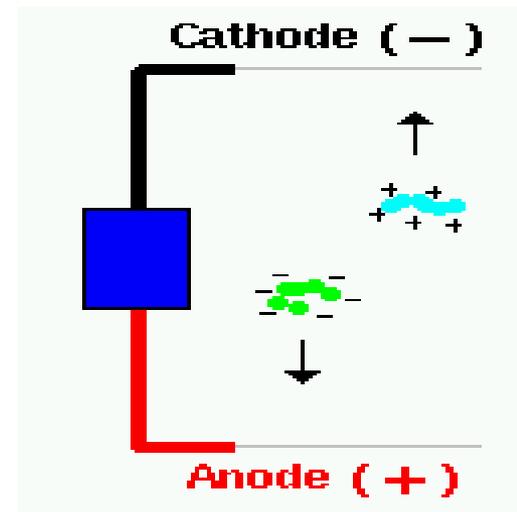
E: intensità del campo elettrico

q: carica della particella

f: coefficiente frizionale = $6\pi\eta r_p$

viscosità del mezzo

raggio della particella



Principi generali

La mobilità elettroforetica

$$\mu = v/E = q/f$$

q : carica della particella

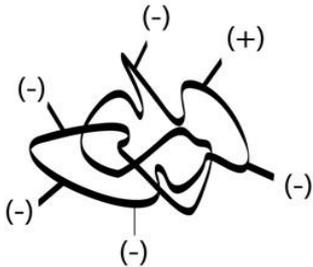
f : coefficiente frizionale = $6\pi\eta r_p$

Molecole dotate di carica elettrica immerse in un campo elettrico si separeranno in base alla diversa mobilità elettroforetica ovvero in base al rapporto carica vs massa

Fattori che influenzano la mobilità

$$\mu = q / f$$

CAMPIONE



MEZZO

- supporto
- tampone
(*pH, concentrazione*)

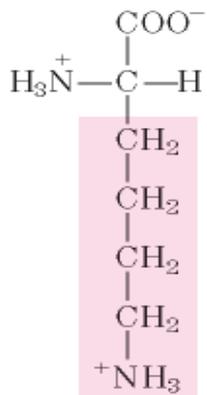
- carica netta
- massa
- dimensioni
- forma

Fattori che influenzano la mobilità: il campione

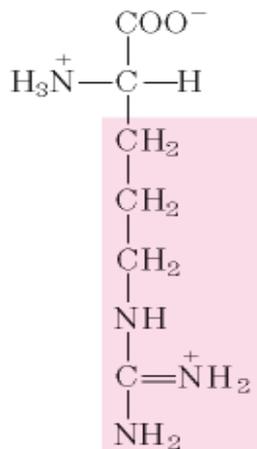
CARICA ELETTRICA

$$\mu = q/f$$

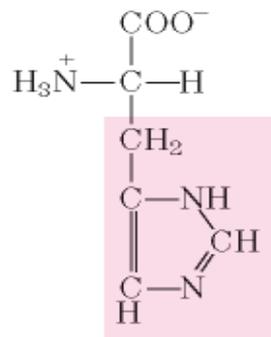
- La velocità di migrazione aumenta all'aumentare della **carica netta** del campione.
- La carica dipende dal pH: al di sotto del **pI (punto isoelettrico*)** le proteine hanno carica positiva, al di sopra di esso sono cariche negativamente.
- Il valore di pI dipende dal contenuto di aminoacidi ionizzabili



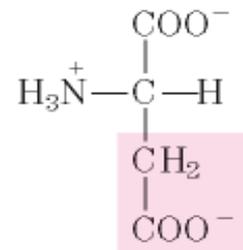
Lisina



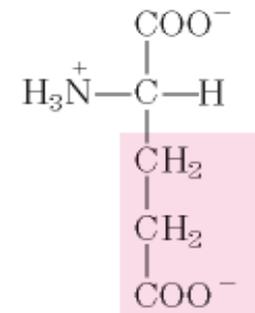
Arginina



Istidina



Aspartato



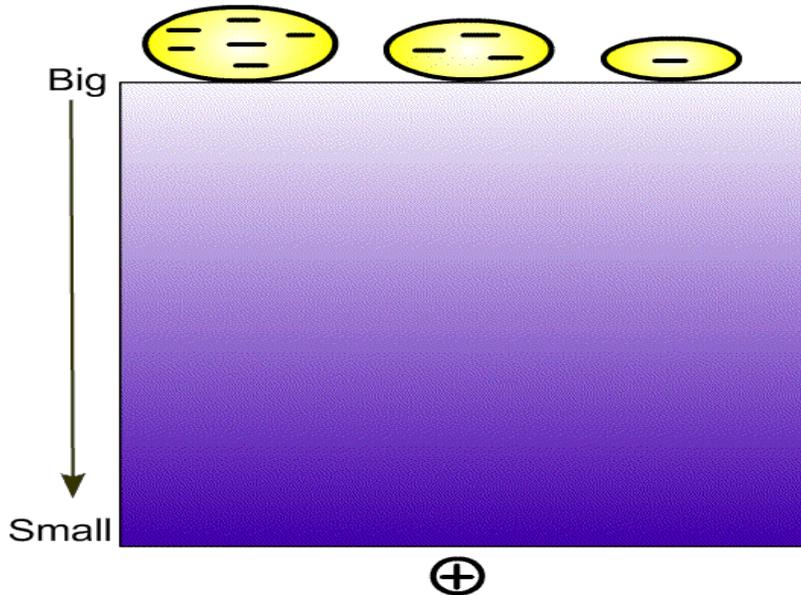
Glutammato

*pI (punto isoelettrico): valore di pH a cui le proteine hanno carica netta pari a zero

Fattori che influenzano la mobilità: il campione

MASSA, DIMENSIONI E FORMA

$$\mu = q / f$$



- La mobilità diminuisce all'aumentare del **peso molecolare**: proteine più pesanti risentono di forze frizionali ed elettrostatiche maggiori.

- La mobilità diminuisce all'aumentare della **dimensione**: a parità di peso molecolare, proteine più grandi attraversano con maggior difficoltà il mezzo in cui sono immerse
- La mobilità dipende anche dalla **forma**: ad esempio proteine fibrose e proteine globulari mostrano differenti caratteristiche di migrazione a causa del diverso effetto delle forze frizionali ed elettrostatiche

Fattori che influenzano la mobilità: il mezzo

IL SUPPORTO

$$\mu = q/f$$

- Per la maggior parte delle macromolecole esso è una matrice inerte costituita da un gel di **poliacrilammide** o agarosio (**tecniche zonali**)
- La matrice agisce da **setaccio molecolare** partecipando in tal modo alla separazione delle molecole in base alla loro forma, dimensione e peso.
- La matrice fornisce stabilità alla convezione ed alla diffusione e consente di conservare il risultato ottenuto mediante la colorazione degli analiti dopo la corsa elettroforetica

Fattori che influenzano la mobilità: il mezzo

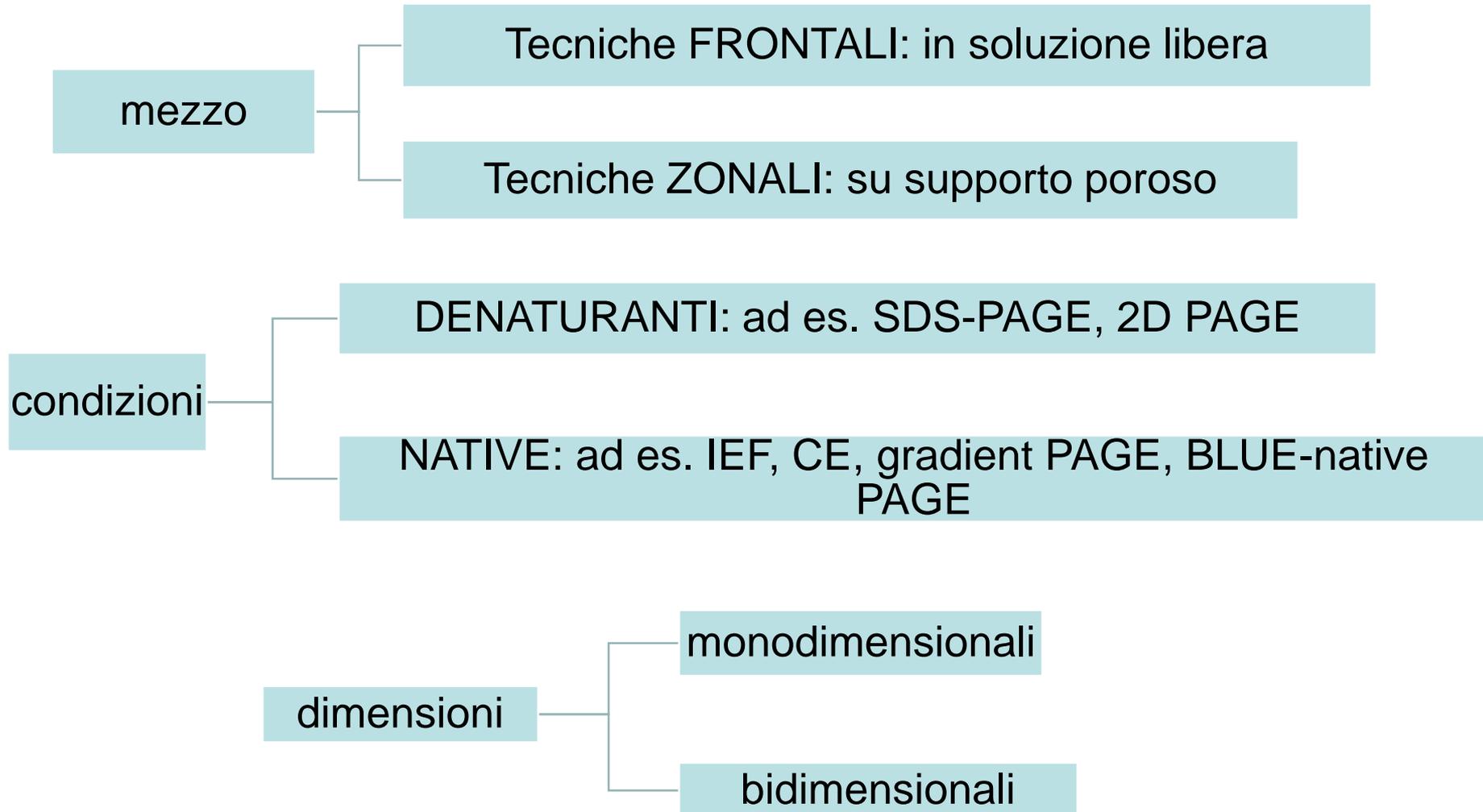
IL TAMPONE

$$\mu = q/f$$

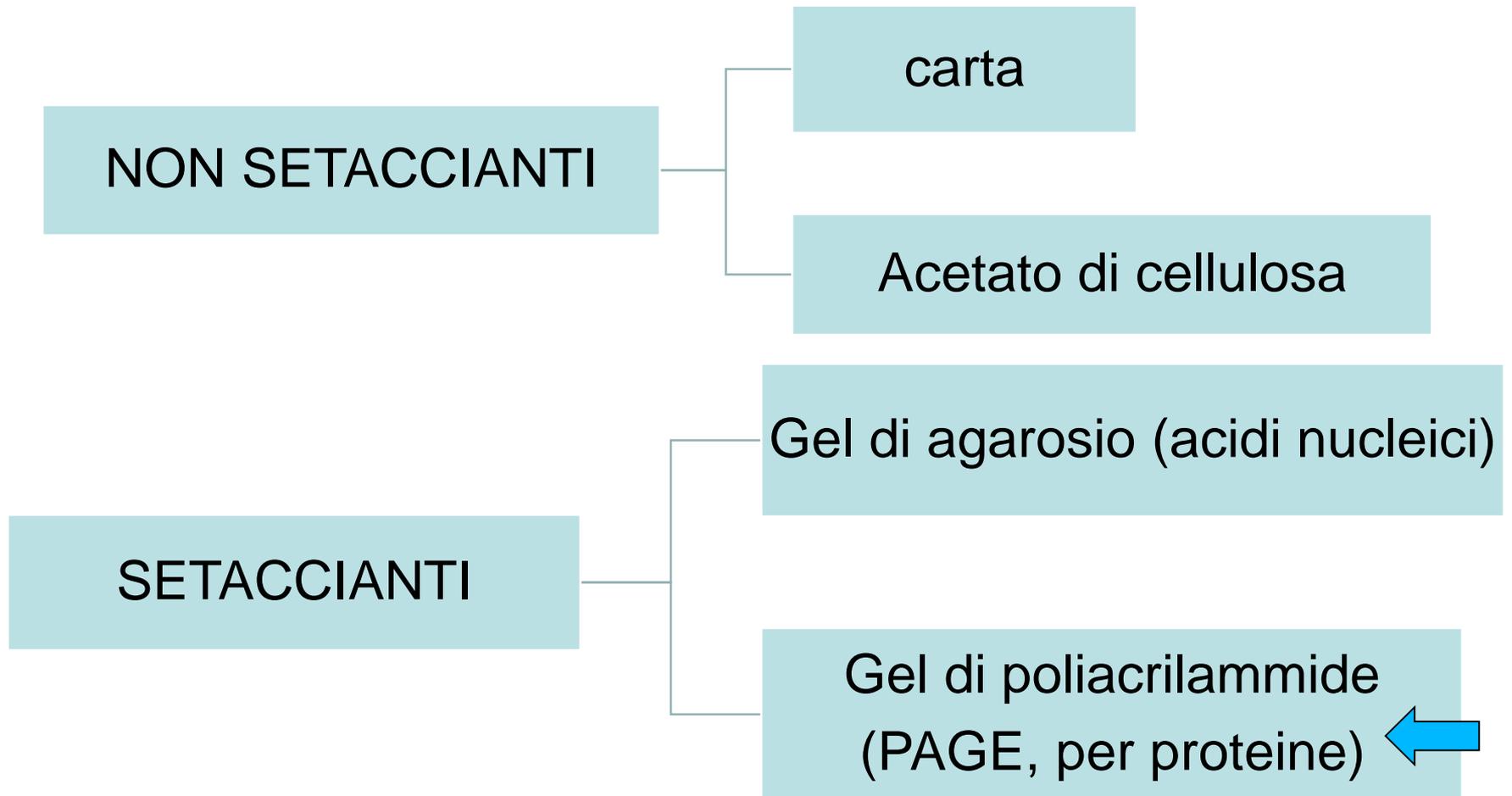
- Il tampone determina e stabilizza il **pH** del mezzo di supporto
- Mantiene le molecole da separare in uno **stato ionizzato**
- Influenza la velocità di migrazione dei componenti del campione: la **forza ionica** deve variare tra 0,05M e 0,10M in modo da garantire la minor produzione di calore e la miglior risoluzione della miscela
- Tamponi più comunemente usati: il formiato, l'acetato, il citrato, il fosfato, il Tris, l'EDTA

Le principali tecniche

In base a.....



Le tecniche zonali: i supporti



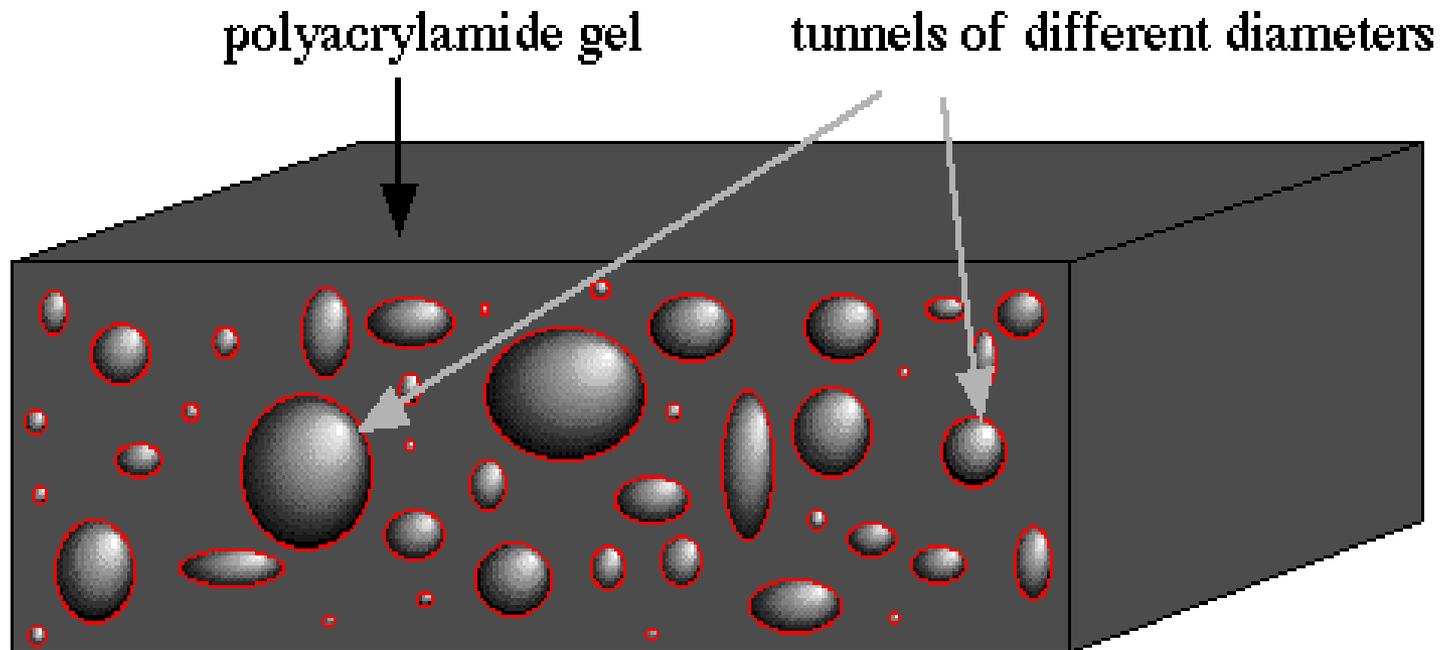
Le principali tecniche mono-dimensionali (1D)

- SDS-PAGE
- PAGE nativa
- IEF (Isoelettrofocalizzazione)
- 2D-elettroforesi (bidimensionale)

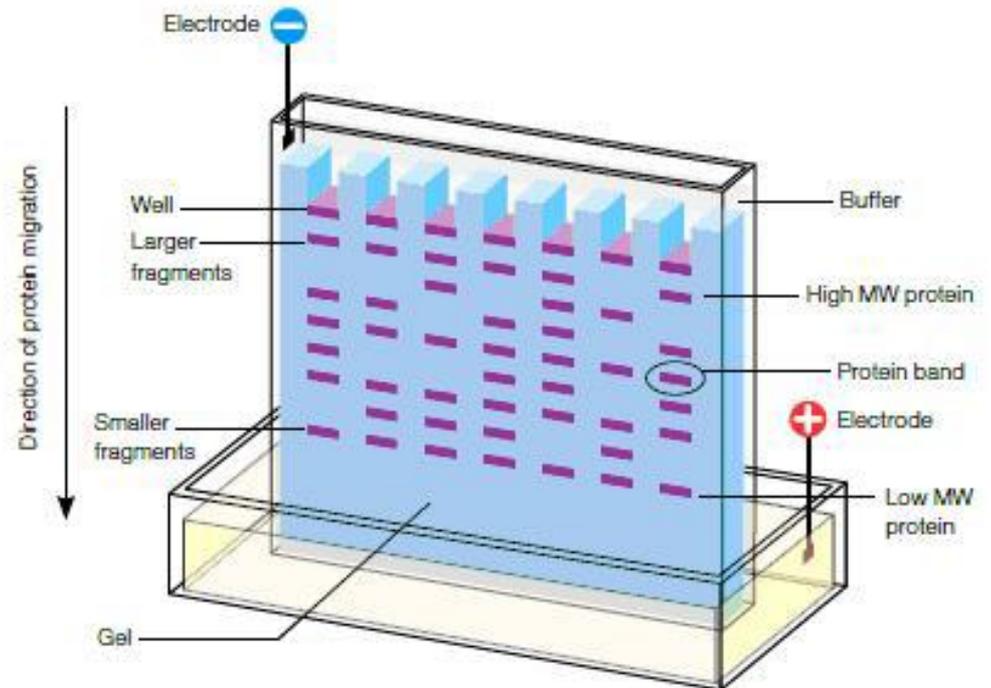
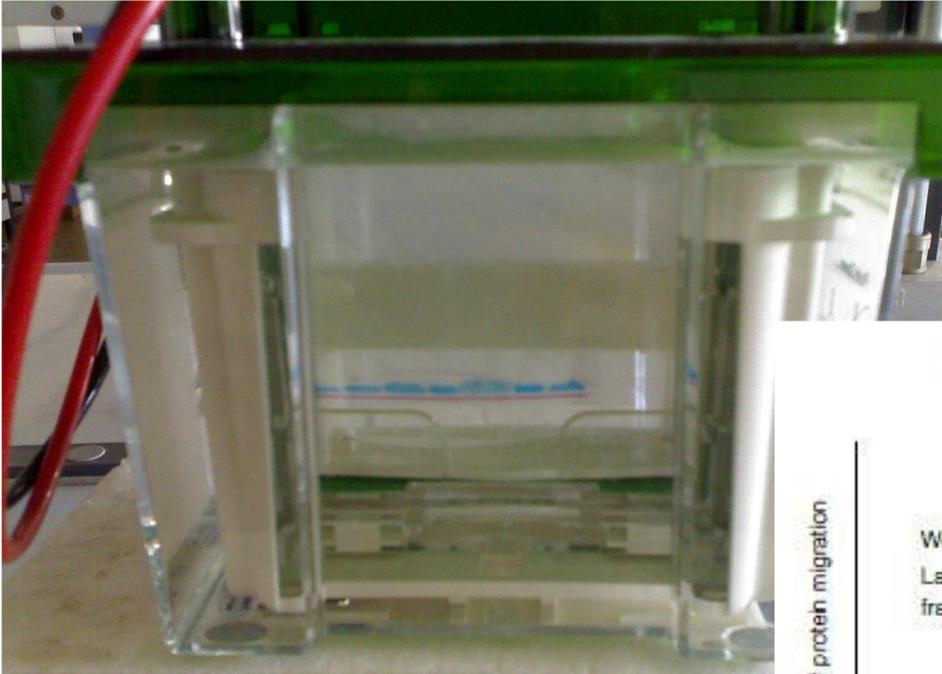
L'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE)

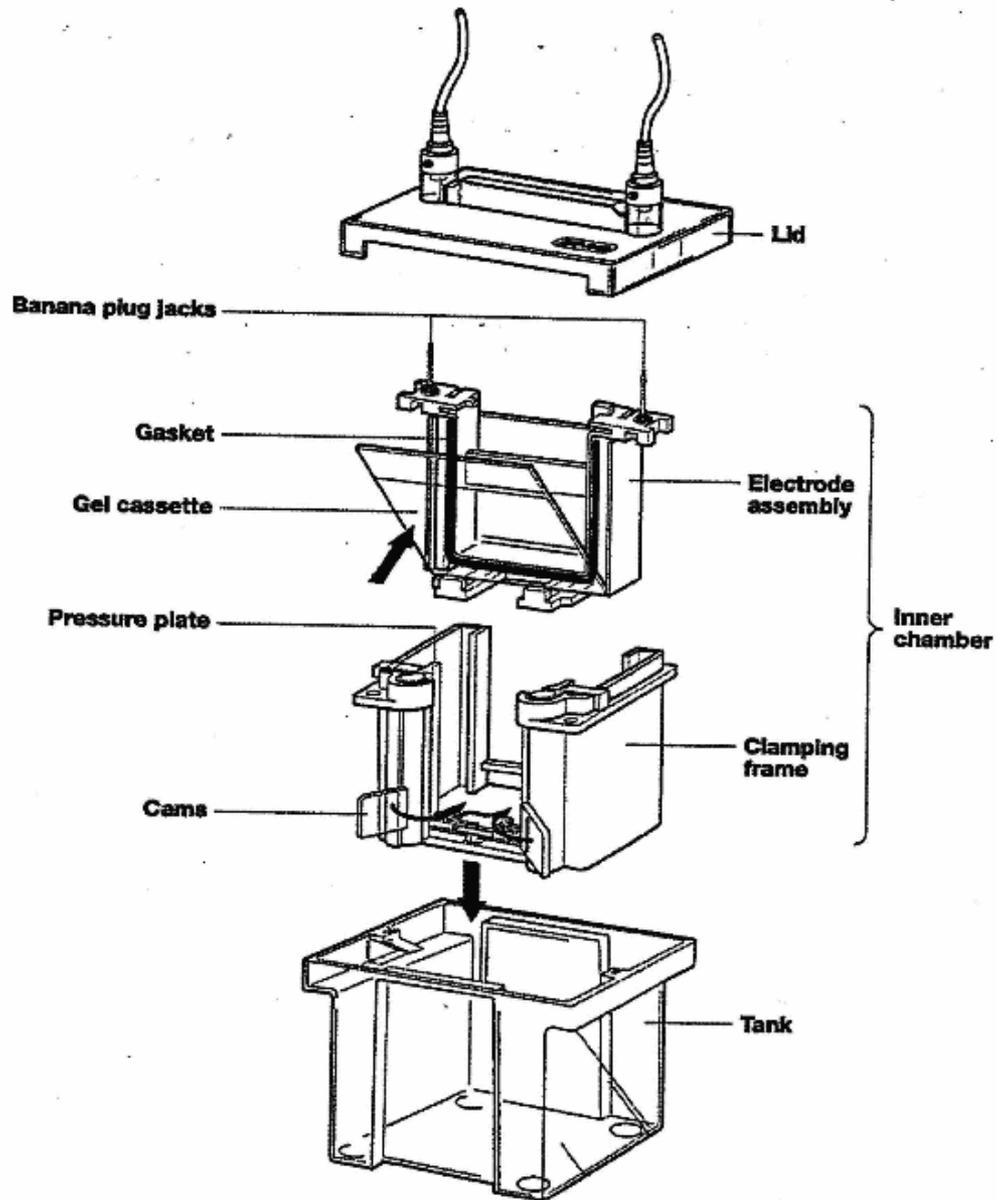
Il gel di poliacrilammide: un setaccio molecolare

(PAGE: PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)



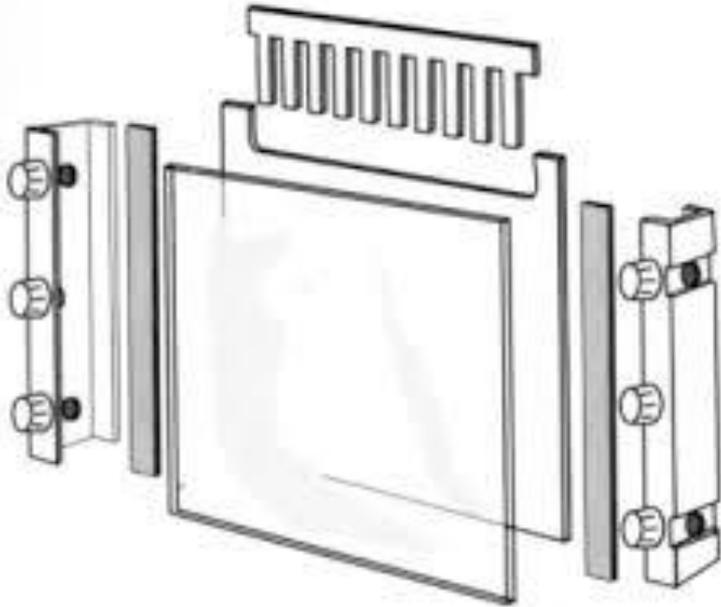
L'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE)





L'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE)

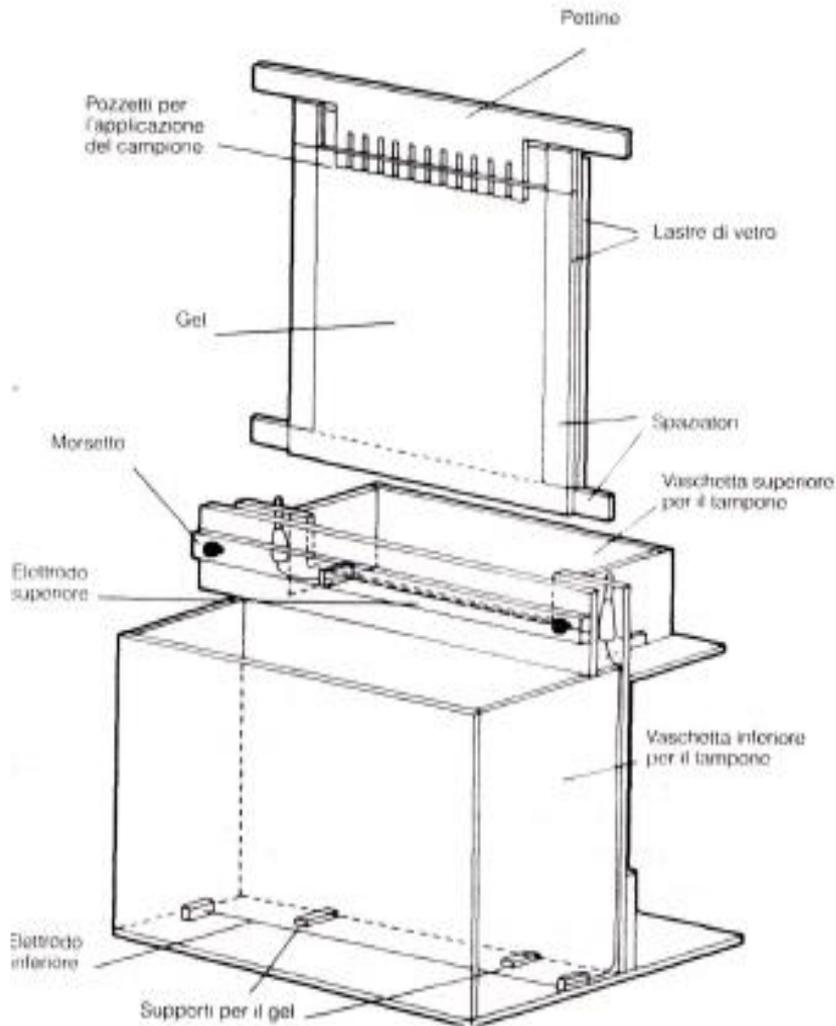
Il gel di poliacrilammide viene preparato direttamente nella camera elettroforetica



La polimerizzazione avviene all'interno del sistema: la soluzione contenente l'acrilammide viene stratificata tra le due lastre di vetro al cui interno viene posto un pettine per formare i pozzetti in cui saranno alloggiati i campioni da analizzare.

Le due lastre di vetro sono disposte parallelamente grazie a spessori di plastica che consentono di preparare gel di spessore variabile tra 0.8 e 1.5 mm e le cui dimensioni dipendono dalla risoluzione che si vuole ottenere, di solito 10 x 10 cm

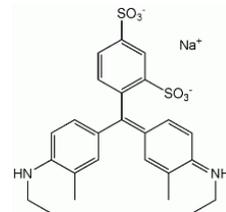
L'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE)



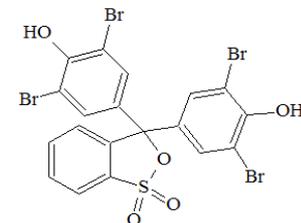
Le lastre contenenti il gel sono immerse in una vaschetta nella quale è presente il tampone di corsa (generalmente TRIS a pH 8.3)

La camera è collegata a due elettrodi che generano il campo elettrico, con l'anodo in corrispondenza della parte inferiore del gel e il catodo in corrispondenza di quella superiore.

L'andamento della corsa viene monitorato grazie a dei traccianti ovvero sostanze colorate che hanno mobilità elettroforetica maggiore delle proteine e che indicano il momento in cui è necessario terminare la corsa



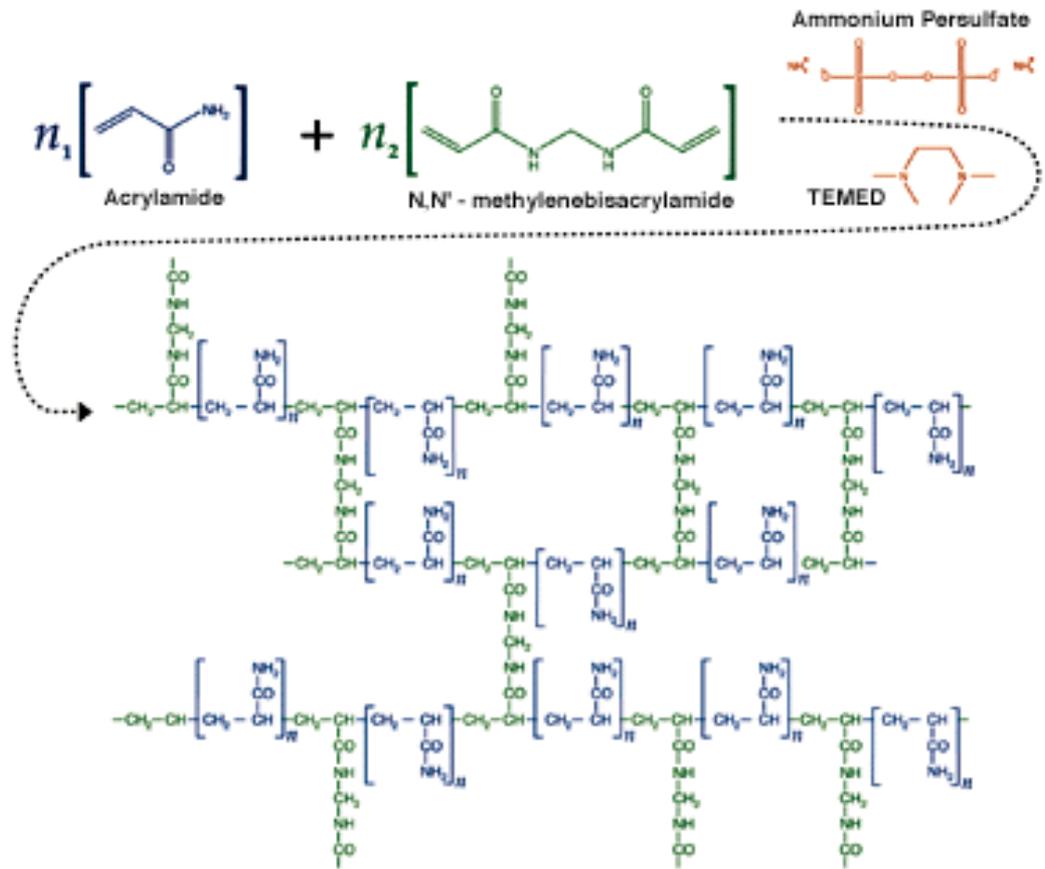
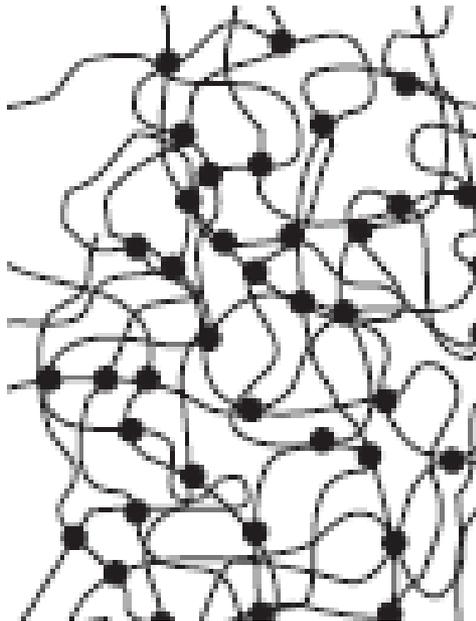
Xilene Cianolo



Blu di Bromofenolo

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE)

La sintesi avviene per polimerizzazione di acrilammide ed N,N'-metilenbisacrilammide, in presenza di ammonio persolfato e TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiammina) come catalizzatori.



L'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE)

La dimensione dei pori del gel di poliacrilammide può essere modulata variando:

- la percentuale totale di acrilamide ovvero acrilammide + bisacrilammide (%T)

oppure

- la percentuale di bisacrilammide (%C)

$$\%T = \frac{\text{gr acrilammide} + \text{gr bisacrilammide}}{\text{ml della sol. di polimerizzazione}} \times 100$$

$$\%C = \frac{\text{gr bisacrilammide}}{\text{gr acrilammide} + \text{gr bisacrilammide}} \times 100$$

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE)

Gel con pori di dimensioni ridotte (alta % T)

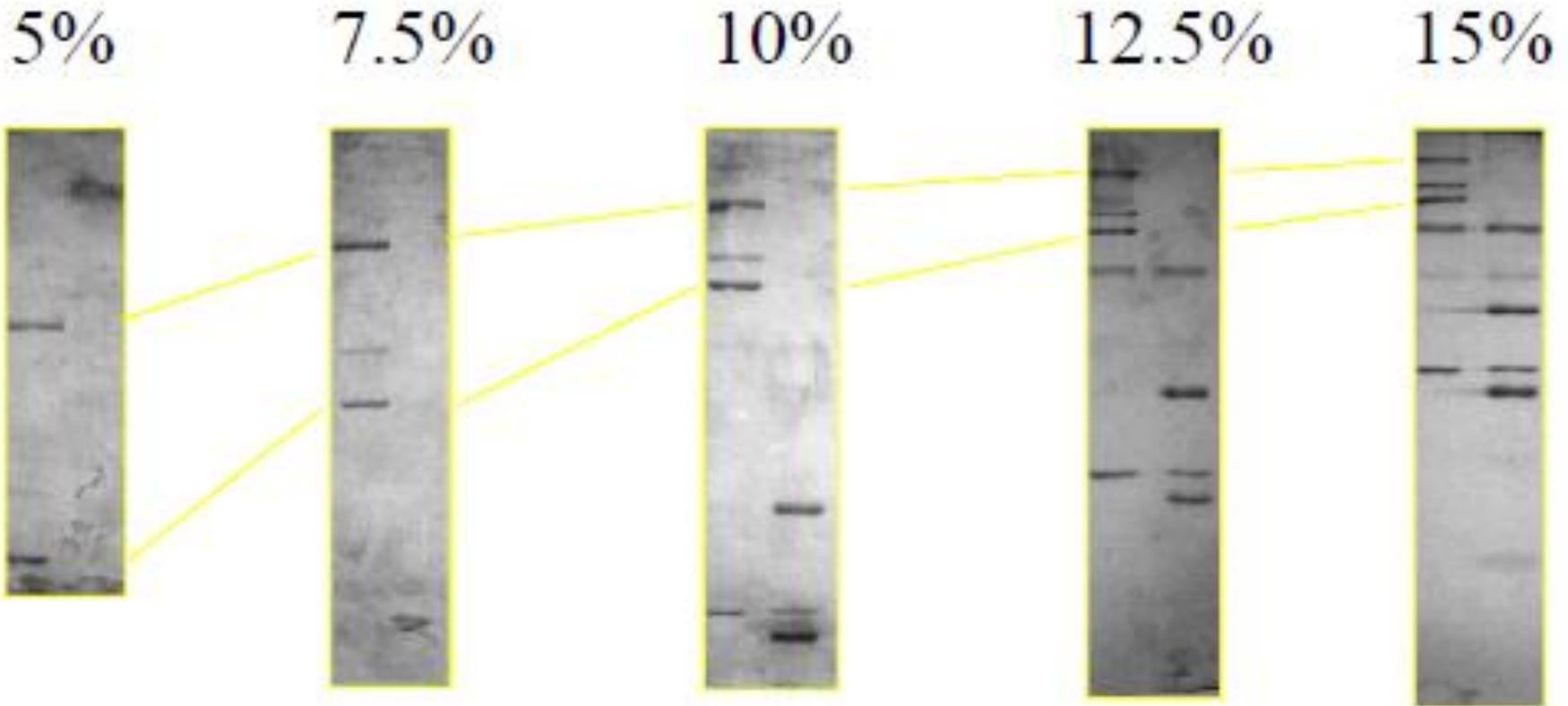
- Sono restrittivi per le proteine di grandi dimensioni, a tal punto che alcune di esse possono anche non entrare nel gel.
- Migliorano la separazione delle proteine a basso peso molecolare

Gel con pori di grandi dimensioni (bassa % T)

- Sono meno restrittivi per le proteine di grandi dimensioni, e ne migliorano la separazione.
- Proteine a basso peso molecolare migrano con il fronte del gel e non si separano

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE)

mantenendo costante C ed aumentando la % di T
si preparano gel con pori di dimensioni minori



L'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE)

In Condizioni denaturanti

La separazione delle proteine avviene in base al **solo peso molecolare**: le proteine sono denaturate e perdono la struttura terziaria e/o quaternaria, laddove presente

In Condizioni native

la separazione delle proteine viene effettuata in base al **rapporto carica/massa**: le proteine vengono avviate all'elettroforesi in un tampone non riducente e non denaturante che consente il mantenimento della struttura terziaria e della densità di carica

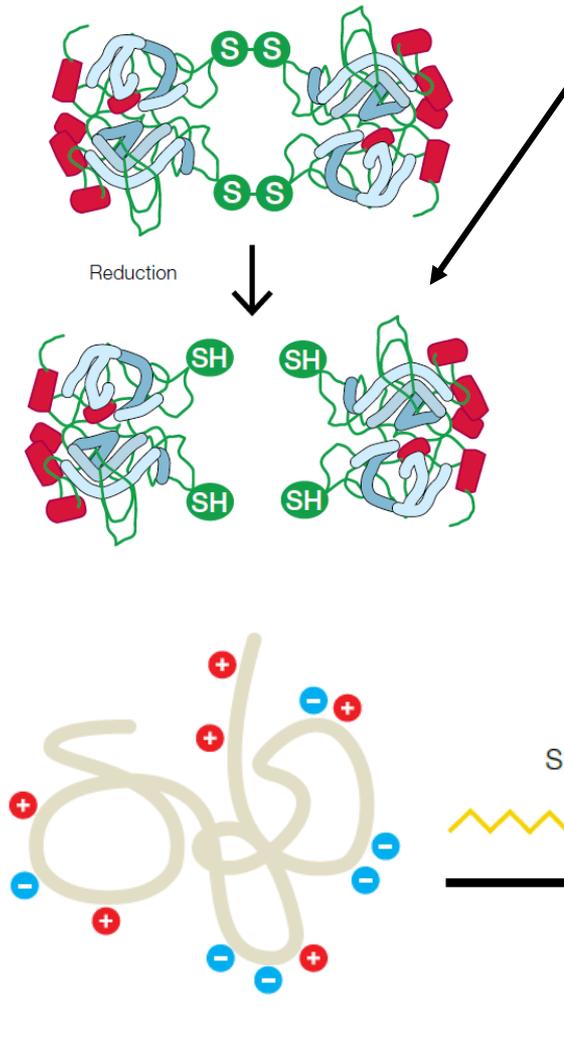
L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)

La metodica maggiormente usata per lo studio delle proteine, è indicata come **SDS-PAGE** in quanto comporta l'uso del sodio dodecilsolfato come agente denaturante

Consente determinazioni di tipo qualitativo e quantitativo

Le proteine vengono separate solo sulla base del loro peso molecolare

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)



Il β -mercaptoetanollo riduce i ponti disolfuro

il **Sodio DodecilSolfato (SDS)**

- rompe i legami idrogeno e le interazioni idrofobiche distruggendo le strutture secondarie e terziarie
- fornisce alle proteine una carica netta costante per unità di massa pari a 1,4 g SDS/ 1 g proteina (1 SDS/2 aa)
- "maschera" la carica apportata dagli aminoacidi della proteina.

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)

A pH alcalino l'SDS porta due cariche negative e quindi conferisce alle proteine una carica netta negativa

L'SDS si lega quasi stechiometricamente e quindi avremo un rapporto carica/massa uguale per tutte le proteine

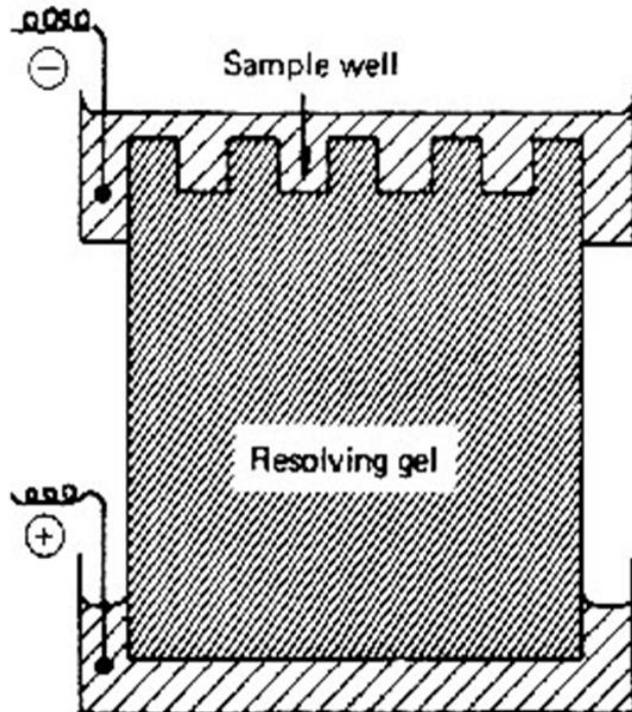
Tuttavia non tutte le proteine legano l'SDS allo stesso modo: infatti il detergente si lega preferenzialmente ai residui aminoacidici idrofobici

La mobilità elettroforetica sarà diversa da quella attesa sulla base del solo peso molecolare: tramite questa metodica si determina il **peso molecolare apparente** di una proteina, in quanto alcune proteine, per loro natura (composizione aminoacidica, modificazioni, ecc.) migrano in modo anomalo, non rispecchiando il loro effettivo peso molecolare

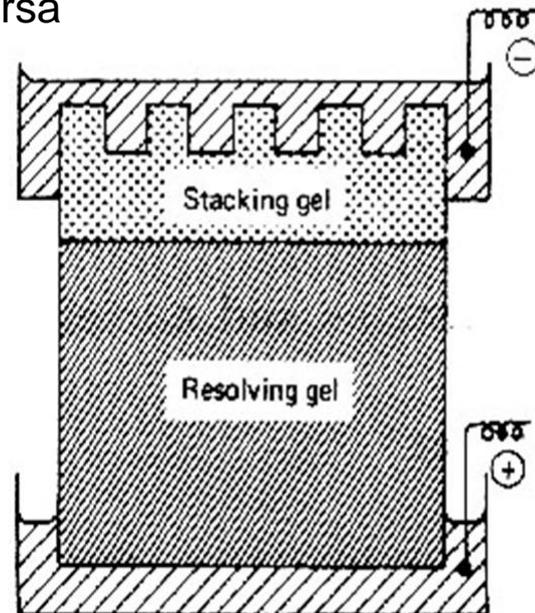
L'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE)

Sistemi continui e discontinui

Un **sistema continuo** è costituito da un solo tipo di gel preparato nello stesso tampone che sarà poi usato per la corsa



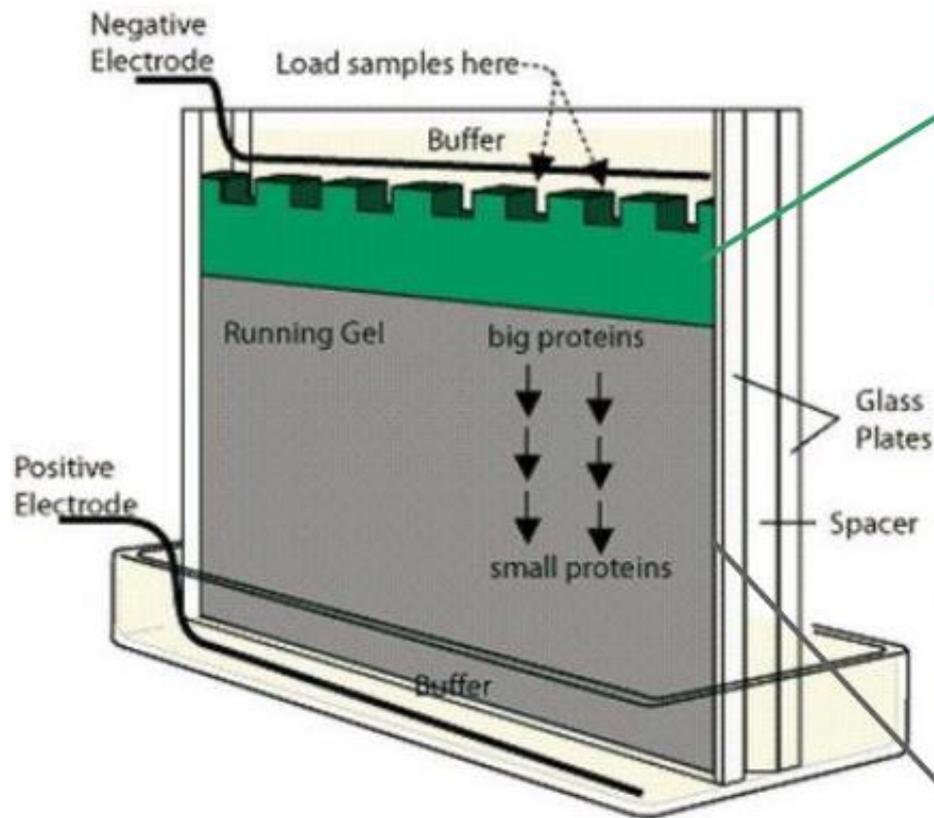
Un **sistema discontinuo** è costituito da **due gel**: il primo presenta pori larghi e quindi è non restrittivo (**stacking gel**); esso è disposto sul secondo (**resolving gel**) che invece presenta pori più piccoli che consentono di separare le proteine con una risoluzione maggiore di un sistema continuo. Ciascun gel è preparato in un opportuno tampone, diverso da quello usato per la corsa



1D

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)

Condizioni classiche di un esperimento di elettroforesi discontinua

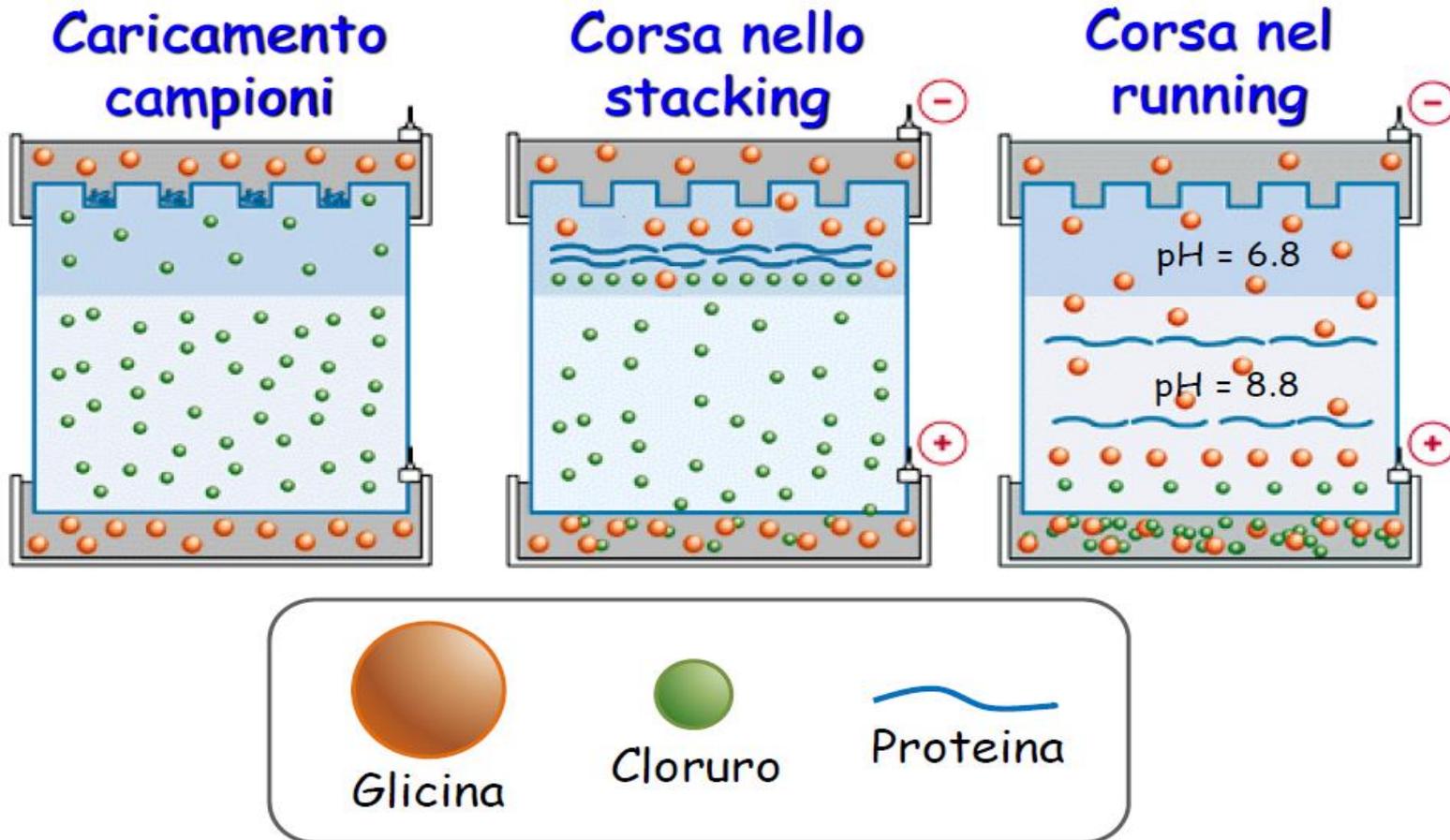


stacking gel
T = 3-5%
TRIS-HCl a pH 6.8

Tampone di corsa
TRIS-Glicina a pH 8.3

resolving gel
T = 7,5 -20%
TRIS-HCl a pH 8.8

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)

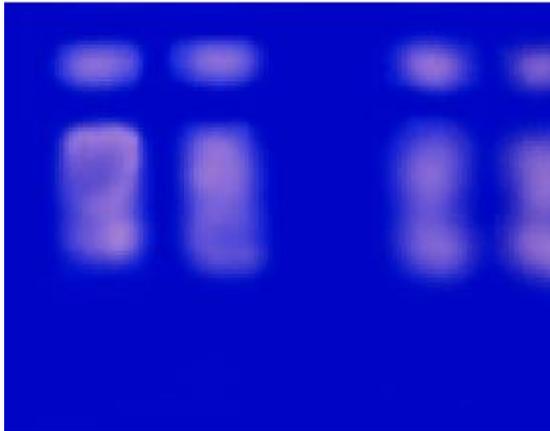


Nel tampone di corsa è presente anche la glicina ($pI = 6.1$) che si trova in forma ionica (carica negativa)

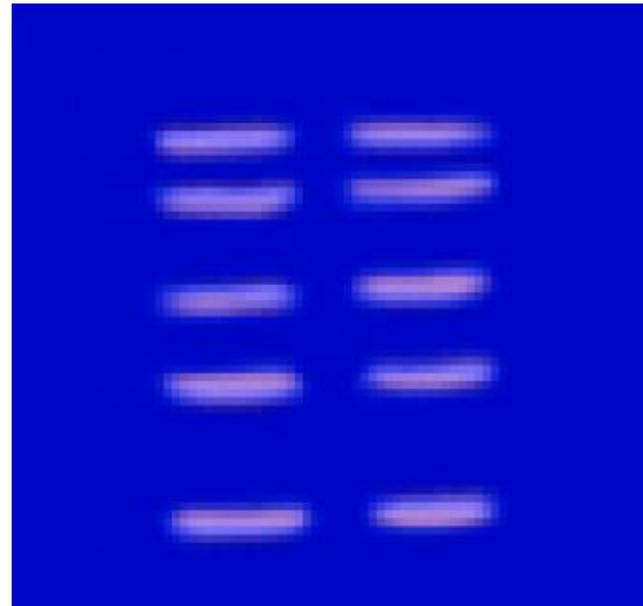
L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)

elettroforesi discontinua: importanza del gel di impaccamento

senza gel di impaccamento



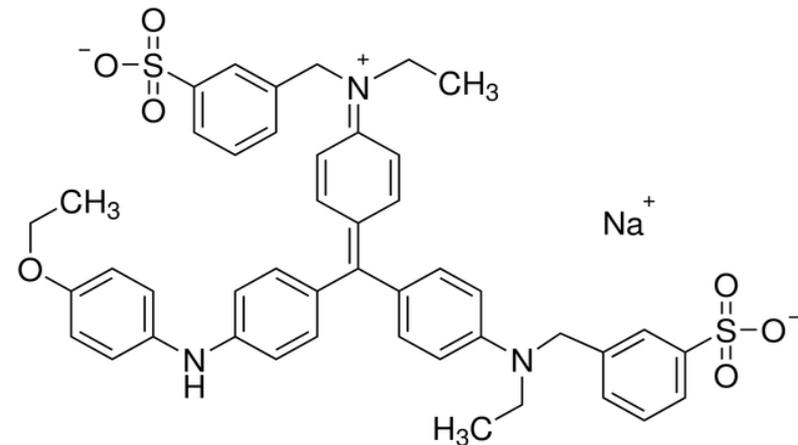
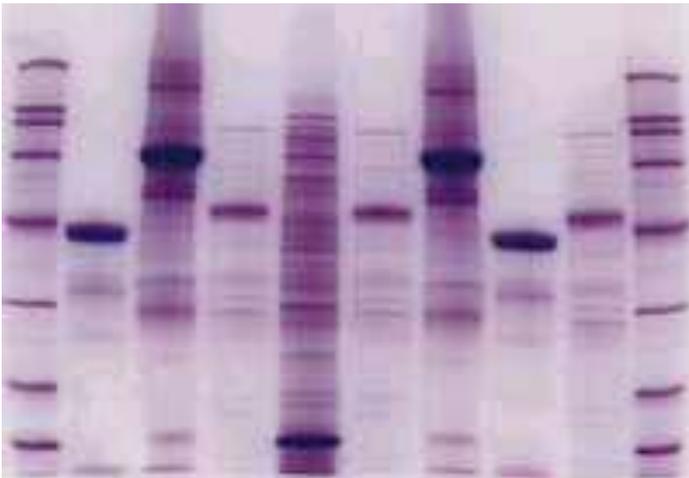
con gel di impaccamento



L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)

Rivelazione delle bande proteiche dopo la corsa: metodi di colorazione

Colorazione con Blue di Comassie (sensibilità: 25ng)



rivelazione nel visibile

Il colorante generalmente usato è il trimetilamino solfato Comassie brilliant Blue usato allo 0,1% in metanolo, acqua e acido acetico glaciale.

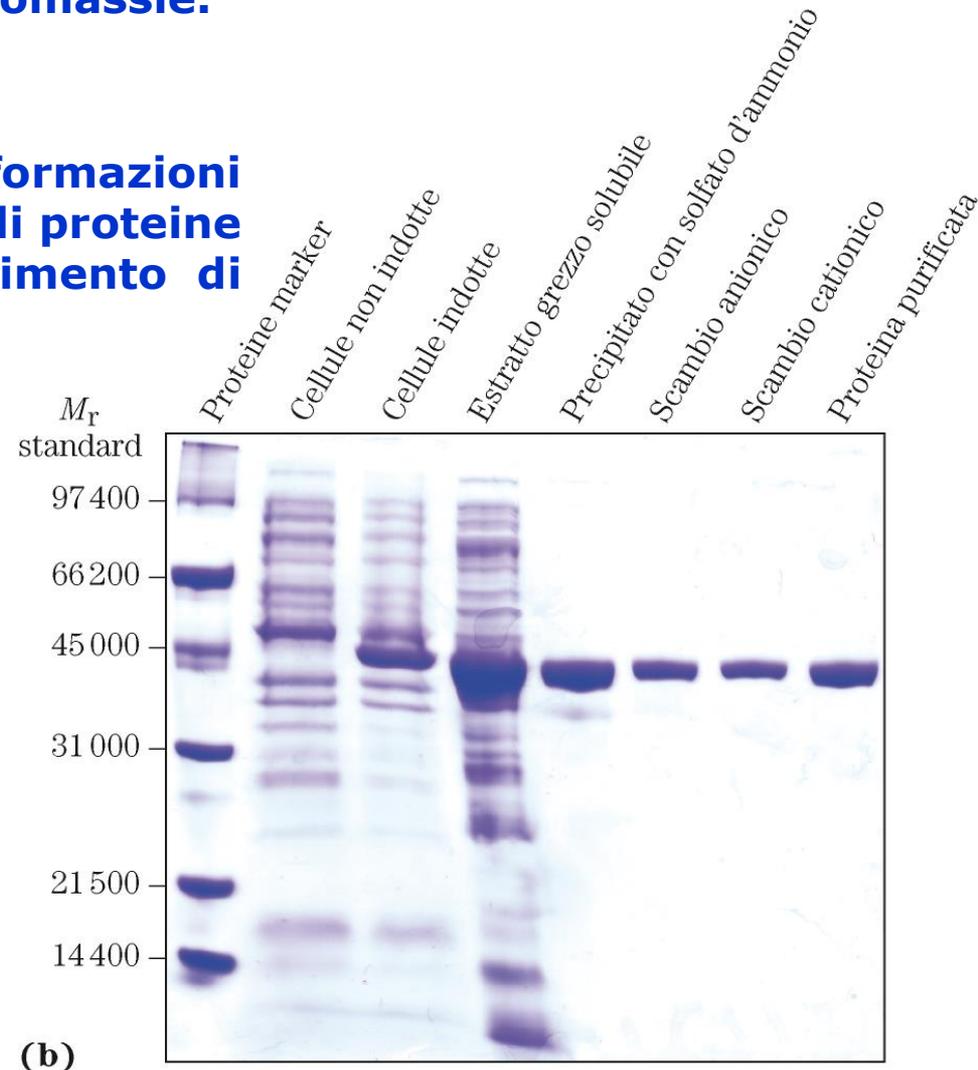
Il colorante si lega alle proteine e le fissa nel gel, quindi il gel viene lavato in una soluzione decolorante che porta via il coomassie che non si è legato evidenziando le proteine visibili come bande blu.

elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)

Dopo la corsa elettroforetica le proteine vengono visualizzate mediante colorazione con il colorante blu di Coomassie.

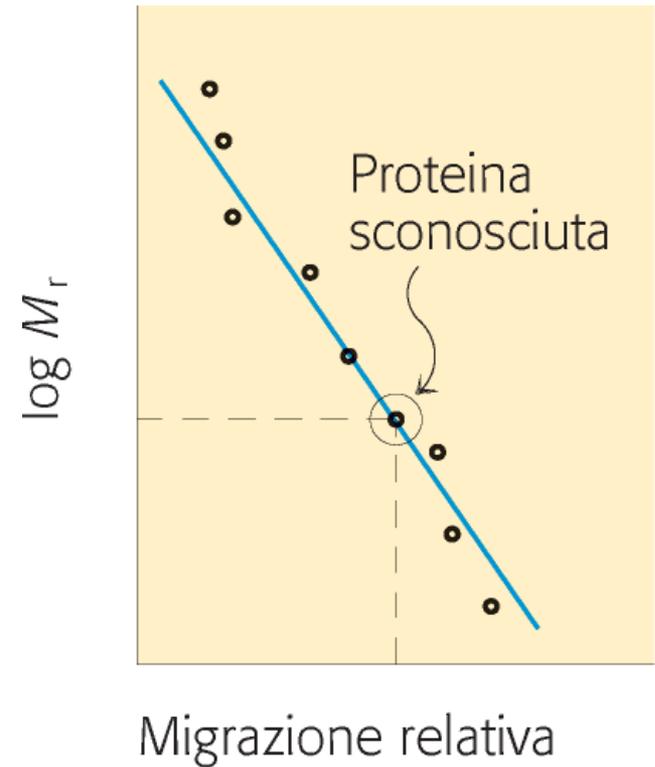
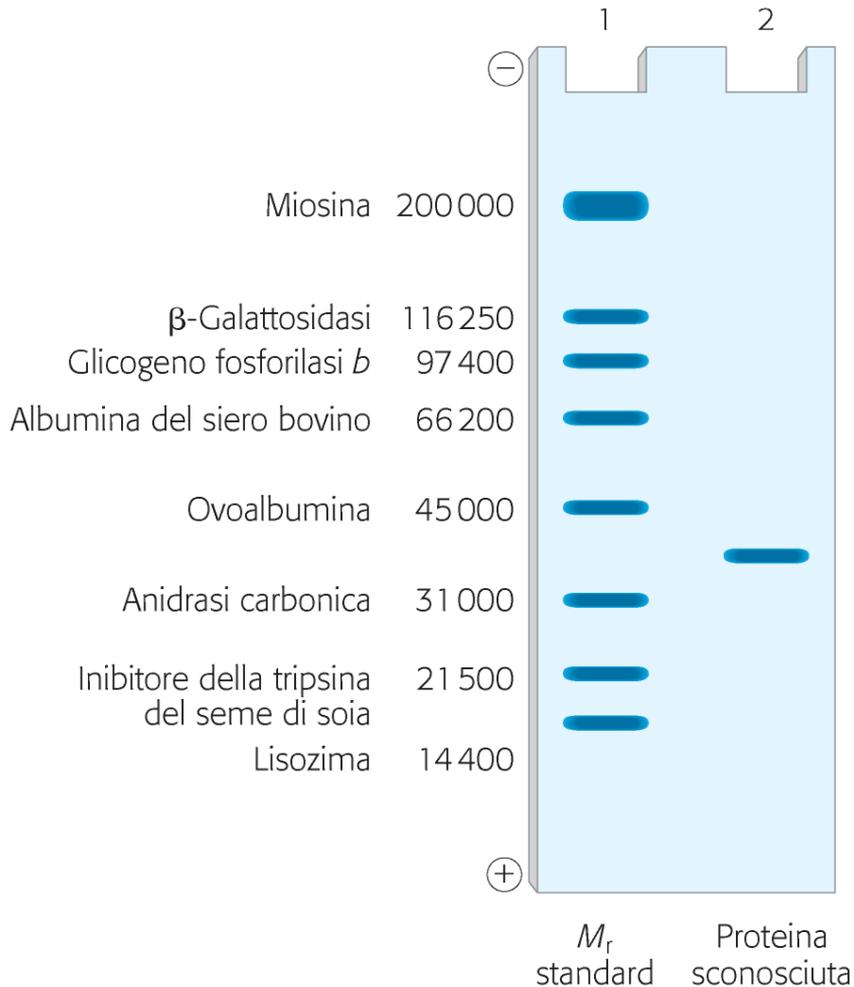
Tale tecnica consente di ottenere informazioni sul grado di purezza di una miscela di proteine dopo i vari passaggi di un procedimento di purificazione.

Se una proteina è composta di più subunità queste appariranno come bande distinte.



DETERMINAZIONE DEL PESO MOLECOLARE MEDIANTE SDS-PAGE

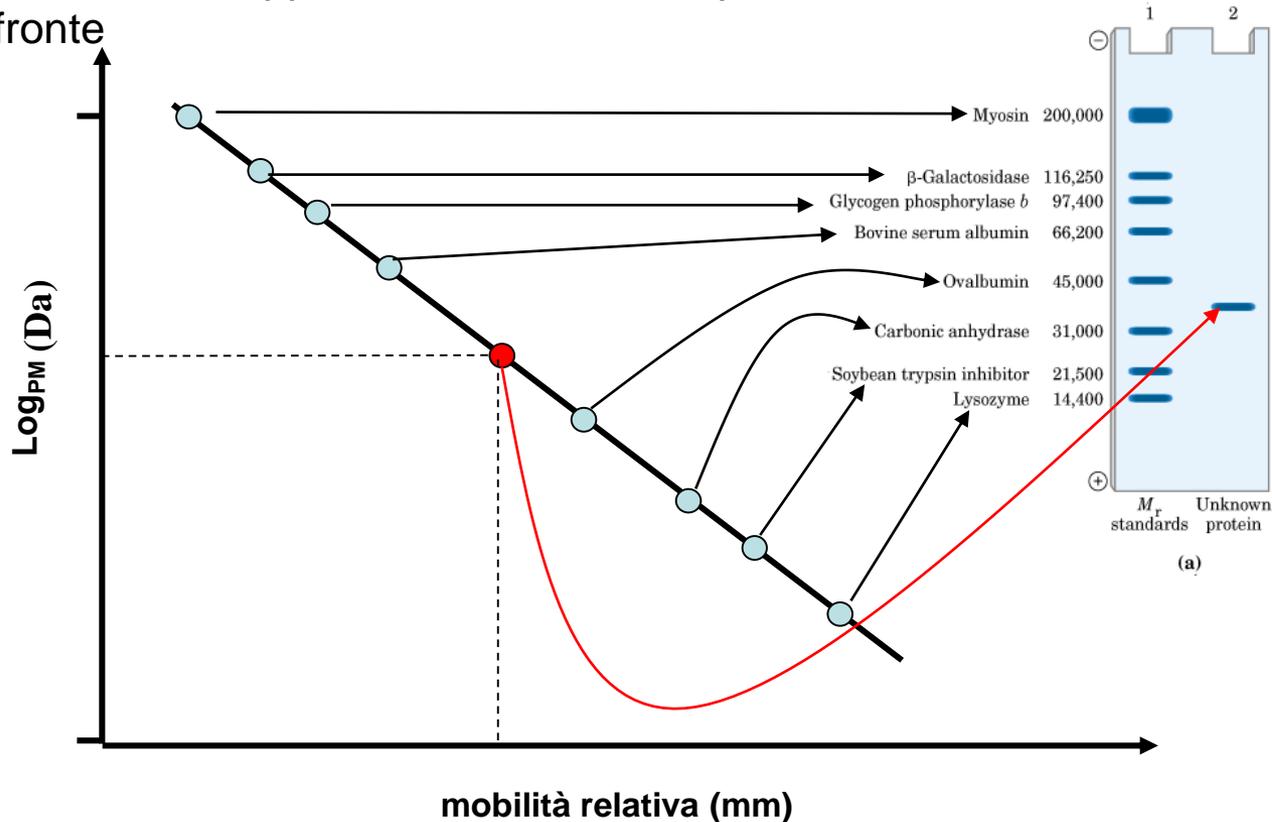
Il confronto con gli standard di peso molecolare consente di determinare il PM delle proteine.



L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)

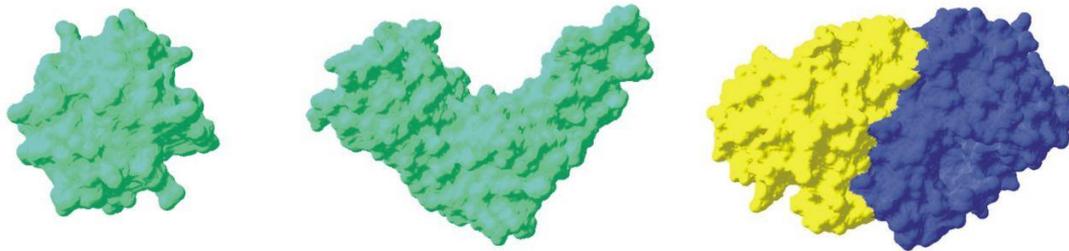
Determinazione della massa molecolare di proteine

In uno dei pozzetti si inserisce una miscela di proteine a peso molecolare noto con le quali si costruisce una retta di calibrazione in cui si riporta il $\text{Log}(M_r)$ in funzione della mobilità relativa ovvero rapporto tra la distanza percorsa dalla proteina e la distanza percorsa dal fronte



L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni native (Native-PAGE)

Analisi delle proteine nella loro conformazione nativa



Utile per studiare:

1. le interazioni proteina-proteina oppure proteina-ligando
2. le proteine oligomeriche
3. le isoforme o isozimi

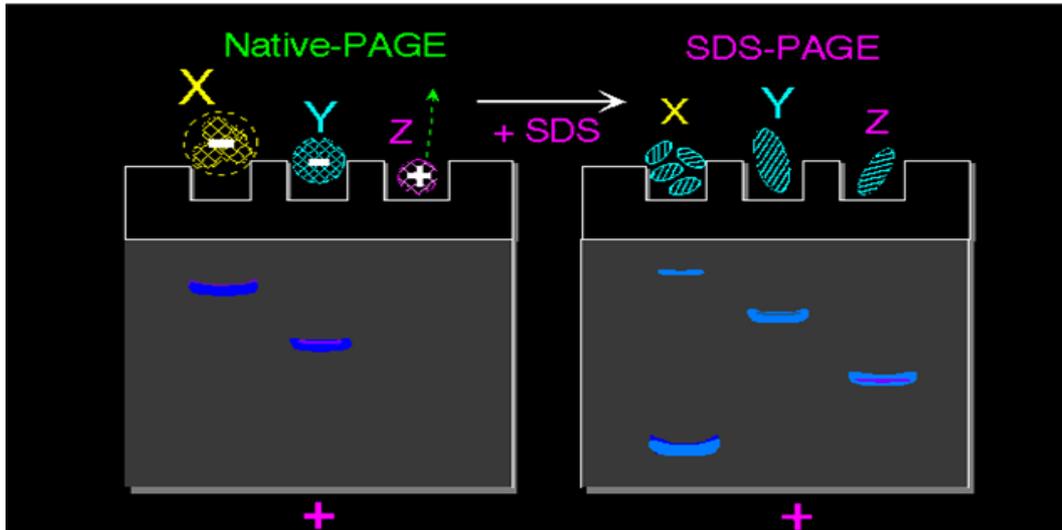
L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni native (Native-PAGE)

Le proteine non vengono pretrattate con agenti denaturanti pertanto la separazione avviene in base alla carica netta, al peso molecolare ed alla forma: le proteine sono sospese in tamponi non-riducenti e non-denaturanti.

Le proteine devono possedere un pI acido o debolmente basico ($\sim 3-8$) per migrare verso l'anodo, altrimenti è necessario invertire la polarità del sistema per effettuare l'analisi.

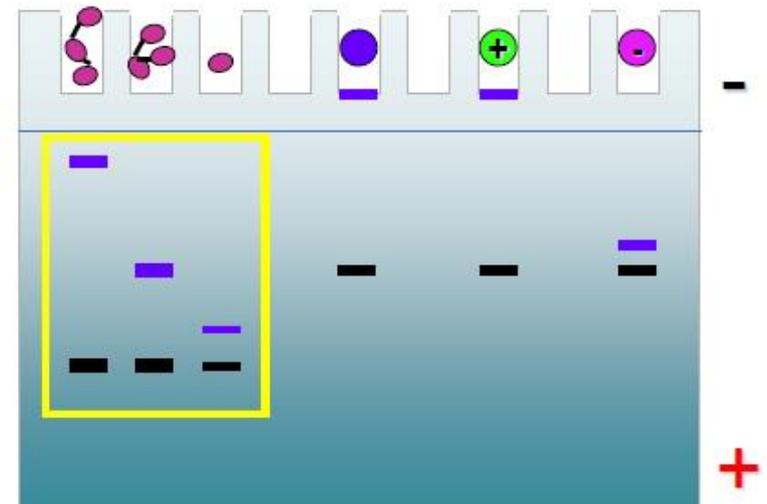
La Native-PAGE utilizza anch'essa gli ioni cloruro e glicina per creare un fronte di proteine che poi si sperano nel gel in base al rapporto carica massa ed alla forma.

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni native (Native-PAGE)



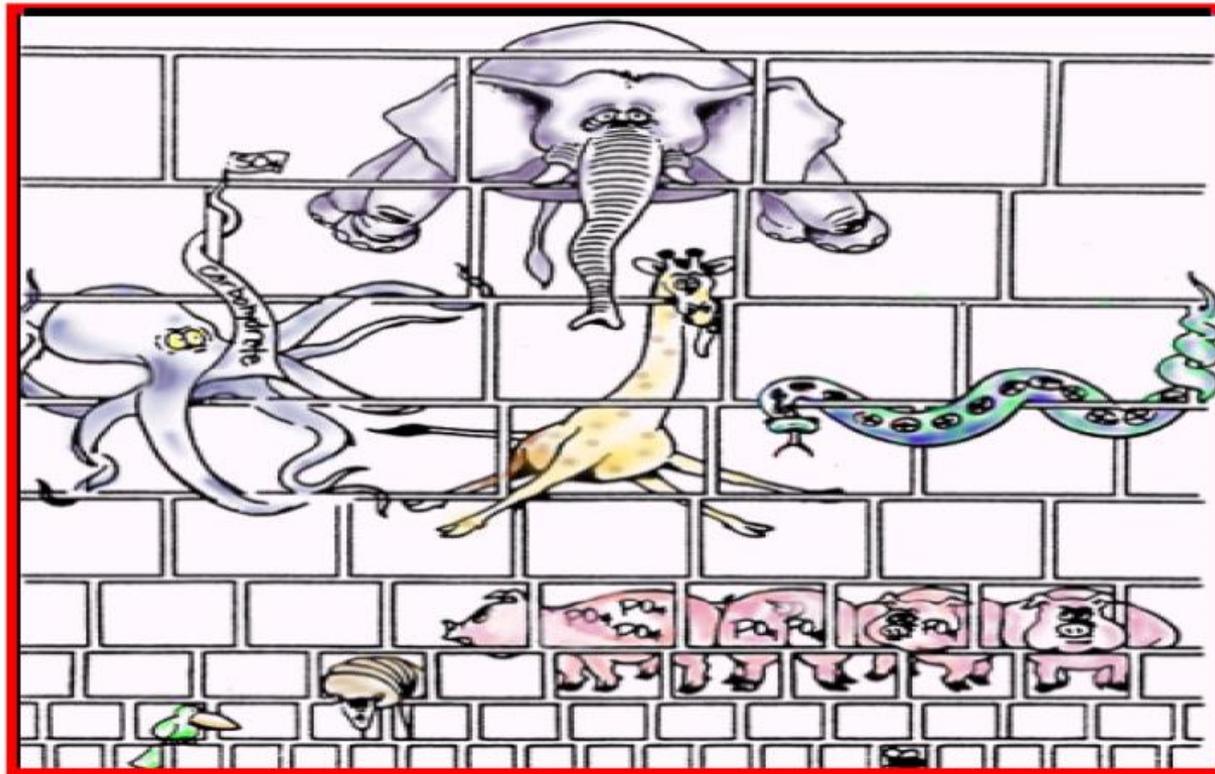
Native-PAGE

SDS-PAGE



L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni native (Native-PAGE)

La risoluzione di una Native-PAGE può essere migliorata utilizzando un gel con gradiente di poliacrilammide che consente di separare proteine in un ampio range di PM e che posseggono un peso molecolare molto simile.



Isoelettrofocalizzazione (IEF)

Le proteine vengono caricate su di un gel a porosità elevata in modo che la separazione non sia influenzata dalla massa e dalla forma delle proteine, ma solo dalla loro carica.

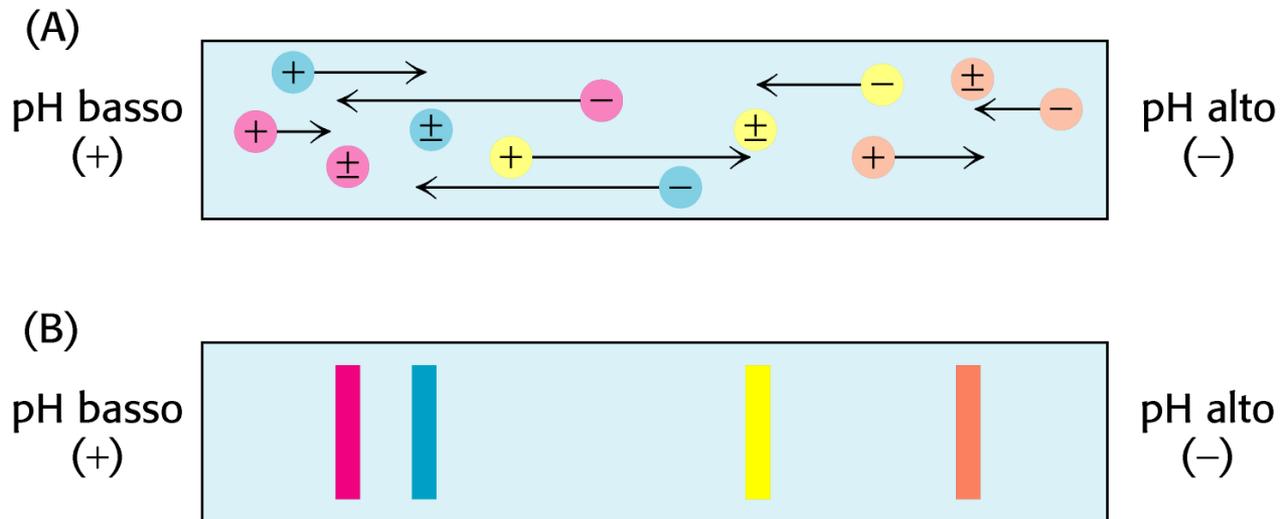
All'interno del gel viene generato un gradiente continuo di pH mediante l'uso di miscele di anfotiti, ovvero molecole anfotere che hanno un elevato potere tamponante al loro pI.

Le proteine migrano nel gradiente di pH verso l'anodo o il catodo a seconda del segno della carica nativa ed arrestano la propria corsa quando si ritrovano nella zona in cui il pH è pari al loro pI.

Tutte le molecole di una determinata specie si concentreranno o focalizzeranno in una zona estremamente ristretta (quella appunto in cui $\text{pH}=\text{pI}$): questa caratteristica rende la IEF una tecnica ad elevata risoluzione, difatti è possibile separare proteine che differiscono tra loro anche per una sola carica.

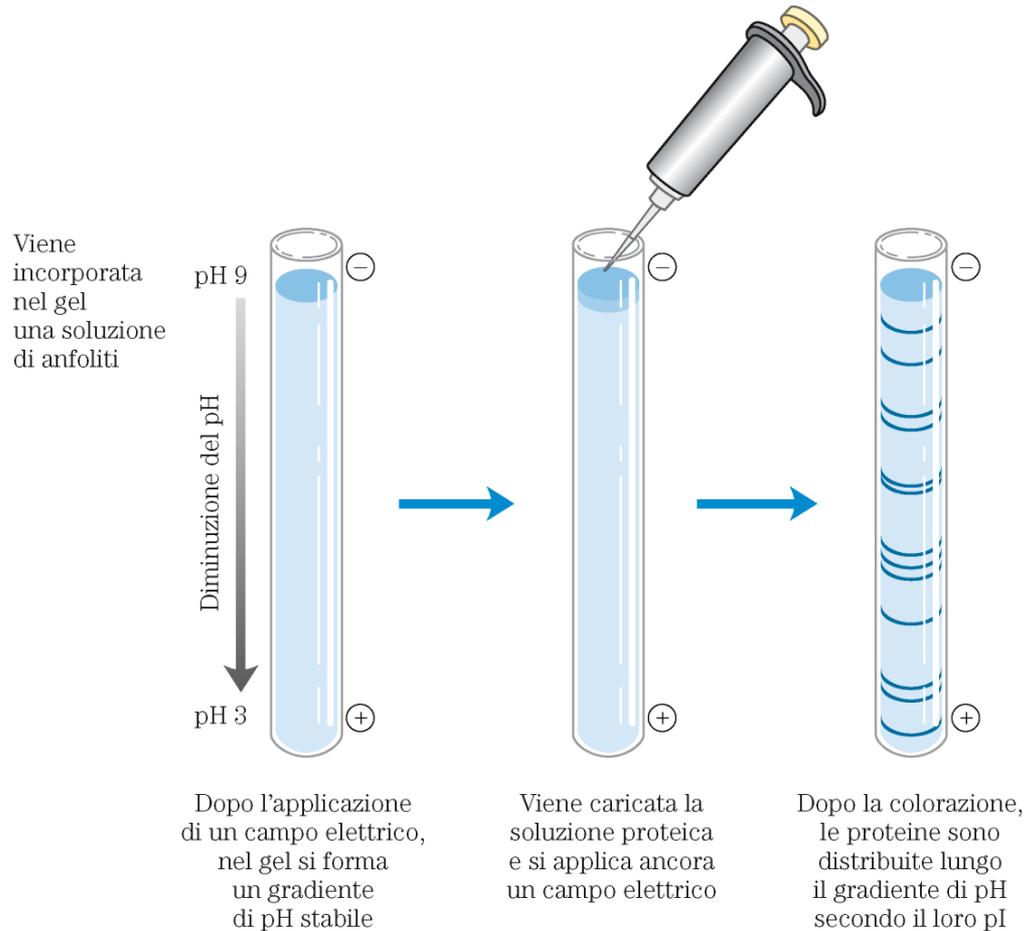
ISOELETTROFOCALIZZAZIONE

Questo tipo di tecnica elettroforetica consente di separare le proteine in base al pI (punto isoelettrico) ovvero il valore di pH a cui la proteina ha carica netta pari a zero.



Le proteine vengono poste in un gel di poliacrilammide in condizioni native nel quale precedentemente è stato creato un gradiente di pH mediante l'uso di una soluzione di "polianfoliti" (acidi e basi organici a basso peso molecolare) immersi nella matrice del gel.

ISOELETTROFOCALIZZAZIONE

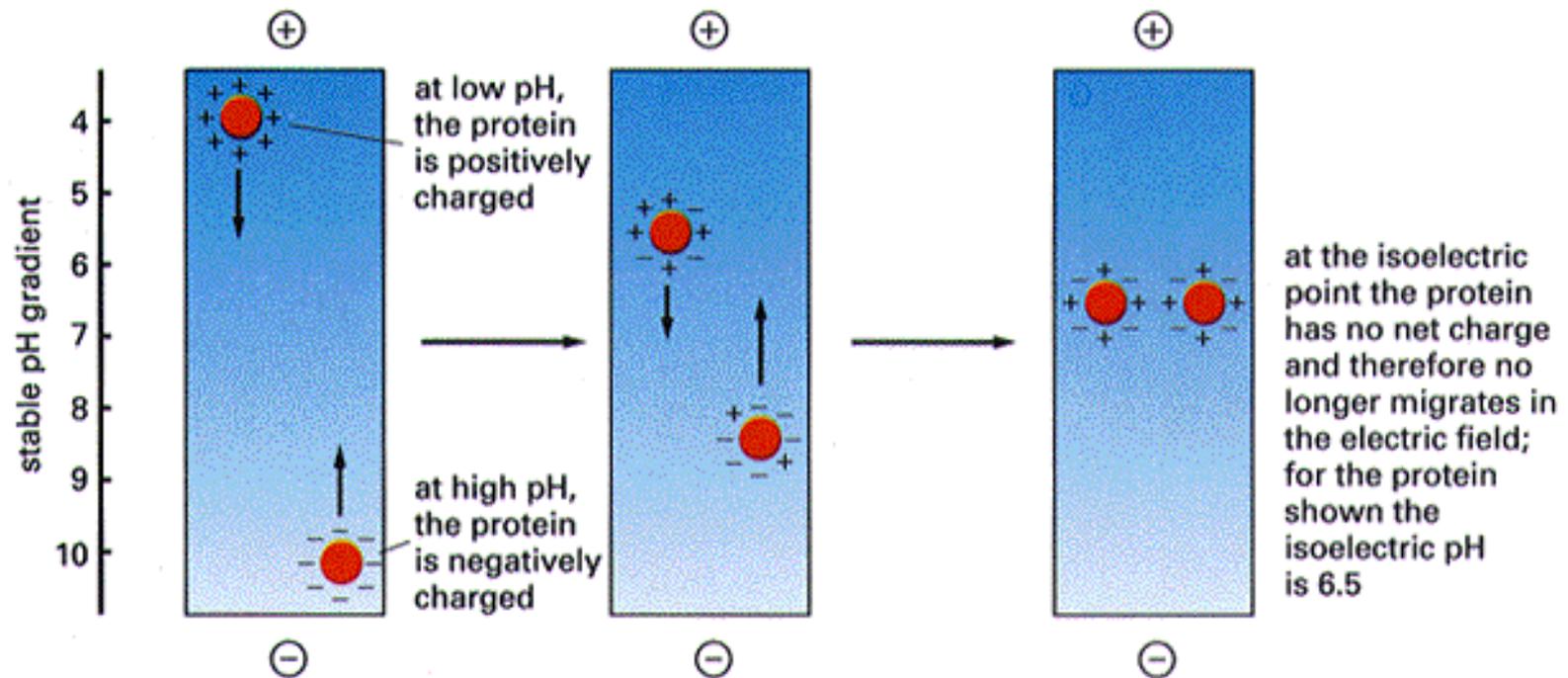


Il gel usato in tal caso presenta dei pori di dimensioni molto elevate, pertanto le proteine si muoveranno in esso solo per effetto della propria carica netta nativa.

Quando la proteina incontra la regione in cui il pH è pari al proprio pI essa arresterà la propria corsa in quanto in tale zona la sua carica netta sarà nulla e quindi non potrà più muoversi per effetto del campo elettrico.

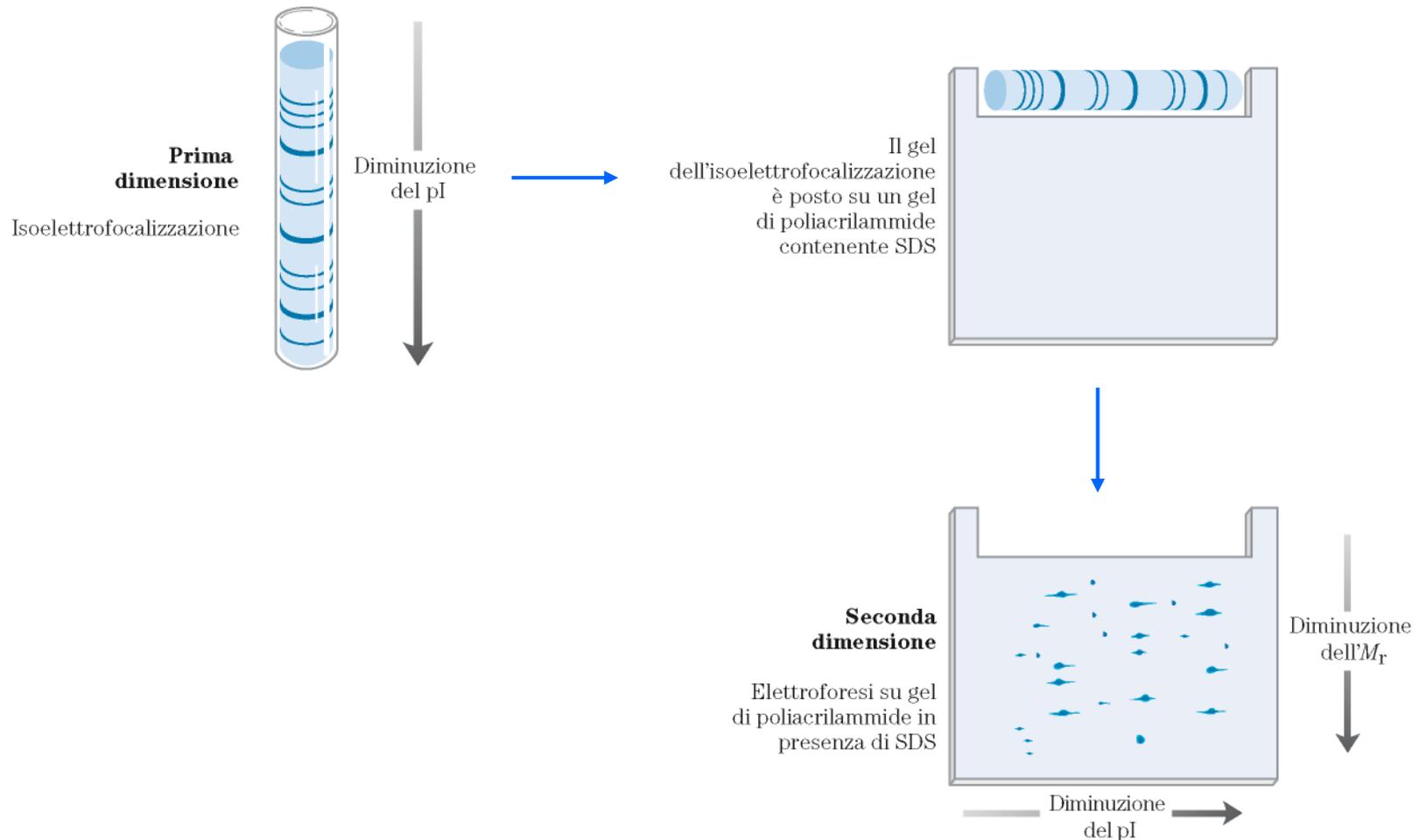
Isoelettrofocalizzazione (IEF)

Le proteine in **condizioni native** migrano nel gradiente di pH verso l'anodo o il catodo a seconda del segno della carica nativa ed arrestano la propria corsa quando si ritrovano nella zona in cui il pH è pari al loro pI.



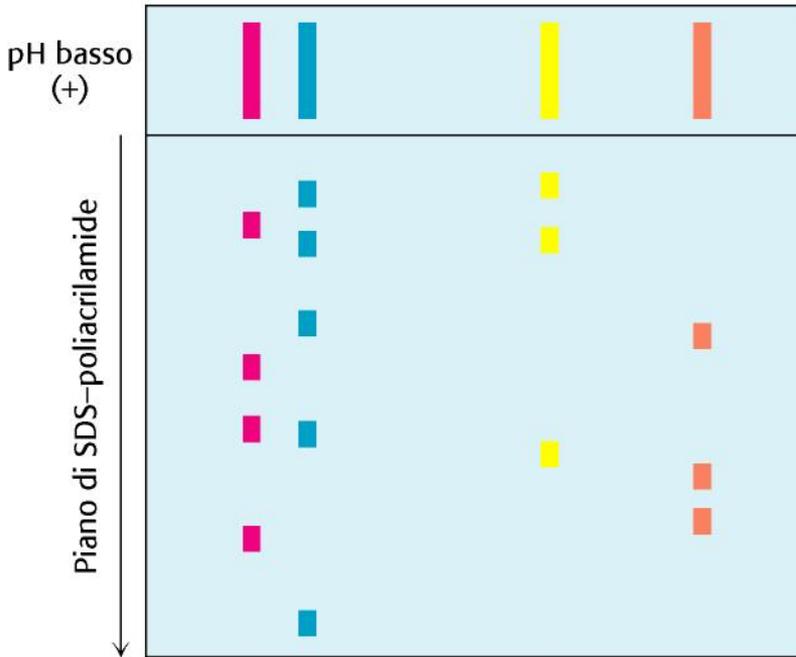
ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE

Questo tipo di tecnica consente di separare le proteine in due dimensioni: dapprima in base al pI e quindi in base al peso molecolare



ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE

(A)



(B)

Isoelettrofocalizzazione

SDS-PAGE



Questo tipo di tecnica consente di separare le proteine in due dimensioni: dapprima in base al pI e quindi in base al peso molecolare