

LO STUDIO DELLE PROTEINE

- A. ISOLAMENTO:** Separazione della proteina dalla cellula o organismo di appartenenza: la proteina in oggetto viene recuperata insieme ad altre componenti cellulari (lipidi, metaboliti, altre proteine, acidi nucleici *et cetera*)

- B. PURIFICAZIONE:** separazione della proteina di interesse dai componenti cellulari di diversa natura chimica; separazione dalle altre proteine

- C. CARATTERIZZAZIONE:** determinazione del peso molecolare, della sequenza amminoacidica, della funzione biologica

A. ISOLAMENTO PROTEINE

OBIETTIVO: recuperare la proteina in forma solubile per poi poterla purificare (produrre un estratto grezzo**)**

**Tessuto vegetale o
animale**

Cellula batterica

**PROTEINE
ENDOCELLULARI**

**liquidi extracellulari
o brodo di coltura batterica**

**PROTEINE
ESOCELLULARI**

A. ISOLAMENTO PROTEINE

**PROTEINE
ENDOCELLULARI**



**Omogeneizzazione per la rottura
della cellula o del tessuto**



OMOGENATO CELLULARE



**Centrifugazione differenziale
(per separare le frazioni sub-cellulari)**

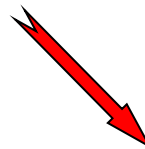
**PROTEINE
ESOCELLULARI**



Centrifugazione a bassi giri



**Brodo di coltura privo
delle cellule**



**Estratto grezzo
(proteina solubile)**

1. PROTEINE ENDOCELLULARI/TESSUTI

ROTTURA CELLULARE: Distruzione di **tessuti** o **cellule** per produrre un grezzo proteico sciolto in opportuno **tampone**, da sottoporre successivamente alla purificazione

Cellule

- Di mammifero ($\varnothing$ 10 μ m): poco rigide, si distruggono facilmente
- Vegetali ($\varnothing$ 100 μ m): parete cellulare rigida, rottura con forze taglienti
- Batteri ($\varnothing$ 1-4 μ m): parete cellulare molto rigida
- Funghi e lieviti: parete cellulare rigida

Tampone

- Forza ionica 0.1-0.2 M; pH 7.0-8.0
- Antiossidanti: β -mercaptoetanololo, ditiotreitolo, cisteina
- Inibitori di proteasi: per evitare la degradazione delle proteine
- Substrati e cofattori: per preservare le attività enzimatiche
- EDTA: per rimuovere ioni metallici
- PVP (polivinilpirrolidone): per allontanare i composti fenolici presenti nelle cellule vegetali
- NaN_3 : batteriostatico per la conservazione del tampone

1. PROTEINE ENDOCELLULARI

Metodi di rottura delle cellule

Metodi BLANDI

- **lisi per osmosi:** differenza di pressione osmotica tra l'ambiente intracellulare e quello extracellulare
- **digestione enzimatica:** lisozima (batteri), zimoliasi e liticasi (funghi, lieviti)
- **omogenizzatori:** potter o a lama, cellule di mammifero e cellule vegetali
- **solubilizzazione chimica:** con solventi organici (toluene o etile acetato) o detergenti (sodio dodecil solfato, SDS)
- **omogeneizzatori tipo potter:** lacerazione per frizione tra il pestello e le pareti di un contenitore cilindrico in vetro smeriglio

MODERATI

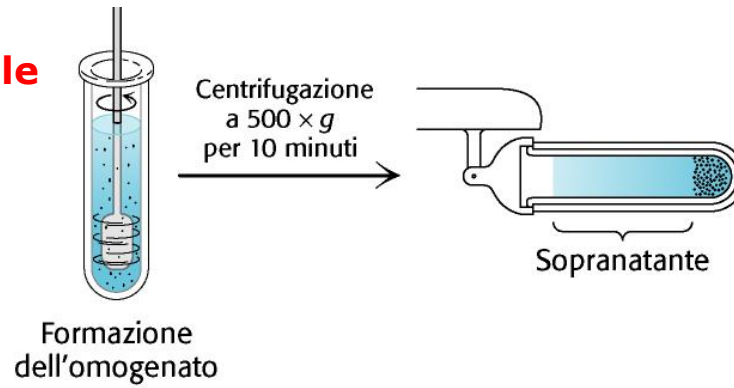
- **omogeneizzatori a lama:** lacerazione mediante forze taglienti (frullatori)
- **macinazione con mortaio:** lacerazione mediante forze frizionali
- **shock termico**

VIGOROSI

- **presse:** French Press, la rottura avviene a causa delle forze taglienti
- **macinazione con microsfele:** lacerazione mediante forze frizionali
- **sonicazione:** rottura grazie ad elevate pressioni locali indotte da onde sonore ad altissima frequenza (> 20 kHz)

1. PROTEINE ENDOCELLULARI

centrifugazione differenziale



1. PROTEINE ENDOCELLULARI

PROTEINE DI MEMBRANA

Dopo la rottura cellulare, vengono recuperate in modo differente a seconda che siano:

- Periferiche: si agisce mediante aumento della forza ionica (es. [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 od il sodio dodecilsolfato (SDS).

I detergenti (soprattutto quelli ionici come SDS o deossicolato) possono causare la denaturazione delle proteine quindi subito dopo il loro impiego devono essere rimossi (es. per dialisi)

PROTEINE CITOSOLICHE

Dopo la rottura cellulare, vengono recuperate mediante centrifugazione per allontanare altri componenti subcellulari

A. ISOLAMENTO PROTEINE

**PROTEINE
ENDOCELLULARI**



**Omogeneizzazione per la rottura
della cellula o del tessuto**



OMOGENATO CELLULARE



**Centrifugazione differenziale
(per separare le frazioni sub-cellulari)**

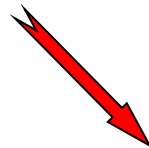
**PROTEINE
ESOCELLULARI**



Centrifugazione a bassi giri



**Brodo di coltura privo
delle cellule**



**Estratto grezzo
(proteina solubile)**

2. PROTEINE EXTRACELLULARI

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 da tessuti o di origine endocellulare (ovvero procedendo con le procedure di frazionamento)

A. ISOLAMENTO PROTEINE

**PROTEINE
ENDOCELLULARI**

**PROTEINE
ESOCELLULARI**



**Estratto grezzo
(proteina solubile)**



FRAZIONAMENTO



**Tecniche ad alta capacità e
bassa risoluzione**



**Tecniche a bassa capacità ed
alta risoluzione**



PROTEINA DI INTERESSE

PURIFICAZIONE



TRATTAMENTO DELL'ESTRATTO GREZZO

FRAZIONAMENTO PER PRECIPITAZIONE

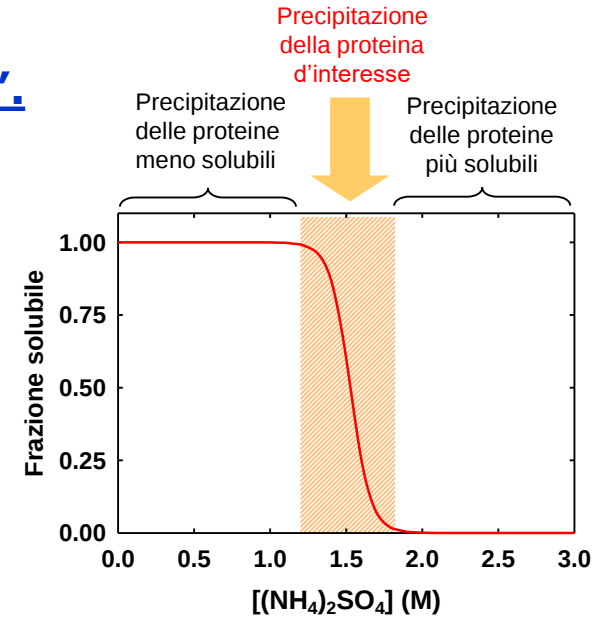
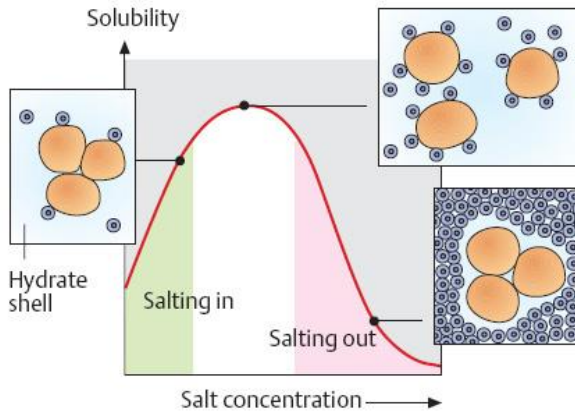
Le proteine vengono fatte precipitare variando uno dei seguenti parametri della soluzione che costituisce il grezzo di estrazione: forza ionica, polarità del solvente, temperatura o pH.

DIALISI o ULTRAFILTRAZIONE

Tecniche di purificazione che in genere vengono usate dopo la precipitazione con sali per allontanare questi ultimi

Frazionamento per precipitazione

• Concentrazione di sali (forza ionica): “salting out”.



Serie di Hofmeister

anioni: $\text{F}^- \approx \text{SO}_4^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{ClO}_3^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$

cationi: $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{ione guanidinio}$

“salting out”

“salting in”

Gli ioni di sale competono con le cariche elettriche presenti nelle proteine per le molecole di solvente, facilitando in tal modo l'aggregazione proteica sulla base delle interazioni tra residui idrofobici (interazioni idrofobiche)

Le proteine precipitano in ordine crescente di idrofobicità

Frazionamento per precipitazione

- Polarità del solvente

Si basa sulla differente solubilità delle proteine in soluzioni acquose contenenti solventi organici miscibili in acqua (etanolo, acetone). Il solvente abbassa la costante dielettrica e rimuove le molecole di H₂O dalla superficie della proteina: in tal modo sono favorite le interazioni elettrostatiche (anziché idrofobiche) proteina-proteina. L'effetto è simile al 'salting in'. Il problema con l'uso dei solventi organici è che si ha in genere un certo grado di denaturazione proteica.

- Temperatura

Si basa sulla differente temperatura di denaturazione di proteine, è utile quando si devono purificare proteine particolarmente termostabili. La gran parte delle altre proteine è eliminata per denaturazione termica riscaldando la miscela per 15-20' ad una temperatura di poco (5-10°C) inferiore alla temperatura di denaturazione della proteina d'interesse. Le proteine denaturate vengono poi eliminate tramite centrifugazione.

- pH

Si basa sulla diversa stabilità delle proteine al pH: ad esempio una proteina che è stabile a pH <3 o >10 si può separare da miscele complesse portando il pH a quei valori estremi ai quali avviene la denaturazione delle altre proteine.

A. ISOLAMENTO PROTEINE

**PROTEINE
ENDOCELLULARI**

**PROTEINE
ESOCELLULARI**



**Estratto grezzo
(proteina solubile)**



FRAZIONAMENTO



**Tecniche ad alta capacità e
bassa risoluzione**



**Tecniche a bassa capacità ed
alta risoluzione**



PROTEINA DI INTERESSE

PURIFICAZIONE



B. PURIFICAZIONE

La proteina di interesse, isolata dalla fonte di origine e presente in miscela complessa (associata ad altre proteine e biomolecole), dopo il frazionamento deve essere purificata ovvero separata dagli altri componenti per poter essere caratterizzata

- **Tecniche ad alta capacità e bassa risoluzione**

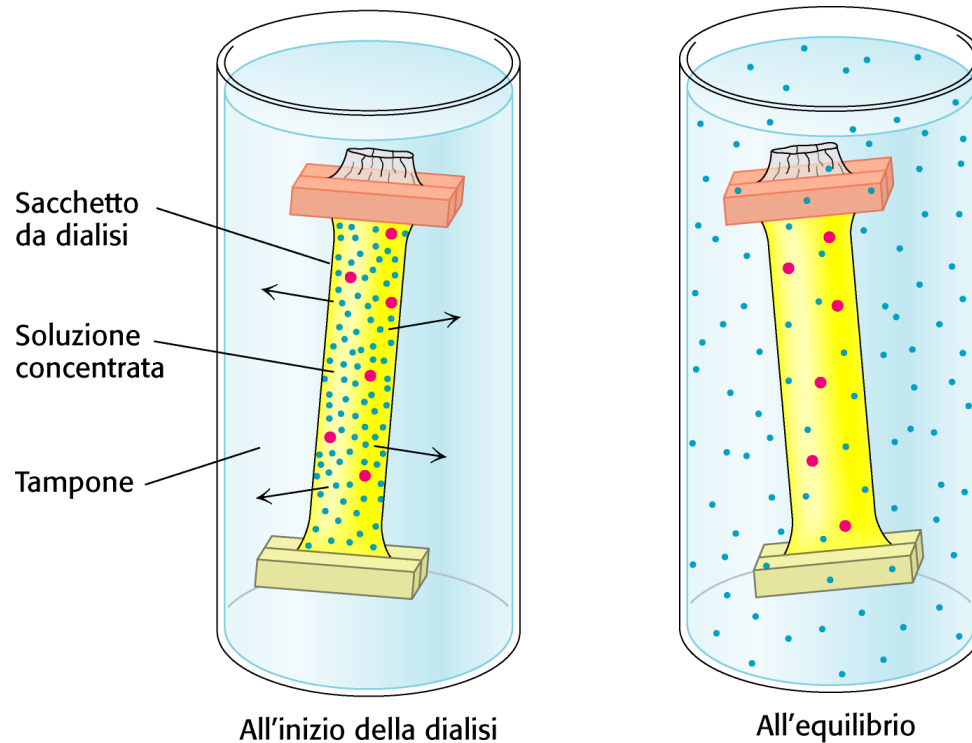
dialisi, ultrafiltrazione (differenze di peso molecolare)

- **Tecniche a bassa capacità e alta risoluzione**

cromatografia, elettroforesi (differenze di peso molecolare, idrofobicità, carica, affinità)

B. PURIFICAZIONE • Tecniche ad alta capacità e bassa risoluzione

• Dialisi



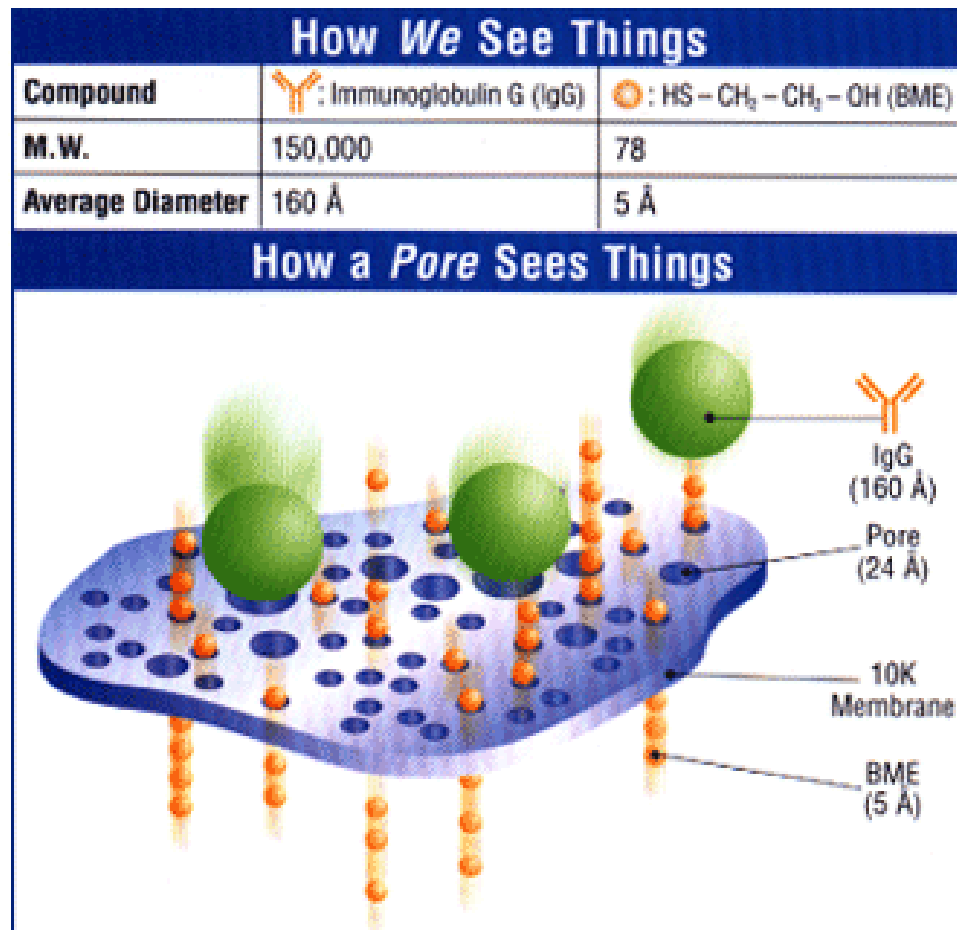
La dialisi consente di rimuovere molecole a basso peso molecolare quali ad esempio i sali: è difatti usata dopo trattamenti quali il "salting out" o per effettuare un cambio del tampone in cui è disciolta la proteina di interesse.

La membrana da dialisi è una membrana semipermeabile (tipicamente di cellulosa), ovvero dotata di pori di dimensione approssimativamente costante ('cut-off': dimensione delle molecole che attraversano il poro).

Nella pratica di laboratorio la membrana costituisce un tubo in cui è posta la miscela proteica; il tubo è immerso in un tampone in cui per osmosi passano sali o molecole di peso molto inferiore alla proteina o comunque inferiore al cut-off della membrana.

B. PURIFICAZIONE • Tecniche ad alta capacità e bassa risoluzione

• Dialisi



<http://www.coleparmer.com/>

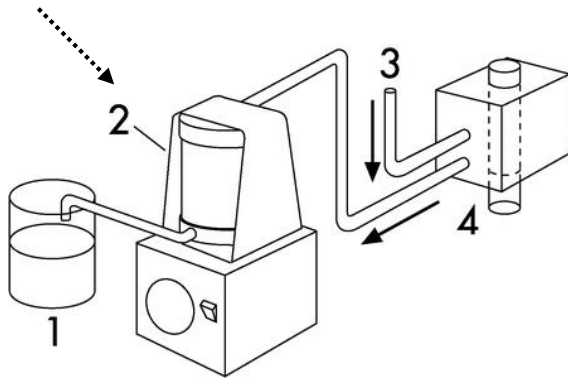
B. PURIFICAZIONE • Tecniche ad alta capacità e bassa risoluzione

• Ultrafiltrazione

E' utile per aumentare la concentrazione proteica di estratti grezzi, consente anche di rimuovere sali da miscele ottenute dopo "salting-out".

Il campione viene concentrato mediante ultrafiltrazione ovvero 'forzando' il passaggio della miscela proteica attraverso una membrana semipermeabile (in genere di polisulfonato o altri polimeri sintetici) molto simile a quella usata in dialisi (ovvero una membrana che viene attraversata da acqua e piccoli soluti ma non dalla proteina d'interesse).

La soluzione è posta in un contenitore sulla cui base si trova la membrana: il campione viene fatto passare attraverso i pori finissimi applicando una forte pressione sul liquido (N_2 a $P > p$ atmosferica) o mediante centrifugazione.



Sistema di ultrafiltrazione con cella ad agitazione magnetica.

- (1) ultrafiltrato
- (2) cella con campione concentrato
- (3) regolatore di pressione
- (4) gas compresso in entrata



Camera di caricamento

Membrana

Campione concentrato

Ultrafiltrato

campo centrifugo