www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

coggle
made for free at coggle.it

TECNICHE CROMATOGRAFICHE

INTRODUZIONE

cromatografia è insieme di metodi che sfruttano fenomeni chimico-fisici per separare e identificare ≠ componenti di un miscuglio

- **meccanismo di base**
  data una sostanza solida in solvente, se a questo volume ne aggiungo uno uguale immiscibile al primo la sostanza si distribuisce nei due solventi in conc. che dipendono dalle caratteristiche dei solventi e della sostanza
- **principi separazione cromatografia**
  - coefficiente di distribuzione Kd (formulario)
  - sono i sistemi hanno una FASE STAZIONARIA e una FASE MOBILE
  - due composti si separano se hanno Kd ≠
  - sostanza totalmente esclusa: quando Kd=0, cioè sostanza tutta in fase mobile (liquida via)
  - processo all'equilibrio: Kd=1 cioè sostanza si ripartisce equamente fra fase mobile e stazionaria
- **finalità**
  - analitiche: identificare composto
  - preparative: purificazione composto di interesse
- **cromatogramma**
  - grafico che riporta concentrazione di una sostanza sottoposta a cromatografia (in funzione del tempo)
  - area sottesa dai picchi proporzionale alla quantità di ogni singolo componente (scopo quantitativo)
    ; ossia alla fuoriuscita di ogni componente ho picchi diversi
  - Kd=1: la prima avviene con divisione 1:1 fra fase mobile e stazionaria quindi nel tempo ottengo una curva gaussiana il cui picco corrisponde alla zona di mezzo in cui si ha max conc in fase mobile
  - Kd=1: le prime sono più distanziate fra loro in base alla sostanza che fuoriesce, in base alle loro Kd

RISOLUZIONE SISTEMA CROMATOGRAFICO

- **grado di risoluzione**
  - **selettività**
    - misura capacità di discriminare tra due composti correlati x struttura
    - capacità del sistema di fluire specie chimiche ≠ con vel. che escano separate
    - fattore di separazione (vedi formulario)
    - deve essere > 1,2, dipende dal meccanismo di separazione
  - **efficienza**
    - misura di diffusione che provoca allargamento dei picchi e loro sovrapposizione
    - capacità sistema di fare picchi stretti, cioè eluire specie con stessa caratteristica a stessa velocità
    - misurata con larghezza base del picco (w)
  - capacità: misura di quantità di materiale che può essere risolta senza sovrapposizione picchi (cromatofocusing e scambio ionico)
- risoluzione: indice di quantità di sovrapposizione tra due picchi ed indica successo di separazione
  - risoluzione del picco Rs (vedi formulario) ha valore pari ad 1, ovvero separazione circa 98%, per cui la risoluzione ottimale prevede picchi non sovrapposti o se sovrapposti distinguibili
- **piatti teorici**
  - si applica a qualsiasi tecnica cromatografia
  - una colonna si considera come divisa in zona adiacenti in ognuna delle quali soluto raggiunge equilibramento
  - zone: piatti teorici con corrispondenza fisica fesistenione lungo colonna; altezza del piatto (HEPT)
  - sostanza in equilibrio su un piatto passa al successivo
  - **EQUAZIONE VAN DEEMTER**
    HEPT=A+B/v+Cv
    - A carrimini ≠, strade alternative che analizza può intraprendere in colonna (alto-basso, lateralmente). NON dipende da v ma da fase stazionaria
    - B: dipende da coefficiente di diffusione, è inversamente proporzionale alla v, quindi diminuisce > per diffusione della sostanza anche lateralmente
    - C: direttamente proporzionale a v, inversamente legato al tempo di equilibramento ed è effetto di trasferimento di massa tra le fasi
    - **riassumendo**
      - efficienza aumenta quando H diminuisce altezza dei singoli piatti, a parità di colonna quella con H minore = efficiente
      - colonnati efficiente ha picchi più stretti, quindi H minore ha picchi stretti
      - H indipendente da lunghezza colonna, quindi posso confrontare prestazioni di colonne ≠
      - equazione Van Deemter ci statistica velocità di flusso ottimale per avere minima H
  - si sono equilibranti successivi del campione tra le due fasi
  - efficienza cromatografia proporzionale al numero piatti teorici N (vedi formulario)
  - per aumentare ≠ piatti aumento lunghezza colonna, con notevole aumento tempi di ritenzione
  - efficienza di colonna è + efficiente < H, in quanto la sostanza viaggia più compatta

TIPI CROMATOGRAFIE

- **# tipi di equilibrio**
  1. ad assorbimento (cr. di adsorbimento, cr. idrofobia)
  2. di ripartizione (cr. ionizione, cr. fase inversa)
  3. scambio ionico (cr. scambio ionico, cromatofocusing)
  4. equilibrio fase stazionaria porosa e fase liquida mobile (gel filtrazione)
  5. tra ligando immobilizzato e fase mobile liquida (cr. di affinità)
- **cromatografia su colonna**
  - su carta: fase stazionaria liquida legata a fibre di cellulosa della carta, fase mobile sale per capillarità
  - TLC (su strato sottile): fase stazionaria legata a matrice, stratificata su vetro, plastica o metallo, fase mobile sale per capillarità
  - su colonna: fase stazionaria attaccata a matrice, impaccata in colonna di vetro fase liquida passa per gravità o pompa
  - 1. colonna: vetro, plastica, ... cioè fari estremità per non fuoriuscire matrice
    2. serbatoio fase mobile con valvola di iniezione
    3. sistema rilascio
    4. sistema identificazione composti
    5. registratore
    6. raccoglitore di frazioni
  - **matrice**
    1. elevata stabilità meccanica
    2. presenza di gruppi funzionali per il legame con la fase stazionaria
    3. elevata capacità
    4. un ampio intervallo di dimensioni di particelle
    5. una porosità adatta
    6. essere fatta di materiale inerte (non deve minimamente interferire con la separazione cromatografica)
    - agaroso (gel fil., cr. idrofobica, cr. scambio ionico, cr. di affinità)
    - destrano (gel fil., cr. scambio ionico, cr. di affinità)
    - cellulosa (cr. scambio ionico)
    - poliacrilammide (gel fil., cr. di affinità)
    - polistirene (cr. scambio ionico)
    - silice (cr. di partizione, cr. di adsorbimento, HTPC;
  - 1. **impaccamento**: fase stazionaria già legata a matrice, in forma gel o polvere viene inserita in colonna senza formazione di bolle (aiutano il risultato)
    2. **equilibramento**: inserisco in colonna tampone, quindi metto in flusso almeno 5 volumi di colonna con fase mobile
    3. **caricamento campione**: carico manualmente o con pompa peristaltica dopo aver rimosso fase mobile (non a secco)
    4. **eluizione**: a velocità costante, per gravità o pompa. Faccio uscire campione con analiti separati.
    eluizione isocratica quando uso 1 solo solvente, altrimenti gradiente di diverse forme e diverse caratteristiche
    5. **rivelazione e raccoglitore**: analiti separati rilevati secondo proprietà (spettrofotometrici con celle a flusso continue). raccoglitori suddividono eluato in frazioni fisse di tempo o volume

https://www.youtube.com/watch?v=UmWWKJA8Sk
https://www.youtube.com/watch?v=ZkeIbGRbtho

GEL FILTRAZIONE

- volume vuoto V0: spazio fra granuli del gel
- volume interno Vi: spazio interno ai granuli
- volume granuli Vg
- uscita secondo le dimensioni:
  1. totalmente escluse: molecole più grosse dai pori, con quantità fase mobile pari a V0 e Kd=0
  2. totalmente incluse: molecole più piccole si equilibrano con intero volume liquido ed eluiscono Vi+V0=V e Kd=1
  3. molecole intermedie: volare Kd intermedio ed eluiscono in vari volumi
  esiste limite inferiore (cut off) e superiore di esclusione
- molecole eluite in ordine di **massa decrescente**
  - processo di separazione basato su *setaccio molecolare*: matrice con canali interni di regolabile
  - Raggio di Stokes: condizione di separazione delle molecole, proporzionale alla massa (per globular)
  - separazione di pp con 10^2-remase10^6 kDa
  - eluizione isocratica
- **matrice**
  - destrano-Sephadex-Sephacryl: polimero di glucosio con legami β1,6
  - agaroso-Sepharose-BioGel A: polimero di D-galattosio e 3,6-anidrido-1-galattosio
  - poliacrilammide-BioGel P: polimero di acrilamide
- **applicazioni**
  1. *purificazione pp*
  2. *determinazione massa mol. relative*, alleanza retta di taratura
  3. *dissalazione* con colonne Sephadex G-25 i sali vengono ritardati
  4. *concentrazione* con Sephadex G-25 richiede acqua e piccole molecole e si gonfia
  - **2: det. massa mol.**
    - volume di eluizione è funzione lineare del logaritmo del peso molecolare (confronto massa-volume empirico)
    - costruisco curva di calibrazione con proteine di forma simile e peso noto (BSA)
    - con proteine marker (catalasi, aldolasi...) carico in colonna e misuro il ≠ V, quindi ricavo cromatografia che poi confronto con pp non nota
    - consente uso di pp in condizioni native
  - **3: dissalazione**
    - pp ≠ per dimensione dai sali
    - usato per cambiare buffer prima di reazione enzimatica (da con sali a senza sali)
    - colonne preimpaccate (PD10)
  - **4: concentrazione**
    - composti con alto peso molecolare possono essere conc. per aggiunta di G-25 secca
    - acqua e sostanze a basso peso assorbite da gel che si rigonfia
    - gel rimosso con centrifugazione

CR. DI PARTIZIONE

- datata ed usata dai chimici
- matrice di silice con organosilano per immobilizzare fase stazionaria
- due tipi:
  1. *fase normale*: in bidoglia, fase staz più polare e di fase mob (solvente organico), analiti eluiti in **polarità crescente**
  2. *fase inversa*: per sistemi automatizzati, fase staz meno polare di fase mob (che quindi può essere anche solvente acquoso, quindi per biolog.), analiti eluiti in **polarità decrescente**

CR. DI ADSORBIMENTO

- prima cromatografia
- alumi materiali solidi trattengono composti su superficie per interazioni deboli
- solvente di eluizione deve avere una polarità simile a quella dell'analita più polare contenuto nella miscela da separare.
- gli eluenti più usati sono:
  1. Alcoli, per analiti che contengono gruppi O-H
  2. acetone o esteri, per analiti che presentano gruppi carbonilici
  3. idrocarburi (es. esano, eptano, toluene), per analiti non polari.
- molto utilizzata in HPLC.

CR. IDROFOBICA

- aggregazione delle molecole apolar in un ambiente polare.
- pp separate in base al grado di idrofobicità di superficie
- fase stazionaria è costituita da una matrice di aparosio che porta dei gruppi funzionali alchilici (esile, obtile) o fenilici
- campione applicato con tampone altamente polare che aumenta interazioni gruppi idrofobici di superficie con fase staz
- gradiente da solvente polare a non polare secondo serie di Hofmeister (solitamente decrescente di ammonio solfato e crescente di etilenglicol
- richiede presenza di composti che provocano salting-out di pp, dopo precipitazione in ammonio solfato

CROMATOGRAFIA DI AFFINITA'

- non sfrutta interazioni chimico fisiche bensì interazioni biologiche specifiche => legami ad alta attività
- specificità di interazioni derivano da tipi diversi non covalenti
- tipo di cromatografia **più selettiva** e più recente
- **primo passaggio** in purificazione di pp a am
- **separazione cromatografia**
  1. matrice accoppiata con ligando impaccata in colonna
  2. equilibro
  3. dopo aver caricato il campione la colonna viene lavata con tampone di equilibramento con almeno 5 volumi di colonna per rimuovere l'aspecifico
  4. eluizione:
  - aspecifica se viene condotta variando pH o forza ionica
  - specifica facendo passare in colonna composto con affinità per molecola d'interesse maggiore di quella di ligando
    posso ulteriormente fluire pp con glutaridine perché pp di fusione di GST oppure senza glutaridine ma con proteasi specifiche che lasciano tag in resina
  5. ricavo pirmo picco da eluizione con aspecifico
  6. tampone di eluizione che da picco stretto in quando essendo ad alta affinità la % di pp d'interesse è ridotta
  7. rifaccio equilibrio per riusare sistema
- **componenti**
  - **matrice**
    - assolutamente inerte
    - gruppi chimici adatti e in # sufficiente per legame covalente con ligando
    - stabile in condizioni di legame post eluizione
    - minimizzare adsorbimento specifico
    - con buone proprietà di flusso
  - **braccio spaziatore**
    - molecola che distacca ligando-matrice
    - aumenta efficienza di legame
    - di 6-8 atomi C, non di meno per inefficacia nè di più perché può interagire
    - idrofilico o idrofobo
    - con 2 gruppi chimici di legame: uno per matrice ed uno per coupling del ligando
    - per macromolecole non necessario
  - **ligando**
    - molecola che lega specificamente e reversibilmente pp
    - con gruppi chimici modificabili per attacco a matrice
    - Kd compresa fra 10^-4 e 10^-8 M perché altrimenti interazione con pp troppo debole o troppo forte
    - specificità assoluta per un solo composto o per gruppo ristretto (selettività di gruppo)
    - fornite già con matrice o in lab si svolge coupling: attacco covalente ligando-matrice
- **effetto di focalizzazione**
  - pp migra velocemente fino a raggiungere pH=pI, superato il quale si fissa a fase stazionaria
  - gradiente di pH in minuendo provoca nuovamente il distacco di pp e di nuovo il suo flusso fino a raggiungere nuovamente pH=pI
  - => pp escono gradualmente secondo il gradiente, questo comporta elevata capacità: due aliquote ≠ anche caricate contemporaneamente
- **tipologie**
  - con lectine: purifico glicoproteine
  - di immunoaffinità: ligandi immobilizzati tramite anticorpi
  - con poliU: purifico mRNA
  - su DNA: isolo pp di dna
  - con chelati di metalli: per purificare pp Histagged (molecole con code legate a His), eluizione attraverso pH o spiazzamento con EDTA
- **pp di fusione**
  - **altri tipi**
    - Histag: la proteina viene prodotta in fusione ad una sequenza di 6 o 8 His, all'N terminale o al C terminale, viene purificata su cromatografia di affinità Ni-NTA
    - Proteina A: viene utilizzata come tag e si sfrutta la sua capacità di legare IgG
      - Flag: si inserisce sequenza amminoacidica sintetica simetrica, contro cui è stato generato un anticorpo monoclonale specifico. E' possibile immunoprecipitare le proteine che contengono questo flag
    - Epitopo HA: è una breve sequenza aa (9aa) contenuta nell'emoagglutinina del virus dell'influenza, contro la quale sono stati generati anticorpi monoclonali specifici
    - Epitopo Myc: è una breve sequenza aa (10aa) contenuta nella proteina c-Myc, contro la quale sono stati generati anticorpi monoclonali specifici
  - **espressione e purificazione**
    - necessito di promotori forti (alta affinità polimerasi, con espressione regolabile in quanto lunga esposizione può portare danni ed espulsione plasmide o morte organismo)
    1. trasformazione: ospite manca di proteasi per ridurre degradazione pp ricombinante
    2. amplificazione: in piastra con ripresa di colonia prelevata in terreno LB 3ml
    3. induzione: cellule producono pp per 2-4 h quindi raccolgo estratto grezzo
    4. *purifico*: centrifugazione per recupero pellet di batteri o sumilazione con pp, metodi meccanici per la lisi cellulare (anche centrifugazione)
  - per evitare degradazione pp eterologhe e purificarle vengono prodotte come pp di fusione con pp stabile in organismo ospite
  - esempio: **pGEX**
    - vettore di espressione di proteine di fusione con GTS
    - di origine applicativa come antibiotico
    - espressione sotto controllo di promotore tac, indotto da analogo del lattosio IPTG
    - permette espressione di pp di fusione con sito di taglio per protease di precisione, ingegnerizzata con optimum di attività a 4° e prodotta come pp di fusione di GST
    - può avere ≠ siti di taglio con ≠ polilinker e ≠ promotori

CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

- **vantaggi e utilizzi**
  - elevata applicabilità, alto potere risolutivo, alta capacità, semplicità e controllabilità
  - separazione e purificazione di pp, analisi di miscele di aa, purificazione acidi nucleici
- separazione in base la carica netta delle pp che dipende dal pKa della molecola e dal pH della soluzione, quindi due parametri di controllo: pH tampone mobile e pKa
  - matrice inerte legata covalentemente a fase staz carica (**scambiatore ionico**) ma neutralizzata elettrostaticamente da controioni scambiabili della soluzione
  - quindi queste pp competono con i controioni per legame a gruppi carichi di fase stazionaria
    => separate secondo la carica
  - pp carica + se pH<pI e carica - se pH>pI
  - si dividono in:
    - *scambiatori cationici*: carica - scambiano cationi
    - *scambiatori anionici*: carica + scambiano anioni
  - *scambiatori forti*: toti ionizzabili a tutti valori di pH (sulfonato SO3- e ammonio quaternario)
  - *scambiatori deboli*: ionizzabili solo a ristretto range di pH (lone carboxilato COO- e dietilammonio)
- **meccanismo**
  si realizzano 2 scambi ionici
  1. cariche fase stazionaria neutralizzate da controione Ci, quindi impaccamento in colonna, equilibrata senza cariche
  2. caricamento campione: pp carica, passaggio limitante
  3. **primo scambio ionico**: pp con carica netta opposta a fase stazionaria scalzano controione
  4. eluizione di pp con carica netta uguale a fase stazionaria Kd=0
  5. **secondo scambio ionico**: eluizione pp legate che vengono scalzate da conti ioni che vengono immessi in gradiente di conc (forza ionica) oppure variando pH
  - **matrici**
    - polistirene: monobeads, resistente
    - agarosio
    - destrano
    - cellulosa
  - **fase mobile**
    - pH e forza ionica di primo tampone devono favorire primo scambio ionico
    - pH tampone varia a seconda della pp: superiore o inferiore di un unità rispetto a pI
    - tamponi cationici come Tris, Piridina e alchilammine, vengono usati con gli scambiatori anionici
    - tamponi anionici come acetato, barbituriato e fosfato vengono usati con gli scambiatori cationici
- **separazione cromatografica**
  - la cromatografia a scambio ionico viene di solito eseguita ad almeno un'unità di pH di distanza dal punto isoelettrico della proteina di interesse
  - le proteine vengono legate in condizioni di bassa forza ionica
  - eluizione aumentando la forza ionica (aumentando la concentrazione del controione) oppure variando il pH, mediante un gradiente continuo, oppure a step
  - volume del campione applicato può essere elevato: la proteina di interesse, legandosi alla resina, viene concentrata ed eluita in un volume ristretto (no limiti a volume di caricamento e indipendenza da forma di colonna

CROMATOFOCUSIG

- applicazione di cromatografia a scambio ionico, quindi con stesse componenti
- pp separate secondo il punto isoelettrico (applicazione analitica)
- crescente gradiente di pH sfruttando capacità tampone di scambiatore ionico
- colonna equilibrata con estremi di pH: prima equilibrio a pH superiore, quindi fasce flussate eluente con anfoliti e pH inferiore, creando quindi gradiente
- gradiente permette effetto di focalizzazione di pp al punto di pI=pI
- **cr. su idrossiapatite**
  - adsorbente usato per separare miscele di proteine e acidi nucleici
  - adsorbimento sembra coinvolgere gli ioni Ca++ e fosfato
  - molto usata per separare DNA a singolo e a doppio filamento

HPLC e FPLC

- **vantaggi**
  - risparmio solvente
  - sensibilità
  - riduzione tempi analisi
  - con piccole quantità di campione
  - assenza assoluta di diffusione longitudinale, quindi migliore risoluzione
- **struttura apparato**
  1. 1,2 solventi mandati in colonna con pompe peristaltiche passano nella precolonna con filtri e valvola di iniezione
  2. colonna: in acciaio inox per sostenere v flusso 2 ml/min. Più piccole del normale: 5-25 cm contro 50-500 cm, e 4,6 mm contro 1-5 cm e anche le particelle minuscole (3-10 µm contro 100-200 µm)
  3. matrici: supporto inerte rigido con fase stazionaria
  4. sistema di pompe per pressione
  5. sistema di rivelazione (letture ev-visibile, fluorimetri, letori elettrochimici, spetrometro di massa)
- **HPLC**
  high performance liquid chromatography
  - **pompe**
    1. la pressione costante: introduzione in colonna di gas in pressione che spinge in colonna. NON da pulsazioni, ma NON compensa diminuzione di velocità
    2. a portata costante: solvente spinto in colonna con pistone mantengono velocità costante, ma danno pulsazioni
  - **valvola di iniezione**
    - sfruttata in acciaio con # uscite
    - campione iniettato con iniettore a spirale-loop
    - 3 posizioni principali: lavaggio pompe, caricamento campione, lancio campione in colonna
    - flusso di campione di caricamento costituito rispetto a quello di lancio in colonna, che avviene grazie alla spinta del solvente di lavaggio
  - **cr. in fase normale**: separazione analiti dipende da interazioni con fase staz polare (silice) e fase mob (solventi organici come esano)
    eluizione aumentando polarità fase mobile
  - **cr. liquida in fase inversa**: RCP , separazione in base ad idrofobicità, che dipende da polarità e dimensioni analizza. fase sta (gruppi alchilfosfinici legati a silice, utile, ottime, cittadelle) e fase mob (soluzioni acquose) quindi uso per separazione peptidi e aa
  - metodo chimico applicato in biologia con FPLC
  - per effettuare separazioni cromatografiche a pressioni > 5 MPa.
  - elevato potere risolutivo riducendo HETP, poiché vengono ottimizzati valori di Van Deemter:
    1. particelle molto piccole e regolari della matrice riducono A
    2. velocità di flusso elevata diminuisce B
    3. sempre piccole dimensioni di particelle aumentano sup disponibile per equilibramento, quindi minore C
  - essendo elevata v di flusso le particelle piccole (5-3 µm) offrono > resistenza creando contropressione elevata, per questo si usano elevate pressioni di contrasto
- **FPLC**
  fast protein liquid chromatography
  - **matrice**: particelle di piccole dimensioni regolari (silice)
  - **fase stazionaria**: scambiatori anionici o cationici, cr. idrofobica, chromatofocusing, gel filtrazione (ultime due a scopo analitico)
  - sistema più recente specifico per le pp
  - compatibilizzato e veloce (15-30 min)
  - pressioni intermedie fino a 4 Mpa
  - stessa struttura di HPLC ma con rivelatore uv-visibile a 280 nm
  - particelle minori quindi si ottimizza equazione Van Deemter

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari