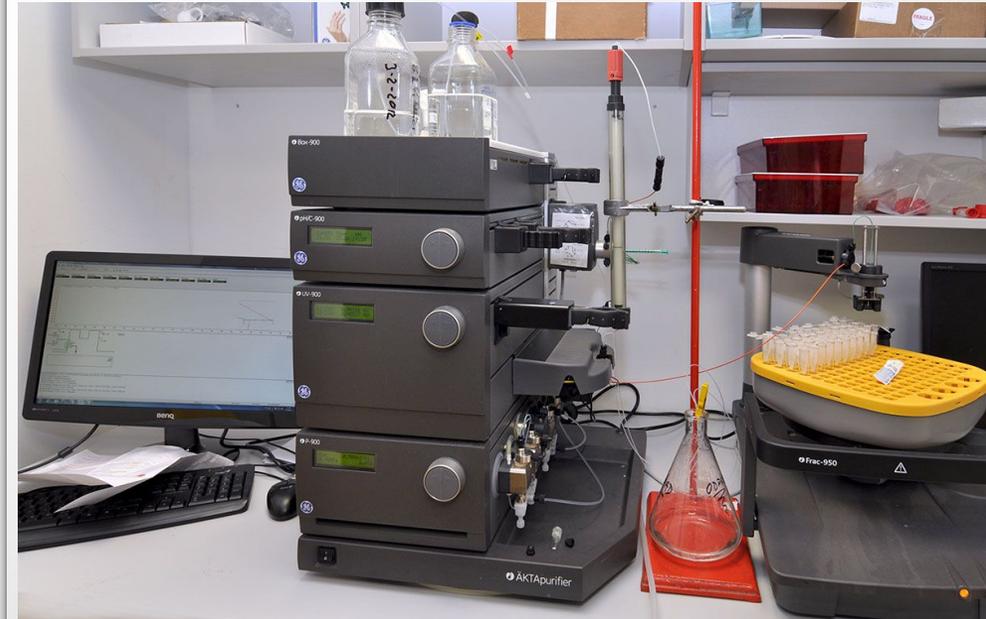


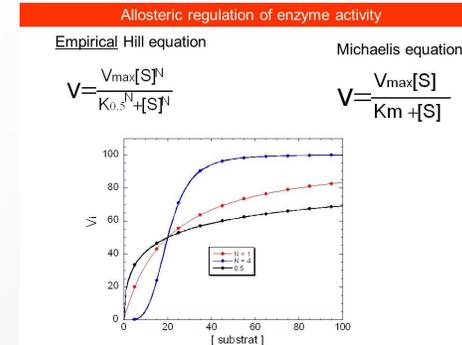
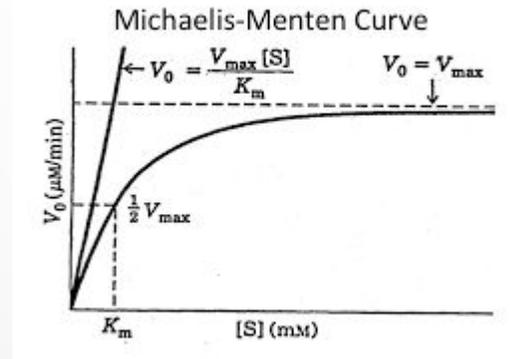
# LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA SU COLONNA PER LA PURIFICAZIONE DI PROTEINE

ANNALaura SABATUCCI

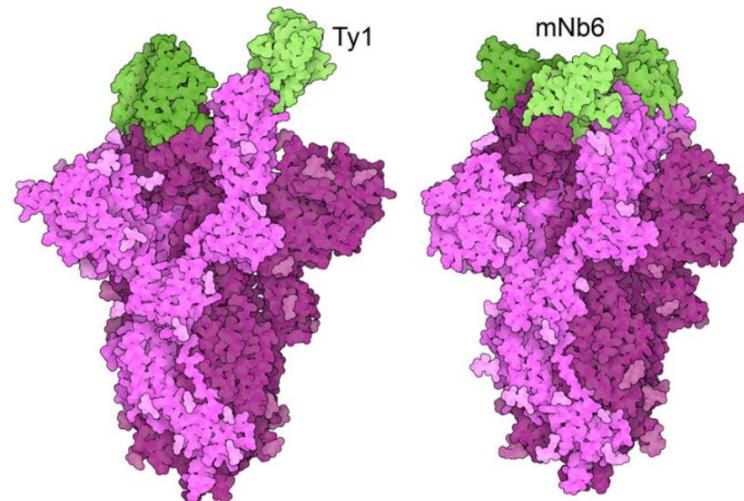


# PERCHÉ PURIFICARE UNA PROTEINA?

## PER STUDIARE LA FUNZIONE



## PER STUDIARE LA STRUTTURA



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

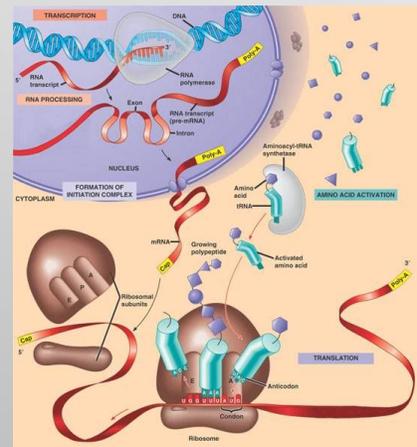
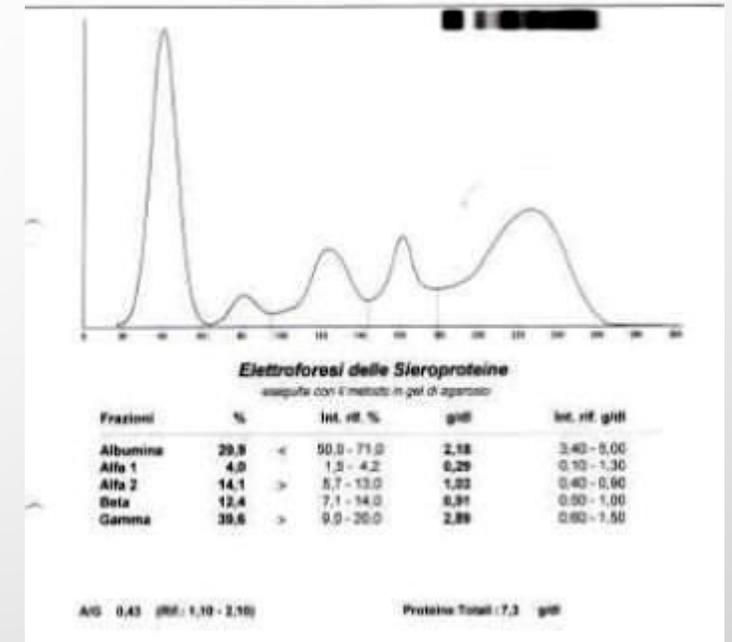
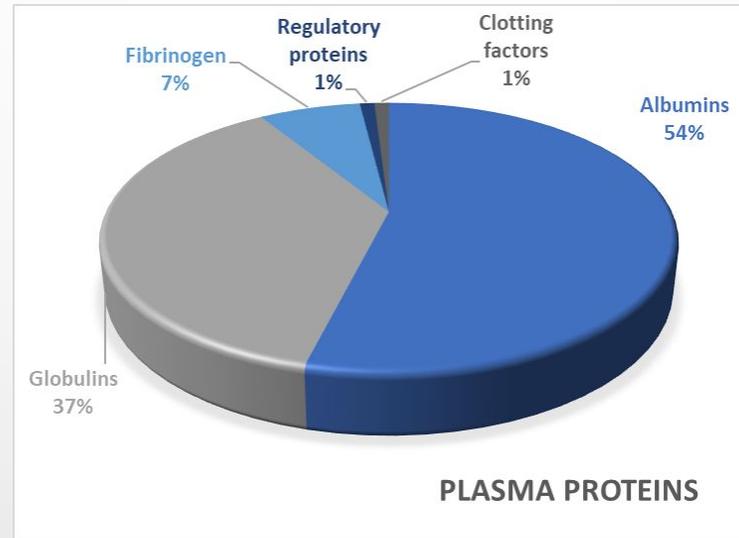
### Nanobodies

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
<b>Albumins:</b> Albumin, pre-albumin (transthyretin)
<b><math>\alpha_1</math>-globulins:</b> Thyroxin-binding globulin, transcortin, $\alpha_1$ -acid glycoprotein, $\alpha_1$ -antitrypsin, $\alpha_1$ -lipoprotein (HDL), $\alpha_1$ -fetoprotein
<b><math>\alpha_2</math>-globulins:</b> Haptoglobin, macroglobulin, ceruloplasmin
<b><math>\beta</math>-globulins:</b> Transferrin, hemopexin, lipoprotein (LDL), fibrinogen, C-reactive protein, C3 and C4 components of the complement system
<b><math>\gamma</math>-globulins:</b> IgG, IgM, IgA, IgD, IgE

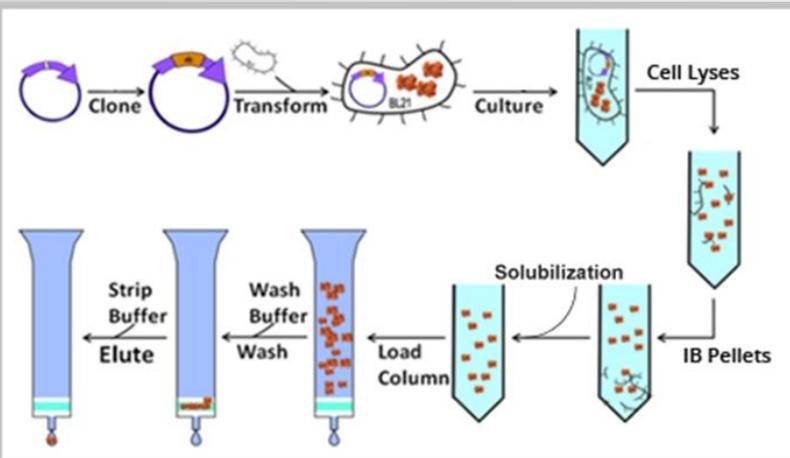
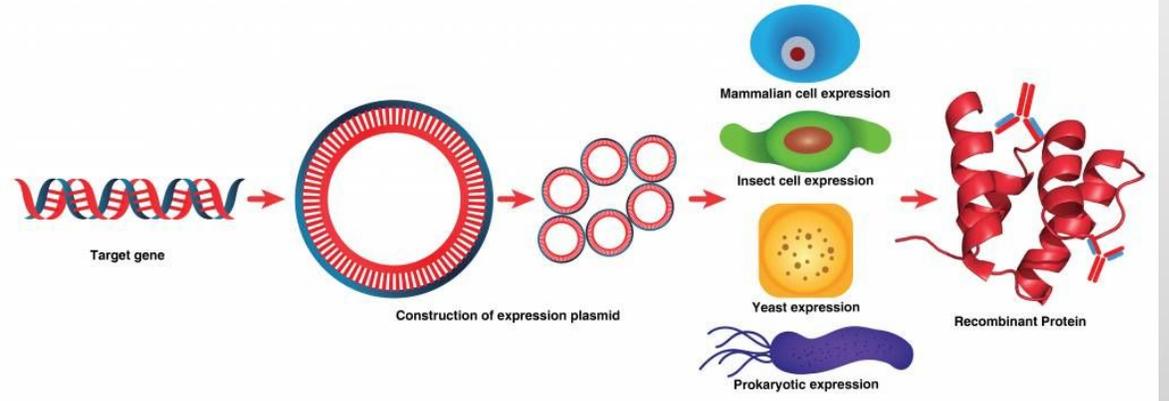
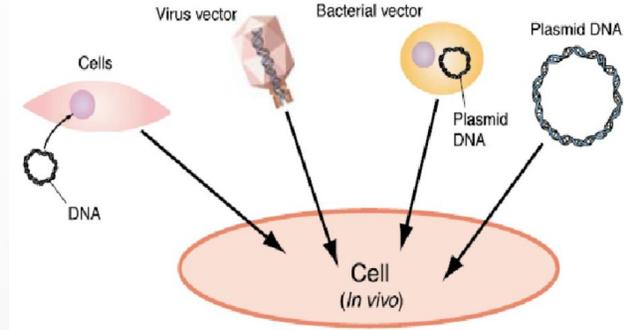
Protidogramma  
(elettroforesi sieroproteica)

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).

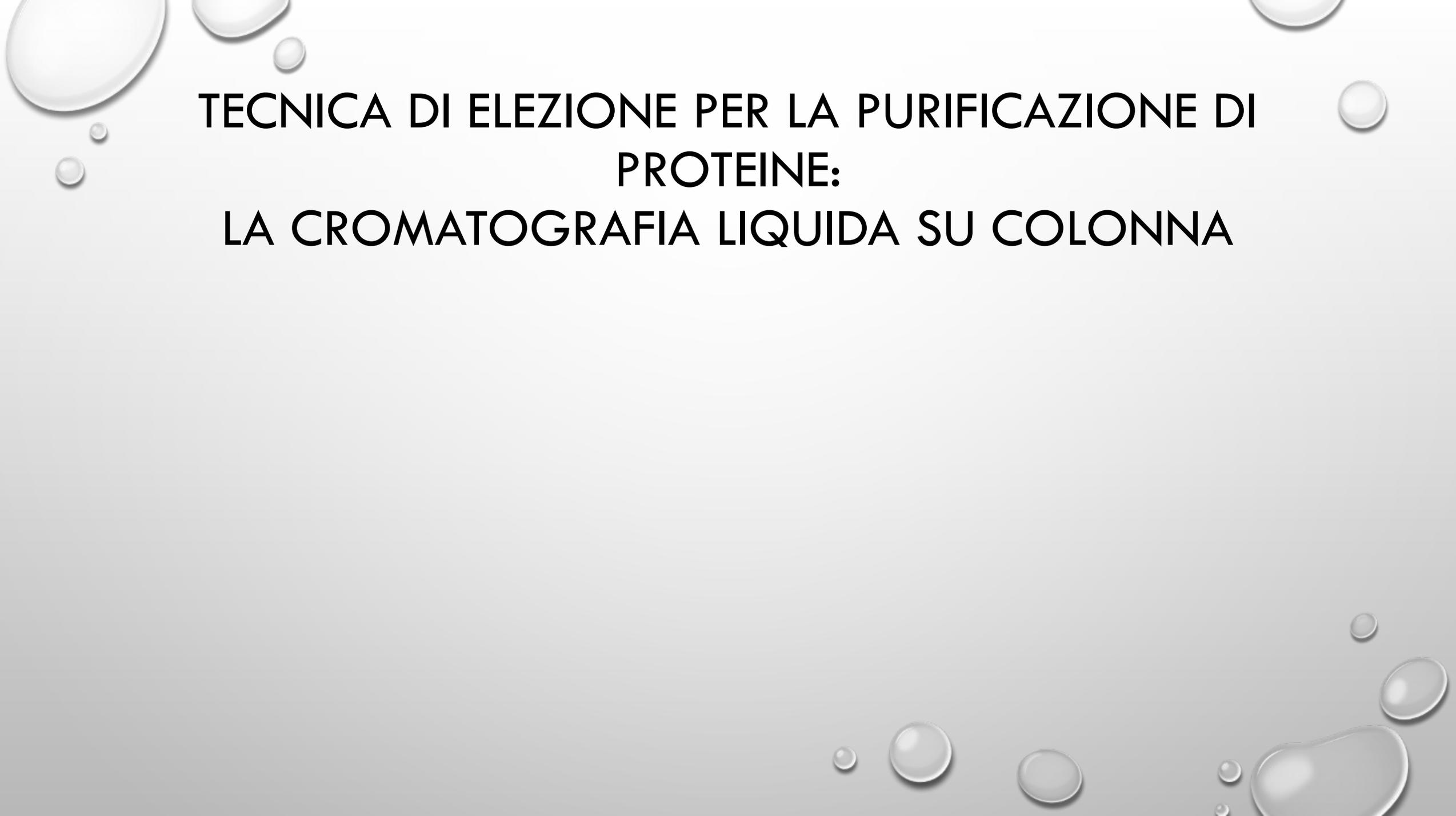
Una dose (0,5 mL) contiene:

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. The droplets are most prominent in the top-left and bottom-right corners, with some smaller ones scattered throughout. The text is centered in a bold, black, sans-serif font.

**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**:

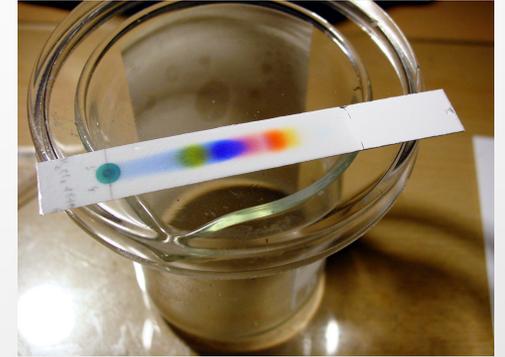
Fisicamente, separa una **mistura** nei suoi singoli componenti.

- 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)

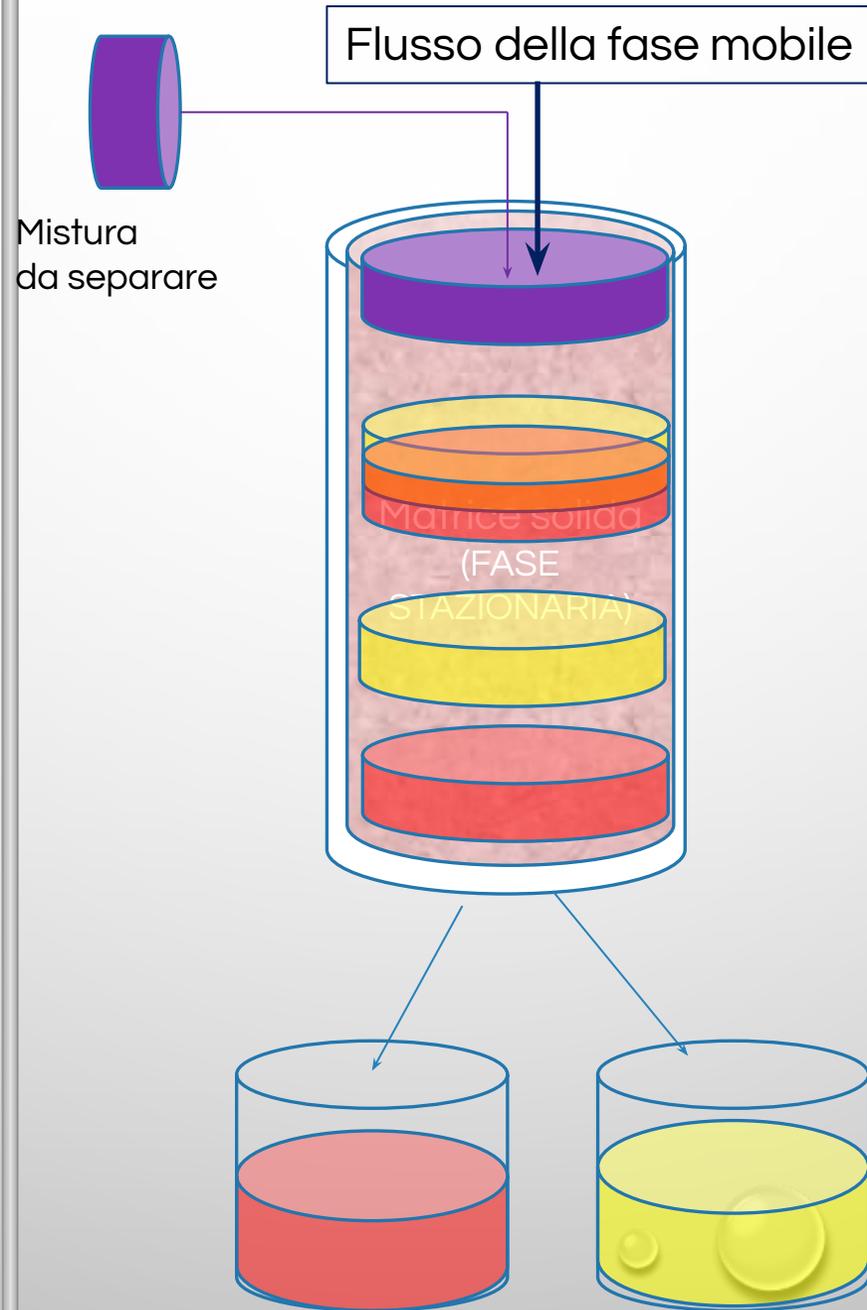
la **FASE MOBILE**  
(solvente organico o acquoso)  
flussa attraverso la resina:  
- per gravità ,oppure  
- spinto da una pompa.

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

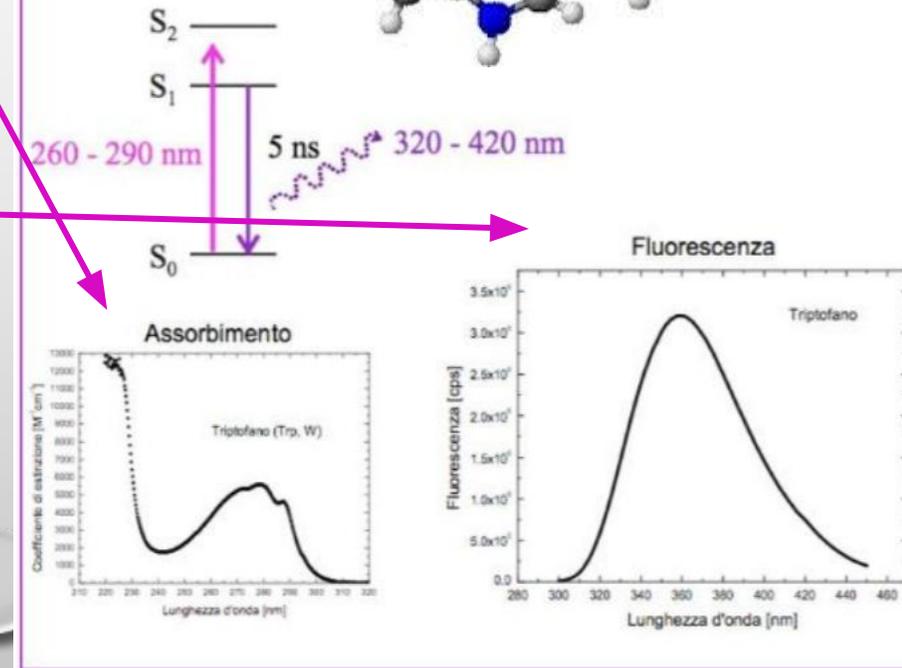
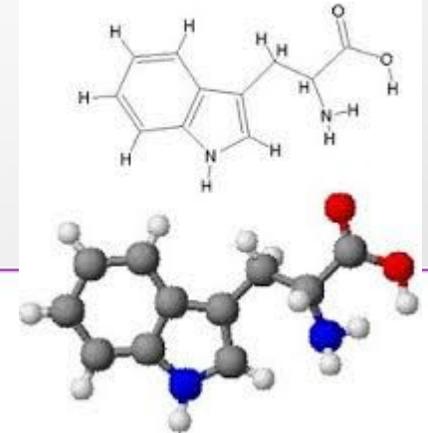
- Fluorescenza

## RADIODETECTORS

- Radioattività

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

Triptofano (Trp)

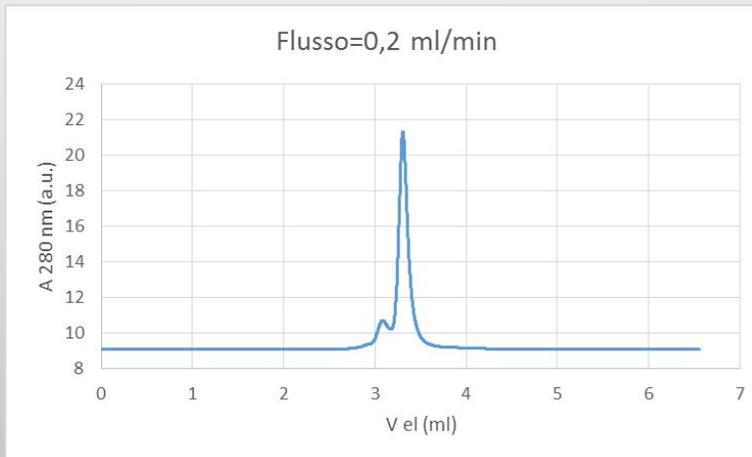
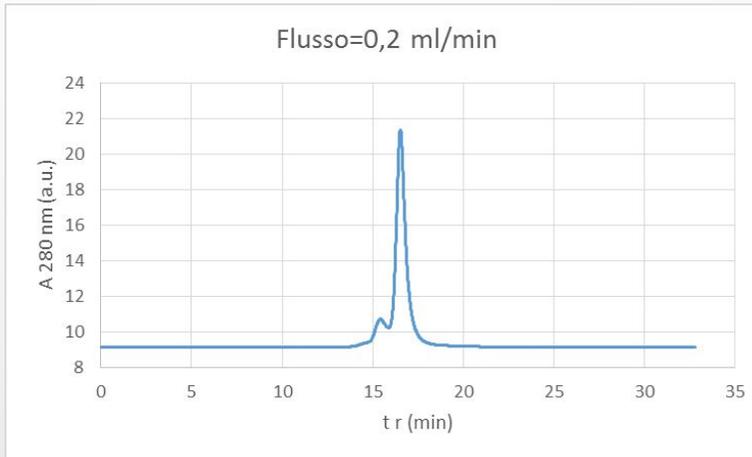


# IL CROMATOGRAMMA

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/inch<sup>2</sup> = 0,454 Kg / (0,0254)<sup>2</sup> m<sup>2</sup>  
= 703 kg/m<sup>2</sup>

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/m<sup>2</sup> = 6900 N/m<sup>2</sup> = 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	$9.8692 \times 10^{-6}$	$10^{-5}$	$145.04 \times 10^{-6}$
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	$68.046 \times 10^{-3}$	$68.948 \times 10^{-3}$	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'

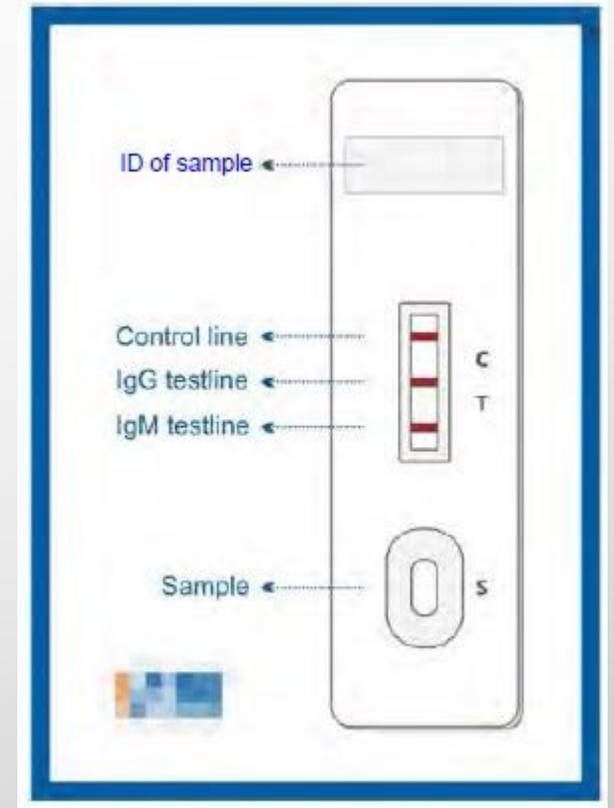
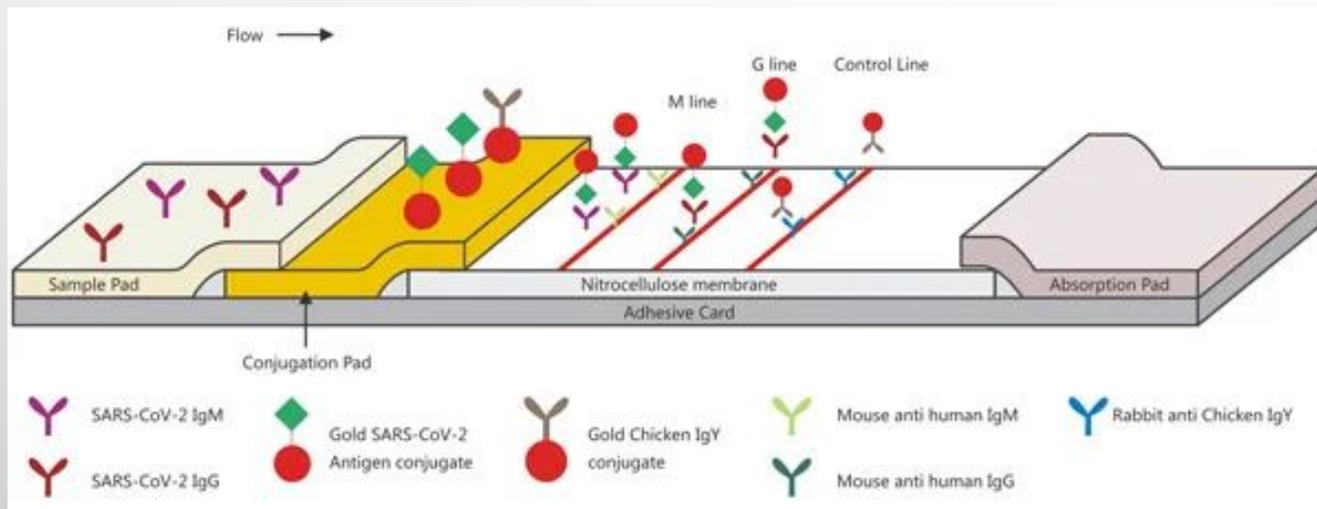


TECNICHE IN  
CROMATOGRAFIA  
LIQUIDA  
per separazione di  
proteine

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

## CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ': immunocromatografia

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



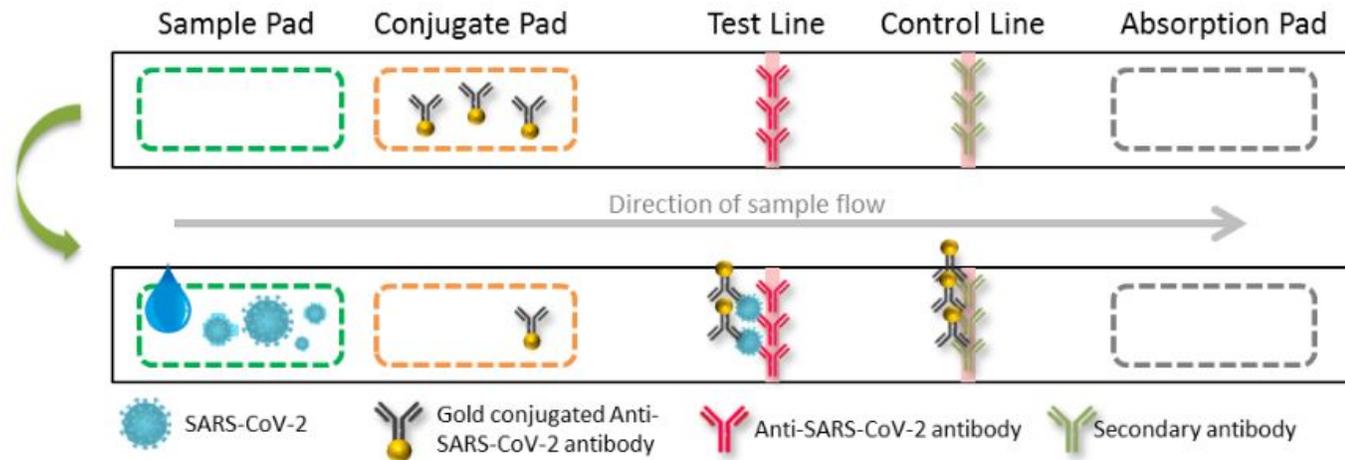
<https://www.mybiosource.com/covid-19-assay-kits/covid-19-nucleoprotein-n-spike-glycoprotein-s-antibody-immunochromatography-coronaviruses/7135927>

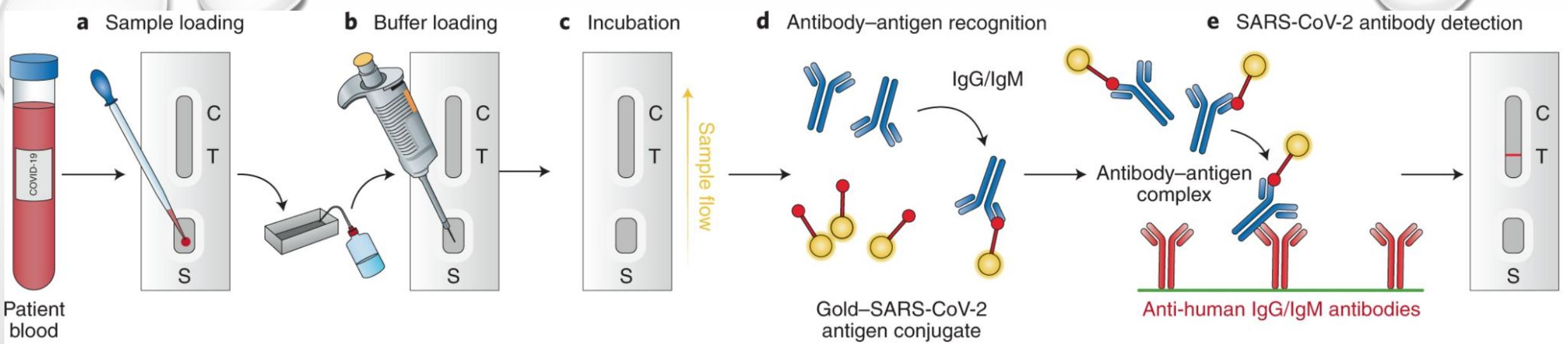
## COVID-19 (SARS-CoV-2) Antigen Rapid Detection Kit (lateral flow immunoassay)

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

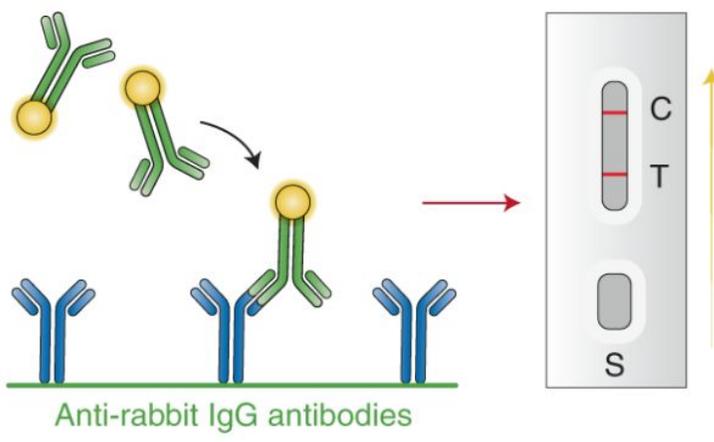
### Lateral flow immunoassay design for COVID-19 (SARS-CoV-2) antigens detection:

- **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.

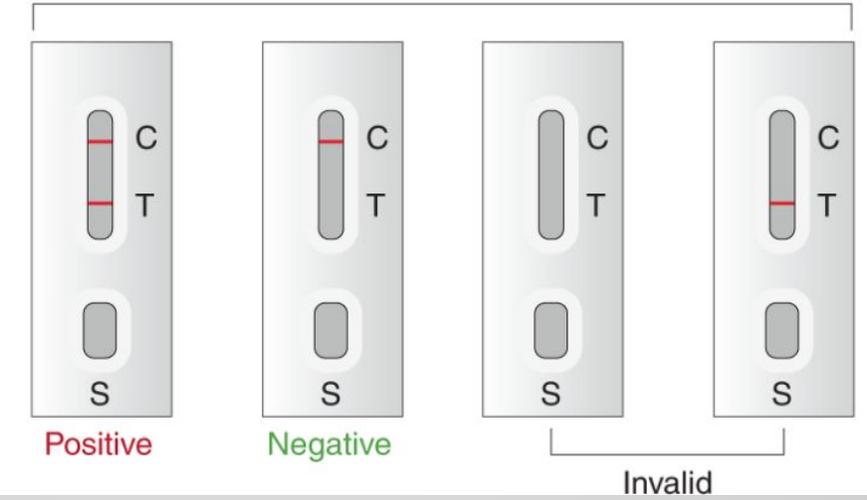




**f Control antibody detection rabbit-gold conjugate**



**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

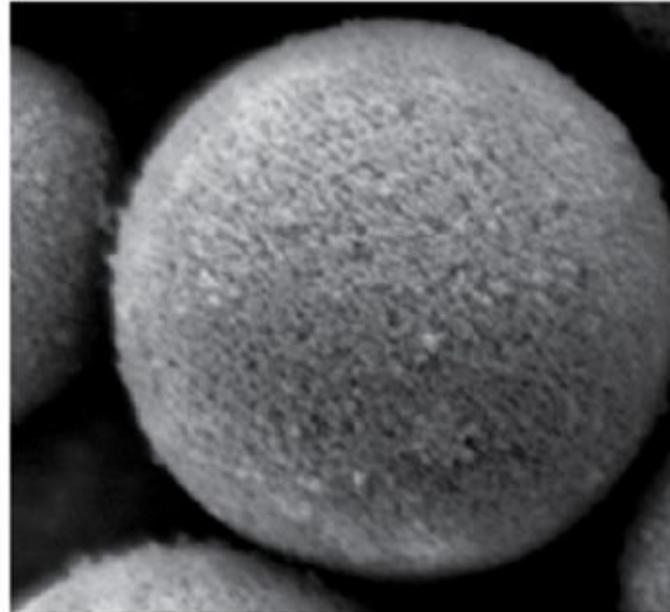
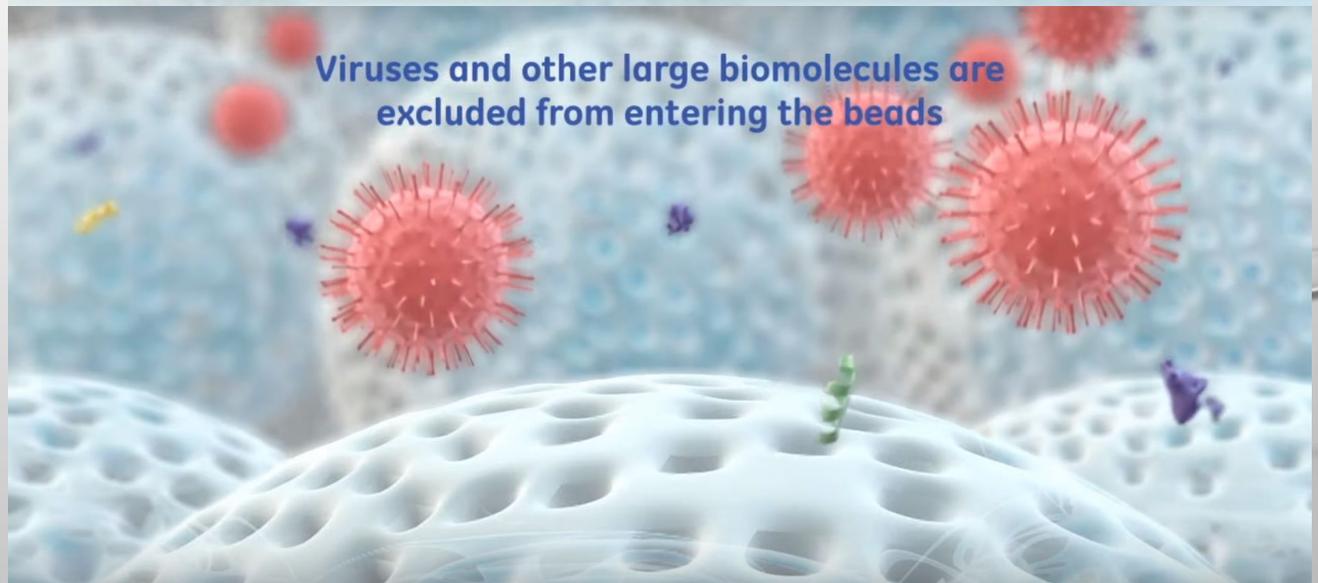
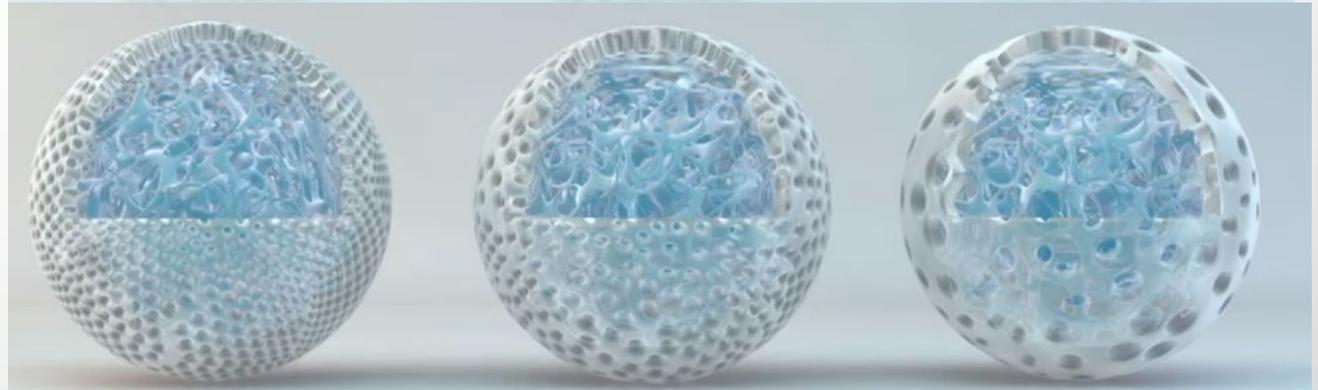


Immagine in microscopia elettronica (SEM) di una bead di diametro 3 µm. La **dimensione dei pori** determina le dimensioni delle molecole che possono essere separate (la capacità della colonna).

GEL  
FILTRAZIONE  
(GFC) O  
ESCLUSIONE  
MOLECOLARE  
(SEC)



# GEL FILTRAZIONE (GFC) O ESCLUSIONE MOLECOLARE (SEC)

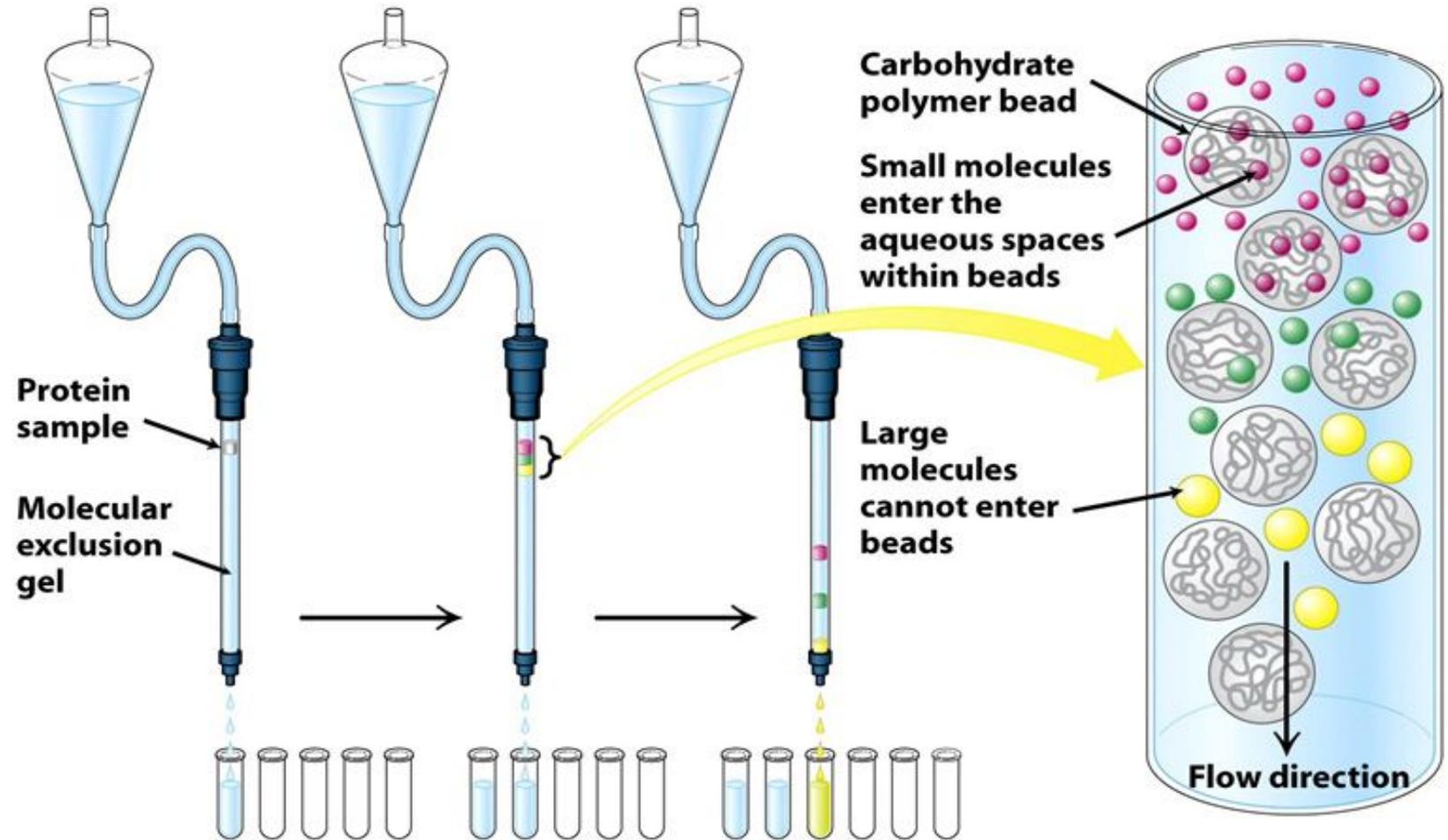
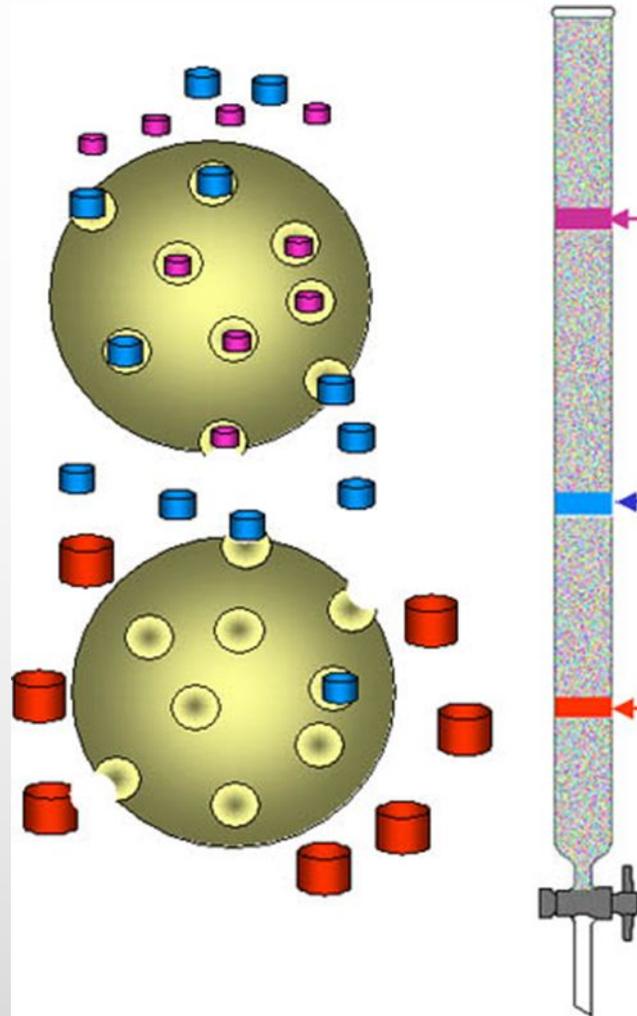


Figure 3-3  
*Biochemistry, Sixth Edition*  
© 2007 W.H. Freeman and Company

# 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

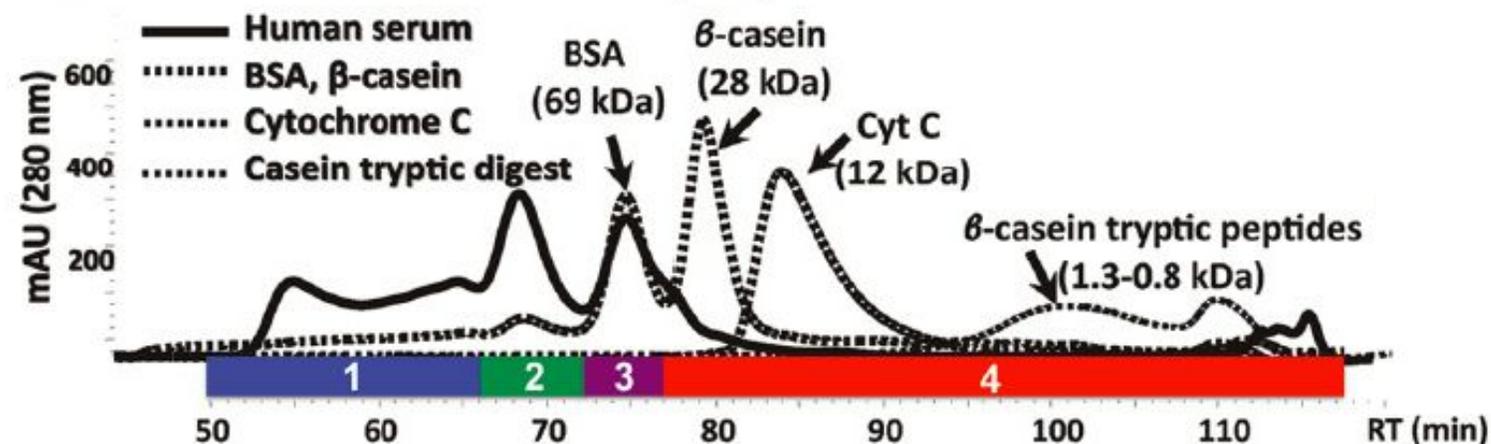
SEPARAZIONE DI PROTEINE DEL SIERO MEDIANTE SEC  
E DETERMINAZIONE DEL PESO MOLECOLARE



# 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

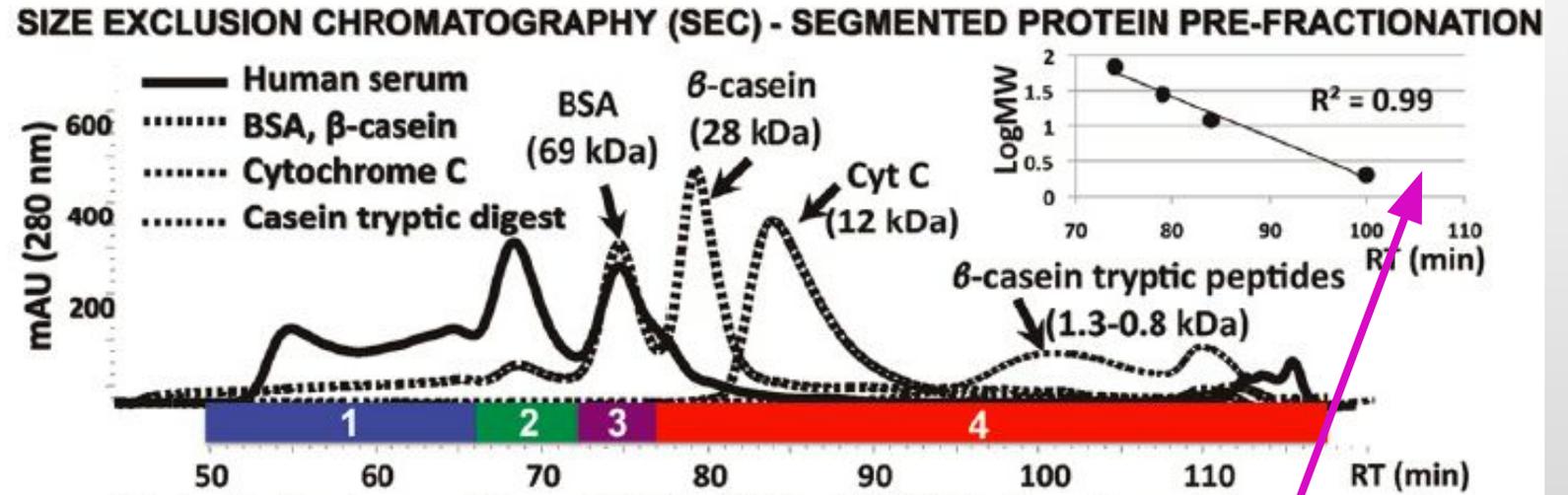
Il tempo di ritenzione  $T_R$  (e il  $Vel$ ) di una proteina e' dipendente in maniera lineare dal **logaritmo** del PESO MOLECOLARE (MW) della **stessa** (se vale l'approssimazione di una molecola **GLOBULARE**)

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

# 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.

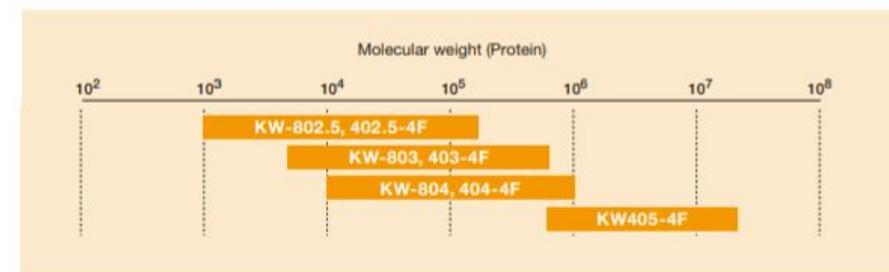
Un volume di 200 ul di siero diluito contenente 7,4 mg totali di proteine è stato iniettato nella colonna. Standard proteici utilizzati: Albumina di siero bovino (67 kDa), beta-caseina (28 kDa), citocromo c (12 kDa) e peptidi triptici della beta caseina (1,3 – 0,8 kDa)

FASE MOBILE:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  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)

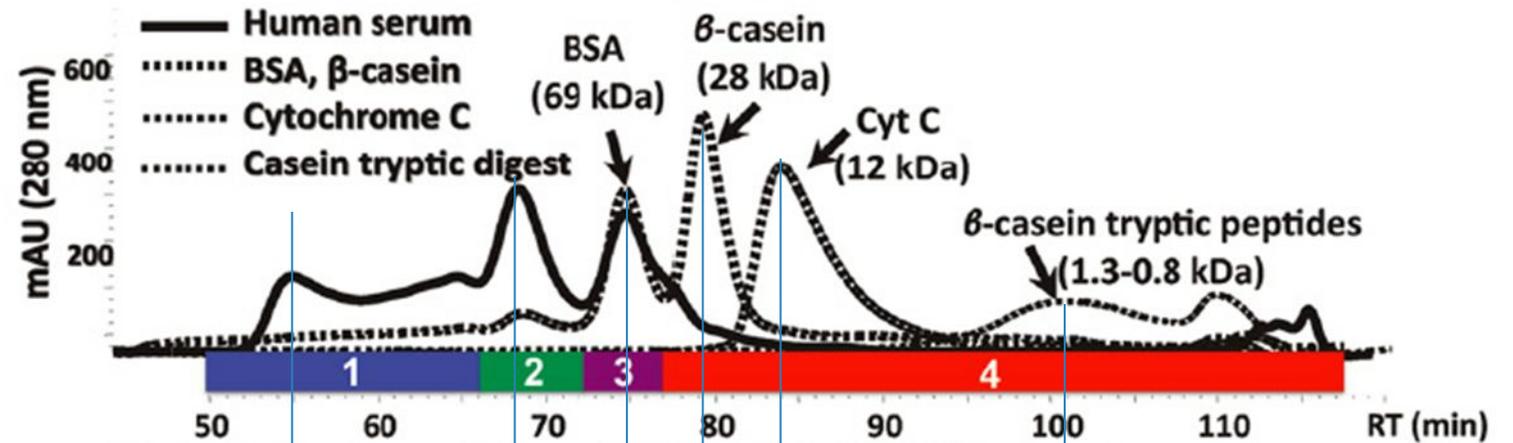


=> Range di separazione della colonna: da 10 a 1000 kDa

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

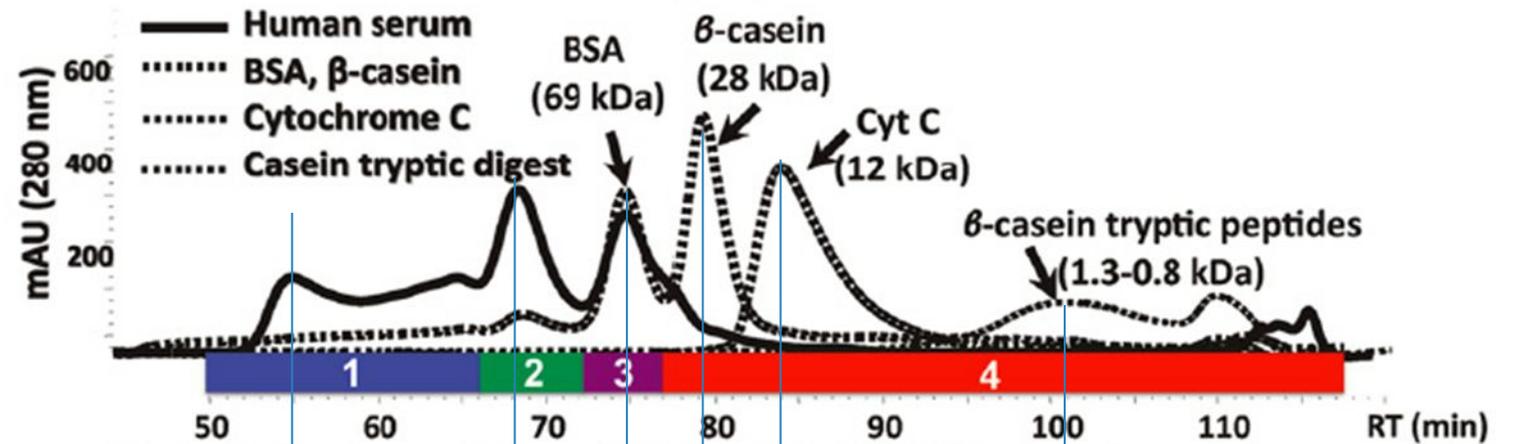
1) LEGGIAMO ED  
ANNOTIAMO IL TEMPO  
DI RITENZIONE DI OGNI  
STANDARD SU UN  
FOGLIO EXCEL

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 Ttot (Vtot) perché il loro peso è minore del minimo nel range di separazione!

# CROMATOGRAMMA DEL SIERO UMANO

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



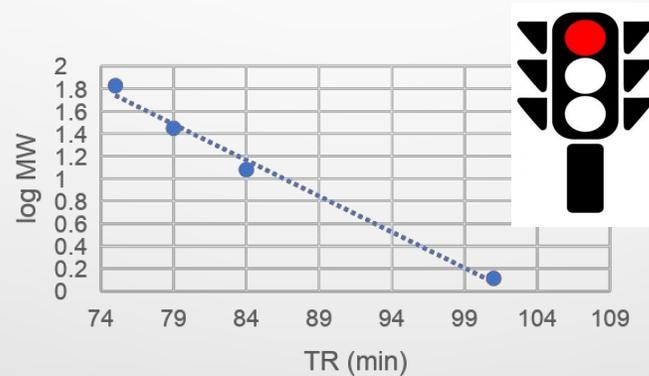
RICOSTRUIAMO LA  
RETTA DI TARATURA  
DAL  
CROMATOGRAMMA  
2) CALCOLIAMO IL  
LOGARITMO DEL PESO  
MOLECOLARE

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

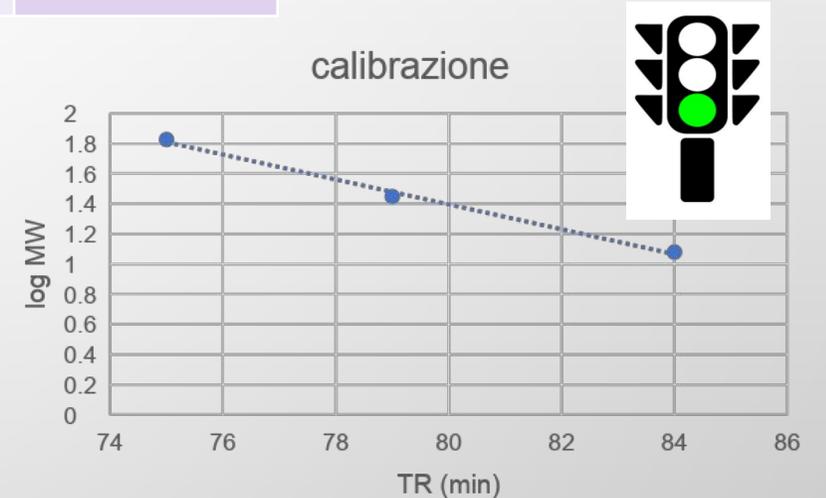
## RICOSTRUIAMO LA RETTA DI TARATURA DAL CROMATOGRAMMA

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 <sub>el</sub> (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 <sub>el</sub> (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

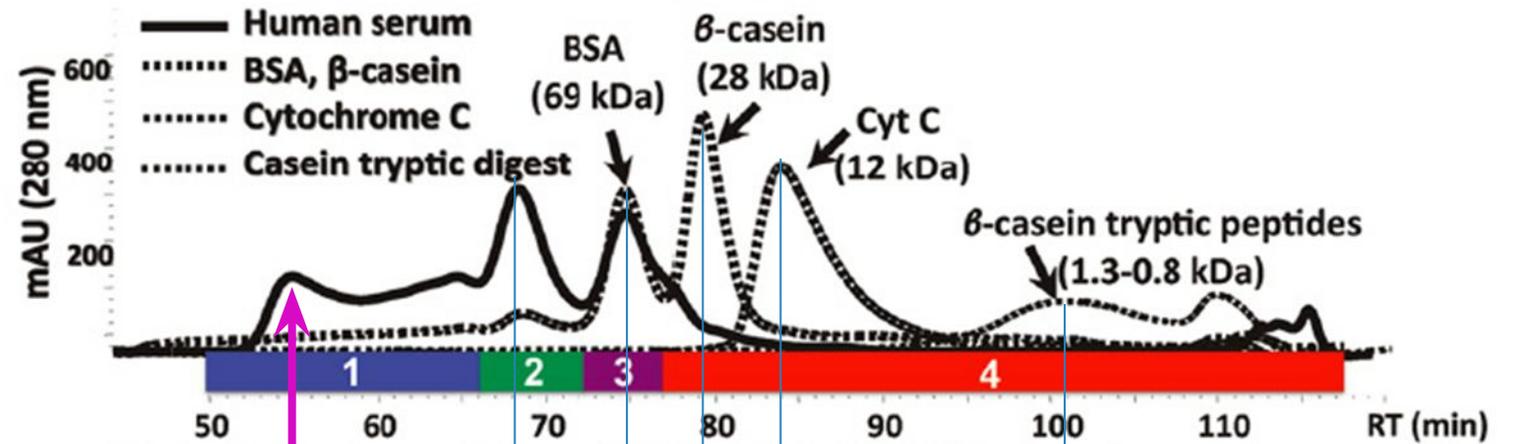
$$0 < K_{av} < 1$$

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

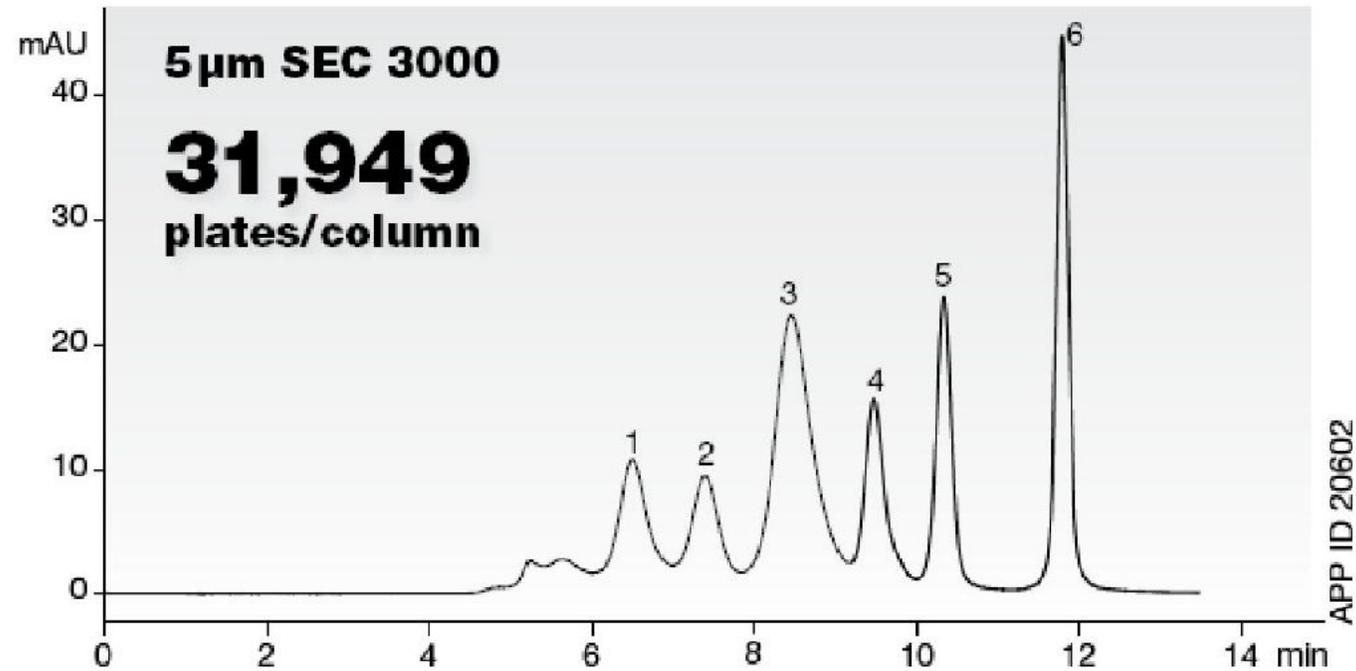


RICOSTRUIAMO LA  
RETTA DI TARATURA DAL  
CROMATOGRAMMA

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 image features a light gray background with several realistic water droplets of various sizes scattered in the corners. The droplets have highlights and shadows, giving them a three-dimensional appearance. The text 'THE END' is centered in the upper half of the image.

**THE END**