

Primo Levi

“Il sistema periodico”

L'anidride carbonica [...] questo gas che costituisce la materia prima della vita, la scorta permanente a cui tutto ciò che cresce attinge, e il destino ultimo di ogni carne, **non è uno dei componenti principali dell'aria**, bensì un rimasuglio ridicolo, un' "impurezza" trenta volte meno abbondante dell'argon di cui nessuno si accorge [...] è un'acrobazia ironica, uno scherzo da giocoliere, una incomprensibile ostentazione di onnipotenza-prepotenza, poichè **da questa sempre rinnovata impurezza dell'aria veniamo noi**: noi animali e noi piante, e noi specie umana, coi nostri quattro miliardi di opinioni discordi, i nostri millenni di storia, le nostre guerre e vergogne e nobiltà e orgoglio.

Su questo cammino all'ingiù, che conduce all'equilibrio e cioè **alla morte**, **la vita disegna un'ansa** e ci **si annida**.

“Never waste pure thoughts on an impure protein”

PURIFICAZIONE
DI
PROTEINE

PURIFICARE

Purificare significa ottenere "solamente" la nostra molecola di interesse (**isolarla**).

Purificare
una proteina
per:

- Determinarne la sequenza aminoacidica
- Studiarne la funzione
- Determinarne la struttura

Le proteine differiscono per :

- Dimensione e forma
- Carica
- Solubilità
- Attività biologica

PROPRIETA' DELLE PROTEINE SFRUTTATE PER PURIFICARLE

- la dimensione (PM) e forma
- il contenuto in aminoacidi acido o basici (la carica di una proteina è la somma delle cariche (+) e (-) ad un dato pH sulla superficie).
- il punto isoelettrico
- la distribuzione di carica (ci può essere una distribuzione non uniforme sulla superficie)
- solubilità (influenzata da pH, forza ionica)
- densità ($\sim 1.4 \text{ g/cm}^3$) lipoproteine < proteine < fosfoproteine
- idrofobicità (numero e distribuzione dei residui idrofobici)
- capacità a legare metalli o altre molecole
- capacità di associazione e dissociazione (reversibili)
- specificità di sequenza o di struttura (anticorpi)
- presenza di modifiche post-traduzionali
- altre proprietà (es. termolabilità)

Processi di separazione

Precipitazione

solfato d'ammonio

acetone

polietilenilammina (polimin P)

Precipitazione isoelettrica

Ripartizione

polietilenglicole (PEG)

Cromatografia

scambio ionico

idrofobica

affinità

affinità per metallo immobilizzato

immunoaffinità

cromatofocusing

filtrazione su gel

Elettroforesi

gel elettroforesi (native)

gel elettroforesi denaturate-SDS

elettrofocusing

Centrifugazione

Ultracentrifugazione

Proprietà sfruttate

solubilità

solubilità

solubilità, carica

solubilità, pI

coefficiente di ripartizione tra due fasi

carica, distribuzione di carica

idrofobicità

sito di legame per un ligando

legame con metallo

specifico sito antigenico

punto isoelettrico

forma, dimensione

carica, dimensione

dimensione

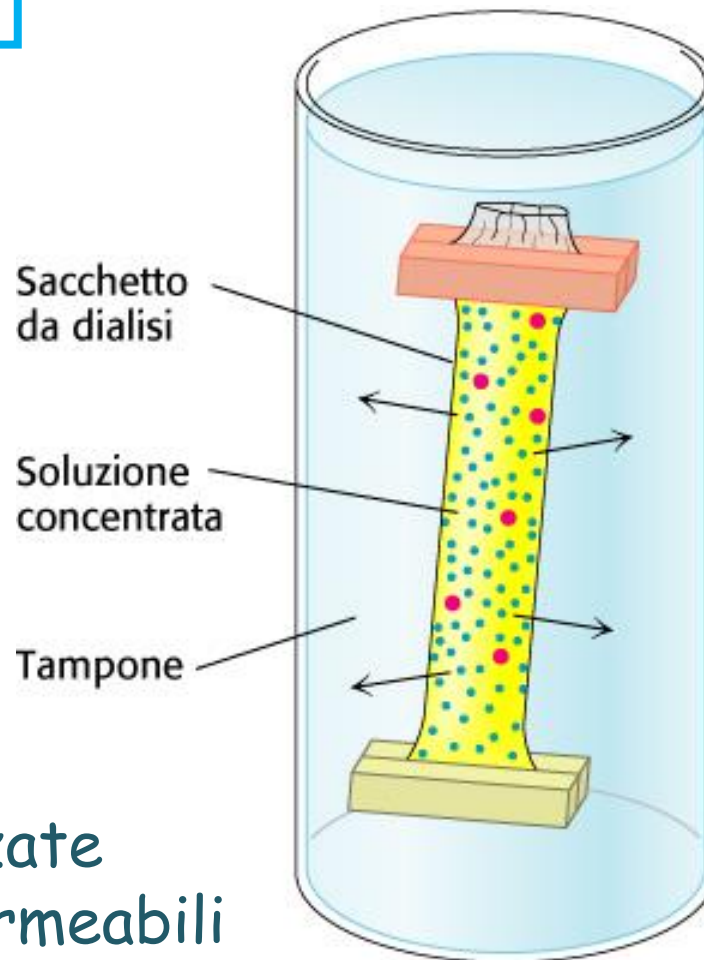
pI

forma, dimensione, densità

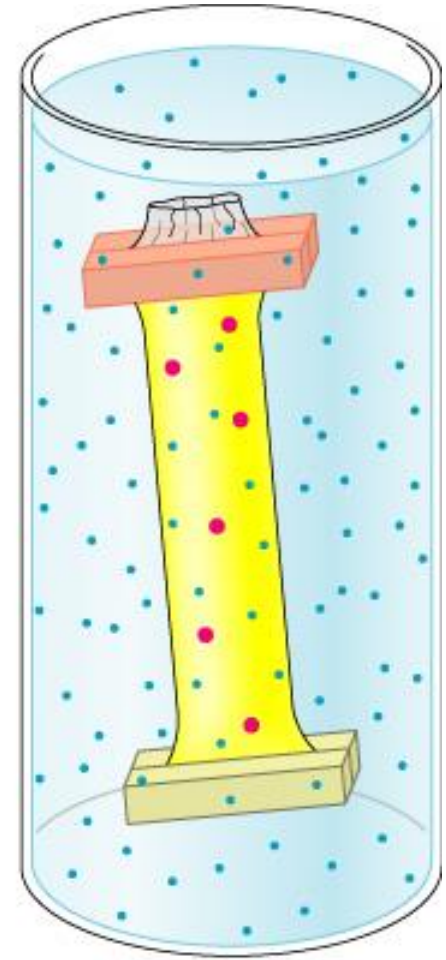
forma, dimensione

DIALISI

Proprietà sfruttata:
DIMENSIONE
delle proteine.



All'inizio della dialisi



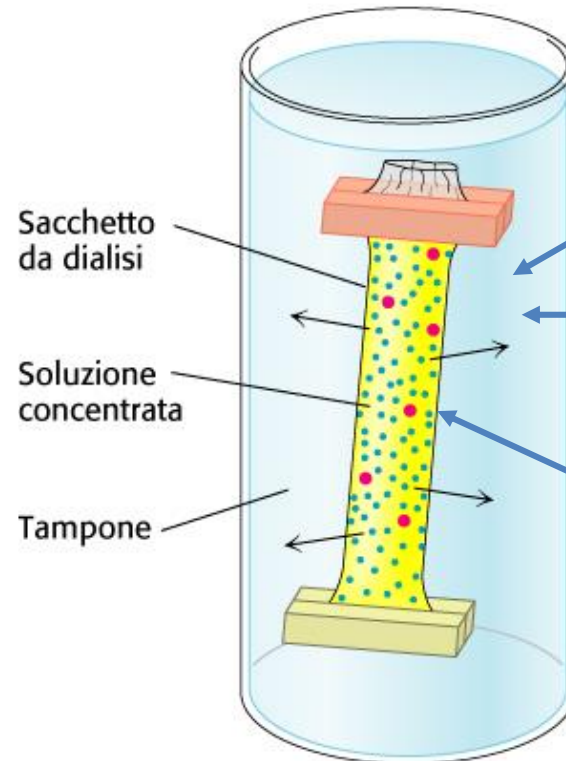
All'equilibrio

Vengono utilizzate
membrane semi-permeabili
(es. cellulosa).

DIALISI

Proprietà sfruttata:
DIMENSIONE
delle proteine.

3 grandezze da considerare:



La chimica del tampone esterno

La quantità del tampone esterno

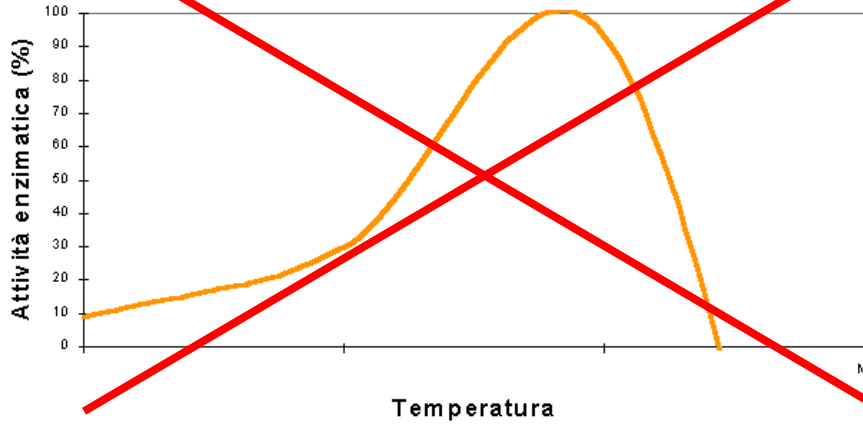
Il diametro dei pori del sacchetto

All'inizio della dialisi

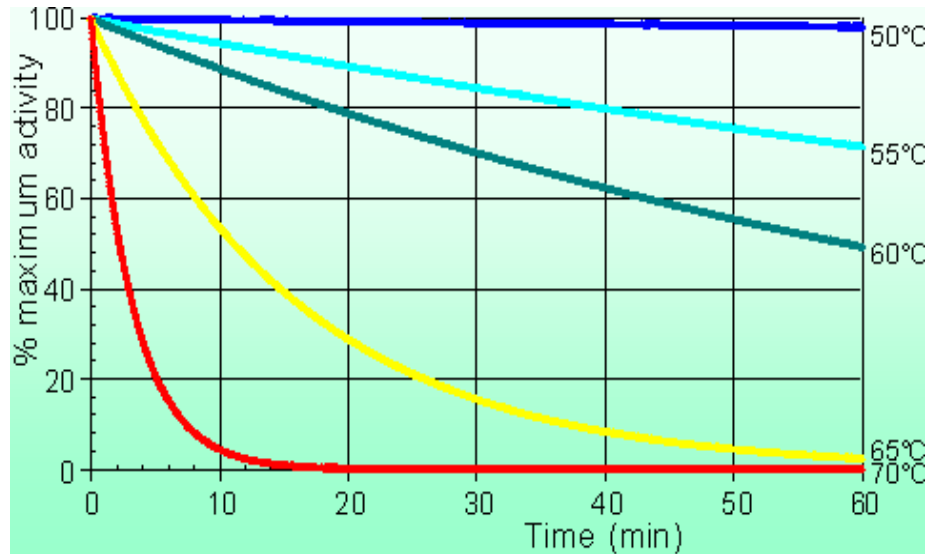
Per una dialisi esaustiva occorrono **diverse ore** ed è necessario sostituire periodicamente il tampone.

SEPARAZIONE SULLA BASE DEL FENOMENO DELLA DENATURAZIONE

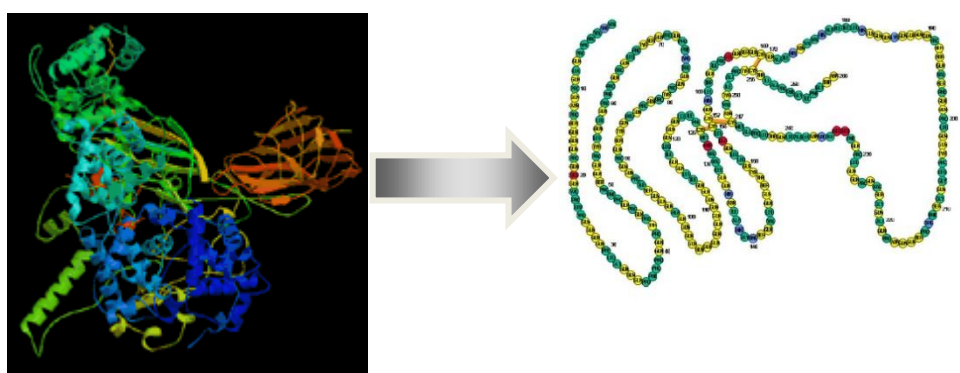
Influenza della temperatura sull'attività enzimatica (Kunze, 1999)



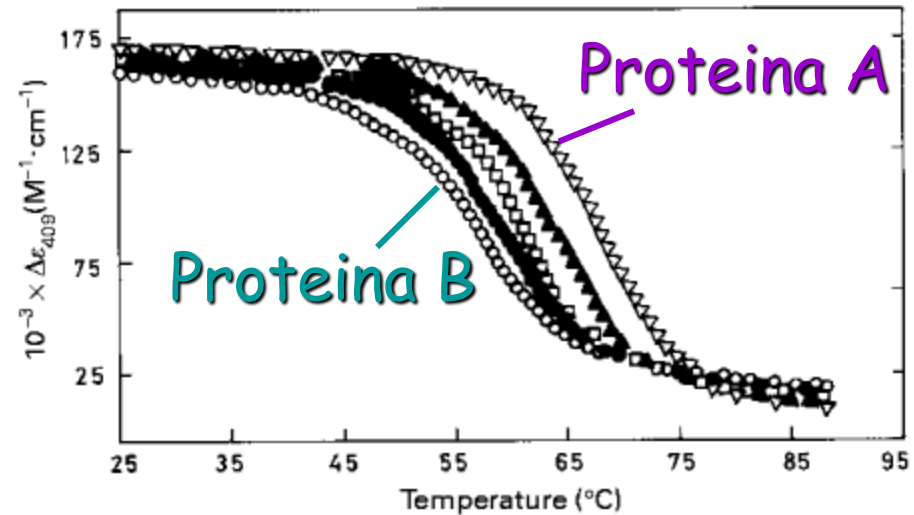
FRAZIONAMENTO PER DENATURAZIONE



Differente sensibilità al calore delle proteine



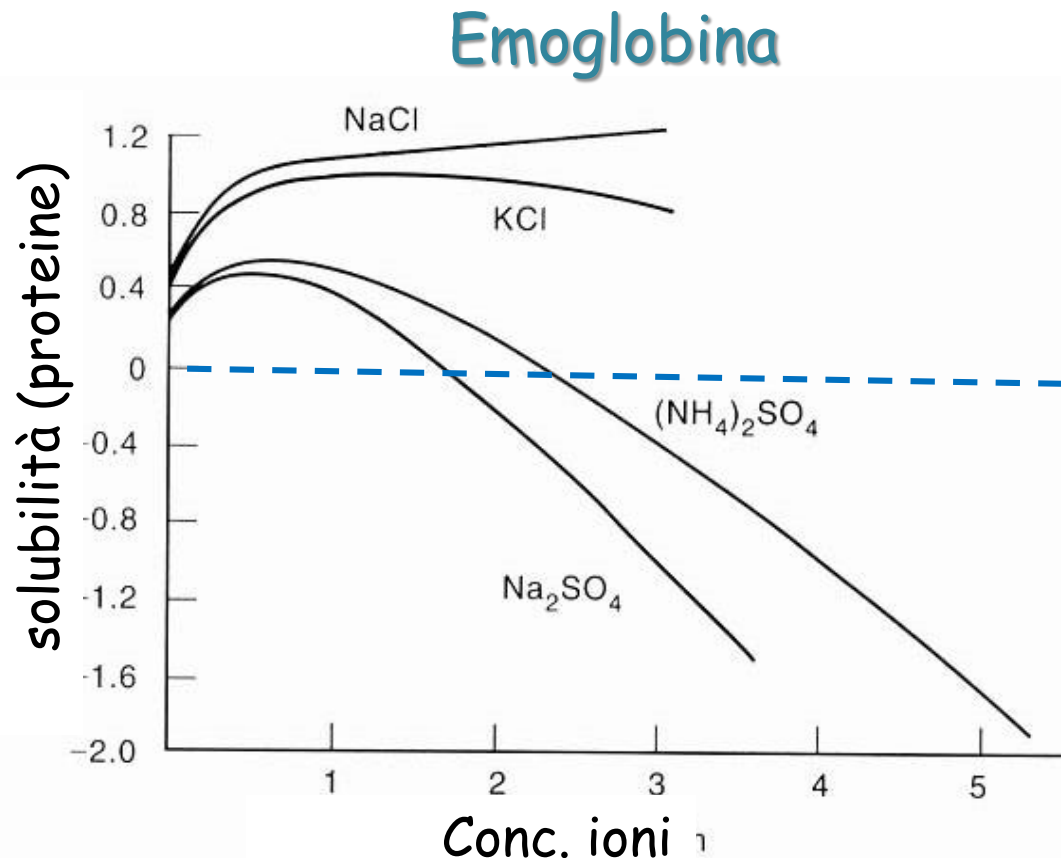
Proprietà sfruttata:
STABILITA' delle proteine.



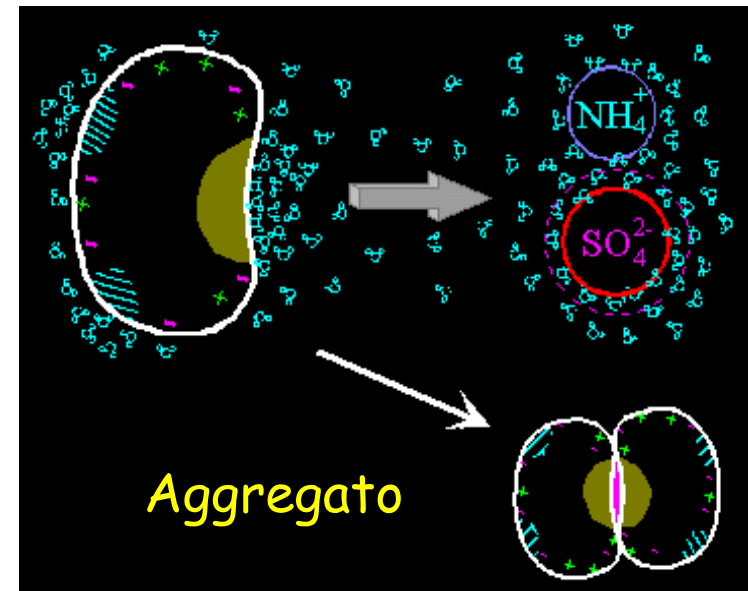
FRAZIONAMENTO SALINO o SALTING OUT

Proprietà sfruttata:
SOLUBILITA'
delle proteine.

Le proteine sono solitamente solubili in H_2O ; tale solubilità è anche in funzione della forza ionica della soluzione.



$$\mu = \frac{1}{2} \sum c \cdot z^2$$



Salting-in _ & _out

Solubility of horse carbon monoxide hemoglobin in different salt solutions. The addition of a moderate amount of salt (salting in) is required to solubilize this protein. At high concentrations, certain salts compete more favorably for solvent, decreasing the solubility of the protein and thus leading to its precipitation (salting out). (Source: E. J. Cohn and J. T. Edsall, *Proteins, Amino Acids, and Peptides as Ions and Dipolar Ions*. Copyright ©1942, Reinhold, New York, N.Y.)

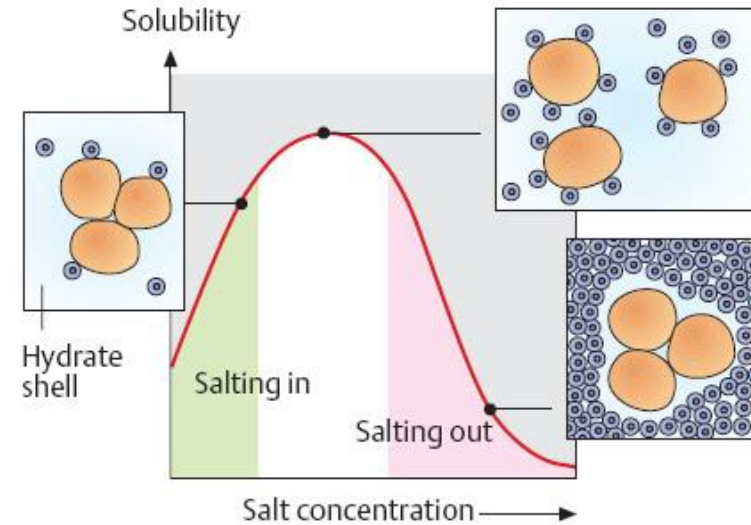
In condizioni normali le proteine si aggregano per attrazione tra le cariche di superficie e precipitano. **Quando viene aggiunto il sale gli ioni da esso derivanti interagiscono con le cariche elettriche di superficie delle proteine neutralizzandole e impedendo la formazione di aggregati.**

Al contrario aumentando la concentrazione di sale, e quindi facendo aumentare la forza ionica in soluzione, si ottiene un eccesso di cariche che, dopo aver saturato la proteina, la destabilizzano **entrando in competizione con essa per il solvente.**

Poichè le cariche di superficie delle varie specie di proteine sono differenti, ognuna di esse ha un suo punto di precipitazione che corrisponde ad una determinata concentrazione di sale. In questo modo usando una concentrazione di sale ad hoc possiamo isolare una o un gruppo di proteine da una miscela; **il sale viene poi eliminato per dialisi.**

APPLICAZIONE DEL SALTING OUT

Proprietà sfruttata:
SOLUBILITA'
delle proteine.



Solfato
d'ammonio
0,8 M

Come si elimina il sale in eccesso?

Soluzione di
fibrinogeno
ed albumina

Precipitazione

Albumina solubile

ppt fibrinogeno



SEDIMENTAZIONE E CENTRIFUGAZIONE

Centrifuga: motore centrale in grado di imprimere una rotazione ad un **rotore** contenente i campioni.



L'uso di una centrifuga è ottimale per la separazione di particelle con un diverso **coefficiente di sedimentazione (S)**.

A valori di **S** > corrispondono velocità di sedimentazione >.

Ogni particella sedimenta con una velocità direttamente proporzionale al **campo centrifugo**.

CENTRIFUGHE



Da banco

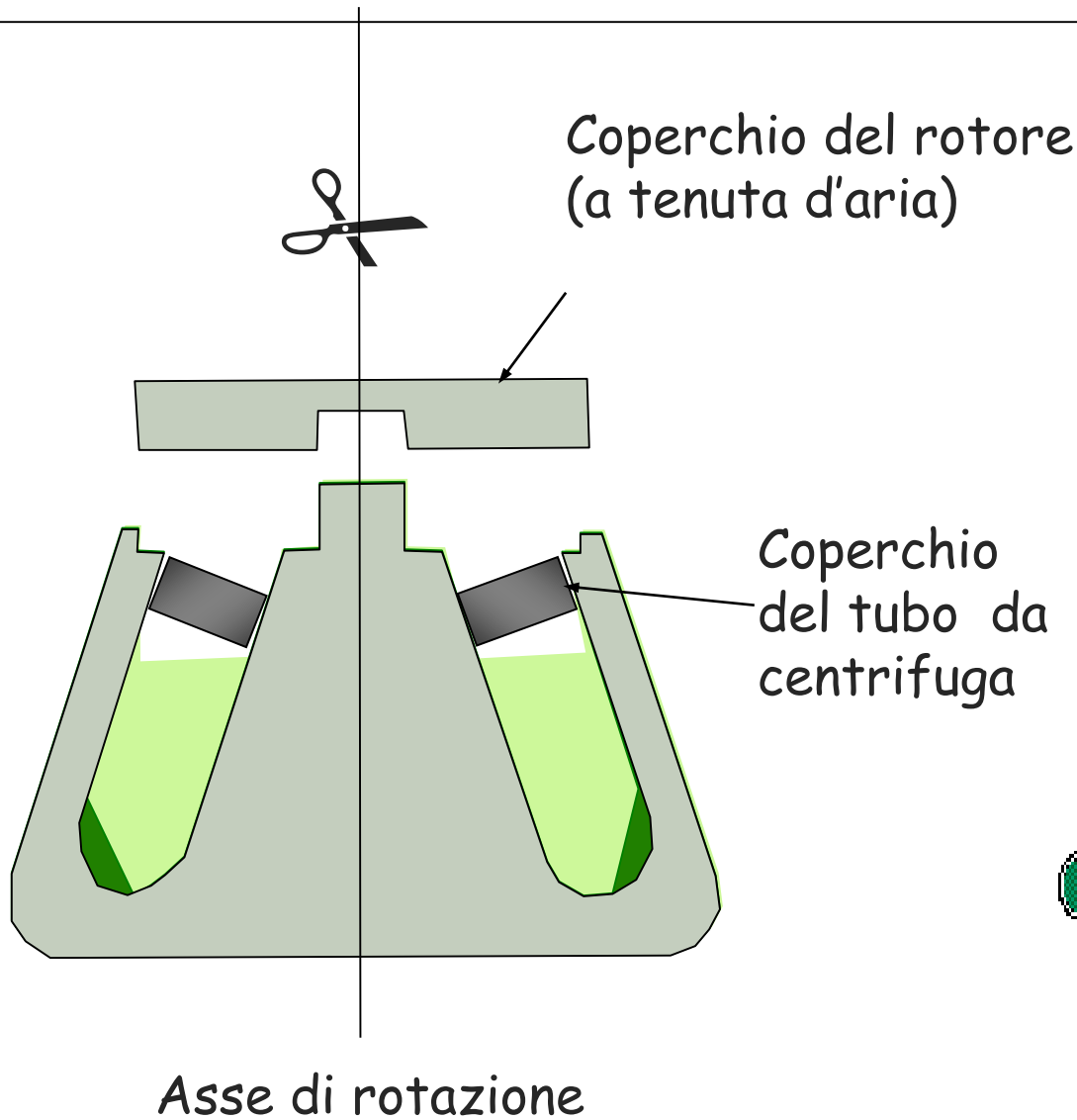


Da pavimento

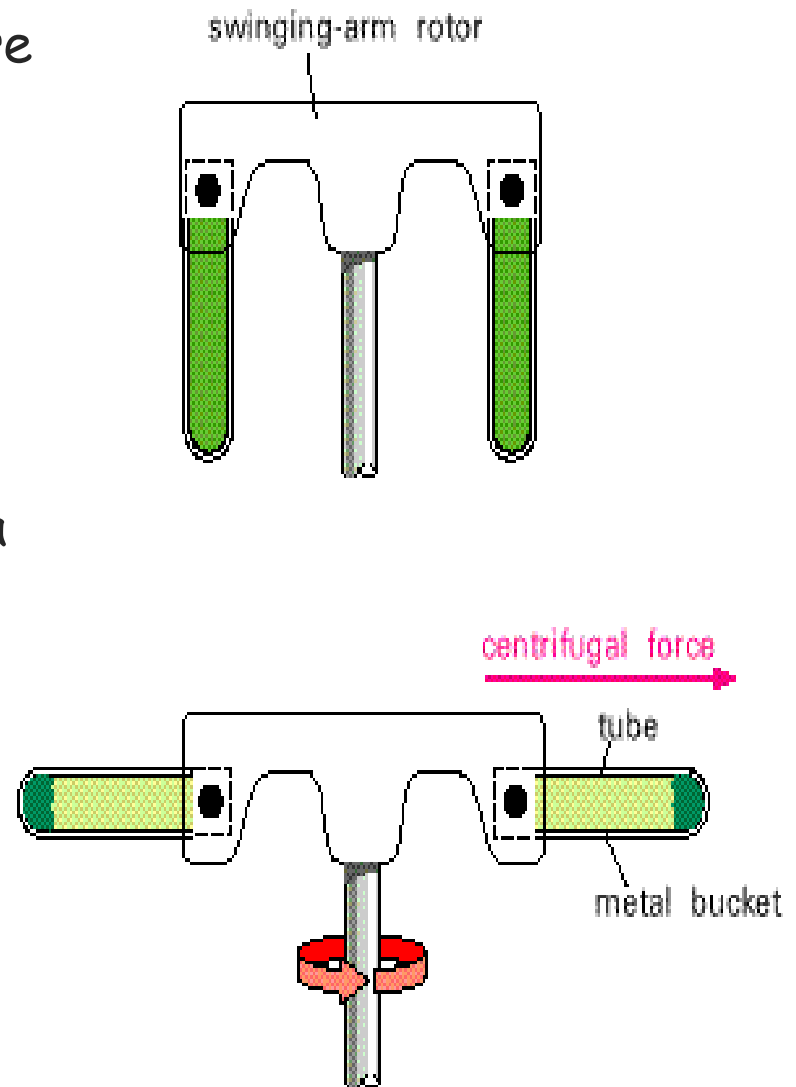


Si distinguono per **velocità** di rotazione, per **n°** e **volumi** dei campioni.

ROTORI



Rotore ad angolo **fisso**

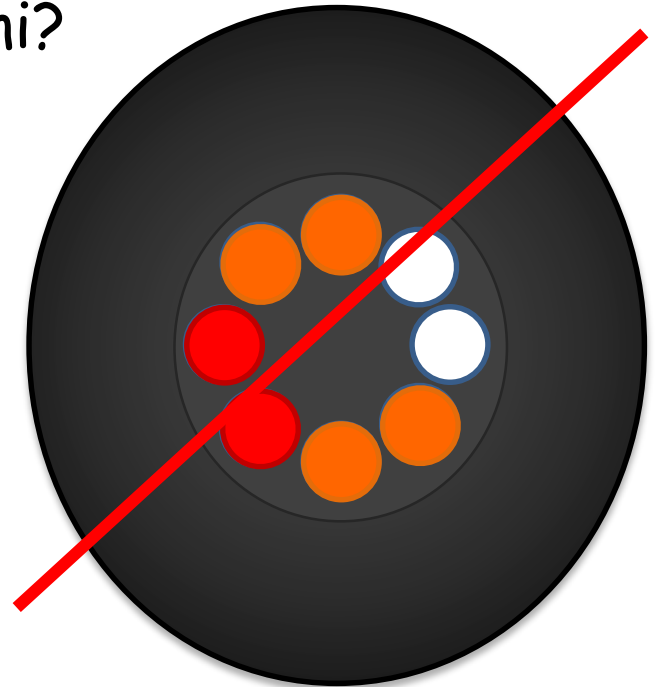
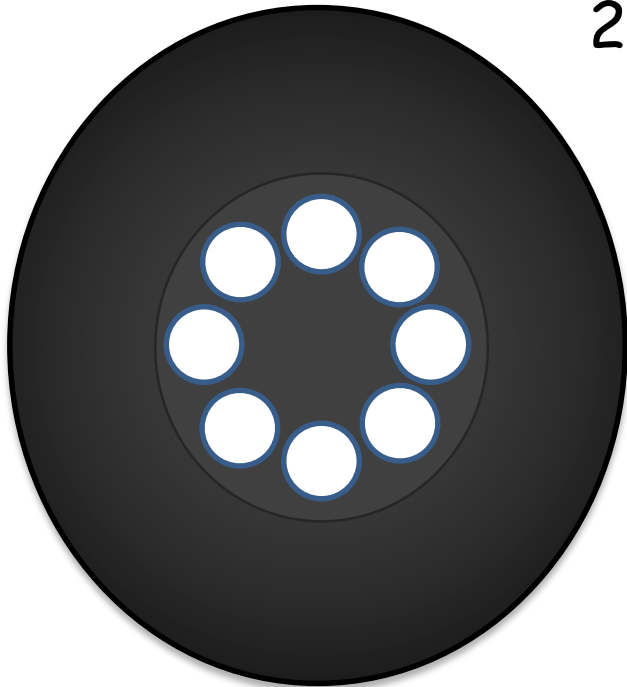


Rotore ad angolo **variabile**

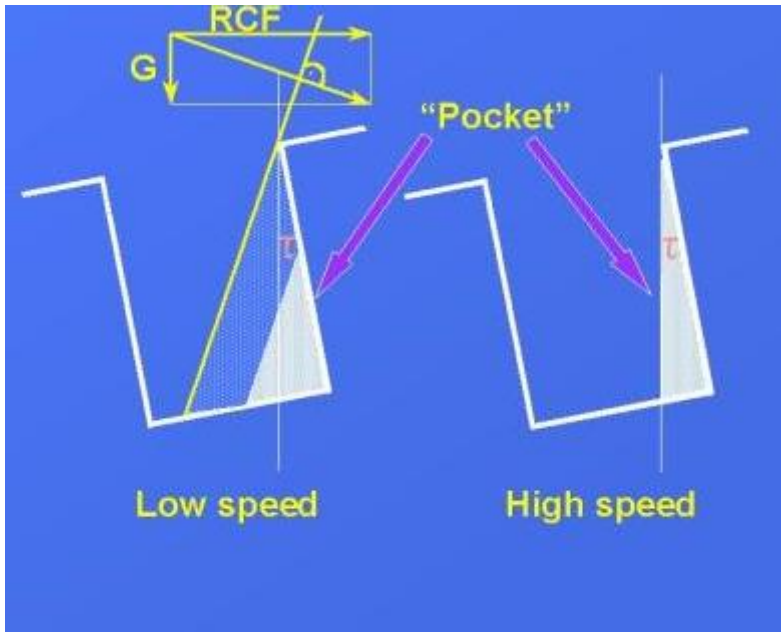
RIEMPIMENTO DEI ROTORI



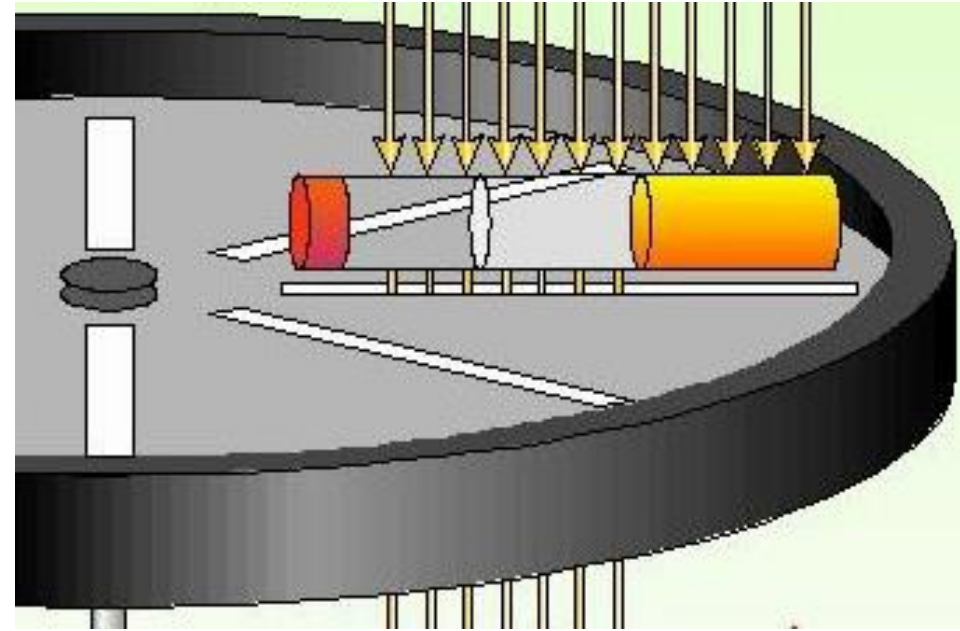
Se devo caricare
2 o più campioni?



SEDIMENTO

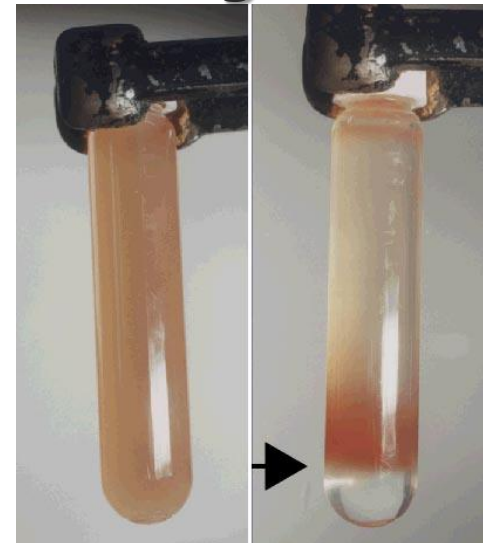


Rotore ad angolo **fisso**



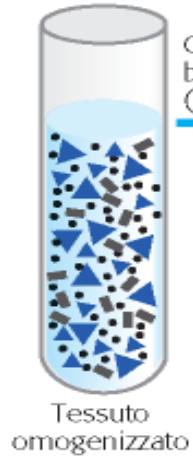
Rotore ad angolo **variabile**

Come si depositerà il sedimento dipende anche dalla **velocità** impostata.



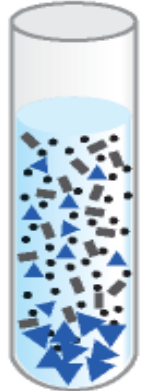
CENTRIFUGAZIONE DIFFERENZIALE

Omogenizzazione
del tessuto



Tessuto
omogenizzato

Centrifugazione a
bassa velocità
(1000 *g*, 10 min)



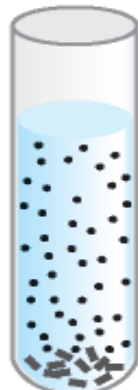
Sedimento
contenente cellule
intatte, nuclei,
citoscheletro,
membrane
plasmatiche

Sopranatante sottoposto
a centrifugazione a media velocità
(20000 *g*, 20 min)



Sedimento
contenente
mitocondri,
lisosomi,
perossisomi

Sopranatante sottoposto
a centrifugazione ad alta velocità
(80000 *g*, 1 h)



Sedimento
contenente
microsomi
(frammenti
di ER)
e piccole
vescicole

Sopranatante sottoposto
a centrifugazione
a velocità molto alta
(150000 *g*, 3 h)

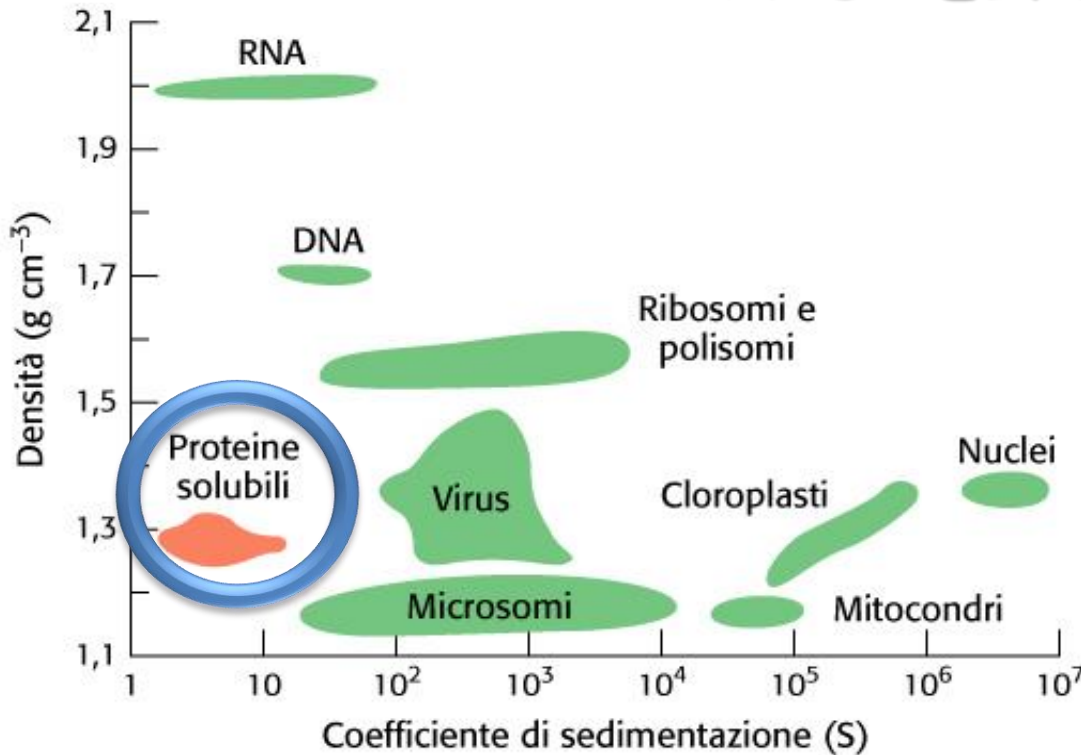


Sedimento
contenente
ribosomi
e grosse macromolecole

Sopranatante
contenente
proteine
solubili

Variano
tempi e
velocità.

CENTRIFUGAZIONE NELLA SEPARAZIONE DI PROTEINE



S dipende da caratteristiche della **particella** e della **soluzione** in studio.

S dipende da:

- **densità**
- **PM**
- **forma**
- **densità soluzione**
- **viscosità soluzione**

$$v = \frac{2R^2(d_e - d_i)g}{9\eta}$$

Proteina

S

PM

(Svedberg)

(kDa)

Inibitore della tripsina

1

6.5

Ribonucleasi A

1.78

13.7

Citocromo C

1.83

12.3

Mioglobina

1.97

17.8

Concanavalina A

3.80

51.3

CENTRIFUGAZIONE

Legge di Stokes

$$v = \frac{2R^2(d_e - d_i)g}{9\eta}$$

v = velocità di sedimentazione;

R = raggio della particella;

d_i = densità del mezzo;

d_e = densità della particella;

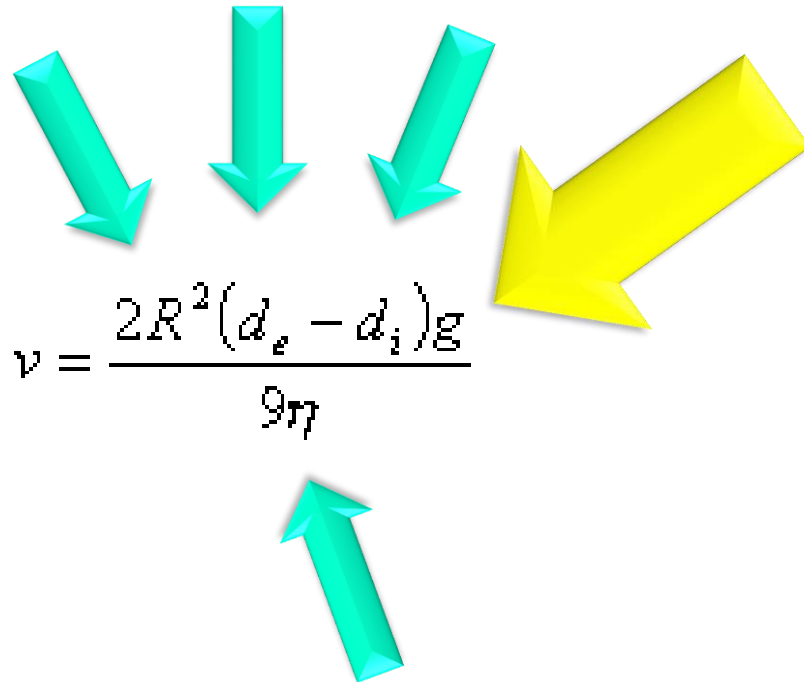
g = accelerazione di gravità;

η = viscosità del mezzo;

$2/9$ = costante di forma per una sfera.

APPLICAZIONE DELLA LEGGE

DOVE POSSO INFLUIRE?
COSA CONTA DI PIU'?

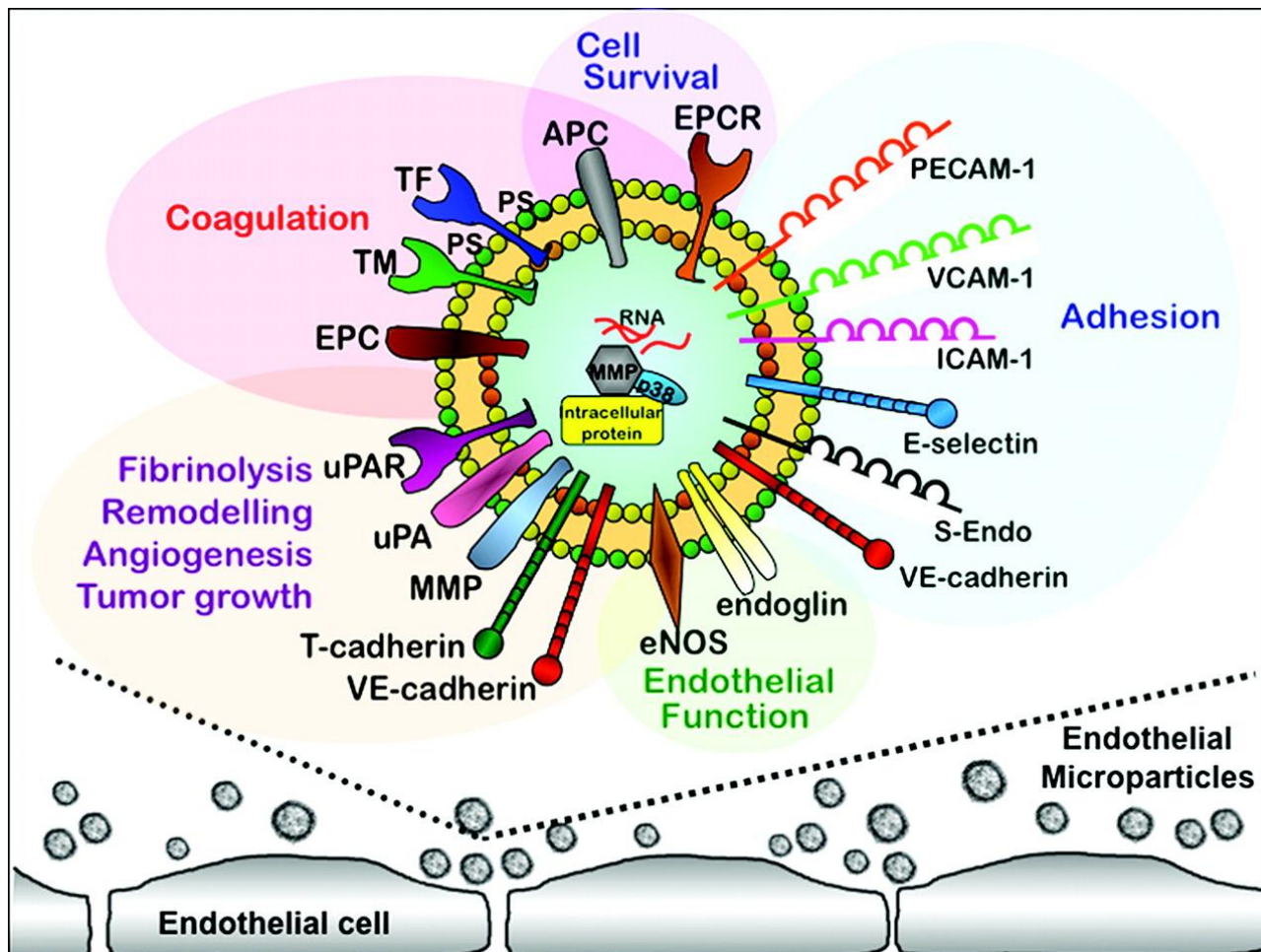


The diagram features the formula $v = \frac{2R^2(d_e - d_i)g}{9\eta}$ centered on the page. Five 3D-style arrows are positioned around the formula: three cyan arrows point downwards towards the terms $2R^2$, $(d_e - d_i)$, and g in the numerator; one cyan arrow points upwards towards the denominator 9η ; and one large yellow arrow points from the right towards the entire formula.

$$v = \frac{2R^2(d_e - d_i)g}{9\eta}$$

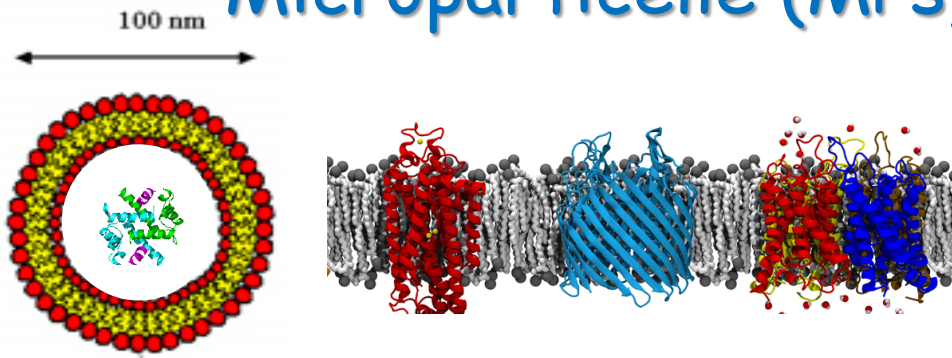
APPLICAZIONE DELLA LEGGE MICROPARTICELLE (MPs)

<http://www.youtube.com/watch?v=BneWaqNynVg>

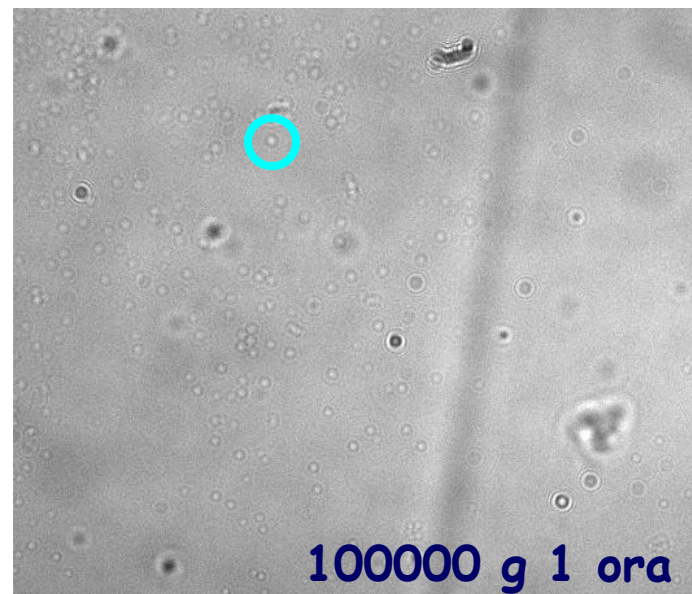
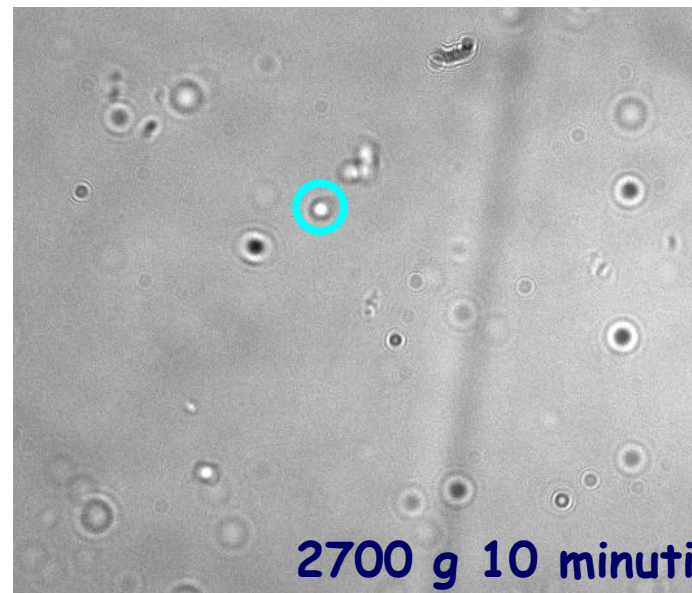


ESEMPI DI CENTRIFUGAZIONI

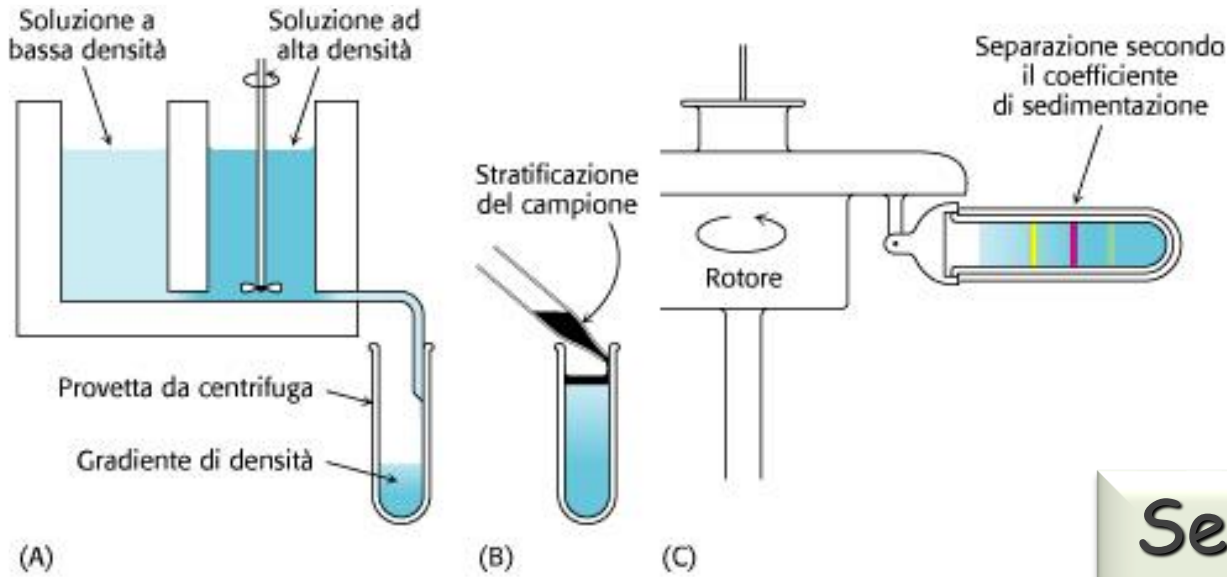
Microparticelle (MPs)



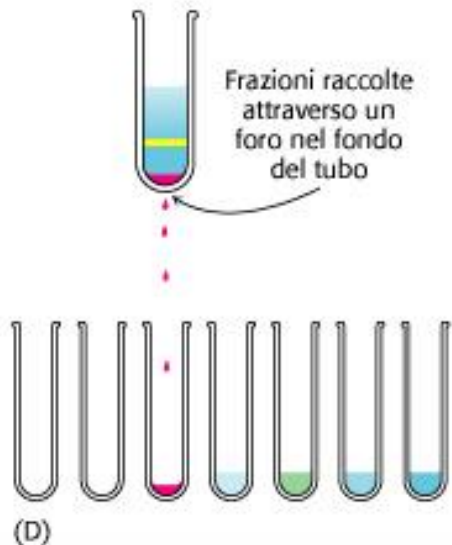
ULTRACENTRIFUGA



CENTRIFUGAZIONE IN GRADIENTE DI DENSITA'



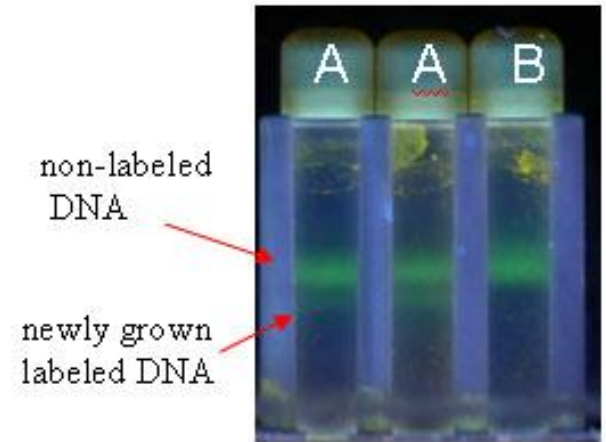
Separazione
isopicnica



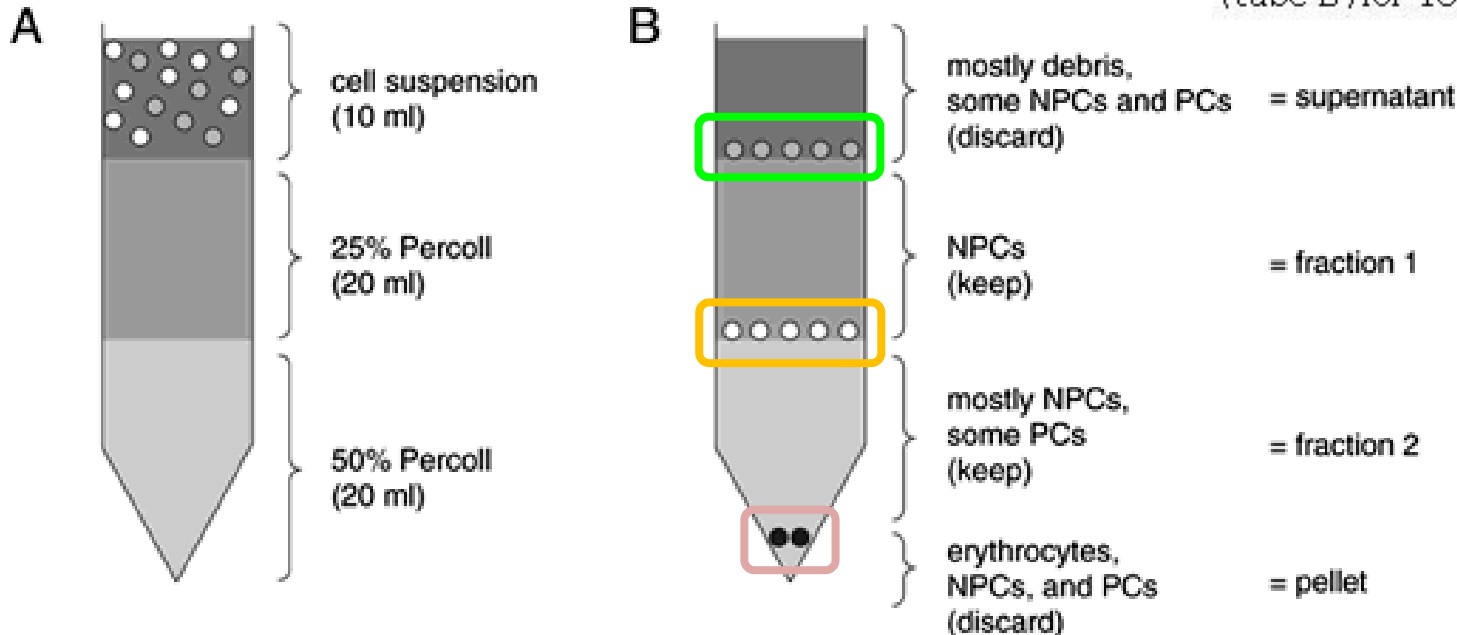
Centrifugazione di una miscela in un **gradiente di densità** di CsCl_2 o saccarosio.

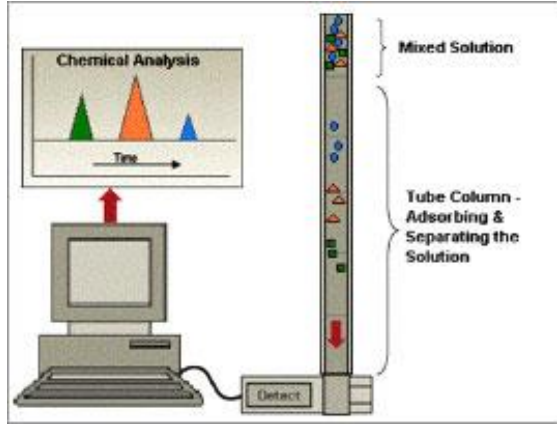
CENTRIFUGAZIONE IN GRADIENTE DI DENSITA'

I campioni sedimentano in zone definite, restando in sospensione.

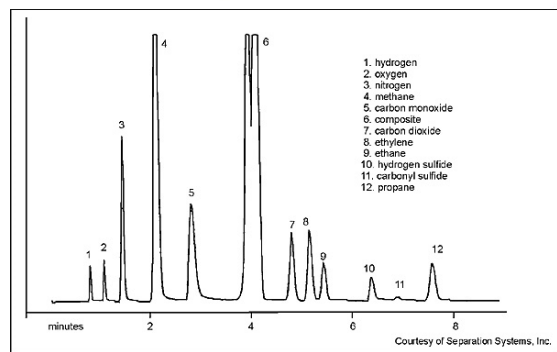


Isopycnic centrifugation of DNA extracted from mixed conifer soil incubated with $H_2^{18}O$ (tubes A) or $H_2^{16}O$ (tube B) for 10 days.





TECNICHE CROMATOGRAFICHE



PRINCIPIO DELLA CROMATOGRAFIA

La cromatografia consiste nello sfruttare la diversa attitudine di ogni molecola o ione nel distribuirsi fra due fasi differenti.

Una fase viene immobilizzata su di un supporto (es. colonna) ed è perciò detta **fase stazionaria**, l'altra viene fatta scorrere sulla prima continuamente: **fase mobile**.



TECNICHE CROMATOGRAFICHE

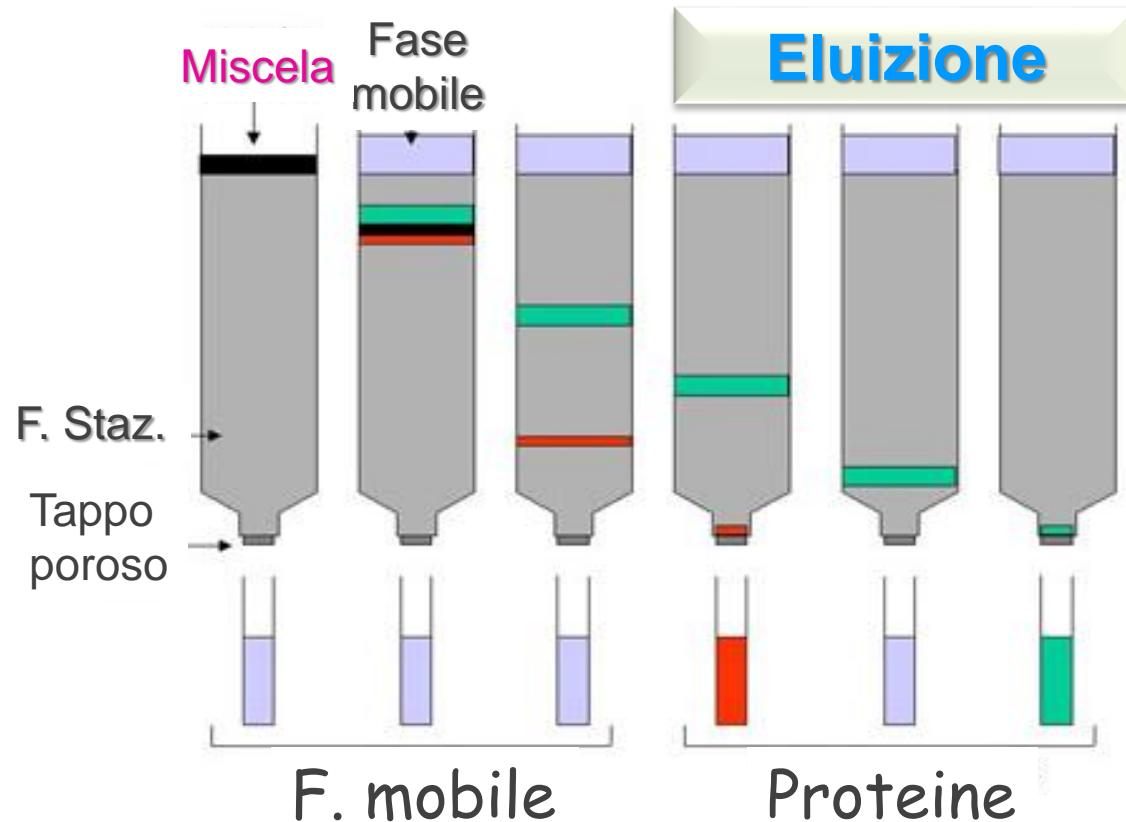
Ogni componente della miscela sarà in **equilibrio** fra 2 fasi



$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

K = coefficiente di distribuzione
(diverso per ogni componente)

Una **miscela di proteine** messa a contatto con le due fasi si separerà sulla base delle diverse affinità di ciascuna proteina per tali fasi.



FINALITA' DELLA CROMATOGRAFIA

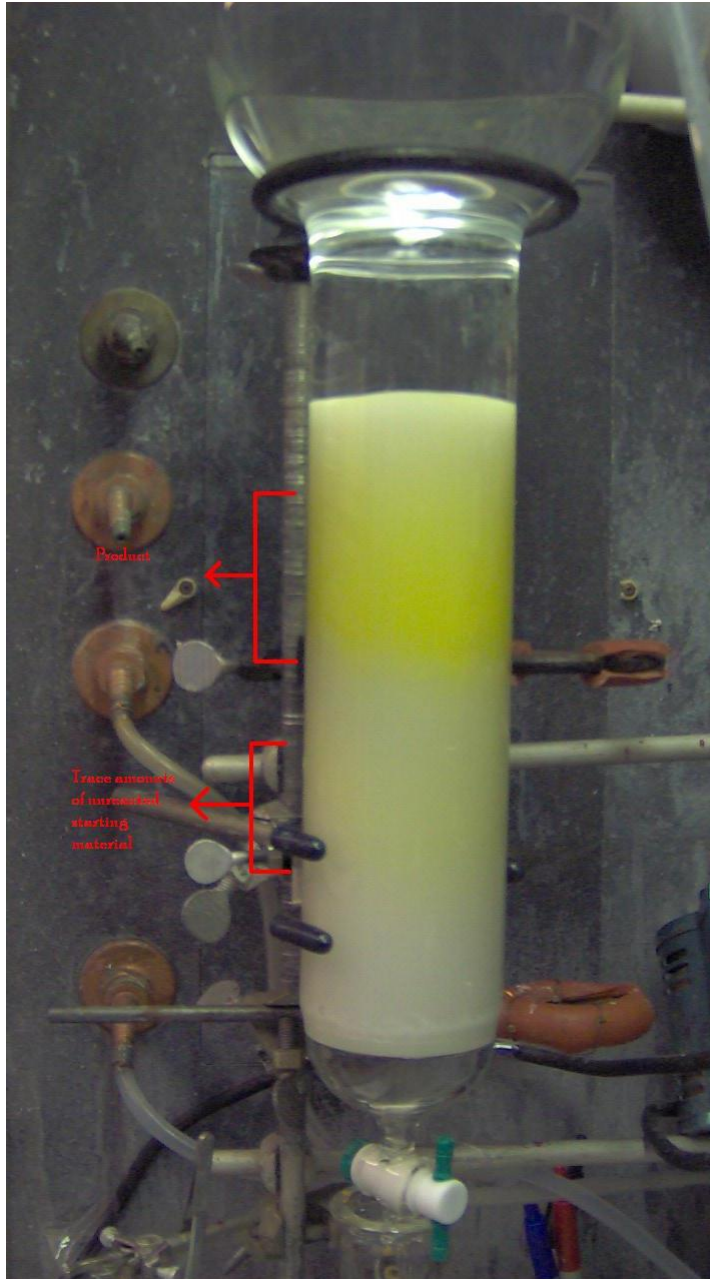
ANALITICA



PREPARATIVA



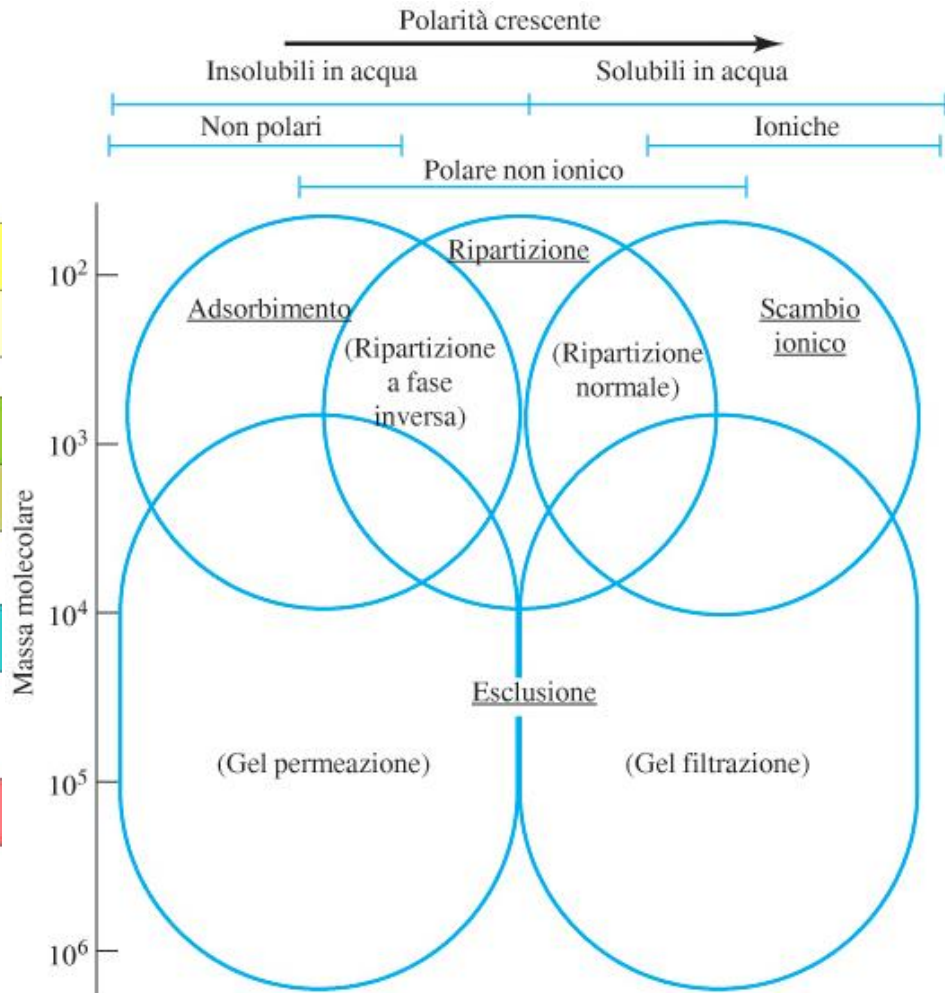
CROMATOGRAFIA SU COLONNA



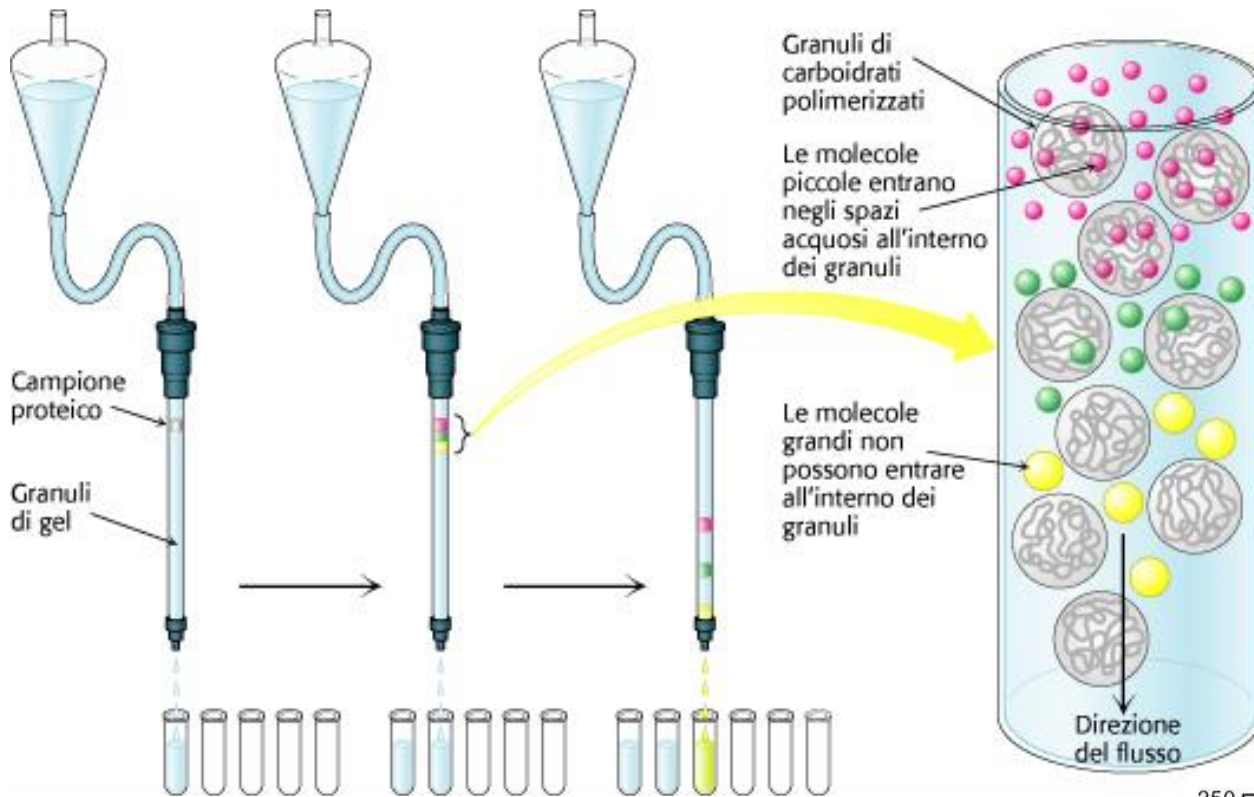
- Colonne (vetro, plastica, metallo)
- Serbatoi (Isocratica o gradiente)
- Pompe (peristaltica o continua)
- Fasi stazionarie
- Fasi mobili
- Rivelatori (spettrofotometro, fluorimetro, rilevatore elettrochimico, a indice di rifrazione)
- Sistemi per raccogliere le frazioni (manuale, semi-automatico, completamente automatico)

CLASSIFICAZIONE

CHROMATOGRAPHIC PRINCIPLE	Physical state of mobile phase	Type of Chromatography
Adsorption Chromatography Competition between a solid adsorbent and mobile phase	Gas	GC / GSC
	Liquid	LC / HPLC TLC / PC
Partition Chromatography Competition between a liquid stationary phase and mobile phase	Gas	GC / GLC SFC
	Liquid	LC / HPLC
Ion Exchange Chromatography Competition between an ion exchange resin stationary phase and liquid mobile phase	Liquid	IEC / IC / HPIC
Permeation Chromatography Competition between a polymer matrix and liquid mobile phase	Liquid	GPC



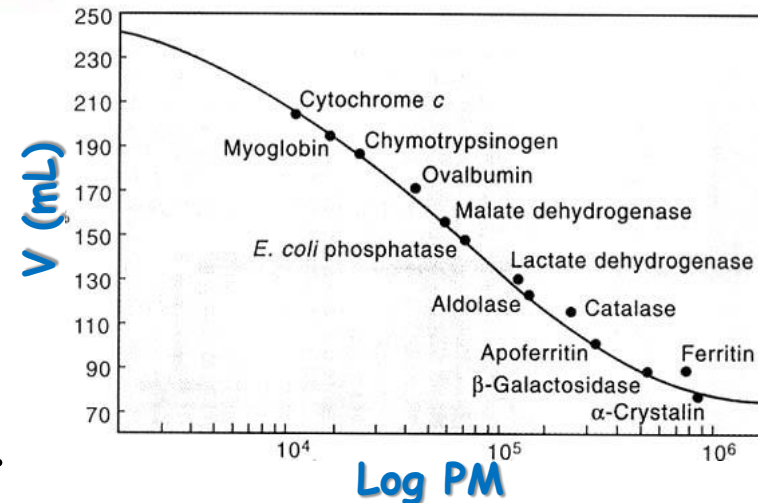
CROMATOGRAFIA PER FILTRAZIONE SU GEL



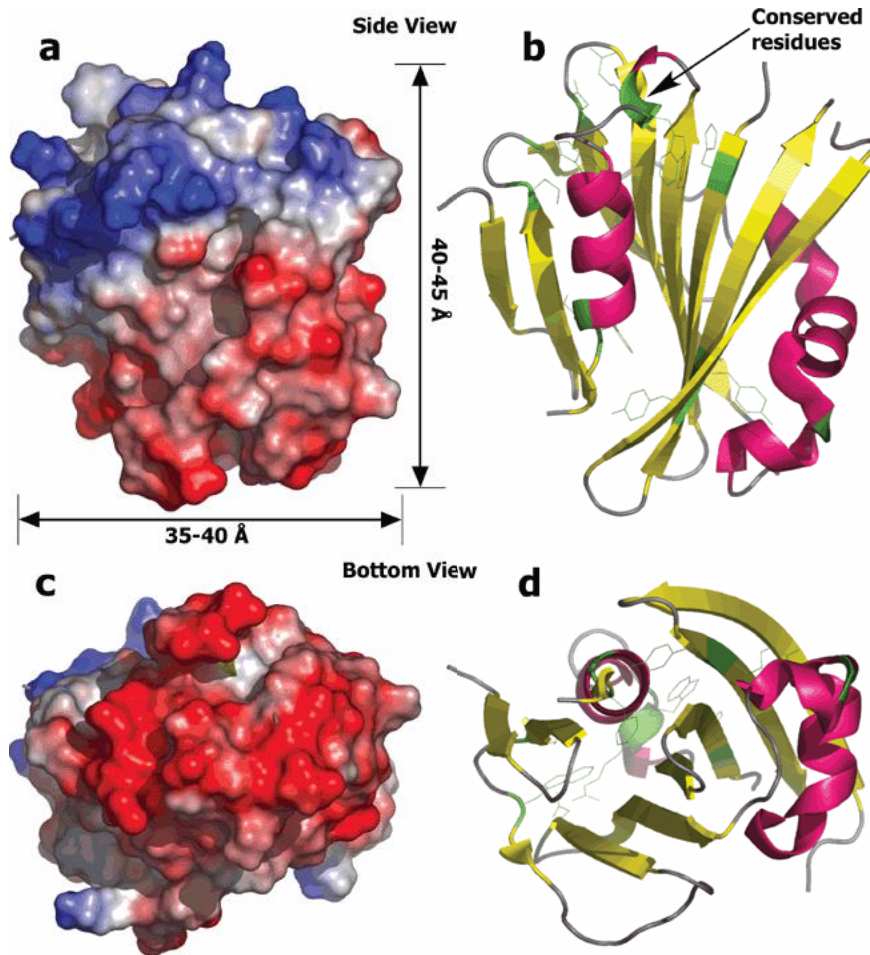
Proprietà sfruttata:
DIMENSIONE
delle proteine.

Separazioni **più nette** rispetto alla DIALISI.

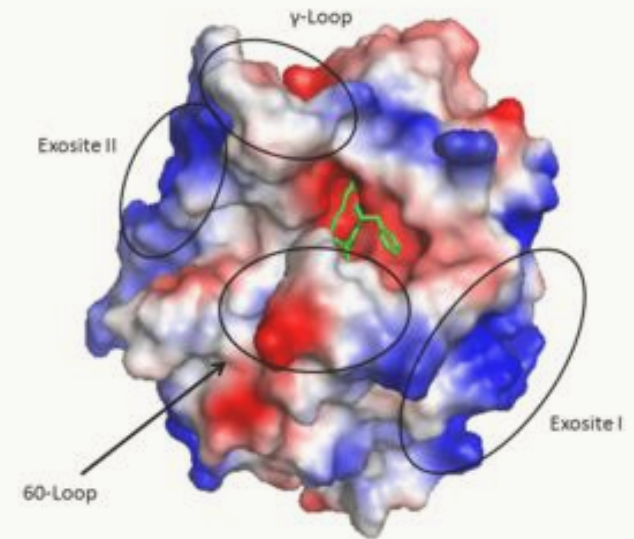
Ordine di uscita dei campioni **opposto** rispetto all'SDS-PAGE.



CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO



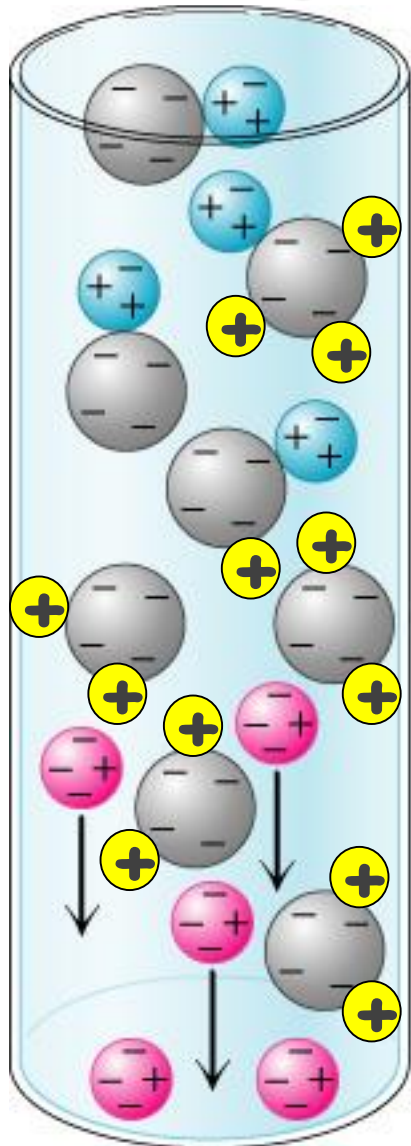
Ogni proteina, a un determinato **pH**, differisce dalle altre per la carica netta e per la distribuzione delle cariche.



Blue positive - White neutral - **Red negative**

PRINCIPIO: ATTRAZIONE FRA PARTICELLE DI CARICA OPPOSTA

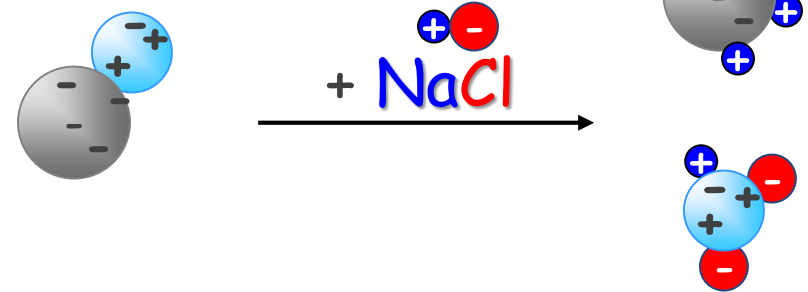
1^a fase: legame



Le proteine cariche positivamente si legano a granuli carichi negativamente
SCALZANDONE I CONTROIONI

Le proteine cariche negativamente passano attraverso la colonna

2^a fase: eluizione



Proprietà sfruttata:
CARICA NETTA
delle proteine.

Separate la molecola di interesse
conoscendone la carica.

ESEMPIO DI CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

Scambiatore di anioni forte:
QAE sephadex (ammine quaternarie).

Da 20 L di medium a
60 mL di purificato!



TRIS	50 mM
NaCl	100 mM
EDTA	5 mM
Benzamidina	10 mM

**EQUILIBRAZIONE
RESINA**

pH 7.5

TRIS	50 mM
EDTA	5 mM
Benzamidina	10 mM
+ CAMPIONE	

**FISSAZIONE
RESINA**

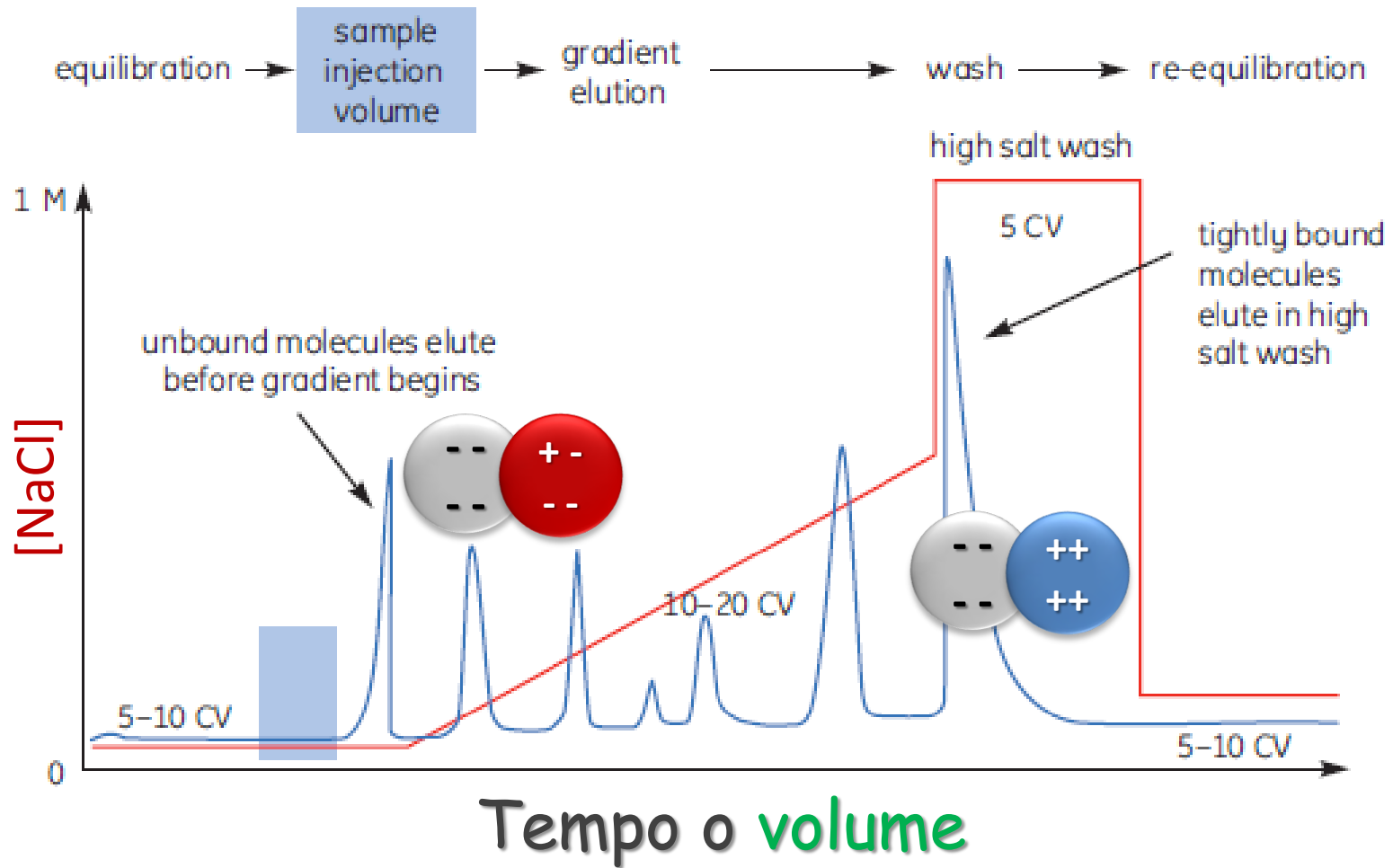
pH 7.5

TRIS	50 mM
NaCl	500 mM
EDTA	5 mM
Benzamidina	10 mM

ELUIZIONE

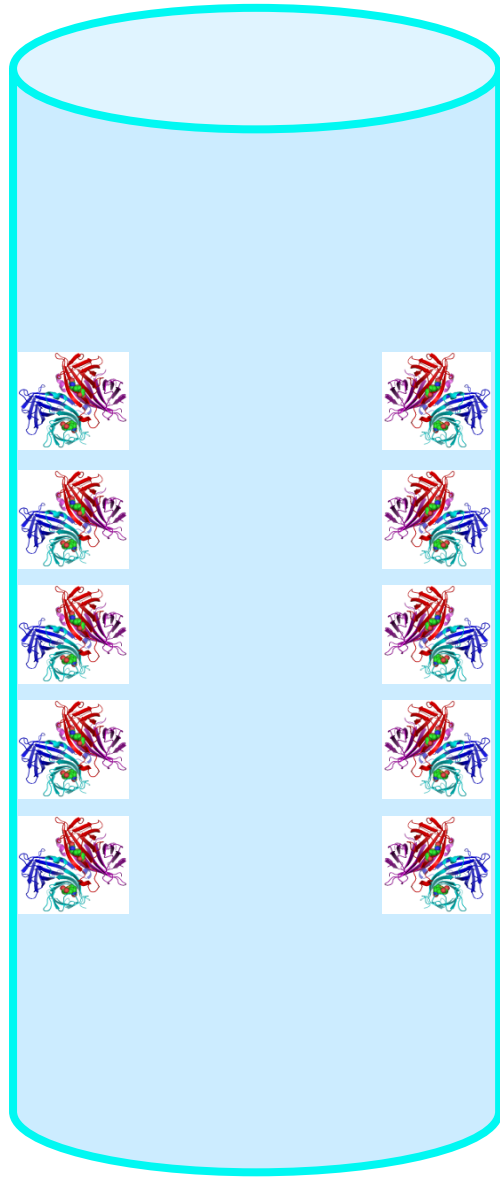
pH 7.5

ELUIZIONE IN GRADIENTE DI CONCENTRAZIONE



Permette di ottenere molteplici frazioni.

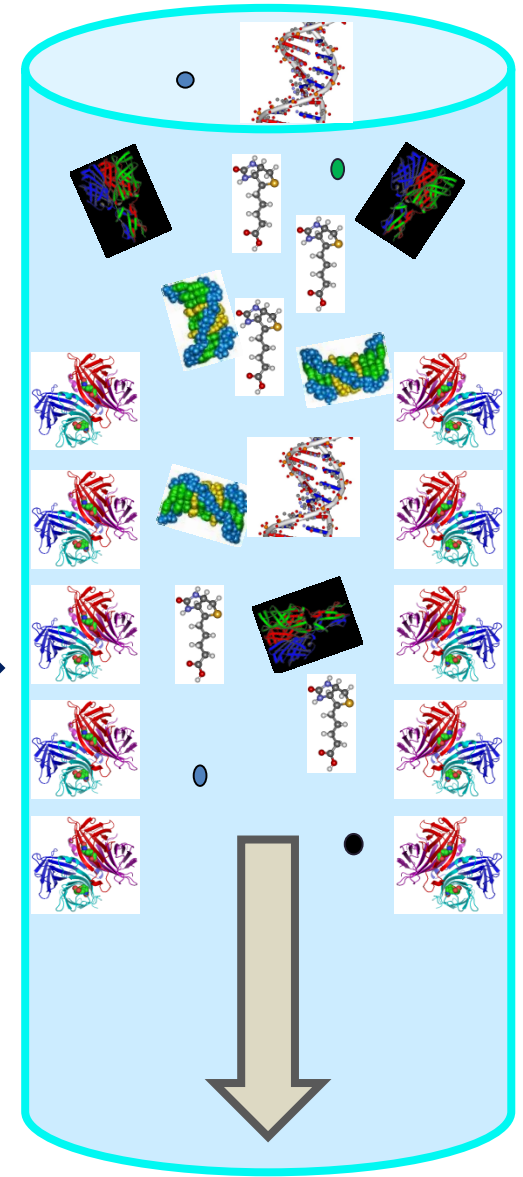
CROMATOGRAFIA PER AFFINITA'



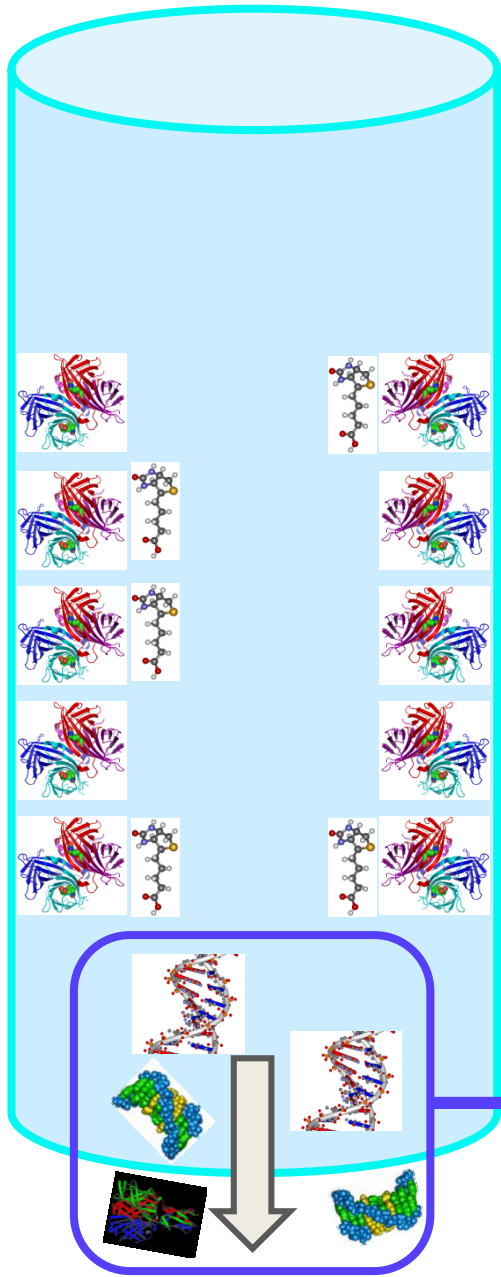
Miscela campione



assieme alla **F. M.**



CROMATOGRAFIA PER AFFINITA'

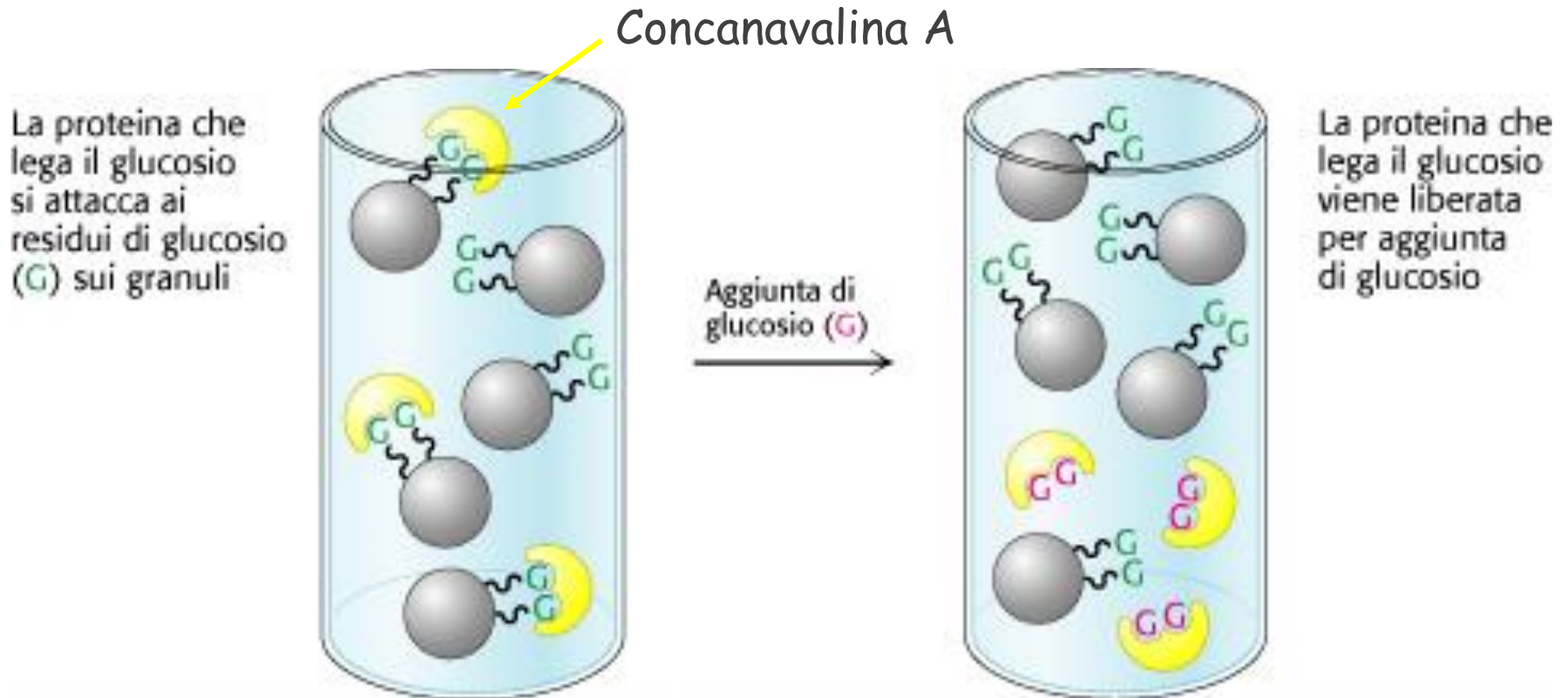


Recupero della molecola di interesse per alterazione delle condizioni di legame.

(pH, temperatura, forza ionica....)

Molecole non affini

ESEMPIO DI CROMATOGRAFIA PER AFFINITA'

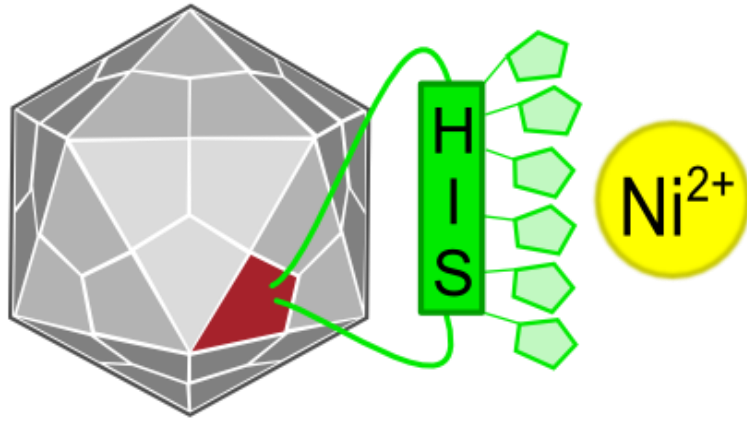


- Legare **covalentemente** un composto ad un supporto solido.
- Addizionare la miscela proteica.
- Lavare con tampone.
- Eluire la proteina desiderata con una elevata concentrazione di composto in forma **solubile**.

Proprietà sfruttata:
**AFFINITA' PER
ALCUNI GRUPPI
CHIMICI.**

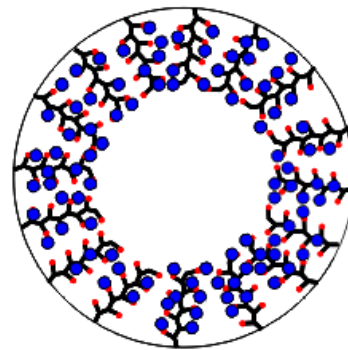
CROMATOGRAFIA PER AFFINITA'

Sistema Poli His-Nichel (His tag)

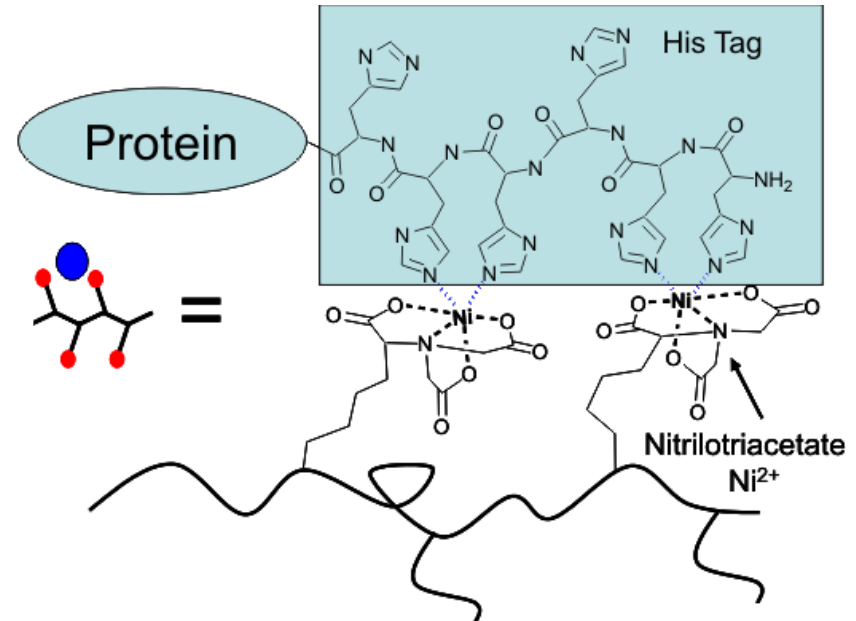


Coda di 6 Istidine

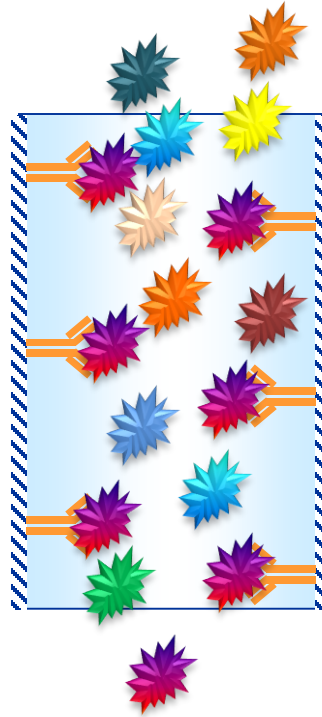
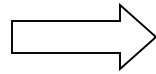
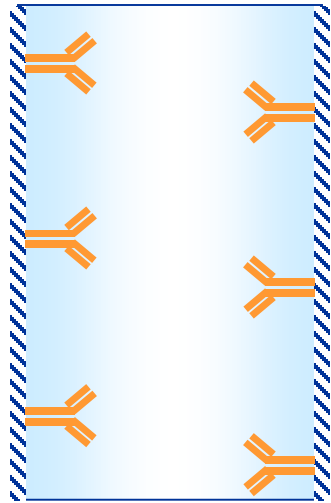
Acido nitrilotriacetico (NTA)
chelante tetradentato dello
ione Ni^{2+}



Brush-modified pore



CROMATOGRAFIA PER IMMUNOAFFINITA'



Vengono
utilizzati
**ANTICORPI
SPECIFICI**



Colonna
cromatografica



Anticorpo
anti-proteina



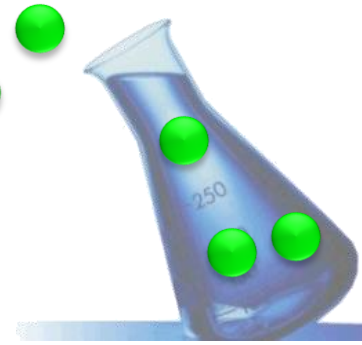
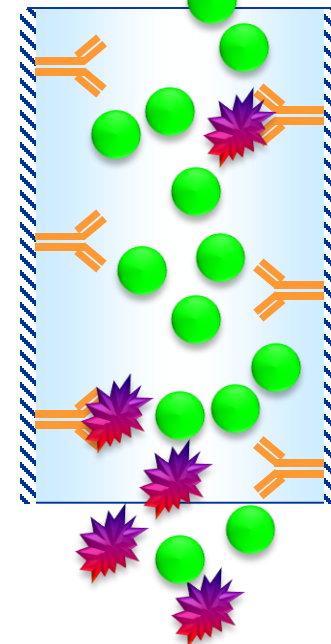
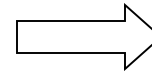
Molecola di interesse



Altre molecole



Eluente

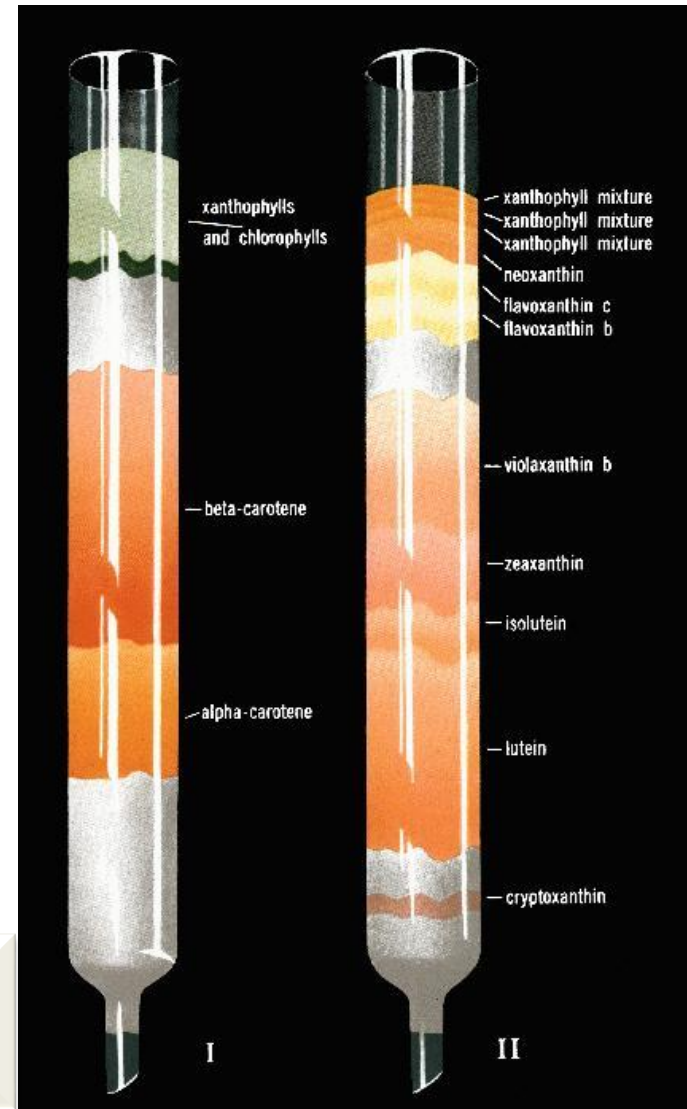


CROMATOGRAFIA DI ADSORBIMENTO

Fase stazionaria **solida, porosa**, sulla cui superficie si instaurano interazioni elettrostatiche deboli (o idrofobiche nell'adsorbimento idrofobico). L'**idrossiapatite** (fosfato di calcio) dà anche scambio ionico.

Fase mobile con polarità **simile** al composto da separare.

Interazione
DIRETTA



ESEMPIO REALE

Parametri monitorati
simultaneamente:

- **Pressione**
- **Conduktività
(salinità)**
- **Assorbimento UV**

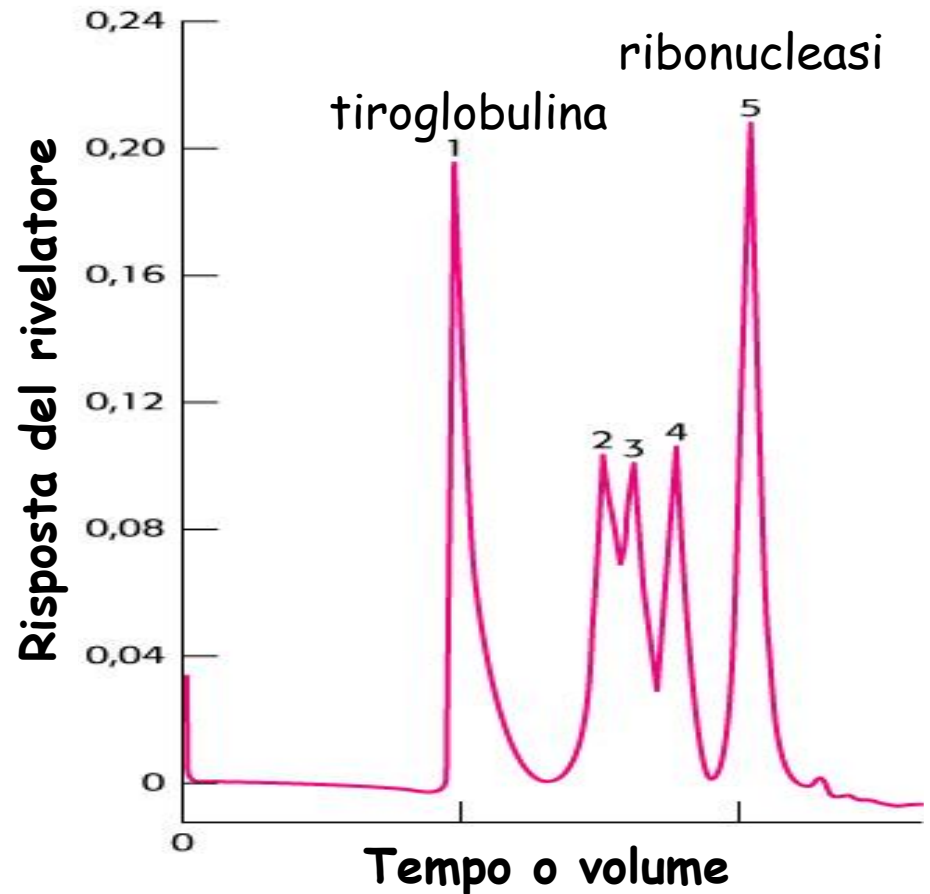
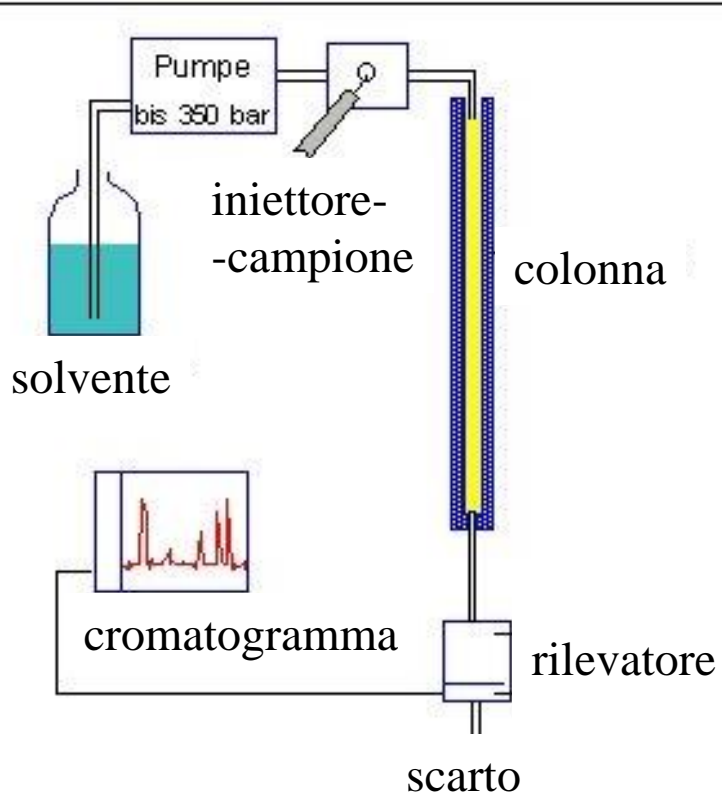


Avete intuito che non
si lavora solo a P_{atm}

CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTE PRESTAZIONI (HPLC)



Evoluzione strumentale delle cromatografie in fase liquida su colonna classica.



PROTOCOLLO PURIFICAZIONE PROTEINE

Day One

Preparazione di
**tutti i
tamponi**

Impaccamento
delle colonne



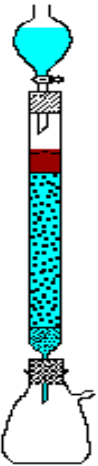
PROTOCOLLO DELLA CR. A SCAMBIO IONICO

Lavaggio: - 1 L di H₂O bidistillata
- 0,5 L NaOH 1M
- 1 L di H₂O bidistillata

2° giorno

Equilibratura: - 0,5 L TBS pH 7,4

Legame: **20 L** di medium + Tris 20 mM + EDTA 2 mM
Flow rate <10 mL/min O/N a 4°C



Lavaggio: 1 L TBS pH 7,4

Eluizione: 0,5 L TBS + NaCl 750 mM pH 7,4

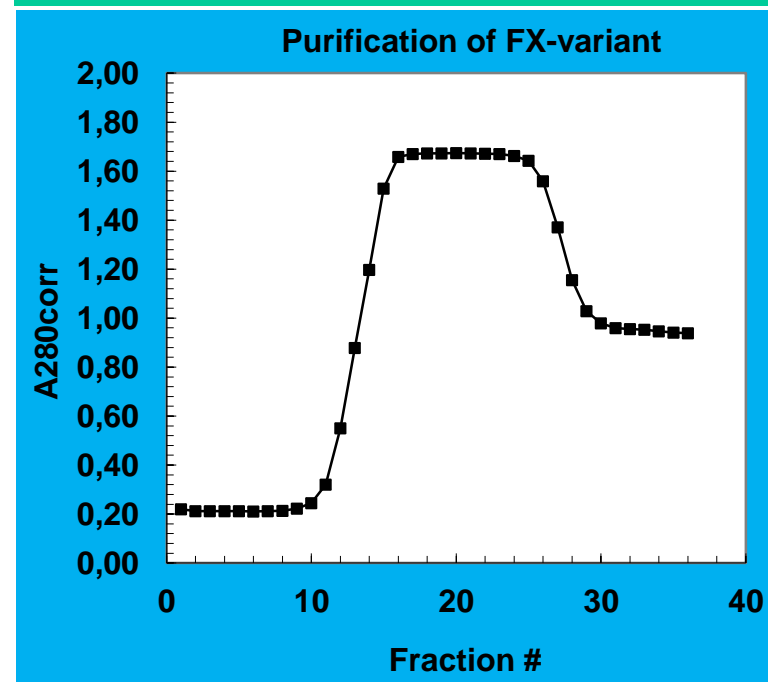
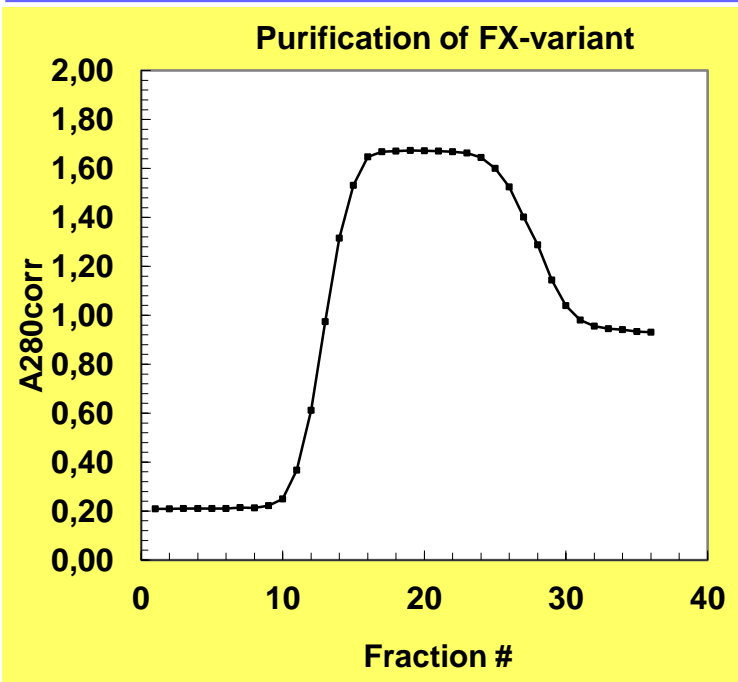
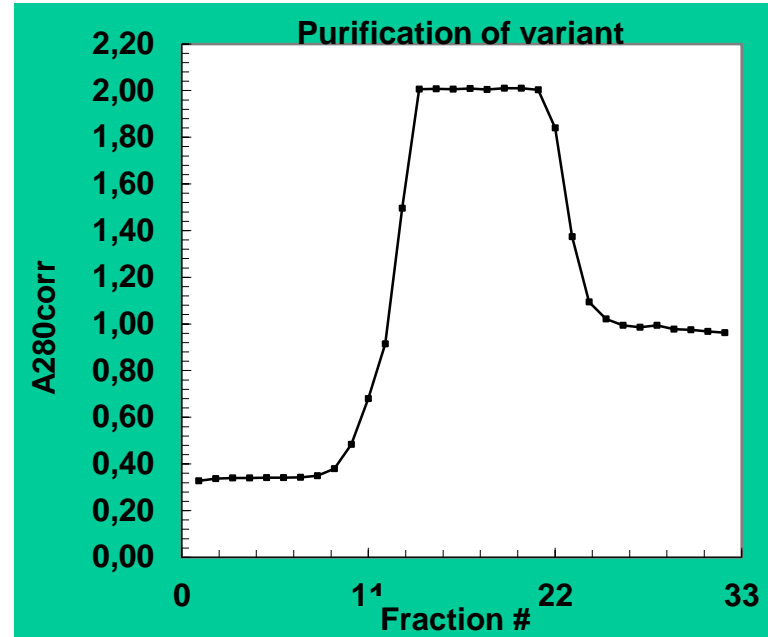
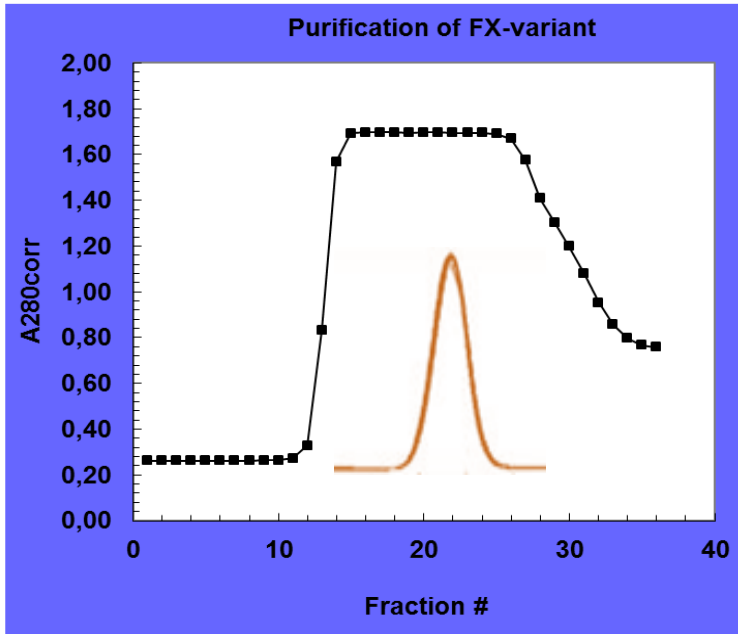
Aggiunta EDTA 5 mM e Benzamidina 10 mM

DIALISI O/N in 20 L di Tris 8 mM + NaCl 60 mM
pH 7,4

3° giorno



LETTURA A 280 nm DELLE FRAZIONI



PROTOCOLLO DELLA IMMUNOAFFINITA'

- Lavaggio:
- 0,5 L di Tris 8 mM + **NaCl 2M**, pH 7,4
 - 0,5 L di Tris 8 mM + NaCl 60 mM, pH 7,4
 - 0,5 L di Tris 8 mM + **EDTA 25 mM**, pH 7,4
 - 0,5 L di Tris 8 mM + **CaCl₂ 2 mM**, pH 7,4

4° giorno

Legame 1: Purificato dializzato, flow rate lento

Lavaggio: 0,5 L di Tris 8 mM + **CaCl₂ 2 mM**, pH 7,4

Eluizione 2: 0,5 L Tris 8 mM + **EDTA 8 mM** pH 7,4

Lavaggio: 0,5 L di Tris 8 mM + **CaCl₂ 2 mM**, pH 7,4

Legame 2: Si ripassa il flow-through

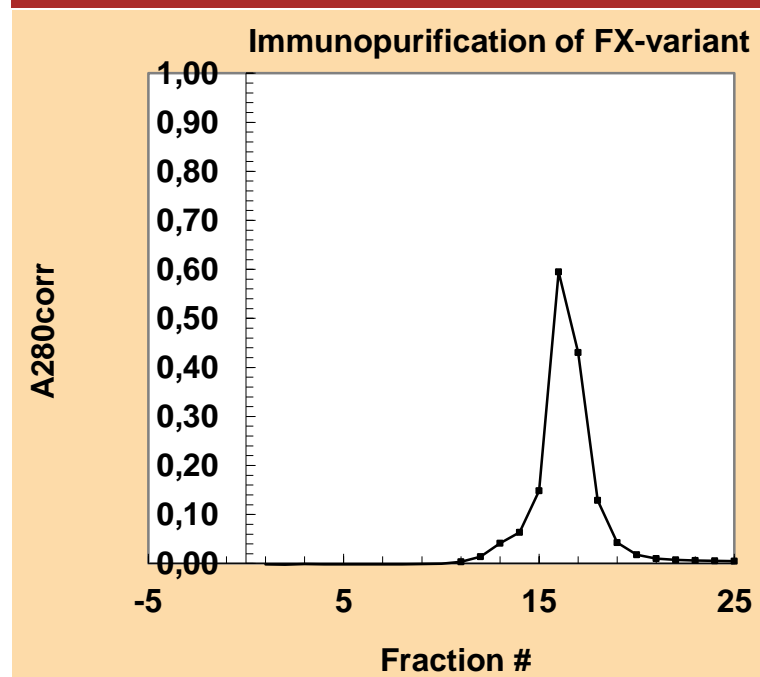
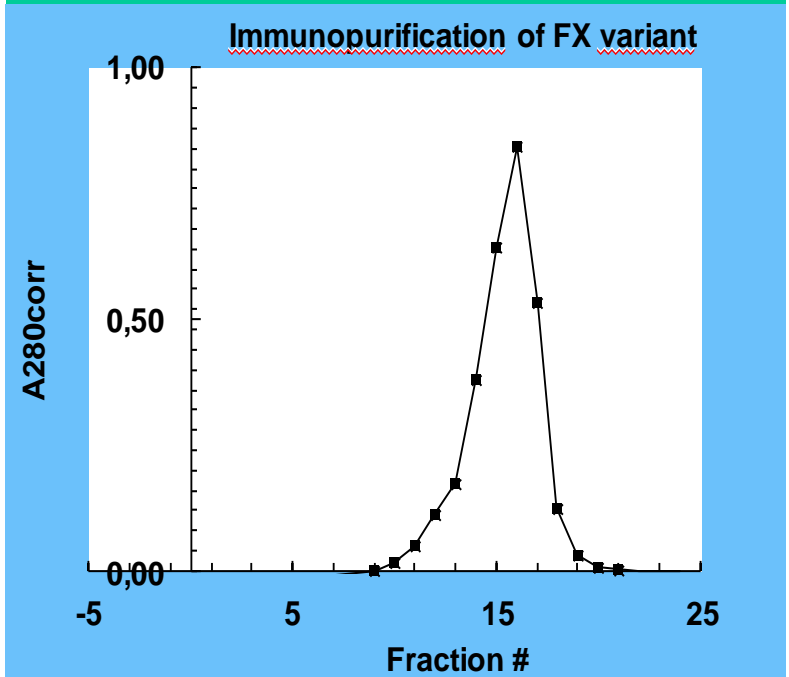
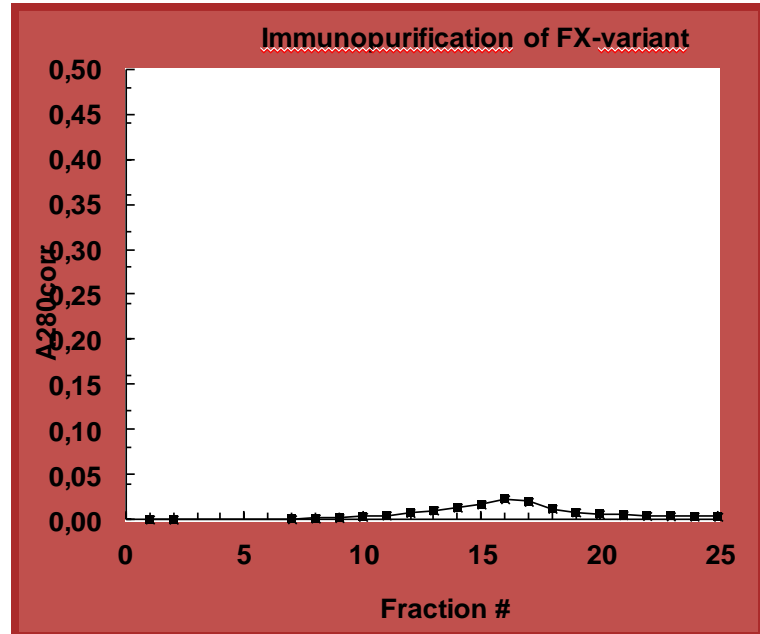
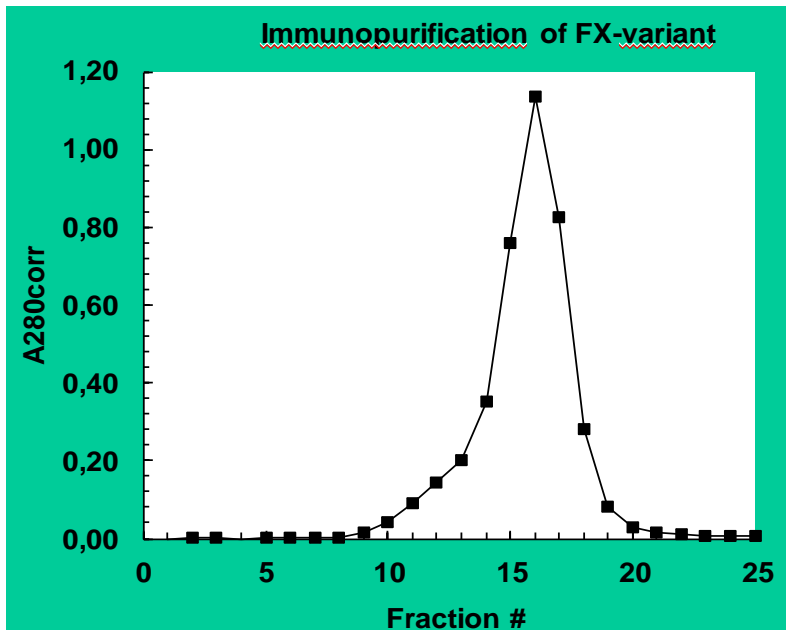
Lavaggio: 0,5 L di Tris 8 mM + **CaCl₂ 2 mM**, pH 7,4

Eluizione 2: 0,5 L Tris 8 mM + **EDTA 8 mM** pH 7,4

Lavaggio: 0,5 L di Tris 8 mM + **CaCl₂ 2 mM**, pH 7,4

DIALISI O/N in 20 L di Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ 1 mM

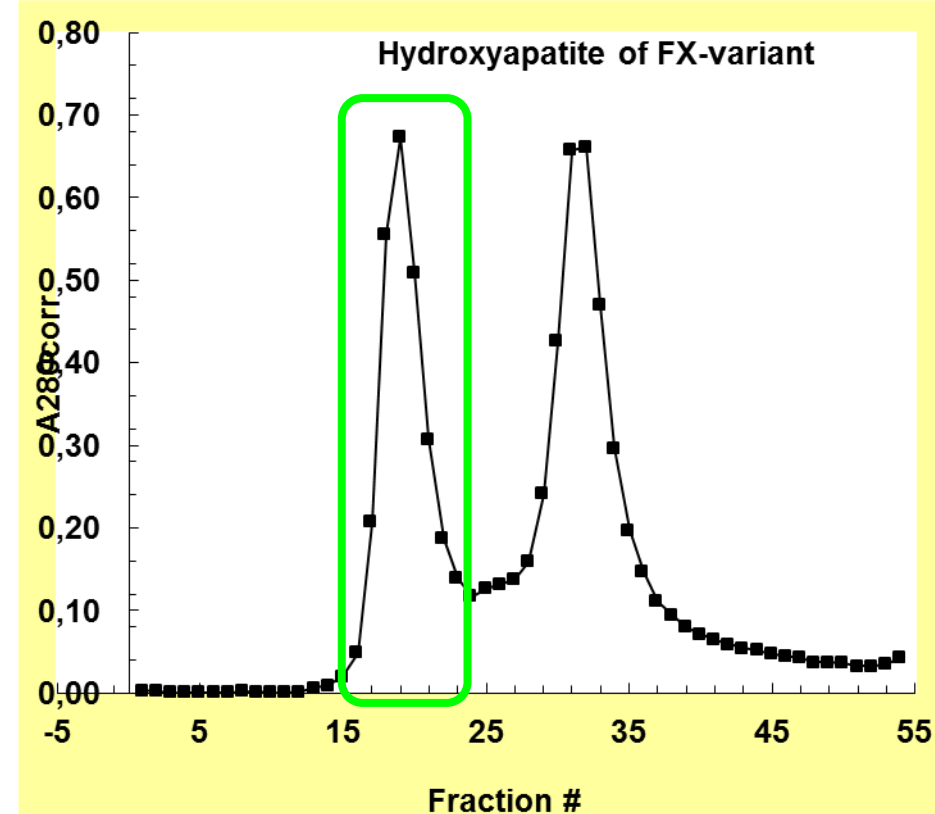
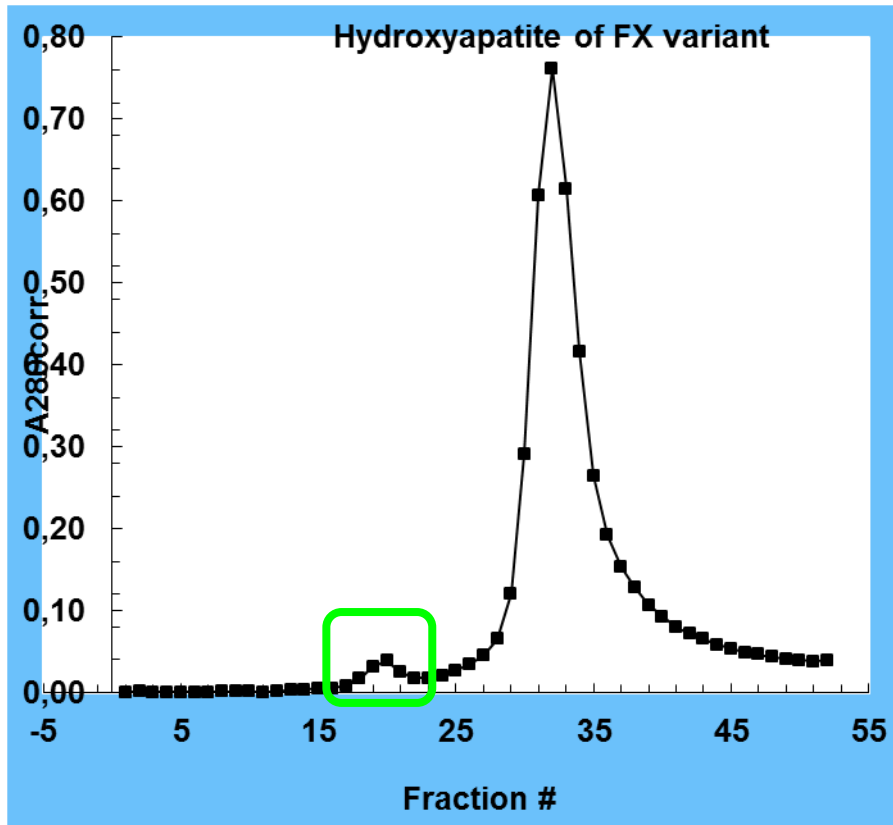
LETTURA A 280 nm DELLE FRAZIONI



PURIFICAZIONE PER ADSORBIMENTO

5° giorno

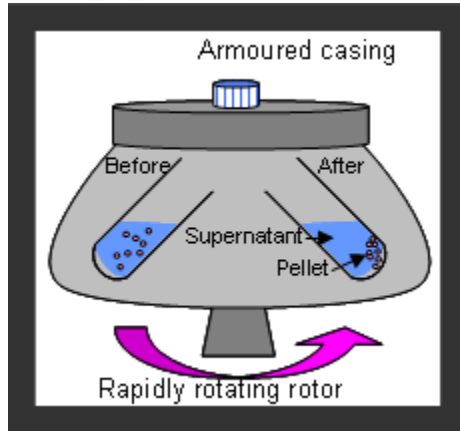
Letture a 280 nm delle frazioni.



ULTIME FASI

6°-7° giorno

Aggiunta di Ammonio Persolfato (0,516 g/mL)



Centrifugazione a 10000 g, 30 min, 4°C.

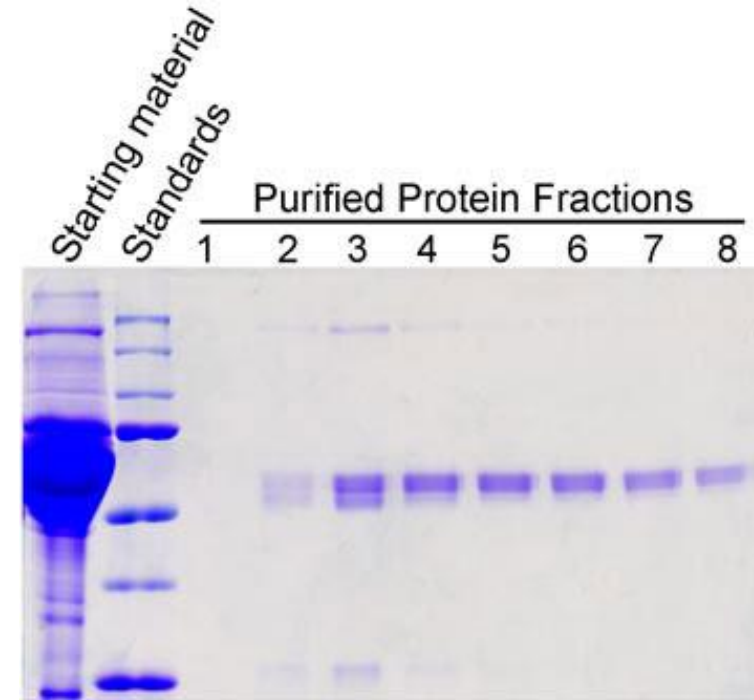
Risospensione in **glicerolo 50%**

Misura dell'**A_{280 nm}**

SDS-PAGE

Colorazione di **Coomassie**

Conservazione a -20°C

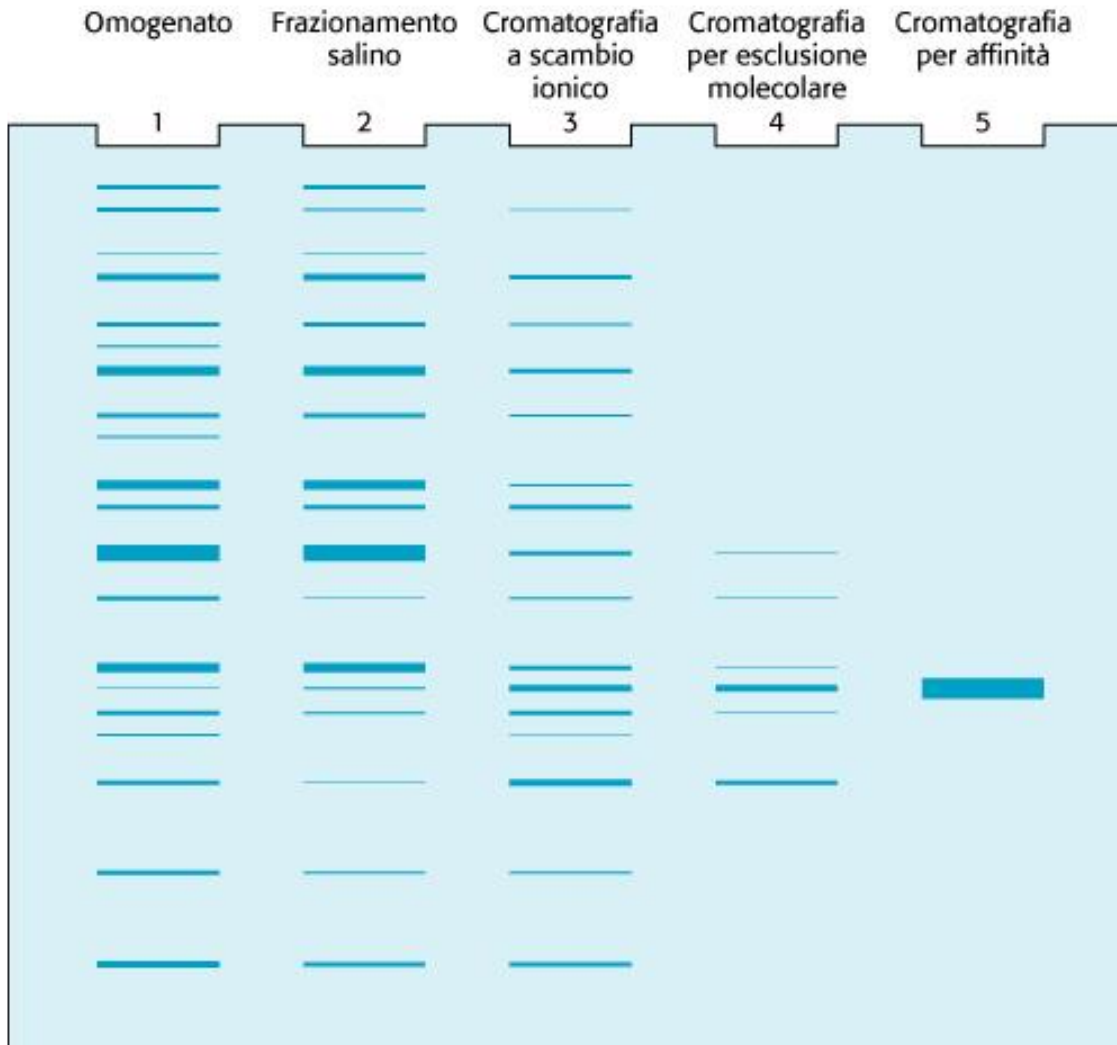


Confronto tecniche di separazione

Campione di partenza: **la cellula**.

Distruggendo la membrana cellulare si ottiene

l'omogenato.



SDS-PAGE

Ogni pozzetto è stato caricato con **50 ug** di campione.

Sarà l'**utilizzo finale** della proteina a decidere la purezza richiesta.

ATTIVITA' SPECIFICA

Durante le fasi di purificazione occorrono **2 tests**:

- valutare se la proteina possiede la propria **attività** biologica (specifico, sensibile, rapido, riproducibile).
- valutare la **quantità** di proteina ottenuta.

$$\text{Attività specifica} = \frac{\text{Attività}}{\text{Quantità di proteina}}$$

In un processo di purificazione si cerca di massimizzare l'attività specifica.

PURIFICAZIONE DI UNA PROTEINA

Non vi è a priori una tecnica migliore di un'altra.

Bisogna valutare:

- quanto **puro** deve essere il prodotto finale,
- **quanta** proteina mi occorra alla fine,
- se mi interessa la forma **attiva/conformazione nativa** oppure no,
- quanto **lavoro/tempo** richiede il metodo,
- il **rapporto resa/costo** del metodo,
- **fallibilità** del metodo.