

1. Cromatografia per gel-filtrazione

La gel filtrazione è un metodo cromatografico che separa le sostanze in base alle loro dimensioni molecolari. I materiali che costituiscono il supporto per la gel-filtrazione sono i gel di acrilammide, agarosio e destrano caratterizzati da stabilità chimica e resistenza meccanica.

Esistono in commercio diversi tipi di gel caratterizzati da differente porosità, per cui è possibile scegliere opportunamente il tipo di gel più adatto a separare le sostanze in questione. Ad esempio, il Sephadex è un gel idrofilo che si ottiene a partire da destrano ed epichelidina etilenica che è capace di formare legami crociati tra due catene lineari di destrano. Le variazioni del contenuto di destrano ed il grado di ramificazione portano a gel di differente porosità con limiti di capacità di separazione sino a pesi molecolari intorno a 600.000 Da.

Il gel idrofilo di cui si fa uso in questo esperimento è il Sephacryl S-100, preparato a partire da allil-destrano fatto reagire con N, N' metilen-bis-acrilammide che permette di ottenere legami crociati in una matrice dotata di elevata resistenza meccanica.

Il sistema cromatografico è costituito da una certa quantità di gel sospesa in tampone che si lascia sedimentare in una "colonna" di vetro.

Il volume di eluizione (V_e) delle molecole da una gel filtrazione è regolato dalla formula

$$V_e = V_0 + K_d V_i$$

K_d è il coefficiente di distribuzione (può assumere tutti i valori compresi tra 0 e 1) della molecola in questione.

Le molecole di dimensioni maggiori dei pori del gel non penetrano nei pori ($K_d = 0$) e sono eluite per prime; il volume di tampone necessario alla eluizione di tali molecole viene definito V_0 (volume vuoto o escluso).

$$V_e = V_0$$

Le molecole di dimensioni tali da penetrare completamente nei pori del gel ($K_d = 1$) sono eluite per ultime; il volume di tampone necessario per l'eluizione di tali molecole corrisponde a

$$V_e = V_0 + V_i \quad \text{cioè al volume totale (} V_T \text{) del gel.}$$

Le molecole il cui peso molecolare è compreso tra i due casi descritti ($0 < K_d < 1$) sono eluite con un volume di eluizione compreso tra V_0 e V_T .

Esperienza dimostrativa:

Gel: Sephacryl S-100 (intervallo di separazione 1000-100.000 Da)

Dimensioni colonna: 1,5 x 25 cm

Eluente: 50 mM Tris-HCl pH 7,5 contenente 0,1 M NaCl

Campione contenente le sostanze a peso molecolare noto: Blue Destrano (2.000.000 Da), Citocromo c (11.700 Da), dicromato di potassio (162 Da).

Dopo aver chiuso il rubinetto inferiore della colonna e rimosso la quantità di tampone eccedente (il battente), si stratifica al di sopra del gel il campione. Si fa penetrare il campione nel gel per gravità; quindi si ripristina il battente e si collega la colonna alla pompa peristaltica che garantisce un flusso costante di eluente. L'eluato della colonna è raccolto in frazioni mediante un collettore automatico.

2. Spettrofotometria di proteine ed acidi nucleici

Numerosi metodi analitici usati nella indagine biochimica sono basati sulla interazione dell'energia radiante con la materia. Questi metodi sono conosciuti come metodi spettroscopici. I gruppi responsabili dell'assorbimento sono detti cromofori.

L'assorbimento delle radiazioni nell'ultravioletto (100-400 nm) e nel visibile (400-800 nm) è descritto quantitativamente dalla legge di Lambert-Beer:

$$\log I_0 / I = A = \epsilon C l$$

Dove I_0 ed I sono le intensità relative di luce incidente e trasmessa, l è lo spessore della soluzione attraversata dal raggio espresso in centimetri e C rappresenta la concentrazione espressa in moli/litro. Il $\log I_0 / I$ è chiamato assorbanza (A) ed è misurato direttamente allo spettrofotometro.

Il coefficiente di proporzionalità ϵ è chiamato coefficiente di estinzione molare ed indica l'assorbanza di una soluzione 1 M della sostanza in esame quando viene letta in una cuvetta con percorso ottico uguale ad 1 cm ad una determinata lunghezza d'onda.

E' evidente, dalla definizione data, che il coefficiente di estinzione molare lo si può calcolare solo se è disponibile il valore del peso molecolare. Quando, soprattutto nel caso di macromolecole come le proteine e gli acidi nucleici, non è disponibile il peso molecolare, si fa uso di un altro parametro, il coefficiente di estinzione percentuale, che indica l'assorbimento di una soluzione all' 1% della sostanza in esame quando viene letta in una cuvetta dal percorso ottico di 1 cm.

La misura dell'assorbanza si può fare ad una sola lunghezza d'onda (che è in genere quella alla quale si ha l'assorbanza massima ed è detta l_{max}), oppure si può registrare in modo continuo la variazione dell'assorbanza in funzione della variazione della lunghezza d'onda. In questo modo si ottiene lo spettro di assorbimento che appare come un picco allargato.

Lo spettro sulla sostanza sciolta in un'appropriata soluzione si effettua ponendo la soluzione in cuvette di vetro o plastica per la lettura nel visibile, in cuvette di quarzo per la lettura nell'ultravioletto. La cuvetta è costruita in modo tale da permettere al raggio di luce di attraversare la soluzione per lo spessore di 1 cm. Si prepara poi una cuvetta di riferimento contenente un solvente puro ed ambedue vengono poste nello spettrofotometro. L'intensità del raggio trasmesso dalla soluzione in esame viene registrata per confronto con quello trasmesso dal solvente puro (Bianco di riferimento).

Lo spettro di una macromolecola (acido nucleico o proteina) misurato da 200 nm a 300 nm, può essere suddiviso in due zone ben distinte: la prima, che va da 200 a 245 nm circa, in cui si ha un forte assorbimento per la molteplicità dei cromofori responsabili, non utilizzabile per scopi analitici; la seconda che va da 245 a 300 nm, in cui lo spettro si rivela diverso per i due gruppi di macromolecole: gli acidi nucleici (per la presenza di raggruppamenti eteroaromatici) presentano un massimo di assorbimento intorno a 260 nm, mentre le proteine (per la presenza degli amminoacidi fenilalanina, tirosina e triptofano) presentano un massimo di assorbimento intorno a 280 nm.

A) Determinazione spettrofotometrica della concentrazione di una soluzione di RNA

Diluire 200 volte in acqua una aliquota della soluzione di RNA in un volume finale di 2 ml; riempire una cuvetta di quarzo e registrare lo spettro di assorbimento da 240 a 320 nm.

Determinare la concentrazione della soluzione di RNA sapendo che il coefficiente di estinzione percentuale dell'RNA a 260 nm è $2,4 \times 10^2$ O.D.

B) Determinazione spettrofotometrica della concentrazione di una soluzione di albumina di siero bovino (BSA)

Diluire 10 volte in acqua una aliquota della soluzione di BSA in un volume finale di 1 ml; riempire una cuvetta di quarzo e registrare lo spettro di assorbimento da 240 a 320 nm.

Determinare la concentrazione sapendo che il coefficiente di estinzione percentuale della BSA a 280 nm è di 6,75 O.D.

3. Preparazione di una soluzione partendo da soluzione più concentrata

Esempio: Si vogliono preparare 600 ml di una soluzione 0,2 M di HCl.

L' HCl è un gas che in commercio si trova in soluzione acquosa concentrata al 37,27 %. Questo vuol dire che nella bottiglia di HCl concentrato sono presenti 37,27 g di HCl per ogni 100 g di soluzione. La densità dell'acido cloridrico al 37,27 % è 1,185 g / ml. Il PM dell'HCl è uguale a 36,46.

$$\frac{\text{PM} \times \text{Conc Finale} \times \text{Vol Finale}}{1000} = \text{gr di HCl necessari}$$

Dovendo preparare 600 ml di soluzione, occorreranno

$$\frac{36,46 \times 0,2 \times 600}{1000} = 4,37 \text{ g HCl}$$

che saranno contenuti in :

$$\frac{100 \times 4,37}{37,27} = \text{g } 11,72 \text{ di soluzione al } 37,27\%$$

Essendo piuttosto disagiata pesare un liquido, se si divide il valore in grammi ottenuto per la densità della soluzione si ottiene il volume di soluzione che corrisponde a 11,72 g di essa:

$$\frac{11,72}{1,185} = 9,89 \text{ ml}$$

Questo volume viene portato a 600 ml.

Esercitazione: Preparare 30 ml di una soluzione di acido cloridrico 0,1 N a partire da HCl al 3,7 %.

Quanti ml di HCl al 3,7 % sono da prelevare ?

4. Preparazione di una soluzione tampone

Una soluzione tampone è una soluzione in cui il pH varia in misura minima anche aggiungendo significative quantità di acidi o basi forti. Le migliori soluzioni tampone, per valori di pH nell'intervallo 4-10, sono quelle che contengono un acido debole con la sua base coniugata o una base debole con il suo acido coniugato.

Dall'equazione di Henderson-Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{base}]}{[\text{acido}]} \quad (1)$$

dove

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

$$\text{pK}_a = -\log K_a \text{ (costante di dissociazione dell'acido)}$$

[base] = conc. della base coniugata

[acido] = conc. dell'acido non dissociato

Dall'equazione risulta che la miscela con un rapporto [base]/ [acido] = 1 è un tampone ottimale (massima capacità tamponante) e il suo pH è uguale al pK_a della componente acida; che le miscele con rapporti [base]/ [acido] compresi tra 0,1 e 10 sono efficaci come tamponi.

In altre parole si ritiene che una miscela di un acido debole e della sua base coniugata costituisca un soddisfacente tampone nell' intervallo di pH compreso tra (pK_a - 1) e (pK_a + 1).

Il pH delle soluzioni tampone si può calcolare applicando l'equazione di Henderson-Hasselbalch.

Nell' espressione (1.) noto il valore di K_a, è possibile calcolare il rapporto [base coniugata] / [acido] per ottenere un valore di pH prefissato della soluzione (scelto naturalmente nell'intervallo ottimale). Per quanto nella preparazione di miscele tampone l'equazione (1) dia buoni risultati, è bene sempre misurare accuratamente il pH della miscela finale alla temperatura alla quale deve essere impiegata. L'aggiustamento accurato del pH si può fare aggiungendo piccole quantità di acido forte o alcali.

Esempio: Preparare un tampone Tris-HCl 0,1 M pH 8,9. Il Tris base (Tris-idrossimetilamminometano, pK_a = 8,08) si protona come segue:



L'equazione (1) diventa

$$8,9 = 8,08 + \log \frac{[\text{Tris}]}{[\text{Tris-H}^+]}$$

[Tris-H⁺] corrisponde alla quantità di acido forte (HCl) da aggiungere alla soluzione di Tris per spostare il rapporto [Tris] / [Tris-H⁺] al valore desiderato

$$\log \frac{[\text{Tris}]}{[\text{Tris-H}^+]} = 0,82; \quad \frac{[\text{Tris}]}{[\text{Tris-H}^+]} = 6,6 \quad (2)$$

poichè la concentrazione di Tris richiesta è 0,1 M

$$[\text{Tris}] + [\text{Tris-H}^+] = 0,1 \text{ da cui } [\text{Tris}] = (0,1) - [\text{Tris-H}^+] \text{ e sostituendo in (2)}$$

$$\frac{0,1 - [\text{Tris-H}^+]}{[\text{Tris-H}^+]} = 6,6$$

e quindi

$$[\text{Tris-H}^+] = \frac{0,1}{(6,6 + 1)} = 0,013 \text{ moli /litro di HCl}$$

Dunque una soluzione contenente 0,1 moli/litro di Tris e 0,013 moli/litro di Tris e 0,013 moli/litro di HCl avrà un pH di 8,9.

Esercitazione: Preparare 40 ml di tampone Tris-HCl 0,05 M pH 7 a partire da soluzioni di Tris ed HCl 0,1 M.

Seguendo l'esempio precedente calcolare le moli di HCl (e quindi il volume) necessarie per portare a 7 il pH di una soluzione di Tris 0,05M. (Per semplicità di calcolo riferirsi ad 1 litro di soluzione e poi applicare la proporzione).

Verificare il pH con cartina indicatrice.