



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI**  
**"PARTHENOPE"**

Corso di Biochimica con Laboratorio  
A.A. 2013-14

Dispensa:  
**Isolamento, purificazione e dosaggio delle proteine**

Dott. Laura Dipasquale (Tutor)

Corso di Biochimica 9 CFU (prof. Paola Di Donato,  
[paola.didonato@uniparthenope.it](mailto:paola.didonato@uniparthenope.it))

# Isolamento delle proteine

## Rottura delle cellule e produzione degli estratti grezzi

### Omogeneizzazione

L'isolamento di una proteina consiste nella sua separazione dalla cellula o organismo di appartenenza: la proteina in oggetto viene recuperata insieme ad altre componenti cellulari (altre proteine, lipidi, metaboliti, acidi nucleici, etc) dalle quali deve successivamente essere purificata.

A meno che non si isolino proteine esocellulari dai liquidi extracellulari, come il sangue o il brodo di una coltura batterica, la fonte di una proteina è in genere un tessuto (vegetale o animale) o una cellula microbica. Quindi la prima tappa in tutti i procedimenti di isolamento e purificazione di proteine endocellulari deve essere l'omogeneizzazione, ovvero la distruzione delle cellule di partenza, che rilasciano il loro contenuto intracellulare in una sospensione chiamata **estratto grezzo**. Quando possibile, deve essere scelto come materiale di partenza quello che contiene in grandi quantità la proteina di interesse.

### Scelta e conservazione del materiale di partenza

In un processo di purificazione di macromolecole (o organelli citoplasmatici) è fondamentale scegliere un materiale di partenza che contenga elevate concentrazioni della macromolecola (o dell'organello) che si desidera isolare. Da tenere presente nella scelta del materiale di partenza sono anche la sua reperibilità e il costo.

L'impiego delle cellule scelte come materiale di partenza dovrebbe avvenire il più rapidamente possibile al fine di minimizzare i processi degradativi. Di norma, le cellule devono essere mantenute a 4°C o congelate alle temperature più basse possibili (ad esempio in un freezer da laboratorio a -80°C) fino al momento dell'omogeneizzazione.

### Metodi di rottura delle cellule

Per l'isolamento di proteine endocellulari, i metodi di omogeneizzazione impiegati (al fine di distruggere i tessuti o le cellule di partenza per produrre un estratto grezzo proteico sciolto in opportuno tampone, da sottoporre successivamente alla purificazione) cambiano a seconda del tipo di materiale di partenza (maggiore o minore resistenza delle pareti cellulari) ed a seconda del materiale che si intende purificare e studiare.

Il campione di partenza può essere costituito da cellule:

✓ di mammifero ( $\varnothing$  10 $\mu$ m): sono poco rigide e si distruggono facilmente;

- ✓ vegetali ( $\varnothing$  100 $\mu$ m): hanno una parete cellulare rigida, per cui sono rotte mediante utilizzo di con forze taglienti;
- ✓ batteri ( $\varnothing$  1-4  $\mu$ m): hanno una parete cellulare molto rigida;
- ✓ funghi e lieviti: hanno una parete cellulare rigida.

Si possono distinguere (a scopo didattico) metodi blandi, moderati e vigorosi di omogeneizzazione. Prima dell'omogeneizzazione il tessuto o le cellule utilizzate come materiale di partenza sono sospese in 2-3 volumi di tampone specifico.

### Metodi blandi

- **lisi per osmosi:** si utilizza con cellule fragili (come i globuli rossi), che si lisano se immerse in acqua distillata a causa della differenza di pressione osmotica tra l'ambiente intracellulare e quello extracellulare. Ciò determina un rigonfiamento delle cellule, con conseguente aumento della pressione sulla membrana cellulare e lisi della stessa (in questi casi anche le membrane degli organelli citoplasmatici possono rompersi).



Un abbassamento drastico della pressione osmotica esterna (es: immersione in acqua distillata) provoca un rigonfiamento delle cellule e l' "esplosione" delle membrane.

Le cellule animali mantengono costante la concentrazione intracellulare di soluti scambiando attivamente (consumo di ATP) ioni con l'esterno.

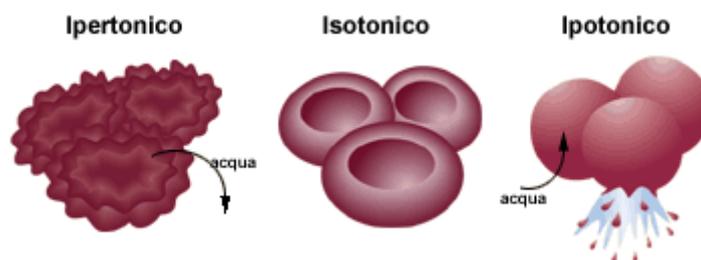


Figura 1 – Schematizzazione di ciò che si verifica ad una cellula se viene posta in una soluzione ipertonica, isotonica e ipotonica rispetto all'ambiente intracellulare

- **digestione enzimatica:** in modo specifico nel caso dei batteri, la parete cellulare può essere digerita mediante l'utilizzo di enzimi, come il lisozima. Questo può degradare la parete di peptidoglicani dei batteri Gram-positivi, determinando così la lisi osmotica della membrana cellulare. Anche i batteri Gram-negativi possono essere lisati per azione del lisozima, ma in tal caso devono essere utilizzati anche EDTA, che rimuove gli ioni  $Ca^{2+}$  e destabilizza lo strato polisaccaridico esterno e un detergente non ionico, che solubilizza la membrana cellulare. Analogamente, per i lieviti i due enzimi più comunemente impiegati sono la zimoliasi e la liticasi.

I metodi enzimatici sono generalmente impiegati solo in piccola scala in laboratorio, perché i costi sono troppo elevati per lavori su grande scala.

- **solubilizzazione chimica:** utilizzata in particolare per i lieviti. La degradazione delle membrane/pareti è operata da solventi organici (quali toluene o etile acetato) o detergenti (ad esempio sodio dodecil solfato, SDS) e il rilascio degli enzimi idrolitici endocellulari completa la degradazione delle membrane.
- **omogeneizzatori tipo potter:** le membrane sono lacerate dalle forze frizionali che un pestello in teflon o vetro (generalmente mantenuto in rotazione grazie ad un motore elettrico) esercita contro le pareti di uno spesso cilindro di vetro. Questa è una tecnica utilizzata per tessuti animali (fegato, reni, cuore etc.) e non è adatta per cellule batteriche e lieviti.

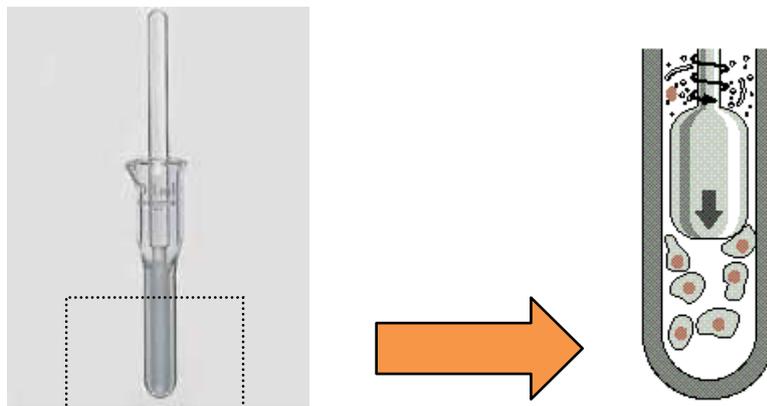


Figura 2 – Tipico omogeneizzatore a potter visto nell'insieme e in dettaglio

### Metodi moderati

- **omogeneizzatori a lama:** si tratta di normali frullatori. In presenza di tampone il tessuto viene sminuzzato per azione delle lame e frullato. E' una metodica adatta sia a tessuti animali che vegetali.



Figura 3 – Tipico omogeneizzatore a lama

- **macinazione con mortaio:** è una tecnica adatta alle cellule batteriche o vegetali, che sono dotate di parete cellulare. Le cellule sono mescolate con sabbia e triturate con un pestello a mano (la rottura delle pareti è data dall'effetto abrasivo della sabbia e allumina). In alternativa, i tessuti vegetali possono essere congelati in azoto liquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ): ciò rende le pareti particolarmente fragili, per cui successivamente è abbastanza facile rompere le cellule con un pestello.



Figura 4 – Tipico mortaio con pestello

### Metodi vigorosi

- **French Press:** è una metodica adatta a lieviti e batteri, che prevede che la sospensione di cellule venga inserita in una camera di compressione di acciaio inox, dotata di pistone e chiusa da una valvola a spillo. Successivamente tutta l'aria è rimossa dalla camera e mediante il pistone vengono applicate sulle cellule pressioni idrauliche elevatissime (fino a  $10^5$  kPa  $\approx$  1000 atm). Poi la valvola a spillo viene lentamente aperta, così che le cellule, fino a quel momento sottoposte ad altissime pressioni, possono fuoriuscire dalla valvola stessa. La rottura avviene a causa delle forze taglienti, man mano che le cellule passano attraverso la piccola apertura, ma anche a causa del rapido calo di pressione quando ne fuoriescono.

Infatti le cellule precedentemente compresse sono libere di espandersi rapidamente e di scoppiare. Affinchè tutte le cellule siano lisate sono necessari più passaggi.

- **sonicazione:** è una tecnica utilizzata per batteri e sospensioni di altri tipi di cellule. Nel campione viene immersa la sonda metallica di un sonicatore, che vibrando è in grado di emettere onde sonore ad altissima frequenza ( $> 20$  kHz). Le cellule vengono rotte dalle elevate pressioni locali indotte da queste onde.



Figura 5 – Esempio di un classico sonicatore ad ultrasuoni

- **macinazione con microsferi:** le cellule vengono mescolate con sfere di vetro di diametro molto ridotto e poi sottoposte a vigorosa agitazione con strumenti appositi (vortex e simili) per diversi minuti. Le cellule, intrappolate tra le sferette, sono frantumate a causa degli urti tra le microsferi. E' una tecnica utilizzata per lieviti, batteri e altre sospensioni cellulari.

### **Proprietà chimico-fisiche delle soluzioni impiegate per l'omogeneizzazione**

Le soluzioni impiegate per sospendere le cellule e per stabilizzare l'estratto grezzo devono mantenere il più possibile l'integrità degli organelli (se questi si vogliono ottenere intatti) e delle macromolecole presenti nella cellula. La formulazione di queste soluzioni è basata sulle caratteristiche chimico-fisiche dei fluidi biologici. In particolare, è importante che queste soluzioni mantengano un pH simile a quello fisiologico.

Il mantenimento del pH della soluzione a valori fisiologici (o quasi) è essenziale per preservare la funzionalità biologica dell'estratto. Comunque, in alcuni casi, variazioni deliberate del pH possono aiutare lo studio analitico di alcuni gruppi di molecole (come amminoacidi e proteine) mediante tecniche di elettroforesi e cromatografia a scambio ionico.

Il mantenimento del pH ad un valore costante nei sistemi biologici è ottenuto mediante l'azione di efficienti **sistemi tampone (o buffer)**, la cui natura chimica fa sì che resistano a variazioni della concentrazione degli ioni idrogeno dovute alla presenza di acidi o di basi.

Nella pratica, le soluzioni tampone sono costituite da una miscela di acido o base debole e dal loro sale, per esempio acido acetico e sodio acetato. In una soluzione di un acido debole ( $\text{RCOOH}$ ) e del suo sale ( $\text{RCOO}^-$ ), gli ioni  $\text{H}^+$  aggiunti vengono neutralizzati dall'anione del sale, il quale agisce perciò come una base debole; invece l'aggiunta di ioni  $\text{OH}^-$  viene rimossa dalla neutralizzazione dell'acido. La capacità tamponante dipende anche dalla concentrazione totale dell'acido e della base coniugata e dalle loro relative proporzioni: maggiore è la concentrazione totale, maggiore è la capacità tamponante. La concentrazione abituale di acido e sale nelle soluzioni tampone è dell'ordine di 0.05 – 0.2 M.

Acido o base	pKa (a 25°C)	Note
Acido acetico	4.7	È efficace come tampone solo a pH acidi (4.0-5.5)
Acido citrico	3.1 (pKa <sub>1</sub> ) 4.8 (pKa <sub>2</sub> ) 6.4 (pKa <sub>3</sub> )	È efficace come tampone a pH <7. Tende a chelare gli ioni polivalenti
MES acido 2-(N-morpholino)- etansulfonico	6.1	È uno dei cosiddetti "Good buffers" (dal nome di chi ne ha approfondito per primo l'uso in biochimica e biologia cellulare), come anche Bicina, PIPES, HEPES ed altri. E' poco tossico per le cellule
Acido carbonico	6.3 (pKa <sub>1</sub> ) 10.3 (pKa <sub>2</sub> )	La forma diprotonata tende a formare $\text{CO}_2$ . Come tampone per la biochimica, a pH alcalini, è migliore lo ione monoacido $\text{HCO}_3^-$
PIPES acido 1,4- piperazinodietansulfonico	6.8	Relativamente costoso, ma valido. Interagisce pochissimo con i metalli divalenti ( $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ ). Può interferire con il metodo di Lowry per la determinazione della concentrazione proteica
Imidazolo	7.0	E' uno dei sistemi tampone che stabilizza il pH del sangue
Acido fosforico	2.1 (pKa <sub>1</sub> ) 7.2 (pKa <sub>2</sub> ) 12.7 (pKa <sub>3</sub> )	Poco costoso. È spesso metabolita o inibitore di sistemi enzimatici. Tende a precipitare i cationi polivalenti
HEPES acido 4-2-idrossietil-1- piperazinil- etansulfonico	7.5	Vedi: PIPES
		Poco costoso e molto usato. Tuttavia può dare effetti inibitori con molti sistemi

Tris	8.1	enzimatici ed interagire fortemente con i metalli di transizione. Il suo pKa varia sensibilmente con la temperatura
Bicina <i>N,N'</i> -bis(2-idrossietil)glicina	8.3	Un "Good buffer"
Acido borico	9.2	Forma complessi con gli acidi nucleici
Glicina	2.3 (pKa <sub>1</sub> ) 9.8 (pKa <sub>2</sub> )	E' il più semplice dei venti amminoacidi ordinari

Tabella 1 – Esempi dei tamponi più comunemente usati in biochimica

Altri componenti delle soluzioni tamponate:

- ✓ all'interno della cellula le proteine si trovano in un ambiente altamente riducente, ma quando vengono rilasciate nel tampone si trovano esposte ad un ambiente più ossidante. Poiché molte proteine contengono gruppi sulfidrilici (dell'amminoacido cisteina), tali gruppi possono andare incontro ad ossidazione formando ponti disolfuro inter e intramolecolari. Per impedire che ciò avvenga, si aggiungono nella soluzione tampone degli agenti riducenti, come ditionitrito,  $\beta$ -mercaptoetanololo, cisteina o glutatione ridotto. Questi composti tiolici non vanno usati durante le procedure di purificazione di proteine che contengono ponti disolfuro essenziali;
- ✓ inibitori delle proteasi, che servono ad impedire o ritardare i fenomeni degradativi dovuti alla liberazione delle proteasi intracellulari. Si usano molecole specifiche per diverse classi di proteasi, come il PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro, che è un inibitore delle proteasi a serina), la leupeptina (un tripeptide modificato, inibitore reversibile di alcune proteasi seriniche e cisteiniche), la pepstatina A (che blocca le proteasi acide quali pepsina, renina e chimosina), l'EDTA (un chelante dei metalli, che quindi inibisce indirettamente le metalloproteasi);
- ✓ substrati enzimatici e cofattori. Infatti bassi livelli di substrato possono essere aggiunti in un tampone d'estrazione, poiché il legame del substrato al sito attivo può stabilizzare l'enzima stesso nel corso del processo di purificazione. Quando occorre, si aggiungono anche i cofattori che potrebbero andare persi durante la purificazione, per mantenere l'attività enzimatica affinché sia rilevabile durante l'analisi degli eluati delle colonne cromatografiche;
- ✓ detergenti ionici, quali il sodio dodecilsolfato (SDS), il sodio deossicolato, il cetiltrimetilammonio bromuro (CTAB), e non-ionici, come il Triton X-100 e il Nonidet P-40 sono utilizzati nel caso dell'estrazione di proteine intrinseche di membrana, ricche di amminoacidi idrofobici (per le regioni della proteina immerse nella membrana e associate ai lipidi) e con bassa solubilità nei tamponi acquosi. I detergenti (soprattutto quelli ionici come SDS e sodio deossicolato) possono causare la denaturazione delle proteine quindi subito dopo il loro impiego devono essere rimossi (per es: mediante dialisi);

✓ in tamponi che devono essere conservati per lunghi periodi di tempo si aggiungono agenti antibatterici e/o antimicotici a basse concentrazioni, come la sodio azide ( $\text{NaN}_3$ , agente batteriostatico).

### Per concludere...

Nei processi di isolamento e purificazione delle proteine, è necessario evitare la denaturazione dei campioni proteici.

La procedura da adottare per ottenere un estratto grezzo contenente la proteina da purificare dipende dalla localizzazione cellulare della proteina stessa. Nel caso di **proteine esocellulari**, il loro recupero non richiede la rottura cellulare: tali proteine sono sintetizzate dalle cellule e rilasciate nel brodo di coltura nel quale sono solubili e dal quale sono recuperate mediante centrifugazione a bassi giri che consente di allontanare le cellule intatte. Dopo tale procedimento si procede trattando il grezzo proteico in modo analogo a quanto si fa con le proteine ottenute da tessuti o di origine endocellulare (ovvero procedendo con le procedure di frazionamento).

Le **proteine endocellulari** possono essere recuperate dopo rottura delle cellule; quest'ultime possono essere lisate con diverse tecniche e la più adatta è scelta in base alla fragilità delle cellule. Dopo la rottura cellulare, nel caso in cui si vogliano isolate **proteine di membrana**, queste vengono recuperate in modo differente a seconda che siano:

- ✓ periferiche: si agisce mediante aumento della forza ionica (es.  $[\text{NaCl}]$ ), mediante shock termico (congelamento-scongelamento) o con enzimi (tagliando l'ancora peptidica che fissa l'enzima alla membrana);
- ✓ integrali: si solubilizza la proteina a partire dal tessuto omogeneizzato, oppure si isola intatto il comparto subcellulare cui essa appartiene e poi la si solubilizza. La solubilizzazione si effettua usando detergenti quali il Tween 20 (un derivato del polietilenglicole), il sodio deossicolato, il Triton X-100 o il sodio dodecilsolfato (SDS).

Nel caso di **proteine citosoliche**, dopo la rottura cellulare i componenti subcellulari che non interessano sono rimossi mediante centrifugazione differenziale ad alti g per alcune ore e successivamente si recupera il supernatante.

## Procedure per la purificazione di una proteina da un estratto grezzo

Per analizzare in dettaglio una particolare proteina occorre prima separarla dalle altre presenti nella stessa cellula e per far ciò bisogna disporre di opportune tecniche. Si è tentati di pensare che un estratto cellulare contenga solo proteine, mentre in realtà vi si

trovano anche una vasta gamma di altre molecole, come DNA, RNA, carboidrati e lipidi insieme a metaboliti a basso peso molecolare.

Gli estratti grezzi di origine batterica possono essere particolarmente viscosi a causa della presenza del DNA cromosomico. Alcuni operatori aggiungono DNasi I al tampone di estrazione per ridurre la viscosità; i piccoli frammenti di DNA che si ottengono vengono rimossi durante i successivi passaggi di dialisi. In modo analogo l'RNA può essere rimosso mediante trattamento con RNasi.

Di norma, la concentrazione nell'estratto grezzo della proteina d'interesse è molto bassa, perché il principale "contaminante" è l'acqua! Per purificare la proteina desiderata l'estratto è di norma sottoposto a trattamenti che separano le proteine in frazioni diverse in base a proprietà comuni, come la carica o le dimensioni: questo processo va sotto il nome di frazionamento. Lo scopo è quello di ottenere una soluzione via via a più alta concentrazione della proteina d'interesse.

A tale scopo dunque si procede inizialmente con il frazionamento per precipitazione e poi successivamente si utilizzano in sequenza tecniche di purificazione ad alta capacità e bassa risoluzione (dialisi ed ultrafiltrazione) seguite da tecniche a bassa capacità ed alta risoluzione (cromatografia ed elettroforesi).

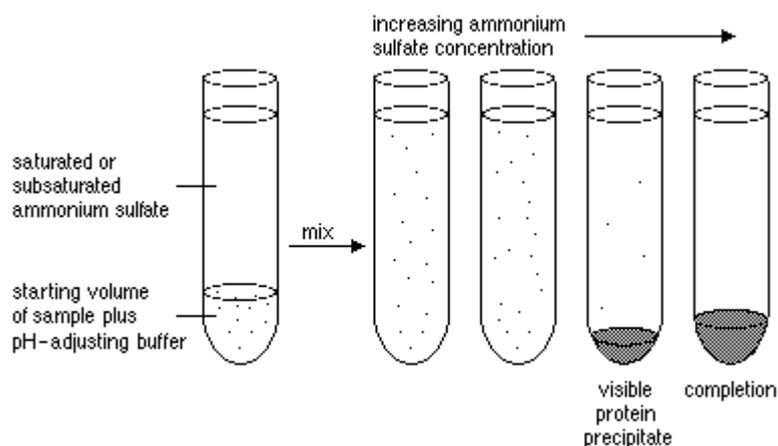
### **Frazionamento per precipitazione**

È importante sottolineare che le tecniche di frazionamento vengono usate anche nel caso in cui la proteina che si intende isolare è presente in un brodo cellulare ovvero quando la proteina di interesse è una proteina extracellulare (NOTA: si ricordi che le tecniche di omogeneizzazione sono invece richieste quando si intende isolare proteine o in genere biomolecole intracellulari).

Il **frazionamento per precipitazione** può basarsi su:

- ✓ stabilità alla temperatura o pH: se la proteina d'interesse è particolarmente stabile al calore, si può riscaldare l'estratto grezzo a temperature a cui la proteina è ancora stabile, mentre le altre si denaturano (ovvero vengono distrutte le interazioni idrofobiche, i legami idrogeno e i ponti disolfuro che ne stabilizzano la struttura terziaria, permettendone l'attività). Infatti una volta nota la temperatura alla quale la proteina d'interesse si denatura, è possibile rimuovere le altre proteine più termolabili mediante riscaldamento della miscela a una temperatura di 5-10°C più bassa di quella critica per 15-30 minuti. Le proteine denaturate sono eliminate mediante centrifugazione. Un procedimento analogo può essere seguito per la sensibilità ai pH estremi, portando l'estratto proteico ad un pH differente di almeno un'unità rispetto a quello al quale la proteina in esame denatura e quindi precipita;
- ✓ solubilità: generalmente la ridotta solubilità di una proteina dovuta alla presenza nella stessa soluzione di un'elevata quantità di sali è un effetto chiamato "**salting out**". La

solubilità delle proteine è influenzata da vari fattori, come pH, temperatura e concentrazione salina. Infatti le proteine in soluzione sono circondate da uno strato di idratazione, sensibile alle tecniche di precipitazione. Le alte concentrazioni saline allontanano lo strato di idratazione dalle proteine, in quanto gli ioni diventano solvatati, favorendo in questo modo l'interazione tra le regioni idrofobiche delle proteine, che di conseguenza si aggregano. Questo metodo precipita le proteine nella loro conformazione nativa, in quanto diventano insolubili in seguito ad un processo di aggregazione, ma non si denaturano. Le prime proteine a precipitare sono quelle con un maggior numero di residui idrofobici sulla superficie, seguite dalle proteine con meno residui idrofobici. Gli aggregati visibili ed insolubili che si formano sono composti da una miscela di varie proteine, in quanto le singole molecole identiche non si cercano l'una con l'altra, ma si legano ad un'altra molecola adiacente con un tratto idrofobico esposto. L'aggregato è poi recuperato mediante centrifugazione e successivamente risospeso in un tampone opportuno. Per questo processo gli ioni più efficaci sono gli anioni a carica multipla e i cationi monovalenti: l'ammonio solfato,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , è spesso usato a questo scopo per la sua grande solubilità in acqua.



**Figura 6 – Esempio di “salting out” mediante l’utilizzo di ammonio solfato, con conseguente precipitazione delle proteine all’aumentare della sua concentrazione. Generalmente, per velocizzare la fase della precipitazione degli aggregati proteici, si procede alla centrifugazione del campione**

A seconda della sostanza che deve essere precipitata (proteine, polisaccaridi, etc) si possono utilizzare anche solventi organici miscibili in acqua, come l’etanolo, l’acetone e il butanolo e il polietilenglicole, un polimero organico idrosolubile. Nel caso specifico della precipitazione delle proteine, i solventi organici abbassano la costante dielettrica e rimuovono le molecole di  $\text{H}_2\text{O}$  dalla superficie delle proteine: in tal modo sono favorite le interazioni elettrostatiche (anziché idrofobiche) proteina-proteina. L’effetto è in qualche modo opposto a quello descritto sopra e chiamato “**salting in**”, fenomeno per cui in acqua distillata o comunque a forza ionica molto bassa la solubilità delle proteine diminuisce. In

questo caso il problema derivante dall'uso dei solventi organici è una parziale denaturazione delle proteine.

### Dialisi ed ultrafiltrazione

Dopo questo primo trattamento, si prosegue con la purificazione della proteina di interesse, ovvero con la sua separazione dai componenti cellulari di diversa natura chimica. Tra le tecniche di purificazione caratterizzate da alta capacità e bassa risoluzione troviamo la dialisi e l'ultrafiltrazione.

Per effettuare la **dialisi**, l'estratto parzialmente purificato viene posto in un tubo costituito da una membrana semipermeabile in un grande volume di una soluzione tampone con la giusta forza ionica. Nell'ambito di una stessa membrana semipermeabile i pori sono dotati di dimensione approssimativamente costante, anche tali dimensioni possono variare da membrana a membrana: infatti sono disponibili in commercio membrane con "cut-off" molto diversi, che possono lasciar passare solo molecole di piccole dimensioni. In particolare con la dialisi le proteine più grandi dei pori della membrana semipermeabile rimangono all'interno del tubo, mentre gli altri soluti modificano la loro concentrazione fino ad equilibrarsi con la soluzione presente all'esterno del sacchetto. La dialisi per esempio è utilizzata per allontanare l'ammonio solfato dalla soluzione proteica dopo il processo del "salting out".

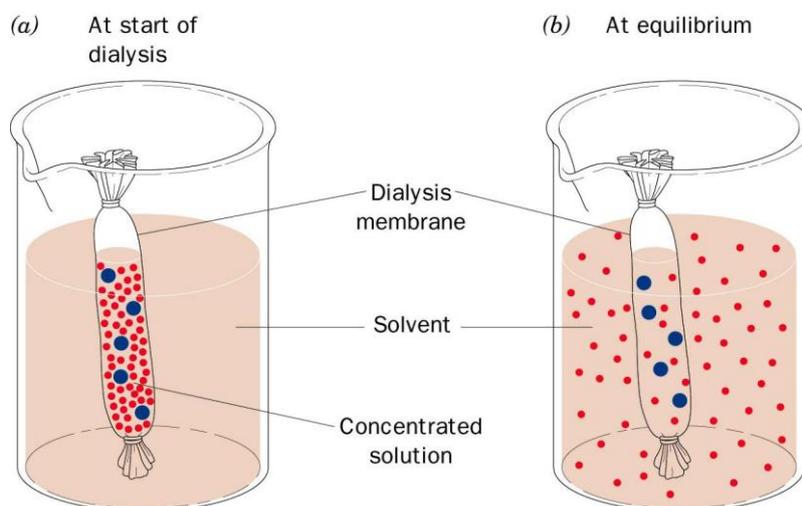


Figura 7 – Tubo da dialisi contenente una soluzione proteica ad alta concentrazione salina (per esempio, dopo precipitazione con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ): a) il tubo è immerso in una soluzione tampone con opportuna forza ionica, differente da quella del campione; b) dopo alcune ore è possibile osservare la fuoriuscita dei soluti con dimensioni più piccole rispetto ai pori del tubo. Generalmente, sono necessari più cambi della soluzione in cui è immerso il tubo per accertarsi che sia raggiunto l'equilibrio tra il campione e il solvente. Infatti l'uso di un largo eccesso di soluzione esterna, nonché il cambio ripetuto di tale soluzione, consente di eliminare le piccole molecole presenti nella soluzione proteica. Generalmente la dialisi è condotta a  $4^\circ\text{C}$ , con agitazione del tubo, per circa 24 h

Nell'ambito della purificazione di una proteina, generalmente la concentrazione di un campione proteico diluito avviene mediante **ultrafiltrazione**, che consiste nel "forzare" il

passaggio del campione attraverso una membrana semipermeabile (in polisulfonato o altri polimeri sintetici), che viene attraversata da acqua e piccoli soluti, ma non dalla proteina d'interesse. Anche in questo caso, come per i tubi da dialisi, sono disponibili membrane con diversi cut-off, da selezionare in base alla massa molecolare della proteina d'interesse. Nel caso dei tubi Centricon, il campione caricato nella camera superiore dell'apparato passa attraverso una membrana (con un determinato cut-off) nella camera inferiore grazie all'accelerazione centrifuga. Infatti il tubo viene centrifugato a bassa velocità e la rotazione consente il passaggio di gran parte dell'acqua e sali (l'"ultrafiltrato") nella camera inferiore. Nella camera superiore rimane soltanto una piccola frazione del volume iniziale in cui la proteina si trova molto concentrata.

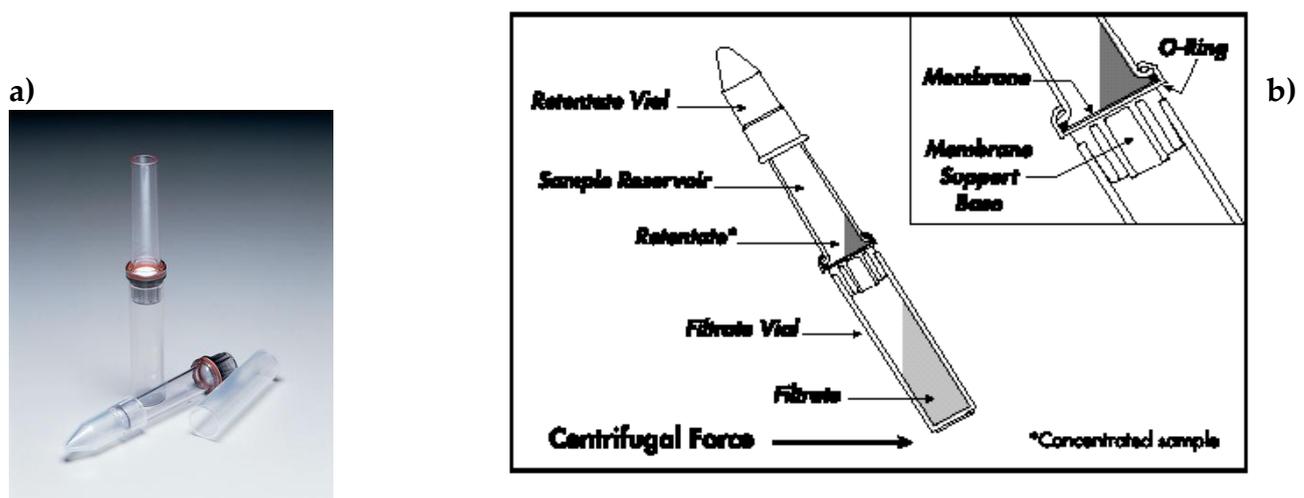


Figura 8 – a) Rappresentazione schematica del processo di ultrafiltrazione mediante il sistema Centricon; b) esempi di sistemi Centricon disponibili in commercio

Nel caso degli apparati ad agitazione magnetica, l'ultrafiltrazione è indotta applicando una pressione di qualche atmosfera (si usa un gas compresso, generalmente azoto) nella camera in cui si trova il campione. Sotto la membrana (con un opportuno cut-off) si trova un supporto rigido traforato, in cui si raccoglie l'ultrafiltrato, che viene poi drenato all'esterno. Il campione viene mantenuto in agitazione per evitare che le macromolecole otturino la membrana.

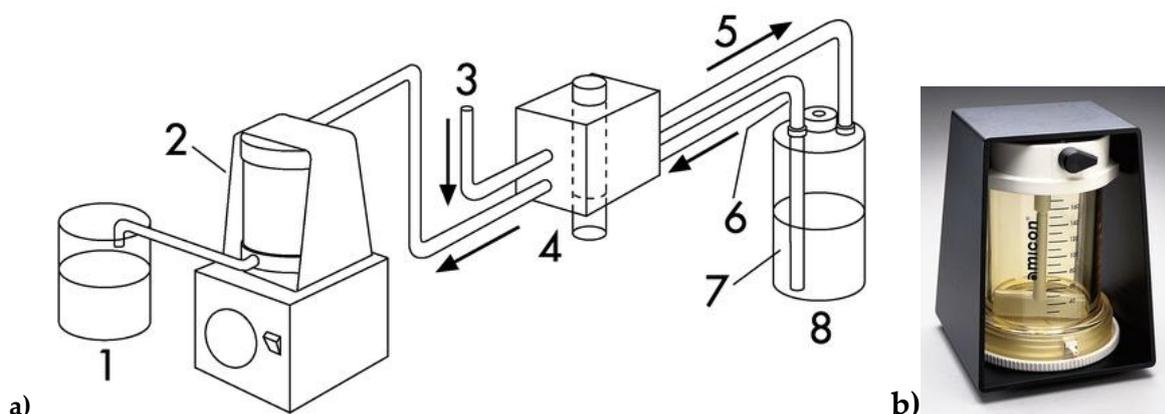


Figura 9 – a) Rappresentazione schematica del processo di ultrafiltrazione mediante un apparato ad agitazione magnetica: 1– ultrafiltrato, 2 – apparato per ultrafiltrazione, 3 – sorgente di pressione, 4 – valvola per l'immissione del gas, 5 – ingresso del gas, 6 – uscita del gas, 7 – alimentazione del gas, 8 – serbatoio del gas compresso; b) un esempio di apparato ad agitazione magnetica disponibile in commercio

## Cromatografia su colonna

La cromatografia è una tecnica di migrazione differenziale che permette la separazione dei costituenti di una miscela, permettendo la determinazione qualitativa e quantitativa dei vari componenti. Il metodo più funzionale per separare le proteine è la cromatografia su colonna, che permette di sfruttare le differenze in carica, dimensioni e affinità di legame tra le proteine.

In ogni tecnica cromatografica devono essere identificabili due fasi immiscibili tra loro: una fase fissa (o stazionaria) immobilizzata, che può essere solida, liquida, gel o una miscela solido/liquida e una fase mobile (o eluente), che può essere liquida (cromatografia liquida) o gassosa (gas cromatografia), che fluisce sopra o attraverso la fase stazionaria e che contiene la miscela di sostanze da separare. Le fasi stazionarie solide sono costituite da particelle insolubili nella fase mobile e hanno diversa granulometria (ovvero dimensione della particelle solide) a seconda del tipo di cromatografia; le fasi stazionarie liquide sono adsorbite su supporti solidi a loro volta costituiti da particelle solide chimicamente inerti.

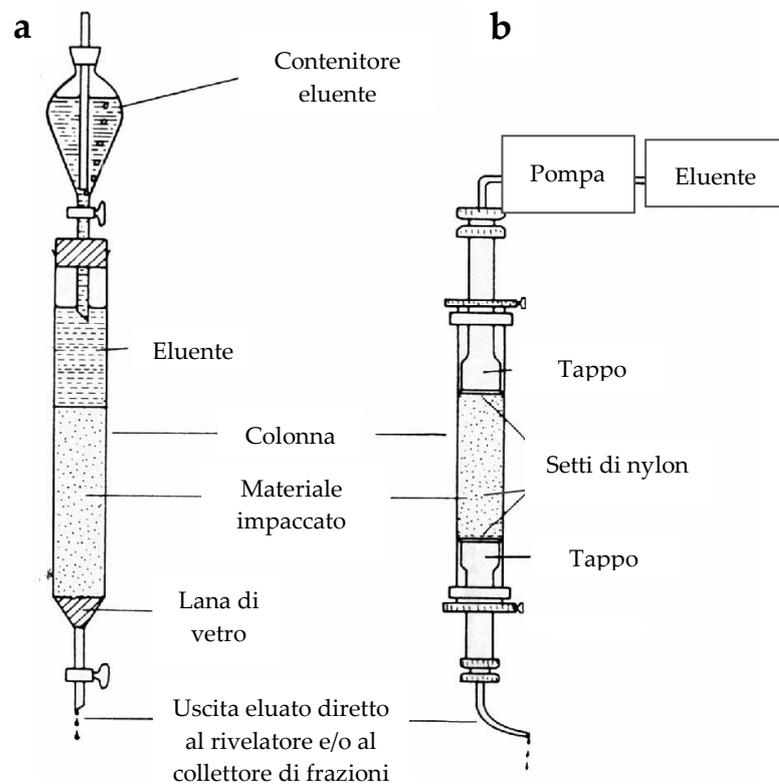
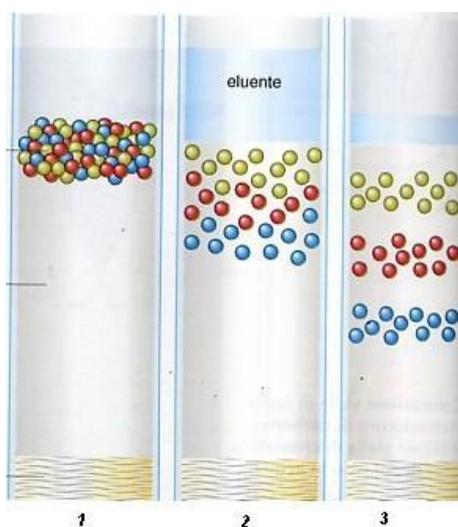


Figura 10 - Il flusso della fase mobile all'interno della colonna può avvenire per effetto della gravità (a) oppure per azione di una pompa (b)

Nel caso della cromatografia per la separazione di proteine si impiega sempre la cromatografia su colonna, dove la fase stazionaria è immobilizzata su un supporto (matrice) inerte ed insolubile, "impaccato" dentro una colonna di vetro, plastica o metallo. Invece la fase mobile, chiamata anche eluente, consiste in un solvente organico o una miscela di solventi contenenti un tampone acquoso e viene fatta scorrere continuamente sulla fase stazionaria per gravità o usando un sistema di pompaggio o applicando un gas sotto pressione. Il campione viene disciolto in un solvente adatto, caricato sulla cima della colonna e applicato alla fase stazionaria come una banda stretta e discreta. Il passaggio continuo della fase mobile su quella stazionaria determina la progressiva separazione del campione nei suoi componenti (analiti). Questi, durante il loro percorso, sono rallentati in misura variabile e quindi tendono a separarsi (fig. 11). Gli analiti con la solubilità più alta nella fase mobile si muovono più velocemente attraverso la fase stazionaria. Per facilitare la separazione degli analiti, la composizione della fase mobile può essere cambiata gradualmente, rispetto al pH o alla polarità. Quando un particolare analita è stato rimosso dalla colonna dalla fase mobile si dice che è stato eluito. Le varie componenti escono a tempi diversi dalla colonna e sono raccolte in frazioni diverse di eluato. La separazione dei componenti avviene in quanto ogni sostanza ha una distribuzione caratteristica tra le due fasi (costante di ripartizione  $K_d = C_s/C_m$ ).



**Figura 11 – La soluzione contenente i componenti da separare viene caricata sulla colonna contenente la fase stazionaria. Le diverse proteine, indicate con vari colori, sono inizialmente mescolate (1). Un solvente (eluente) le costringe a scendere lungo la colonna, ma la fase stazionaria le trattiene in modo selettivo (2).**

**Le proteine presenti nella fase mobile o scendono lungo la colonna o sono trattenute dalla fase stazionaria. Nell'esempio le molecole azzurre sono quelle con minore affinità con il materiale solido e sono trattenute di meno; le gialle sono le più lente, mentre le rosse hanno una velocità intermedia.**

**L'effetto complessivo del procedimento è la separazione dei vari costituenti della miscela iniziale (3)**

All'uscita della colonna e prima del raccogliatore di frazioni può trovarsi un rivelatore (ad esempio, un sistema spettrofotometrico), che permette di rilevare la presenza dei composti d'interesse nell'eluato. L'andamento del segnale proveniente dal rivelatore in funzione del

tempo o del volume di eluizione costituisce un **cromatogramma**. Questo è formato da una serie di picchi che rappresentano l'eluizione dei singoli analiti.

La scelta della fase stazionaria e di quella mobile viene fatta in modo tale che i composti che devono essere separati abbiano diversi coefficienti di distribuzione.

### Cenni di teoria

La separazione delle proteine dipende dalle interazioni delle proteine stesse con la fase stazionaria, che ne consentono la ripartizione tra le due fasi (mobile e stazionaria). A tal proposito, un concetto fondamentale in tutte le tecniche di cromatografia è quello di **costante di ripartizione**.

La costante di ripartizione ( $K_d$ ) descrive il modo in cui un composto si distribuisce tra due fasi immiscibili. Ad una determinata temperatura, per una sostanza che si distribuisce tra volumi uguali di due fasi tra loro immiscibili, dette A e B, il valore di questo coefficiente è una costante e si definisce come:

$$K_d = \frac{\text{concentrazione sostanza nella fase A}}{\text{concentrazione sostanza nella fase B}}$$

La diversa distribuzione dei componenti di una miscela dipende dalle interazioni che essi sono in grado instaurare con le due fasi: tali interazioni dipendono dalle caratteristiche chimico-fisiche di ciascun componente della miscela. Il tipo di interazione che il componente stabilisce con la fase stazionaria costituisce il meccanismo o principio di separazione cromatografica. I diversi principi cromatografici comprendono:

- ✓ adsorbimento: la fase stazionaria è un solido e la separazione si basa sulla formazione di legami deboli (legami H, legami dipolo-dipolo) tra fase ed analiti; se il legame è di tipo idrofobico si parla di cromatografia di interazione idrofobica (impiegata soprattutto per la separazione di proteine ed acidi nucleici);
- ✓ ripartizione: la fase stazionaria è un liquido adsorbito su supporto solido inerte e la separazione si basa sull'equilibrio di ripartizione degli analiti tra le due fasi mobile e stazionaria;
- ✓ scambio ionico: la fase stazionaria è un solido costituito da macromolecole dotate di gruppi ionizzati e la separazione si basa sull'interazione elettrostatica tra i gruppi carichi sulla superficie della fase fissa e gli analiti che siano dotati di una o più cariche elettriche di segno opposto;
- ✓ esclusione: la fase stazionaria è un solido poroso e la separazione si basa sulla dimensione delle particelle di analita; solo quelle di dimensioni adatte entrano nei pori del gel, mentre quelle più grandi ne vengono escluse;

✓ affinità: la fase stazionaria è un supporto solido su cui sono legati chimicamente molecole che sono ligandi specifici di proteine ed enzimi che in tal modo vengono separati dalle altre componenti di miscele complesse.

### Cromatografia a scambio ionico

In questo tipo di cromatografia l'adsorbimento delle particelle sulla fase stazionaria è determinato da interazioni di tipo elettrostatico (gruppi con cariche di segno opposto). Le proteine differiscono per il contenuto in amminoacidi carichi (che sono gruppi ionizzabili) e quindi hanno differenti cariche nette ai vari pH: questa differenza può essere sfruttata per la cromatografia a scambio ionico. Le separazioni a scambio ionico sono condotte in colonne impaccate con una resina scambiatrice di ioni. Si tratta cioè di una resina in cui una matrice solida di supporto, in forma di sferule porose, porta covalentemente legati dei gruppi funzionali carichi.

Negli **scambiatori anionici** la resina espone gruppi carichi positivamente che attraggono molecole cariche negativamente e ne favoriscono l'adsorbimento sulla fase solida, mentre le molecole neutre o cariche positivamente vengono eluite nel tempo morto della colonna.

Negli **scambiatori cationici** la matrice possiede invece gruppi carichi negativamente e attrae, quindi, molecole cariche positivamente, che migreranno nella matrice più lentamente di quelle che hanno una carica netta negativa. Maggiore è la carica complessiva della molecola ionizzata da scambiare, più questa si legherà in modo forte allo scambiatore e verrà eluita per ultima.

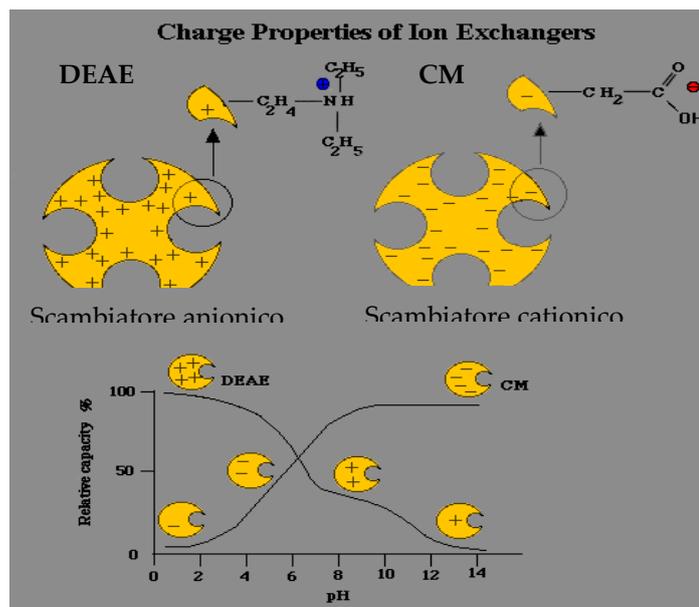


Figura 12 – Esempio di uno scambiatore anionico (DEAE) e cationico (CM) con i relativi intervalli ottimali di pH di funzionamento: a pH acidi per il primo di tipo di resina e basici per il secondo

Il tipo di scambiatore da usare dipende ovviamente dal punto isoelettrico (pI) della proteina d'interesse, nonché dalla sua stabilità in funzione del pH.

Se una proteina è stabile al di sopra del suo pI, conviene lavorare sopra il pI ed usare uno scambiatore anionico; viceversa, se la proteina è stabile al di sotto del suo pI, conviene lavorare a basso pH ed usare uno scambio cationico. Un suggerimento empirico dato da molti autori è di lavorare ad un pH distante circa 1 unità dal pI della proteina d'interesse: questo consente di avere una carica netta sufficiente per favorire l'adsorbimento, senza richiedere però condizioni troppo drastiche per l'eluizione.

Come già detto, nella cromatografia a scambio ionico l'interazione tra proteina e fase stazionaria dipende dalla carica della proteina che, come detto, dipende a sua volta dal pH e dalla forza ionica della fase mobile. Più alta la forza ionica, maggiore la competizione degli ioni in soluzione con la proteina. Per questo motivo solitamente le proteine vengono eluite in **gradiente di pH oppure di forza ionica (NaCl)**: a seconda della loro carica netta complessiva più o meno elevata, proteine diverse sono eluite in punti diversi del gradiente. Gli ioni competono con le proteine per il legame con la resina: le proteine con la carica più debole sono quelle eluite alla forza ionica più bassa, mentre quelle più cariche alla concentrazione salina più alta.

Un gradiente di forza ionica è preferibile nella maggior parte dei casi, perché più compatibile con la stabilità proteica.

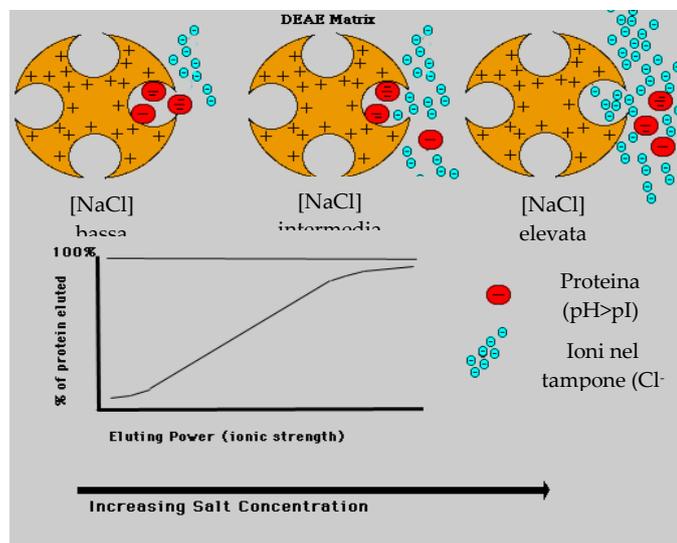


Figura 13 – Esempio di eluizione mediante gradiente di forza ionica per uno scambiatore anionico: all'aumentare della concentrazione di NaCl, aumenta la competizione per il legame ai gruppi basici della resina tra gli ioni Cl<sup>-</sup> e le proteine cariche negativamente

Molti scambiatori ionici sono costituiti da matrici di cellulosa modificata chimicamente: ad esempio la carbossimetilcellulosa (CM-cellulosa) e la DEAE-cellulosa; analoghi ai derivati della cellulosa sono i derivati del destrano e dell'agarosio (Sephadex e Sepharose). Questi

scambiatori sono affini ai materiali impiegati nella gel-filtrazione e presentano quindi limiti d'esclusione.

L'efficienza della cromatografia a scambio ionico non è strettamente legata al volume di campione applicato alla colonna, come invece nel caso della cromatografia ad esclusione, per cui è possibile caricare sulla colonna volumi anche elevati di materiale.

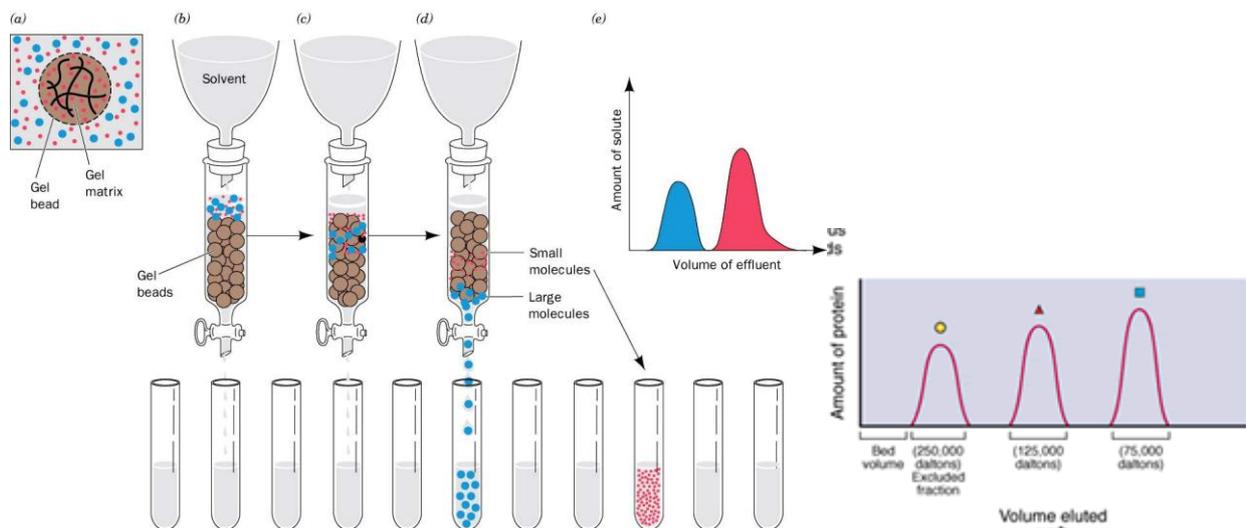
### **Cromatografia ad esclusione molecolare (o gel-filtrazione)**

Per la separazione di molecole in base alla loro forma e al loro peso molecolare vengono utilizzate le proprietà di setaccio molecolare che sono proprie di numerosi materiali porosi. Infatti le resine per la gel-filtrazione sono costituite da sfere con una quantità diversa di legami crociati e quindi con diverse dimensioni dei pori, che conferiscono loro proprietà di gel. Da qui il termine di gel-filtrazione per descrivere la cromatografia che utilizza questi materiali.



**Figura 14 - Microstruttura della matrice per gel-filtrazione: con le frecce colorate in verde, rosso e arancio è mostrato il percorso delle molecole più piccole dei pori della matrice, mentre in viola e azzurro quello delle macromolecole più grandi**

La cromatografia ad esclusione molecolare si basa sul principio che le molecole più grandi, completamente escluse dai pori, rimangono nel volume vuoto (o volume escluso) e, passando attraverso gli spazi interstiziali, vanno dirette verso il fondo della colonna, mentre le molecole più piccole si distribuiscono nel solvente presente sia all'interno sia all'esterno del setaccio molecolare, entrano nei pori e attraversano quindi la colonna a velocità più bassa, allungando il percorso che devono compiere per essere eluite.



**Figura 15 – Esempio dell’eluizione di soluti a diverso peso molecolare da una colonna per gel-filtrazione. Le molecole più grandi sono eluite per prime**

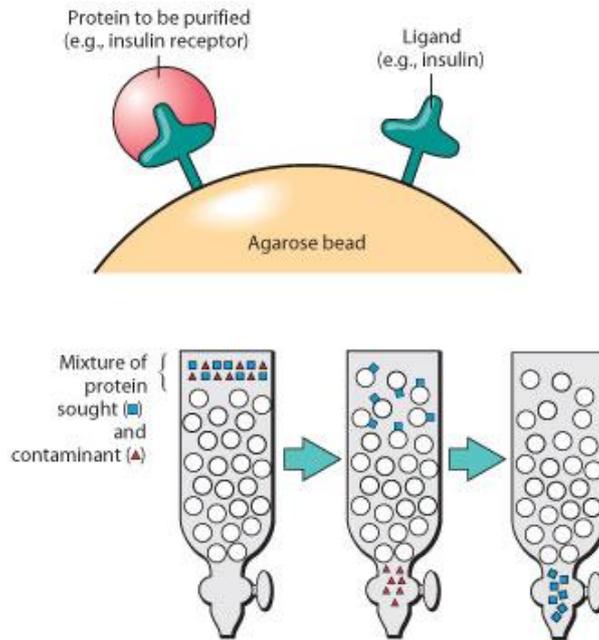
Le matrici usate per questo tipo di cromatografia comprendono destrani a legami crociati (Sephadex), agarosio (Sephacrose, Bio-Gel A, Savagac), poliacrilammide (Bio-Gel P), poliacriloilmorfini e polistireni (Bio-Beads S).

Nella cromatografia di gel-filtrazione, la risoluzione dipende dalle dimensioni delle particelle di gel, dalle dimensioni dei pori, dalla lunghezza e dal diametro della colonna e dal volume del campione, che in questo sistema è particolarmente critico. Generalmente si consiglia di caricare volumi di campione <5% del volume totale della resina impaccata.

L’eluizione in isocratica, ovvero utilizzando un singolo tipo di solvente come fase mobile, è generalmente utilizzata per questo tipo di cromatografia.

### **Cromatografia per affinità**

Questo tipo di cromatografia separa le proteine in base alla loro specificità di legame, in quanto sfrutta la loro capacità di interagire in modo specifico, ma reversibile, con un ligando attaccato covalentemente ad un supporto inerte. Generalmente, il termine ligando è usato per indicare un gruppo chimico o una molecola che si lega ad una macromolecola. Quando viene caricato su colonna il campione proteico, solo le proteine in grado di legarsi al ligando sono trattenute sulla colonna; invece le proteine non legate vengono velocemente eluite. Per recuperare la proteina d’interesse, si rompe la sua interazione con il ligando immobilizzato con l’utilizzo di una soluzione contenente ligando libero. È molto usata per la separazione di anticorpi o di fattori di trascrizione.



**Figura 16 – Una soluzione proteica è caricata su una colonna costituita da una matrice solida con affinità per la proteina d’interesse che deve essere purificata. Le proteine non aventi affinità per la matrice sono eluite rapidamente, mentre il cammino della proteina d’interesse è rallentato dalla sua interazione con la resina su cui è posto uno specifico ligando. Tali proteine sono poi eluite in un secondo momento in seguito all’aggiunta di una soluzione ad alta concentrazione di ligando, che entra in competizione con quello legato sulla resina**

### **Per concludere...**

Per avviare la purificazione di una proteina mai isolata in precedenza occorre seguire sia studi presenti in lavori di letteratura pubblicati su riviste scientifiche del settore di interesse e anche il buon senso.

Infatti nella maggior parte dei casi occorre utilizzare uno dopo l’altro i vari metodi visti finora per purificare completamente la proteina che interessa. Inoltre, seguendo il buon senso, le procedure poco costose, come la precipitazione con ammonio solfato, devono essere eseguite per prime, quando il volume del campione è grande e il numero di contaminanti elevato.

I metodi cromatografici sono spesso impraticabili nelle prime fasi della purificazione, in quanto la quantità di mezzo cromatografico necessario è proporzionale alla dimensione del campione da trattare. Invece dopo ogni tappa di purificazione il volume del campione da saggiare diventa via via più piccolo ed è allora possibile applicare metodi cromatografici sempre più sofisticati e costosi.

## Elettroforesi

L'elettroforesi è una tecnica di separazione fra le più usate in biochimica, che sfrutta la diversa velocità di migrazione di particelle cariche sotto l'influenza di un campo elettrico. La velocità con cui le particelle si muovono in un fluido per effetto di un campo elettrico corrisponde a:

$$v = E z / f$$

$v$  = velocità della particella

$E$  = forza del campo elettrico

$z$  = carica netta della proteina

$f$  = coefficiente frizionale

La velocità di migrazione dipende a sua volta da diversi fattori:

- ✓ campo elettrico applicato;
- ✓ tampone utilizzato per la corsa;
- ✓ caratteristiche della particella quali massa, carica, dimensioni e forma;
- ✓ tipo di supporto utilizzato per eseguire le separazione.

Le particelle si spostano verso il catodo se hanno carica positiva e verso l'anodo se hanno carica negativa. E' possibile sottoporre a separazione elettroforetica molecole che possiedono gruppi o residui ionizzabili, e dunque aminoacidi e proteine, nucleotidi e acidi nucleici.

La tecnica è spesso usata a scopi analitici per determinare:

- ✓ numero di proteine presenti in una miscela;
- ✓ grado di purezza;
- ✓ punto isoelettrico;
- ✓ peso molecolare.

Si distinguono, in generale, metodi frontali, in cui la separazione avviene in soluzione libera, e metodi zonali che si avvalgono dell'utilizzo di un mezzo poroso come carta, gel o acetato di cellulosa.

La differenza di potenziale tra gli elettrodi ( $E$ ) genera un gradiente di potenziale elettrico definito da:

$$E = V/d$$

dove  $V$  = voltaggio applicato e  $d$  = distanza fra gli elettrodi.

L'intensità della corrente ( $I$ ) condotta è invece determinata da:

$$I = V/R$$

dove  $V$  = voltaggio applicato e  $R$  = resistenza.

La corrente viene condotta principalmente dagli ioni del tampone che ha la funzione di mantenere le molecole del campione in uno stato ionizzato, senza legarsi ai composti da

separare. La sua concentrazione oscilla tipicamente tra da 0.05 e 0.10 M, mentre il suo pH determina, influenza e stabilizza la migrazione.

Le molecole si separano sulla base del loro rapporto carica/massa.

La strumentazione necessaria a condurre una corsa elettroforetica comprende un alimentatore e un apparato (camera elettroforetica) di tipo diverso a seconda del supporto utilizzato. Esempi di apparati comunemente usati per corse elettroforetiche sono quello per elettroforesi verticale su gel di acrilamide, o quello per elettroforesi orizzontale su carta.

Per quanto riguarda i supporti, molto usati sono i gel di poliacrilammide, agarosio, oppure carta da filtro o acetato di cellulosa.

La separazione elettroforetica su gel prevede che la miscela di molecole da separare sia caricata su di un supporto gelatinoso preparato a base di agarosio o poliacrilammide. L'agarosio è normalmente utilizzato per la separazione di frammenti di acidi nucleici aventi dimensioni tipicamente comprese tra 500 bp a 20 kb circa; con alcune variazioni è possibile arrivare a separare anche frammenti parecchio più grandi. Gel di poliacrilammide sono invece più comunemente usati per la separazione di proteine e per frammenti di DNA più piccoli, da pochi nucleotidi a 2-3 kb circa.

Per molecole come il DNA, in cui il rapporto carica/massa è praticamente costante, questi supporti permettono la separazione comportandosi come un reticolo, che rallenta il movimento delle molecole, in maniera dipendente dalle loro dimensioni. In queste condizioni la velocità è approssimativamente proporzionale all'inverso del logaritmo della loro lunghezza.

La migrazione è inoltre influenzata dalle condizioni in cui avviene la corsa elettroforetica: è infatti possibile separare molecole in condizioni native, o anche in condizioni denaturanti o riducenti.

Il gel di poliacrilammide si ottiene dalla polimerizzazione di molecole di acrilammide mediante formazione di legami crociati in presenza di metilen-bis-acrilammide. Il processo di polimerizzazione è innescato dall'aggiunta di tetrametilendiammina (TEMED) e ammonio persolfato. I campioni caricati su gel, dopo la separazione elettroforetica, possono essere resi visibili mediante utilizzo di metodi in grado di colorare le molecole separate. Silver stain e la colorazione con Coomassie brilliant blue o con reagenti di colorazione della serie SYPRO (Sigma) sono metodi frequentemente utilizzati per la rivelazione di proteine. L'analisi densitometrica delle bande corrispondenti a ciascun componente può essere utilizzata per determinarne i rapporti ed eseguire una stima quantitativa dei campioni.

L'elettroforesi su gel è tipicamente una tecnica analitica, tuttavia essa può essere usata a scopi preparativi, perchè le molecole contenute nelle banda possono essere recuperate dal gel per diffusione o mediante elettroeluizione e sottoposte ad analisi successive.

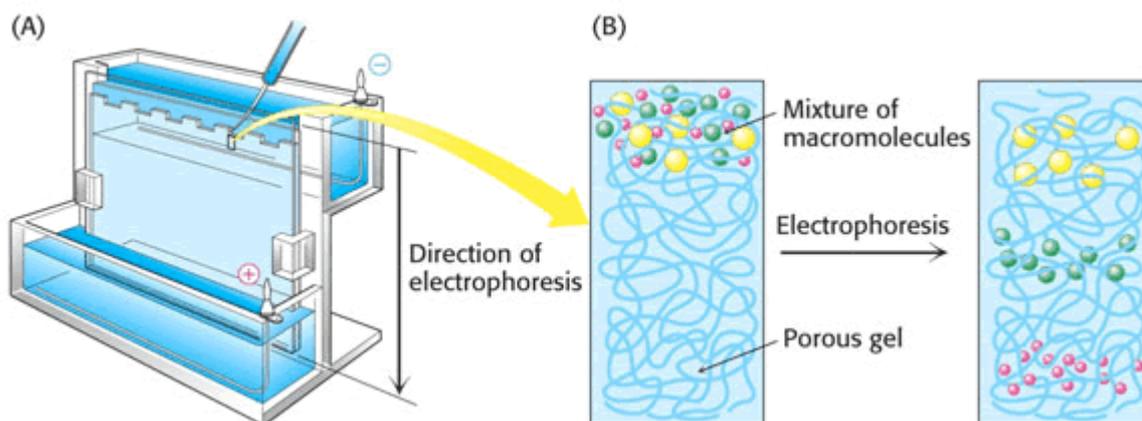
La separazione dei componenti di una miscela eterogenea di proteine mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide può essere ottimizzata modificando opportunamente la porosità del gel, attraverso l'uso di acrilamide e bis-acrilamide in rapporti diversi per la preparazione del gel.

La velocità di migrazione di una proteina su gel dipende da diversi fattori:

- ✓ corrente applicata;
- ✓ dimensione;
- ✓ carica netta.

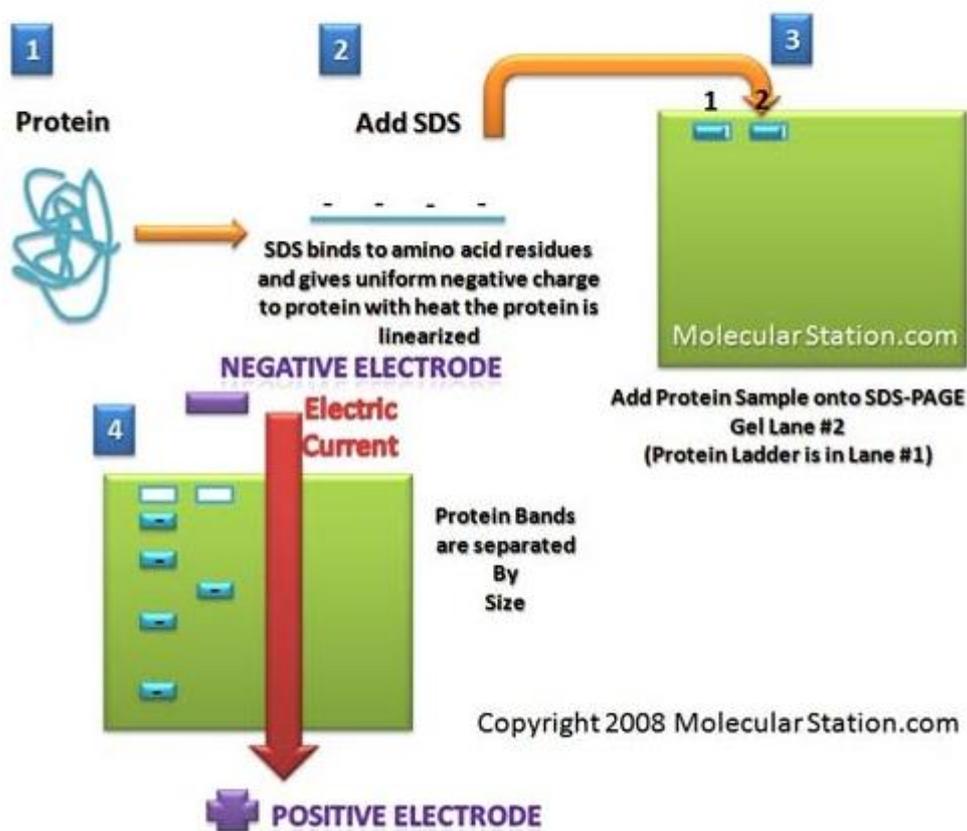
La carica netta di una proteina dipende dal pH del tampone: a pH neutro la maggior parte delle proteine è sotto forma di anioni (-) e migra quindi verso il polo positivo.

Una corsa elettroforetica in condizioni native permette di separare enzimi o proteine preservando la loro attività biologica. In queste condizioni le proteine conservano la loro conformazione e la separazione avviene sulla base del rapporto carica/massa. La conservazione della conformazione è importante per il mantenimento dell'attività biologica: proteine estratte da gel sono attive e possono essere utilizzate in ulteriori esperimenti.



L'elettroforesi in presenza di sodio dodecilsolfato (SDS) è largamente usata per la determinazione del peso molecolare delle proteine. In presenza di SDS, le strutture secondarie sono denaturate e le proteine vengono dotate di un gran numero di cariche negative, che rendono la carica complessiva essenzialmente proporzionale alla lunghezza della catena polipeptidica. Dal momento che tutte le proteine sono cariche allo stesso modo, e che sono essenzialmente in forma lineare, la separazione avviene solo sulla base delle dimensioni. In queste condizioni, la mobilità elettroforetica è circa proporzionale all'inverso del logaritmo decimale della massa molecolare.

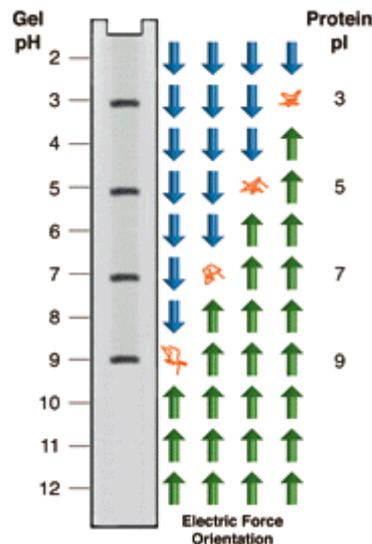
## PROTEIN GEL ELECTROPHORESIS METHOD



Con specifiche tecniche, è inoltre possibile separare le proteine sulla base del punto isoelettrico (isoelettrofocalizzazione IEF), o su di un gradiente (elettroforesi su gradiente).

La tecnica di isoelettrofocalizzazione consente la separazione di sostanze anfotere sulla base del pH. Il gel viene prodotto con miscele di anfolti, acidi alifatici sintetici poliammino-policarbossilici, che formano un gradiente di pH nella matrice prima della sua polimerizzazione. Gli anfolti disponibili commercialmente sono utilizzati per diversi range di pH, sia a banda larga (ad es. da pH 3 a pH 10), che a banda stretta (ad es. da pH 7 a pH 8).

I composti da separare migrano verso la zona di pH corrispondente al proprio punto isoelettrico (focalizzazione) ovvero il valore di pH a cui la proteina ha carica netta pari a zero. Una calibrazione con proteine a pH noto è in genere utile. Il gel usato in tal caso presenta dei pori di dimensioni molto elevate, pertanto le proteine si muoveranno in esso solo per effetto della propria carica netta nativa. Quando la proteina incontra la regione in cui il pH è pari al proprio pI essa arresterà la propria corsa in quanto in tale zona la sua carica netta sarà nulla e quindi non potrà più muoversi per effetto del campo elettrico.

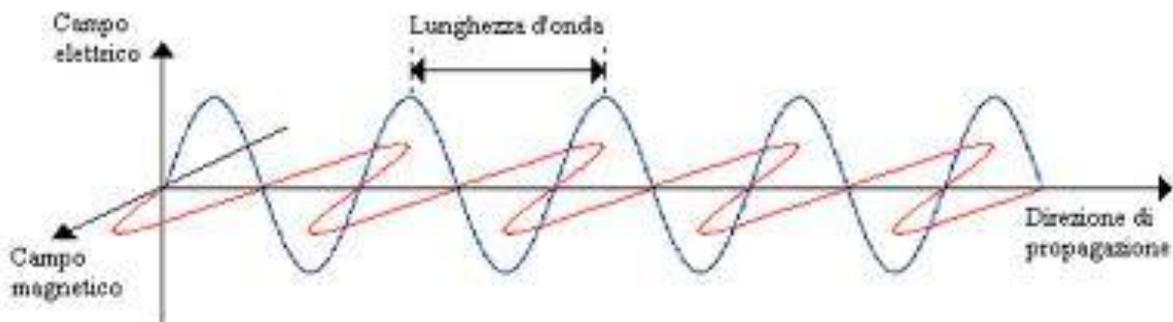


E' infine possibile combinare la separazione prodotta da elettroforesi di tipo diverso eseguendo una elettroforesi bidimensionale. Questo tipo di tecnica consente di separare le proteine in due dimensioni: dapprima in base al pI e quindi in base al peso molecolare.

## Assorbimento della luce da parte delle molecole: la legge di Lambert-Beer

Le tecniche di misura spettroscopiche sfruttano l'interazione delle molecole con le radiazioni elettromagnetiche, o più in particolare con alcune ragioni dello spettro della radiazione elettromagnetica (ad esempio il campo UltraVioletto, quello Visibile, quello Infra-Rosso, quello delle microonde).

La radiazione elettromagnetica ha una natura dualistica ovvero ad essa può essere attribuita sia natura ondulatoria che corpuscolare. Secondo la descrizione ondulatoria la radiazione elettromagnetica è costituita da campi elettrici e campi magnetici che oscillano perpendicolarmente tra di loro e rispetto alla direzione di propagazione dell'onda stessa. Possiamo identificare:



$\lambda$  = **lunghezza d'onda**, ovvero la distanza tra un picco e quello successivo;

$\nu$  = **frequenza**, ovvero il numero di cicli per secondo;

$c$  = **velocità** della luce nel vuoto;

L'**ampiezza** è l'altezza dell'onda rispetto all'asse orizzontale centrale; il quadrato di tale ampiezza determina l'**intensità**, ossia la brillantezza, della radiazione.

Secondo la descrizione corpuscolare la radiazione elettromagnetica è costituita da un treno di particelle dette fotoni che si muovono lungo la direzione di propagazione dell'onda alla velocità della luce nel vuoto.

Ciascun fotone trasporta una quantità di energia costante e definita ovvero quantizzata e che è pari a:

$$E = h \nu = h (c/\lambda)$$

$h$  = **costante di Planck** ( $6.62 \times 10^{-34}$  Jsec)

$c$  = **velocità** della luce nel vuoto ( $3 \times 10^{10}$  cm/sec)

L'energia trasportata da una radiazione elettromagnetica è inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda pertanto le radiazioni più energetiche sono quelle che presentano un minor valore di  $\lambda$ .

Le diverse lunghezze d'onda della radiazione elettromagnetica costituiscono il cosiddetto **spettro della radiazione elettromagnetica**.

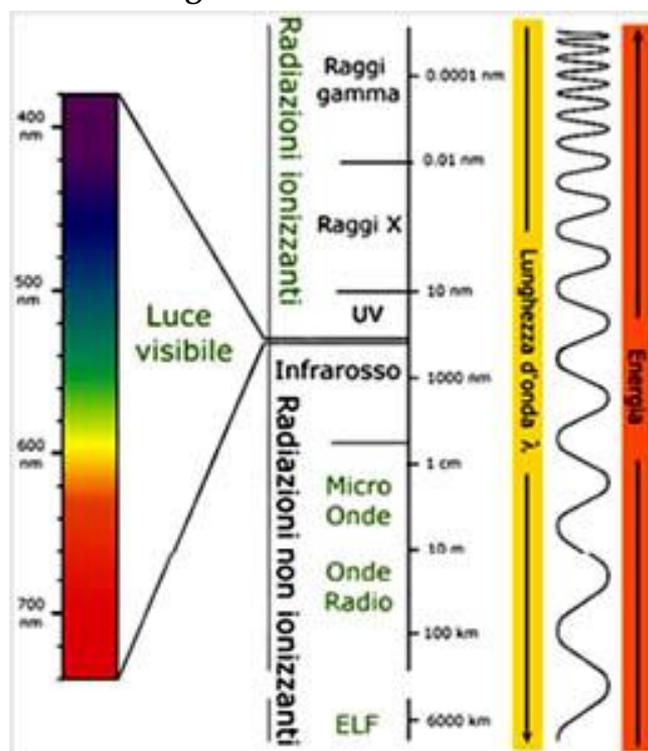


Figura 17 – Spettro elettromagnetico che mostra tutta la gamma di lunghezze d'onda e, in dettaglio, la porzione della luce visibile, compresa tra 400 e 700 nm circa

La spettroscopia sfrutta **l'interazione tra materia e radiazione elettromagnetica**, in particolare essa studia l'assorbimento o l'emissione delle radiazioni elettromagnetiche da parte delle molecole: nel primo caso si parla di spettroscopia di assorbimento, nel secondo di spettroscopia di emissione. Il dato sperimentale che si ottiene (rispettivamente **spettro** di assorbimento o di emissione) mette in relazione l'intensità della radiazione assorbita o emessa con la variazione della frequenza o della lunghezza d'onda. Con l'**assorbimento** si misura la perdita d'intensità della radiazione che attraversa il campione, al variare della  $\lambda$ , mentre con l'**emissione** si registra l'intensità della radiazione emessa dal campione dopo l'irraggiamento al variare della  $\lambda$  della radiazione.

Da tali spettri si possono ottenere informazioni sia di carattere qualitativo (tipo di elemento, composto) che di tipo quantitativo (concentrazione delle specie analizzate).

La spettroscopia **UV-Vis**, detta anche spettroscopia ultravioletta, studia l'interazione tra le molecole e la regione dello spettro elettromagnetico che comprende le radiazioni delle regioni dell'UV e del visibile, ovvero radiazioni con lunghezze d'onda che vanno **dai 200 nm ai 750 nm**.

L'energia associata alle radiazioni appartenenti a queste due regioni è tale da promuovere un elettrone da un orbitale nello stato fondamentale ad un orbitale di uno stato eccitato a più elevata energia: lo spettro UV-Vis è dovuto a **transizioni elettroniche**.

I composti che assorbono la luce nella regione del visibile (e quindi a  $\lambda$  più alte ed E minore) hanno elettroni più facilmente eccitabili di quelli che assorbono nella regione dell'UV che comprende radiazioni più energetiche.

✓ raggi **UVC**:  $\lambda$  tra 280 e 100 nm;

✓ raggi **UVB**:  $\lambda$  tra 320 e 280 nm;

✓ raggi **UVA**:  $\lambda$  tra 400 e 320 nm;

✓ **VIS**:  $\lambda$  da 400 a 750 nm circa.

Quando una radiazione UV o visibile attraversa un campione la sua intensità si riduce in modo proporzionale al numero ed al tipo di molecole incontrate dal raggio lungo il suo cammino. La legge sperimentale che descrive in modo quantitativo tale fenomeno è la **legge di Lambert-Beer**.

Se una molecola è solo parzialmente trasparente, essa trasmetterà solo una parte della radiazione incidente. Il rapporto tra l'intensità della luce trasmessa e quella incidente è chiamato trasmissione  $T$ :

$$T = I/I_0$$

dove  $I_0$  è l'intensità della radiazione incidente e  $I$  è l'intensità della radiazione trasmessa, con l'intensità pari al numero di fotoni che interagiscono nell'unità di tempo, in genere secondi.

Un valore di  $T$  pari al 100% corrisponde ad una sostanza completamente trasparente che non assorbe alcuna radiazione, mentre un valore pari a zero rappresenta una sostanza opaca che assorbe totalmente la luce. Per valori intermedi è possibile definire l'assorbanza  $A$  come

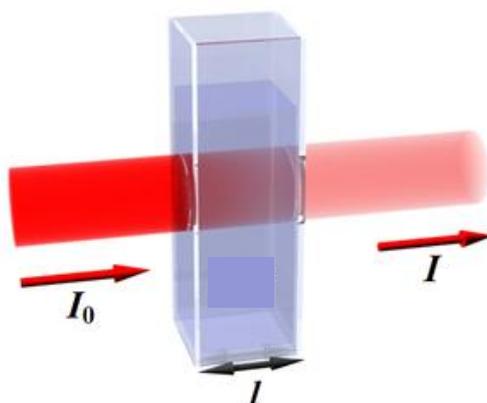
$$A = \log(I/I_0)$$

L'assorbanza è di solito chiamata anche densità ottica (OD, Optical density) e, poiché è un logaritmo, è adimensionale e per definizione va da zero all'infinito.

Secondo la legge di Lambert-Beer l'assorbanza è proporzionale sia alla concentrazione della sostanza capace di assorbire la luce ad una determinata lunghezza d'onda che allo spessore dello strato attraversato (o cammino ottico):

$$A = \epsilon_{\lambda} c l$$

dove  $\epsilon_{\lambda}$  è il coefficiente di assorbanza molare (o coefficiente di estinzione molare) della sostanza che assorbe la luce alla lunghezza d'onda  $\lambda$  ( $L \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) ed equivale al valore di assorbanza di una soluzione 1 M della sostanza in esame;  $c$  è la concentrazione molare della soluzione che assorbe la luce ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) e  $l$  è il cammino ottico della radiazione nella soluzione (ovvero lo spessore, espresso in cm). Con un cammino ottico di una data lunghezza, l'assorbanza  $A$  è direttamente proporzionale alla concentrazione del soluto che sta assorbendo la luce.



**Figura 18 – Uno spettrofotometro comprende una sorgente luminosa che emette una luce in una vasta gamma di lunghezze d'onda, ma la presenza di un monocromatore permette di scegliere e trasmettere la luce ad una particolare lunghezza d'onda. La luce monocromatica ( $I_0$ ) passa attraverso il campione posto in una cuvetta con un cammino ottico ben definito ( $l$ ). La luce viene assorbita dal campione in funzione della concentrazione ( $c$ ) di una specifica molecola, che ha anche un suo particolare coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon$ ). La luce trasmessa ( $I$ , che esce dalla cuvetta) viene misurata da un registratore**

La legge di Lambert-Beer suppone che la luce incidente sia parallela e monocromatica (ovvero di una sola lunghezza d'onda) e che le molecole di soluto e di solvente siano orientate in modo casuale.

Il coefficiente di estinzione molare dipende da: la natura chimica del composto, il solvente in cui essa è disciolta, inoltre assume valori diversi a diverse lunghezze d'onda ed anche con il pH se la specie che assorbe la luce è in equilibrio con uno stato di ionizzazione che ha proprietà di assorbimento diverse. In genere per ogni sostanza ci si riferisce al valore di  $\epsilon$  corrispondente alla lunghezza d'onda alla quale si registra un massimo nel valore dell'assorbanza.

## Considerazioni generali sulla purificazione delle proteine

Sono tre i fattori importanti per lo sviluppo di un protocollo di purificazione:

- ✓ purezza desiderata: infatti il tipo di studi che si intende eseguire determina il grado di purezza da raggiungere per la molecola d'interesse;
- ✓ quantità di proteina desiderata: è sempre importante partire da un materiale relativamente ricco della proteina che si intende purificare. Per grandi quantità di campione di partenza si deve ricorrere a tecniche che consentono di processare volumi elevati (ad esempio il salting out o la cromatografia a scambio ionico), ma non a tecniche come la cromatografia di affinità, che si applica su volumi più ridotti di campione.

Un buon protocollo di purificazione deve essere riproducibile e tendere ad ottenere la purezza desiderata della proteina d'interesse con il minor numero possibile di passaggi purificativi.

L'ordine nel quale le diverse tecniche devono essere applicate è essenziale: la sequenza delle tappe dovrebbe essere tale che il materiale ottenuto alla fine di un dato passaggio costituisca un buon materiale di partenza per la tappa successiva. In genere, si tende a far precedere a passaggi ad alta capacità/bassa risoluzione i passaggi con tecniche ad alta risoluzione/bassa capacità. Per esempio, ogni passaggio cromatografico porta alla formazione di un numero relativamente elevato di provette (frazioni) da analizzare, contenenti tampone e proteine eluite dalla colonna. E' necessario sia determinare la quantità di proteine presenti in ciascuna frazione per poter disegnare il profilo di eluizione del campione (ovvero l'andamento della concentrazione delle proteine in funzione del numero di provette) e sia determinare quali provette contengono la proteina d'interesse. A questo punto il loro contenuto può essere riunito, eventualmente concentrato e/ dializzato per poi essere utilizzato per il successivo passaggio di purificazione.

Se la proteina d'interesse è un enzima, avendo a disposizione un saggio specifico è semplice individuare dove è presente l'attività enzimatica che si cerca. Per le proteine che invece non hanno attività biologica facilmente misurabile, occorre ricorrere ad altri approcci (come la determinazione mediante reazione con uno specifico anticorpo) per poterle individuare.

Nella pratica, per purificare una determinata proteina sono necessari in media quattro passaggi di frazionamento. Come già detto, il grado finale di purezza della proteina dipende anche dagli scopi per i quali la proteina in questione deve essere destinata. Non è semplice definire una proteina pura: in teoria una proteina può essere definita tale quando un campione contiene un'unica specie proteica. Nella pratica è pressoché impossibile raggiungere una purezza del 100%, ma si possono condurre studi su una proteina anche se contaminata nella misura del 5-10% da altre proteine.

In tutti i protocolli, le varie fasi della purificazione sono accompagnate da saggi specifici per verificare la **quantità** delle proteine totali a disposizione e, in particolare, di quella d'interesse e la sua **purezza**.

### **Metodi per la determinazione della concentrazione proteica**

La determinazione della concentrazione proteica ed il dosaggio dell'attività enzimatica si basano su metodi spettrofotometrici, che sono metodi che sfruttano la capacità delle molecole (sia proteine che substrati di enzimi) di assorbire radiazioni elettromagnetiche nella regione dell'UV-Vis (vicino UV: 200 – 350 nm; VIS: 350 – 700 nm).

La maggior parte di questi metodi sono colorimetrici e necessitano che una parte della soluzione proteica reagisca con un reagente dando luogo ad un prodotto colorato. La quantità di questo prodotto viene determinata spettrofotometricamente e con un'appropriata calibrazione si correla l'intensità della colorazione alla quantità di proteine. Nessuno di questi metodi è assoluto, perché spesso lo sviluppo della colorazione dipende dalla composizione amminoacidica delle proteine presenti nel campione.

In molti casi si prepara una retta di calibrazione standard utilizzando l'albumina di siero bovino (BSA, Bovine Serum Albumin), perché economica, altamente pura e facilmente disponibile. Tuttavia occorre tenere presente che poiché la composizione in amminoacidi della BSA è differente da quella del campione esaminato, il valore che si ricava dalla curva di calibrazione è approssimativo.

Comunque, in generale, per determinare la concentrazione proteica di un campione è necessario:

- ✓ avere una soluzione proteica a concentrazione nota da usare come standard;
- ✓ costruire una retta di taratura;
- ✓ determinare la concentrazione proteica incognita dei campioni effettuando lo stesso saggio effettuato per lo standard.

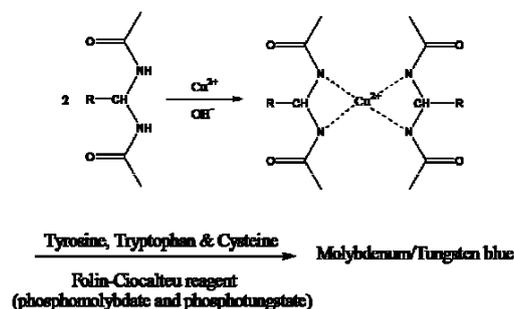
In genere si esaminano miscele contenenti proteine e altre sostanze (carboidrati, lipidi, acidi nucleici, detergenti, etc) che possono interferire con le reazioni cromogene usate per determinare la concentrazione delle proteine.

La determinazione proteica di un campione può essere eseguita mediante:

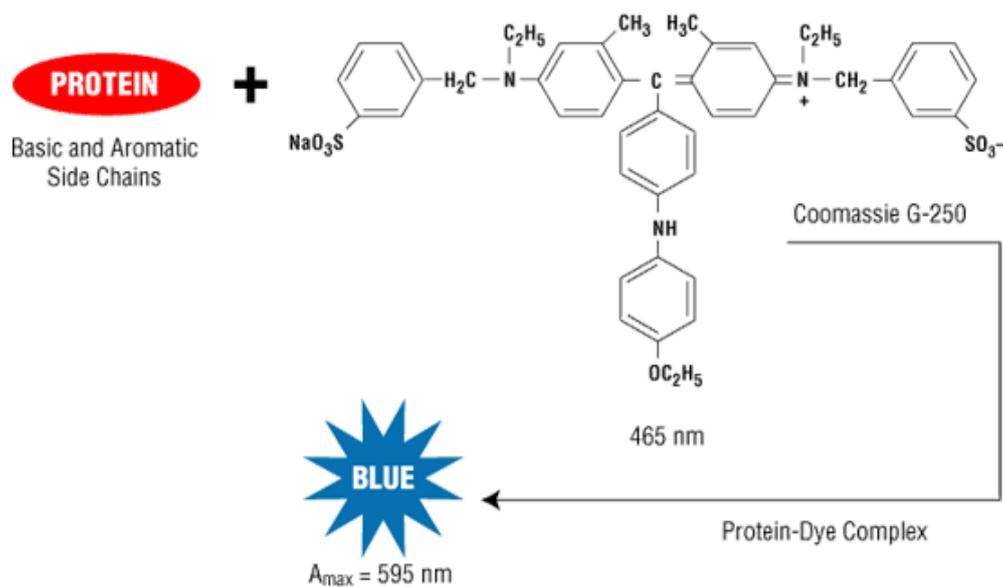
✓ **assorbimento della luce ultravioletta:** in questo caso si va a individuare la presenza degli amminoacidi aromatici triptofano, tirosina e fenilalanina, che hanno un massimo di assorbimento a 280 nm. Il metodo è abbastanza sensibile, perché capace di misurare basse concentrazioni; inoltre, al contrario dei metodi colorimetrici, questa è una metodica non distruttiva, in quanto il campione può essere recuperato. È particolarmente utile quando si lavora con piccole quantità di proteine, ma occorre tenere in considerazione l'interferenza degli acidi nucleici, che assorbono a 260 nm, per cui la loro anche minima presenza può influenzare enormemente l'assorbanza a 280 nm. Misurando le assorbanze a 260 e 280 nm è possibile applicare la seguente formula per ricavare la concentrazione proteica di un campione:

$$\text{Proteine (mg/mL)} = 1.55 A_{280} - 0.76 A_{260}$$

✓ **metodo di Lowry (Folin-Ciocalteu):** quando alla soluzione proteica sono aggiunti il reagente di Folin-Ciocalteu (una miscela di tungstato, molibdato e fosfato di sodio) e una soluzione di solfato di rame si sviluppa un colore blu-porpora, che può essere quantificato mediante misura dell'assorbanza a 660 nm; il colore blu intenso dipende in parte dal contenuto di tirosina, triptofano e cisteina del campione proteico;



**metodo di Bradford:** questo metodo si basa sul legame del colorante Coomassie Brilliant Blue alle proteine grazie alle interazioni elettrostatiche con i gruppi aminici e carbossilici e tramite forze di van der Waals. A bassi valori di pH, il colorante libero ha un massimo di assorbimento a 470 nm, ma quando è legato alle proteine ha un massimo di assorbimento a 595 nm. I vantaggi di questo metodo sono la semplicità della preparazione, lo sviluppo immediato del colore e la stabilità. È comunque un metodo relativo in quanto la quantità di colorante legato sembra variare in base al contenuto in arginina, triptofano, tirosina, istidina e fenilalanina del campione.



## Come si costruisce la tabella di purificazione di una proteina?

Per poter purificare una proteina (in particolare, un enzima) è fondamentale avere a disposizione un metodo per seguire la sua attività biologica: a tale scopo si utilizzano dei **saggi** basati su caratteristiche uniche della proteina d'interesse. Idealmente un saggio dovrebbe essere:

- ✓ specifico, per non avere un falso positivo;
- ✓ rapido, da realizzare in un arco di tempo molto rispetto (minuti, al massimo 1-2 ore);
- ✓ sensibile, per non consumare tutto il campione a disposizione;
- ✓ quantitativo, per permettere di quantificare la proteina d'interesse recuperata dopo ogni passaggio della purificazione.

Molti substrati e prodotti assorbono la luce nelle regioni del visibile o dell'ultravioletto e, purchè non assorbano alla stessa lunghezza d'onda e sia valida la legge di Lambert-Beer, la variazione dell'assorbanza può essere utilizzata come base per i dosaggi spettrofotometrici.



Figura 19 – Tipico spettrofotometro utilizzato per i saggi di determinazione proteica e enzimatica

La purificazione di una proteina può essere pensata come una serie di frazionamenti realizzati in modo tale che la proteina d'interesse si trovi quasi esclusivamente in un'unica frazione, mentre i restanti contaminanti si trovano in frazioni diverse. Il frazionamento è efficace se, ad ogni passaggio di purificazione, aumenta la percentuale di proteina desiderata rispetto al contenuto totale di proteine del campione.

Ad ogni passaggio di purificazione devono monitorati alcuni parametri, quali:

- ✓ il volume totale del campione;
- ✓ il quantitativo di proteine totali presenti nel campione;
- ✓ le unità di attività della proteina d'interesse mediante l'utilizzo di un saggio specifico.

L'attività enzimatica è la determinazione della concentrazione di un enzima in termini della sua attività catalitica. L'unità di misura dell'attività enzimatica è l'unità internazionale (U).

1U: quantità di enzima che trasforma 1  $\mu\text{mol}$  di substrato in 1 min. La misurazione si basa sulla valutazione della variazione di concentrazione del substrato (consumo) o del prodotto (formazione) della reazione enzimatica;

U/ml = attività relativa;

U/mg di proteine totali = attività specifica.

Queste informazioni di base permettono di ricavare per ogni passaggio di purificazione:

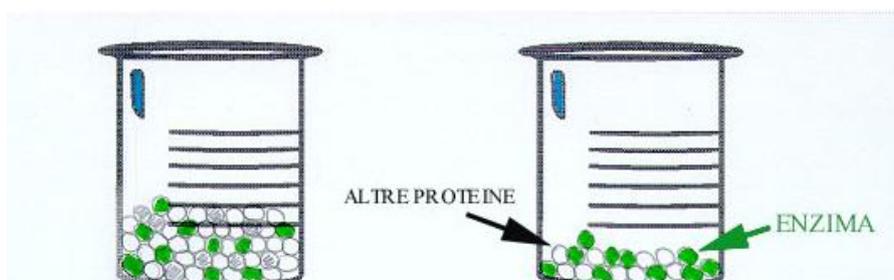
- ✓ l'attività specifica, definita come il numero di unità totali di enzima nel campione/quantità totale di proteine presenti nel campione (U/mg) ed è una misura della purezza dell'enzima. Infatti dopo ogni tappa di purificazione viene misurata l'attività (in unità) della preparazione e la sua concentrazione proteica: un passaggio di purificazione coronato dal successo si riconosce dall'aumento dell'attività specifica, che diventa massima e costante quando l'enzima è puro;
- ✓ il grado di purificazione, definito come il rapporto tra l'attività specifica del campione dopo un determinato passaggio di purificazione e l'attività specifica iniziale;
- ✓ la resa, definita come il rapporto tra le unità enzimatiche totali del campione dopo un determinato passaggio di purificazione e le unità enzimatiche del campione iniziale; il

valore ottenuto è moltiplicato per 100, in quanto la resa è espressa in percentuale. Questo è un fattore molto importante in quanto non ha utilità ottenere un aumento di attività specifica se si perde la gran parte della proteina che si sta cercando di purificare. Una resa pari o superiore al 70% è accettabile per qualsiasi passaggio di purificazione.

Passaggio di purificazione	Volume totale del campione (mL)	Proteine totali del campione (mg)	Unità enzimatiche nel volume totale del campione (U)	Unità enzimatiche totali/volume totale del campione (U/mL)	Attività specifica (U/mg) = unità enzimatiche totali/proteine totali del campione	Fattore di purificazione	Resa (%)
Estratto grezzo	12	564	62286	5190.5	110.4	1	100
Q-Sepharose F.F.	2	129	43333.4	21666.7	335.9	3	69.6
Sephacryl S-100	3.6	3.24	41424.1	11506.7	12785.2	115.8	66.5
HPLC	0.6	0.31	16068.4	26780.7	51833.5	469.5	25.8

**Tabella 2 – Esempio di una tipica tabella di purificazione per un'attività enzimatica**

In ogni tappa di purificazione l'attività enzimatica e la concentrazione proteica totale tendono a diminuire: la prima decresce per effetto di perdite dovute a una non perfetta interazione con i materiali cromatografici o per inattivazione dell'enzima; invece la seconda diminuisce in quando l'obiettivo del procedimento di purificazione è eliminare il più possibile le proteine che non interessano. In una buona tappa di purificazione la perdita delle proteine deve superare quella dell'attività, per cui l'attività specifica complessivamente aumenta.



**Figura 20 – La differenza tra l'attività e l'attività specifica può essere illustrata usando come esempio due contenitori con palline colorate. Il numero di palline verdi è uguale in entrambi i casi, ma cambia la quantità delle altre palline. Se supponiamo che le palline rappresentino le proteine, i due contenitori contengono la stessa attività della proteina (ovvero le palline verdi); il secondo, però, ha un'attività specifica maggiore, in quanto le palline verdi rappresentano una frazione più grande del totale**

Non esiste un saggio che permetta di affermare in maniera univoca se la proteina purificata è pura, in quanto una preparazione che risulti pura con una certa metodica può rivelarsi contaminata usando una tecnica di rivelazione molto più sensibile.

Il miglior criterio per determinare il grado di purezza di una proteina è quello di impiegare diverse tecniche per effettuare test basati su differenti caratteristiche della molecola in esame. Per esempio:

- ✓ una preparazione omogenea deve mostrare un'attività specifica costante quando è sottoposta ai successivi passaggi di purificazione;
- ✓ l'elettroforesi in condizioni native deve mostrare una sola banda sia se condotta a pH acido che a pH alcalino;
- ✓ l'elettroforesi in condizioni denaturanti deve fornire risultati coerenti.