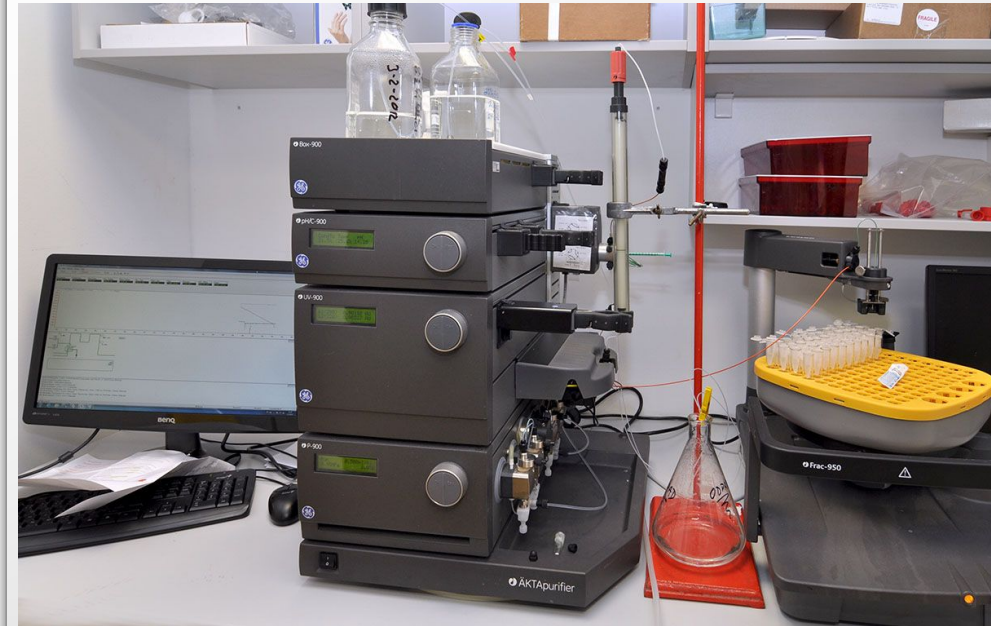


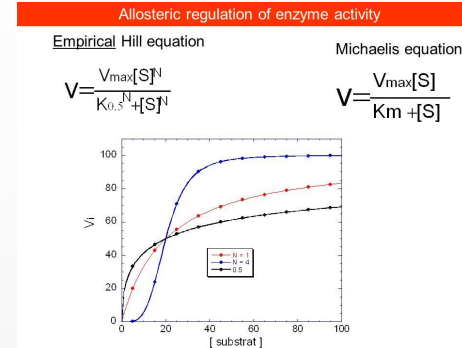
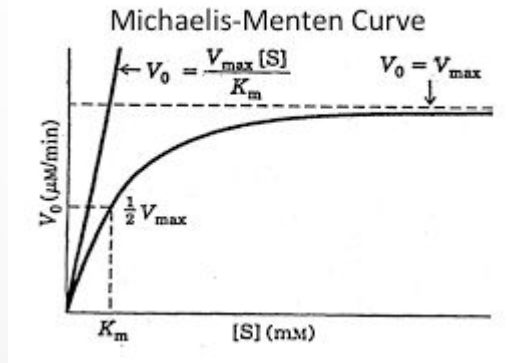
LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA SU COLONNA PER LA PURIFICAZIONE DI PROTEINE

ANNALaura SABATUCCI

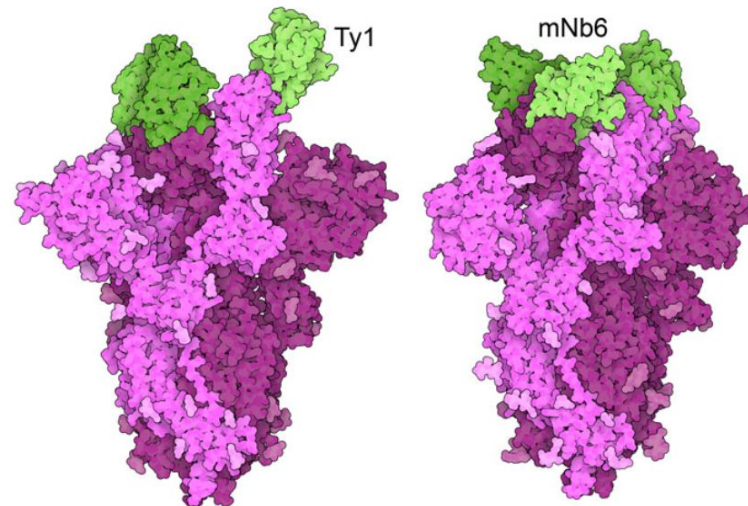


PERCHÉ PURIFICARE UNA PROTEINA?

PER STUDIARE LA FUNZIONE



PER STUDIARE LA STRUTTURA



Structures of nanobodies (green) bound to SARS-CoV-2 spike protein (magenta).

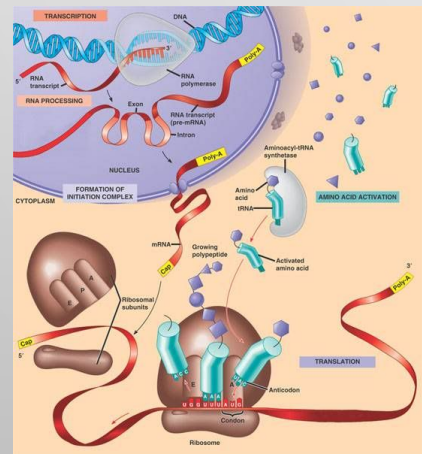
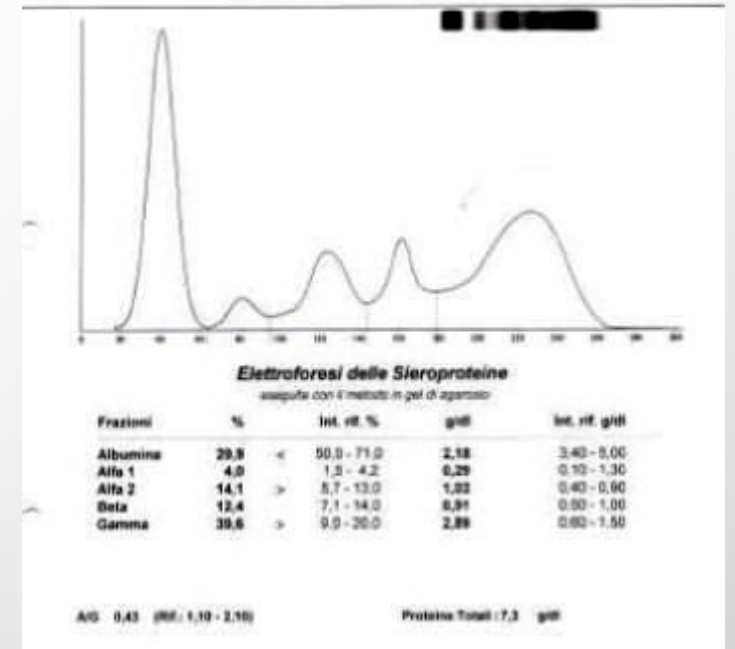
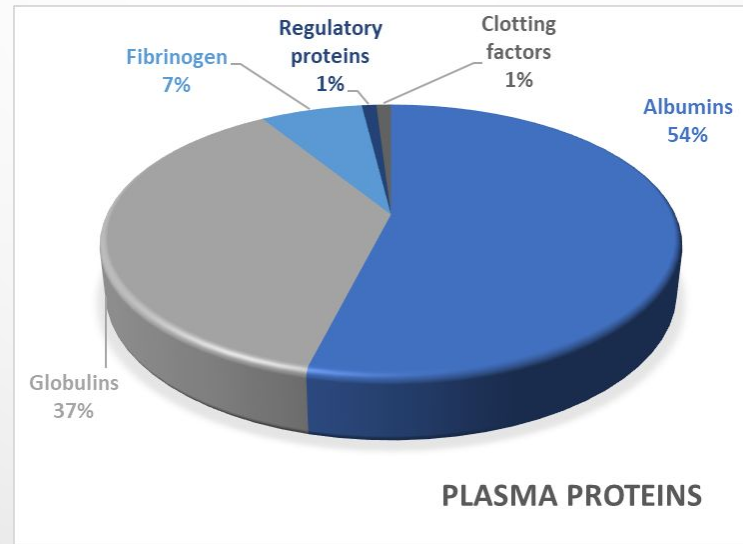
Nanobodies

Researchers are also exploring approaches to engineer smaller forms of antibodies, termed **nanobodies**, for use in treatment of the disease. Two examples are shown here. The Ty1 (PDB ID [6zxn](#)) single-chain antibody was discovered by immunizing alpacas with the viral spike. It binds to the receptor-binding domain in the up and down conformations, and blocks binding to the ACE2 receptor. The nanobody mNb6 (PDB ID [7kkl](#)) was selected from a library of synthetic nanobodies, and then optimized by making many small changes in the portions that interact with the spike and selecting the tightest binders. It binds to the receptor-binding domains in the inactive down position.

PROTEINE ENDOGENE

Estrazione da organi, tessuti fluidi

Composizione proteica del plasma umano



Fraction
Albumins: Albumin, pre-albumin (transthyretin)
α_1-globulins: Thyroxin-binding globulin, transcortin, α_1 -acid glycoprotein, α_1 -antitrypsin, α_1 -lipoprotein (HDL), α_1 -fetoprotein
α_2-globulins: Haptoglobin, macroglobulin, ceruloplasmin
β-globulins: Transferrin, hemopexin, lipoprotein (LDL), fibrinogen, C-reactive protein, C3 and C4 components of the complement system
γ-globulins: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE

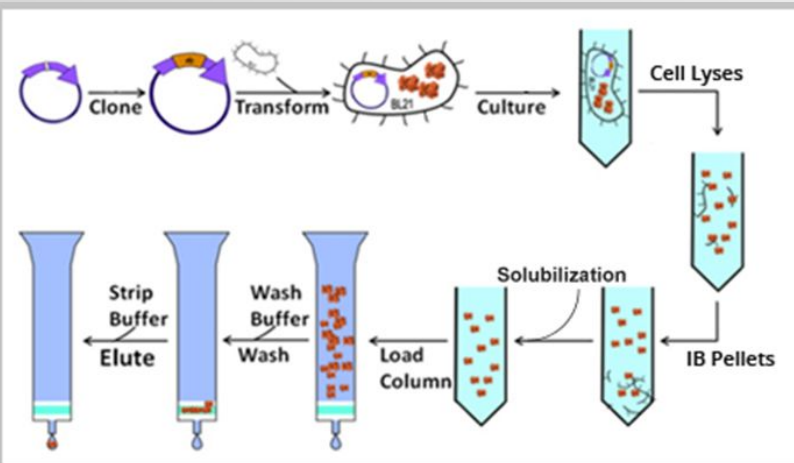
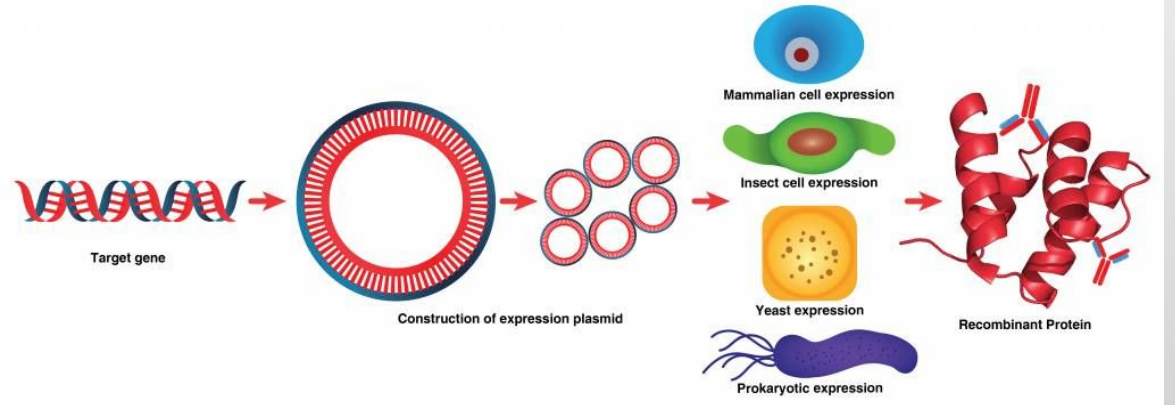
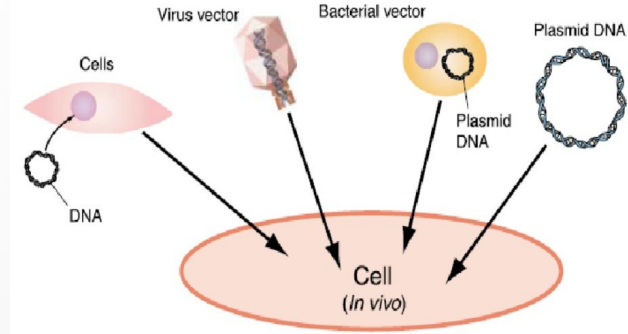
Protidogramma (elettroforesi sieroproteica)

Video della metodologia:
<https://www.youtube.com/watch?v=FKxQxt2vAK4>

PROTEINE RICOMBINANTI

Vettori:
Cellule, virus, batteri
trasportano il gene della
proteina da esprimere (di
solito in plasmide) in un
sistema di espressione
cellulare

Various Vector Systems.....



1. DENOMINAZIONE DEL MEDICINALE

COVID-19 Vaccine AstraZeneca, sospensione iniettabile
Vaccino anti-COVID-19 (ChAdOx1-S [ricombinante])

2. COMPOSIZIONE QUALITATIVA E QUANTITATIVA

Flaconcini multidose contenenti 8 dosi o 10 dosi da 0,5 mL per flaconcino (vedere paragrafo 6.5).

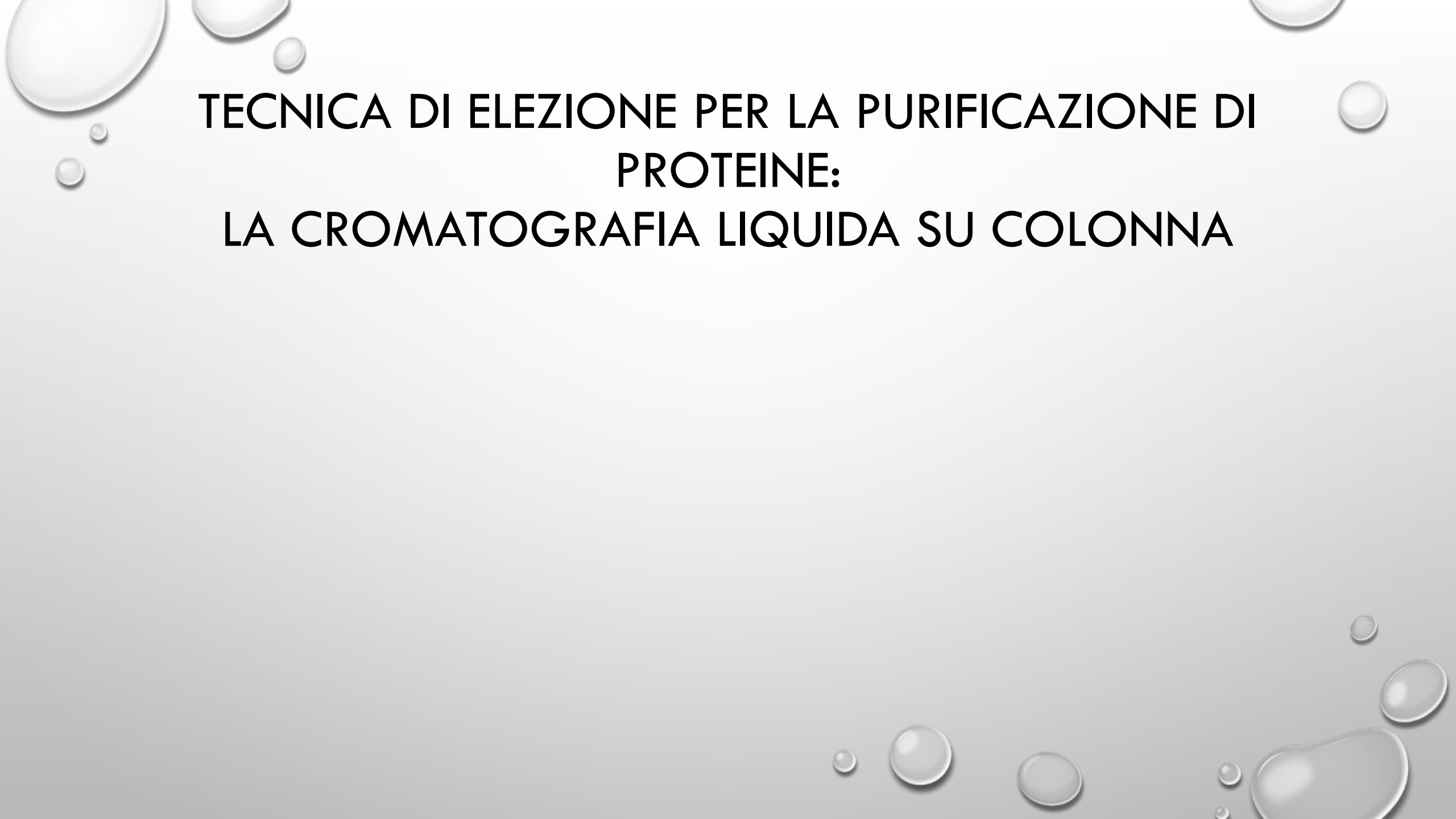
Una dose (0,5 mL) contiene:

Adenovirus di scimpanzé che codifica per la glicoproteina spike del SARS-CoV-2 (ChAdOx1-S)*, non inferiore a $2,5 \times 10^8$ unità infettive (U.Inf)

*Prodotto in cellule renali embrionali umane geneticamente modificate (HEK) 293 e mediante tecnologia del DNA ricombinante.

Meccanismo d'azione

COVID-19 Vaccine AstraZeneca è un vaccino monovalente composto da un singolo vettore ricombinante di adenovirus di scimpanzé con deficit di replicazione (ChAdOx1) che codifica per la glicoproteina S di SARS-CoV-2. L'immunogeno SARS-CoV-2 S nel vaccino è espresso in conformazione di prefusione trimerica; la sequenza codificante non è stata modificata per stabilizzare la proteina S espressa in conformazione di prefusione. Dopo la somministrazione, la glicoproteina S di SARS-CoV-2 viene espressa localmente stimolando gli anticorpi neutralizzanti e le risposte immunitarie cellulari, che possono contribuire alla protezione contro COVID-19.

The background of the slide is a light gray gradient, decorated with several realistic water droplets of various sizes. Some droplets are clustered in the top-left and bottom-right corners, while others are scattered across the page. The droplets have highlights and shadows, giving them a three-dimensional appearance.

**TECNICA DI ELEZIONE PER LA PURIFICAZIONE DI
PROTEINE:
LA CROMATOLOGRAFIA LIQUIDA SU COLONNA**

CROMATO GRAFIA

(Cromatos= COLORE quindi, in
senso più ampio, proprietà;
Grafia= tracciato)

- LA CROMATOLOGRAFIA È UNA
TECNICA **SEPARATIVA**:

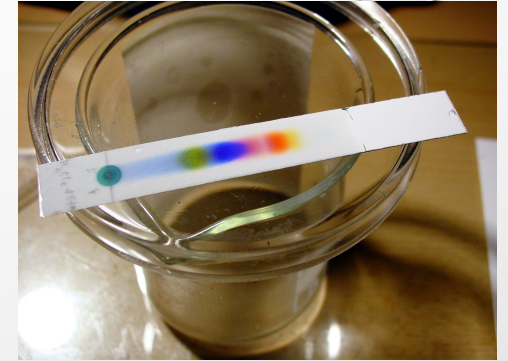
Fisicamente, separa una **mistura** nei
suoi singoli componenti.

- MA È ANCHE UNA TECNICA
ANALITICA:

Ogni componente separato dalla
mistura può essere identificato
grazie ad una sua **proprietà**.

Nel caso di **proteine**:

- peso molecolare,
- carica totale,
- gruppi funzionali,
- idrofobicità,
- affinità...



CROMATOGRAFIA LIQUIDA SU COLONNA

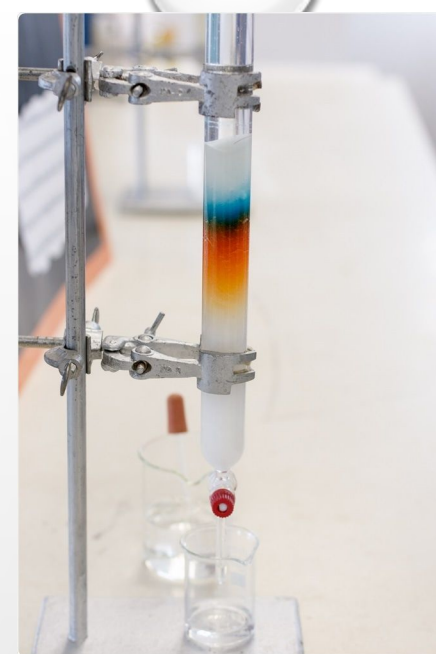


Le **COLONNE** sono tubi DENTRO
cui è impaccata la
FASE STAZIONARIA (una resina)

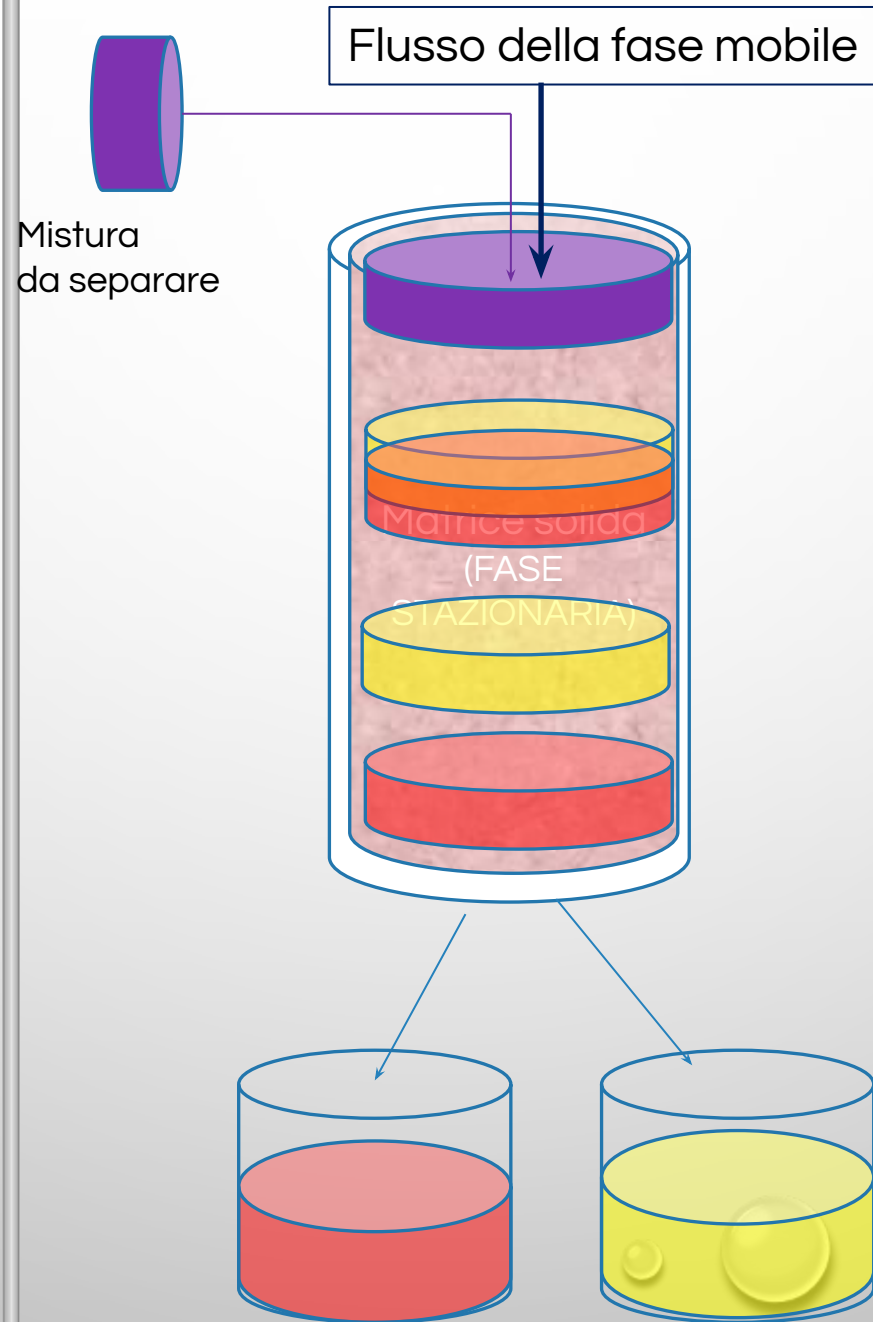
la **FASE MOBILE**
(solvente organico o acquoso)
flussa attraverso la resina:
- per gravità ,oppure
- spinto da una pompa.

L'**ELUIZIONE** è il processo con cui
la mistura da separare viene
trasportata attraverso la colonna
dal flusso della fase mobile.

La velocità media con cui un
analita si muove attraverso la
colonna è determinata dal tempo
che esso passa nella fase mobile.



PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO



-la **mistura** da separare viene inserita nella **FASE STAZIONARIA**.

-**LA FASE MOBILE** liquida (o gassosa) viene flussata attraverso la fase stazionaria

- La mistura viene dissolta nella fase mobile e inizia a fluire attraverso la fase stazionaria.

- La fase stazionaria compete con le componenti della mistura. I componenti con una forte affinità per la fase stazionaria e/o bassa affinità per la fase mobile rimarranno bloccati; I componenti molto solubili nella fase mobile e/o con bassa affinità per la fase stazionaria eluiscono più facilmente e...

AVVIENE LA SEPARAZIONE!

SISTEMI DI RIVELAZIONE PER CAMPIONI PROTEICI

IL PIU' USATO E' LO SPETTROFOTOMETRO:

- Assorbimento della luce nell'UV/vis
- UV: massimo assorbimento della proteina: 280 nm, dovuto principalmente ai **triptofani**.
- Visibile: metalloproteine

Altri sistemi usati:

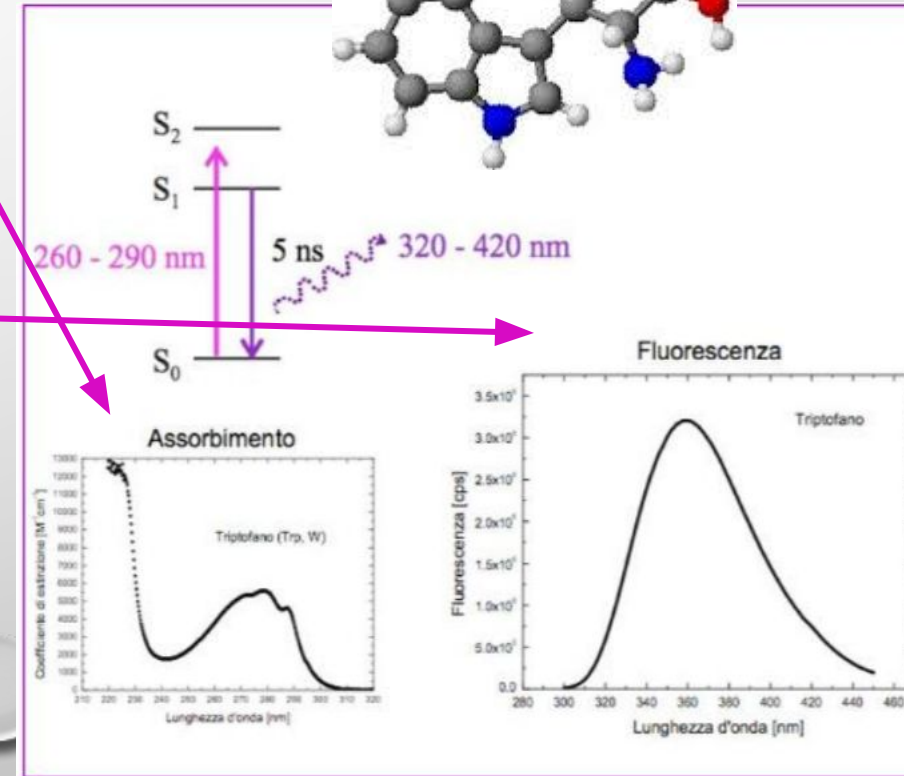
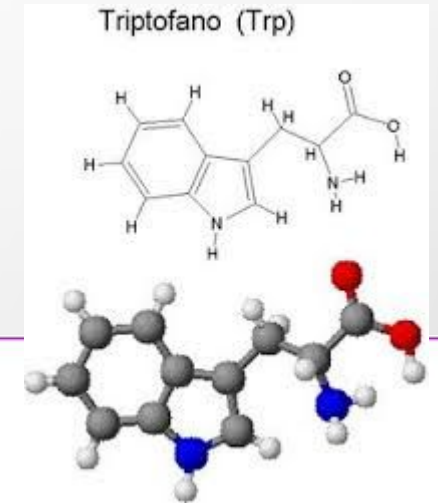
SPETTROFLUORIMETRO

- Fluorescenza

RADIODETECTORS

- Radioattività

Assorbimento delle proteine dovuto alle catene laterali degli aa aromatici (regione 270-290 nm) (Tryptofano, tirosina, fenilalanina)

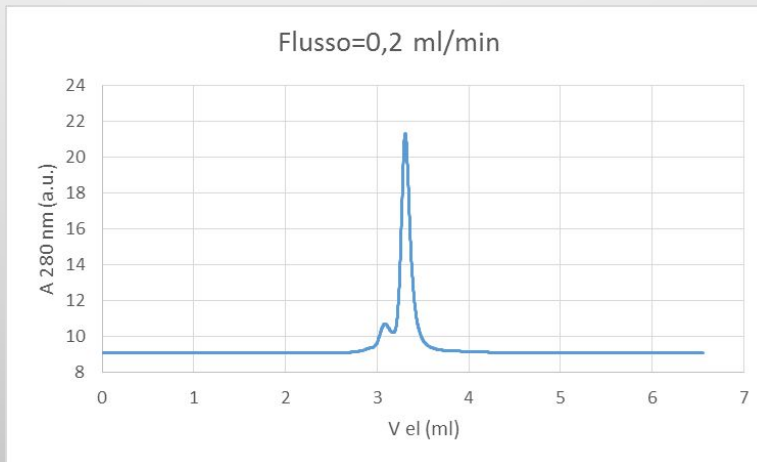
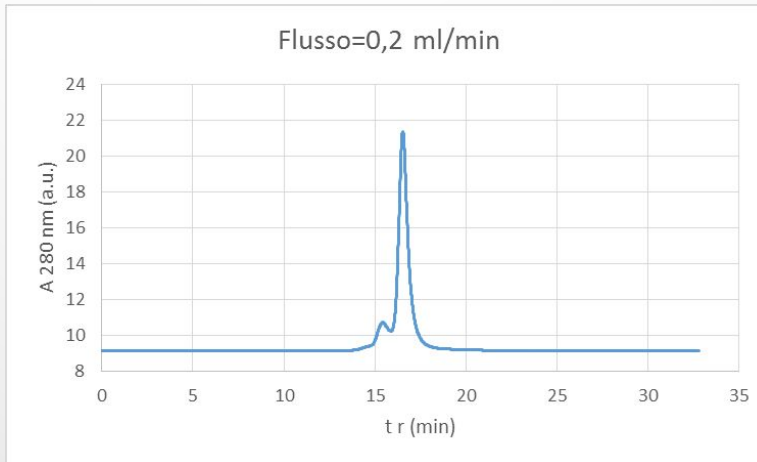


IL CROMATOGRAMMA

FLUSSO,
TEMPO di ritenzione,
VOLUME di ritenzione

Dal rivelatore si ottiene un CROMATOGRAMMA in cui compariranno picchi di assorbimento alla lunghezza d'onda selezionata (o di fluorescenza o di conteggi beta...) corrispondenti alla posizione di un campione, in funzione di

- tempo di ritenzione (t_R) o
- volume di eluizione (V_{el})



In **FISICA**, il flusso di una data grandezza fisica rappresenta la quantità della grandezza che attraversa nell'unità di tempo una data superficie.

Nel nostro caso, il flusso F è dato dal volume di fase mobile (V) che passa attraverso la sezione della colonna nell'unità di tempo (t)

$$F = V/t \text{ [ml/min]} \Rightarrow$$
$$V = F \cdot t \text{ [ml]}$$

Dato il flusso, possiamo convertire una grandezza nell'altra facilmente

Legge di continuità

flusso $F = V/t = \text{Area} \cdot ds/dt = \text{Area} \cdot \text{velocità}$

Legge di continuità:

Presi 2 tratti 1 e 2, il flusso nei 2 tratti è costante: $F_1 = F_2$

$$\Leftrightarrow A_1 \cdot v_1 = A_2 \cdot v_2$$

Tubi: diametro interno circa 0,2 mm

Colonna: diametro interno circa 3,5 mm

$$\text{Volume} = \text{Flusso} / \text{tempo}$$

$$\text{tempo} = \text{Volume} / \text{flusso}$$

SISTEMI DI CROMATOGRAFIA LIQUIDA SU COLONNA: FPLC e HPLC



• **FPLC** (Fast **Protein** Liquid Chromatography):

Basse pressioni : **max (435-580 psi) 30-40 atm = 3-4 MPa!**

Colonne molto grandi in vetro o plastica

Grande capacità di carico

Bassa risoluzione



DEDICATA
ALLA
SEPARAZIONE
DI PROTEINE

• **HPLC** (High Performance (Pressure) Liquid Chromatography)

Alte pressioni: 5800 – 7000 psi

(400 – 500 atm, 40-50 MPa)

Colonne strette in acciaio

Piccola capacità di carico

Alta risoluzione



PRESSIONE IN COLONNA

FPLC: Basse pressioni:
Massimo: 3-4 MPa (30-40 atm)

Unità di misura utilizzata: PSI (Pounds/square inch)

1 Pound = 0,454 Kg

1 inch = 0,0254 m

=> 1 PSI = 1 Pound/inch² = 0,454 Kg / (0,0254)² m²
= 703 kg/m²

Ricordando che la Pressione è definita come Forza per unità di superficie: $P = F/m^2$ dove

$F = ma$ (nel nostro caso forza peso, $a = g$, (Newton))

La pressione di 1 PSI corrisponde dunque a

1 PSI = 703 * 9,81 N/m² = 6900 N/m² = 6900 Pa (6,9 kPa)

HPLC: Alte pressioni:
Massimo: 40-50 MPa
5800-7000 PSI

Table 1: Pressure terms used in HPLC

Term	Pa (pascal)*	atm (atmosphere)	Bar	psi (pounds per square inch)
Pa (pascal)	1.0	9.8692×10^{-6}	10^{-5}	145.04×10^{-6}
atm (atmosphere)	101.325	1.0	1.01325	14.696
Bar	100,000	0.9869	1.0	14.504
psi (pounds per square inch)	6895	68.046×10^{-3}	68.948×10^{-3}	1.0

*Units of kPa (kilopascal) or MPa (megapascal) are frequently used.

COMPONENTI DI UN SISTEMA CROMATOGRAFICO

HPLC

FPLC

Fase mobile
(tampone)

pH-metro

Spettrofotometro
UV-visibile

Pompa

Colonna

Valvola di iniezione del campione



Tubo di uscita dello
spettrofotometro al
raccoltore di frazioni

Tubo di uscita dallo spettrofotometro al 'waste'

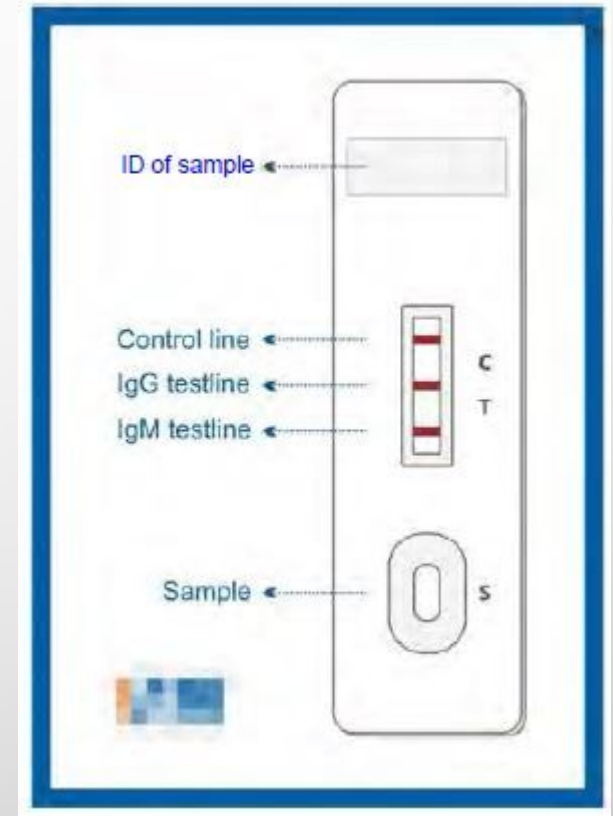
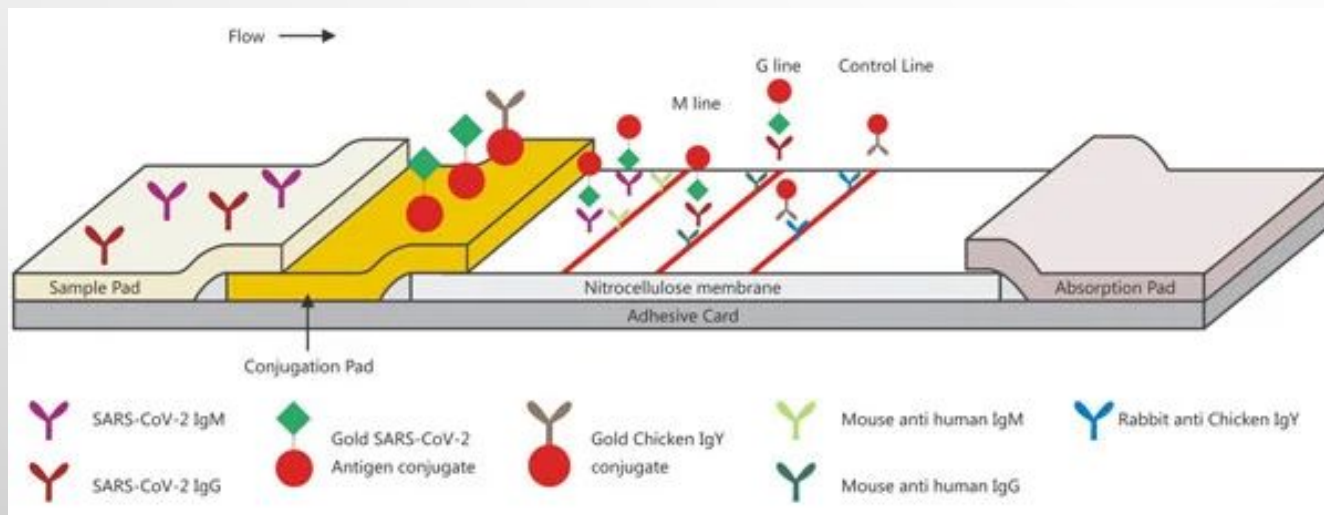


TECNICHE IN
CROMATOGRAFIA
LIQUIDA
per separazione di
proteine

Tecnica cromatografica	Acronimo	Principio di separazione
<i>Cromatografia liquida con modalità non interattiva</i>		
Esclusione Molecolare (Size-exclusion) o Gel filtrazione	SEC GFC	Differenze in peso molecolare
<i>Cromatografia liquida con modalità interattiva</i>		
Scambio ionico (Ion-exchange)	IEC	Interazioni elettrostatiche (carica)
Fase normale (Normal-phase)	NPC	Interazioni polari
Fase inversa (Reversed-phase)	RPC	Interazioni dispersive
Interazione idrofobica (Hydrophobic interaction)	HIC	Interazioni dispersive
Affinità	AC	Interazioni biospecifiche
Affinità per metalli (Metal affinity)	MAC	Interazioni specifiche con metalli immobilizzati in matrice

CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ': immunocromatografia

SARS-CoV-2 Antigen Rapid Test Kit (colloidal gold immunochromatography), da TAMPONE NASALE



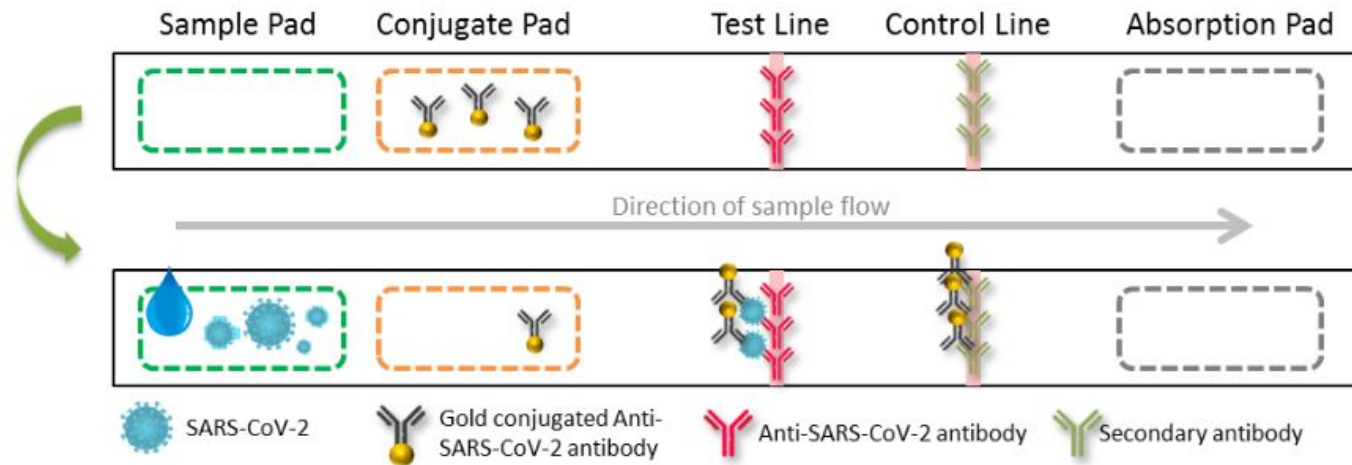
<https://www.mybiosource.com/covid-19-assay-kits/covid-19-nucleoprotein-n-spike-glycoprotein-s-antibody-immunochromatography-coronaviruses/7135927>

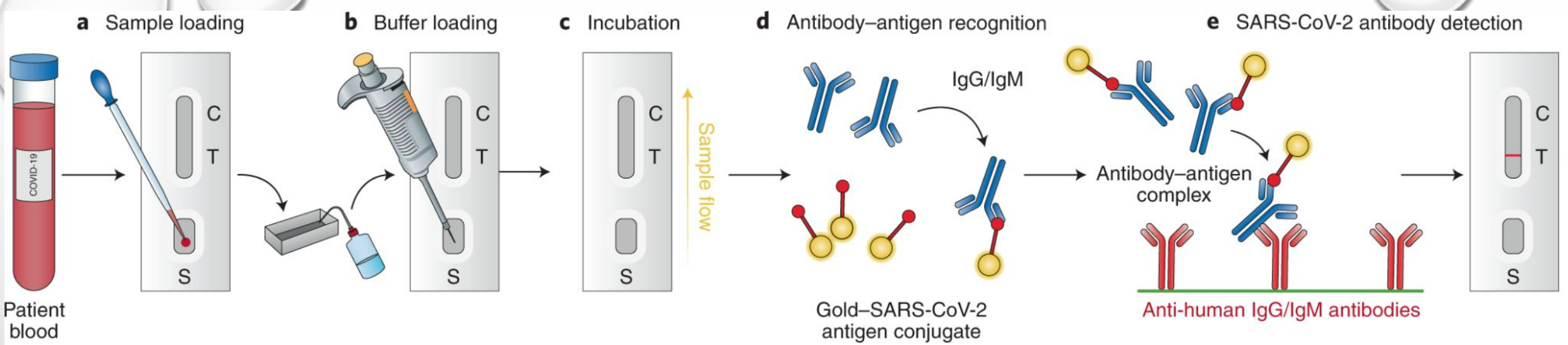
COVID-19 (SARS-CoV-2) Antigen Rapid Detection Kit (lateral flow immunoassay)

Detection of viral infections can be obtained in the early stages of a disease by detection of viral antigens directly in the clinical specimen.

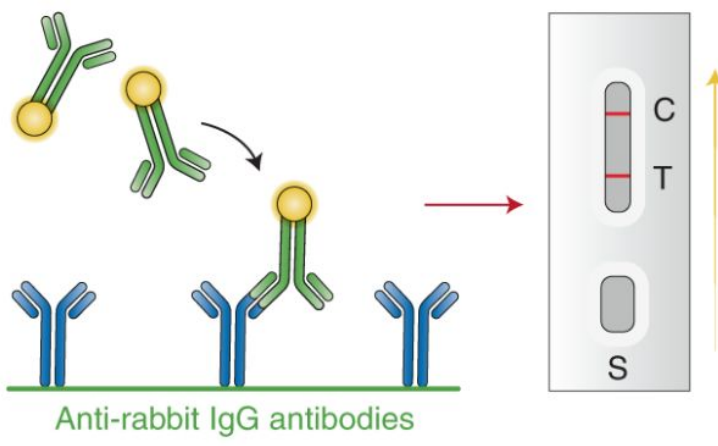
Lateral flow immunoassay design for COVID-19 (SARS-CoV-2) antigens detection:

- **Sample Pad:** acts as absorption process, and in some cases contains a filter, to ensure the accurate and controlled flow of the sample.
- **Conjugate Pad:** stores the **Gold conjugated COVID-19 (SARS-CoV-2) antibody**, will recognize the target antigen (such as spike protein) in sample. If the virus is present, the conjugated SARS-CoV-2 antibody will bind to the virus and continue to migrate along the test.
- **Test Line:** prints **anti-COVID-19 (SARS-CoV-2) antibody**, also recognize the target antigen (such as spike protein) in sample. As the sample moves along the device, the **anti-COVID-19 (SARS-CoV-2) antibody** situated on the nitrocellulose membrane will bind to the target antigen at the test line. A coloured line will form duo to the same target antigens were bound by Gold conjugated COVID-19 (SARS-CoV-2) antibody.
- **Control Line:** prints **secondary antibody**, recognize the Fc/Fab/or H+L chain of Gold conjugated COVID-19 (SARS-CoV-2) antibody. A coloured line will form duo to Gold conjugated COVID-19 (SARS-CoV-2) antibody.
- **Absorbent Pad:** The sample will pass through the nitrocellulose membrane into the absorbent pad. The absorbent pad will absorb the excess sample.

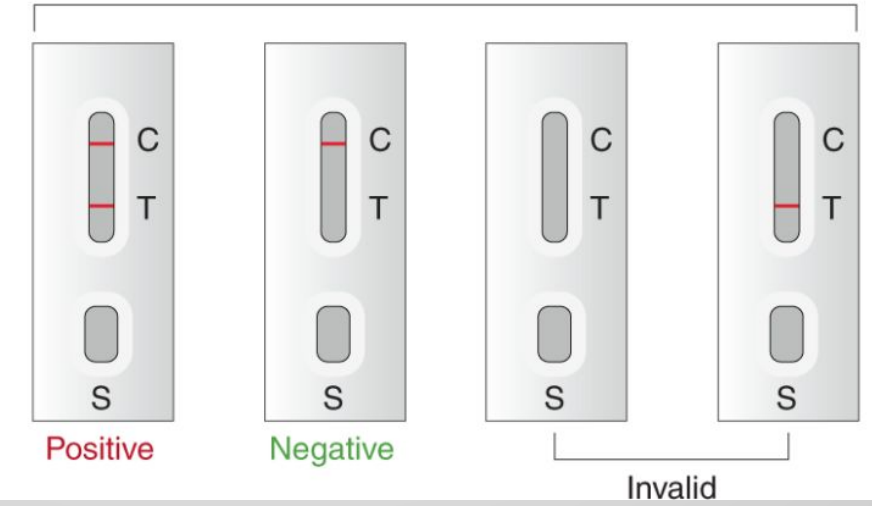




f Control antibody detection rabbit-gold conjugate



g



Analysis of results

Positive
One lateral flow strip each in C well and T well

Negative
One lateral flow strip in C well

GEL FILTRAZIONE (GFC) ○ ESCLUSIONE MOLECOLARE (SEC – SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAP HY)

GFC - SEC

- Modalità non interattiva.
- Setaccio molecolare: separazione in base alle dimensioni
- Resina composta da sferette (beads) polimeriche porose

SEM of Yarra™
3µm Particle

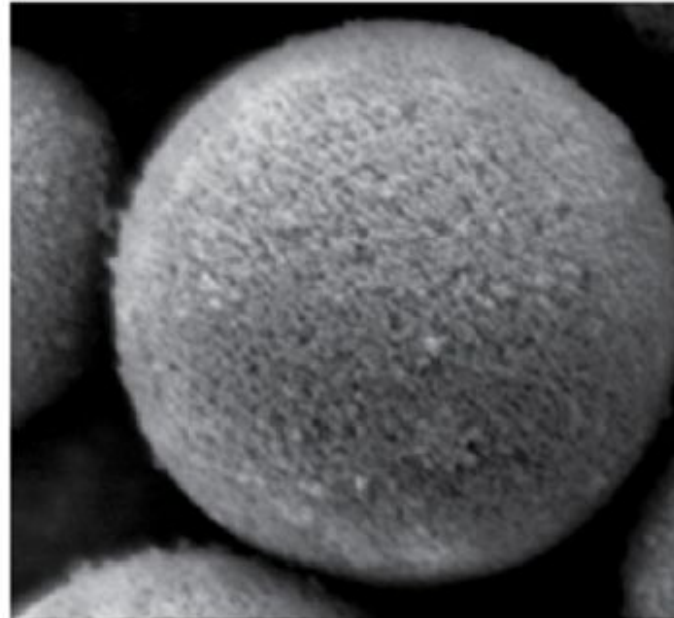
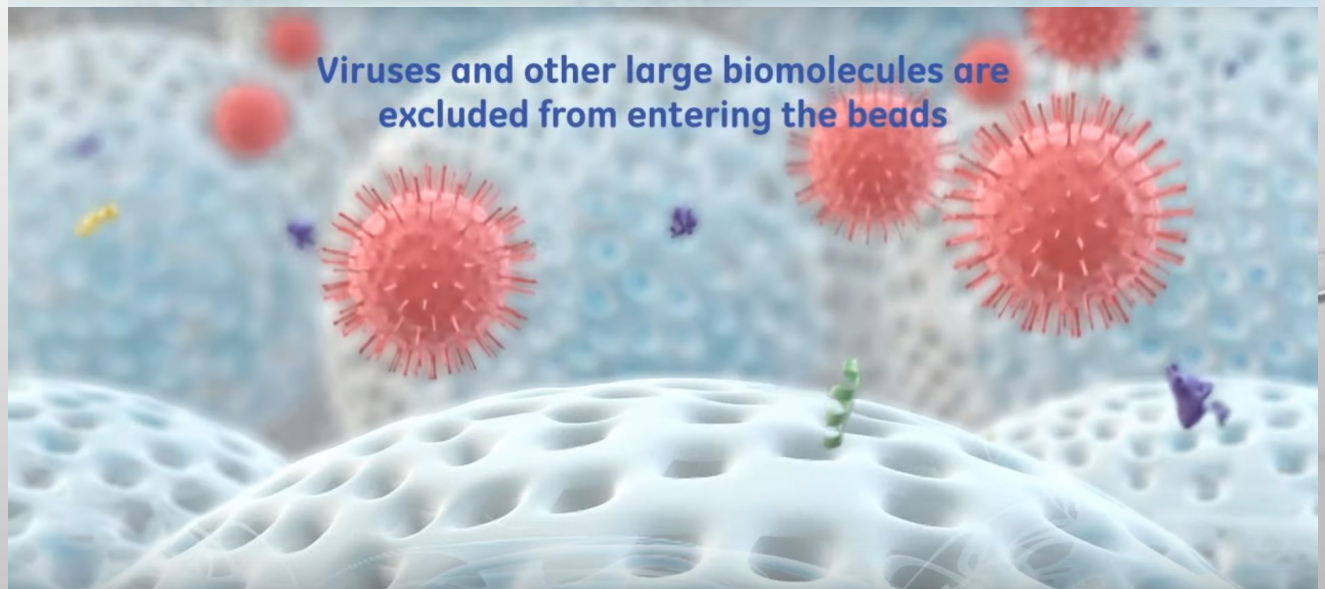
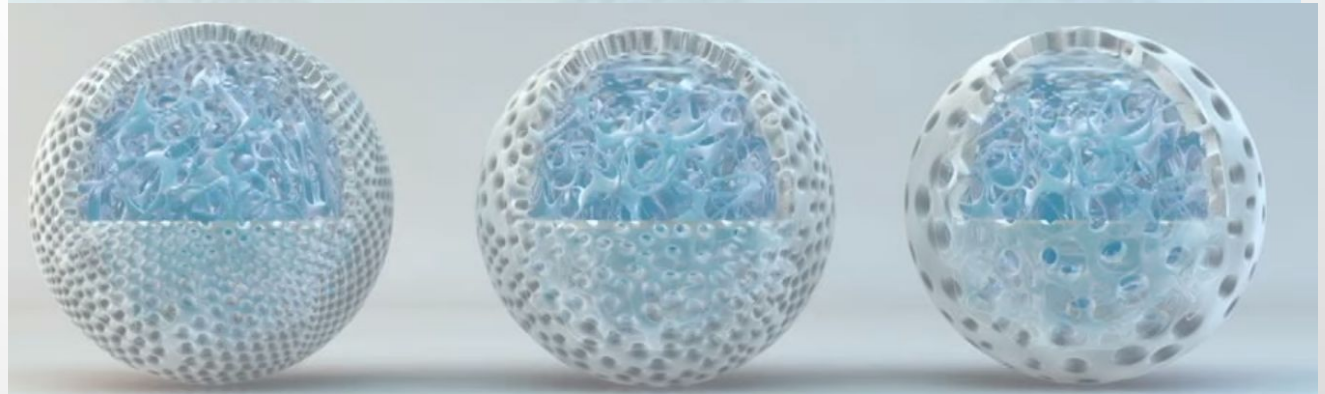
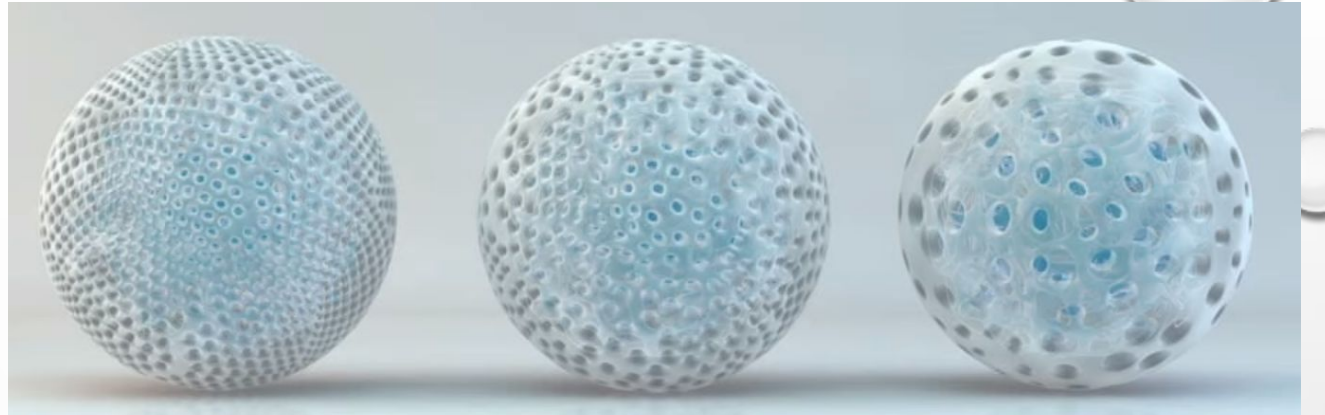


Immagine in microscopia elettronica (SEM) di una bead di diametro 3 µm. La **dimensione dei pori** determina le dimensioni delle molecole che possono essere separate (la capacità della colonna).

GEL
FILTRAZIONE
(GFC) O
ESCLUSIONE
MOLECOLARE
(SEC)



GEL FILTRAZIONE (GFC) O ESCLUSIONE MOLECOLARE (SEC)

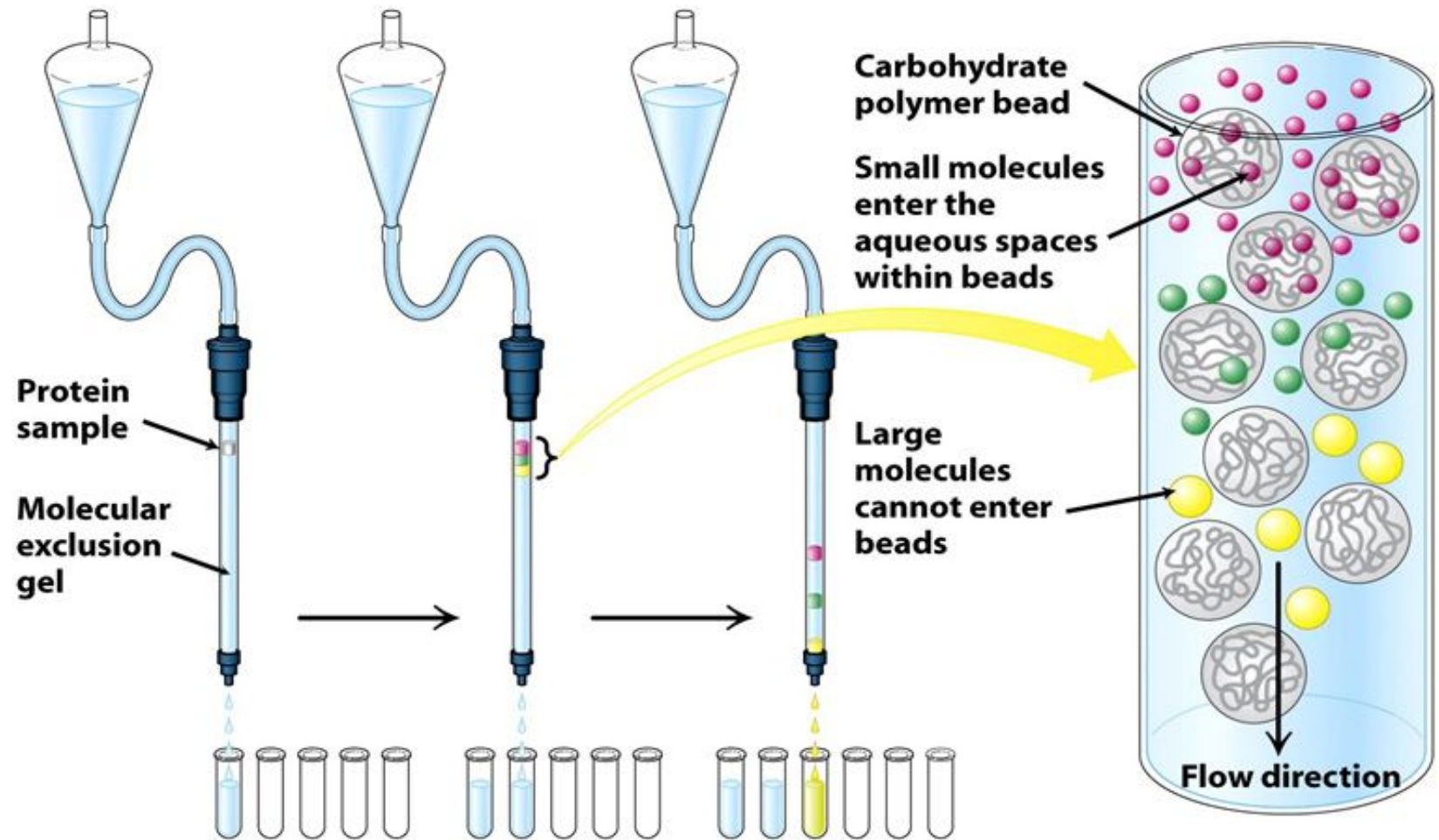
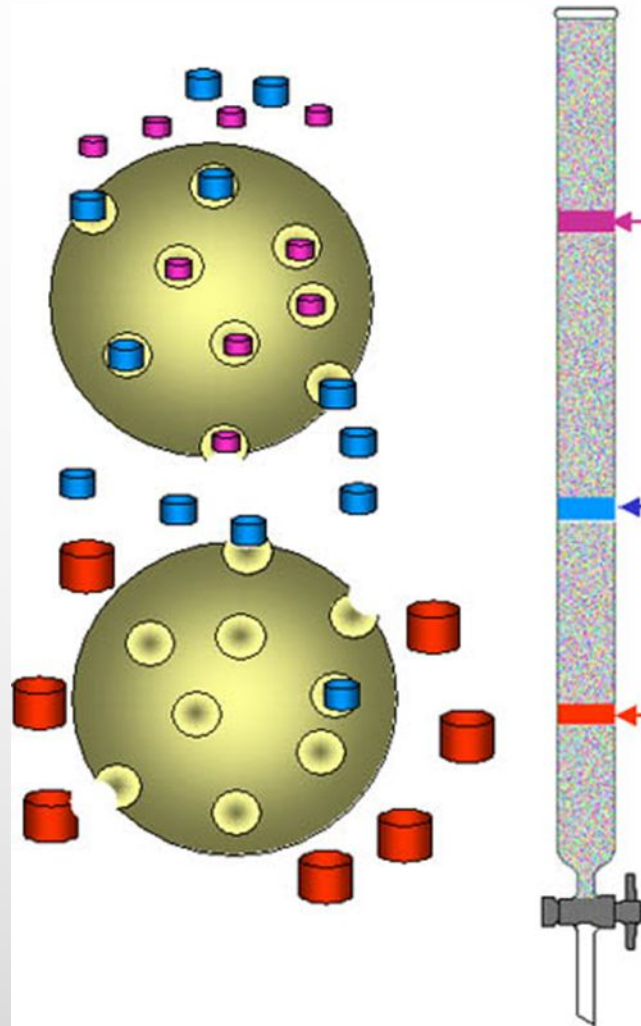


Figure 3-3
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

VOLUMI DI ELUIZIONE



V_{tot} (VOLUME TOTALE)

Proteine molto piccole entrano in tutti i pori delle beads e compiono un percorso molto lungo, quindi eluiscono a tempi molto lunghi. Tutte le proteine con dimensioni minori di un certo valore eluiranno allo stesso tempo, t_{tot} corrispondente al V_{tot} .

RANGE DI SEPARAZIONE V_{el}

Proteine con dimensioni intermedie entrano in alcuni pori del gel. Il tempo di percorrenza (e quindi il volume di eluizione V_{el}) è inversamente proporzionale alle loro dimensioni.

V_0 (VOLUME MORTO)

Proteine molto grandi, con diametro maggiore delle dimensioni dei pori, compiono un percorso quasi lineare ed eluiscono a tempi molto brevi. Tutte le proteine con un diametro maggiore delle dimensioni dei pori usciranno allo stesso tempo, t_0 corrispondente al V_0 .



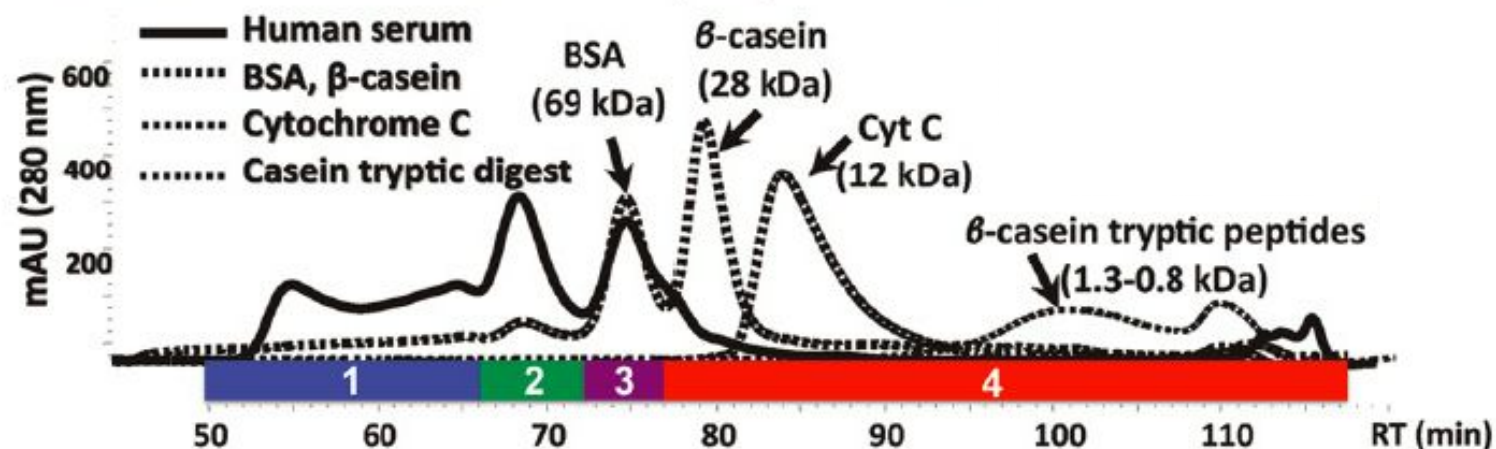
I LAB

SEPARAZIONE DI PROTEINE DEL SIERO MEDIANTE SEC
E DETERMINAZIONE DEL PESO MOLECOLARE

CROMATOGRAMMA DEL SIERO UMANO

DETERMINAZIONE DEL PESO MOLECOLARE

SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY (SEC) - SEGMENTED PROTEIN PRE-FRACTIONATION



✓ Cite this: *Anal. Chem.* 2011, 83, 3, 708-718
Publication Date: December 21, 2010
<https://doi.org/10.1021/ac102075d>
Copyright © 2010 American Chemical Society
[RIGHTS & PERMISSIONS](#) ACS AuthorChoice

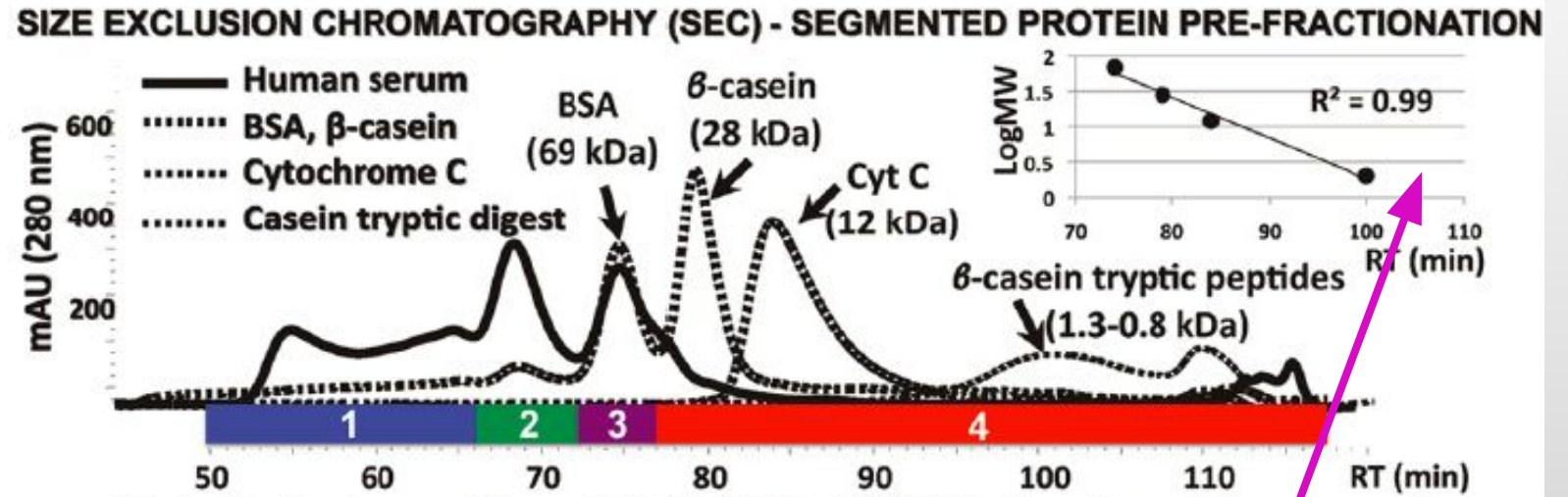
Il tempo di ritenzione T_R (e il Vel) di una proteina e' dipendente in maniera lineare dal **logaritmo** del PESO MOLECOLARE (MW) della **stessa** (se vale l'approssimazione di una molecola GLOBULARE)

$$T_R = a * \log(MW) + b$$

CROMATOGRAMMA DEL SIERO UMANO

DETERMINAZIONE
E DEL PESO
MOLECOLARE:

RETTA DI
TARATURA



✓ Cite this: *Anal. Chem.* 2011, 83, 3, 708-718
Publication Date: December 21, 2010
<https://doi.org/10.1021/ac102075d>
Copyright © 2010 American Chemical Society
RIGHTS & PERMISSIONS ACS AuthorChoice

La RETTA DI TARATURA IN SEC si costruisce utilizzando come
STANDARD
proteine GLOBULARI con peso molecolare noto,
riportando il log MW in funzione del tempo di ritenzione

CROMATOGRAMMA DEL SIERO UMANO

PROTOCOLLO

Il frazionamento SEC è stato condotto utilizzando una colonna shodex KW804 alla temperatura di 15°C con un flusso di 0,2 mL/min a monitorato alla lunghezza d'onda di 280 nm.

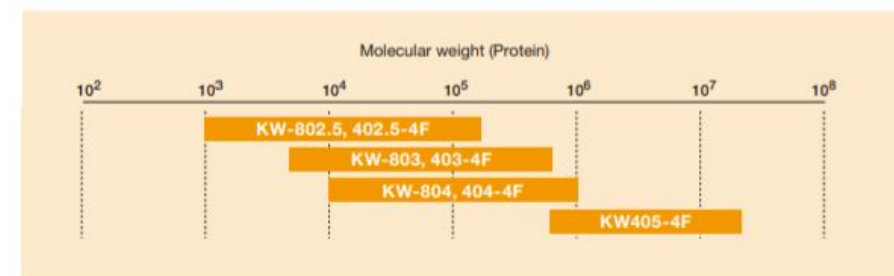
Un volume di 200 ul di siero diluito contenente 7,4 mg totali di proteine è stato iniettato nella colonna. Standard proteici utilizzati: Albumina di siero bovino (67 kDa), beta-caseina (28 kDa), citocromo c (12 kDa) e peptidi triptici della beta caseina (1,3 – 0,8 kDa)

FASE MOBILE: KH_2PO_4 50 mM, Tris 10 mM, pH 7.0

PROTEIN KW-804 [Login/Register](#)

Product Exclusion limit (Proteins)	1,000,000
Product Exclusion limit (Pullulan)	500,000
Product Particle size, um	7
Product pH range	3 - 7.5
Product Plate number (TP/Column)	>16,000
Product Pore Size Maximum	1,500
Product Size (I.D. x Length, mm)	8.0 x 300

Molecular weight range with protein (eluent : phosphate buffer)



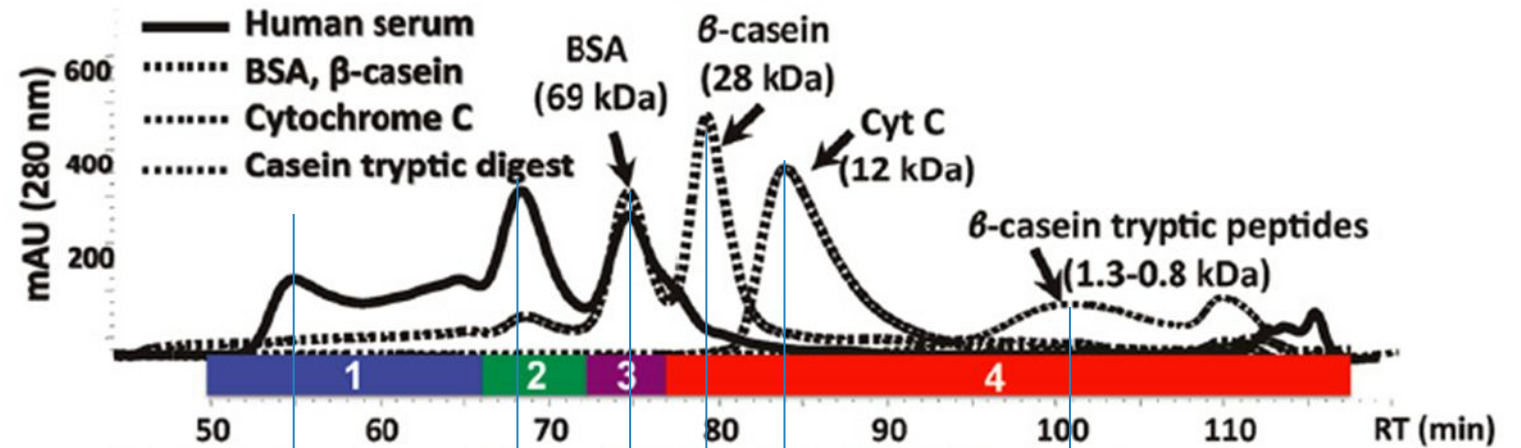
=> Range di separazione della colonna: da 10 a 1000 kDa

DETERMINAZIONE
E DEL PESO
MOLECOLARE:

PROTOCOLLO

CROMATOGRAMMA DEL SIERO UMANO

SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY (SEC) - SEGMENTED PROTEIN PRE-FRACTIONATION



RICOSTRUIAMO LA
RETTA DI TARATURA DAL
CROMATOGRAMMA

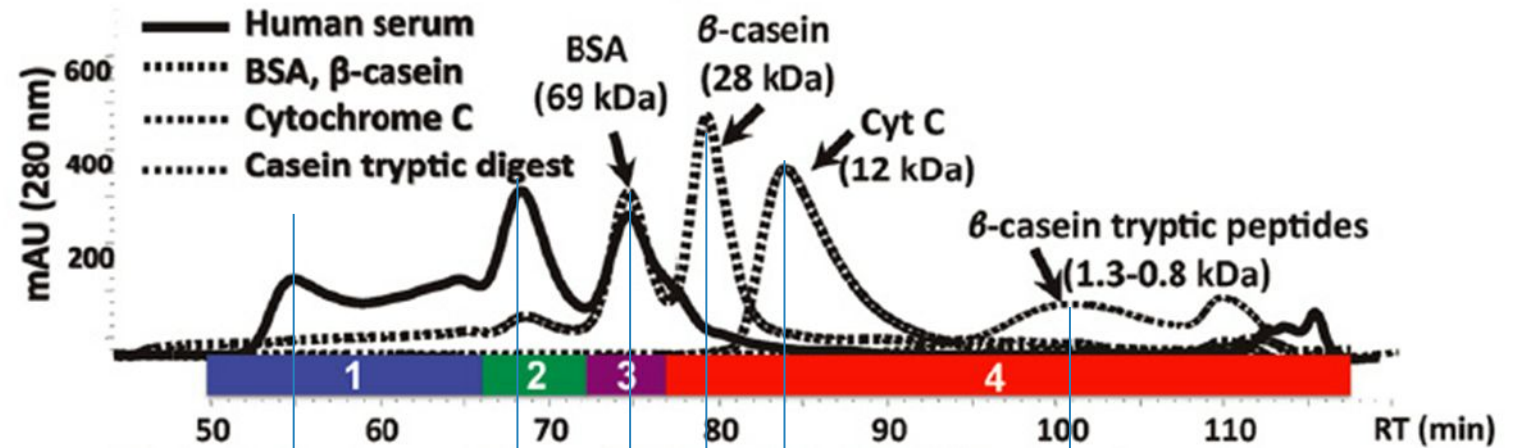
1) LEGGIAMO ED
ANNOTIAMO IL TEMPO
DI RITENZIONE DI OGNI
STANDARD SU UN
FOGLIO EXCEL

STANDARD	Peso molecolare (Kda)	Tempo di ritenzione (min)
Albumina di siero bovino (BSA)	67	75
Beta caseina	28	79
Citocromo C	12	84
Prodotti proteolitici	1.2	101

NB i prodotti proteolitici escono a T_{tot} (V_{tot}) perché il loro peso è minore del minimo nel range di separazione!

CROMATOGRAMMA DEL SIERO UMANO

SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY (SEC) - SEGMENTED PROTEIN PRE-FRACTIONATION



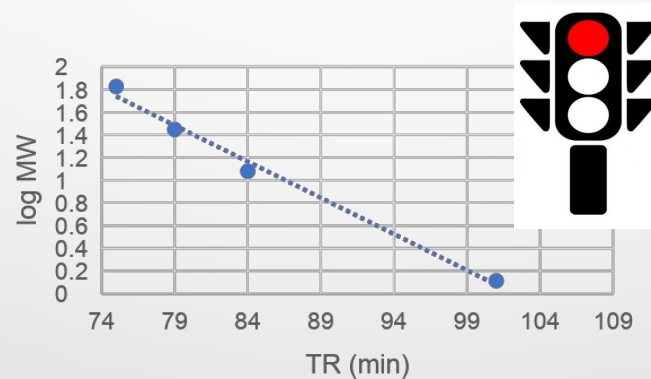
RICOSTRUIAMO LA
RETTA DI TARATURA
DAL
CROMATOGRAMMA
2) CALCOLIAMO IL
LOGARITMO DEL PESO
MOLECOLARE

STANDARD	Peso molecolare (Kda)	Tempo di ritenzione (min)	log MW
Albumina di siero bovino (BSA)	67	75	1,826074803
Beta caseina	28	79	1,447158031
Citocromo C	12	84	1,079181246
Prodotti proteolitici	1,3	101	0,113943352

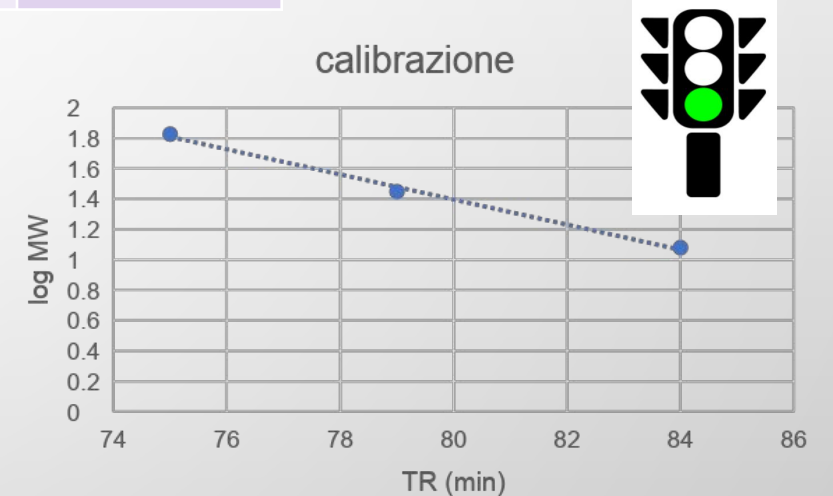
RICOSTRUIAMO LA RETTA DI TARATURA DAL CROMATOGRAMMA

3) COSTRUIAMO UN
GRAFICO RIPORTANDO
IN ASCISSE IL TR ED IN
ORDINATE IL LOG MW

STANDARD	Peso molecolare (Kda)	Tempo di ritenzione (min)	log MW
Albumina di siero bovino (BSA)	67	75	1,826074803
Beta caseina	28	79	1,447158031
Citocromo C	12	84	1,079181246
Prodotti proteolitici	1,3	101	0,113943352



Curva SBAGLIATA dove abbiamo inserito il punto corrispondente ai prodotti proteolitici



CURVA GIUSTA CON SOLO GLI STANDARD CON PESI COMPRESI NEL RANGE DI SEPARAZIONE

RICOSTRUIAMO LA RETTA DI TARATURA DAL CROMATOGRAMMA

4) RIPIANTIAMO I DATI IN FUNZIONE DEL VOLUME DI ELUZIONE E DEL COEFFICIENTE DI PARTIZIONE K

1) Volume di eluzione.

Dal protocollo abbiamo che il flusso (F) è di 0,2 mL/min

$$\Rightarrow V_{el} = TR \cdot F$$

STANDARD	Peso molecolare (Kda)	Tempo di ritenzione (min)	log MW	V _{el} (ml)
(BSA)	67	75	1,826074803	15
Beta caseina	28	79	1,447158031	15,8
Citocromo C	12	84	1,079181246	16,8
Prodotti proteolitici	1,3	101	0,113943352	20,2

1) Coefficiente di partizione.

$$K_{av} = (V_{el} - V_0) / (V_t - V_0)$$

Corrisponde ad una NORMALIZZAZIONE del cromatogramma tra 0 e 1.

Infatti per campioni che escono a $V = V_0$, $K_{av} = 0$

Per campioni che escono a V_{tot} , $K_{av} = 1$

Tutti i campioni che rientrano nel range di separazione avranno

$$0 < K_{av} < 1$$

Nella nostra retta manca un campione ad alto peso molecolare per determinare V_0 .

1) Volume di eluizione.

Dal protocollo abbiamo che il flusso (F) è di 0,2 mL/min

$$\Rightarrow V_{el} = TR \cdot F$$

STANDARD	Peso molecolare (Kda)	Tempo di ritenzione (min)	log MW	V _{el} (ml)
(BSA)	67	75	1,826074803	15
Beta caseina	28	79	1,447158031	15,8
Citocromo C	12	84	1,079181246	16,8
Prodotti proteolitici	1,3	101	0,113943352	20,2

RICOSTRUIAMO LA
RETTA DI TARATURA DAL
CROMATOGRAMMA

4) RIPORTIAMO I DATI
IN FUNZIONE DEL
VOLUME DI ELUIZIONE E
DEL COEFFICIENTE DI
PARTIZIONE K

RICOSTRUIAMO LA RETTA DI TARATURA DAL CROMATOGRAMMA

4) DETERMINIAMO IL COEFFICIENTE DI PARTIZIONE

Coefficiente di partizione

$$K_{av} = (V_{el} - V_0) / (V_t - V_0)$$

Corrisponde ad una NORMALIZZAZIONE del cromatogramma tra 0 e 1.

Infatti per campioni che escono a $V=V_0$, $K_{av}=0$

Per campioni che escono a V_{tot} , $K_{av}=1$

Tutti i campioni che rientrano nel range di separazione avranno

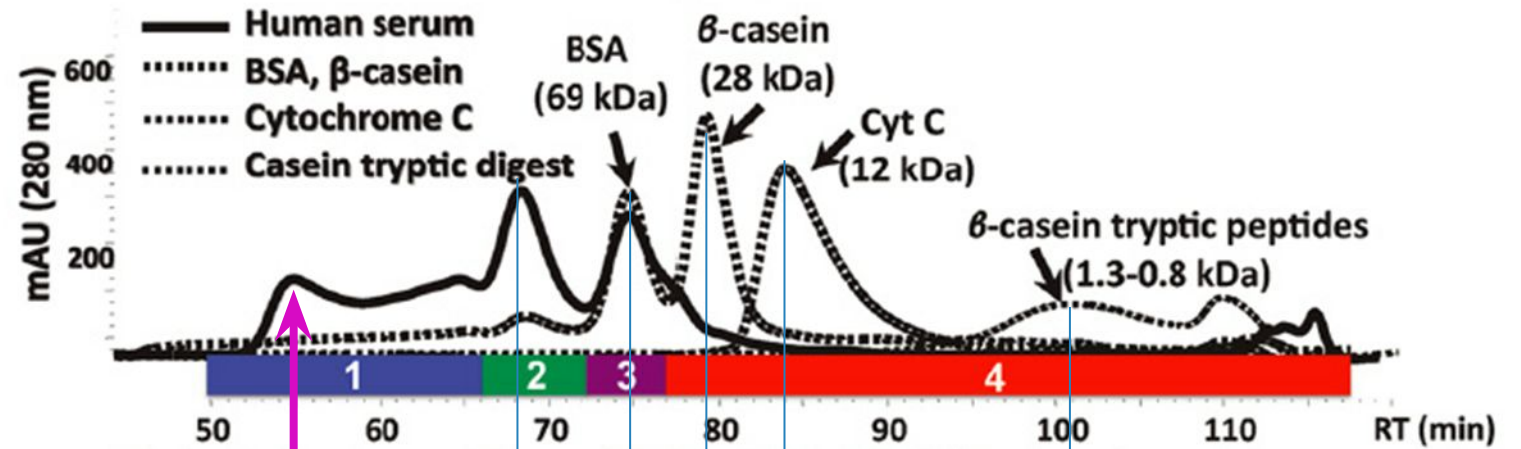
$$0 < K_{av} < 1$$

Nella nostra retta manca un campione ad alto peso molecolare per determinare V_0

Ma c'è un picco asimmetrico a volume molto basso che è sicuramente un V_0 :

CROMATOGRAMMA DEL SIERO UMANO

SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY (SEC) - SEGMENTED PROTEIN PRE-FRACTIONATION

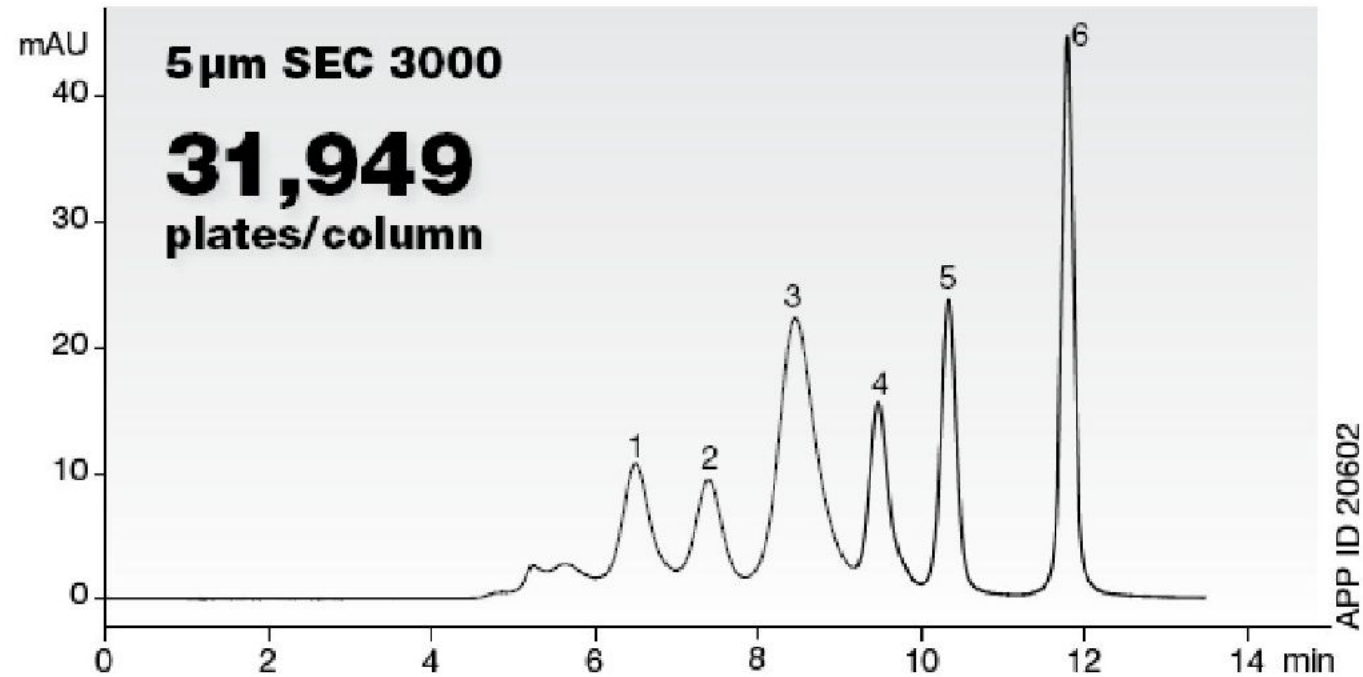


RICOSTRUIAMO LA
RETTA DI TARATURA DAL
CROMATOGRAMMA

4) DETERMINIAMO IL
COEFFICIENTE DI
PARTIZIONE

STANDARD	Peso molecolare (Kda)	Tempo di ritenzione (min)
Albumina di siero bovino (BSA)	67	75
Beta caseina	28	79
Citocromo C	12	84
Prodotti proteolitici	1,3	101

ESERCITAZIONE da fare a casa



Questo è il cromatogramma ottenuto in HPLC leggendo l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 280 nm di un mix di proteine/molecole standard iniettato su una colonna di gel filtrazione YARRA SEC 3000.

Standard:

1. tiroglobulina (699 kDa)
2. IgA (300 kDa)
3. IgG (150 kDa)
4. Ovalbumina (44 kDa)
5. Mioglobina (17 kDa)
6. Uridina (0.244 kDa)

Per ogni standard, misurare il tempo di eluizione t_{el} con un righello.

Su un foglio excel calcolare quindi il volume di eluizione (V_{el}) ed il logaritmo del peso molecolare (Log MW).

Graficare il log MW in funzione di V_{el} e ricavare l'equazione della retta che meglio fitta i punti.

E' possibile calcolare il coefficiente di partizione: $K_d = (V_t - V_{el}) / (V_t - V_0)$?

A quale tempo di eluizione dovrebbe uscire un campione di BSA pura?

THE END

The image features a light gray gradient background. In the top-left and bottom-right corners, there are clusters of realistic, 3D-rendered water droplets of various sizes. The droplets have highlights and shadows, giving them a sense of depth and volume. The text 'THE END' is centered in the upper half of the image in a bold, black, sans-serif font.