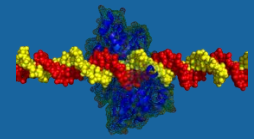


# Tehnici de Biologie Moleculară

**11.12.2024**

**Curs 6 – Analiza proteinelor prin tehnici  
electroforetice și cromatografice**

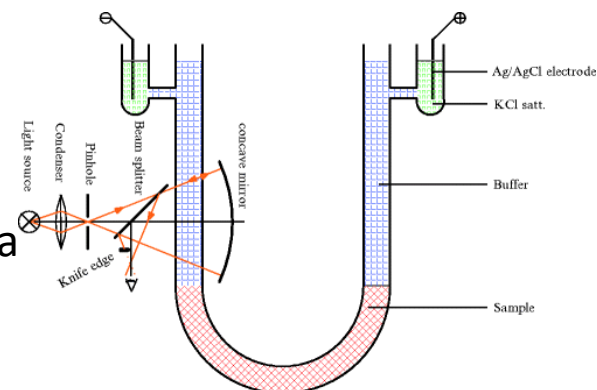


# Metode electroforetice de separare a proteinelor

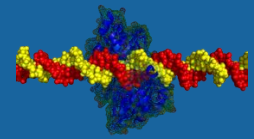
Electroforeza este o metodă de separare care se bazează, în principiu, pe capacitatea particulelor coloidale sau moleculelor încărcate electric de a migra, sub influența unui câmp electric generat de doi electrozi, în direcția electrodului purtător al sarcinii opuse. Viteza de migrare depinde în principal de dimensiunea sarcinii electrice și din acest motiv moleculele cu sarcini diferite vor avea o mobilitate electroforetică diferită, separându-se în fracții. În principiu, această metodă poate fi aplicată tuturor macromoleculelor încărcate electric, separarea realizându-se fie în soluții apoase libere, fie pe medii cu rol stabilizator (plăci cu silicagel, filme, geluri).

În general electroforeza este folosită pentru separarea proteinelor, peptidelor, glucidelor și acizilor nucleici. **Utilitatea acestei metode de separare** se referă, în special, la **caracterizarea din punct de vedere calitativ a unui amestec și aprecierea purității unui compus**. Dacă se ține cont de o serie de precauțiuni, tehnica poate fi utilizată și în scopul unor separări cantitative și preparative. Domeniul în care electroforeza își găsește cea mai mare aplicabilitate este studiul proteinelor.

Una dintre primele metode de separare electroforetică a fost pusă la punct de Arne Tiselius în 1937 și presupunea separarea fracțiilor proteice în interiorul unui tub de forma literei U plin cu electrolit, fracțiile proteice fiind identificate densitometric. Metoda avea însă o sensibilitate redusă de aceea s-a preferat dezvoltarea metodelor care folosesc **medii stabilizatoare**.



Buxbaum E. (2011) Electrophoresis. In: Biophysical Chemistry of Proteins. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7251-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7251-4_8)



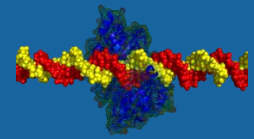
# Electroforeza ca tehnică de separare a proteinelor

Electroforeza pe hârtie, a fost utilizată tot de Tiselius în 1951 pentru separarea proteinelor din ser a fost urmată de apariția unor **medii suport** din ce în ce mai complexe: **acetat de celuloză, amidon, agaroză și poliacrilamidă**.

De-a lungul timpului au fost adoptate două soluții tehnice pentru realizarea separării electroforetice:

- **electroforeza orizontală** - folosită atunci când se utilizează suporturi inerte față de oxigen (hârtie, plăci de silicagel, amidon, agaroză). Această soluție are avantajul simplității și robusteții aparaturii utilizate, ea devenind standard pentru **electroforeza pe geluri de agaroză**;
- **electroforeza verticală** - folosită cu suporturi care trebuie ferite de oxigen, precum poliacrilamida. În acest caz, suportul este turnat între două plăci din sticlă etanșezate lateral, comunicarea cu electrozii realizându-se prin părțile inferioară și superioară. Această soluție tehnică este mai complexă deoarece ridică probleme de etanșezare a compartimentelor electrozilor dar, cu toate acestea, a devenit standard pentru electroforeza în geluri de poliacrilamidă.

Amidonul, agaroză și poliacrilamida nu sunt doar medii suport ci, datorită structurii și organizării lor sub formă de gel, pot avea un rol activ în procesul de separare. În cazul în care **concentrația gelului este atât de mică încât nu interferă cu migrarea**, este vorba despre un **gel permisiv**, separarea **moleculor realizându-se în funcție de încărcarea electrică a acestora**. Când **concentrația gelului este atât de mare încât influențează migrarea printr-un efect de filtrare a moleculelor** în funcție de dimensiunea lor (efect de filtrare moleculară), ne referim la **geluri restrictive**. În acest caz **migrarea se realizează în funcție atât de sarcina electrică a moleculelor cât și de dimensiunile lor**.



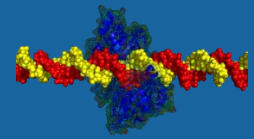
# Electroforeza nativă vs SDS-PAGE

În funcție de scopul separării și de condițiile de migrare, moleculele proteice pot fi separate

1. în **stare nativă**, prin utilizarea electroforeze native (engl. *native polyacrilamide gel electrophoresis, Native-PAGE*)
2. în **stare denaturată**. Denaturarea proteinelor în catene polipeptidice componente se realizează, cel mai frecvent, prin tratamente cu dodecilsulfat de sodiu (SDS), caz în care electroforeză în condiții denaturante se notează SDS-PAGE.

Oricare ar fi sistemul utilizat, după realizarea separării propriu-zise, moleculele proteice trebuie evidențiate pe gel prin tehnici specifice de colorare. Separarea electroforetică a proteinelor se realizează, prin urmare, în două etape distincte:

1. **separarea propriu-zisă (electroforeză nativă sau denaturantă, în funcție de scopul urmărit);**
2. **evidențierea fracțiunilor proteice de interes prin colorare, autoradiografie sau tehnici imunologice.**

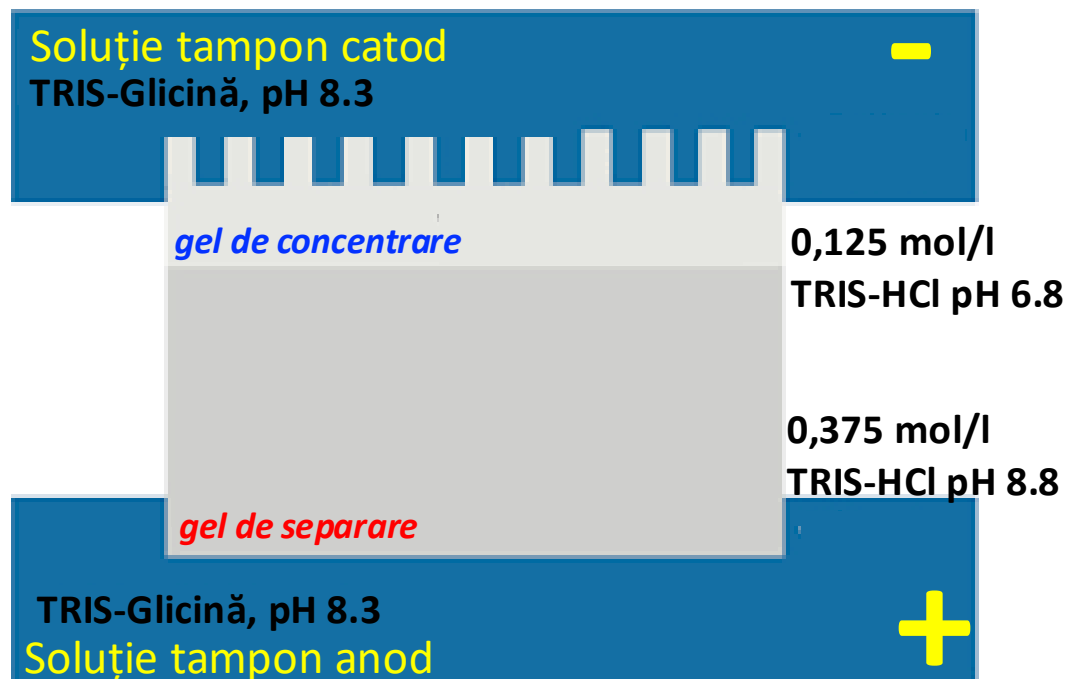


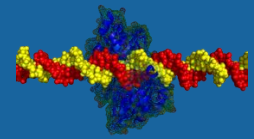
# Electroforeza nativă a proteinelor în sistem discontinuu

Metoda are la bază un **sistemul de tampon discontinuu** utilizat inițial în geluri amplasate în tuburi de sticlă. Deoarece în caeste tuburi proteinele se separă sub formă de discuri, metoda mai poartă numele și de **disc-electroforeză**.

Discontinuitatea se referă la 4 parametri:

- 1. porozitatea gelului** – gelul conține două zone de concentrații diferite, una în zona superioară de **concentrație mică** (pori de dimensiuni mari, zonă numită **gel de concentrare**) și una în zona inferioară de **concentrație mare** (pori de dimensiuni mici, zonă numită **gel de separare**);
- 2. pH-ul gelului** – **gelul de concentrare** are pH-ul **6,8**, iar **gelul de separare** are pH-ul **8,8**;
- 3. tăria ionică a soluțiilor tampon** din interiorul gelului – **gelul de concentrare** conține **0,125 mol/l TRIS-HCl**, iar **gelul de separare** **0,375 mol/l TRIS-HCl**;
- 4. natura ionilor din gel și din tamponul de electrod**; **gelul conține ioni Cl<sup>-</sup>** iar **tamponul de migrare glicină**.



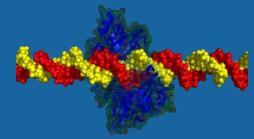


# Electroforeza nativă a proteinelor în sistem discontinuu

Separare proteinelor în sistemul discontinuu are loc în două etape, corespunzătoare celor două geluri:

## 1. **Etapa de concentrare a fracțiilor proteice** sau etapa de **izotachoforeză**.

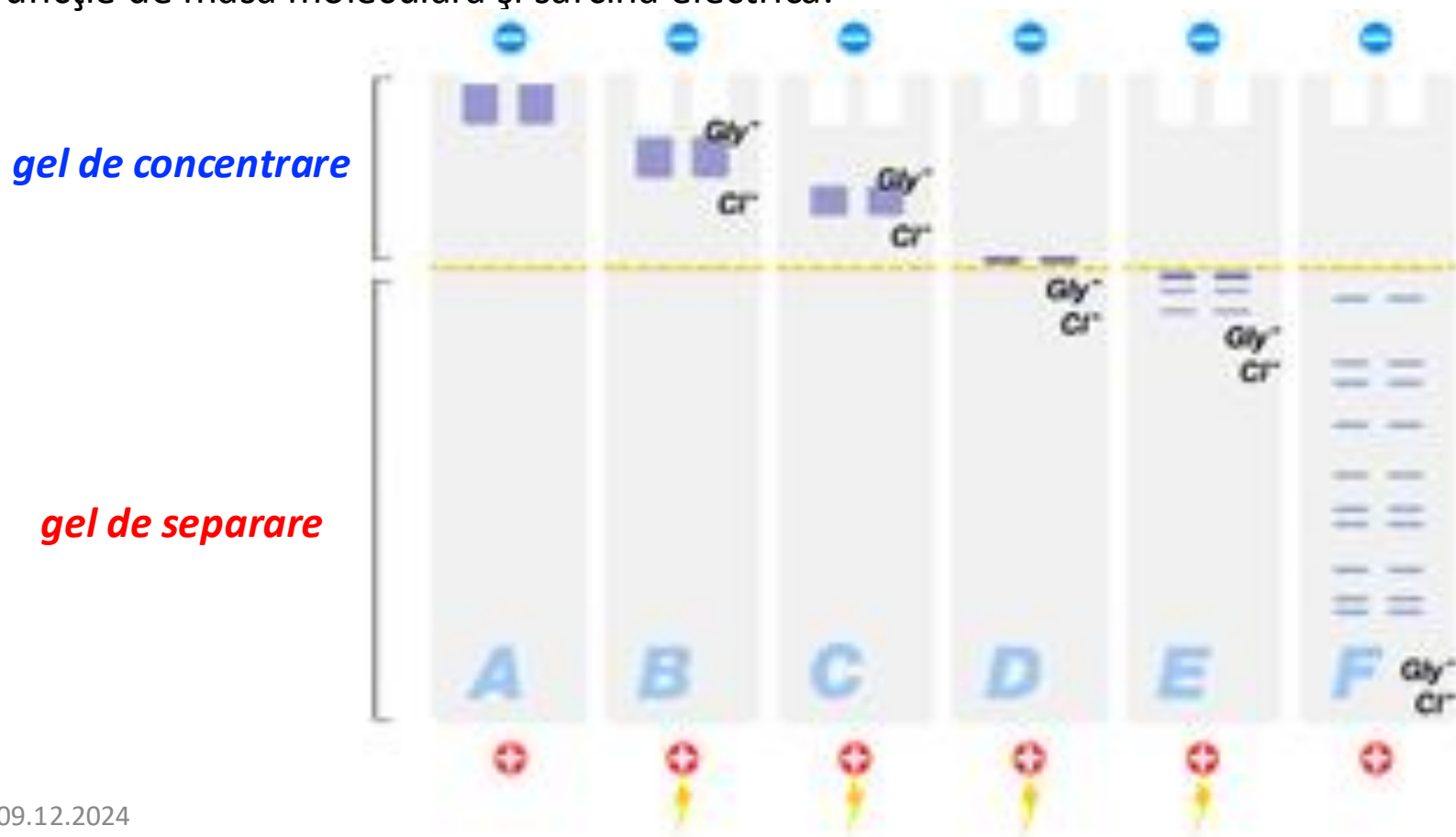
Probele reprezentate de soluția proteică sunt plasate în gelul de concentrare, al cărui pH este de 6,8. La această valoare a pH-ului, glicina (punctul izoelectric,  $pI=6,7$ ) este practic lipsită de sarcină electrică, iar clorul este încărcat negativ. La aplicarea curentului electric, glicina va avea o mobilitate redusă (datorită lipsei sarcinii), iar clorul va avea mobilitate maximă. Proteinele cu punctul izoelectric (**pI**) diferit de 6,8, cu grade diferite de încărcare vor avea mobilități intermediare, plasându-se între frontul glicinei și cel al clorului, realizând legătura între aceste două fronturi. Apare astfel o zonă în care moleculele **proteice se grupează, se concentrează și se ordonează în funcție de sarcină**. În această zonă apar grupe de proteine ce diferă una de cealaltă prin sarcină, aceste grupe fiind însă strâns legate una de cealaltă și formând un așa-numit „tren de ioni”. Între grupele de proteine nu pot apărea goluri, deoarece aceste goluri ar duce la întreruperea circuitului electric. Ca urmare a acestui fapt, în etapele târzii ale procesului toate moleculele migrează cu aceeași viteză, de unde și denumirea de **izotachoforeză (izo – egal, tacho – viteză)**. Când acest tren al ionilor ajunge în zona de contact dintre gelul de concentrare și cel de migrare, **rezistența datorată porilor mici ai gelului de migrare crește, ceea ce duce la concentrarea proteinelor sub forma unei singure benzi foarte fine**.

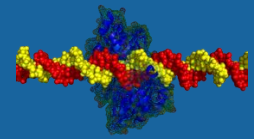


# Electroforeza nativă a proteinelor în sistem discontinuu

## 2. Etapa de separare a fracțiilor proteice.

În gelul de separare, la pH 8,8, glicina este încărcată negativ și, datorită masei moleculare mici, continuă să migreze împreună cu frontul clorului cu o viteză relativ mare, depășind frontul proteic întârziat la intrarea în acest gel. Proteinele se desprind din trenul ionilor și se separă în funcție de masa moleculară și sarcina electrică.





# Electroforeza nativă a proteinelor în sistem discontinuu

## Avantaje:

Acest tip de separare electroforetică este util în experimentele în care se dorește păstrarea intactă a structurii tridimensionale a proteinelor precum:

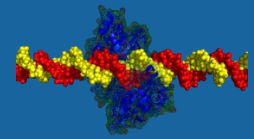
1. separarea de enzime în scopuri preparative;
2. identificarea de izoenzime.

## Limitări:

O atenție deosebită în cazul acestui tip de separare trebuie acordată punctului izoelectric al proteinelor de interes. În sistemul discontinuu descris nu pot fi separate proteine al căror  $pI$  este mai mare de 6,8 (la pH-ul gelului de concentrare aceste proteine sunt încărcate pozitiv și migrează spre anod). În general, pentru o bună separare, sistemul tampon folosit trebuie să fie cu două unități de pH mai bazic decât  $pI$ -ul proteinelor de separat.

Acest tip de electroforeză nu poate fi utilizată pentru aprecierea maselor moleculare relative ale proteinelor, deoarece migrarea se realizează și în funcție de sarcinile acestora. Pentru a înlătura acest dezavantaj a fost descrisă o metodă de separare electroforetică care utilizează colorantul Serva Blue G. Acesta ecranează sarcinile native ale proteinelor și conferă acestora sarcini negative. Tehnica poartă numele de **blue-native PAGE**.

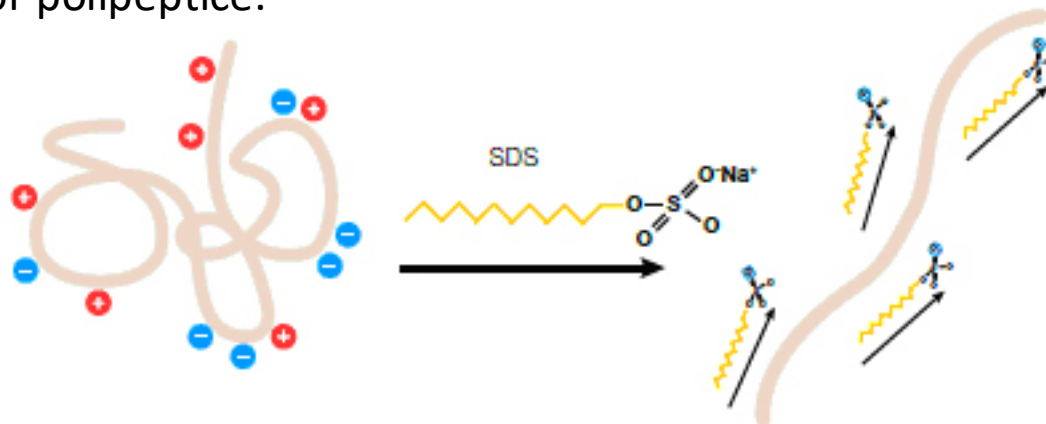


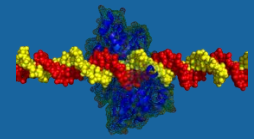


# Electroforeza proteinelor în condiții denaturante (SDS-PAGE)

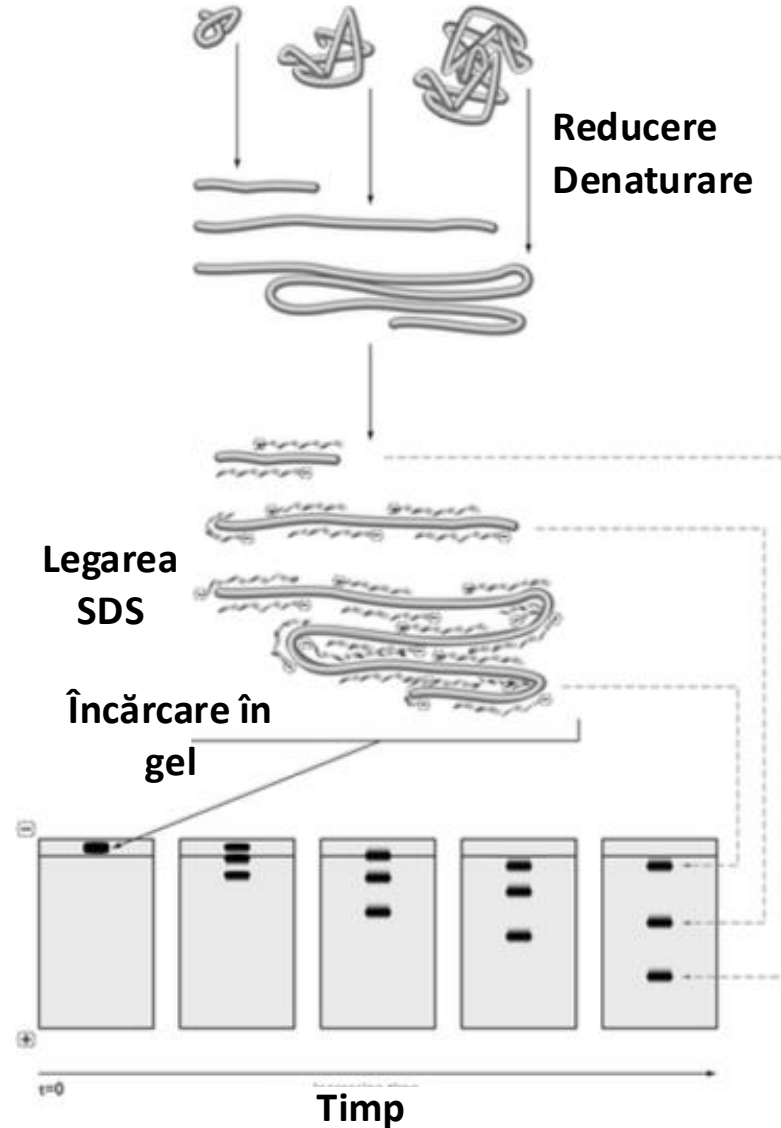
Metoda de separare electroforetică în condiții denaturante este derivată de la sistemul de separare discontinuu discutat anterior. **Diferența între acest sistem de separare și cel nativ constând în faptul că proteinele sunt supuse denaturării** prin acțiunea **dodecil-sulfatului de sodiu (SDS)** și temperaturii în prezența unui agent reducător ( **$\beta$ -mercaptoetanol sau dithiothreitol**). SDS-ul este un detergent încărcat negativ care are proprietatea de a se lega de catenele polipeptidice într-un raport de 1,4 g detergent / 1 g proteină.

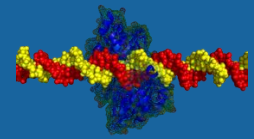
Separarea se realizează după aceleași principii ce guvernează și electroforeza nativă. Diferențele apar datorită faptului că, sub acțiunea temperaturii, SDS-ului și  $\beta$ -mercaptoetanolului, **structura tridimensională a moleculelor proteice este alterată**. Astfel, proteinele sunt transformate în catene liniare de aminoacizi. Suplimentar, SDS-ul se fixează pe catenele polipeptidice într-o cantitate proporțională cu lungimea lor și ecranează sarcinile datorate încărcării aminoacizilor. Toate proteinele vor fi, prin urmare, încărcate negativ, dimensiunea sarcinii fiind direct proporțională cu cantitatea de SDS fixată, adică cu lungimea catenei. În această situație separarea se realizează în funcție de un singur parametru și anume de dimensiunea catenelor polipeptice.





# Electroforeza proteinelor în condiții denaturante (SDS-PAGE)





# Electroforeza proteinelor în condiții denaturante (SDS-PAGE)

## **Avantaje:**

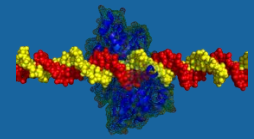
Metoda este utilizată în scopuri analitice calitative (în vederea aprecierii gradului de puritate a unui preparat), dar și cantitative. Aplicația cea mai cunoscută este însă aprecierea maselor moleculare ale proteinelor. În acest caz trebuie făcute următoarele precizări:

- pentru aprecierea masei moleculare este necesar ca amestecul de proteine marker (cu mase moleculare cunoscute) să fie supus electroforezei simultan cu proba de analizat;
- separarea proteinelor în funcție de masa moleculară nu este una liniară, de aceea se pot aprecia corect masele moleculare doar pentru proteinele din zona centrală a gelului;
- masa moleculară relativă a proteinelor poate varia în funcție de starea de reducere a legăturilor disulfidice; prezența legăturilor disulfidice nereduse duce la scăderea masei moleculare relative cu 2-4 kDa, iar prezența legăturilor incomplet reduse duce la apariția a două benzi apropiate ca masă; analiza comparativă a aceleiași proteine tratate și netratate cu agenți reducători poate oferi informații legate de prezența punților disulfidice.

## **Limitări:**

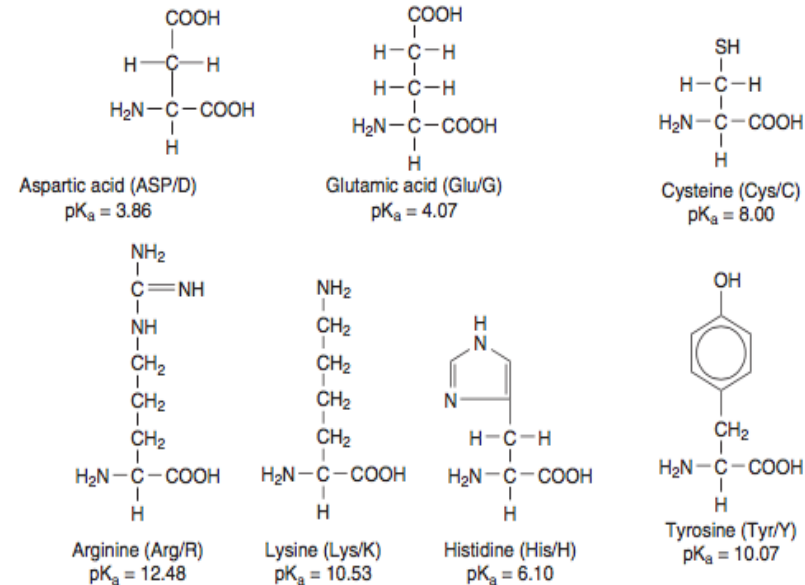
Folosind acest sistem de separare, glicoproteinele migrează foarte încet. Această comportare se datorează faptului că partea glucidică din structura glicoproteinelor leagă foarte slab SDS-ul.

Sistemul de separare descris (Glicină-SDS-PAGE) permite separarea proteinelor cu masă moleculară mai mare de 15 kDa. Pentru proteinele cu masele moleculare mai mici decât această limită este indicată utilizarea sistemului **Tricină-SDS-PAGE**.



# Izoelectrofocuseria

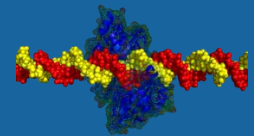
O bună parte a aminoacizilor proteinoși conțin grupe funcționale care, în anumite condiții pot ioniza, și deci care pot genera sarcini electrice ( $\text{COOH}$  în  $\text{COO}^-$ ,  $-\text{NH}_3$  în  $-\text{NH}_4^+$ ). De asemenea, MPT-urile pot introduce grupe funcționale ionizabile pe suprafața moleculelor proteice ( $\text{PO}_4^-$ ) și astfel genera sarcini. Ionizarea acestor grupe este influențată de pH-ul soluției, în sensul în care **la valori de pH mici**, majoritatea grupelor funcționale ce pot accepta  $\text{H}^+$  îi vor accepta și vor deveni **neutre sau pozitive**. **La valori mari de pH**, majoritatea grupelor funcționale ce pot ceda  $\text{H}^+$  îi vor ceda și vor deveni **neutre sau negative**. Fiecare grupă funcțională se caracterizează astfel



printr-o valoare specifică de pH ionizează, valoare de pH care se notează  $\text{pK}_A$ . Grupele funcționale ionizabile din structura aminoacizilor se influențează reciproc, ceea ce face ca fiecare aminoacid să fie caracterizat **printr-o valoare unică de pH la care nici una dintre grupele funcționale nu sunt încărcate electric, aminoacidul fiind lipsit de sarcină – punct izoelectric, pI**.

Același lucru este valabil și pentru proteine. În cazul lor, grupele funcționale de la aminoacizilor de la suprafața moleculelor proteice pot ioniza și deci genera sarcini. Interacțiunea dintre grupele funcționale ionizabile de la suprafața moleculei proteice face ca fiecare proteină să fie caracterizată de un pI unic. Funcție de valoarea acestuia, proteinele se pot împărți în:

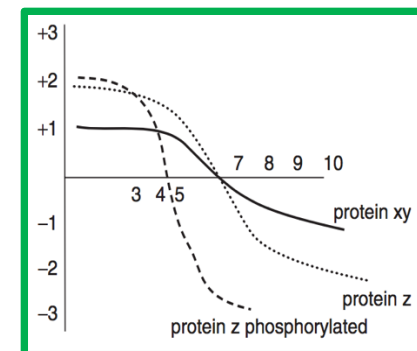
- A. **proteine acide**,  $\text{pI} < 7$ ,
- B. **Proteine bazice**,  $\text{pI} > 7$ .



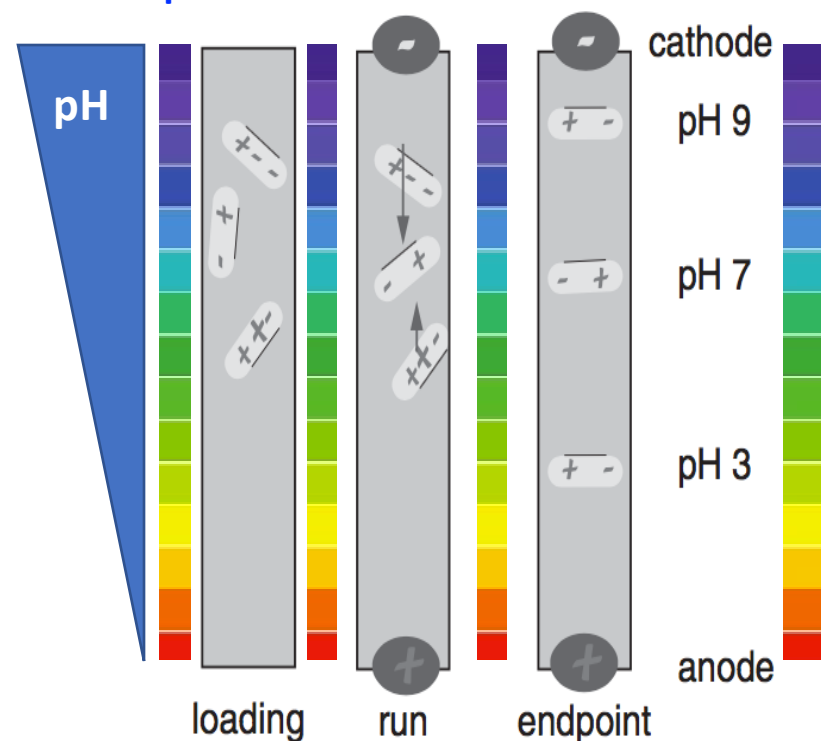
# Izoelectrofocuseria

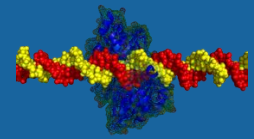
Indiferent de tipul lor, **proteinele vor fi deci încărcate pozitiv la valori de pH mai mici decât pI, încărcate negativ la valori de pH mai mari decât pI și neutre la pI**. Pe această variabilitate a sarcinii proteinelor funcție de pH la care sunt expuse se bazează metoda de fracționare numită - **izoelectrofocuserie**.

**Izoelectrofocuseria reprezintă o metodă de fracționare și separarea a proteinelor funcție de valoarea pI-ului acestora**. Propriu-zis, **proteinele sunt amplasate în geluri în care a fost generat în prealabil un gradient de pH**.



Prin aplicarea curentului electric, **proteinele se deplasează spre unul dintre electrozi, funcție de sarcina lor**. În deplasarea lor spre electrozi, proteinele trec prin zone ale gelului cu valori diferite de pH și sarcina lor se modifică corespunzător. Atunci când **o moleculă proteică ajunge în zona gelului ce are un pH egal ca valoare cu pI-ul său**, sarcina proteinei devine nulă și aceasta **nu se mai deplasează**. Indiferent de timpul de aplicare al curentului electric, o moleculă proteică ajunsă la pI-ul său nu se va mai deplasa în gel. Prin aplicarea îndelungată a curentului electric, toate moleculele proteice cu același pI, indiferent de secvență și locul unde erau amplasate în gel la începutul separării, vor migra și se vor concentra în aceeași zonă – denumirea tehnicii de **izoelectrofocuserie**.





# Electroforeza 2D-PAGE

Electroforeza 2D-PAGE este o metodă de separare a proteinelor în geluri de poliacrilamidă (polyacrylamide gel electrophoresis - **PAGE**) care combină principiile descrise anterior pentru a separa amestecurile proteice funcție de 2 parametri sau dimensiuni (2D):

**A. punctul izoelectric** – printr-o etapă inițială de izoelectrofoculare

**B. masă moleculară** - printr-o etapă de SDS-PAGE.

Deși principiile și metoda în sine a fost introdusă încă din anii 70, aceasta nu a fost utilizată foarte intens datorită dificultăților tehnice întâmpinate în:

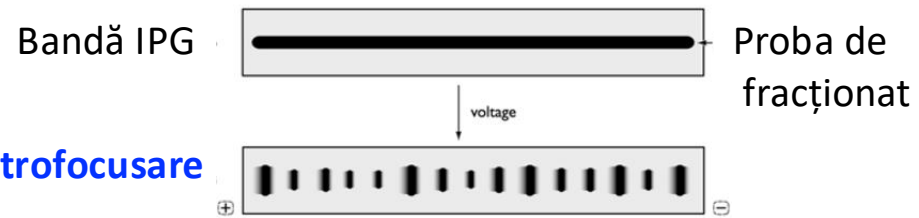
- realizarea într-o manieră repetabilă a gradientului de pH;

- atașarea gelului pentru electrofoculare peste gelul SDS-PAGE și tranferul proteinelor dintr-un gel în altul.

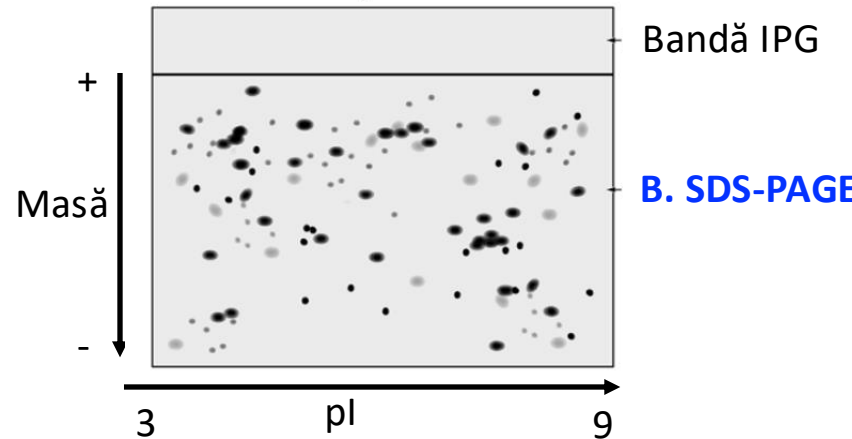
În prezent, prin utilizarea în etapa de electrofoculare a unor benzi de gel în care compușii ce generează gradientul de pH sunt imobilizați pe un gel de acrilamidă (**benzi IPG** – immobilized pH Gradient), 2D-PAGE a devenit metoda de referință pentru studiile de proteomică, ea permițând inclusiv separarea moleculelor proteice cu aceeași secvență, dar cu MPT diferite (Ex. diverse nivele de fosforilare)

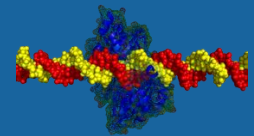
09.12.2024

## A. Izelectrofoculare



Spălare, adăugare de SDS, reducere  
Banda IPG este amplasată peste gelul SDS-PAGE



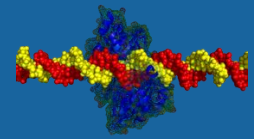


# Detecția proteinelor pe geluri

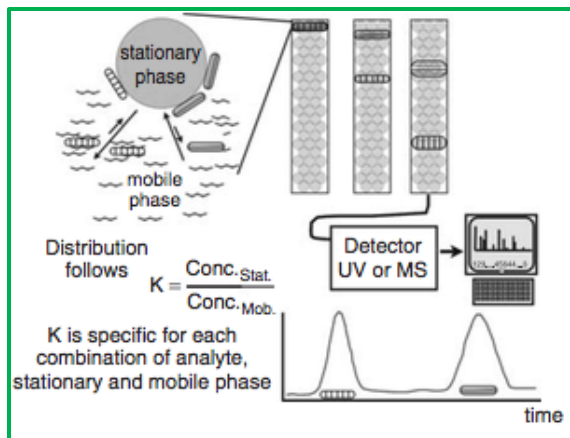
Pentru evidențierea proteinelor separate pe gelurile de poliacrilamidă au fost descrise numeroase protocoale ce pot fi împărțite în două categorii mari:

- 1. colorații specifice** cu care sunt evidențiate doar anumite fracțiuni din toate proteinele separate; aceste colorații se folosesc în special pentru evidențierea unor enzime;
- 2. colorații nespecifice** care realizează colorarea uniformă a tuturor proteinelor separate. Diversele metode de colorare nespecifică diferă între ele prin nivelul de sensibilitate și prin complexitatea. Indiferent de metoda de colorare, la bază stă reacția unui reactiv de culoare cu resturi specifice de aminoacizi din catena polipeptidică (ex. nucleeele aromatice). Din acest motiv intensitatea culorii nu depinde doar de cantitatea de proteină din gel, ci și de secvența de aminoacizi a proteinei colorate.

Metodă de colorare	Sensibilitate	Observații
Coomassie brilliant blue R-250	0,3-1 μg/bandă	Simplă, tradițională, cu sensibilitate redusă. Recomandată pentru gelurile SDS-PAGE) și 2D-PAGE
Coomassie brilliant blue G-250 (coloidal)	100 ng/bandă	Recomandată pentru toate tipurile de geluri, sensibilitate bună dar necesită un timp mai îndelungat de colorare.
Colorație cu argint	10 ng/bandă	Sensibilitate foarte bună, dificil de realizat, necesită o calitate deosebit de bună a reactivilor utilizați
Colorație cuprică	10-100 ng/bandă	Rapidă și ușor de realizat, nu poate fi aplicată decât pentru gelurile cu SDS.
Colorație cu Zn	10-100 ng/bandă	Rapidă și ușor de realizat, nu poate fi aplicată decât pentru gelurile cu SDS.
Coloranți luminescenti tip SYPRO	1-8 ng/bandă	Rapidă și ușor de realizat, aplicabilă tuturor tipurilor de geluri, necesită sistem de achiziție a imaginilor în UV



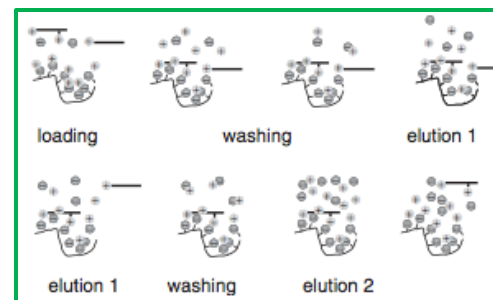
# Metode cromatografice de separare a proteinelor



**Cromatografia** este o metodă fizică de separare a componentelor unui amestec pe baza interacțiunilor diferite pe care le realizează aceștia cu după faze: o fază mobilă și o fază staționară. Funcție de interacțiuni pe baza cărora se realizează, metodele cromatografice aplicabile în cazul proteinelor sunt:

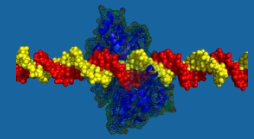
**1. Cromatografia prin schimb ionic (Ion exchange chromatography, IEX)** are la bază existența de sarcini electrice pe suprafața moleculelor proteice. Faza staționară este de

asemenea încărcată electric (pozitiv sau negativ), în așa fel încât proteinele vor avea o afinitate mai mare sau mai mică funcție de aceasta. Numele acestui tip de separare provine de la faptul că eluarea proteinei de pe coloană se realizează prin concentrații crescute de săruri ionizate, faza staționară schimbând proteinele fixate de aceasta cu ioni sării.



**2. Cromatografia pe bază de interacțiuni hidrofobe (Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC)** – separarea se realizează la concentrații mari de săruri ce rețin puternic apa în sfera de hidratare. În aceste condiții, moleculele proteice vor fi lipsite de apa de hidratare și vor interacționa cu o fază staționară puțin hidrofobă, tăria interacțiunii depinzând de dimensiunea zonelor hidrofobe de pe suprafața moleculelor proteice. Prin scăderea concentrației de sare, apa de hidratare devine disponibilă, moleculele proteice interacionează cu aceasta și se desprind de pe faza staționară.



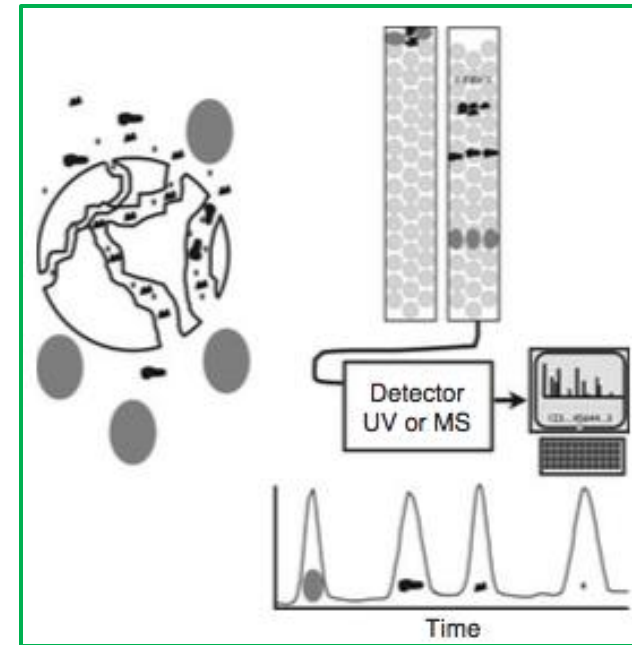


# Metode cromatografice de separare a proteinelor

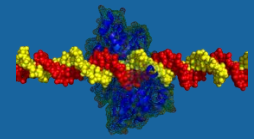
## 3. Cromatografia pe bază interacțiuni hidrofile (Hydrophilic interaction chromatography, HILIC)

– se bazează pe interacțiunile cu o fază staționară puternic hidrofilă, însă aplicabilitatea acestei metode în separarea proteinelor este redusă la proteinele membranare și apolipoproteine.

4. **Filtrarea prin gel** (Size-exclusion chromatography, SEC) - are la bază principiul de separare care presupune excluderea din gel în funcție de dimensiuni (engl. size-exclusion). În funcție de masă, moleculele de dimensiuni diferite vor fi reținute diferentiat la traversarea unui gel cu pori de dimensiuni fixe, astfel încât moleculele mari, care nu pot pătrunde prin pori, vor avea un grad mai mic de reținere, în timp ce moleculele mici vor pătrunde prin porii gelului și se vor „pierde”, fiind astfel foarte mult întârziate.



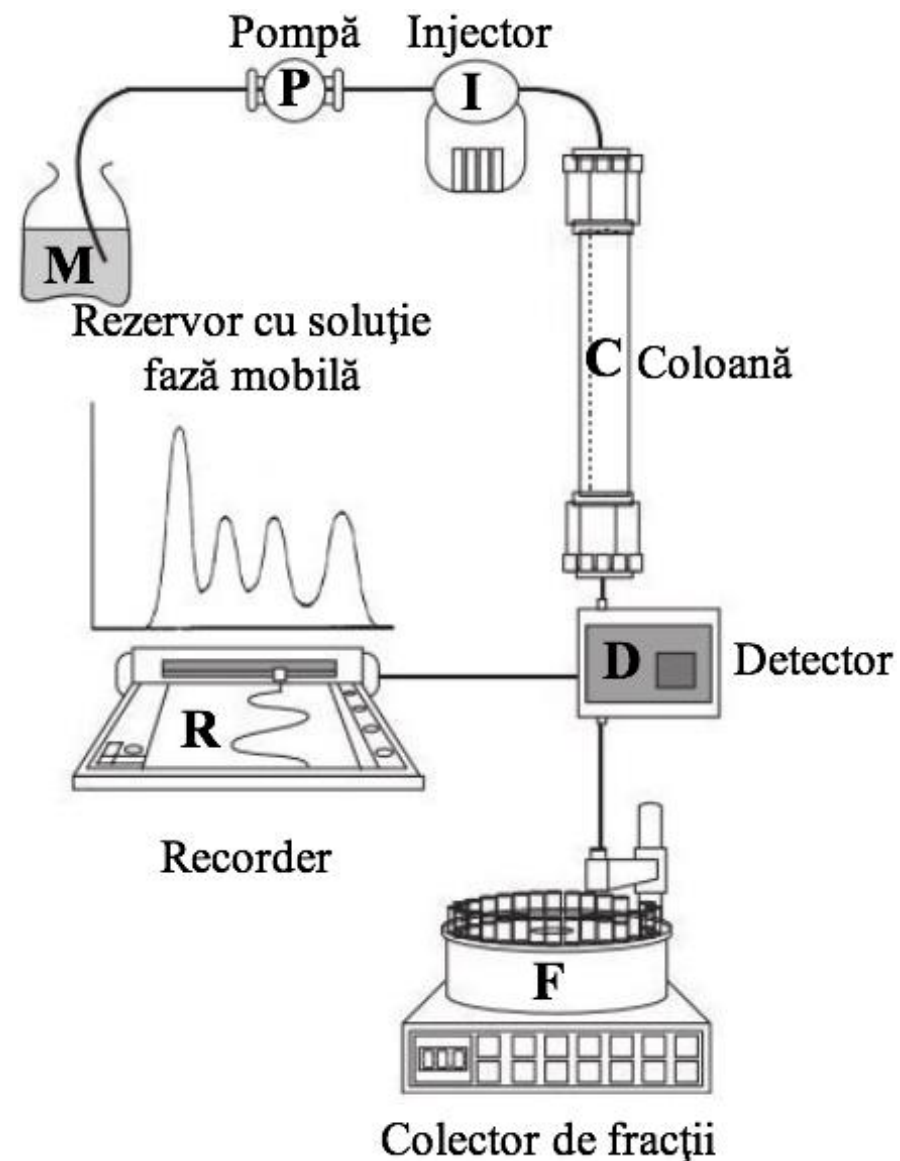
5. **Cromatografia de fază inversată** (Reversed-phase liquid chromatography, RPLC) – este în mod tradițional utilizată pentru separarea peptidelor, însă recent și-a găsit aplicații și în separarea proteinelor. Din motive didactice, principiile și detalii suplimentare vor fi discutate la capitolul corespunzător separării peptidelor post-digestie.

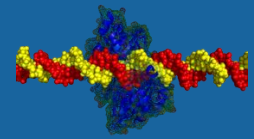


# Metode cromatografice de separare a proteinelor

Fracționarea proteinelor folosind tehnicile cromatografice se realizează în **sisteme cromatografice** care cel mai frecvent sunt alcătuite din:

1. **rezervor** cu soluție reprezentând faza mobilă (M) – capacitatea minimă a rezervorului este dată de dimensiunile coloanei cromatografice, fiind necesar ca acesta să conțină suficientă fază mobilă pentru a permite echilibrarea coloanei și separarea cromatografică propriu-zisă;
2. **pompă (P)** – are rolul de a asigura un debit constant în timpul separării; pentru GF este suficientă o pompă peristaltică simplă, deoarece presiunile atinse în coloană sunt mici; aplicațiile mai complexe necesită o pompă cu piston sau chiar un sistem format din două sau patru pompe cu piston;
3. **injector (I)** – permite injectarea probei de analizat în coloană la momentul stabilit de utilizator. În cazul instrumentelor moderne injector este înlocuit de un autosampler ce încarcă automat probele de analizat;





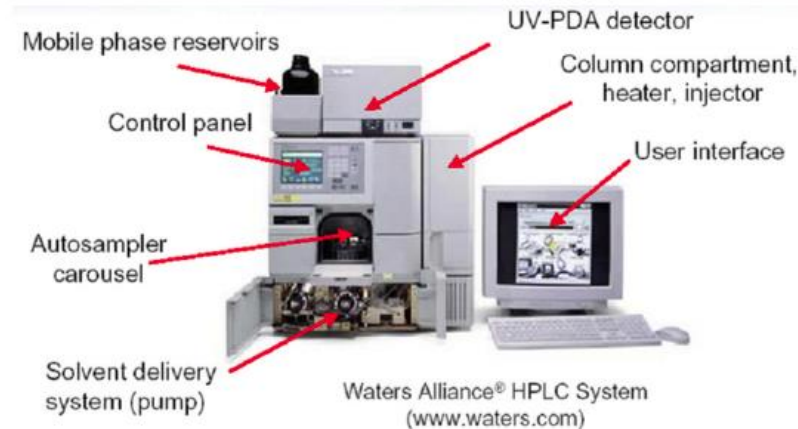
# Metode cromatografice de separare a proteinelor

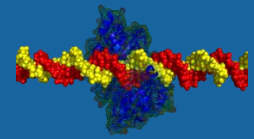
4. **coloana cromatografică (C)** – este elementul în care se realizează propriu-zis separarea; coloanele cromatografice conțin diverse tipuri de faza staționară, funcție de tipul de separare (SEC; HILIC; RPLC, HIC, IEX);

5. **detector (D)** – permite monitorizarea în timp real a concentrației de proteine din faza mobilă la ieșirea din coloana cromatografică și detecția momentului în care proteina investigată este eluată;

6. **colector de fracții (F)** – permite colectarea fracționată automată în eprubete separate a eluentului de pe coloană; nu este obligatoriu, sistemele cromatografice pot fi conectate direct la un spectrometru de masă;

7. **aparat de înregistrare (recorder (R))** – are rolul de a prelua și prezenta grafic valorile înregistrate de către detector; informațiile sunt prezentate sub forma unui grafic numit cromatogramă, pe abscisă (axa Ox) fiind reprezentat timpul (sau volumul), iar pe ordonată (axa Oy) extincția fazei mobile; în cazul sistemelor moderne de cromatografie, sistemul de înregistrare este înlocuit de software-ul de control al întregului sistem cromatografic; acesta permite nu doar monitorizarea, ci și ajustarea în timp real a parametrilor separării.



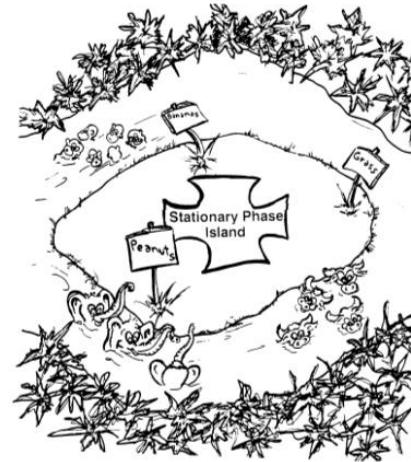


# Metode cromatografice de separare a proteinelor



## A Simple Analogy 1

A zoo train derailed over a river. Monkeys, elephants and cows were free!



## A Simple Analogy 2

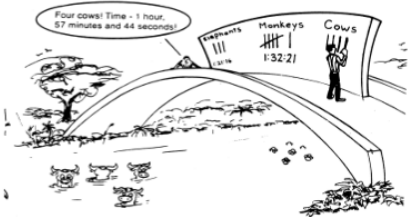
The animals drifted by an island that had bananas, grass and peanuts. Each animal stopped at their favorite food. They each took their time eating before setting off.

© 2009 Sigma-Aldrich Co. All rights reserved.

SIGMA-ALDRICH®

© 2009 Sigma-Aldrich Co. All rights reserved.

SIGMA-ALDRICH®



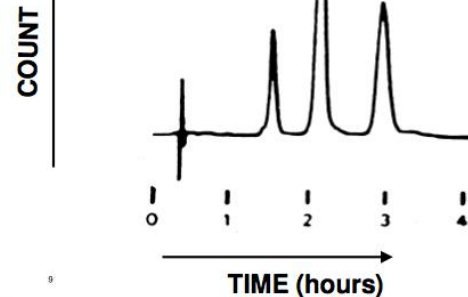
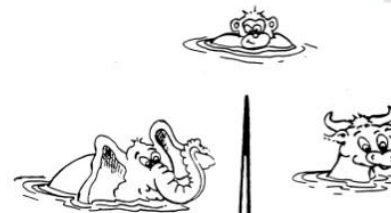
The analysis is now complete.

## A Simple Analogy 3

Eventually, the animals floated under a bridge. As the animals went under the bridge, the "detector" called out the time and the number of each animal.

© 2009 Sigma-Aldrich Co. All rights reserved.

SIGMA-ALDRICH®



## A Simple Analogy 4

The caretakers graphed the detector's data. They plotted the number of each animal on the y-axis and the time it passed under the bridge on the x-axis.

© 2009 Sigma-Aldrich Co. All rights reserved.

SIGMA-ALDRICH®