

**CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA PER LA  
SOSTENIBILITÀ**



**BIOCHIMICA APPLICATA  
(6 CFU)**

**LEZIONE 1**

**Prof. Paola Di Donato**

**Dipartimento di Scienze e Tecnologie**

**Stanza 520, V piano lato NORD**

**Tel. 081 547 6625**

**E-mail: [paola.didonato@uniparthenope.it](mailto:paola.didonato@uniparthenope.it)**

- **Principali tecniche di studio di proteine ed enzimi: purificazione e caratterizzazione**
- Purificazione delle proteine
- Tappe della purificazione delle proteine
- Purificazione delle proteine: cromatografie
- Criteri di purezza
- Dosaggio delle proteine
- Saggi enzimatici
- Determinazione massa molecolare; numero e peso molecolare delle subunità
- Analisi conformazionali
- Spettrometria di massa (MS)

## CONTENUTI: PARTE 2

- Esempi di costruzione e caratterizzazione di proteine ingegnerizzate con nuove proprietà
  - Rational Design
  - Directed evolution
  - Costruzione di nuovi sistemi

## CONTENUTI: PARTE 3

- Esempi di utilizzo degli enzimi per la salvaguardia dell'ambiente

# Lezioni di ricapitolazione

- ✓ Prime fasi purificazione proteica  
(Materiale da esperimento)
- ✓ Centrifugazione: generalità
- ✓ Cromatografia: generalità
- ✓ Elettroforesi: generalità
- ✓ Spettrofotometria: generalità

# Purificazione delle proteine

- ✓ Significato di proteina pura-omogenea
- ✓ Interesse verso la purificazione di una proteina
- ✓ Tappe della purificazione
- ✓ Tabella di purificazione

# Interesse verso la purificazione di una proteina

- ✓ Analisi strutturali (sequenza, spettrometria di massa, cristallografia a raggi X, spettroscopia NMR, Cryo-EM);
- ✓ Studio della funzione;
- ✓ Studio della regolazione;
- ✓ Studio delle interazioni tra macromolecole;
- ✓ Applicazioni biotecnologiche.

# Tappe della purificazione delle proteine\*

1. Omogeneizzazione\*;
2. centrifugazione: differenziale, in gradiente di densità;
3. separazione mediante variazioni solubilità\*;
4. separazione con membrane\*;
5. cromatografia

\* lezione di ricapitolazione: prime fasi purificazione proteica

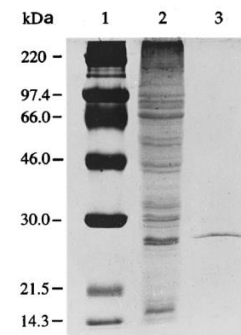
# Tabella di Purificazione

- Volume della soluzione
- Concentrazione proteica (mg/ml)
- Proteine totali (mg totali)
- **Attività proteina** (Attività enzimatica (U/ml) (kat/ml))
- **Attività totale** [(U/tot) (kat/totali)]
- **Attività specifica** [(U/mg) (kat/mg)]
- Resa (%)
- **Fattore di purificazione**

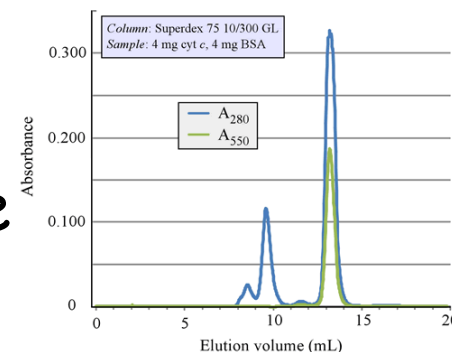


# Criteri di purezza

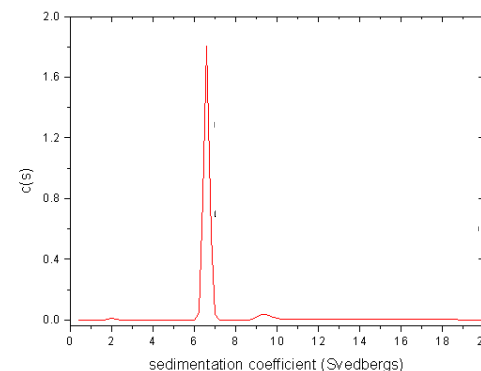
✓\*Elettroforesi nativa e in SDS (SDS-PAGE)



✓Cromatografia per esclusione molecolare



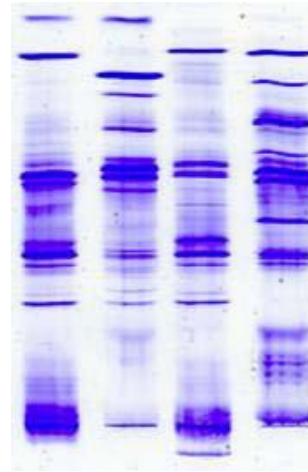
✓Ultracentrifugazione analitica



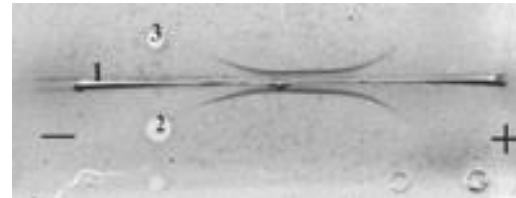
\* lezione di ricapitolazione: elettroforesi

# Criteri di purezza

✓ Focalizzazione al pI



✓ Metodi immunochimici



# Dosaggio delle proteine

✓ metodi spettrofotometrici\* (diretti)  $A = \epsilon_{\lambda} c l$

✓ metodi colorimetrici \* (indiretti)

✓ metodi immunochimici (indiretti)



\* lezione di ricapitolazione: spettrofotometria

# Dosare un enzima

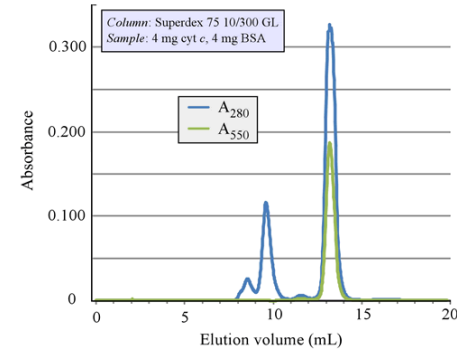
- ❑ Misurare l'attività enzimatica x la quantificazione e la caratterizzazione delle proprietà cinetiche
- ❑ Enzimi nella diagnostica clinica
- ❑ Dosare metaboliti
- ❑ Indicatore della formazione di un complesso (ELISA; Western blotting)

# Saggi enzimatici

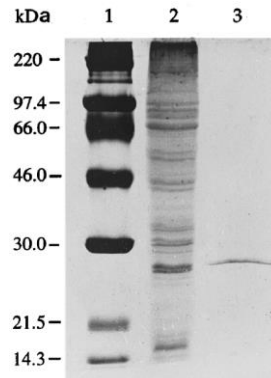
- ✓ Principi
- ✓ dosaggi in continuo - discontinuo
- ✓ metodi di saggio
  - ✓ spettrofotometrici (visibile- UV *substrati naturali, artificiali*)
  - ✓ spettrofluorimetrici (*substrati naturali, sintetici*)
    - ✓ chemiluminescenza
    - ✓ bioluminescenza
    - ✓ radioattivi
- ✓ reazioni accoppiate

# Determinazione massa molecolare; numero e peso molecolare delle subunità

✓ Cromatografia per esclusione molecolare

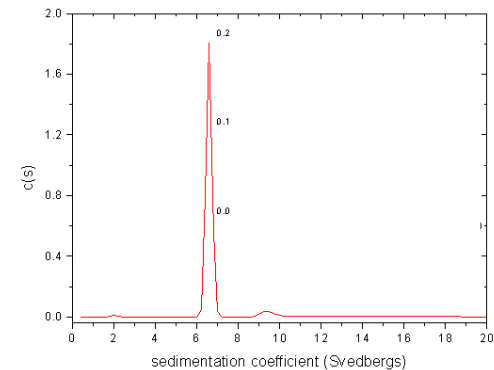


✓ SDS-PAGE



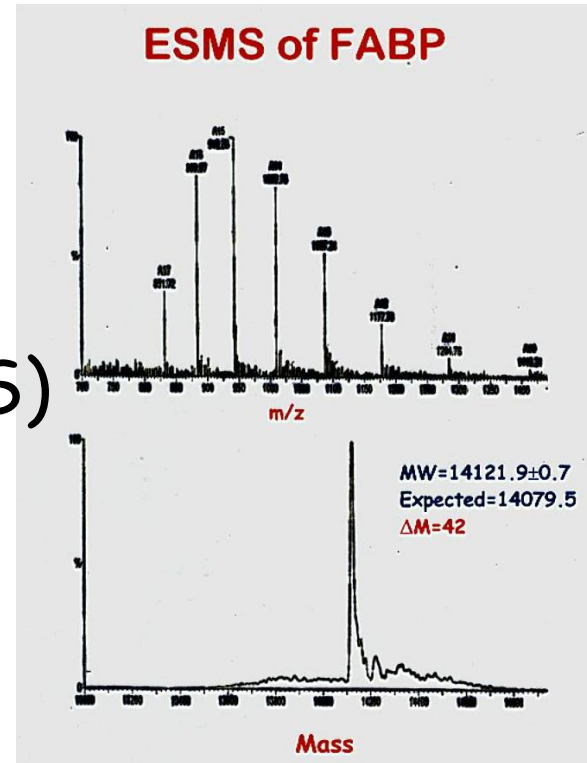
Protein Cross-Linking

✓ Ultracentrifugazione analitica

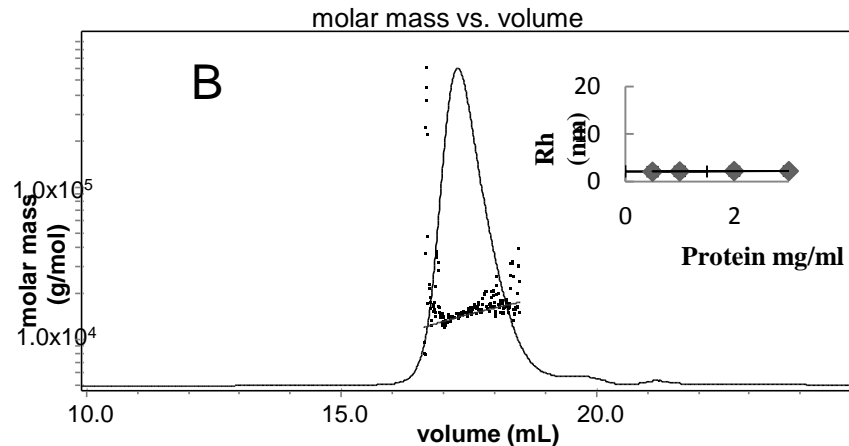


# Determinazione massa molecolare; numero e peso molecolare delle subunità

✓ Spettrometria di massa (MS)



✓ Light scattering



# Applicazioni della MS

- **Biotechnology:**  
analysis of proteins, peptides, oligonucleotides
- **Pharmaceutical:**  
drugs discovery and metabolism, combinatorial chemistry, pharmacokinetics
- **Clinical:**  
neonatal screening, Hb analysis, drug testing, metabolomics
- **Environmental:**  
water, food, air quality, wastes (PCB, IPA, Pesticides etc)
- **Forensic analysis**  
drugs, poisons, toxins, gunshot residues, explosives, fingerprints and biological fluids
- **Cultural Heritage**  
restoration diagnosis, degradation state, working techniques



# Purificazione delle proteine

- ✓ Significato di proteina pura-omogenea
- ✓ Interesse verso la purificazione di una proteina
- ✓ Tabella di purificazione
- ✓ Tappe della purificazione

# I primi passaggi

1. Scelta della fonte: economica e facilmente recuperabile; molte proteine sono maggiormente rappresentate in tessuti specifici, come ad es. l'emoglobina nel sangue e queste possono rappresentare un'utile fonte di partenza.
2. La proteina può anche essere ottenuta per via ricombinante in un organismo ospite opportuno.
3. Disporre di un metodo per identificare e distinguere la proteina di interesse nella miscela, ovvero mettere a punto un saggio biologico.

# Tappe della Purificazione delle proteine: strategia generale

- Omogenizzazione e frazionamento del tessuto e/o della cellula
- Centrifugazione
- Separazione

si possono sfruttare le proprietà che differenziano una proteina dall'altra:

## PROPRIETA'

Solubilità

Punto isoelettrico (carica)

Dimensioni molecolari e conformazione

Proprietà di legame

Proprietà di adsorbimento

Proprietà di ripartizione

Distribuzione di amminoacidi idrofobici

## METODO

precipitazione con sali (salting out)/solventi

cromatografia a scambio ionico

cromatografia ad esclusione molecolare

cromatografia di affinità

cromatografia di adsorbimento

cromatografia di ripartizione

cromatografia di interazione idrofobica

## Purificazione di proteine ricombinanti

- Cromatografia di affinità con tag specifici o partner di fusione;
- Vantaggi: aumentata espressione, aumentata solubilità, più semplice identificazione e purificazione

# Tappe della purificazione delle proteine

1. Omogeneizzazione;
2. centrifugazione: differenziale, in gradiente di densità;
3. separazione mediante variazioni solubilità;
4. separazione con membrane;
5. cromatografia

# 1) OMOGENEIZZAZIONE

sonicatore



Omogeneizzazione  
con ultrasuoni a  
elevata frequenza

Waring Blenders



Purificazione delle proteine: omogeneizzazione

# 1) OMOGENEIZZAZIONE

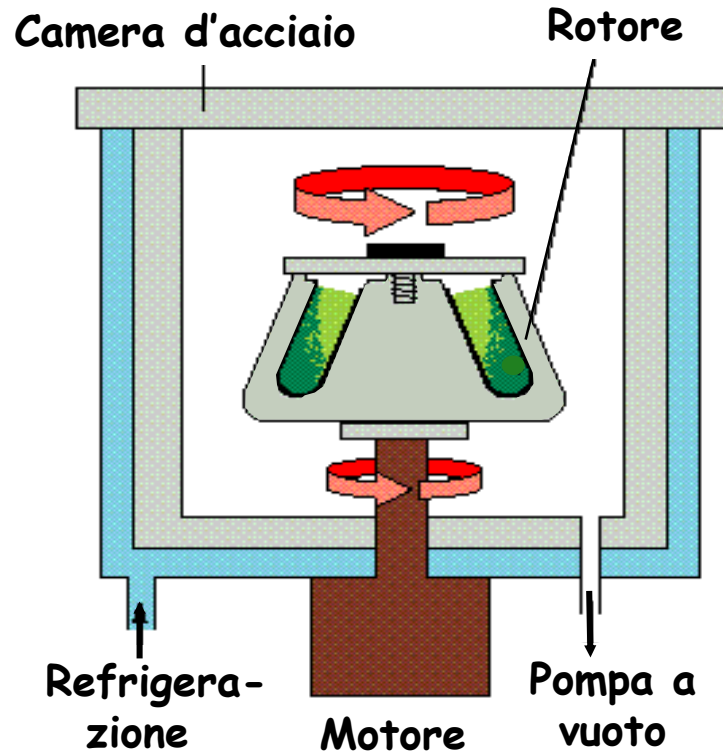


La particolare geometria dei provettoni assicura la circolazione uniforme del prodotto durante la rotazione del pestello.

## OMOGENEIZZATORI OMNI MIXER

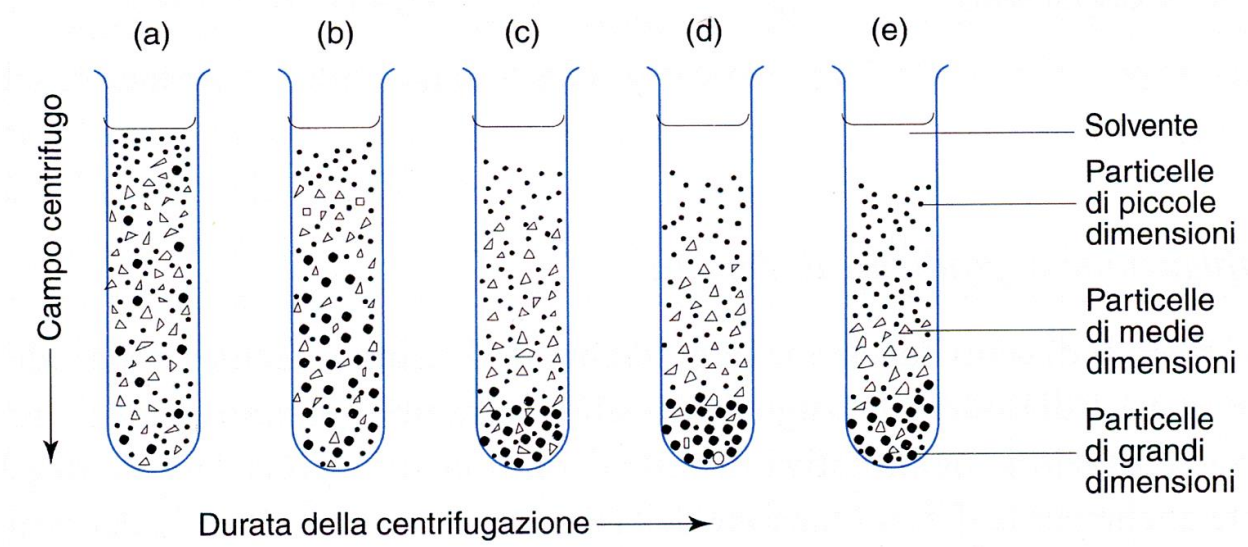


## 2) Centrifugazione



# Metodi di separazione nella centrifugazione preparativa

## • Centrifugazione differenziale



Separazione in frazioni per centrifugate successive, aumentando gradualmente il campo centrifugo applicato ( $G = \omega^2 r$ )

$$v = \frac{dr}{dt} = \frac{2}{9} \frac{r_p^2 (d_p - d_m)}{\eta} \omega^2 r$$

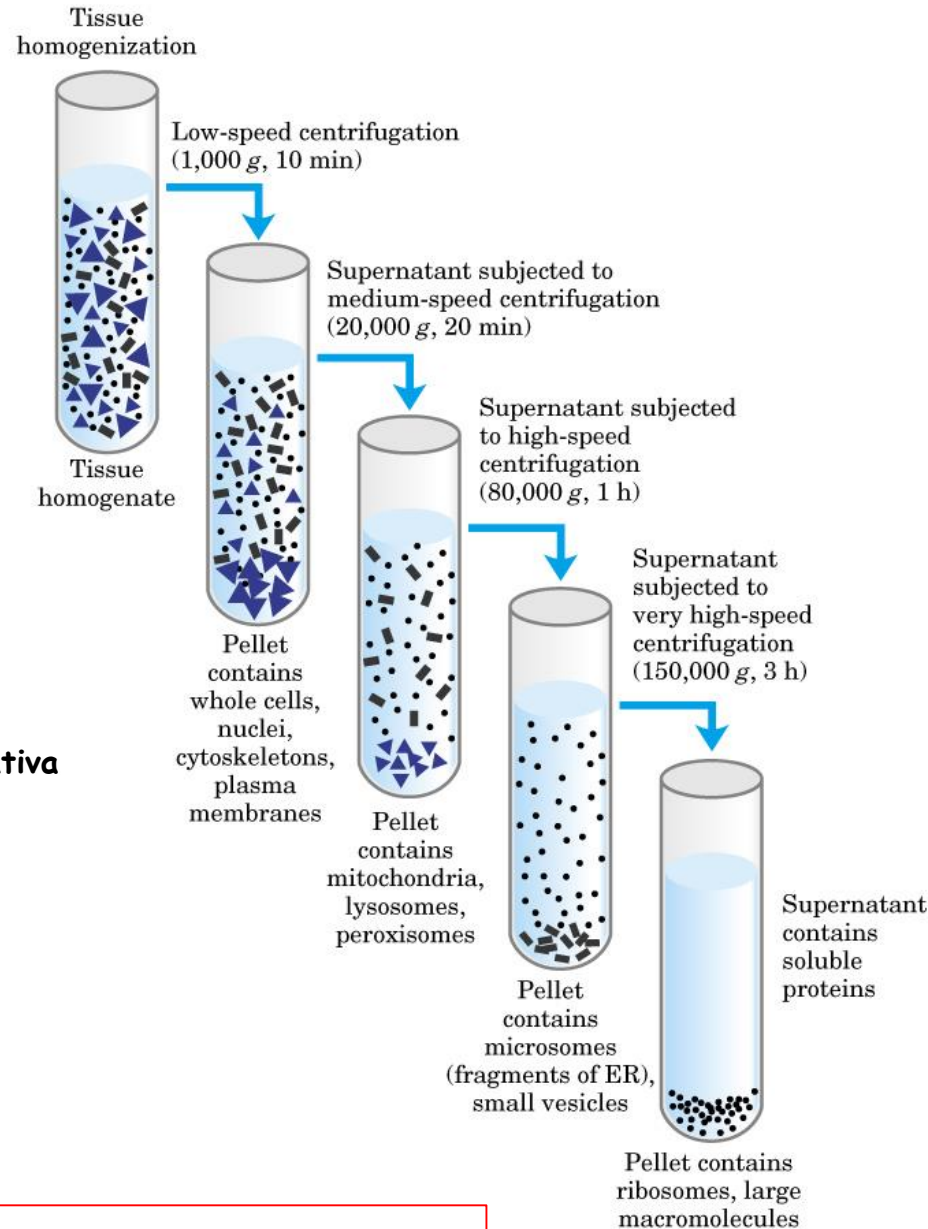
$r$  = distanza radiale  
 $\omega$  = velocità angolare

$v$  = velocità di sedimentazione;  $r_p$  = raggio della particella  
 $d_p$  = densità della particella;  $d_m$  = densità del mezzo  
 $\eta$  = viscosità del mezzo

Purificazione delle proteine: centrifugazione



# Centrifugazione differenziale



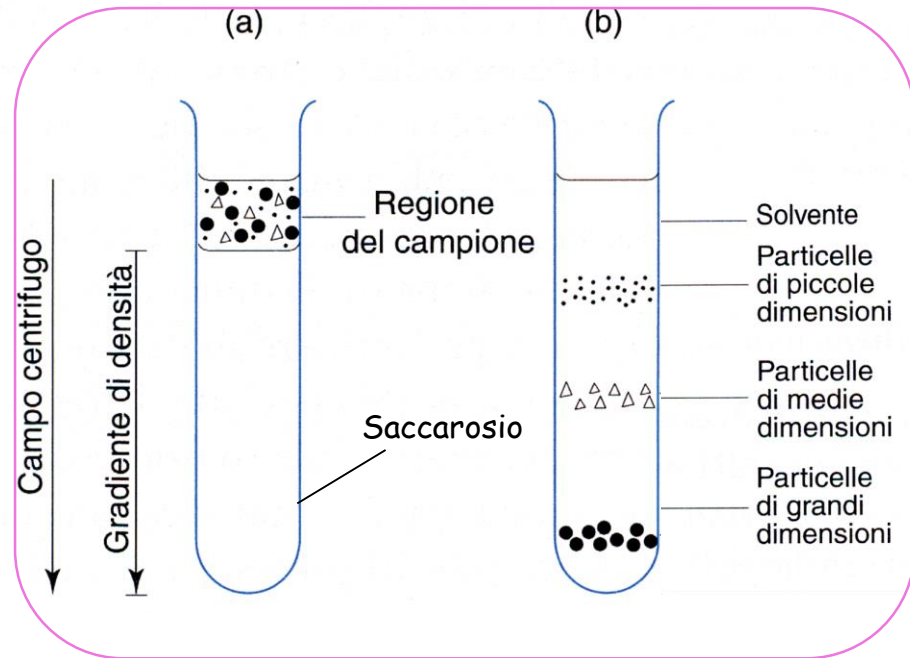
RCF = Forza centrifuga relativa

Purificazione delle proteine: centrifugazione

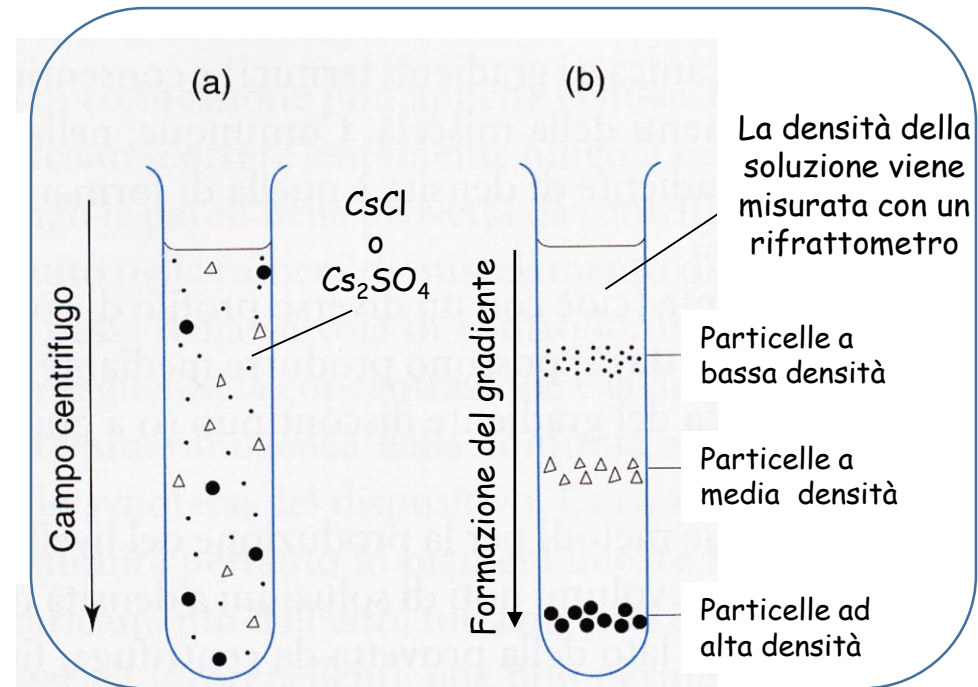
# Metodi di separazione nella centrifugazione preparativa

## • Centrifugazione in gradiente di densità

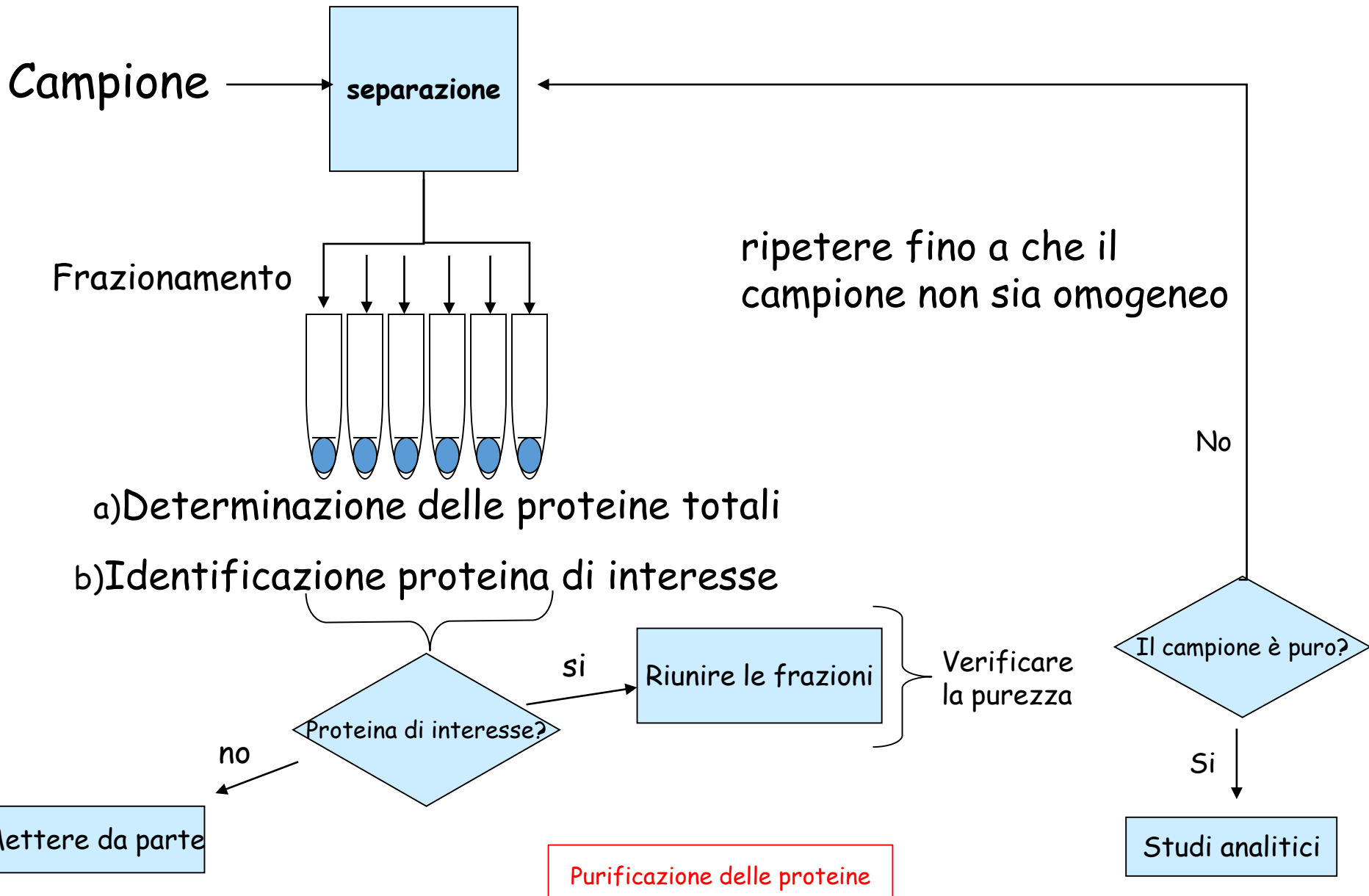
➤ Centrifugazione zonale (separa in base alle dimensioni delle particelle)



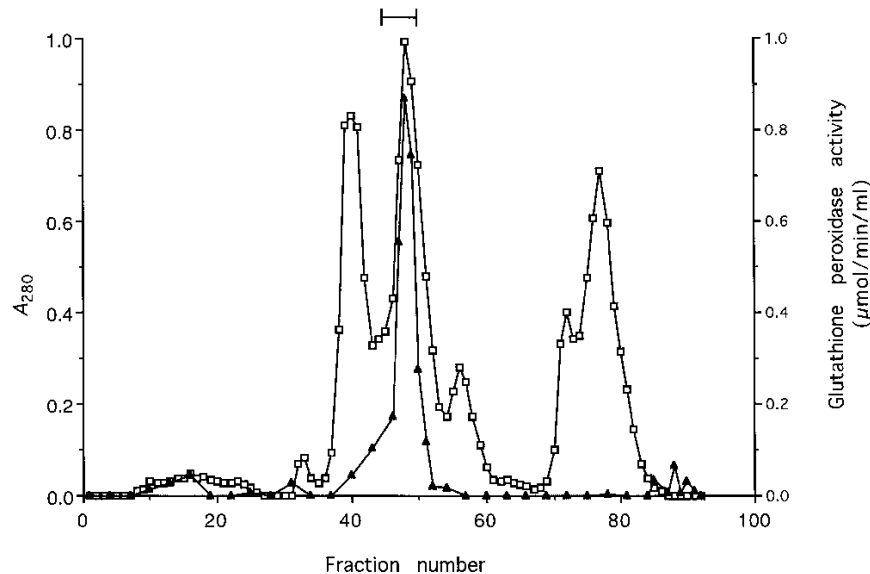
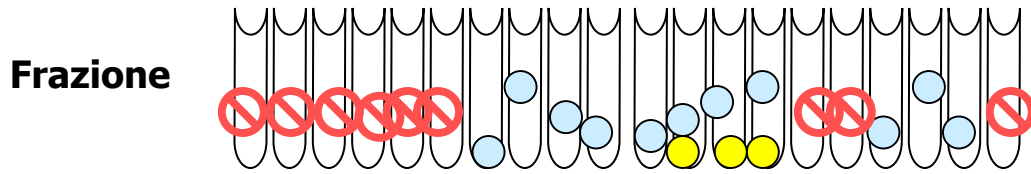
➤ Centrifugazione in *gradiente di densità all'equilibrio o isopicnica* (separa in base alla densità delle macromolecole)



# La purificazione di una proteina può richiedere più passaggi di frazionamento



Si può misurare in un saggio specifico la proteina di interesse (l'attività enzimatica) eseguendo un dosaggio su ciascuna frazione che contiene proteine; l'attività maggiore misurata è generalmente in corrispondenza di picchi.



**E' possibile a questo punto scartare le frazioni dove non è presente la proteina di interesse e riunire quelle in cui essa è presente**

**Purificazione delle proteine**

# Purificazione delle proteine

✓ Tappe della purificazione:

❖ 3) separazione mediante variazioni solubilità

- Salting in/out
- Solventi organici

### 3) Solubilità delle proteine

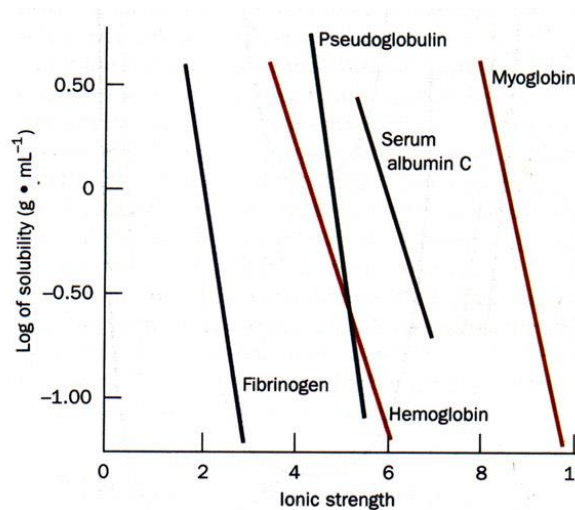
La solubilità delle proteine è fortemente influenzata dalla concentrazione salina della soluzione.

#### Dipendenza della solubilità dal sale

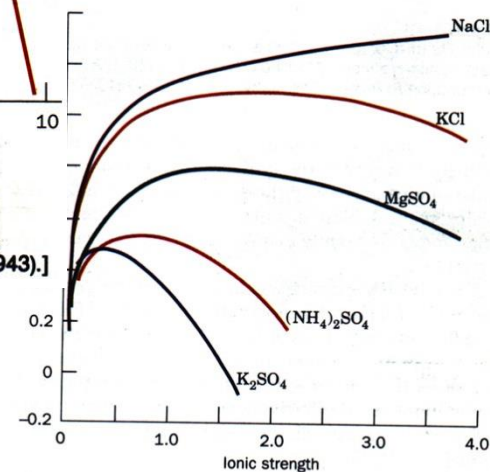
**Il Salting in:** la solubilità aumenta all'aumentare della concentrazione di sale;

**Il Salting out:** la solubilità diminuisce all'aumentare della concentrazione di sale.

Un classico metodo di frazionamento delle proteine è la precipitazione con ammonio solfato basata sul fenomeno del salting out.



**Figure 5-2**  
Solubilities of several proteins in ammonium sulfate solutions. [After Cohn, E. J. and Edsall, J. T., *Proteins, Amino Acids and Peptides*, p. 602, Academic Press (1943).]



**Figure 5-3**  
Solubility of carboxy-hemoglobin at its isoelectric point as a function of ionic strength and ion type. Here S and S' are, respectively, the solubilities of the protein in the salt solution and in pure water. The logarithm of their ratios is plotted so that the solubility curves can be placed on a common scale. [After Green, A. A., *J. Biol. Chem.* 95, 47 (1932).]

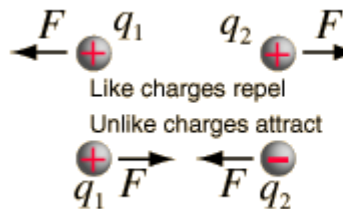
# 3) Solubilità delle proteine

## Precipitazione in solventi organici

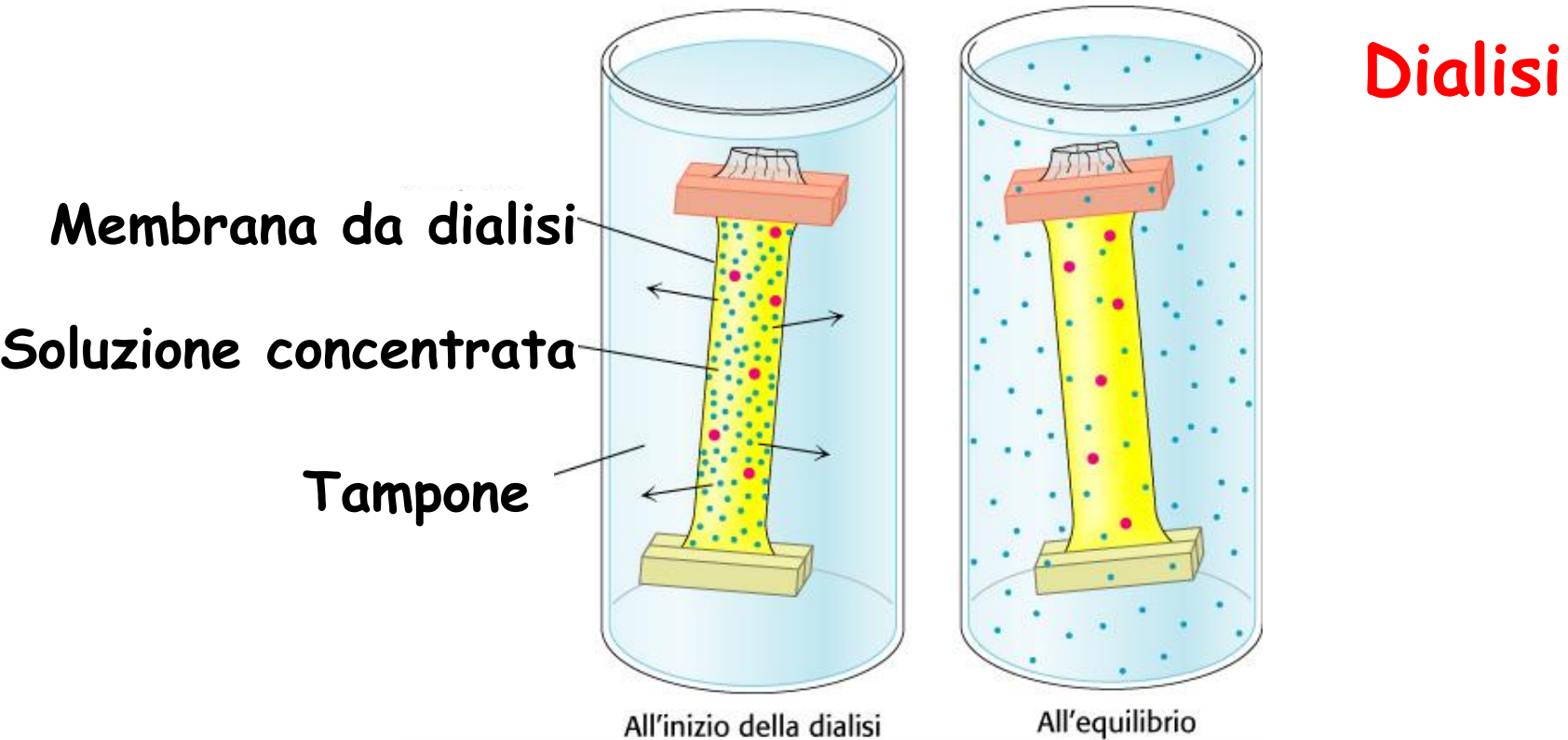
### Coulomb's Law

Like charges repel, unlike charges attract.

The electric force acting on a point charge  $q_1$  as a result of the presence of a second point charge  $q_2$  is given by Coulomb's Law:


$$F = \frac{kq_1q_2}{r^2} = \frac{q_1q_2}{4\pi\epsilon_0 r^2} \quad \text{Coulomb's Law}$$

# 4) Separazione con membrane



Solo le molecole di piccole dimensioni, inferiori al cut-off della membrana, diffondono attraverso la membrana di collodio. All'equilibrio la concentrazione delle molecole piccole è la stessa all'interno e all'esterno della membrana. Le macromolecole restano all'interno della membrana.



# Ultrafiltrazione

