

CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA PER LA SOSTENIBILITÀ



BIOCHIMICA APPLICATA (6 CFU)

LEZIONE 4

Prof. Paola Di Donato

Dipartimento di Scienze e Tecnologie

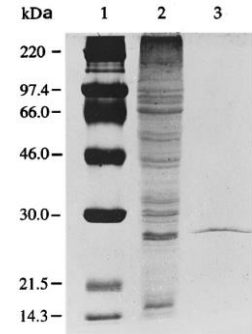
Stanza 520, V piano lato NORD

Tel. 081 547 6625

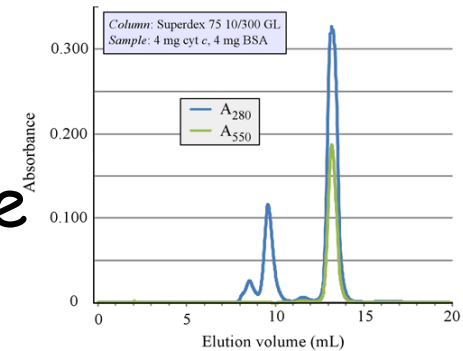
E-mail: paola.didonato@uniparthenope.it

Criteri di purezza

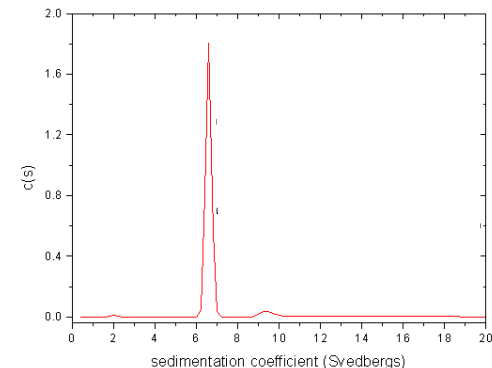
✓ Elettroforesi nativa e in SDS (SDS-PAGE)



✓ Cromatografia per esclusione molecolare

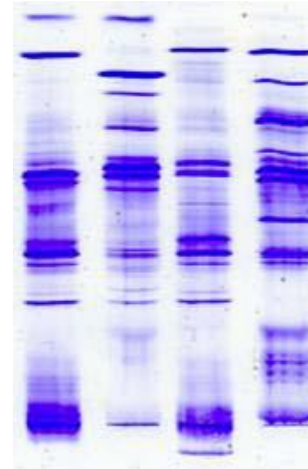


✓ Ultracentrifugazione analitica

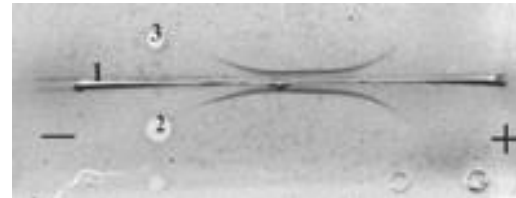


Criteri di purezza

✓ Focalizzazione al pI



✓ Metodi immunochimici



METODI IMMUNOCHIMICI

Metodologie che si basano sull'uso degli anticorpi a diversi scopi:

- Purificazione di macromolecole (ad esempio, per affinità) e complessi (ad esempio, attraverso immunoprecipitazione)
- Analisi ed identificazione di biomolecole
- Sviluppo di nuovi farmaci

METODI IMMUNOCHIMICI

Anticorpo (Ab): molecola prodotta dai linfociti B in risposta ad una stimolazione antigenica

Antigene (Ag): molecola complessa (peptide, zucchero, lipide, acido nucleico) che scatena una risposta immunitaria

Epitopo: frammento sulla molecola di antigene che viene riconosciuto dall'anticorpo

METODI IMMUNOCHIMICI

ANTICORPI

- Glicoproteine dette **Immunoglobuline** (IgG, IgA, IgM, IgE ed IgD)
- Nell'organismo hanno il compito di rilevare, legare e facilitare la rimozione degli antigeni

IMMUNOGLOBULINE: molecole anticorpali

Struttura : quattro catene polipeptidiche, a due a due uguali, legate da ponti disolfuro.

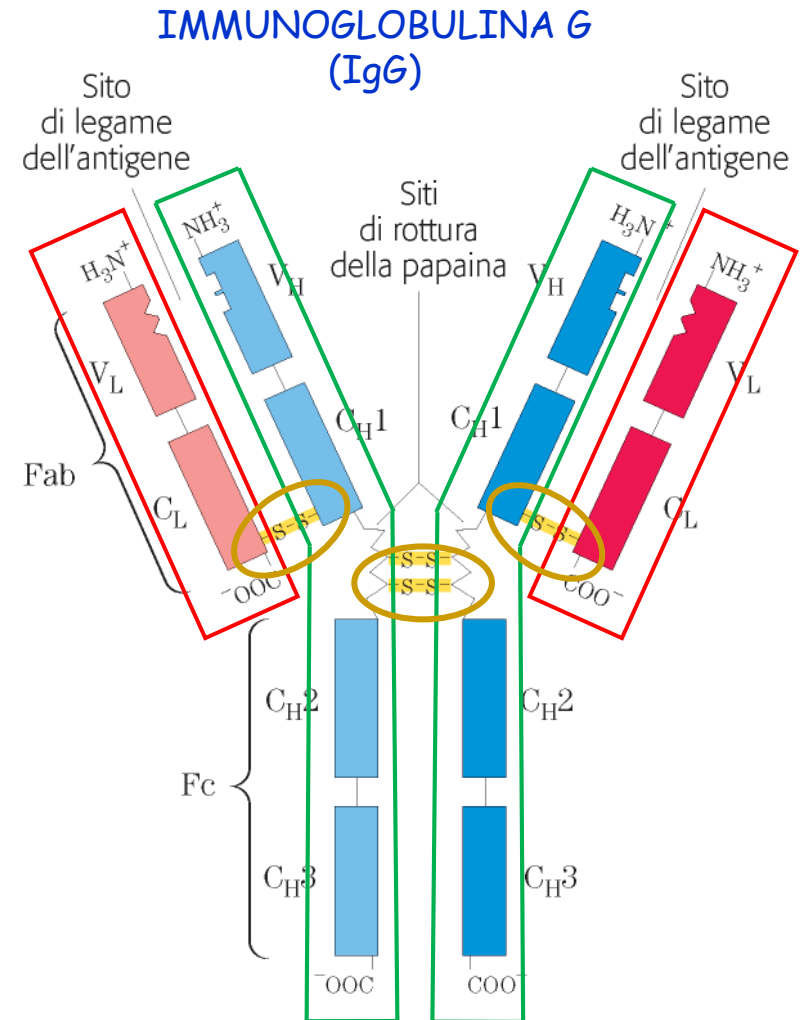
- due "catene leggere", aventi peso molecolare 20000 e costituite da circa 220 amminoacidi
- due "catene pesanti" con peso molecolare di circa 55000 e costituite da circa 430 amminoacidi.

5 classi distinte in base alle catene pesanti:

- a → IgA
- d → IgD
- e → IgE
- g → IgG
- m → IgM

In ogni classe ci sono 2 tipi di catena leggera:

- κ
- λ



C = dominio costante
V = dominio variabile
H, L = catena pesante; catena leggera

ANTICORPI

La produzione di anticorpi si ottiene per differenziazione delle plasmacellule a seguito della risposta immunitaria.

MONOCLONALI

- Anticorpo derivato dai cloni di una singola cellula B
- Presentano affinità per lo stesso epitopo di uno specifico antigene
- Poco potenti ma molto specifici

OLIGOCLONALI

- possono essere ottenuti attraverso la combinazione di una serie di anticorpi monoclonali, oppure immunizzando animali con specifiche regioni antigeniche
- sono un valido compromesso tra poli- e monoclonali, ovvero sensibilità comparabile ai poli- e specificità comparabile ai monoclonali.

POLICLONALI

- miscele di anticorpi che derivano da cloni plasmacellulari diversi
- presentano un insieme di cloni anticorpali, alcuni diretti contro determinati epitopi della proteina ed altri cloni contro altri epitopi.
- Potenti ma poco specifici

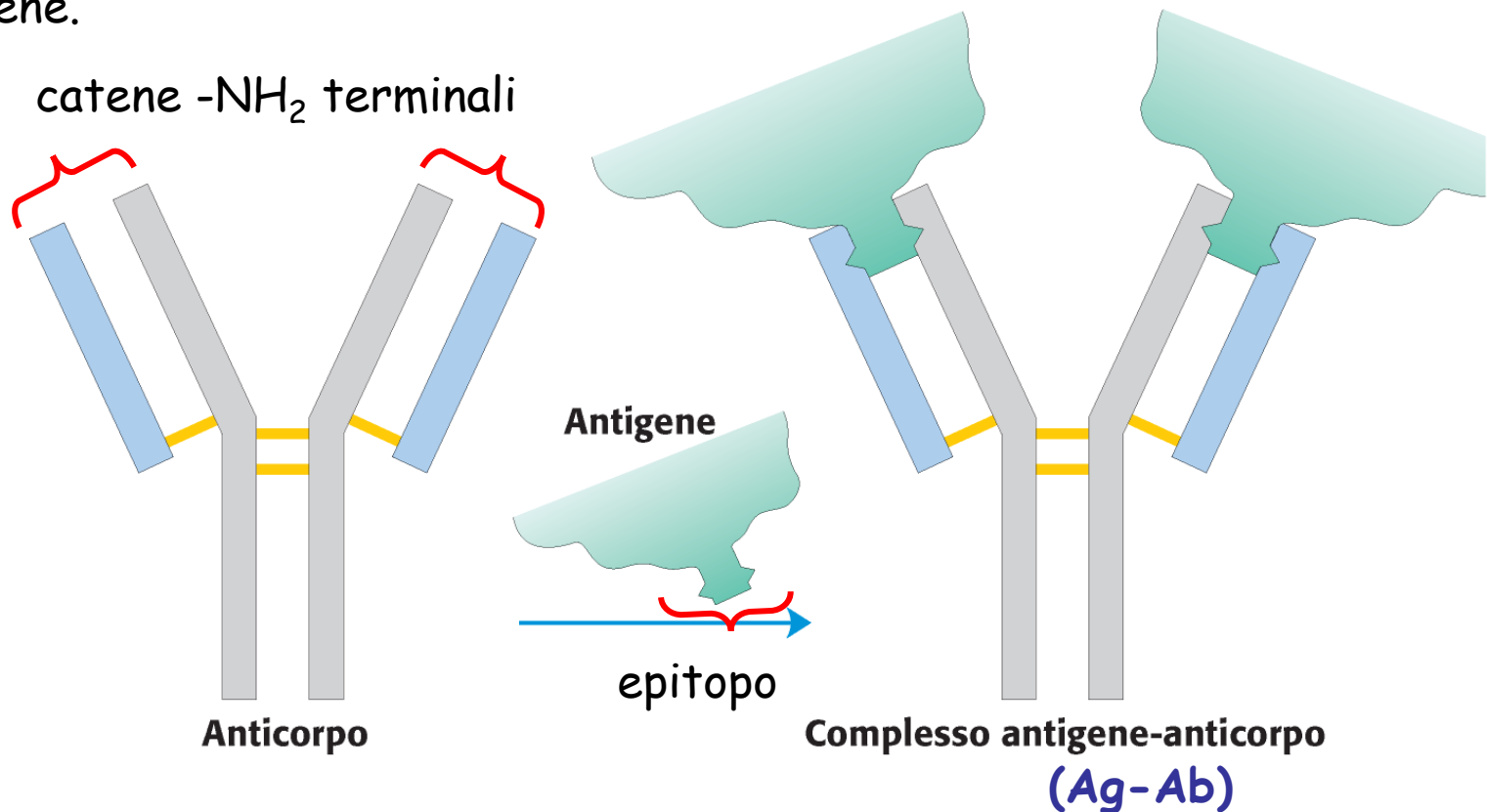
RICOMBINANTI

- Prodotti ad hoc per usi molto specifici

INTERAZIONE ANTIGENE-ANTICORPO: FORMAZIONE DELL'IMMUNOCOMPLESSO (Ag-Ab)

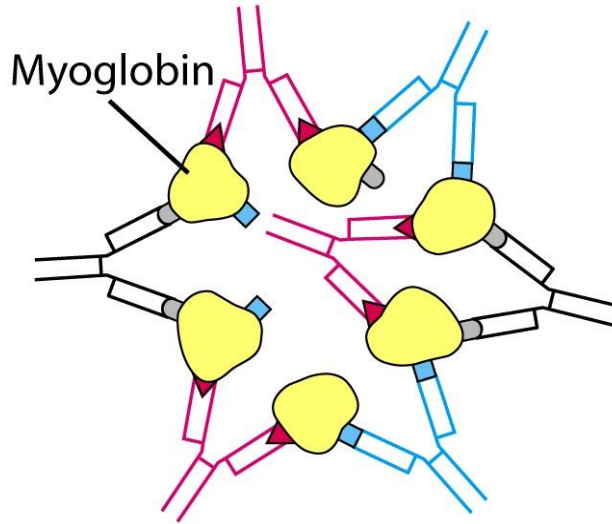
Gli anticorpi sono **molecole normalmente bivalenti**, sono quindi capaci di legare molecole di antigene con un **rapporto 1:2**.

I siti di legame sono rappresentati, rispettivamente, dalle due coppie di catene $-NH_2$ terminali per l'anticorpo e dallo specifico epitopo per l'antigene.



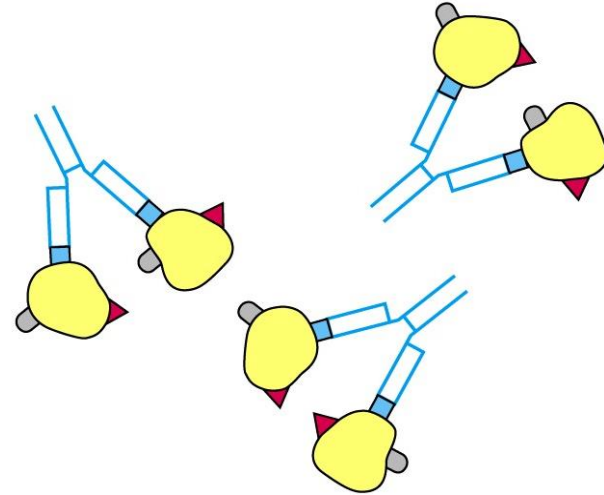
FORMAZIONE DELL'IMMUNOCOMPLESSO: reazioni di IMMUNOPRECIPITAZIONE

POLYCLONAL ANTISERUM



**Matrice reticolare
o grossi aggregati**

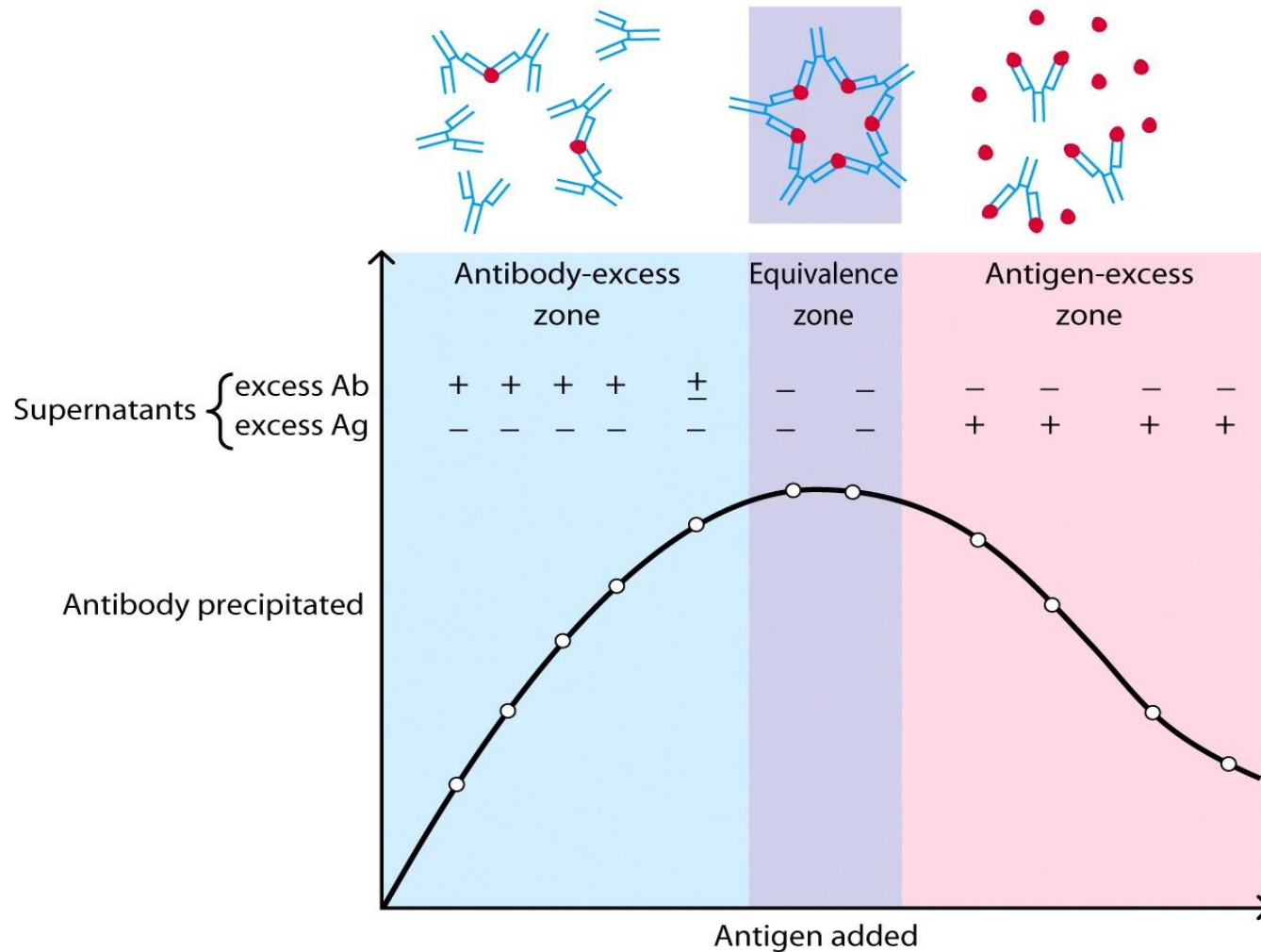
MONOCLONAL ANTIBODY



**Nessuna formazione di
precipitato se Ag contiene
una sola copia dell'epitopo**

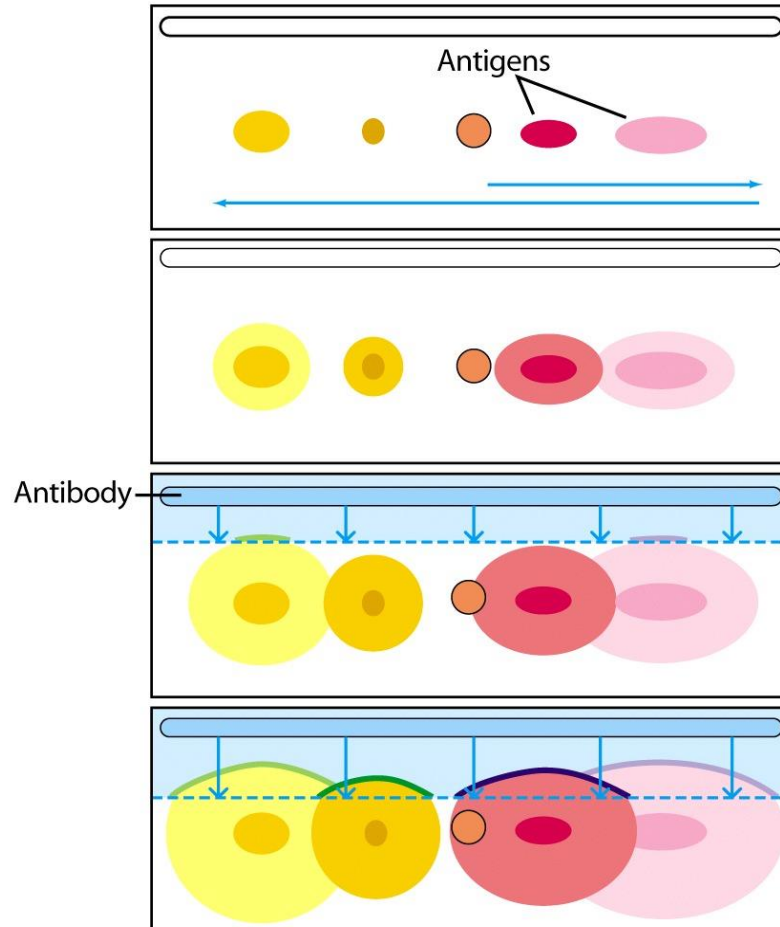
La formazione dell'immunocomplesso Ab-Ag è il processo che è alla base di diverse tecniche immunochimiche; alcune di queste dipendono dalla precipitazione di tale complesso in soluzione

Curva di precipitazione antigene-anticorpo in soluzione



Effetto del rapporto Ab/Ag sulla precipitazione del complesso Ab-Ag

Immunolettroforesi: elettroforesi ed immunoprecipitazione

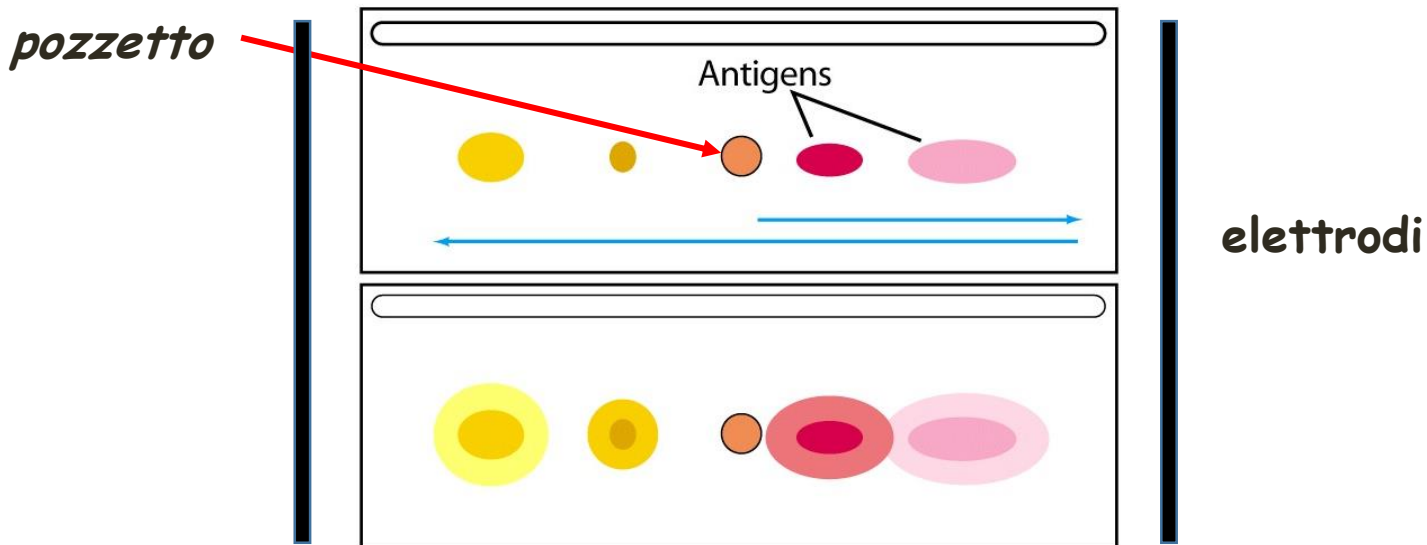


Immunolettroforesi:

Si realizza su gel di agarosio e combina separazione elettroforetica con immuno-precipitazione

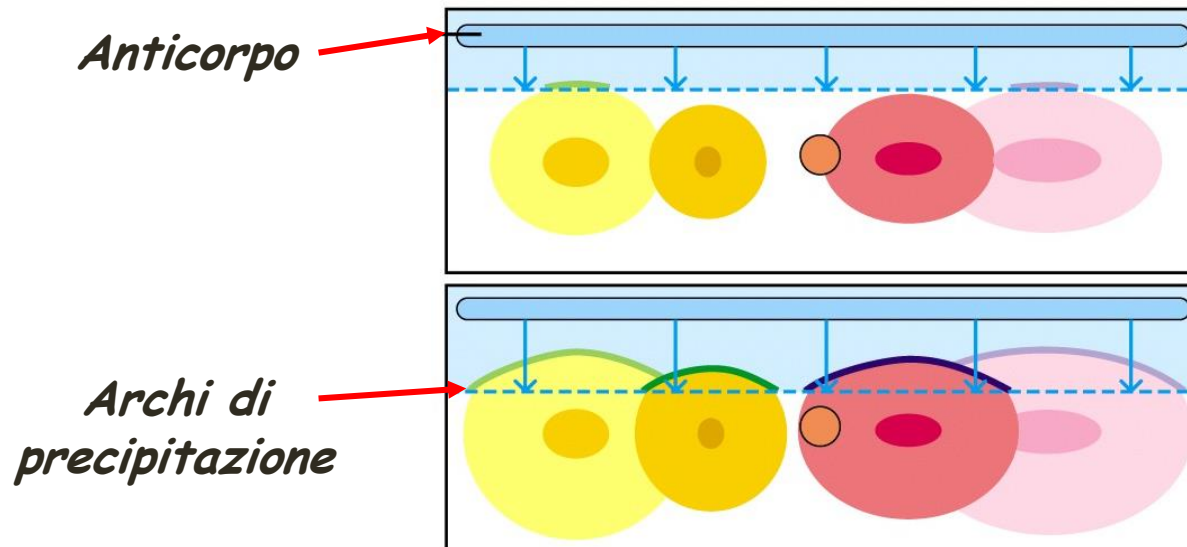
La miscela di antigeni di natura proteica viene posta in un pozzetto all'interno del gel e separata nelle sue componenti mediante elettroforesi

Gli antigeni migrano in base alla propria carica nativa ed alla propria dimensione, separandosi in bande



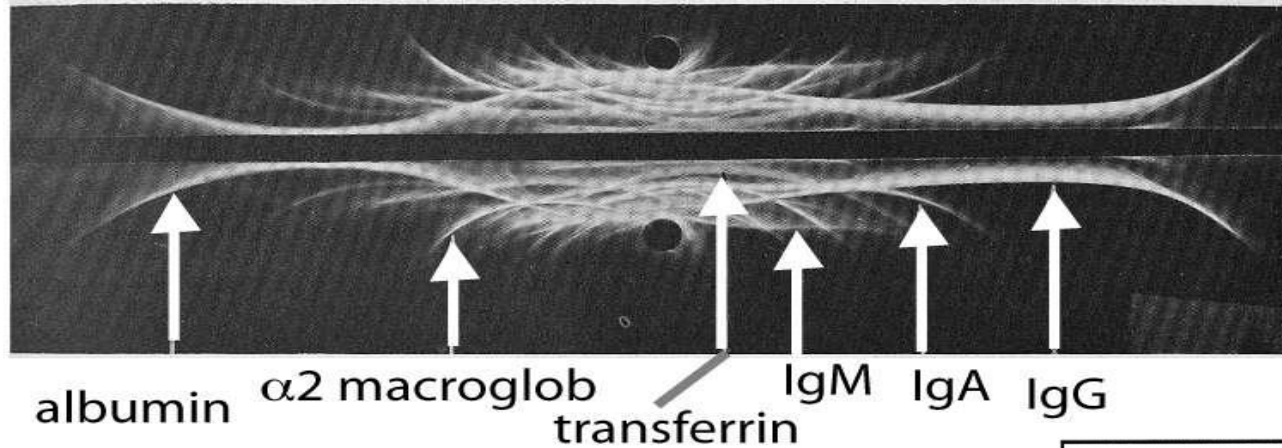
Immunolettroforesi:

Ai lati, su dei solchi viene introdotto la soluzione contenente l'**anticorpo**

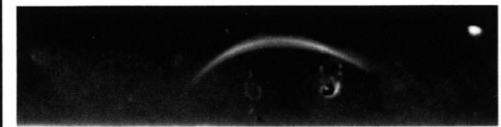


All'unione tra antigeni separati precedentemente e i rispettivi anticorpi, si formano degli **archi** caratteristici.

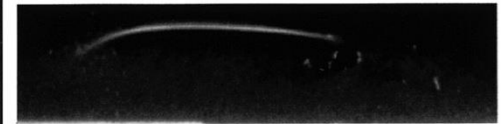
Immunolettroforesi



Ig A



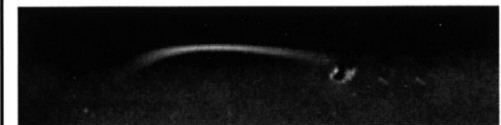
Ig G



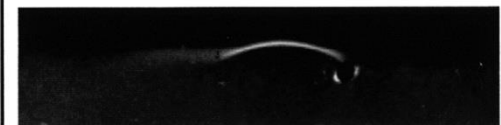
Ig M



K



λ



Criteri di purezza: immunochimica

Dosaggio delle proteine

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

✓ metodi colorimetrici * (indiretti)

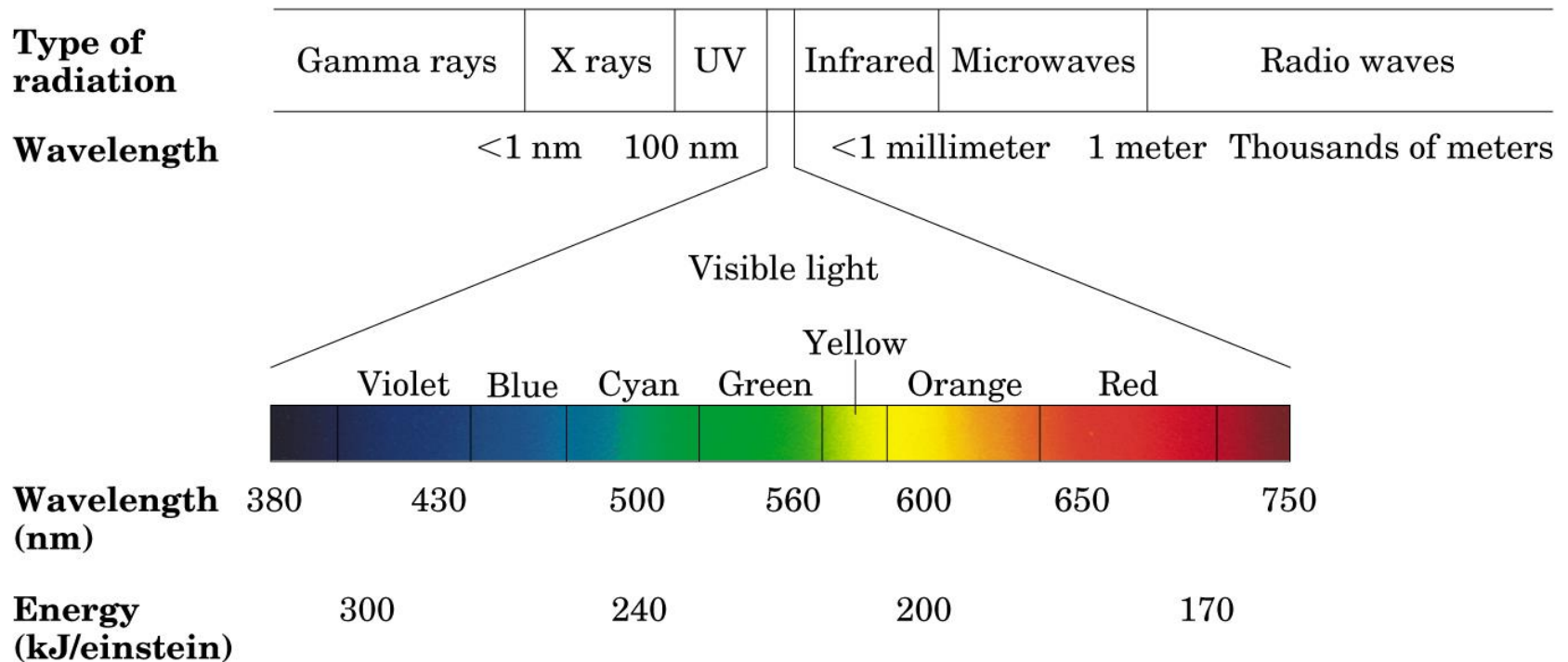


✓ metodi immunochimici (indiretti)



* lezione di ricapitolazione: spettrofotometria

Rappresentazione diagrammatica dello spettro elettromagnetico con in evidenza le bande del visibile



La lunghezza d'onda λ è inversamente correlata alla frequenza dalla relazione $\lambda = c/\nu$ e alla energia $E = h\nu$ (da cui $E = hc/\lambda$)

$$c = 3 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$$

$$h = 6.63 \times 10^{-34} \text{ Js}$$

Spettri di assorbimento di singoli amminoacidi

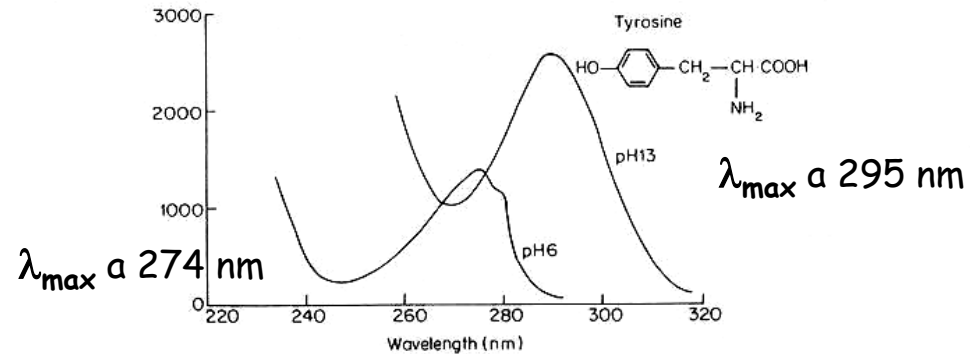
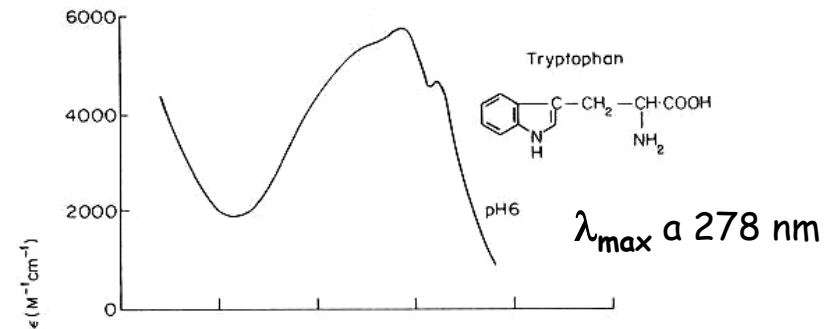
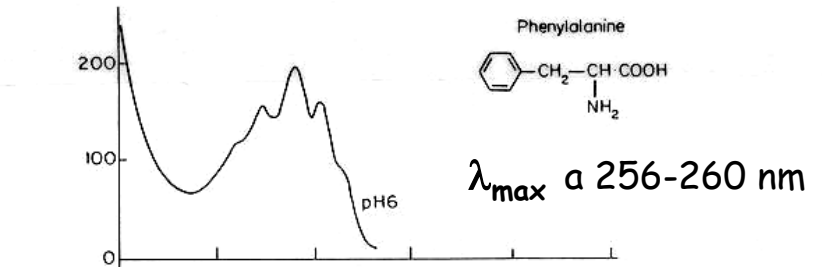
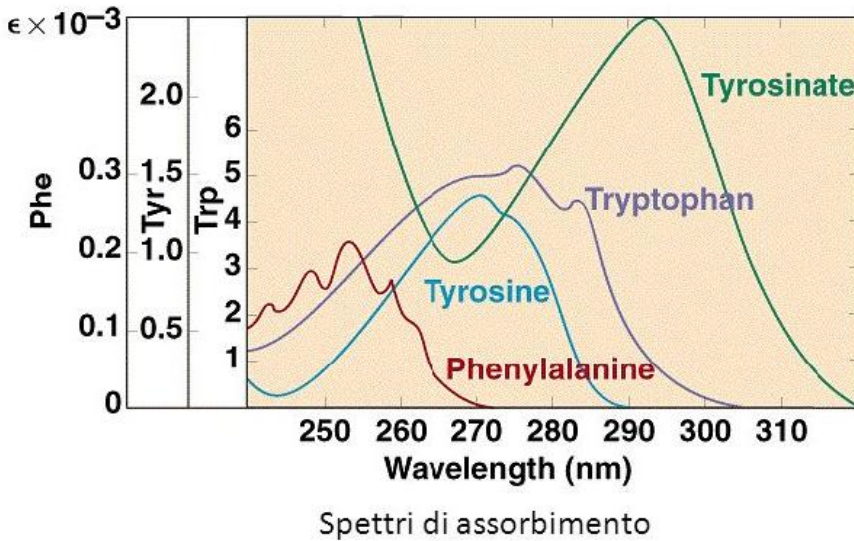
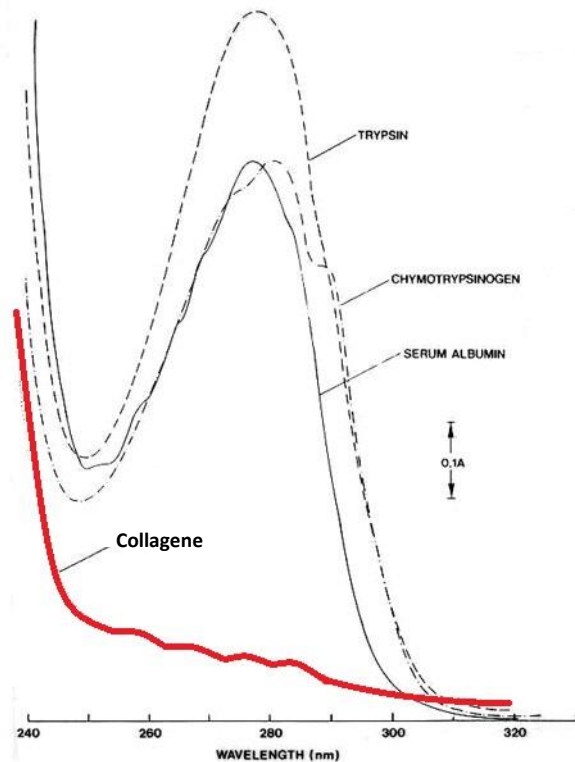


Fig. Ultraviolet absorption spectra of amino acids and proteins. A. UV spectra of aromatic amino acids. Phenylalanine and tryptophane at pH 6, tyrosine at pH 6 and pH 13 (tyrosinate): see Table 3 (Brown, 1980). Reproduced by permission from Brown (1980), *An Introduction to Spectroscopy for Biochemists*. Copyright: Academic Press Inc. (London) Ltd.

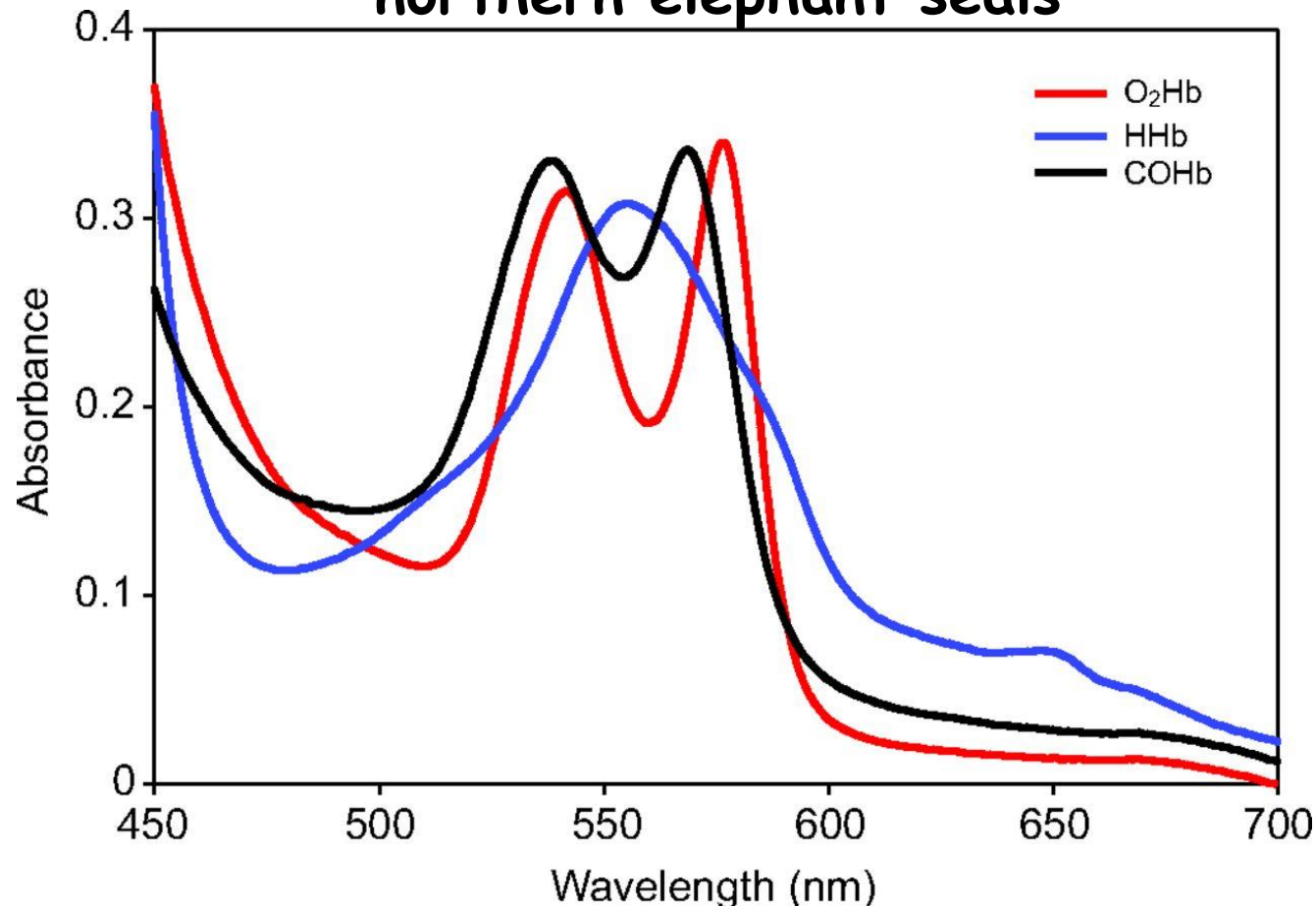
Dosaggio delle proteine: metodi spettrofotometrici

Spettri di assorbimento di proteine



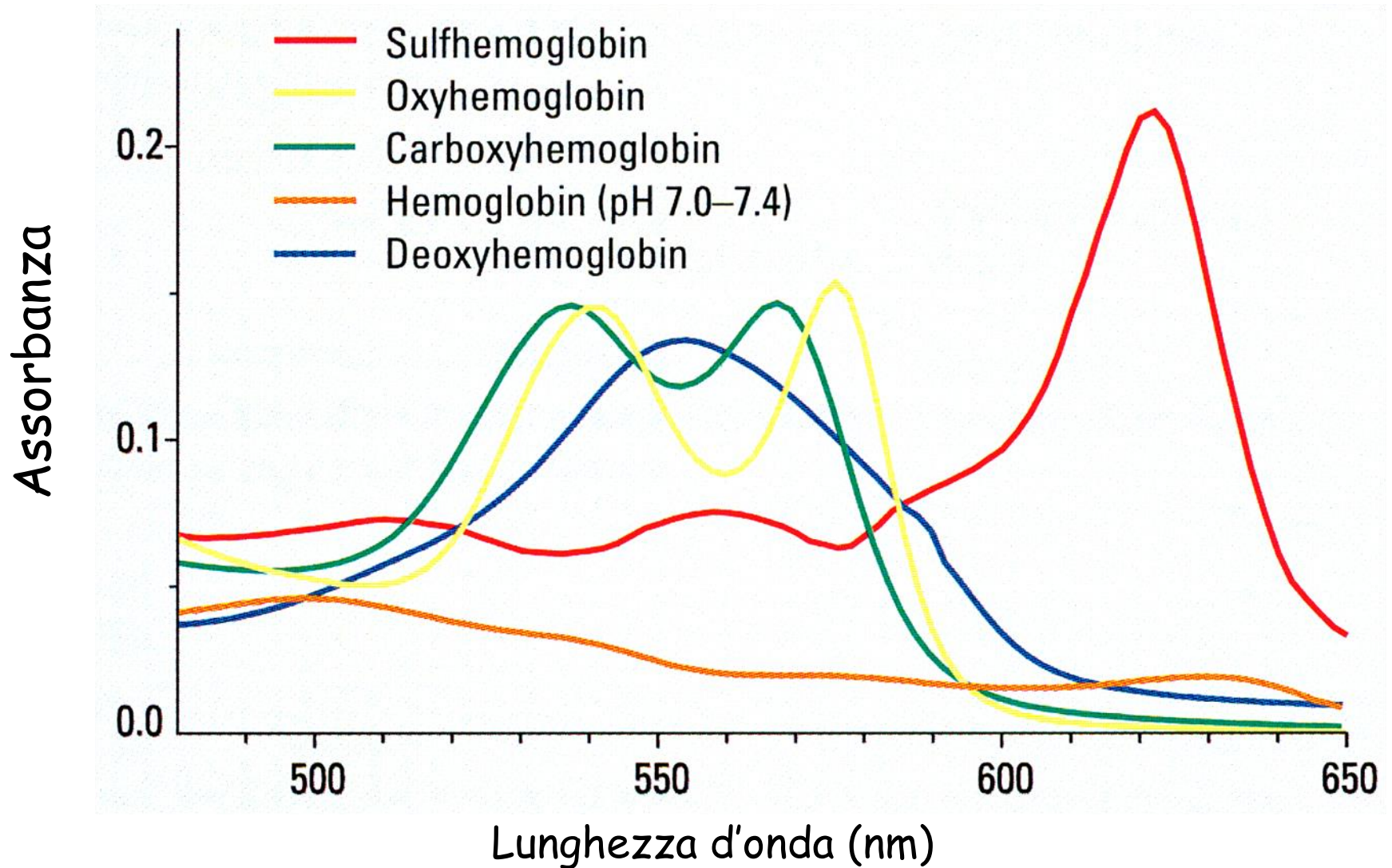
Spettro di assorbimento di quattro proteine: la **tripsina** ha un alto contenuto in tirosina, l'**albumina** in fenilalanina, il **chimotripsinogeno** in triptofano e il collagene ha un basso contenuto in tutti e tre questi aminoacidi.

Absorption spectra for oxyhemoglobin (O_2Hb), deoxyhemoglobin (HHb) and carboxyhemoglobin ($COHb$) in northern elephant seals



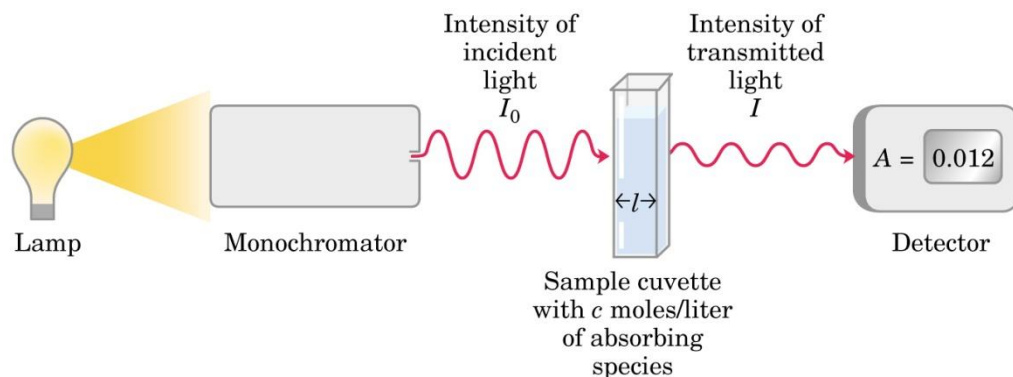
Peaks for O_2Hb (542 and 577 nm), HHb (555 nm) and $COHb$ (539 and 569 nm) match those of other mammalian species (human, cow, sheep)

Spettri di assorbimento di varie forme dell'Emoglobina



Dosaggio spettrofotometrico diretto

Misure di assorbimento - Legge di Lambert-Beer



$$\text{Trasmittanza} = \frac{I}{I_0} \quad 0 \leq T \leq 1 \quad 0 \leq T\% \leq 100$$

$$T = 10^{-\epsilon c l} \quad \log \left(\frac{I}{I_0} \right) = -\epsilon c l$$

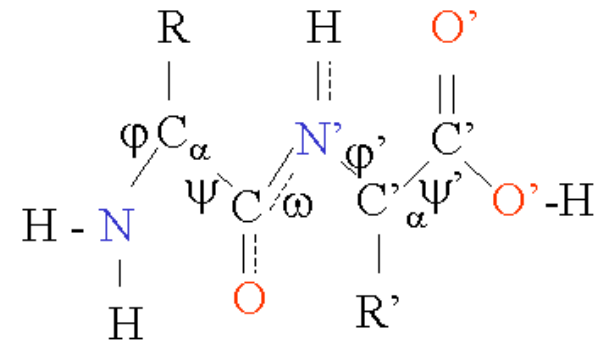
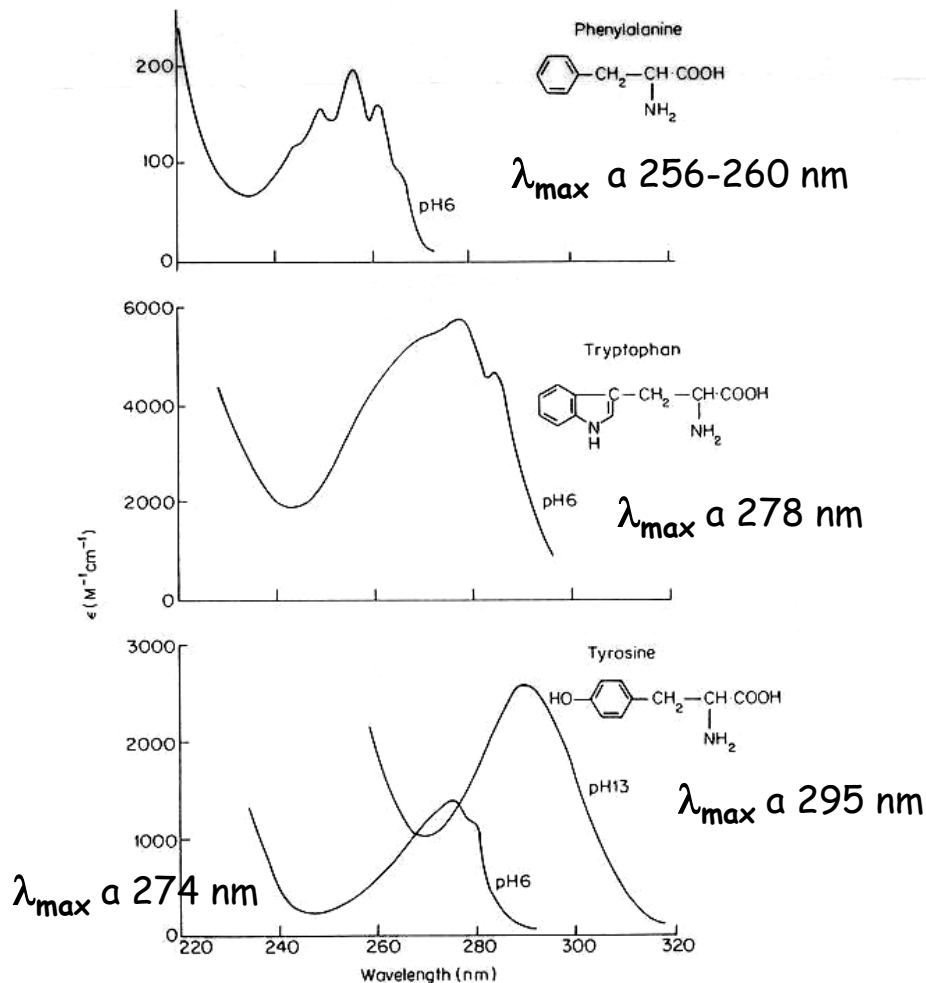
$$\text{Assorbanza} = A = \log \left(\frac{1}{T} \right) = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad 0 \leq A \leq \infty$$

$$A = \epsilon_{\lambda} c l \quad \epsilon_{\lambda} = \text{coefficiente di estinzione molare}$$

L'assorbanza è adimensionale ed è diversa da λ a λ .

Quando la concentrazione è espressa in molarità (M) ed il percorso della luce in centimetri (cm), ϵ è noto come **coefficiente di estinzione molare** ($M^{-1}cm^{-1}$) di un dato composto. **$\epsilon^{1\%}$** è l'assorbanza di una soluzione allo 1%

Spettri di assorbimento di singoli amminoacidi



214 nm, lontano UV

Fig. Ultraviolet absorption spectra of amino acids and proteins. A. UV spectra of aromatic amino acids. Phenylalanine and tryptophane at pH 6, tyrosine at pH 6 and pH 13 (tyrosinate): see Table 3 (Brown, 1980). Reproduced by permission from Brown (1980), *An Introduction to Spectroscopy for Biochemists*. Copyright: Academic Press Inc. (London) Ltd.

Absorption Maxima (λ_{max}) and Molar Absorption Coefficients (ϵ) for Various Substances at Neutral pH Encountered in Biological studies.

Molecule	λ_{max} (nm)	$10^{-3} \times \epsilon$ at λ_{max} ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
Tryptophan*	280	5.6
	219	47.0
Tyrosine*	274	1.4
	222	8.0
	193	48.0
Phenylalanine*	257	0.2
	206	9.3
	188	60.0

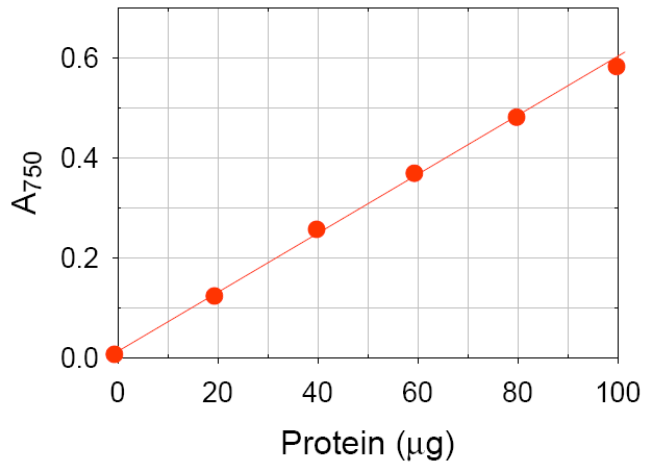
✓metodi colorimetrici (indiretti)

Tabella 7.2 Saggi colorimetrici di uso comune

Sostanza	Reattivo	Lunghezza d'onda
Aminoacidi	(a) Ninidrina (b) Sali rameici	570 (prolina 420) 620
Legame peptidico	Biureto (NaOH, Tartrato di Na-K, CuSO_4)	540
Fenoli, tirosina	Folin (fosfomolibdato, fosfotungstato, sali rameici)	660 o 750 (750 più sensibile)
Proteine	(a) Folin	660
	(b) Biureto	540
	(c) BCA	562
	(d) Blu Coomassie	595

Standard Curve

Lowry Assay Standard Curve
Protein amount vs. Absorbance

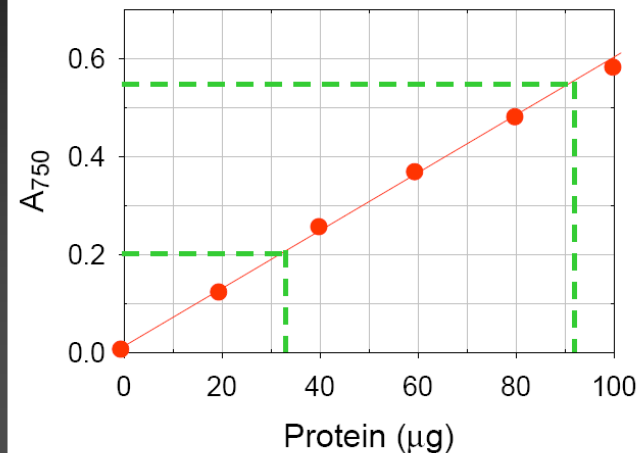


Protein standards:

Protein (μg)	A ₇₅₀
0	0.000
20	0.120
40	0.254
60	0.372
80	0.480
100	0.601

Using Standard Curve

Lowry Assay Standard Curve
Protein amount vs. Absorbance

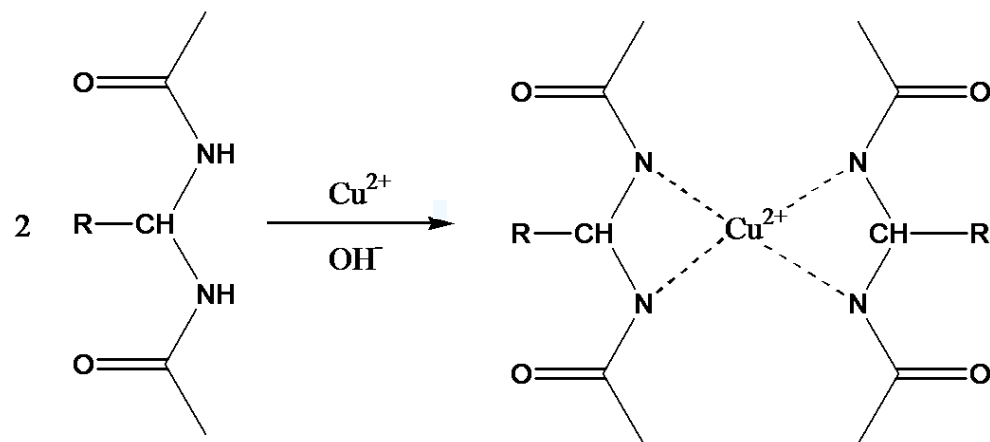


Protein unknowns:

Protein (μg)	A ₇₅₀
33	0.200
92	0.550

Dosaggio delle proteine: metodi colorimetrici

Biuret Test



Peptide Chains

Biuret Complexes (purple color)

■ Il reattivo del biureto è costituito da una soluzione di solfato di rame contenente tartrato di sodio e potassio

■ In condizioni alcaline gli ioni rameici Cu^{2+} formano un complesso di coordinazione con quattro gruppi $-\text{NH}$ presenti in altrettanti legami peptidici

■ Il complesso che si forma assorbe luce nel visibile, con un picco a 540-550 nm

METODO DI LOWRY

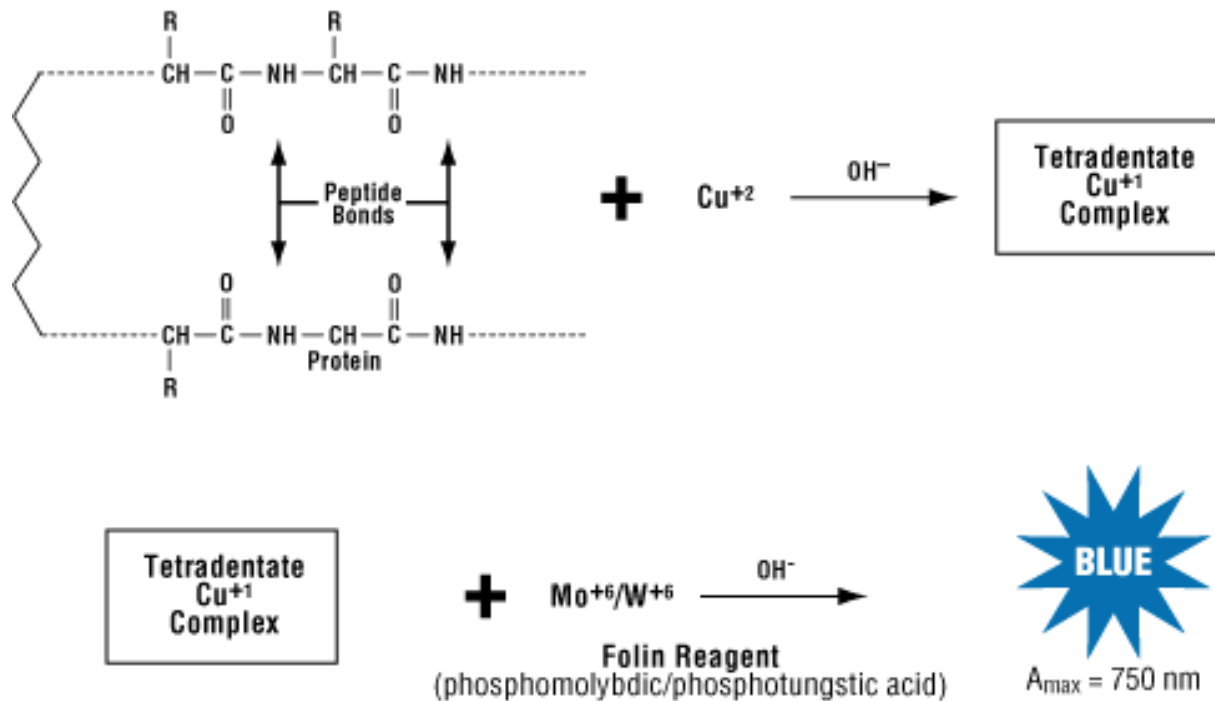
- Consiste nella reazione del biureto con una soluzione di solfato di rame, seguita dalla riduzione in condizioni alcaline del reagente di Folin-Ciocalteu (fosfomolibdato, sodiotungstato) e lo sviluppo di un colore blu
- Gli ioni di rame facilitano il processo di riduzione
- I gruppi cromogeni principali sono i legami peptidici complessati con rame (biureto) ed i molibdotungstati ridotti in gran parte da tirosina e triptofano
- Il prodotto della reazione, eteropolimolibdeno, ha una forte colorazione blu, con un massimo di assorbimento a circa 750 nm

METODO DI LOWRY

sensibilità: inferiore a 10 $\mu\text{g/ml}$

Tris e tamponi zwitterionici (PIPES, HEPES) interferiscono.

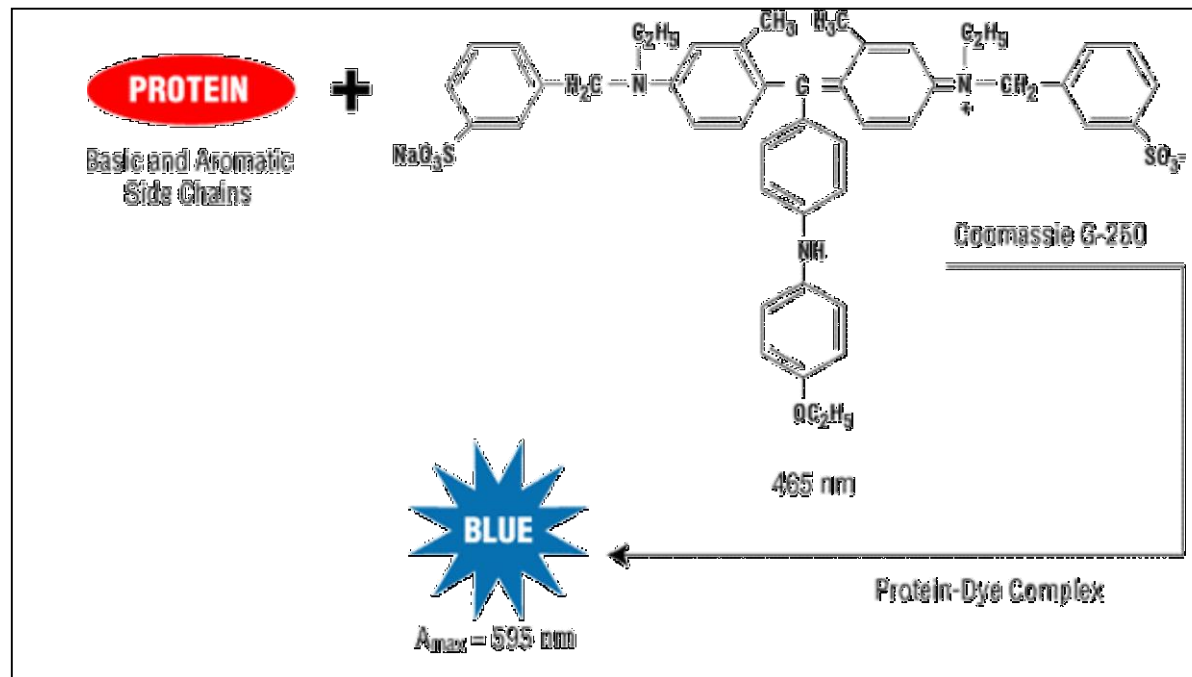
Si basa sulla reazione del Biureto dove i legami peptidici reagiscono con Cu^{++} che reagisce con il reagente di Folin. Il colore sviluppato dipende dal contenuto di tirosina e triptofano.



Reaction schematic for the Modified Lowry Protein Assay.

METODO DI BRADFORD

- Il legame del colorante *Coomassie Brilliant Blue G-250* alle proteine determina uno spostamento del massimo di assorbimento del colorante da 465 nm (rosso) a 595 nm (blu) in soluzioni acide (Bradford, 1976)
- Il colorante forma forti complessi non covalenti con le proteine tramite interazioni elettrostatiche con gruppi amminici e tramite forze di van der Waals
- Il colorante è preparato come soluzione *stock* in acido fosforico
- Il metodo è costituito da un unico passaggio in cui il colorante è aggiunto ai campioni e si determina l'assorbanza a 595 nm



Il colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 si lega primariamente a residui amminoacidici basici (specialmente arginina) e aromatici

In condizioni acide, il colorante è prevalentemente nella forma cationica doppiamente protonata rossa ($\lambda_{\max} = 470 \text{ nm}$). Quando il colorante lega le proteine è convertito nella forma stabile non protonata blue ($\lambda_{\max} = 595 \text{ nm}$).

La quantità di colorante che si lega è proporzionale alla quantità di proteina presente in soluzione.

Pertanto l'intensità del colore blu (e dunque l'assorbimento) è proporzionale alla concentrazione proteica.

In genere quantità uguali di proteine differenti legano la stessa quantità di colorante → **il saggio può essere dipendente dal tipo di proteina**