

### PURIFICAZIONE PER SOLUBILITA'

- cationi ed anioni ordinati dal più cosmotropico-più stabilizzante (salting out) al più cosmotropico-più destabilizzante (salting in)
- Salting in: desco che nell'800 stabilisce questa distribuzione empiricamente
- da proteina nativa si ha prima fase di salting out, fino ad un punto che equivale alla massima presenza di sale che richiama acqua e la proteina è al max di solubilità. Quindi sopra questa soglia avviene il contrario con idratazione di ioni e precipitazioni di aggregati di pp
- alcuni sali, solventi e polimeri organici provocano la precipitazione di proteine in forma nativa
- si sfrutta il fatto che le proteine, differenziate fra loro per quanto attiene alla carica elettrica, dimensioni all'equilibrio di specie come sali
- I metodi di purificazione basati sulla solubilità si possono facilmente applicare a grandi volumi di estratto iniziale + presentano il vantaggio di poter concentrare il campione proteico

- per rimozione di sali, ammonio solfato da prodotto ottenuto per centrifugazione
- si usano membrane in heksa destinate con tamponi di dialisi e in apporzioni magnetiche
- processo all'equilibrio lento che lascia fuoriuscire sale, ma con necessario cambio di tamponi e comunque mai annullamento totale di % di sale

### FRAZIONAMENTO CON AMMONIO SOLFATO

- composto che può provocare il fenomeno del salting-out, che consiste nella precipitazione reversibile delle molecole in forma nativa
- salting-out: alte concentrazioni saline allontanano lo strato di idratazione della proteina, in quanto gli ioni diventano solvati. Ciò favorisce l'interazione delle zone idrofobiche di superficie di una proteina con zone idrofobiche di altre proteine, causando un "raggruppamento" di molecole che precipita (seconda massa)
- reversibile e legata a T

### metodi per concentrazioni di pp

- precipitazione ammonio solfato
- precipitazione di azoto: funzionamento come pentola a pressione, vi è una membrana in camera che manda in pressione con bombola di azoto, quindi si schiacciano molecole su membrana e solo quelle di dimensioni minori della maglia passano
- centrifughe come centrifughe e centrifera, in cui vi è una membrana sul fondo del filocentrifughi
- polilietilenglicoli (PEG): polimero idroscopico con membrana idrofila quindi per essenza richiama acqua e si concentra immediatamente, procedimento durissimo quindi dannoso per alcune linee cellulari

### PRINCIPI DI CENTRIFUGAZIONE

- successivamente a rotazione stabilizza applicando forza centrifuga si permette la sedimentazione di materiale
- tecnica svolta in centrifughe munite di rotore in metallo montato su perno dell'elbero, il tutto in camera chiusa con tappo a vite
- la sedimentazione porta ad un surriscaldamento sulla superficie del il perno sul fondo

ved' formula per CAMPO CENTRIFUGO RELATIVO FORZA APPLICATA A PARTICELLA SFERICA LEVIGATA LUNGO UNO DEI DUE ASSI VELOCITA' SEDIMENTAZIONE CON COEFFICIENTE

- conc. soluzione
- natura chimica mezzo
- tipo centrifuga
- campo centrifugo applicato non uniforme (tenuto da asse di rotazione più intenso)

### CENTRIFUGAZIONI PREPARATIVE

1. agglungo ammonio solfato a composto
2. centrifugo
3. pp stabilisce in surriscaldamento secondo iterazione con ammonio solfato con la cella per il rotore che può fare più caldi sino ad avere quota di interesse (max 3) quindi:

### TECNICHE CENTRIFUGATIVE

- Serve a stabilizzare il liquido all'interno della provetta, minimizzando l'effetto dei moti convettivi.
- può essere ottenuto in modo continuo o discontinuo e viene caricato nella provetta dall'alto.
- Il volume del campione che si può caricare dipende dalla sezione di gradiente esposta al campione stesso. Ogni gradiente ha una capacità massima di caricamento.
- Dopo la separazione, il gradiente può essere raccolto per spazzamento verso l'alto o dal basso, buccinando la provetta

### ISODENSITA'

- campione centrifugato per tempi lunghi così che avvenga
- isodensità
- zonazione secondo la densità delle sostanze
- complementare zonale di velocità

### ELUTTAZIONE

- rotore eluttorio, simile a centrifuga ad alta velocità
- permette di separare materiale in flusso
- rotore contenente dischi piani con 1, una camera di bilanciamento ed una di separazione
- campione immesso in flusso nel rotore
- liquido controcorrente a campo centrifugo che permette separazione: dalle più leggere alle più pesanti escono dal rotore
- accoppiato a microscopio o citofluorimetria a flusso

### rotori ad angolo fisso

- angolo compreso fra 14-40°
- alloggiamenti per tubi disposti circolarmente attorno ad asse di rotazione ad angolo prefissato
- formazione di un pellet inclinato di 45°, che aiuta estrazione del surriscaldamento

### rotori ad bracci oscillanti (swing out)

- provette oscillano sino a d essere in linea con campo di centrifugazione
- il pellet si sedimenta orizzontalmente, utile per gradiente di densità

### TIPDI ROTORI

- a bracci oscillanti
- ad angolo fisso
- con provette ad allungamento verticale
- zonali
- eluttratori

### TIPDI CENTRIFUGHE

- **ad alta velocità**
  - velocità max 60 000Xg
  - rotori sia ad angolo fisso che oscillante
  - raccolta di microrganismi e frammenti cellulari e organuli grandi
- **ultracentrifughe**
  - velocità max 600 000Xg
  - camere a del rotore sotto vuoto per diminuire attrito
  - albero motore flessibile per minimizzare vibrazioni da sbilanciamento
  - rotore in titanio
  - frazionare componenti subcellulari

### APPLICAZIONE TECNICHE CENTRIFUGATIVE

- Raccolta di cellule da terreni e preparati biologici.
- Frazionamento cellulare (= separazione in organuli, Ad es: mitocondri, lisosomi, ecc.)
- Si realizza mediante: centrifugazione frazionata o centrifugazione in gradienti di densità.
- **Precipitazione di macromolecole** in condizioni di insolubilità. In condizioni denaturanti (precipitazione di proteine o di acidi nucleici in TCA e precipitazione di acidi nucleici in etanolo) oppure in condizioni non denaturanti (precipitazione di proteine in solfato d'ammonio).
- **Concentrazione di soluzioni (centriconi)**
- **Determinazione della massa molecolare** di macromolecole mediante ultracentrifugazione analitica.

### da banco

- velocità max 3000-7000 Xg
- refrigerate o non (allora in camera refrigerata)
- le + grandi con diversi rotori
- per raccolta materiale che sedimenta velocemente (levito, eritrociti, ecc.)
- comprendono **microcluge**: max velocità 10 000Xg

### zonale di velocità

- uso di gradiente e separazione dipende dal tempo di centrifugazione
- densità particelle -> densità mezzo, e centrifugazione intercala prima che differenzia tra destra -> no sedimenta
- zonabilità (presa in account) densità di gradiente, dimensioni fondo le più veloci e in superficie le più lente
- complementare ad isosolonica

### formatori di gradienti

- usato in elettrofresi e centrifugazione, ma funzionamento uguale
- due recipienti di cui uno con aglutatore magnetico e sistemi di controllo (colui immoziamento si basa sul principio dei vasi comunicanti)
- apprendo in contemporanea le volume di compressione dei recipienti e di usata si ha passaggio di liquido con diluizione o concentrazione (in base alla richiesta) in gradiente
- materiali per gradiente maggiormente impiegati: cloruro di cesio, ioduro di sodio, glicerolo, saccaroso, albumina da siero bovino, percoli, ...

1. grezzo 600 000Xg x 10min ottenuto nuclei
  2. surriscaldamento 15 000Xg x 5min ottenuto mitocondri, cloroplasti, lisosomi, perossisomi
  3. surriscaldamento 100 000Xg x 60min ottenuto membrana, frammenti re
1. Coltura, 300 000Xg x 20min tempo: unità ribosomali, piccoli poliossomi + surriscaldamento
  - (vedi esempio legato slides)

posso applicare marcatori per identificazione:

- nuclei: DNA ed RNA
- mitocondri: succinato deidrogenasi, citocromo ossidasi, monomio ossidasi
- cloroplasti: ribosio fosfato carbossilasi, fosotasi
- perossisomi: catalasi, urico ossidasi, 4-aa ossidasi
- lisosomi: fosfatasi acida, aml
- solenitide deossiribonucleotidasi
- RE: glicocoliofosfatasi, citocromo
- ribosomi: RNA
- Golgi: glicosil transferasi, tannina protidasi, nucleoside
- membrane: adenil Ciclati, canali apasi
- citosol: enzimi glicolisi

### differenziale

- basata su diversa velocità di sedimentazione di particelle
- in funzione delle dimensioni e densità della particelle
- si separa, 1 surriscaldamento da 1 pellet, il quale di dimensioni maggiori si deposita sul fondo a deprivare sino al solvente, tenendo conto che materiale altrimenti ha velocità differenti
- da estratto grezzo a solo ciostosi avvengono più passaggi ad alta velocità, in quanto ogni volta ottengo un solo pellet ed un solo surriscaldamento