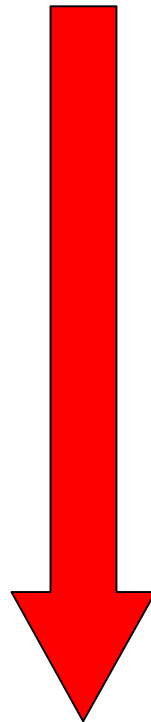


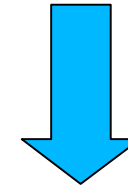
FASE STAZIONARIA

Solida

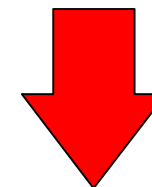


**ADSORBIMENTO
su solido**

Liquida o semiliquida
supportata su di una matrice solida
(solitamente legata covalentemente
alla matrice stessa)



(matrice inerte rispetto al principio
separativo in considerazione
=>
Non contribuisce alla separazione
dei componenti della miscela)



**RIPARTIZIONE
tra liquidi**

Supporto solido alla fase stazionaria

(Materiale inerte che non partecipa al processo cromatografico)

A particelle (d_p)



Silice

Polimeri di:
 Agarosio (Sephacrose – Bio-Gel-A)
 Poliacrilamide (Bio-Gel-P)
 Cellulosa
 Destrano - Sephadex
 Polimeri organici

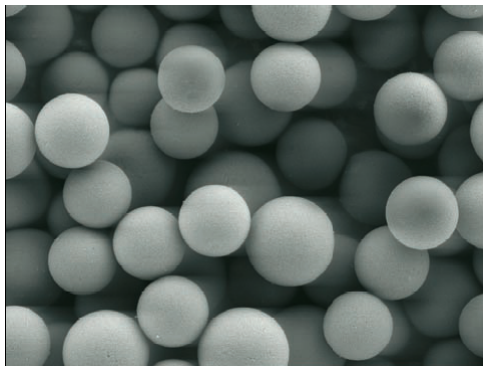
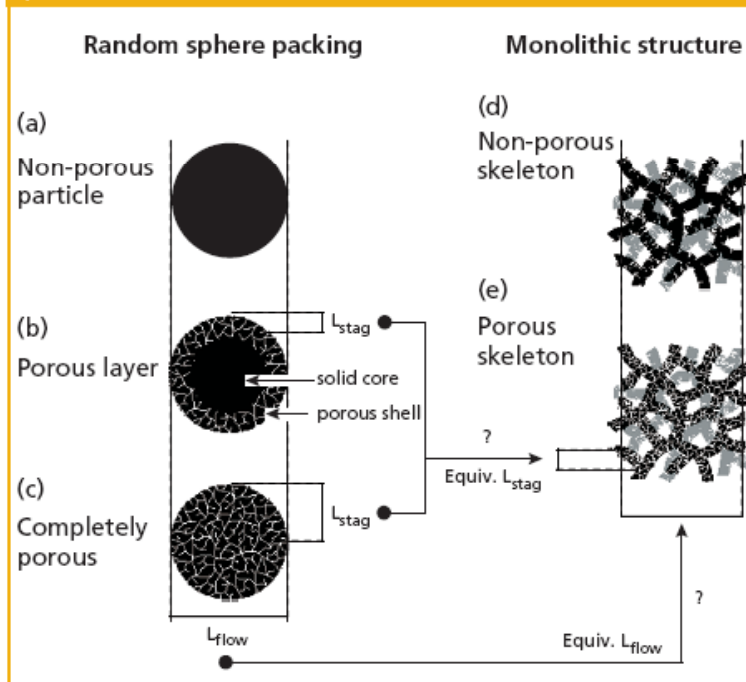


Figure 7: Pictorial representation of characteristic dimensions of a particulate packed bed and monolith. (Taken with permission from reference 1.)

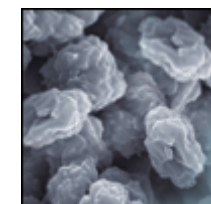
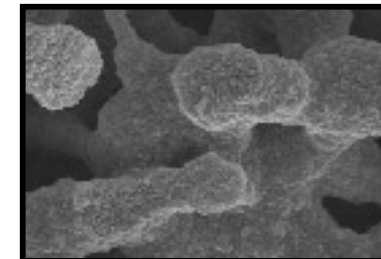
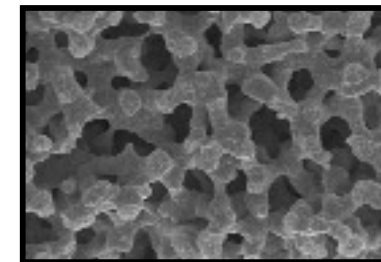


Monolitico



Silice monolitica

Polimeri organici monolitici
 Poli(stirene-co-divinilbenzene)



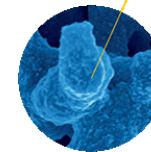
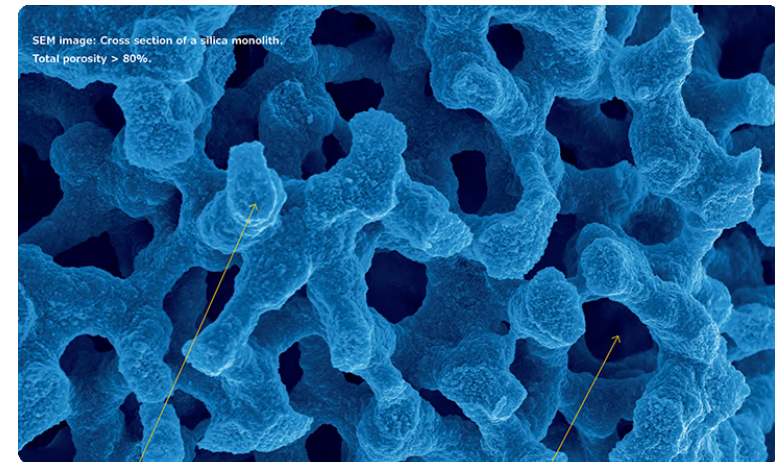
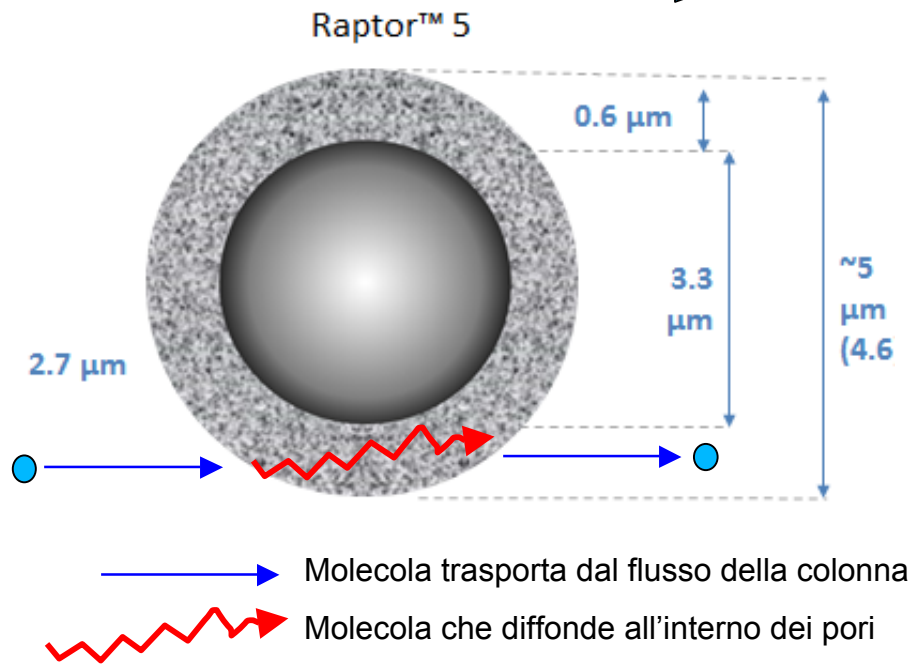
Comprimibilità del supporto solido

=>

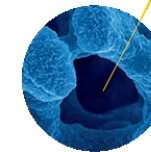
Al diminuire del diametro delle particelle
 aumenta la pressione che bisogna
 esercitare per mantenere un determinato
 flusso ma non tutti i materiale sopportano
 pressioni elevate – differenza tra LC a
 bassa, media e alta pressione

Nb: la porosità aumenta la capacità della colonna
=> Più superficie disponibile per il legame ma...
=> maggiore problemi di diffusione e di
trasferimento di massa

Column flow (FM)



Mesopores:
Correspond to the pores on the silica particles



Macropores:
Correspond to the inter-particle space

Pori della colonna: dimensioni determinano l'accessibilità delle molecole

Piccole molecole: 90 Å

Peptidi/piccole proteine (circa 150 aa): 150 Å

Proteine: 300/400 Å

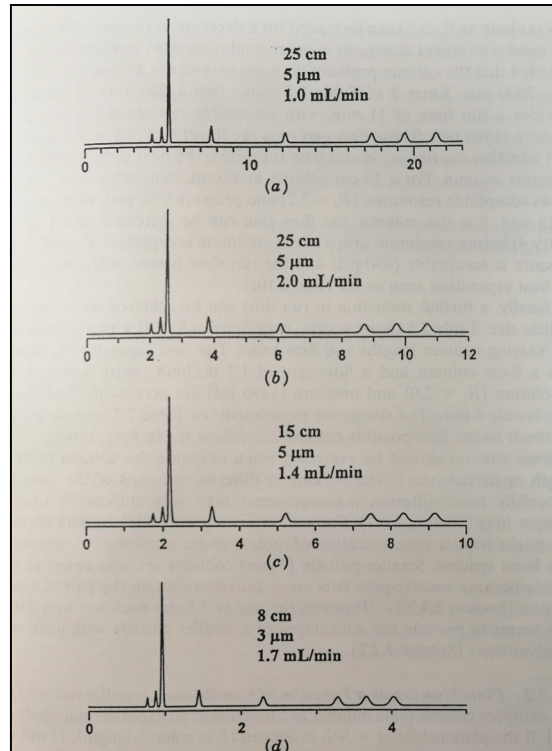
Il grado di porosità determina quanta superficie può supportare la fase stazionaria e quindi la "capacità" della colonna, ovvero quanto campione può essere caricato in colonna senza avere effetti negativi sulla separazione (over-loading, ovvero molecole che non partono "allineate").

FAST-HPLC

Le **colonne monolitiche** hanno una permeabilità maggiore e questo consente di operare con flussi più elevati tagliando i tempi di analisi. Questo perché riescono ad avere un'elevata efficienza nei processi di trasferimento di massa dato l'elevata superficie di contatto tra FS e FM e una bassa diffusione longitudinale (data dai flussi elevati). Lo svantaggio che hanno però è quello di avere un'eterogeneità nei loro macropori che influisce negativamente per quanto concerne la diffusione di Eddy.

Per quanto concerne le **colonne convenzionali** per ottenere separazioni rapide la scelta è quella di operare con colonne più corte ma riempite con particelle più piccole in modo da assicurarsi una elevata efficienza ma al contempo non avere contropressioni esagerate e poter quindi lavorare a flussi elevati.

Fast HPLC - optimization (same resolution)



Start

time

21.5 min

Flow 2x

10.9 min

Column length (60%)

9.1 min

Column length (32%)

4.05 min

d_p from 5 to 3 microm \Rightarrow increase in efficiency to compensate for loss in N due to column shortening

From 21.5 min to 4.05 min \Rightarrow 5.5 x shorter!

NB: Retention times for all the molecules decrease and the base peak widths increase \Rightarrow N strongly decrease but peaks still remains base line resolved!

Nomenclatura delle colonne cromatografiche e flussi operativi

Colonna	Diametro interno (i.d.)			Flusso
Open tubular		<	25 μm i.d.	25 nL/min
Nanobore column	25 μm	\leq i.d. \leq	100 μm	25–4000 nL/min
Capillary column	100 μm	\leq i.d. \leq	1 mm	0.4–200 $\mu\text{L}/\text{min}$
Microbore column	1 mm	\leq i.d. \leq	2.1 mm	50–1000 $\mu\text{L}/\text{min}$
Narrow-bore column	2.1 mm	\leq i.d. \leq	4 mm	0.3–3.0 mL/min
Normal-bore column	4 mm	\leq i.d. \leq	5 mm	1.0–10.0 mL/min
Semipreparative column	5 mm	\leq i.d. \leq	10 mm	5.0–40 mL/min
Preparative column	10 mm			20 mL/min

I flussi si riferiscono a colonne con riempimento a particelle sferiche – diametro 5 μm (HPLC)

Per le cromatografie a bassa e media pressione si possono utilizzare flussi più elevati dato che il materiale con cui sono impaccate le colonne non comporta la generazione di una forte contropressione.

Questo equivale a dire che non è necessario l'utilizzo di pompe in grado di sopportare elevate pressioni.

Quello che cambia sostanzialmente tra bassa/media e alta pressione è quindi **l'efficienza** (e quindi indirettamente anche la risoluzione) che è possibile ottenere e che è strettamente dipendente dal **diametro delle particelle** a supporto della fase stazionaria. Questi discorsi sono naturalmente validi per tutte le cromatografie ad esclusione di quella basata sull'affinità dove il discorso relativo alla risoluzione è completamente diverso ed è strettamente legato alla selettività (specificità) del processo cromatografico in questione.

The effect of column diameter (i.d.) on protein concentration at the column exit

Example: peak 4: injected 100×10^{-12} moli

Separation performed with 4.6 mm i.d. and 0.5 mm i.d. columns (same chromatographic conditions, only the flow is different):

4.6 mm: 1 mL/min (0.001 L/min) - 0.5 mm: 0.015 mL/min (0.000015 L/min).

Separation is identical (peak 4 has the same retention time and the same elution profile (width: 6 sec, 0.1 min))

4.6 mm: [peak 4] : 100×10^{-12} moli / 0.1min x 0.001 L/min = 100×10^{-12} moli / 0.0001 L = 1×10^{-6} M (1 microM)

0.5 mm: [peak 4] : 100×10^{-12} moli / 0.1min x 0.000015 L/min = 100×10^{-12} moli / 0.0000015 L = 66.6×10^{-6} M (66.6 microM)

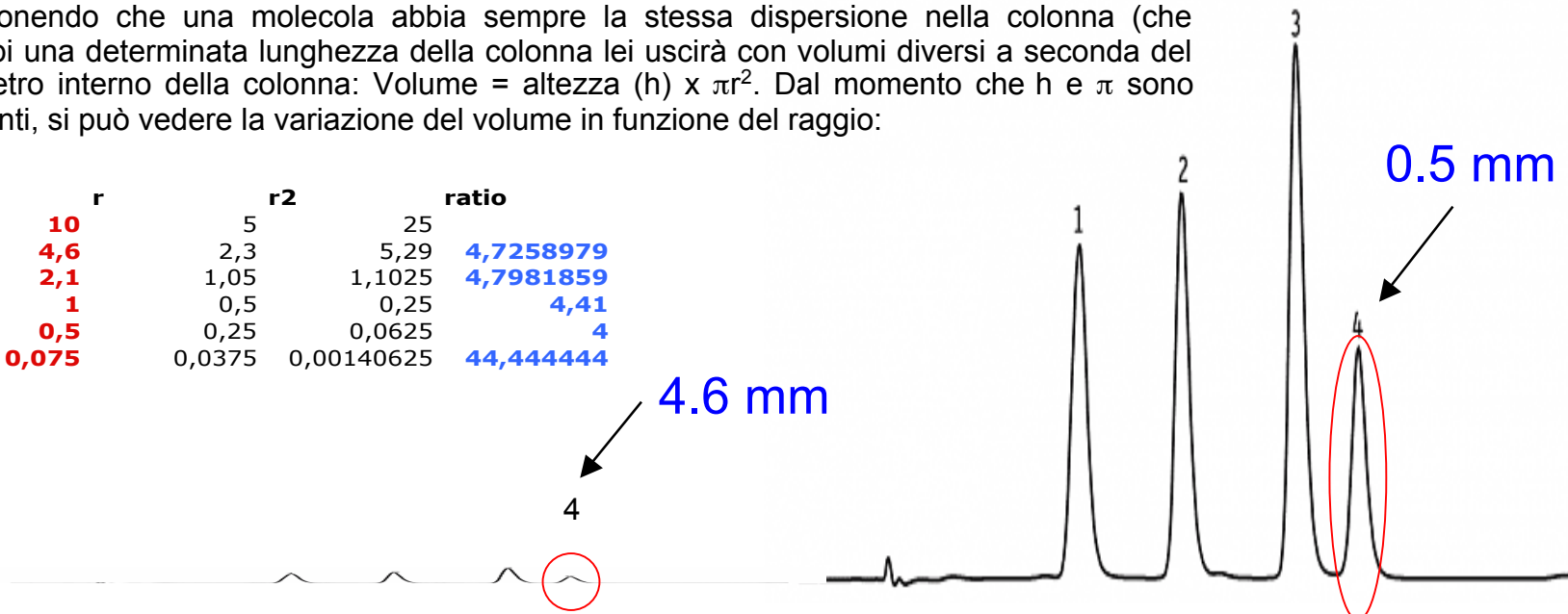
Se la detection è fatta con un rilevatore ad assorbanza, ricordando che $A = \epsilon lc$ e supponendo che il sistema cromatografico sia invariato tra le due corse il segnale che avremo in un caso e nell'altro saranno come sotto riportato.

(NB: in questo esempio sono stati assunti due flussi diversi sulla base dei flussi che di solito si applicano con queste colonne e si è assunto che la molecola eluisca allo stesso identico modo). Un calcolo più preciso può esser fatto considerando le dimensioni della colonna:

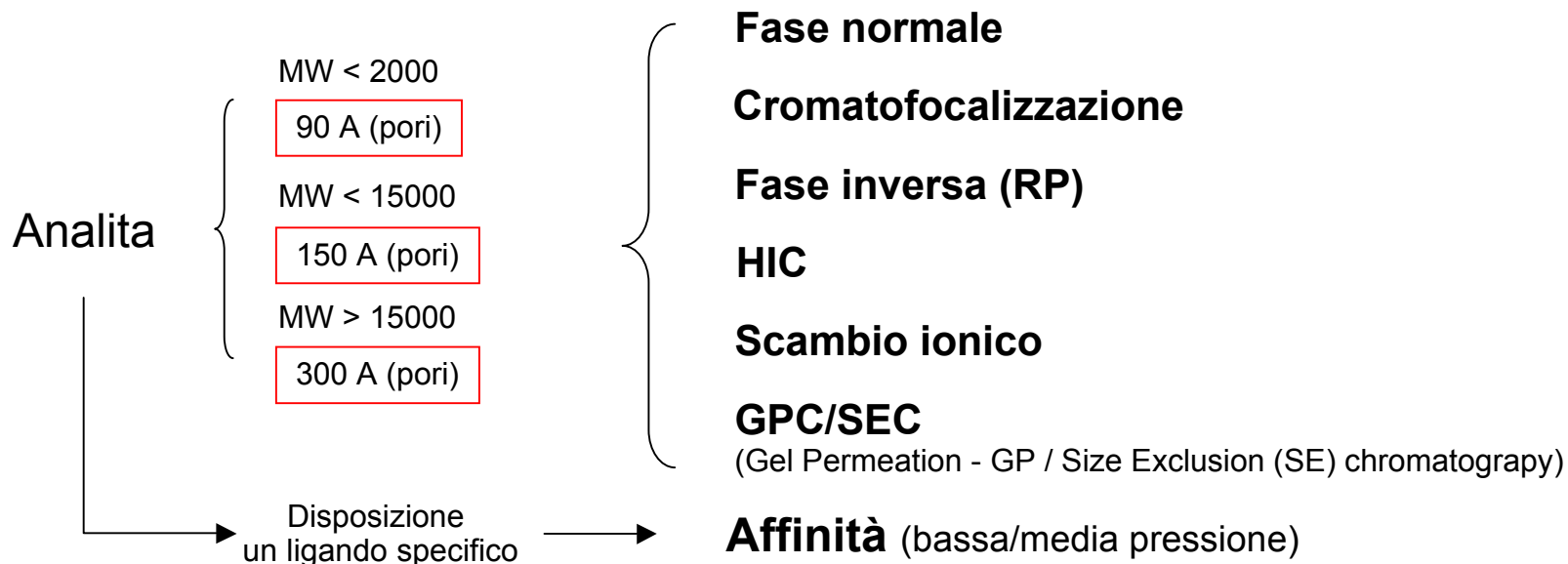
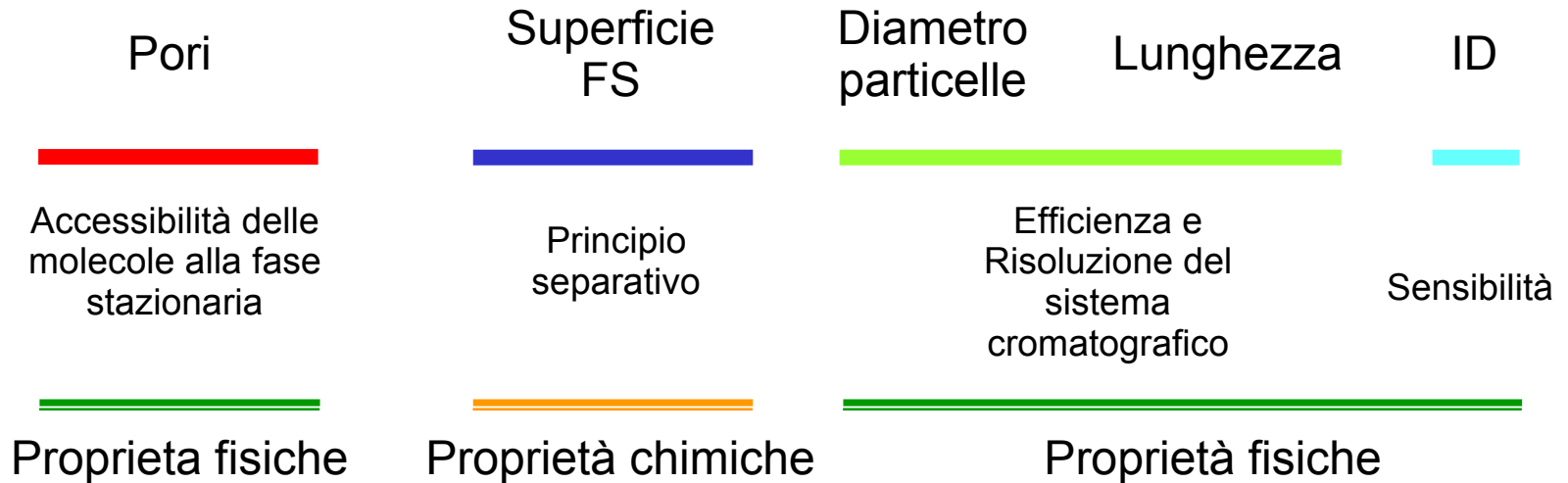
Il punto è il volume con cui esce la molecola che è legato ovviamente al diametro della colonna:

Supponendo che una molecola abbia sempre la stessa dispersione nella colonna (che occupi una determinata lunghezza della colonna lei uscirà con volumi diversi a seconda del diametro interno della colonna: Volume = altezza (h) x πr^2 . Dal momento che h e π sono costanti, si può vedere la variazione del volume in funzione del raggio:

i.d.	r	r ²	ratio
10	5	25	
4,6	2,3	5,29	4,7258979
2,1	1,05	1,1025	4,7981859
1	0,5	0,25	4,41
0,5	0,25	0,0625	4
0,075	0,0375	0,00140625	44,4444444



CRITERI di SCELTA per una Separazione Cromatografica



Cromatografia a Fase Inversa (RP – Reversed Phase HPLC)

Separazione cromatografica in base al grado d'idrofobicità delle molecole (inversa rispetto ad una cromatografia in cui la fase stazionaria è polare)

Molecole più comunemente analizzate in campo biologico mediante questa tecnica: peptidi (anche alcuni tipi di proteine) – Solitamente porta a denaturazione delle proteine dovuta alla presenza di solventi organici e nella versione con TFA all'ambiente estremamente acido.

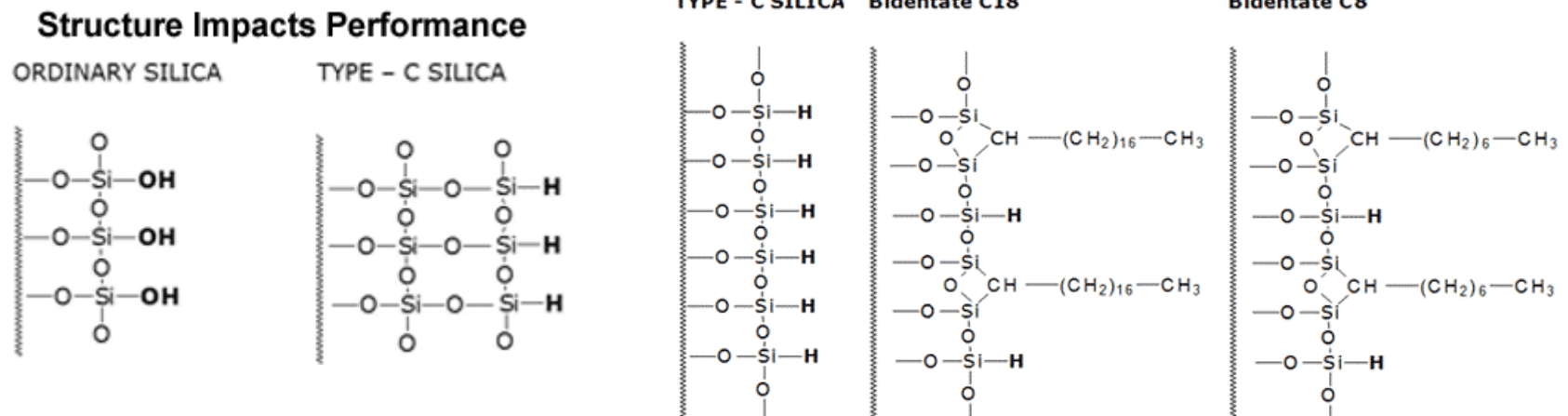
Cromatografia di **ripartizione/adsorbimento (dipende dalle dimensioni delle molecole)**:

Fase stazionaria – idrofobica, pendenti alchilici (C4, C5, C8, C18) legati covalentemente ad una matrice inerte (silice)

Fase Mobile – acqua/solvente apolare (Acetonitrile, Metanolo, Isopropanolo ...) solitamente effettuando un'eluizione attraverso un gradiente ad idrofobicità crescente (% solvente apolare crescente nel tempo) (La fase stazionaria è sostanzialmente un "liquido immobilizzato" con il quale le molecole possono interagire/ripartirsi.)

Solitamente effettuata con sistemi di tipo HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) e nota come RP-HPLC

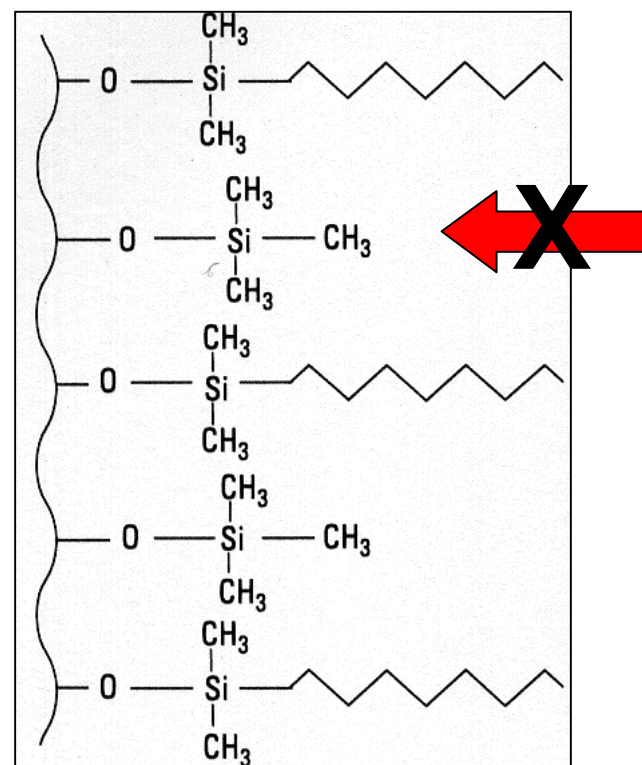
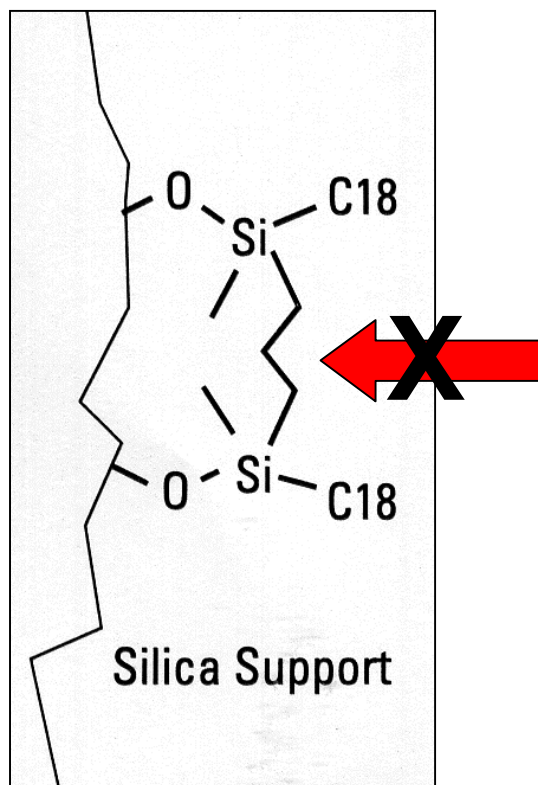
NB: Possono essere aggiunti alla fase mobile degli additivi (i.e acido formico) sia per migliorare la separazione (modifica del pH della fase mobile) sia per permettere alcuni tipi di rilevazione del campione – ad esempio la rilevazione mediante spettrometria di massa



RP-HPLC: Supporti di silice derivatizzata e “protetta”.

I supporti in silice derivatizzati soffrono i pH estremi (minori di 2 e maggiori di 9). A pH acidi è possibile che i gruppi alchilici con cui è stata funzionalizzata la silice siano idrolizzati, mentre a pH alcalini e la stessa silice a presentare problemi di stabilità.

Questo fenomeno viene notevolmente contrastato da gruppi che stericamente proteggono la superficie delle particelle ed i punti d'ancoraggio dei gruppi funzionali.



RP-HPLC: Eluizione in Gradiente

% B

Molecole con alta affinità per la fase stazionaria (nel caso della RP-HPLC molto idrofobiche) possono essere staccate solo con alte percentuali di solvente apolare.

Attenzione a non iniettare in colonna i cosiddetti Column killer – molecole che difficilmente vengono staccati dalla fase stazionaria e in pratica finiscono per “saturare” la colonna.

i.e. Detergenti (SDS o altri), lipidi etc.

Esistono delle procedure per “rigenerare” le colonne che prevedono l’uso di particolari solventi (come ad esempio il DMSO)

Caricamento
(legame in colonna)
 $K \Rightarrow$ molto elevato

Distacco di tutte le molecole dalla colonna

Lavaggio

Evitare sempre variazioni repentine sia nella % B che nel flusso. Ripristino delle condizioni iniziali con un gradiente rapido.

Ripristino condizioni iniziali

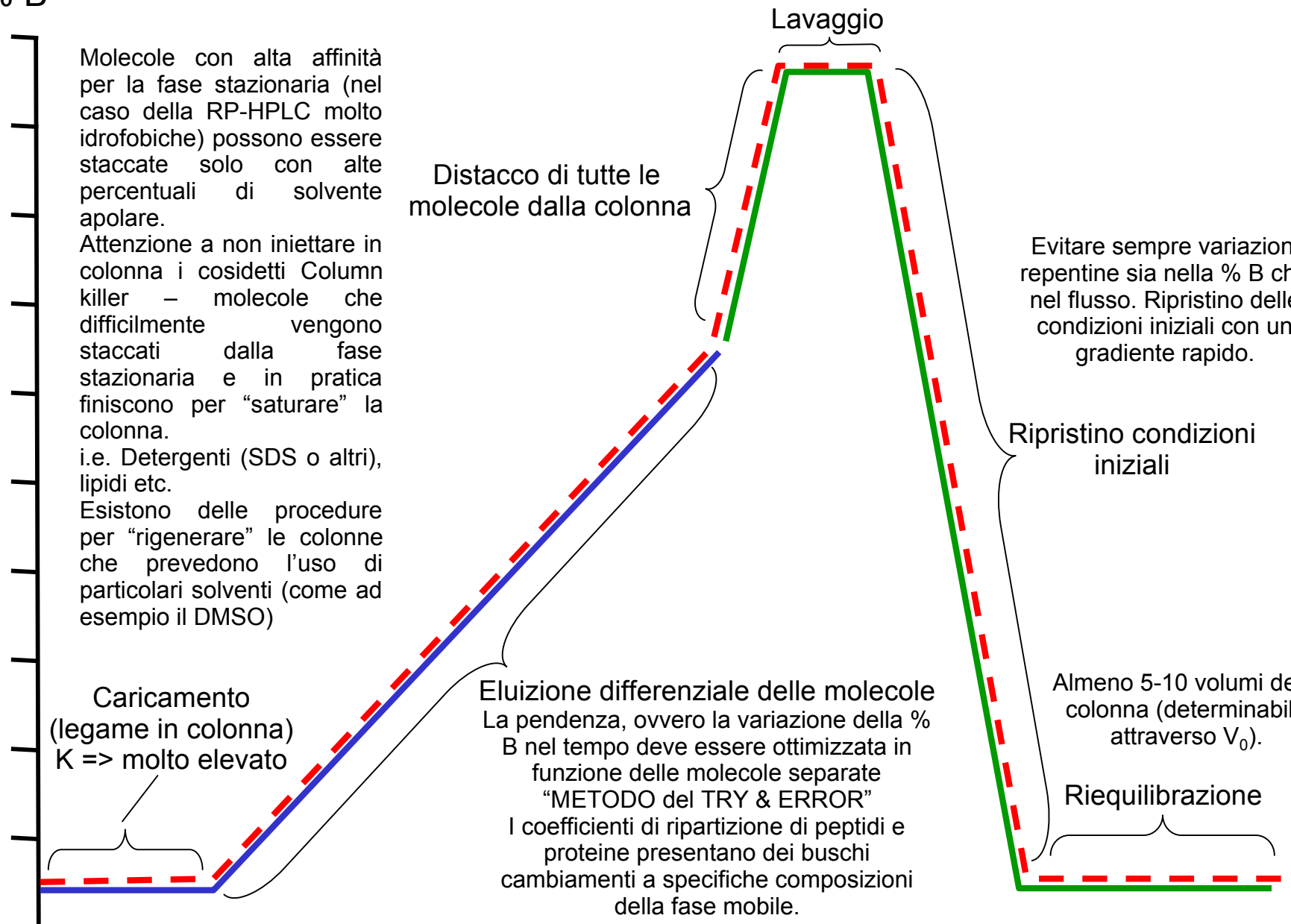
Eluizione differenziale delle molecole
La pendenza, ovvero la variazione della % B nel tempo deve essere ottimizzata in funzione delle molecole separate
“METODO del TRY & ERROR”
I coefficienti di ripartizione di peptidi e proteine presentano dei bruschi cambiamenti a specifiche composizioni della fase mobile.

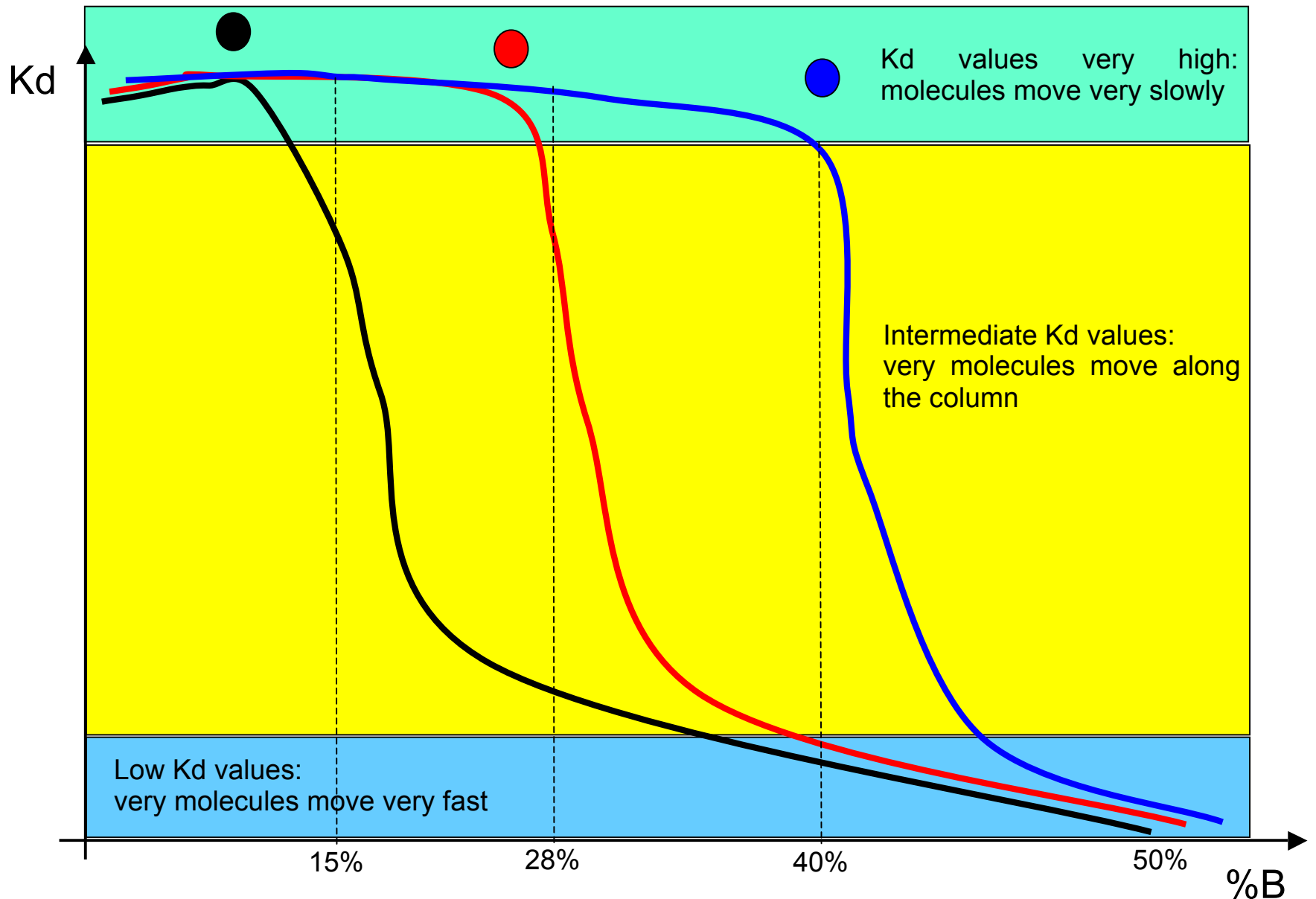
Almeno 5-10 volumi della colonna (determinabile attraverso V_0).

Riequilibrio

E' necessario lasciare per un determinato periodo nelle condizioni iniziali per fare in modo che le molecole si leghino in colonna. In questo periodo esce dalla colonna quello che viene chiamato “ESCLUSO”

tempo



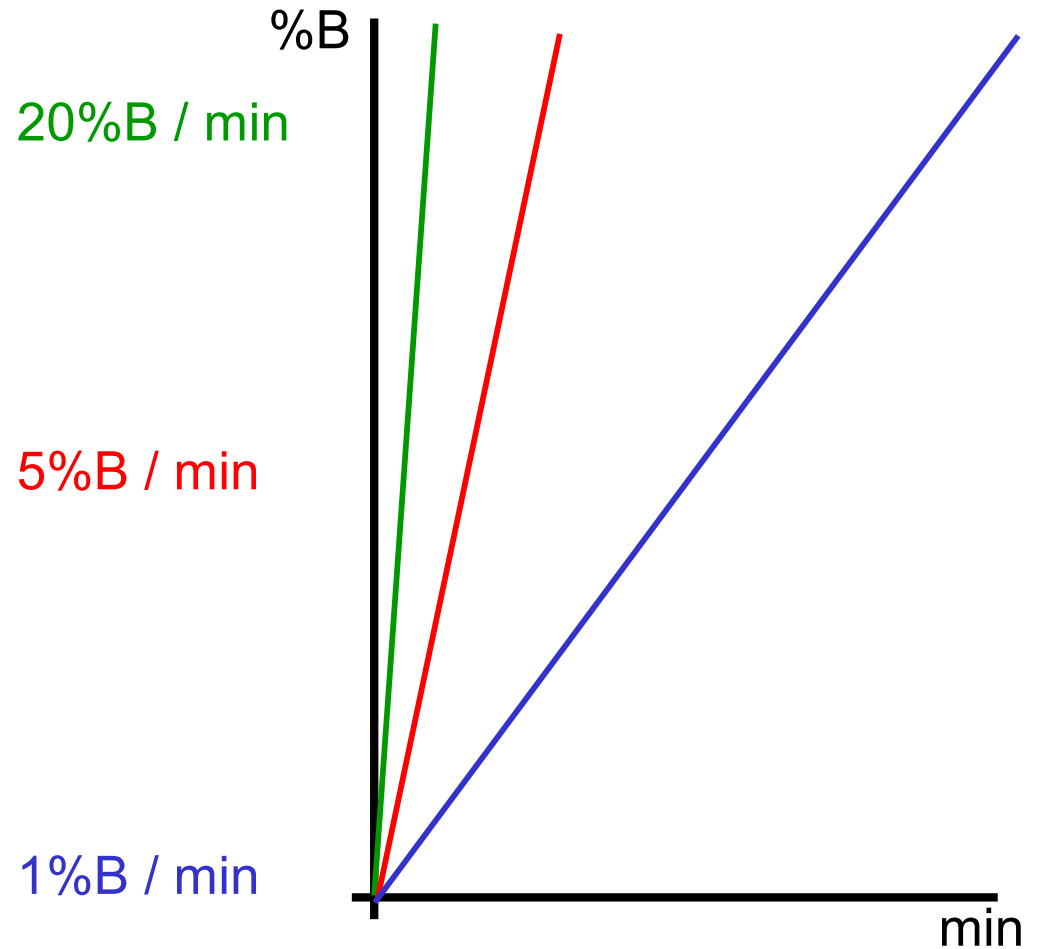
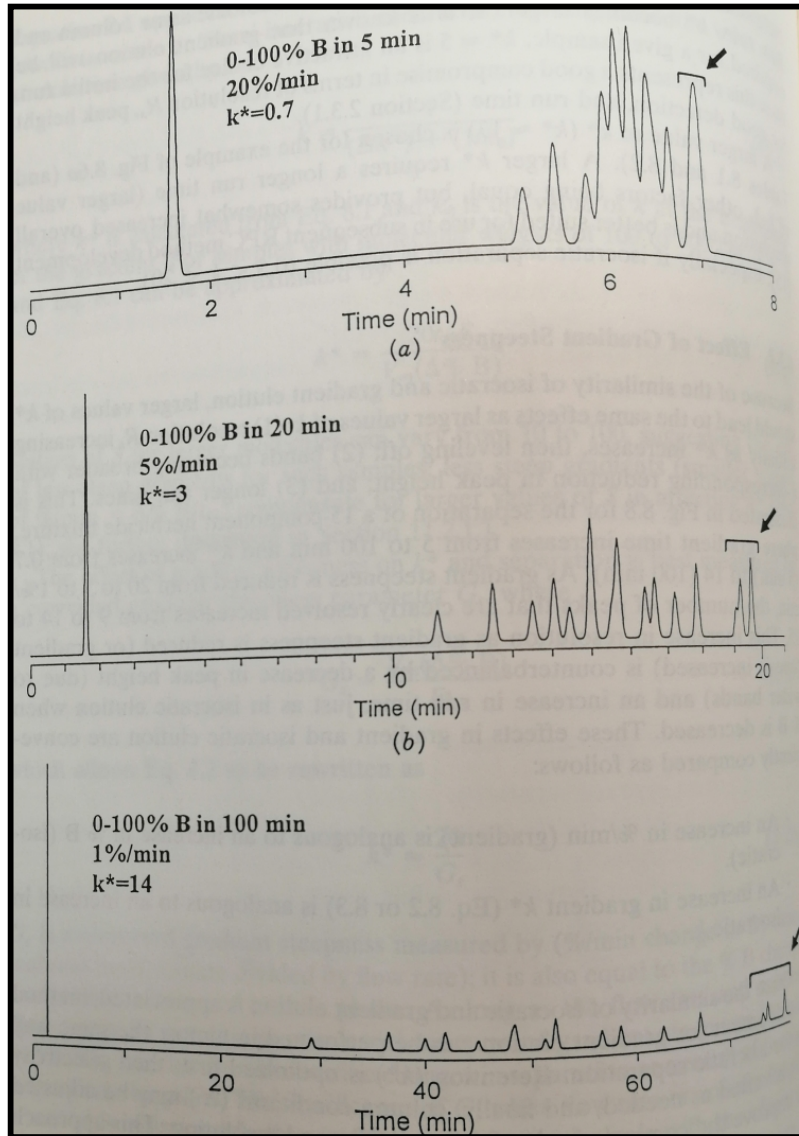


At 10% B: all the molecules have a very high Kd => they don't move differentially

At 50% B: all the molecules have a very low Kd => they don't move differentially

At 15% B: ● has a decreased Kd and it start moving while the other two are still bound to the column. It is impossible to separate ● & ● maintaining 15% B. We must change %B up to about 28 to make ● moving. We must change % B up to 40 to make ● moving. To change %B as a function of time means to create a gradient! The steepness of %B variation in time dictates how much the three molecules will be separated.

Gradient optimization (esempio 0-100% B)



Nel caso riportato è stato scelto di abbassare la pendenza del gradiente in modo tale da dare la possibilità alle ultime tre molecole di separarsi. Se nel profilo cromatografico osservo “zone” vuote, ovvero se passa tanto tempo tra l’eluizione di una molecola e l’altra posso anche pensare di effettuare delle variazioni ad hoc della pendenza del gradiente per “comprimere” il cromatogramma e risparmiare in questo modo tempo (sempre a patto di riuscire a mantenere una risoluzione adeguata ai miei scopi). Comporre un gradiente a linee spezzate.

RP-HPLC: Amino acid scale: Hydrophobic constants derived from HPLC peptide retention times.

Author(s): Wilson K.J., Honegger A., Stotzel R.P., Hughes G.J.

Reference: Biochem. J. 199:31-41(1981).

Amino acid scale values:

Ala:	-	0.300
Arg:	-	1.100
Asn:	-	0.200
Asp:	-	1.400
Cys:	+	6.300
Gln:	-	0.200
Glu:	+	0.000
Gly:	+	1.200
His:	-	1.300
Ile:	+	4.300
Leu:	+	6.600
Lys:	-	3.600
Met:	+	2.500
Phe:	+	7.500
Pro:	+	2.200
Ser:	-	0.600
Thr:	-	2.200
Trp:	+	7.900
Tyr:	+	7.100
Val:	+	5.900

Alcuni amminoacidi presentano un'elevata idrofobicità (i.e. C, I, L, M, F, P, W, Y, V) e concorrono a favorire il contatto con la fase stazionaria apolare, mentre altri, soprattutto K, R, D, E, H, data la loro scarsa idrofobicità contrastano con il legame alla fase stazionaria.

⇒ Per proteine con elevato numero di questi residui aa è necessario adottare delle strategie atte a minimizzare questo effetto negativo ai fini della separazione.

La metodica separativa adottata in questi casi è la **Ion-pair RP-HPLC**

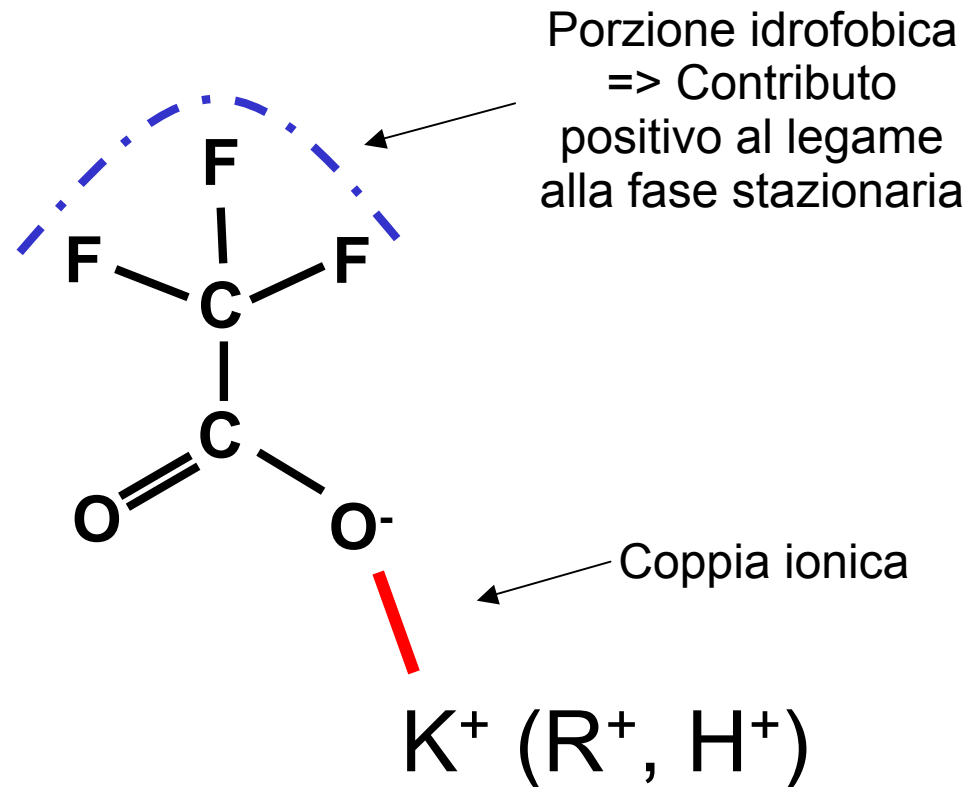
(<http://www.expasy.ch/tools/pscale/Hphob.Wilson.html>)

Ion Pair RP-HPLC

Sostanzialmente identica alla cromatografia a fase inversa ma in presenza di TFA – Acido TriFluoro acetico (0,05 – 0,1%).

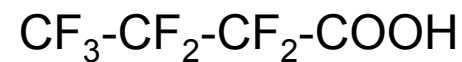
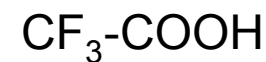
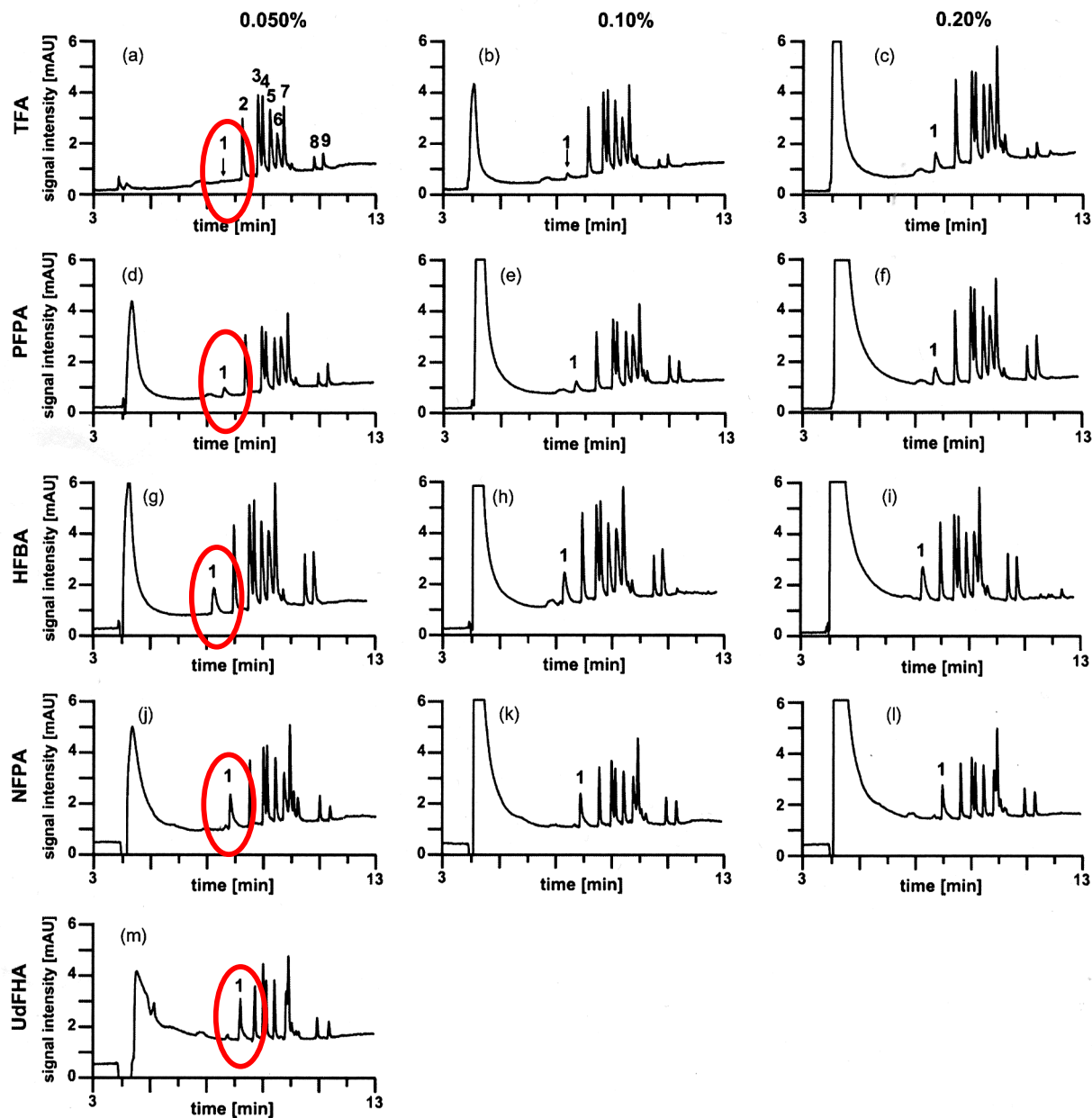
Il TFA è un acido forte e fa in modo che

- i gruppi carbossilici di E e D siano indissociati – pH della fase mobile minore di 3;
- i gruppi basici di H, R e K siano carichi positivamente ma schermati dal controione trifluoroacetato, in questo modo si ha una “neutralizzazione della carica positiva attraverso la formazione di una **COPPIA IONICA**;



NB: Le analisi di peptidi solitamente non necessitano del TFA come additivo, ma in certi casi, ove la presenza di aa quali K, R, H, D, ed E è molto abbondante è necessario adottare questo tipo di cromatografia. In caso contrario si rischia che i peptidi non vengano legati dalla colonna ed eluiscano con il volume morto.

Ion Pair RP-HPLC



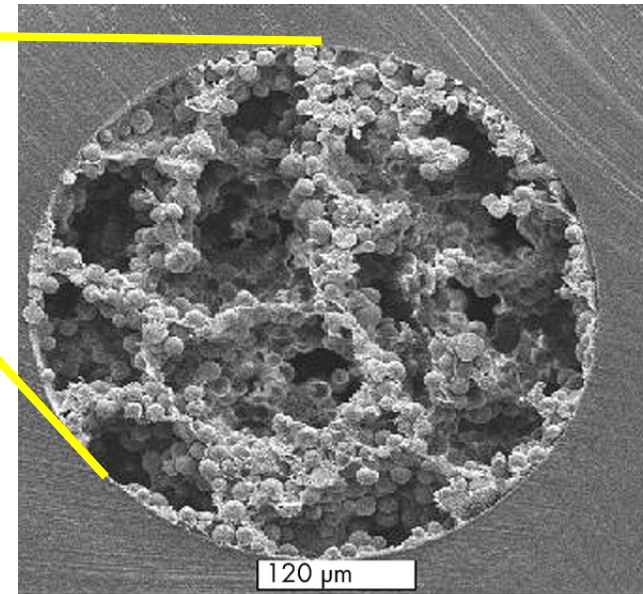
Incremento dell'idrofobicità del controione risulta in un legame migliore alla fase stazionaria polare.

Assorbimento su Reversed Phase (C18) di peptidi generati da in gel digestion



ZipTip: puntali per pipette eppendorf alla cui punta è impaccata una resina che supporta una fase inversa (tipo C18) sulla quale, dopo che i peptidi eluiti dall'in-gel digestion (sciolti in ambiente acquoso), gli stessi peptidi si legano. E' possibile, con i peptidi legati alla resina, effettuare una serie di lavaggi in modo da eliminare eventuali contaminanti ed eluire successivamente i peptidi. (Si adottano le stesse strategie di eluizioni che si adottano in cromatografia HPLC a fase inversa. Questa procedura viene utilizzata soprattutto quando si hanno piccoli volumi e si vuole eliminare la presenza di sali).

RP-HPLC: in alternativa all'utilizzo degli ZipTip, si può procedere a purificare i peptidi mediante una classica RP-HPLC. Solitamente purificazione e analisi di massa viene effettuata in un'unica analisi (questa metodica è comunemente nota come LC-MS [liquid chromatography-mass spectrometry]) dove i peptidi, una volta usciti dalla colonna cromatografica vengono direttamente analizzati dallo spettrometro di massa.



HIC – Hydrophobic Interaction Chromatography

Anche nel caso della HIC l'interazione tra molecole e fase stazionaria si basa su interazioni di tipo idrofobico. Le condizioni però nelle quali viene condotta questo tipo di analisi sono completamente diverse da quelle adottate nella cromatografia a fase inversa.

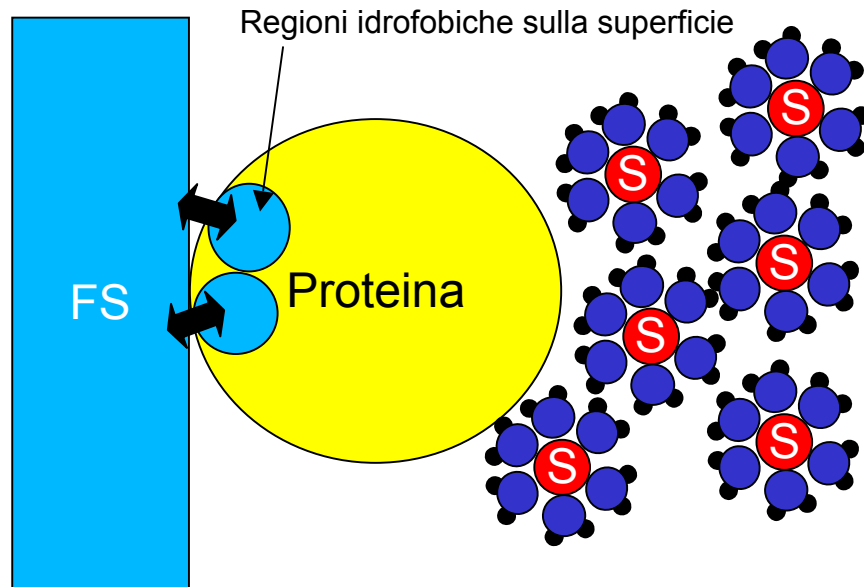
Fase stazionaria – idrofobica, pendenti alchilici (catene più corte rispetto alla RP) o gruppi fenilici.

Fase Mobile – acqua con sali

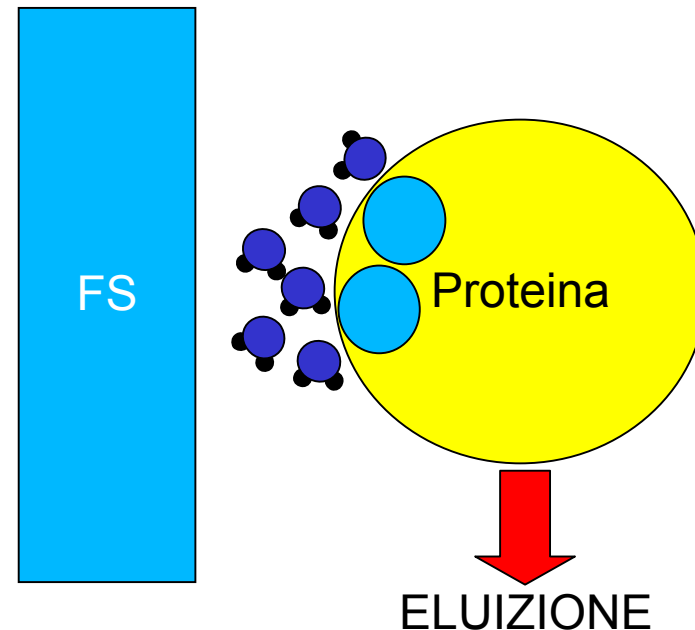
Eluizione - attraverso un gradiente a concentrazione salina decrescente

Le molecole proteiche vengono iniettate in condizioni di alta concentrazione salina. I Sali tendono a “sequestrare” l'acqua disponibile e questo comporta il fatto che porzioni idrofobiche alla superficie delle molecole proteiche perdano la propria sfera d'idratazione e ne consegue che tendono ad aggregare, ovvero ad interagire con altre regioni idrofobiche – “Salting out” – come ad esempio i pendenti della fase stazionaria. Al diminuire della concentrazione salina si rende maggiormente disponibile l'acqua che in tal modo riesce a riportare in soluzione le proteine. Questo tipo di cromatografia non comporta la denaturazione delle proteine => recupero della loro attività.

ALTA CONCENTRAZIONE SALINA

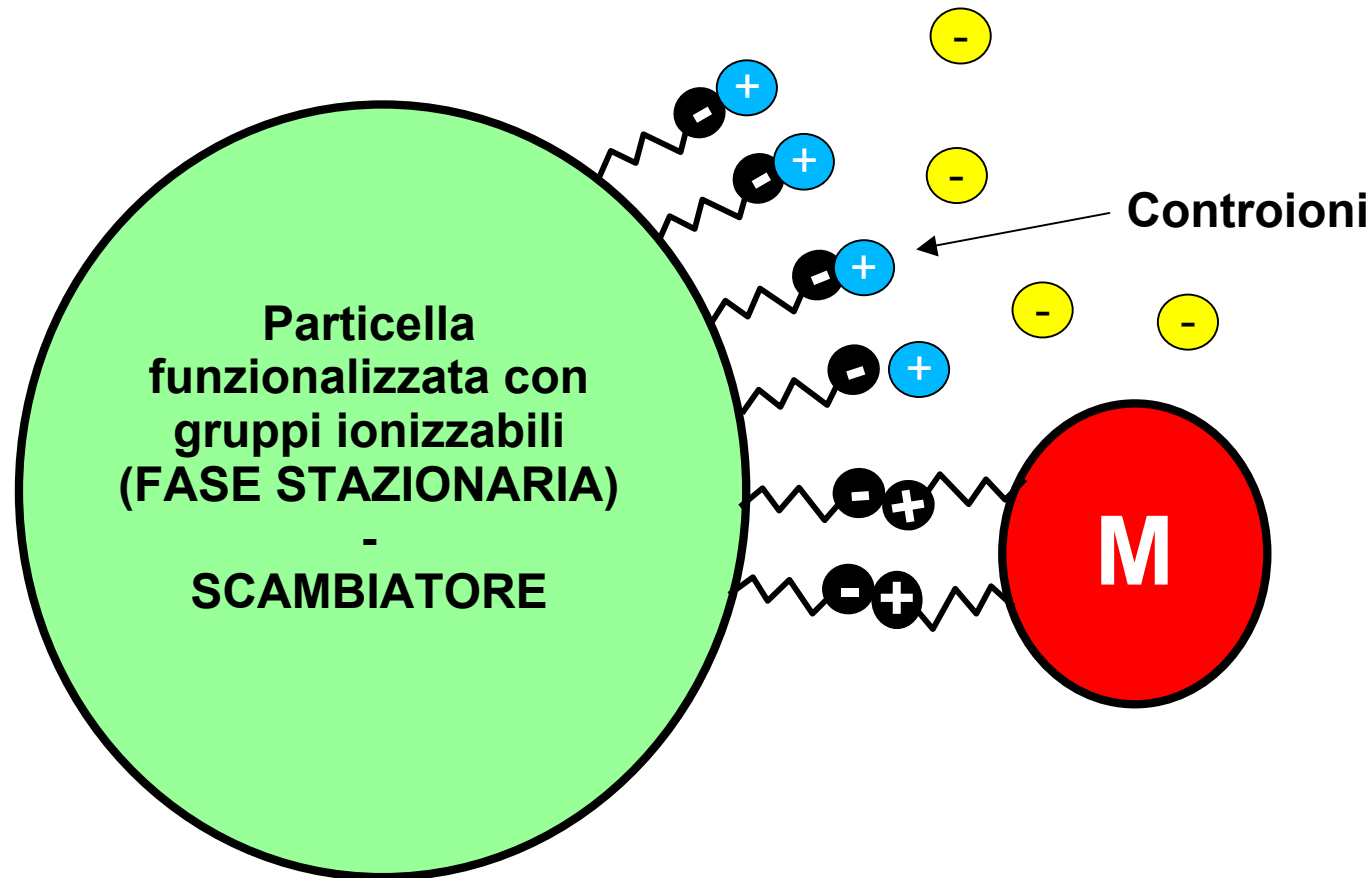


BASSA CONCENTRAZIONE SALINA



Cromatografia a Scambio Ionico

La cromatografia a scambio ionico si basa su interazioni di tipo elettrostatico. Il pH del sistema gioca un ruolo fondamentale in questo tipo di cromatografia dato che tramite sue variazioni si può far variare le cariche sia della fase stazionaria che delle molecole analizzate.



NB: affinché si possa effettuare una cromatografia a scambio ionico è necessario che la fase stazionaria e le molecole che si vogliono separare interagiscano mediante gruppi chimici recanti cariche di segno opposto.

Domanda: Le mie molecole a quel determinato pH che carica hanno?

Cromatografia a Scambio Ionico

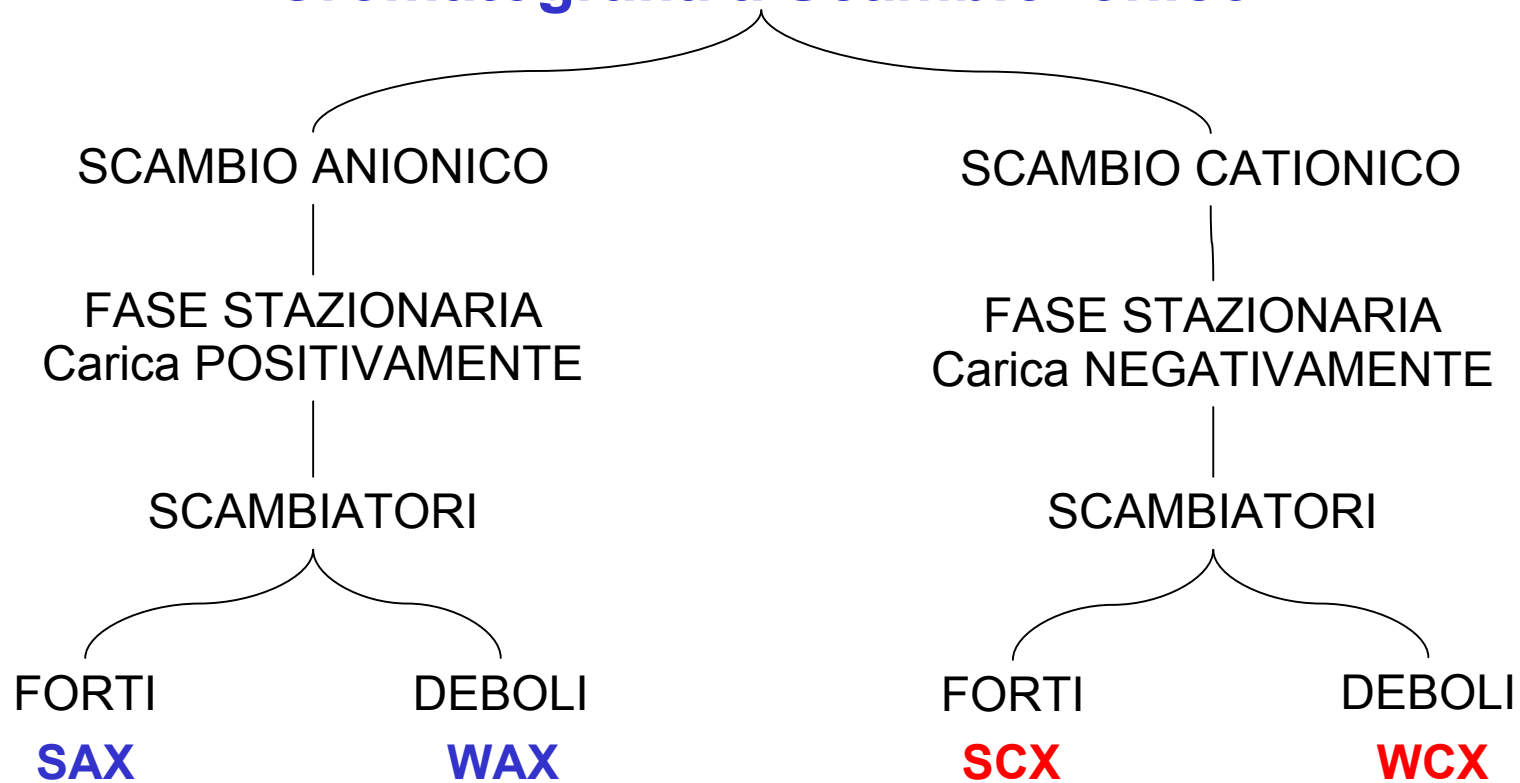
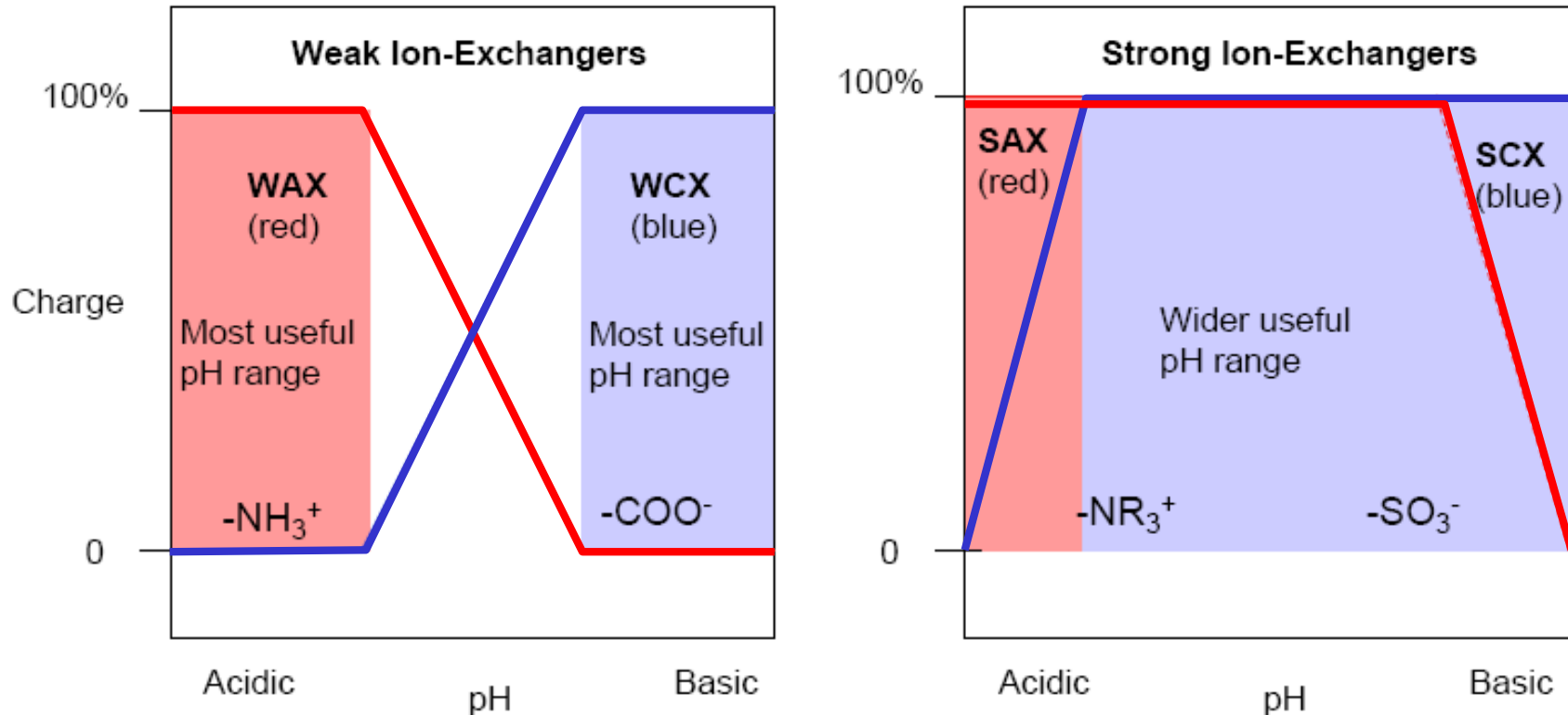


Table 1. Functional groups used on ion exchangers.

	Anion exchangers	Functional group
WAX	Diethylaminoethyl (DEAE)	$-O-CH_2-CH_2-N^+H(CH_2CH_3)_2$
SAX	Quaternary aminoethyl (QAE)	$-O-CH_2-CH_2-N^+(C_2H_5)_2-CH_2-CHOH-CH_3$
SAX	Quaternary ammonium (Q)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2-N^+(CH_3)_3$
	Cation exchangers	Functional group
WCX	Carboxymethyl (CM)	$-O-CH_2-COO^-$
SCX	Sulphopropyl (SP)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2SO_3^-$
SCX	Methyl sulphonate (S)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2SO_3^-$

Cromatografia a Scambio Ionico

Intervalli di utilizzo degli scambiatori forti e deboli IMPORTANZA del pKa



WAX e SAX: a valori di pH al di sotto del loro pKa sono carichi positivamente => UTILIZZABILI

WCX e SCX: a valori di pH al di sopra del loro pKa sono carichi negativamente => UTILIZZABILI

SAX: valori di pKa molto elevati => grande range di utilizzabilità

SCX: valori di pKa molto bassi => grande range di utilizzabilità

Cromatografia a Scambio Ionico

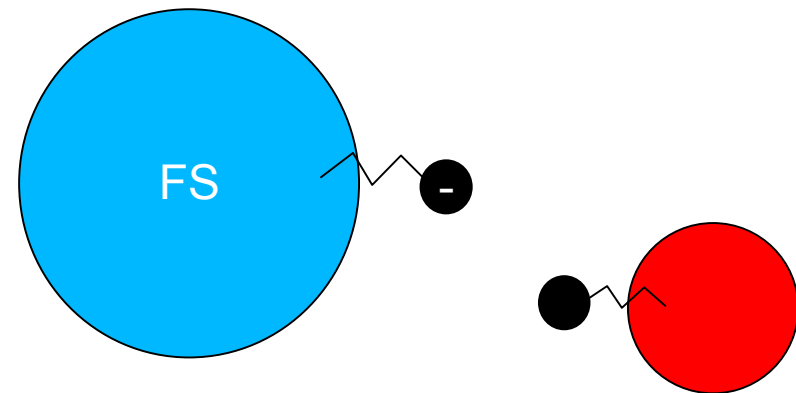
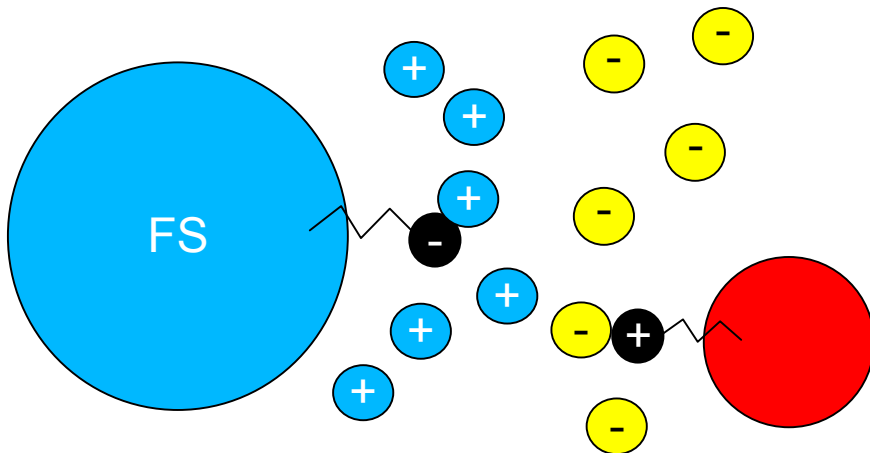
Metodi di eluizione

Gradiente di forza ionica

Gradiente di pH

Competizione per lo scambiatore tra ioni e molecole analizzate

Variazione della carica delle molecole comporta il distacco dallo scambiatore



F^- (weak) < OH^- < Acetate $^-$ < Cl^- < SCN^- < Br^- < CrO_4^- < NO_3^- < I^- < Oxalate $^{2-}$ < SO_2^{2-} < Citrate $^{3-}$ (strong)

Li^+ (weak) < H^+ < Na^+ < NH_4^+ < K^+ < Rb^+ < Cs^+ < Ag^+ < Mg^{2+} < Zn^{2+} < Co^{2+} < Cu^{2+} < Cd^{2+} < Ni^{2+} < Ca^{2+} < Pb^{2+} < Ba^{2+} (strong)

Cromatografia a Scambio Ionico

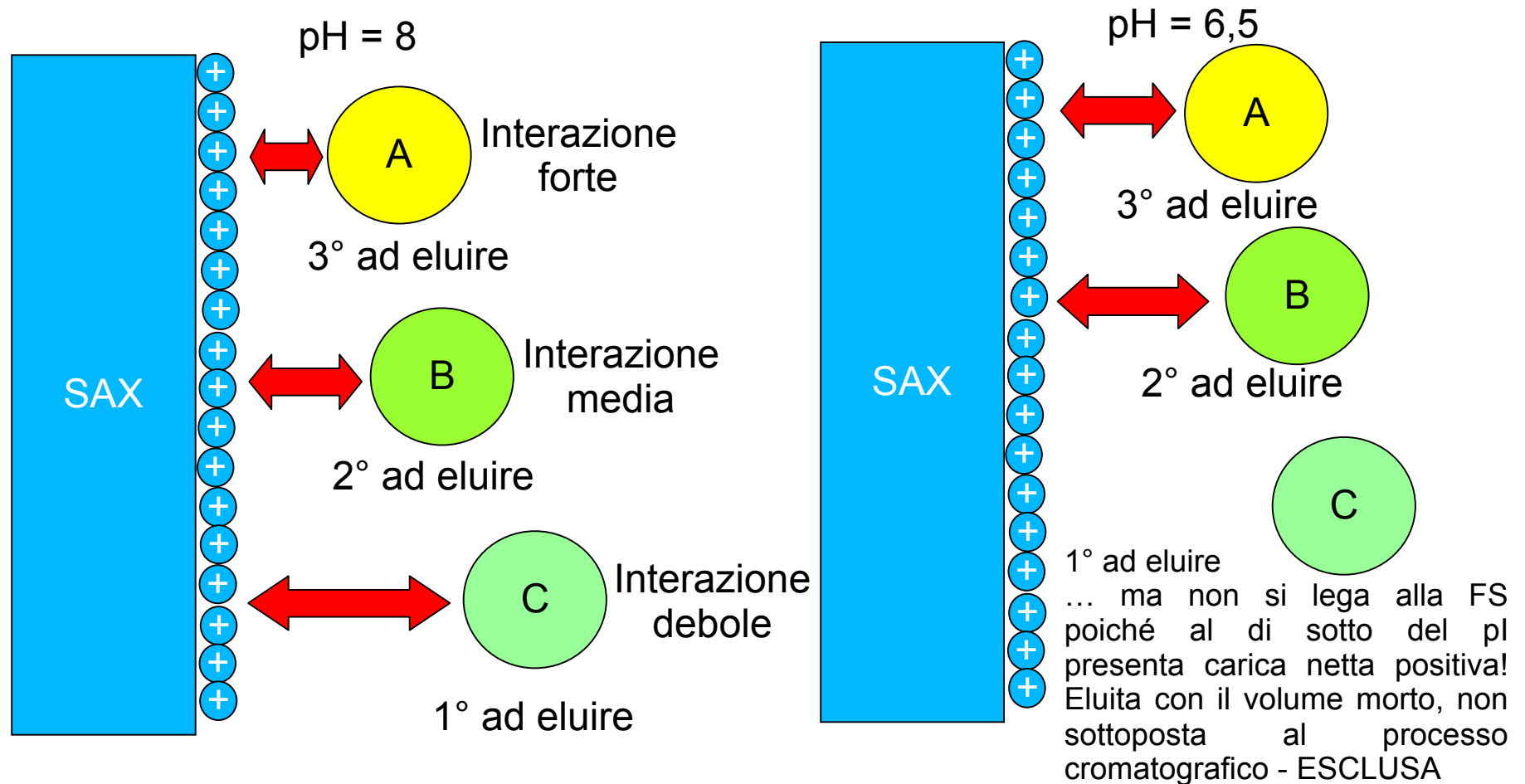
ESEMPIO

Cromatografia a scambio anionico – SAX

Tre proteine: A: $pI = 5$, B: $pI = 6$, C: $pI = 7$

Punto isoeletttrico di una proteina: pH al quale la carica netta di una proteina è uguale a 0

Più basso è il punto isoeletttrico di una proteina maggiore è la proporzione tra i suoi gruppi acidi e quelli basici e viceversa.



Cromatografia a Scambio Ionico

SAX

WCX

Mono-, Di-, Tri-fosfato nucleotidi

ISTONE H1 e sue forme fosforilate

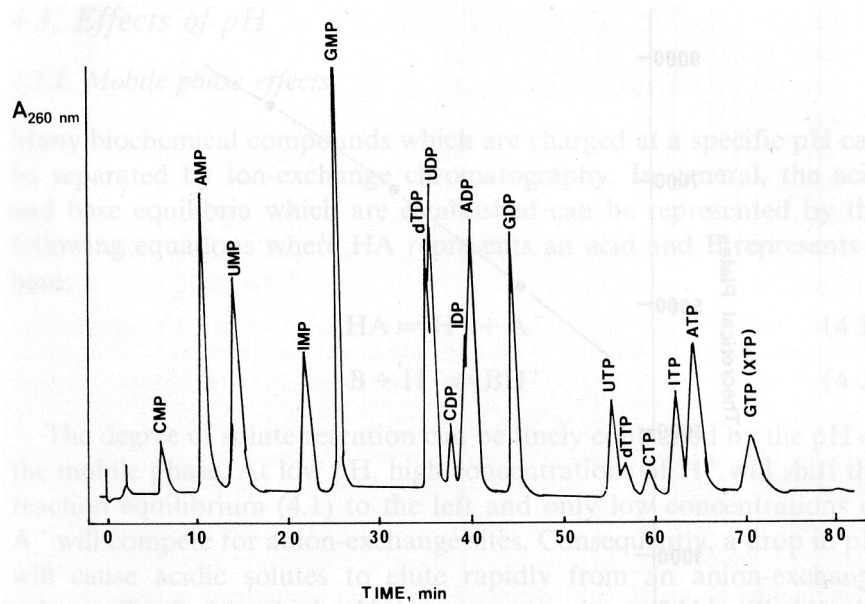
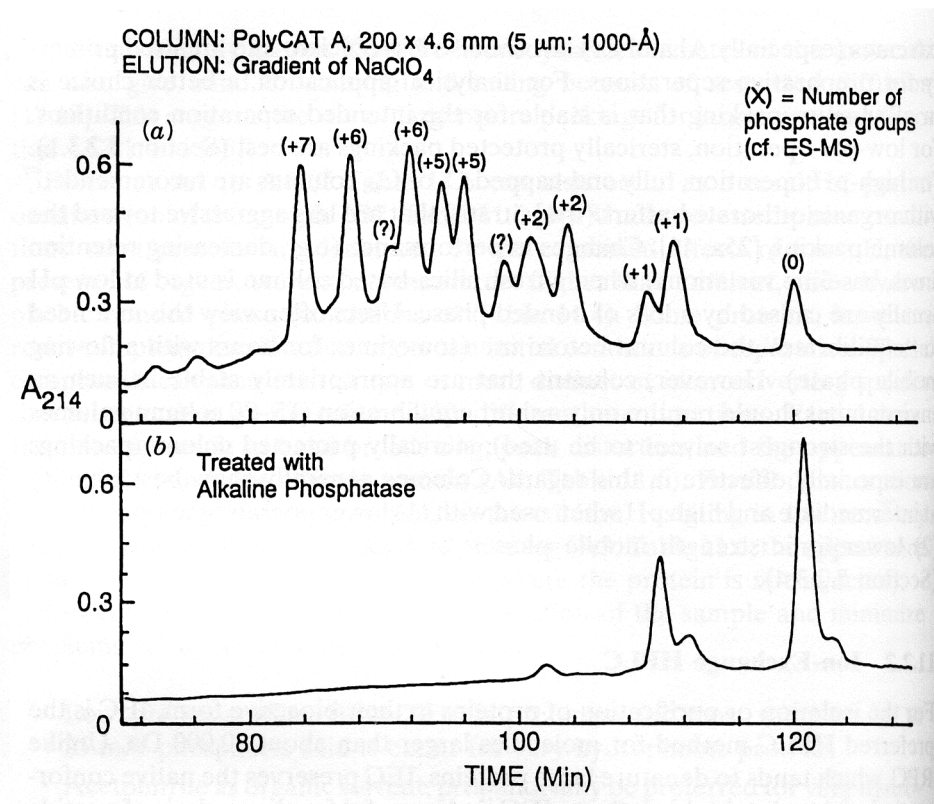


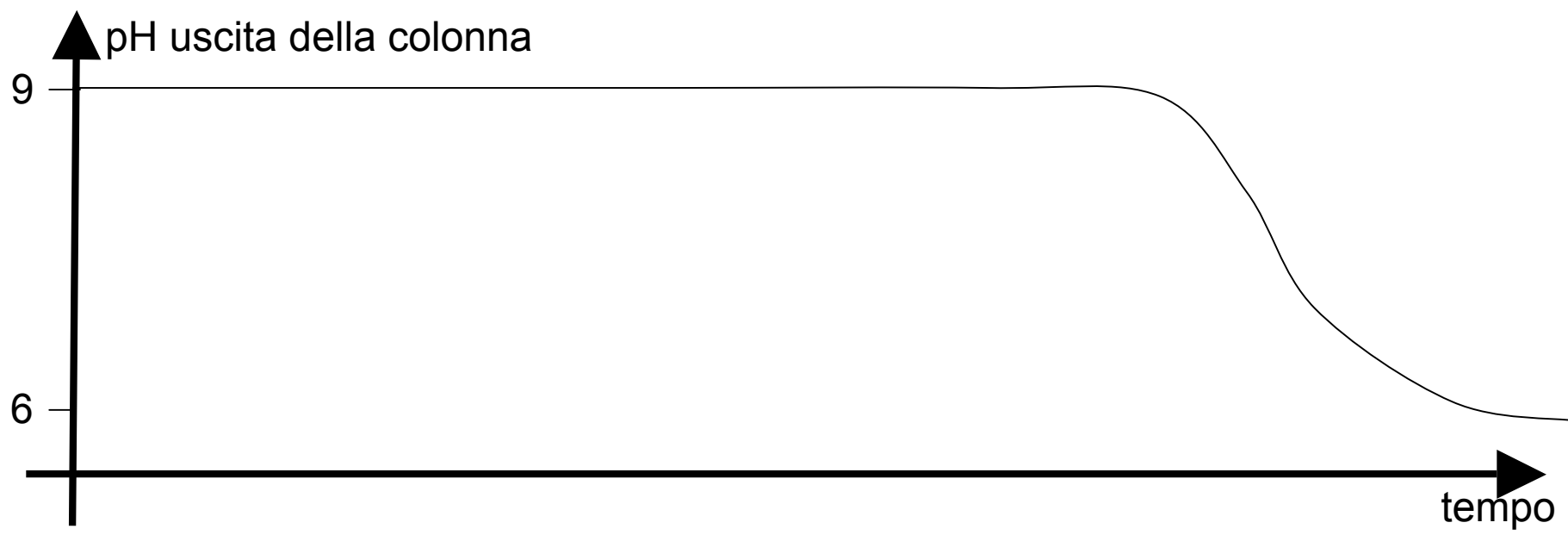
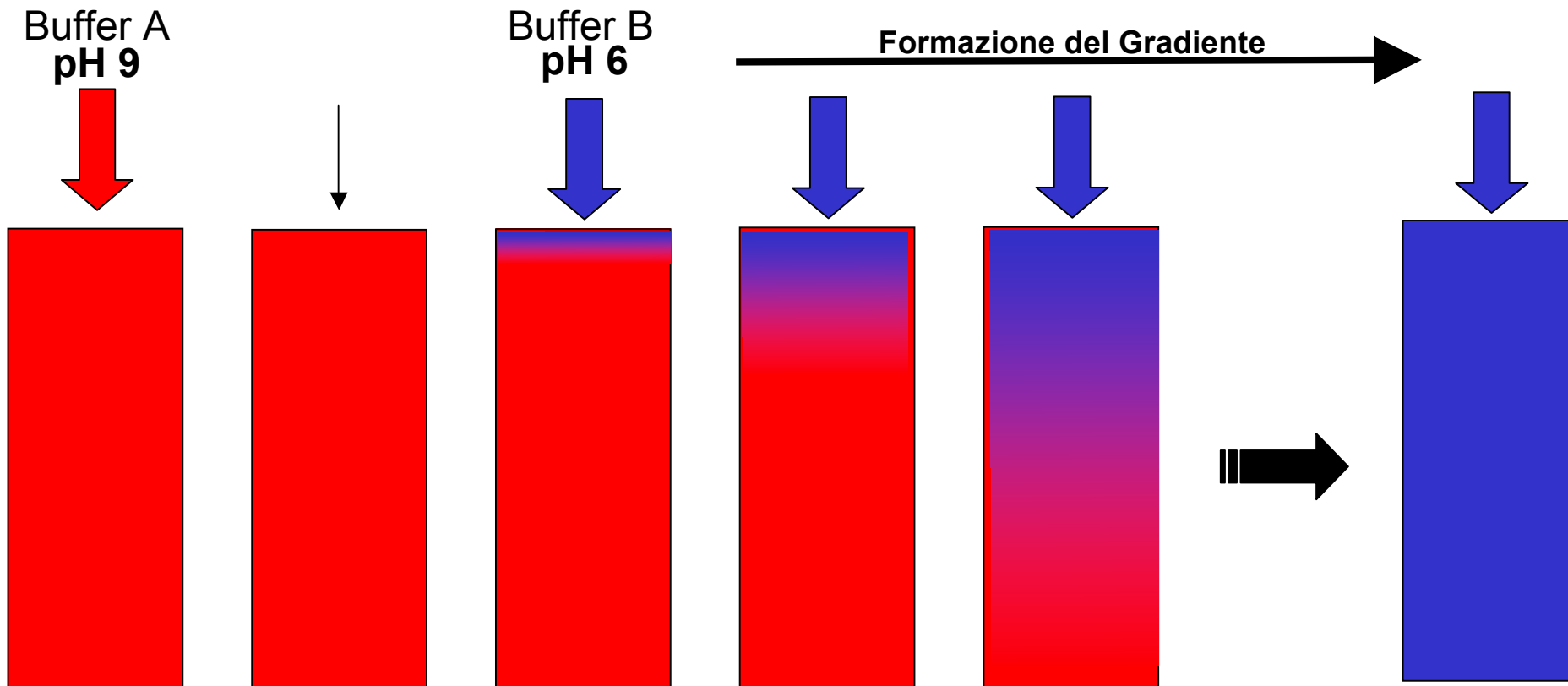
Fig. 4.2. Separation of mono- (MP), di (DP) and triphosphate (TP) nucleotides of adenine (A), guanine (G), hypoxanthine (I), xanthine (X), cytosine (C), uracil (U) and thymine (T). Chromatographic conditions: column, Partisil 10-SAX; mobile phase, linear gradient of 0.007 M KH_2PO_4 , pH 4.0 to 0.25 M KH_2PO_4 , 0.5 M KCl, pH 4.5 in 45 min; flow rate, 1.5 ml/min; temperature, ambient; detection, UV at 260 nm. Reproduced from Zakaria and Brown (1981), with permission.



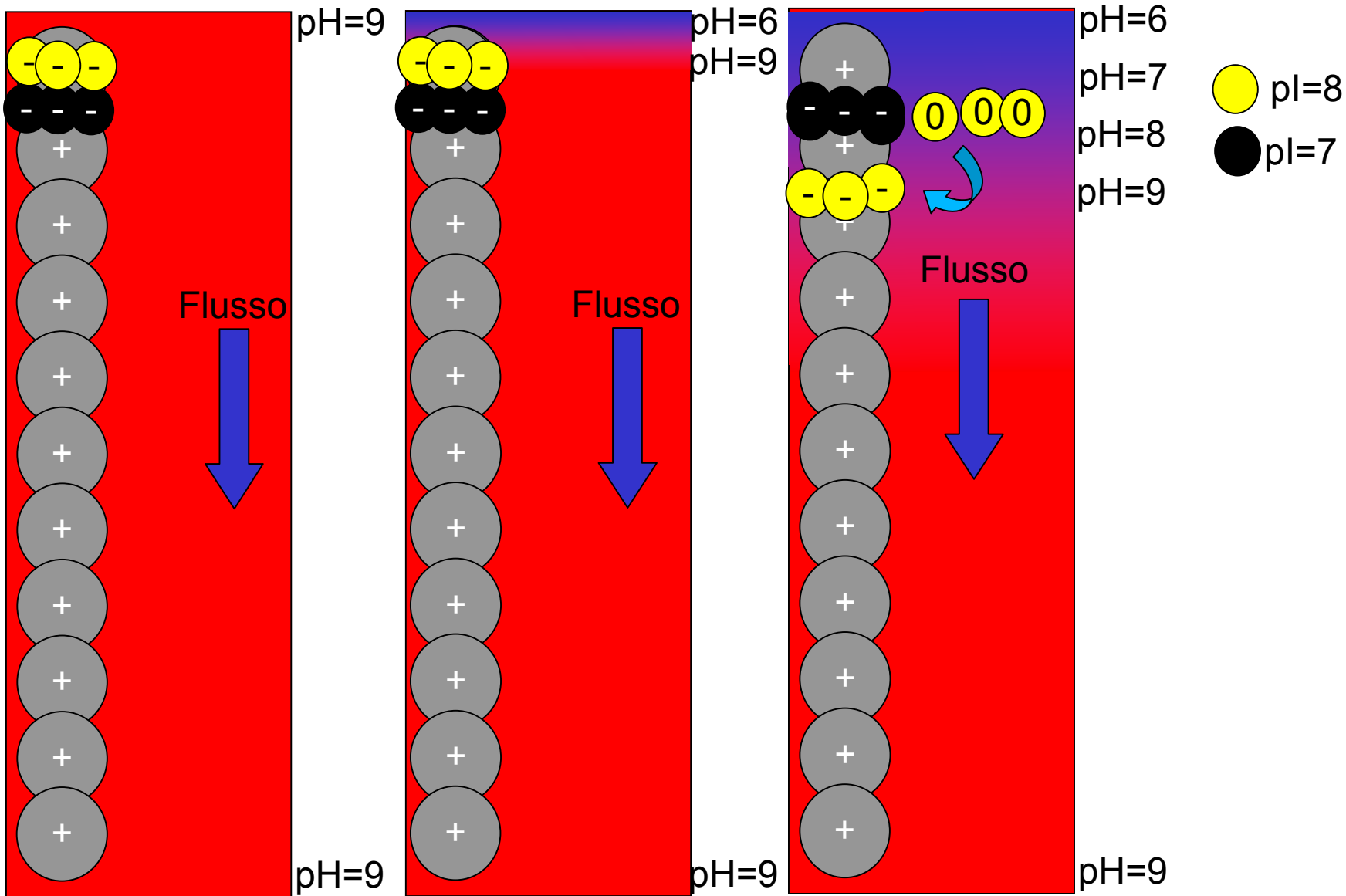
CROMATOFOCALIZZAZIONE

Si basa sulla formazione di un gradiente di pH all'interno di una colonna cromatografica (solitamente uno **scambiatore anionico debole – WAX**)

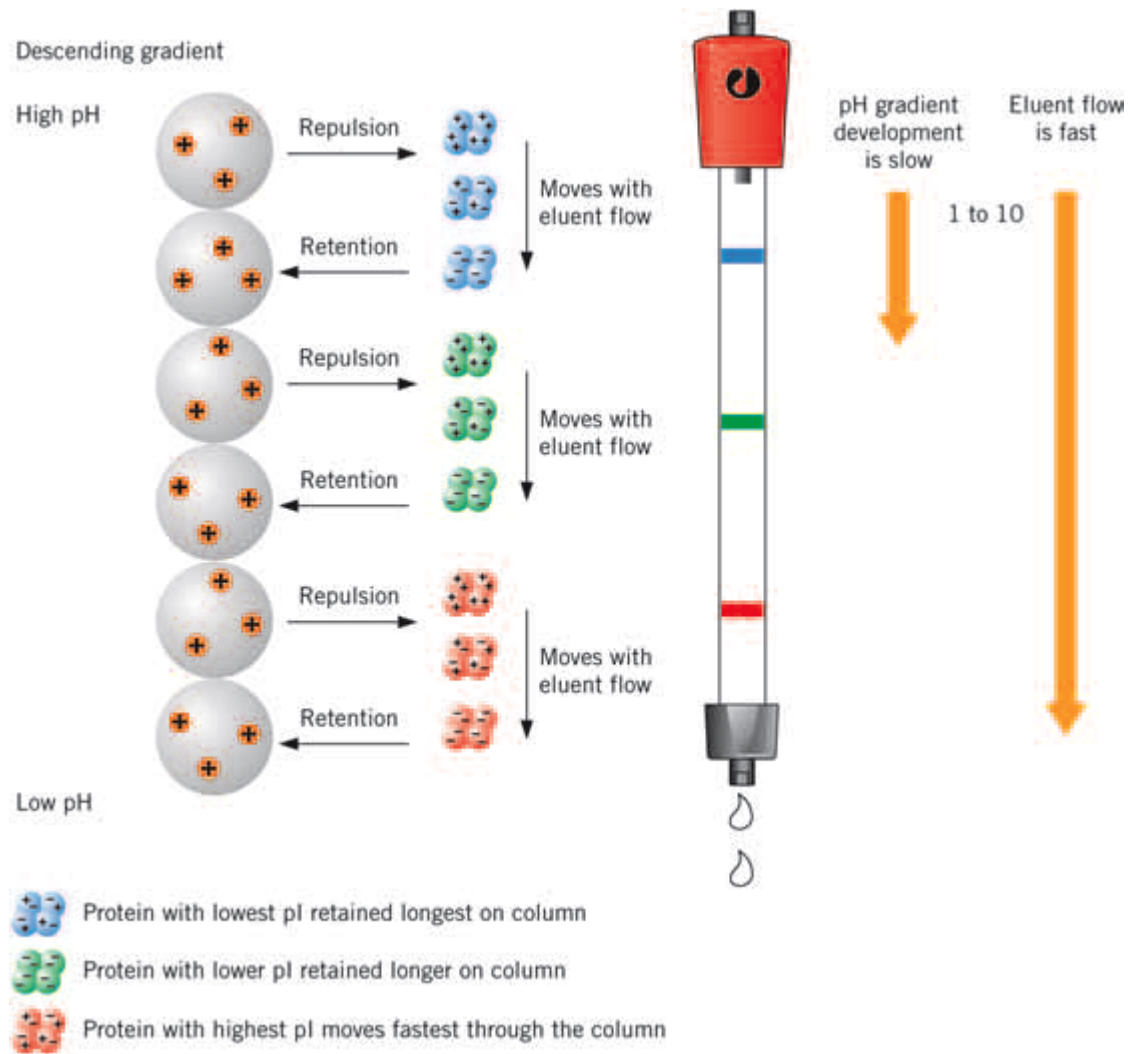
- 1) La colonna viene equilibrata con una fase mobile (miscela di anfoliti portata ad un determinato valore di pH – punto superiore del gradiente di pH) ad un **pH superiore al pI delle proteine sotto analisi** (proteine sono cariche negativamente);
- 2) Proteine iniettate si legano alla colonna;
- 3) Successivamente viene cambiata la fase mobile (miscela di anfoliti portata ad un determinato valore di pH – punto inferiore del gradiente di pH) e si genera un gradiente di pH all'interno della colonna.
NB: il gradiente si genera all'interno della colonna con una velocità minore del flusso della fase mobile - importante il potere tamponante della FS e FM, ovvero la concentrazione dei gruppi coinvolti nella determinazione del pH!
- 4) Quando la proteina risente di un pH uguale o minore del suo punto isoelettrico perde le sue cariche (o addirittura cambia segno) ed è sottoposta all'azione del flusso all'interno della colonna
- 5) Per azione del flusso, la proteina è trasportata avanti sulla colonna dove incontra dei pH via via maggiori e questo comporta il fatto che quando raggiunge un pH uguale al suo pI essa si carica nuovamente in modo negativo ed in tal modo si lega nuovamente allo scambiatore anionico.
- 6) Il gradiente continua a svilupparsi in colonna e si ripete il tutto (dal punto 4)
- 7) => focalizzazione delle proteine al pH uguale al loro punto isoelettrico – eluiscono quando eluisce la fase mobile con il valore di pH pari al loro pI.



CROMATOFOCALIZZAZIONE



CROMATOFOCALIZZAZIONE



CROMATOFOCALIZZAZIONE

Formazione del Gradiente di pH

$$pH_{seg} = (\beta_s pH_s + \beta_m pH_m) / \beta_s + \beta_m$$

s: fase stazionaria

m: fase mobile

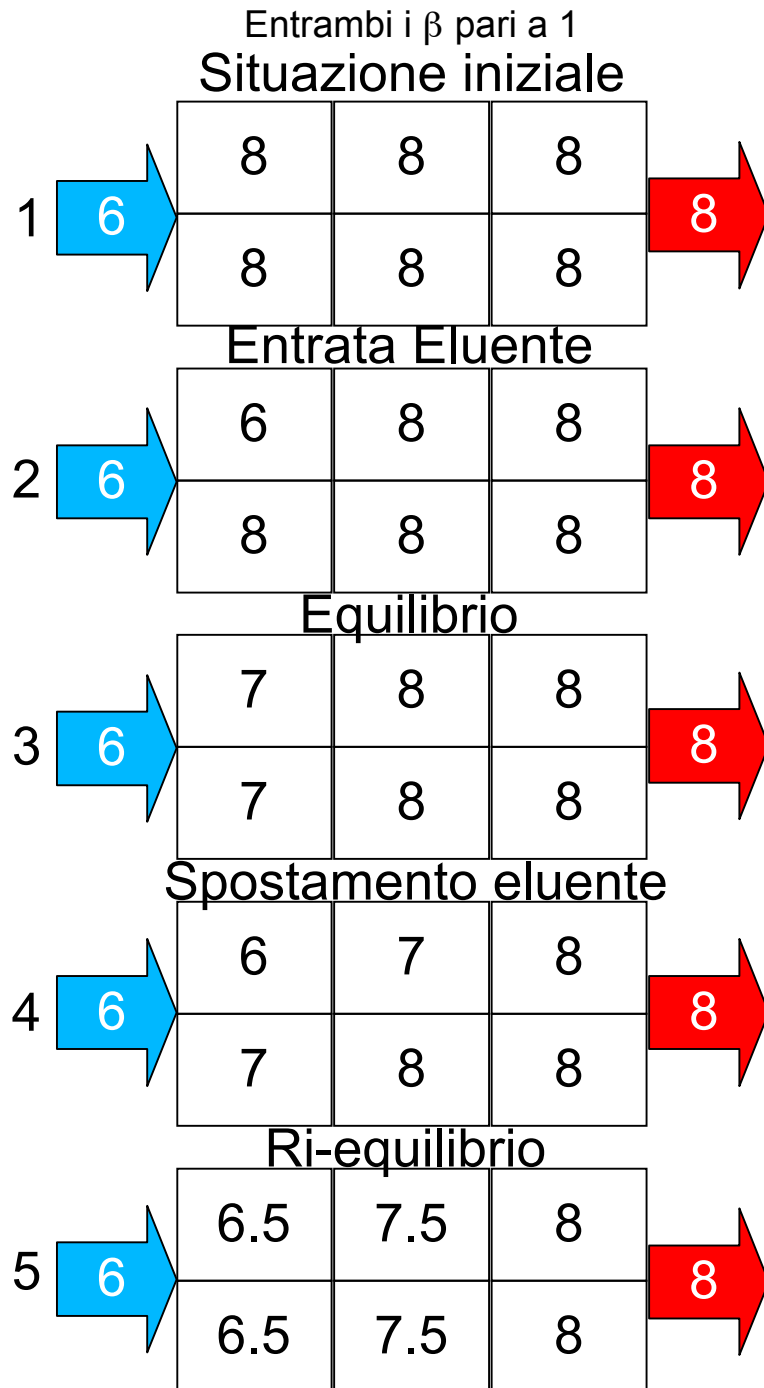
β : capacità tamponante

Come l'eluente (pH minore) viene a contatto con la fase stazionaria (equilibrata a pH maggiore) si raggiunge un pH il cui valore dipende dalla capacità tamponante delle due fasi.

Il flusso che si ha in colonna sposta continuamente l'eluente avanti nella colonna il cui pH è cambiato e che nuovamente va ad equilibrarsi con la fase stazionaria.

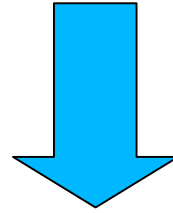
Questi cicli si ripetono un numero n di volte fino a che tutta la colonna ha raggiunto il pH della fase mobile (eluente).

Tanto minore è il potere tamponante della fase mobile, tanto più graduale sarà il gradiente di pH => miglior risoluzione.

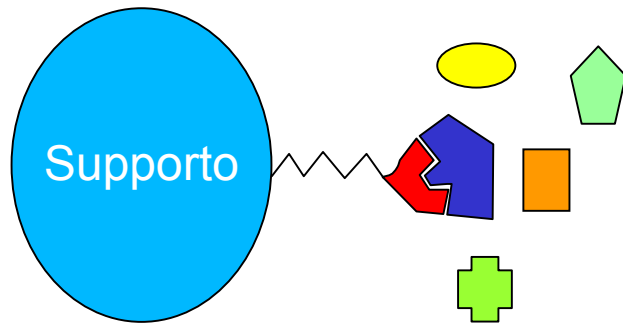


Cromatografia d'affinità

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



Riconoscimento molecolare



3 passaggi fondamentali:

- a) legame alla resina
- b) lavaggio
- c) eluizione/distacco
 - c1: competizione
 - c2: interferenza con legame (forza ionica, pH,...)

Problematiche principali:

- => mantenimento delle condizioni native
- => ottenimento di resine opportunamente funzionalizzate (legame dell' "esca")

Campi d'impiego della cromatografia d'affinità (alcuni esempi)

- **Purificazione di anticorpi**

- antigene immobilizzato su resina

- **Purificazione di proteine**

- anticorpi immobilizzati su resine
- proteine prodotte in fusione con particolari epitopi per i quali è disponibile una molecola in grado di legarsi selettivamente

HA => anticorpo anti-HA

FLAG => anticorpo anti-FLAG

CBP => Calmodulina (CBP- calmodulin binding peptide)

GST => Glutathione

6xHis => Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid)

Proteina A => IgG

- **Arricchimento di proteine in base alle loro modificazioni post-traduzionali**

- anticorpi anti-acetil-K, -fosfo-T, -S, -Y etc.
- lectine immobilizzate su resine – specificità verso alcuni tipi di carboidrati legati alle proteine

- **Purificazione di molecole in grado di legare particolari sequenze di DNA**

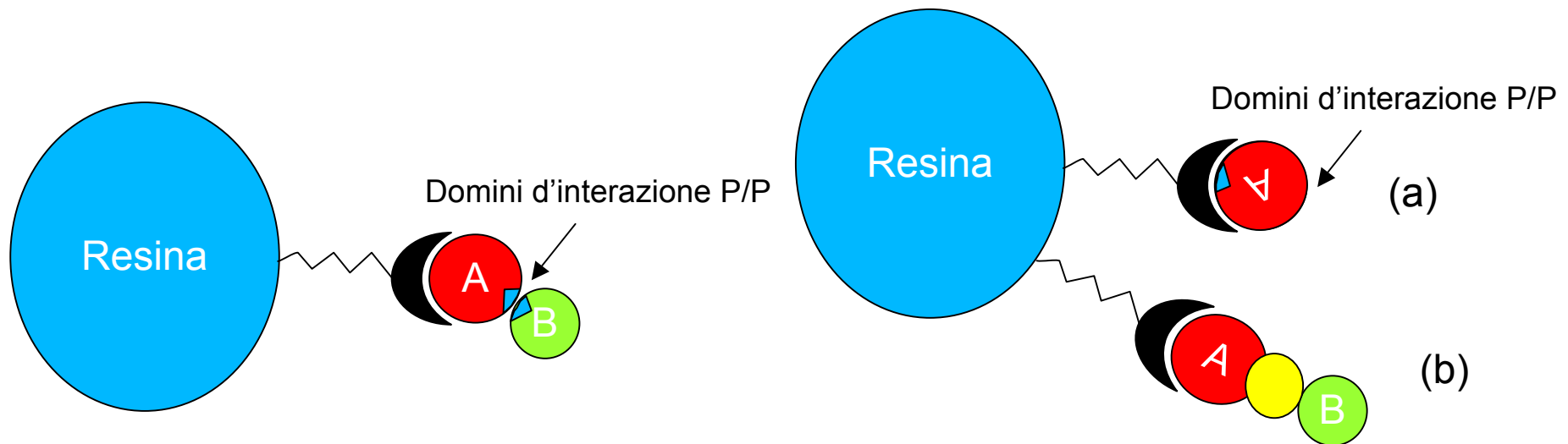
- ssDNA or dsDNA immobilizzato su resine

- **Purificazione di enzimi**

- inibitori immobilizzati su resine

Cromatografia d'affinità nello studio delle interazioni proteina/proteina

Sfruttare il principio della cromatografia d'affinità per l'isolamento di uno/più partner molecolari di una proteina



Co-immunoprecipitazioni

- resine derivatizzate con la proteina A o la proteina G sulle quali viene immobilizzato un anticorpo specifico per la proteina bersaglio.

Proteine prodotte in fusione con uno (o più) tag

- resine derivatizzate con l'opportuna controparte

Proteine covalentemente legate alla resina

Principali problematiche:

- (a) Mascheramento del sito d'interazione dal sistema di purificazione utilizzato: ad esempio l'epitopo riconosciuto dall'Ab potrebbe essere lo stesso sito di legame che la proteina utilizza per le interazioni P/P
- (b) Interazioni evidenziate potrebbero essere non dirette (proteina a ponte) => si mette in evidenza il fatto che quelle due determinate proteine fanno parte dello stesso complesso macromolecolare.

Cromatografia d'affinità

Large-Scale Proteomic Analysis of the Human Spliceosome

Juri Rappsilber, Ursula Ryder, Angus I. Lamond, and Matthias Mann

Purification of the Human Spliceosome

Human complexes were prepared essentially as described, but using less stringent wash conditions (Reed 1990; Calvio et al. 1995; Neubauer et al. 1998).

Briefly, a mixture of spliceosomal complexes was assembled on biotinylated, radioactively labeled RNA.

Two splicing substrates, adenovirus (AD1) and globin (AL4) transcripts, were used in separate experiments. **The substrates were each biotin-labeled and incubated under**

splicing conditions with HeLa nuclear extracts in 1-mL reactions

at 30°C for 1 h, forming both active spliceosomes and assembly intermediates. After incubation the samples were immediately loaded onto a 2.5 x 75-cm S-500 gel filtration column, and **pooled fractions from the spliceosome peak were affinity-selected on streptavidin beads**

(Calvio et al. 1995).

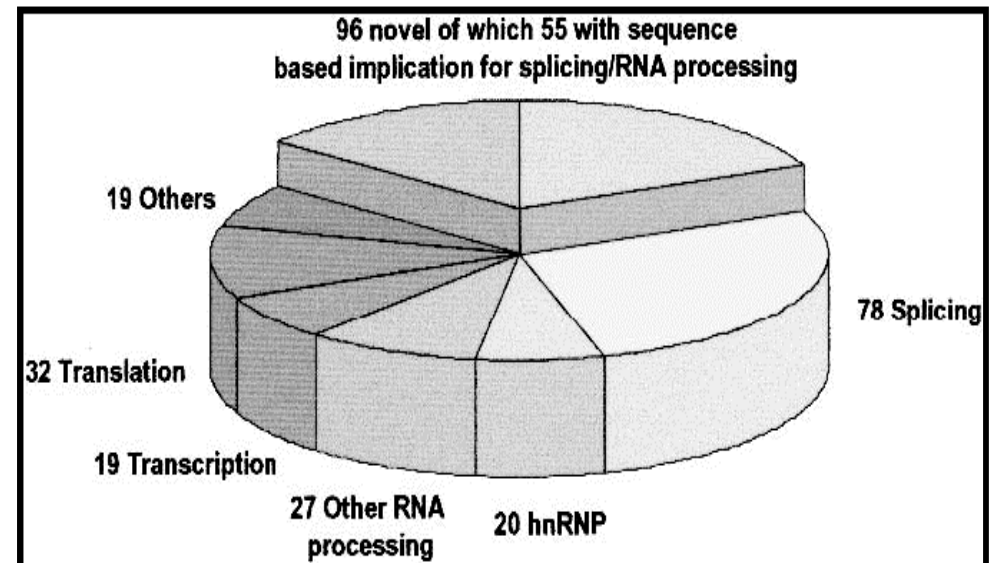
Proteins bound to the beads

were washed three times in wash buffer

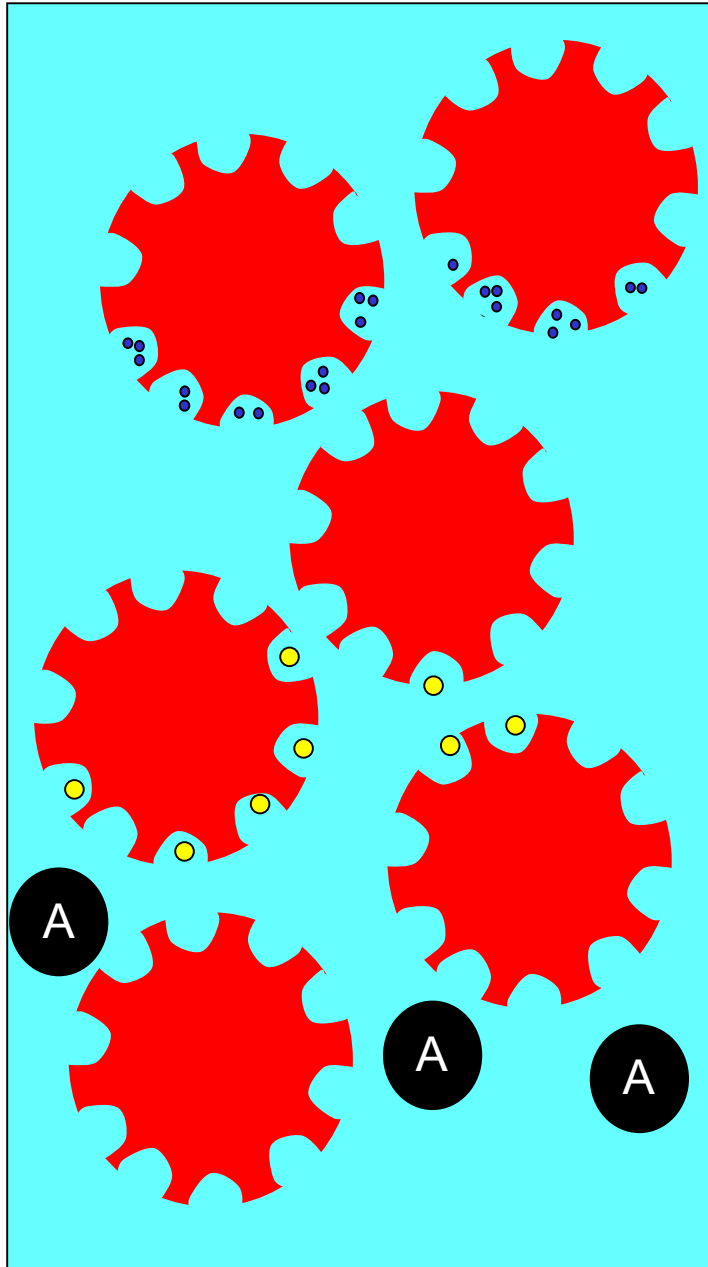
(100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl at pH 7.5),

then eluted in 0.3 mL of elution buffer (2% SDS, 20 mM Tris-HCl at pH 7.5, 20 mM DTT).

Eluted proteins were precipitated with 1 mL of methanol together with 12 µg of slipper limpet glycogen carrier and finally resuspended in 50 µL of elution buffer.

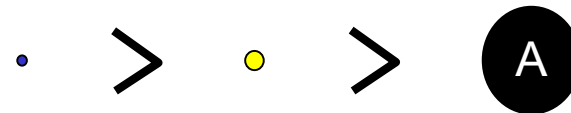


Size Exclusion Chromatography / Gel Permeation Chromatography

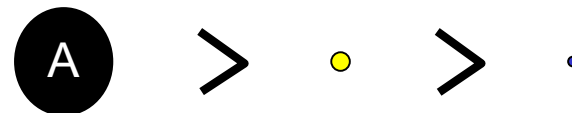


La cromatografia di esclusione si basa sulla diversa accessibilità delle molecole alla fase stazionaria. Fase stazionaria e fase mobile sono entrambe costituite dal medesimo solvente (liquido) con la sola differenza che la fase stazionaria è “immobile” mentre la fase mobile è soggetta ad un determinato flusso. La fase stazionaria è costituita da uno spazio (pori con delle determinate dimensioni) riempito da liquido. A seconda delle dimensioni delle molecole esse possono o meno accedere a questo spazio. Siccome la fase stazionaria (il liquido che costituisce la fase stazionaria) non è soggetta al flusso della fase mobile le molecole che hanno accesso ad essa vengono ritardate rispetto a quelle che ne sono escluse. Tanto più una molecola ha libero accesso alla fase stazionaria tanto maggiormente essa viene ritardata nel suo cammino lungo la colonna cromatografica.

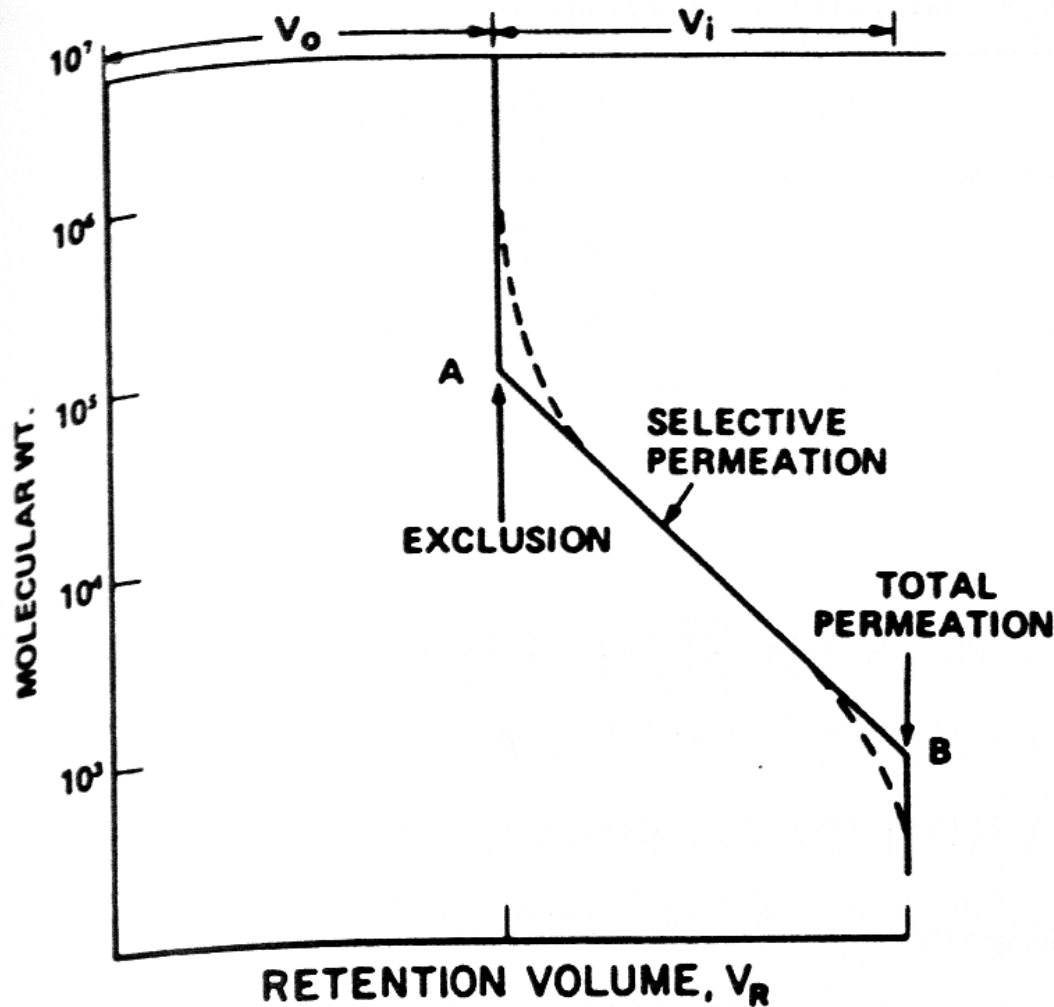
Accessibilità



Velocità d'uscita



Parametri coinvolti nella cromatografia d'esclusione



V_0 : volume del solvente al di fuori della fase stazionaria

V_i : volume della fase stazionaria

V_R : volume di eluizione di una molecola

$$\frac{V_R - V_0}{V_i} = K_d \quad 0 \leq K_d \leq 1$$

Molecola esclusa:

$$V_R = V_0 \Rightarrow K_d = 0$$

Molecola con accesso completamente non vincolato:

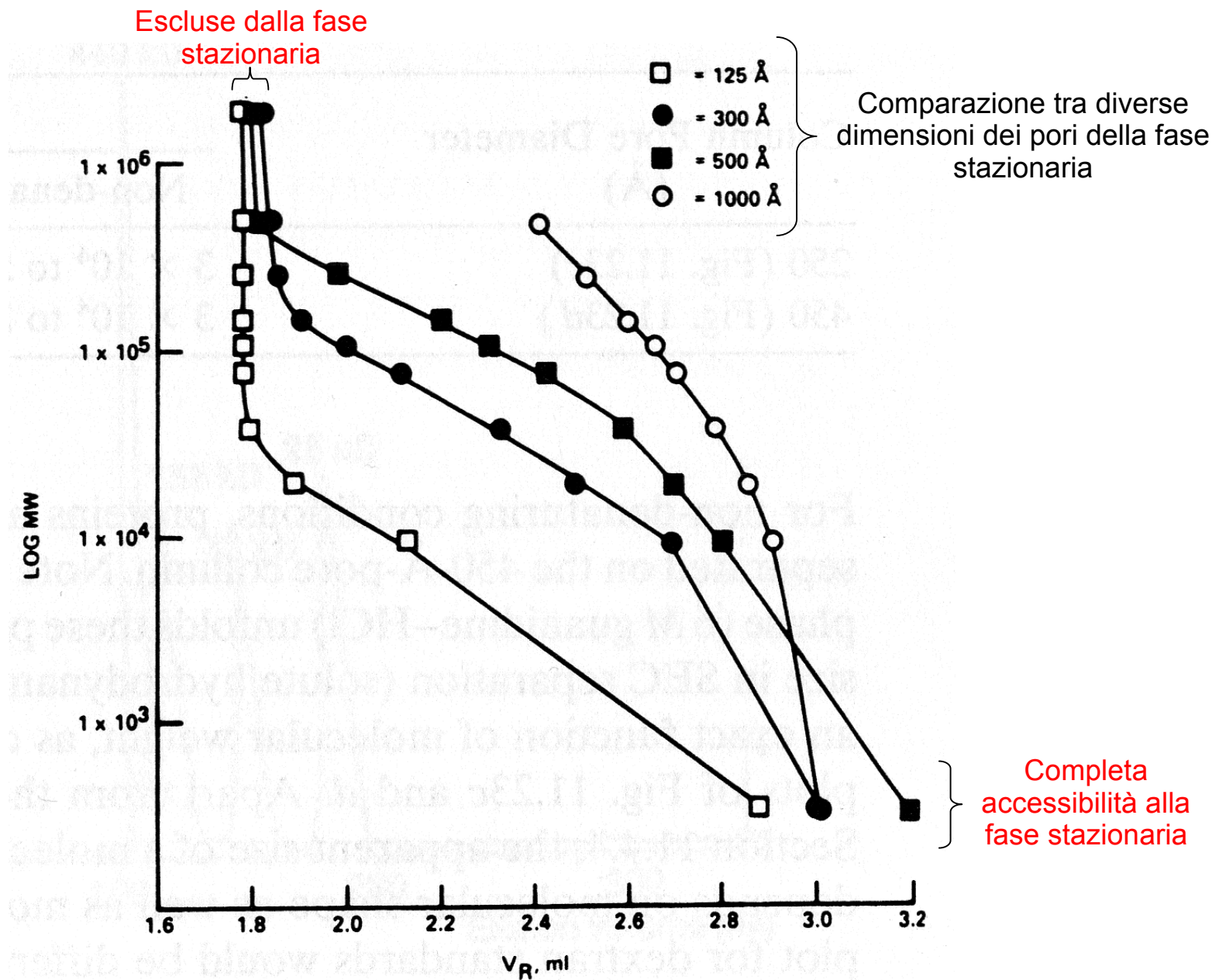
$$V_R = V_i + V_0 \Rightarrow K_d = 1$$

Ne consegue che comunque tutto il processo cromatografico si deve svolgere tra V_0 e $V_0 + V_i$.

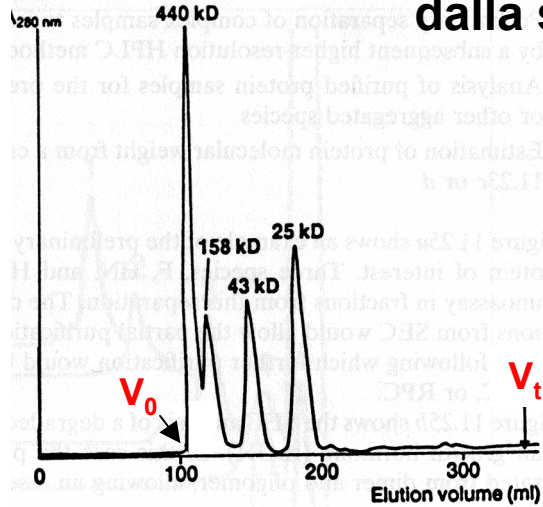
Se non si verifica questo

=> interazioni tra matrice e molecole

Grafici di calibrazione per la cromatografia di gel esclusione (LOG MW (y) vs V_R (x))



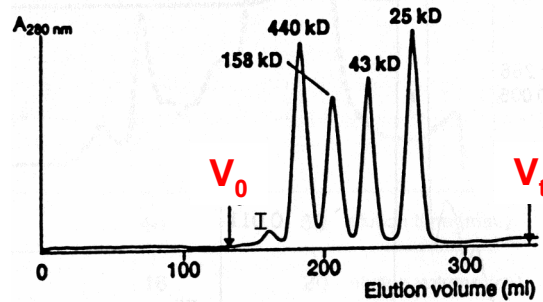
Dipendenza dell'efficienza del processo cromatografico dalla scelta delle dimensioni dei pori



(a)

← Sphacryl S-100 HR

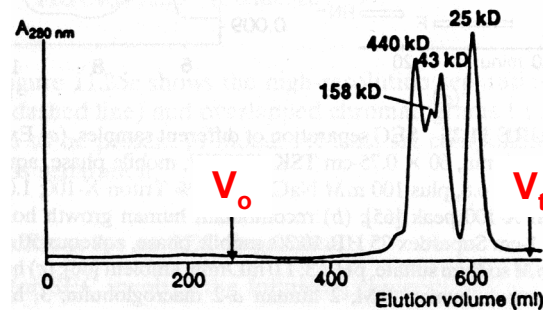
Pori troppo piccoli, le molecole di 440 e 158 kDa non hanno una sufficiente accessibilità differenziale alla fase stazionaria e pertanto non si separano (eluiscono molto vicino a V_0)



(b)

← Sphacryl S-300 HR

Pori delle dimensioni adatte. Tutte le molecole hanno una accessibilità differenziale alla fase stazionaria e pertanto si separano (eluiscono lontano sia da V_0 che da V_t)



(c)

← Sphacryl S-500 HR

Pori troppo grandi, tutte le molecole hanno una accessibilità praticamente quasi identica alla fase stazionaria e pertanto non si separano (eluiscono molto vicino a V_t)

Esempio di specifiche di colonne cromatografiche per gel filtrazione

SELECTION GUIDE BY TECHNICAL OVERVIEW – Gel Filtration

Product	Useful	Useful	Rec. Flow Rate*	
	Fractionation Range (M _r) (Proteins)	Fractionation Range (M _r) (Dextrans)	Prepacked Columns (ml/min)	Average Particle Size (µm)
Superdex™ – Prepacked Tricorn and PC columns				
Superdex Peptide 10/300 GL	100–7000 (peptides)	NA	0.4–1.2 ‡	13
Superdex Peptide PC 3.2/30	100–7000 (peptides)	NA	0.04–0.15 ‡	13
Superdex 75 10/300 GL	3 × 10 ³ –7 × 10 ⁴	5 × 10 ² –3 × 10 ⁴	0.4–1.0 ‡	13
Superdex 75 PC 3.2/30	3 × 10 ³ –7 × 10 ⁴	5 × 10 ² –3 × 10 ⁴	0.04–0.1 ‡	13
Superdex 200 10/300 GL	1 × 10 ⁴ –6 × 10 ⁵	1 × 10 ³ –1 × 10 ⁵	0.4–1.0 ‡	13
Superdex 200 5/150 GL	1 × 10 ⁴ –6 × 10 ⁵	1 × 10 ³ –1 × 10 ⁵	0.15–0.6 ‡	13
Superdex 200 PC 3.2/30	1 × 10 ⁴ –6 × 10 ⁵	1 × 10 ³ –1 × 10 ⁵	0.04–0.1 ‡	13

Domande:

- Che tipo di colonna è necessario utilizzare se si vuole separare due proteine con peso molecolare di 10000 e 20000 kDa?
- E nel caso queste due molecole fossero dei polimeri non proteici?
- La gel filtrazione è una metodica che può essere utilizzata anche per desalificare un campione biologico, ovvero per effettuare una sorta di “dialisi in colonna”?

Cromatografia - Conclusioni

Abbiamo a disposizione una serie di metodiche separative che si basano su principi diversi

Le molecole in genere si differenziano tra loro per più proprietà chimico/fisiche

Possibilità di combinare in serie più processi separativi diversi
=>
Cromatografie multidimensionali



La “**percezione**” della purezza di un campione “dipende” dalla metodica di rilevamento con la quale è stata condotta l’analisi.

Detector basati sulla

Spettrofotometria
Fluorimetria
Spettrometria di massa
Variazione dell’Indice di rifrazione
Elettrochimica

...

“non esiste il metodo di rilevazione (detector) UNIVERSALE”