

TECNICHE DI SEPARAZIONE DELLE PROTEINE

Le proteine sono purificate con ***procedure di frazionamento***



Eliminazione selettiva di tutti gli altri componenti della miscela
alla fine resta soltanto la sostanza di interesse

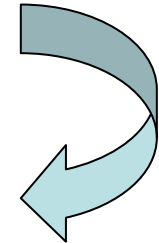
Caratteristiche delle proteine utilizzate per la purificazione :

- **La solubilità** → Precipitazione Frazionata
- **La carica ionica** → Elettroforesi
→ Elettrofocalizzazione
- **Le dimensioni molecolari** → Dialisi
→ Cromatografia per filtrazione e
per esclusione molecolare
- **la specificità di legame con altre molecole** → Cromatografia
per affinità

La **Solubilità delle proteine** dipende da:

- Concentrazione di Sali disciolti
- Polarità del solvente
- pH e temperatura

Alcune o tutte di tali variabili
se modificate



Precipitazione selettiva di certe proteine
lasciandone in soluzione altre

Una proteina contiene molti gruppi carichi e l'attrazione elettrostatica fra gruppi **tende a formare agglomerati colloidali**



Precipitazione

A un **determinato pH** passano in soluzione:



Gli a.a. hanno cariche uguali (**$-\text{OOC}-\text{C}-\text{NH}_2$**)

Le molecole con cariche simili si respingono

Non c'è agglomerazione e precipitazione



massima solubilità

- **A bassa concentrazione ionica**, la solubilità di una proteina aumenta se alla soluzione viene aggiunto un sale, fenomeno detto **salting in**:

L'aggiunta di sali produce un mascheramento dei gruppi carichi della proteina



diminuzione delle forze di attrazione fra le molecole proteiche

- **Ad elevate concentrazioni di sale** la solubilità diminuisce: **salting out**

competizione tra gli ioni del sale e gli altri ioni in soluzione



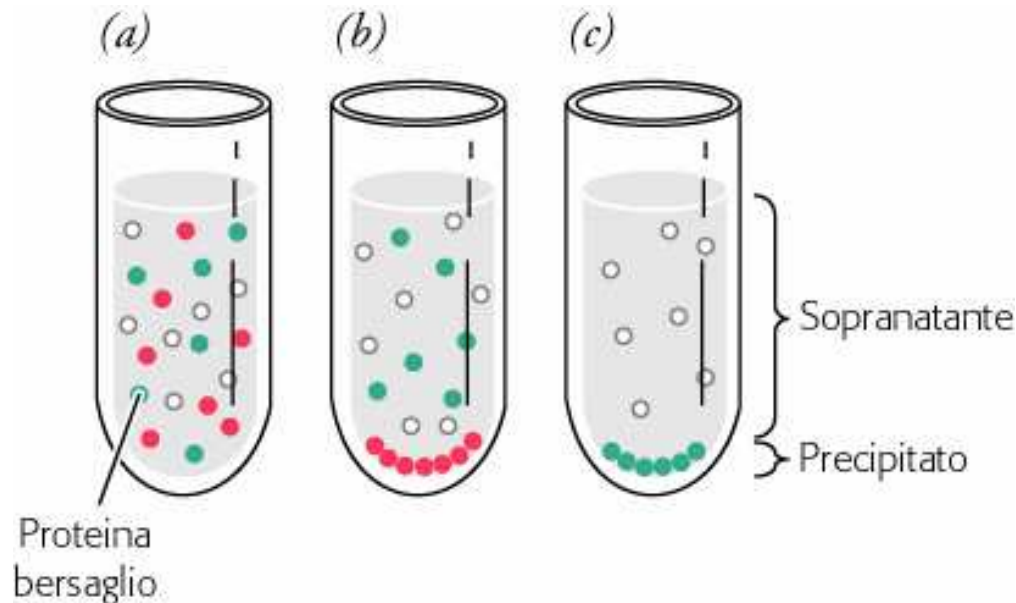
Le molecole di sale rimuovono l'H₂O di idratazione con conseguente precipitazione delle proteine

Le proteine precipitano a concentrazioni di sale differenti

Le proteine precipitate mantengono di solito la loro conformazione e possono essere nuovamente solubilizzate

il salting out è la base di una delle procedure di purificazione

la Precipitazione frazionata



Il sale è di solito l'ammonio solfato, molto solubile e si usa ad una concentrazione poco inferiore di quella richiesta a fare precipitare la proteina di interesse.

Il pH vicino al PI della proteina da purificare, la proteina diventa meno solubile quando la sua carica netta è 0



- I^A Precipitazione di proteine che vengono allontanate (filtrazione o centrifugazione)
- Aumento ulteriore del sale



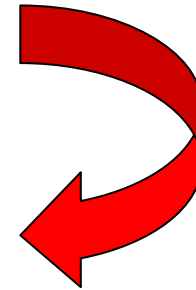
Precipitazione della proteina bersaglio

CROMATOGRAFIA

Una miscela di sostanze da separare è sciolta in un liquido (**Fase mobile**) e viene fatta percolare attraverso una colonna contenente una sostanza solida e porosa (**Fase stazionaria**)

I soluti mentre fluiscono lungo la colonna interagiscono con la fase stazionaria e vengono rallentati

diversa velocità di migrazione



La **cromatografia a scambio ionico**

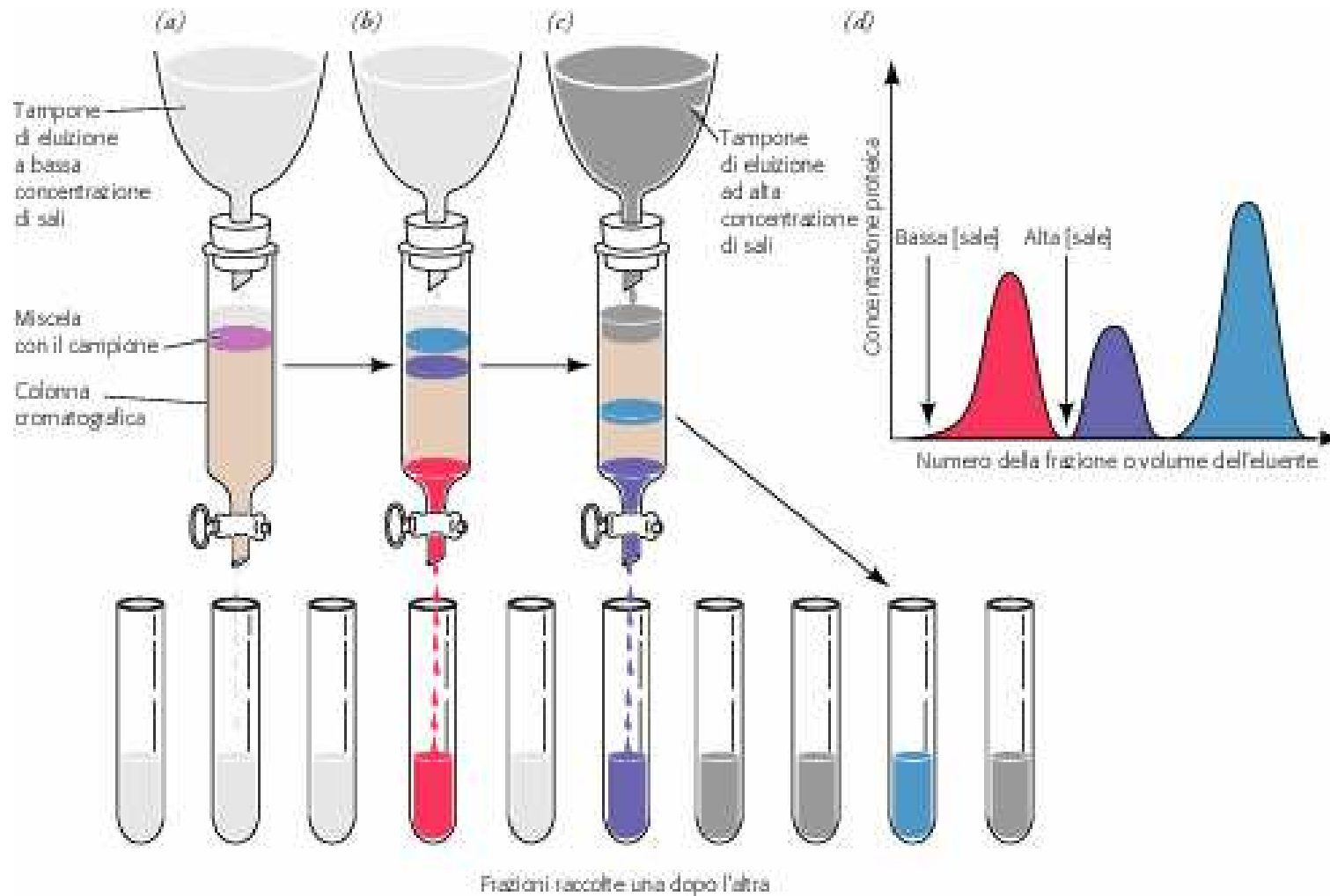
diversa affinità del legame di una certa proteina per la fase stazionaria e dipende:

1. dalla presenza di altri *ioni* in grado di competere con essa per il legame
2. dal *pH* della soluzione che influenza la carica della proteina

La matrice solida è costituita da ***resine con gruppi caricati diversamente***:

- **DEAE** \longrightarrow scambiatori di anioni
ha gruppi cationici (+) a cui si legano gli anioni
- **Resine CM** \longrightarrow scambiatori di cationi
hanno gruppo carbossimetilico $\text{CH}_3\text{-COO}^-$ (-)
a cui si legano i cationi della soluzione


CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

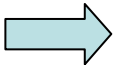


La concentrazione delle proteine nelle frazioni viene misurata con spettroscopio di Assorbimento a 280nm

Tutte le proteine assorbono luce a questa λ

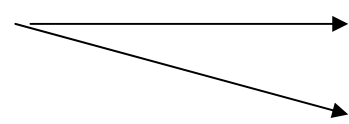
Le proteine da separare vengono sciolte in opportuno tampone con pH e concentrazione salina adeguati allo scopo

- La soluzione viene fatta percolare lungo la colonna
  legame di alcuni ioni con le cariche della resina
- Lavaggio con tampone

le proteine con bassa affinità per lo scambiatore hanno una
 *maggiore velocità di migrazione rispetto alle proteine a*
maggiore affinità

- L'effluente viene raccolto in frazioni
- Le proteine legate + saldamente

vengono eluite

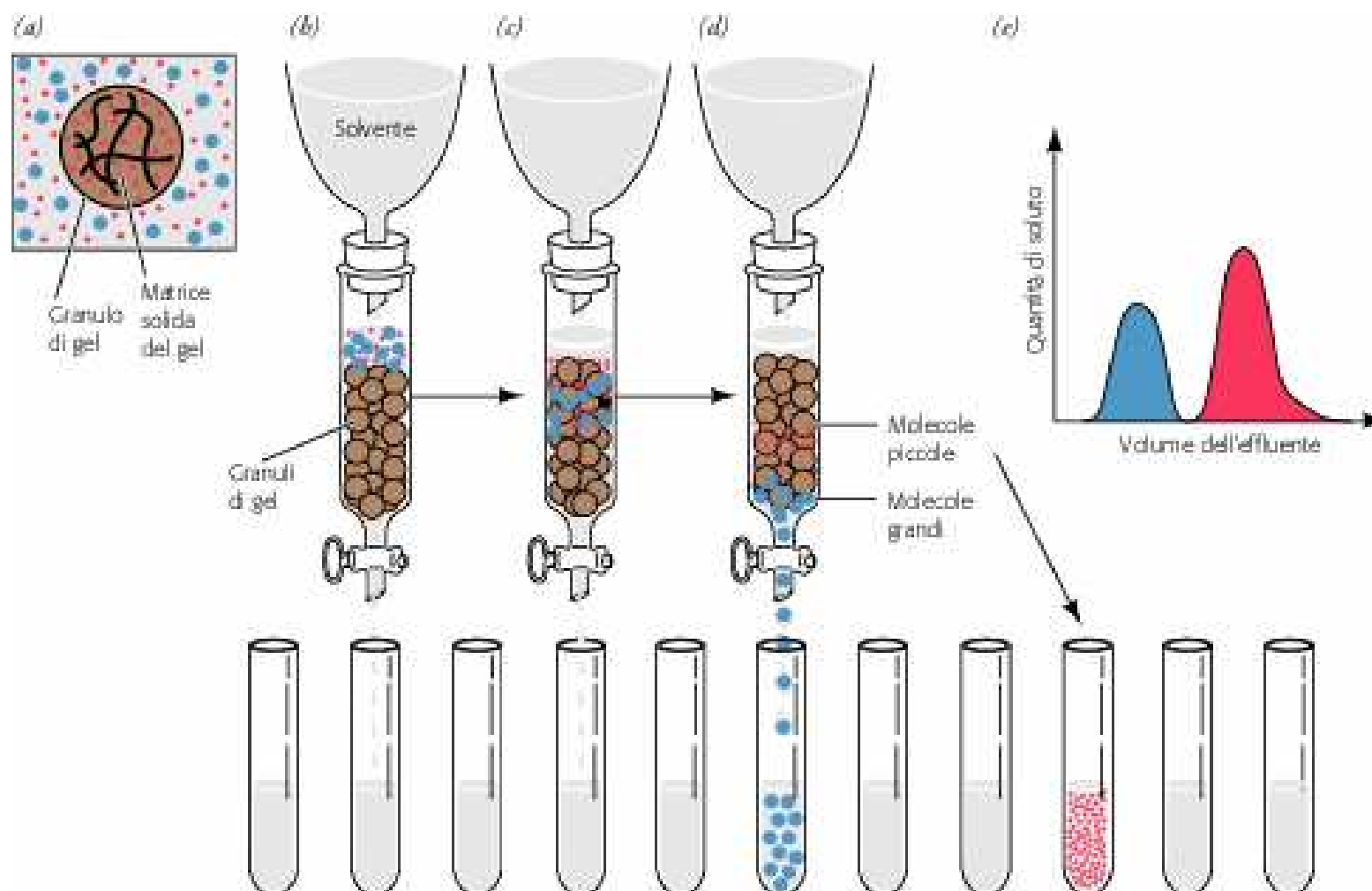


Aumentando la concentrazione di Sali

Variando il pH (pH=PI) in modo che

diminuisca l'affinità della proteina per la matrice

Cromatografia per esclusione molecolare (gel filtrazione)



La cromatografia per esclusione molecolare (gel filtrazione)

separa le molecole in base alla loro dimensione e forma

La colonna contiene un polimero con legami trasversali che formano
pori di un determinato diametro:



Le *proteine + grandi* dei pori migreranno + velocemente

Le *proteine + piccole* entrano nei pori e vengono rallentate

Le molecole + piccole richiedono un volume di solvente maggiore
per essere eluite

Cromatografia per affinità lega le proteine in base alla *specificità di legame*



Le proteine trattenute sulla resina sono quelle che riconoscono **il ligando** presente sul supporto solido e vengono immobilizzate.

Le altre sono allontanate dal flusso della soluzione

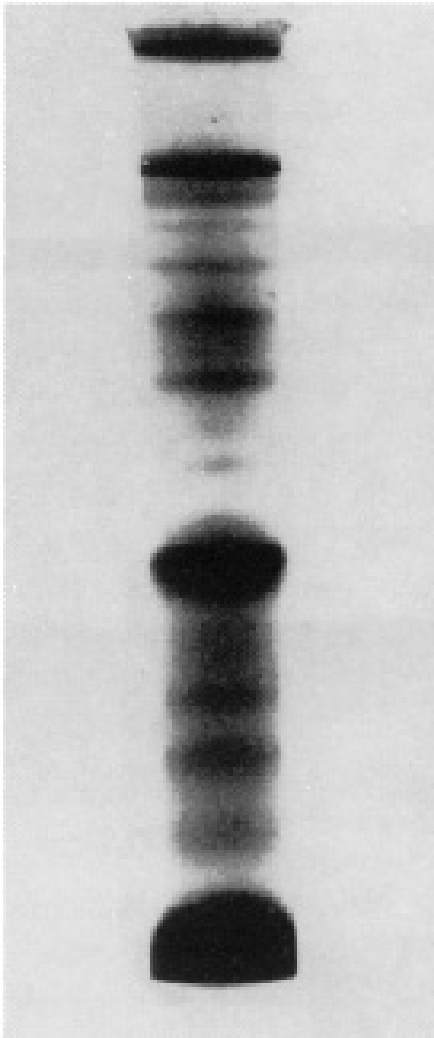
Le proteine rimaste sulla colonna

vengono recuperate mediante eluizione con una soluzione concentrata di ligande libero

Tale metodica, rispetto alle precedenti che si basano su piccole differenze nelle proprietà chimico-fisiche, utilizza una specifica proprietà della proteina da purificare

Ligando = gruppi o molecole che si legano a siti specifici

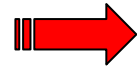
L'ELETTROFORESI è la *migrazione di ioni in un campo elettrico*
su gel di poliacrilammide o di agarosio con pori di dimensioni appropriate




La separazione molecolare avviene :

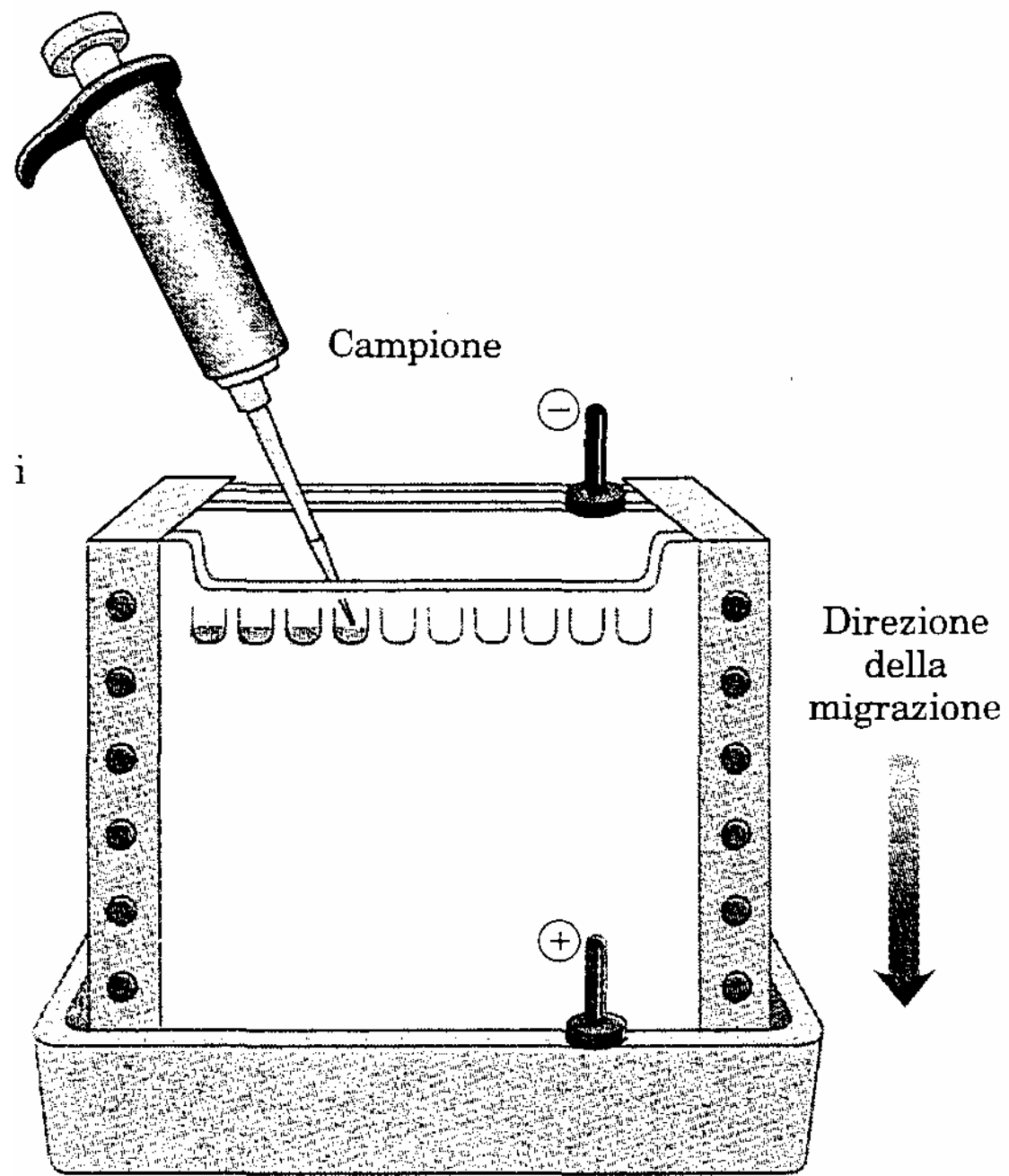
- In base alla differenza nelle dimensioni
- In base alla diversa mobilità elettroforetica

Il gel ha un pH = 9

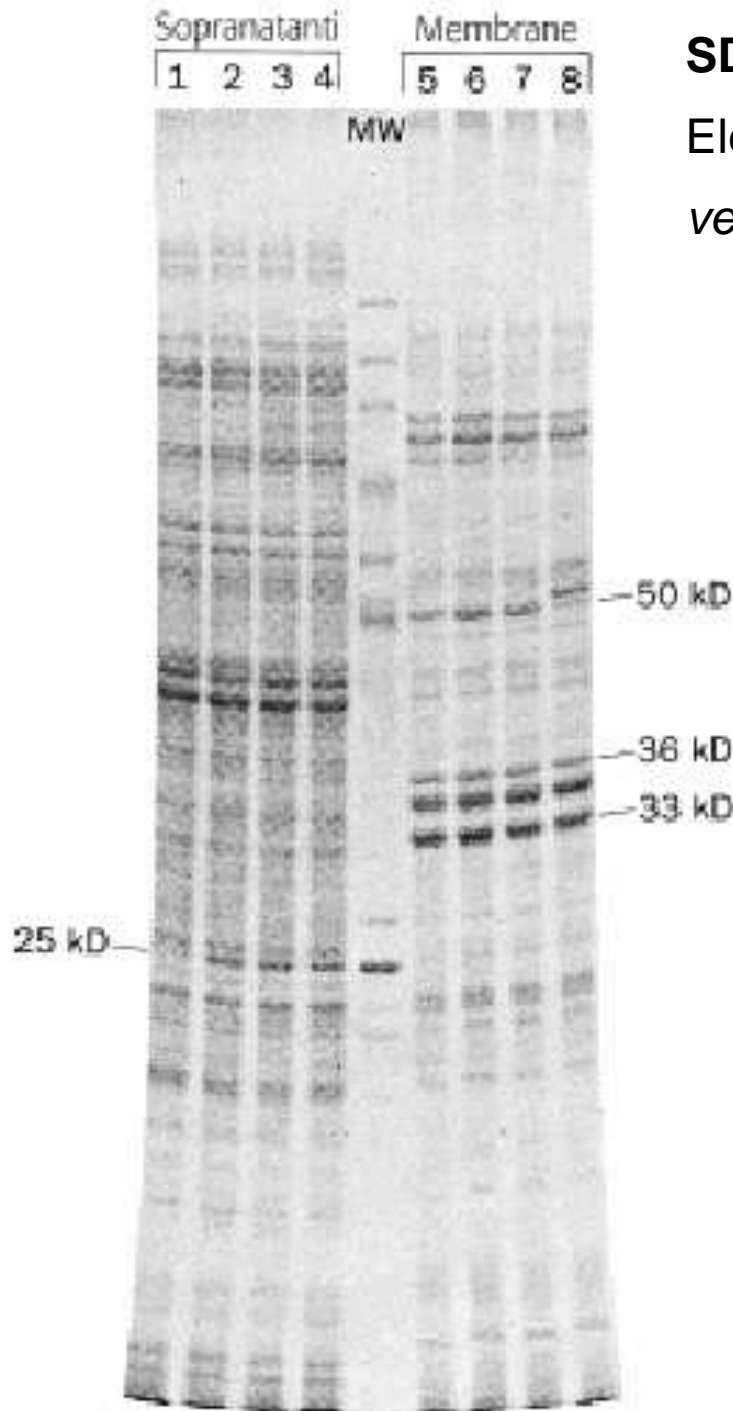


tutte le proteine hanno carica netta –
si muovono verso l'anodo all'applicazione
del campo elettrico

Dopo l'elettroforesi le proteine vengono evidenziate con
colorazione  Bande nette



(a)



SDS-PAGE

Elettroforesi su gel di poliacrilammide e *le proteine vengono denaturate dall'aggiunta di un detergente*

SDS= sodio dodecil solfato

Le proteine assumono forma di bastoncino e

→ ***La proteina assume una grande carica – che maschera la carica intrinseca della proteina***



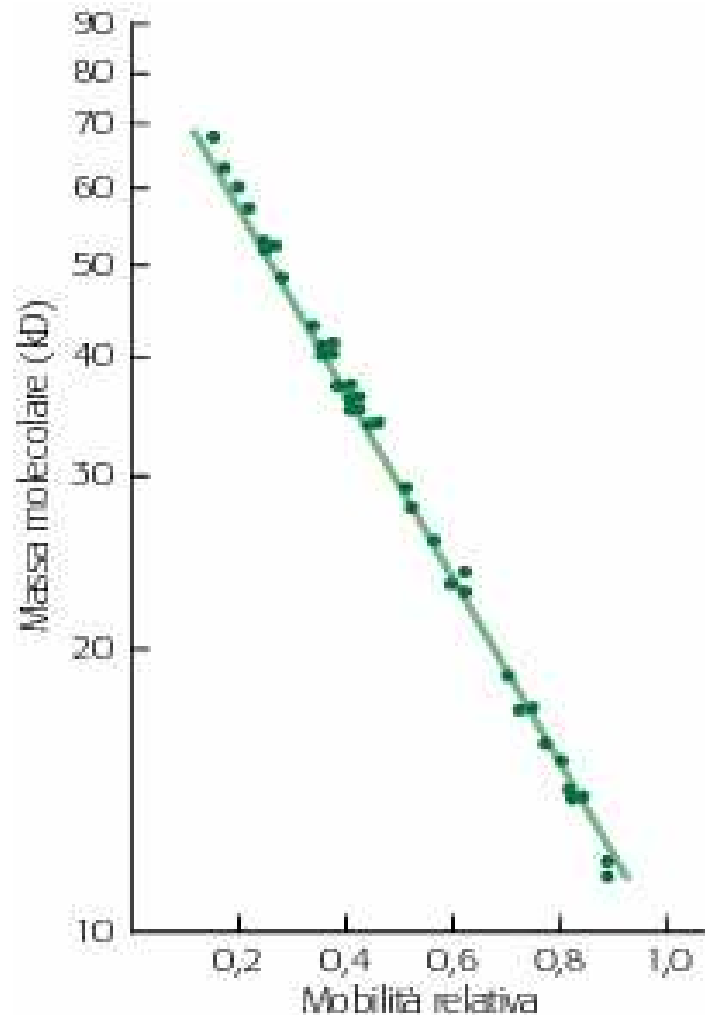
Le proteine assumono una forma simile e un rapporto carica/ massa simile

Le proteine vengono quindi separate in base alla loro massa

La colonna indicata MW= molecular weight
 Contiene proteine con pesi molecolari noti
 (standard)

È possibile determinare la massa molecolare delle proteine in quanto

*La **mobilità relativa** di una proteina è direttamente proporzionale al logaritmo della sua massa molecolare*



SDS rompe le interazioni non covalenti
che tengono uniti i polipeptidi:

***L'SDS-PAGE consente di stabilire
la massa molecolare delle subunità
di una proteina
costituita da + subunità***

ELETTROFOCALIZZAZIONE

Lungo il gel viene creato

un **gradiente di pH**

mediante anfoliti

Le proteine migrando,

si fermeranno sul gel

in corrispondenza del valore

di $pH = pI$ della proteina.

La proteina ha minore solubilità

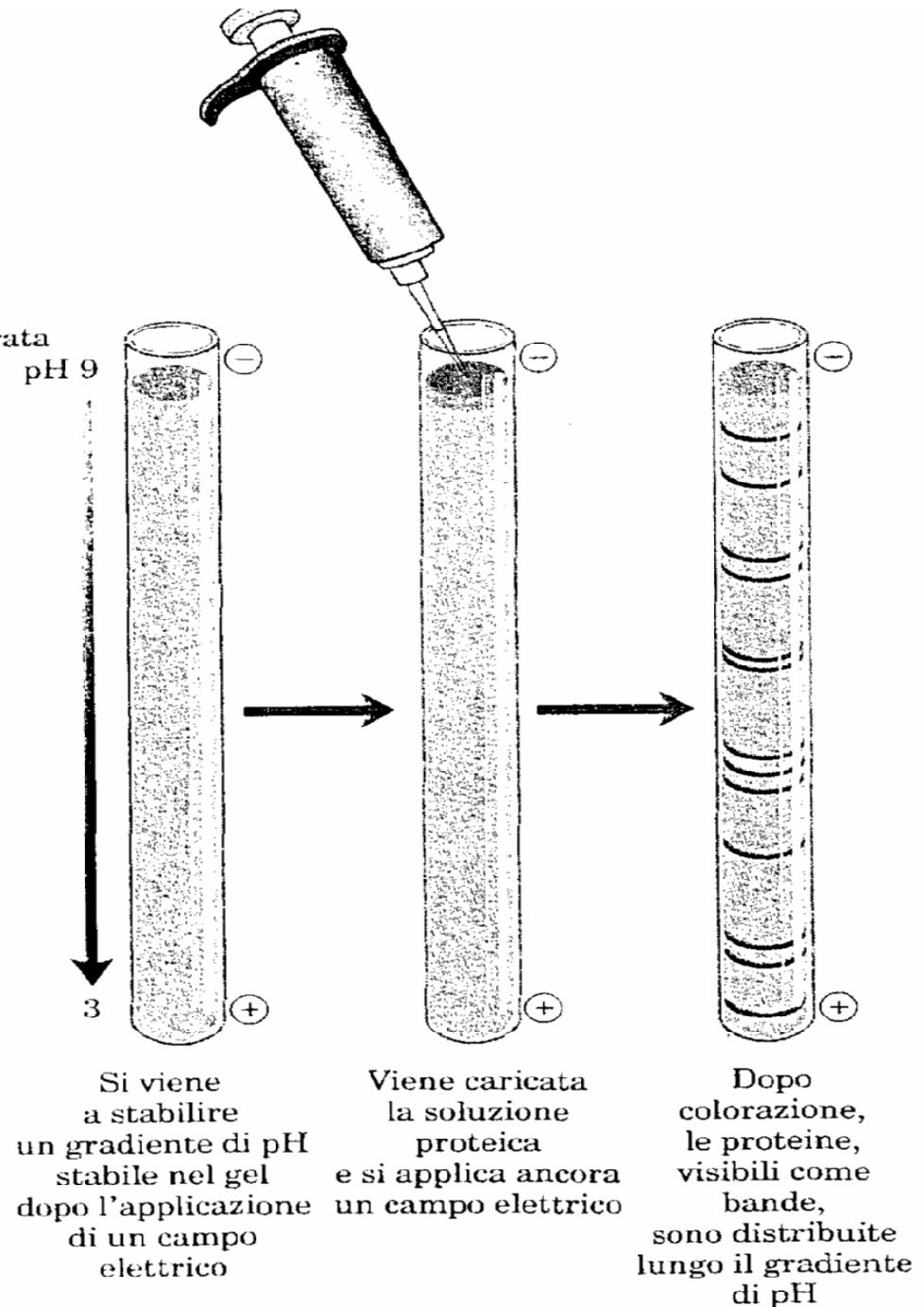
perché ha carica elettrica netta 0

Separazione delle proteine

In funzione del diverso

valore di PI (punto isoelettrico).

Viene incorporata
nel gel
una soluzione
di anfoliti
pH 9



ULTRACENTRIFUGAZIONE

La velocità con cui una particella sedimenta durante un'ultracentrifugazione è proporzionale alla sua **massa**

L'ultracentrifuga raggiunge **velocità rotazionali** di oltre 80 000 giri al minuto e **forze centrifughe** 600 000 volte > alla gravità terrestre

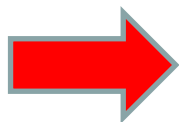
ogni macromolecola in soluzione si muove sulla base

del suo **coefficiente di sedimentazione** = (unità Svedberg $S = s \times 10^{-13}$)

velocità di sedimentazione X unità di forza centrifuga

I coefficienti di sedimentazione delle proteine variano da 1 a 50 S

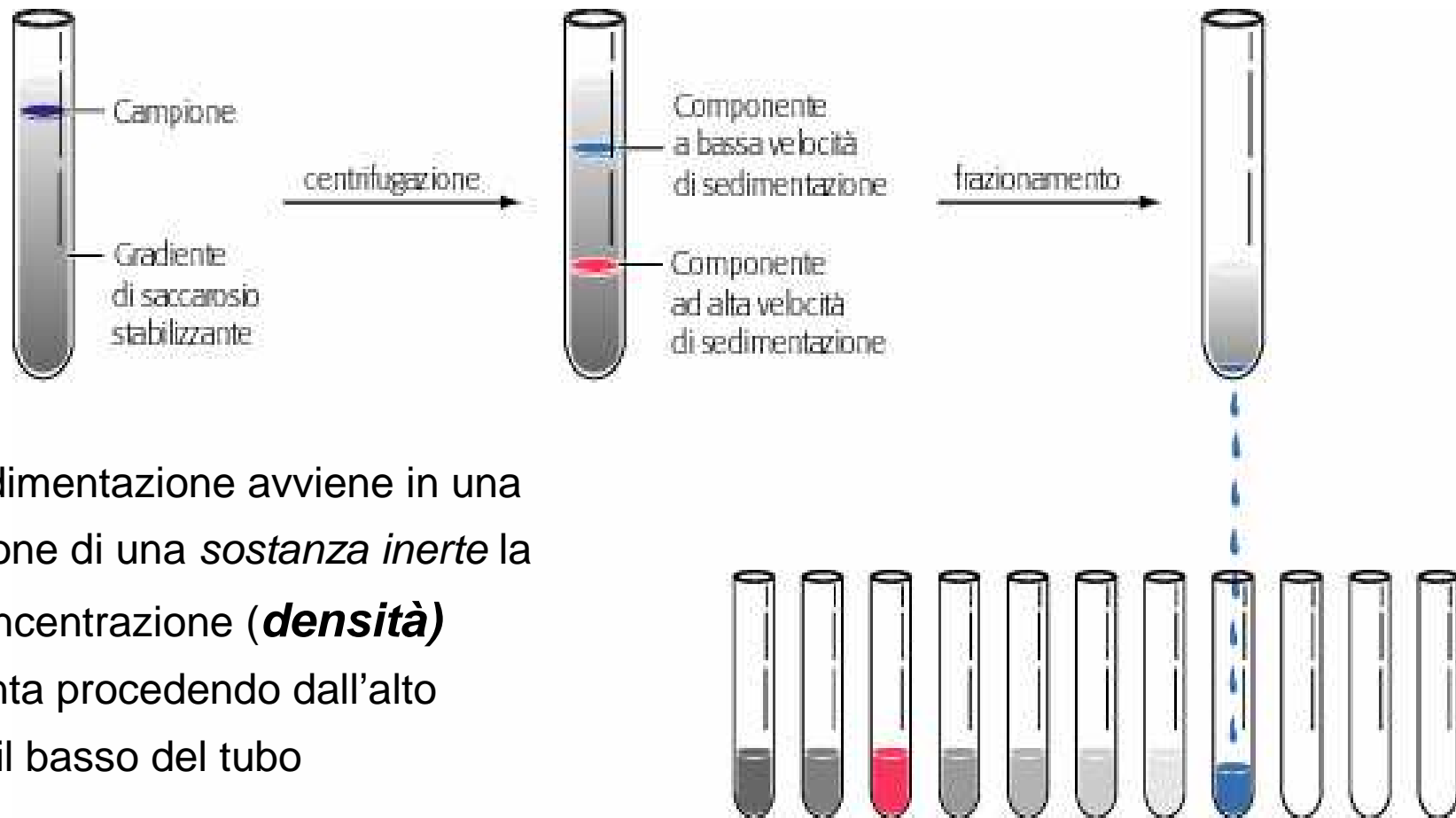
- La relazione tra massa molecolare e coefficiente di sedimentazione non è lineare



anche la densità della soluzione e la forma della particella
possono alterare la velocità di sedimentazione

L'uso dei **gradienti di densità** aumenta il potere di separazione dell'ultracentrifuga :

Ultracentrifugazione zonale . Il campione proteico viene stratificato in cima a un gradiente di densità preparato (saccarosio). Durante la centrifugazione la velocità delle macromolecole è dipendente dal **coefficiente di sedimentazione** e formazione di bande in cui **la densità del gradiente è uguale alla loro densità**



La sedimentazione avviene in una soluzione di una *sostanza inerte* la cui concentrazione (**densità**) aumenta procedendo dall'alto verso il basso del tubo