

# TECNICHE CROMATOGRAFICHE

# ISOLAMENTO DI MOLECOLE BIOLOGICHE

**Distruzione delle cellule e dei tessuti che contengono le molecole biologiche di nostro interesse (proteine o acidi nucleici)**

**Mezzi di omogeneizzazione**  
(la soluzione serve da mezzo di raffreddamento e contiene reagenti capaci di preservare l'integrità biologica dei componenti)

- Tampone (pH)
- Sali inorganici (forza ionica)
- Saccarosio (pressione osmotica)
- Mg<sup>2+</sup> (per preservare l'integrità dei sistemi di membrana)
- EDTA (chela ioni divalenti e cationi metallici che inattivano le proteina, e ioni Ca<sup>2+</sup> che attivano le proteasi)
- inibitori di proteasi [chimici (PMSF) o proteici (leupeptina)]
- Agenti riducenti (b-mercaptoetanolo e ditiotreitolo)
- Detergenti ( x es. Triton- SDS, per solubilizzare proteine di membrana )

## Metodi

### Non meccanici

- Shock osmotico (soluzione ipertonica di saccarosio)
- congelamento e scongelamento (danneggiamento e disgregazione della parete cellulare per formazione di cristalli di ghiaccio)
- enzimi litici (danneggiamento della parete e della membrana cellulare, x es. lipasi, proteasi pectinasi, cellulasi)

### Meccanici (4°C)

- Omogeneizzatori a mescolamento (frullatori domestici)
- mulini a sfere (contengono sfere di vetre vibranti)
- Rotori stativi (frullatore ad immersione)
- sonicatori (gli ultrasuoni creano bolle nel mezzo che scoppiando inducono la rottura delle membrane)
- omogeneizzatori (pestello e tubo, Potter-Elvehjem)

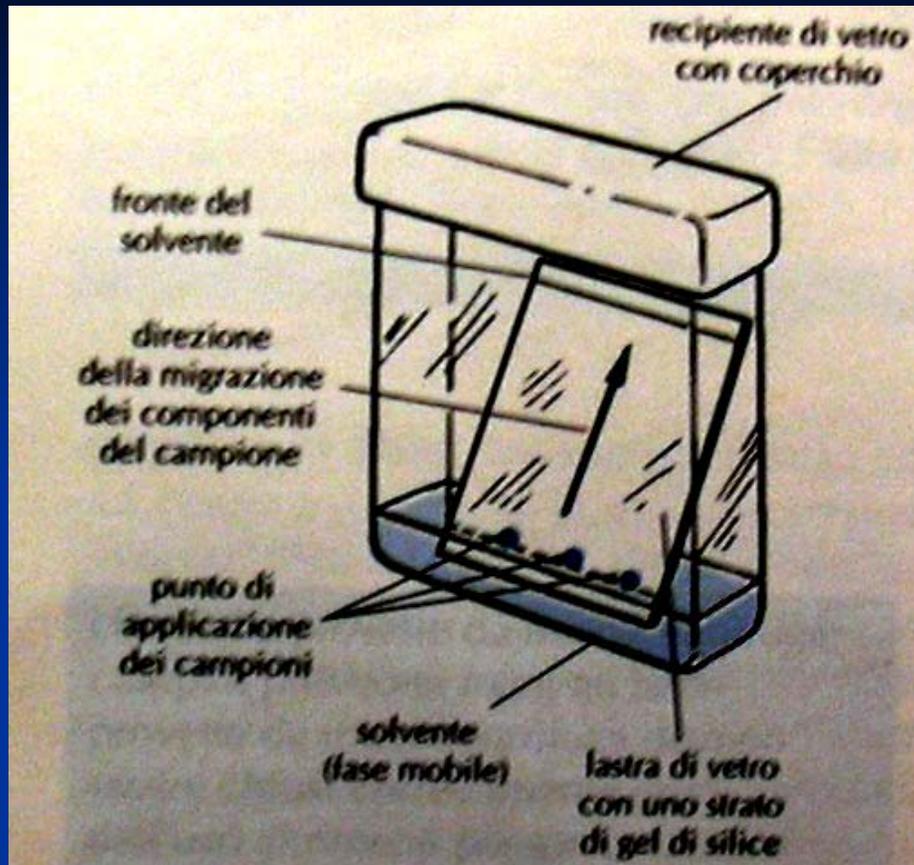
# CROMATOGRAFIA

La cromatografia consente di separare i costituenti di un campione in base a ad una proprietà chimica, come la massa molecolare, la carica o la solubilità )

## Componenti

- fase stazionaria (solida, liquida o gel immobilizzato su una matrice inerte)
- una fase mobile (liquido o gas che trasporta il campione da separare)
- Un sistema che fa passare la fase mobile attraverso il letto cromatografico
- rilevatore

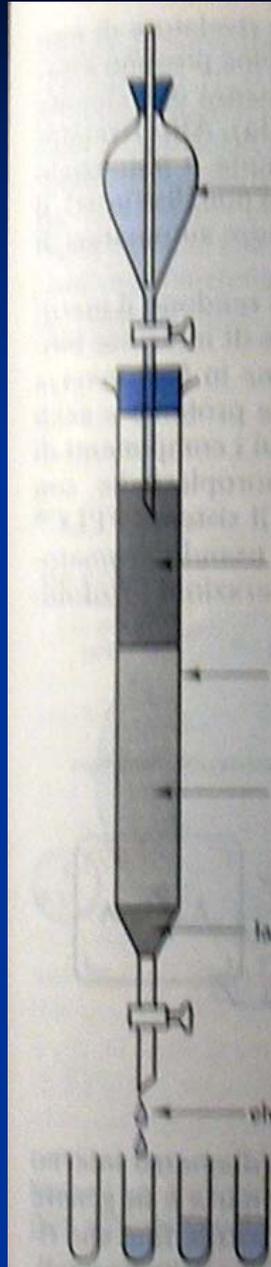
# CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE



Mobilità frontale  $\longrightarrow$   $R_F = \frac{\text{Distanza percorsa dalla sostanza}}{\text{Distanza percorsa da solvente}}$

Mobilità frontale  $\longrightarrow$   $R_F = \frac{\text{Distanza percorsa dalla sostanza campione}}{\text{Distanza percorsa dallo standard}}$

# CROMATOGRAFIA SU COLONNA



Riserva di fase mobile

Fase mobile

Colonna di vetro

Colonna riempita (da tamponare)

Lana di vetro o filtro

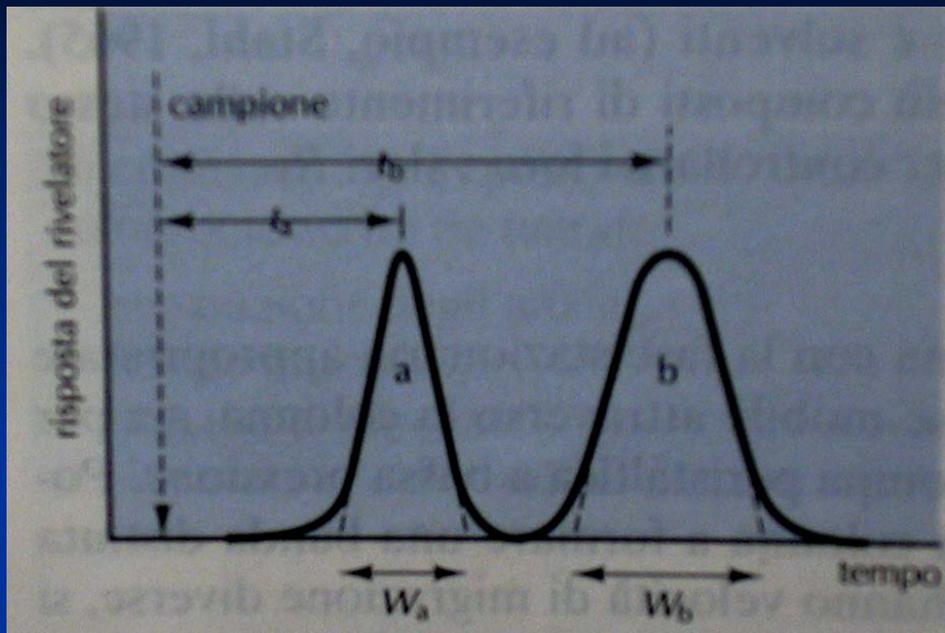
eluente

Provette del collettore di frazioni

Analisi  
delle  
frazioni



## Profilo di eluizione



$t$  = tempo di ritenzione

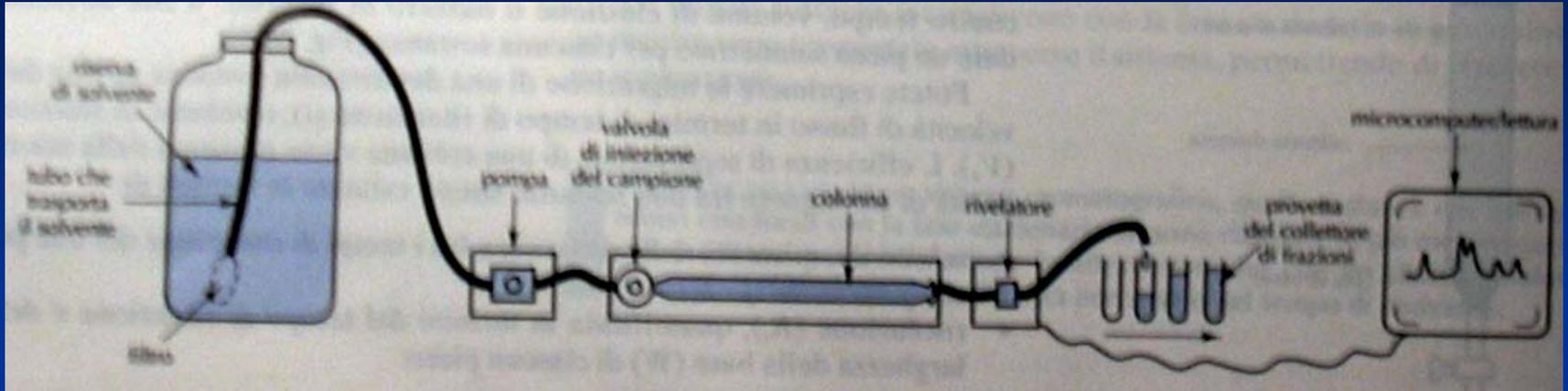
$W$  = larghezza della base di ciascun picco

## Efficienza

Selettività = differenza fra i tempi di ritenzione ( $t_a - t_b$ )

$$\text{Risoluzione} = R_s = \frac{2(t_a - t_b)}{(W_a + W_b)}$$

# HPLC (cromatografia liquida ad alte prestazioni)

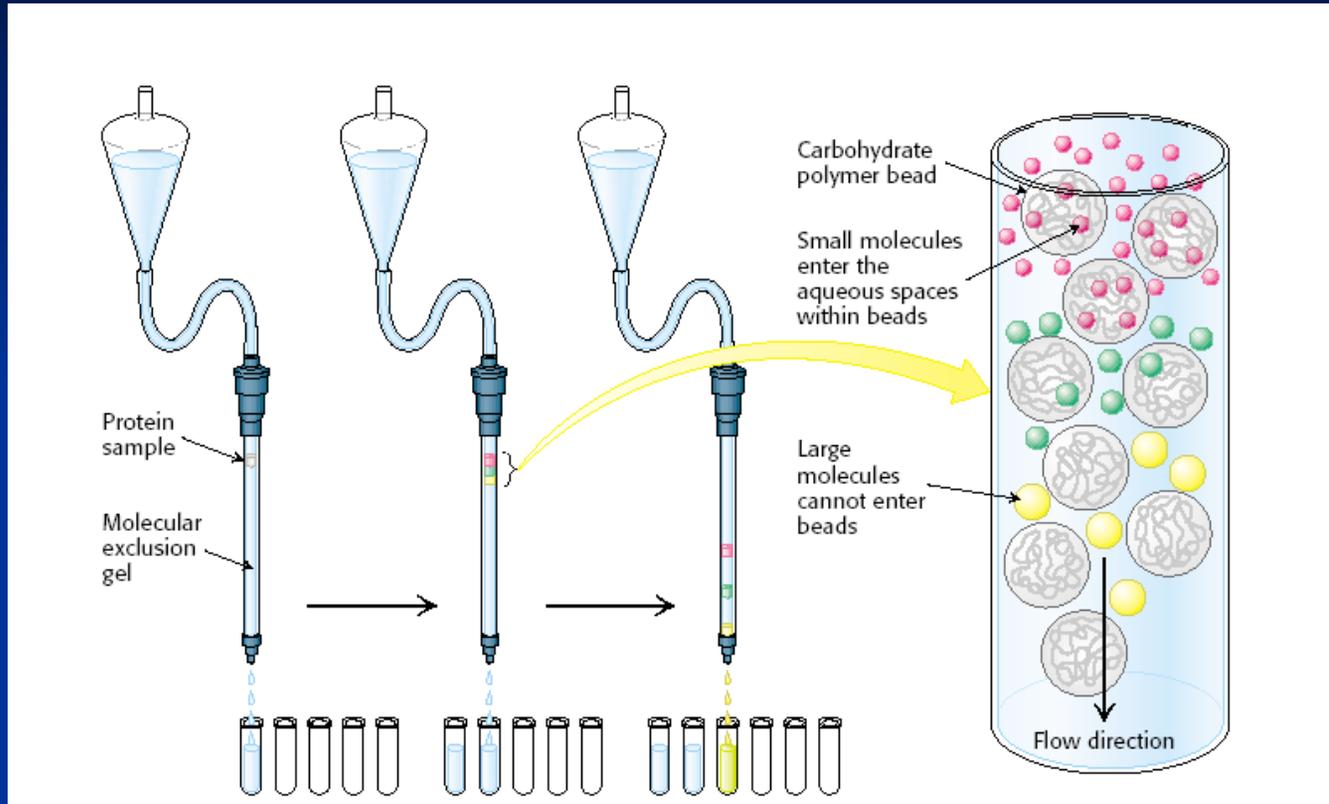


Separazione

- Isocratica (unico solvente o miscela di solventi per tutta l'analisi)
- In gradiente (la composizione della fase mobile viene variata)

# METODI DI SEPARAZIONE

## Cromatografia per gel filtrazione (separazione in base alla massa molecolare)

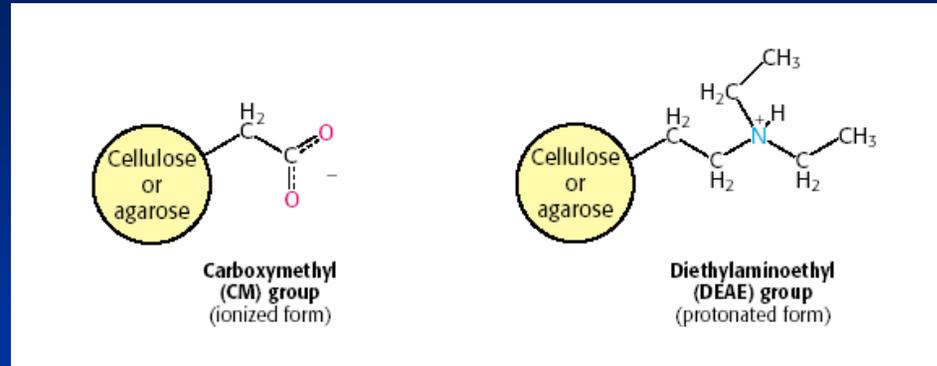
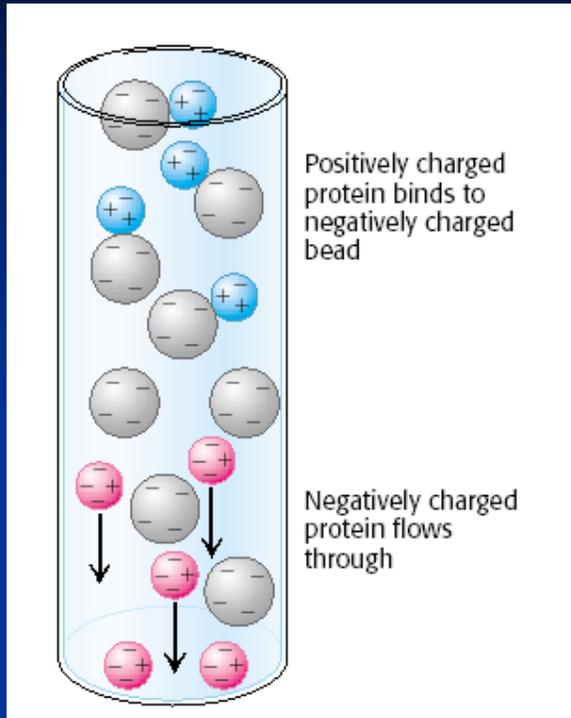


**Fase stazionaria:** Gel con pori di dimensioni controllate in modo che escludano le molecole in base alla MW ( destrani con legami crociati: Sephadex, Sepharose )

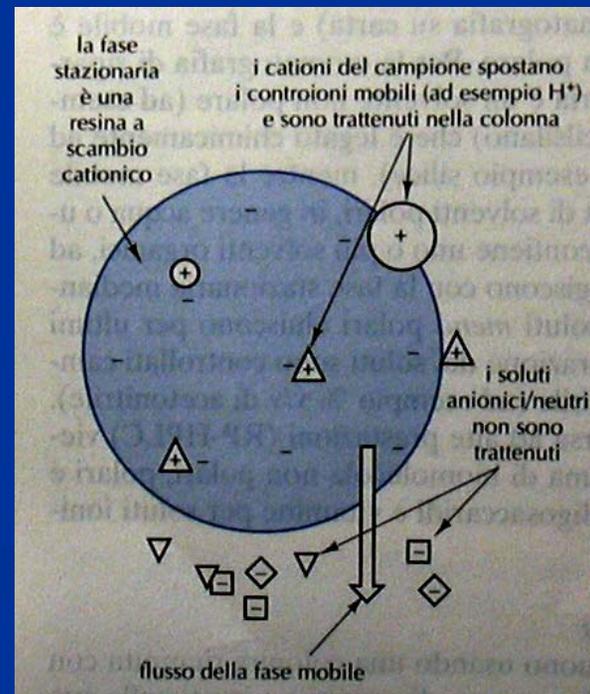
**Fase mobile:** non influisce sulla separazione ma serve solo a trasportare le molecole da separare

# Cromatografia a scambio ionico

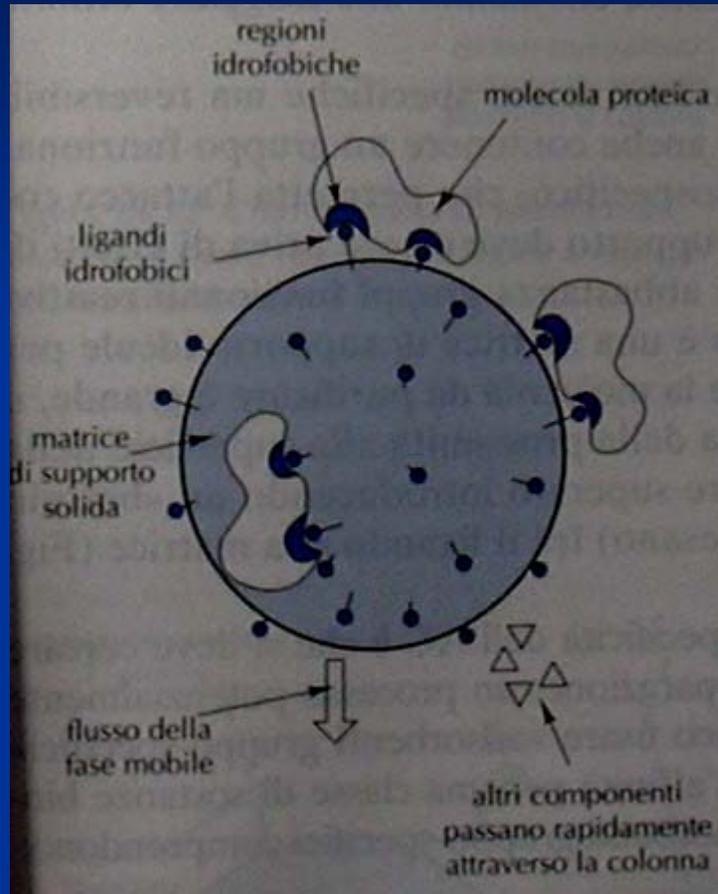
Fase stazionaria : matrice porosa ionizzabile ( i gruppi possono essere scambiatori di cationi o di anioni in funzione della loro affinità per mionipositivi o negativi)



Eluente: tampone a gradiente (differenti valori di pH, forza ionica crescente)



## Cromatografia per interazioni idrofobiche

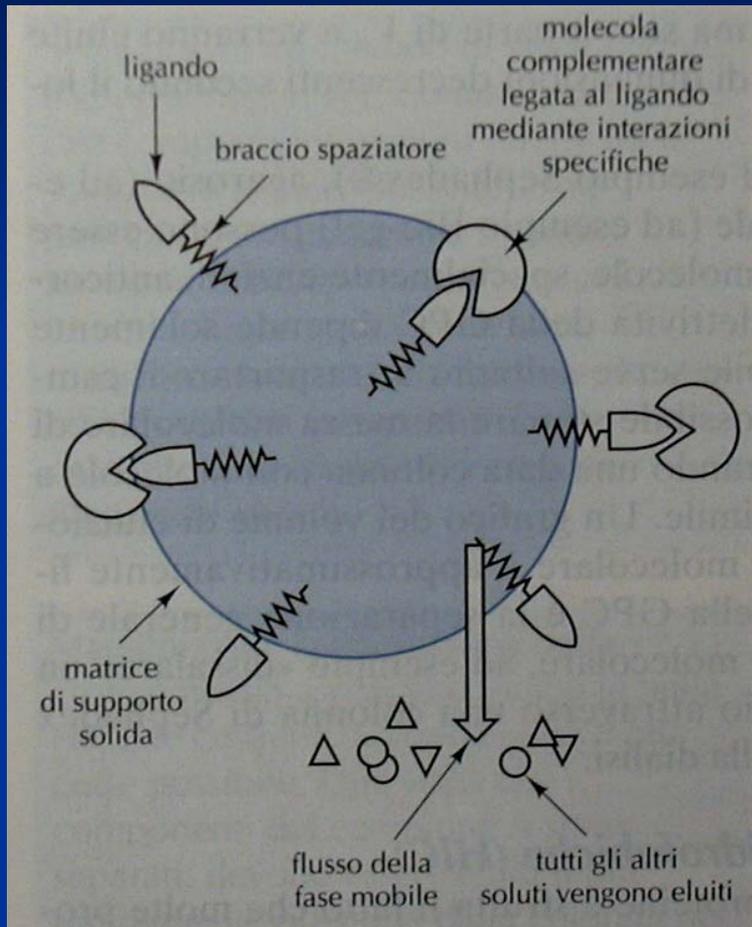


Fase stazionaria : matrice rivestita di gruppi idrofobici

Fase mobile: solventi polari

Eluente : soluzioni con detergenti non ionici, variazioni di pH, riduzione della polarità della fase mobile

# Cromatografia di affinità



**Fase stazionaria :** matrice funzionalizzata con un ligando specifico

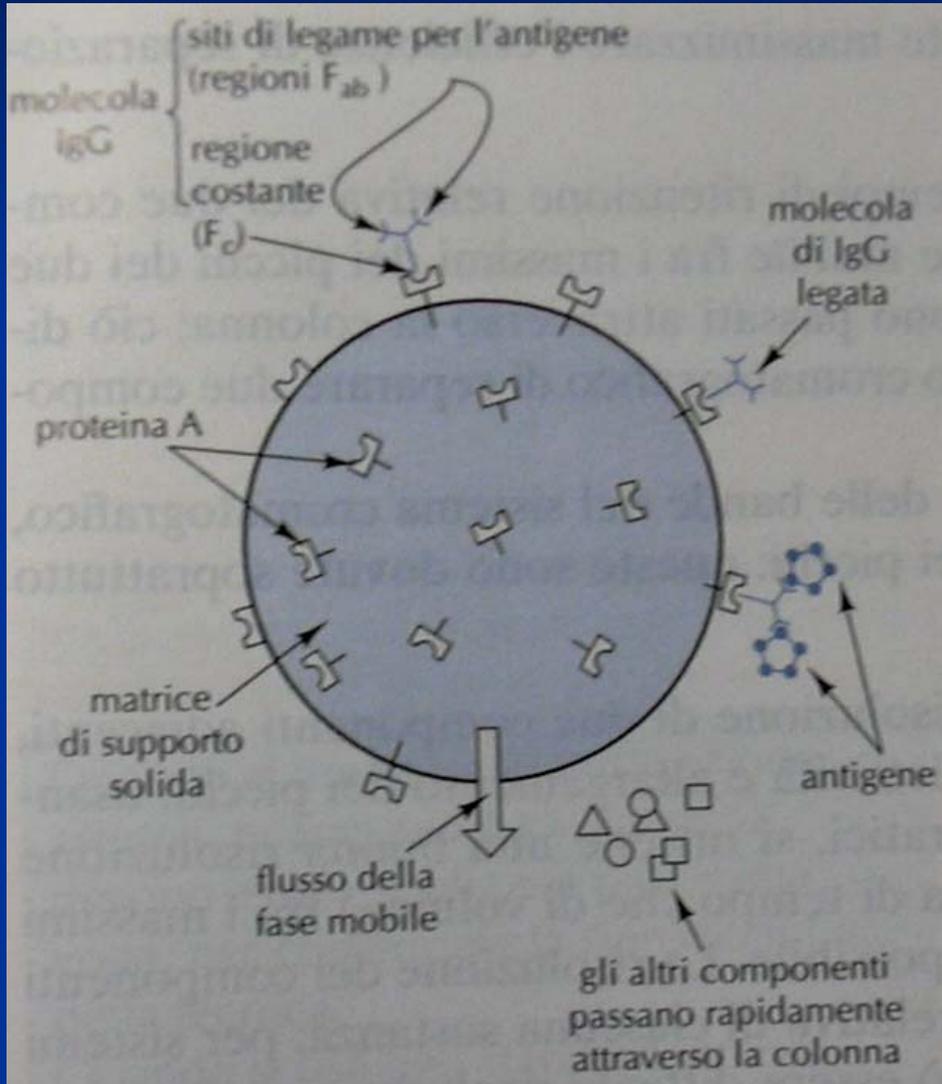
**Fase mobile:** tampone capace di mantenere la proteina in condizioni native

**Eluente :** variazioni di pH, incremento della forza ionica, aggiunta di sostanze capaci spiazzare il legame antigene anticorpo

# Applicazioni

Cromatografia di affinità con proteina A per l'isolamento di IgG

Cromatografia di affinità con coloranti immobilizzati (cibacron blue) per la rimozione selettiva di albumina

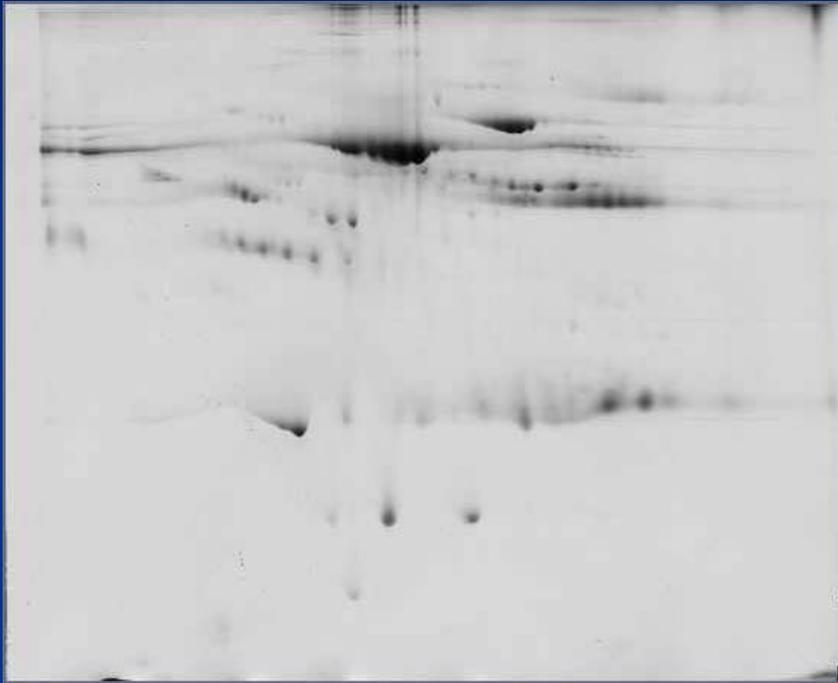


-purificazione di IgG

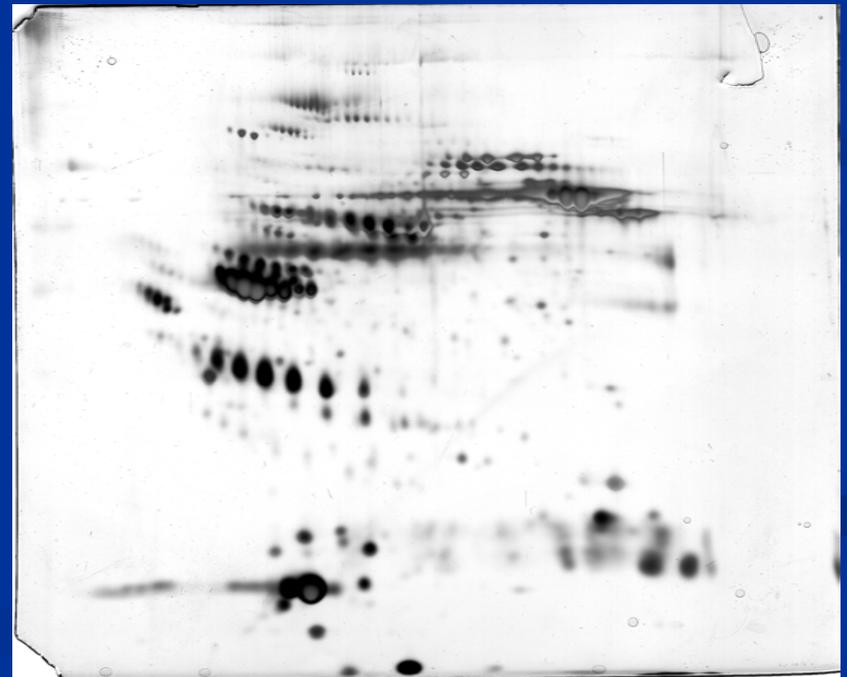
-rimozioni di IgGe albumina da plasma/siero

# Esempio di applicazione cromatografica per diminuire la complessità di un campione biologico

Risoluzione di plasma umano non prefazionato



Risoluzione di plasma umano dopo immunodeplezione di albumina e IgG



# ISOLAMENTO DI GLICOPROTEINE

Fase stazionaria : matrice funzionalizzata con lectine, proteine che riconoscono in modo specifico glicoproteine, lipoproteine, proteine di membrana;

-La concanavalina A riconosce in modo specifico le glicoproteine che contengono mannosio e glucosio

-La lectina del germe del grano riconosce in modo specifico glicoproteine che contengono residui di N-acetilglucosammina

Eluente : gradiente salino o aggiunta di soluzioni di zuccheri liberi capaci di spiazzare il legame della glicoproteina con la colonna

