

LO STUDIO DELLE PROTEINE

ISOLAMENTO → PURIFICAZIONE → CARATTERIZZAZIONE

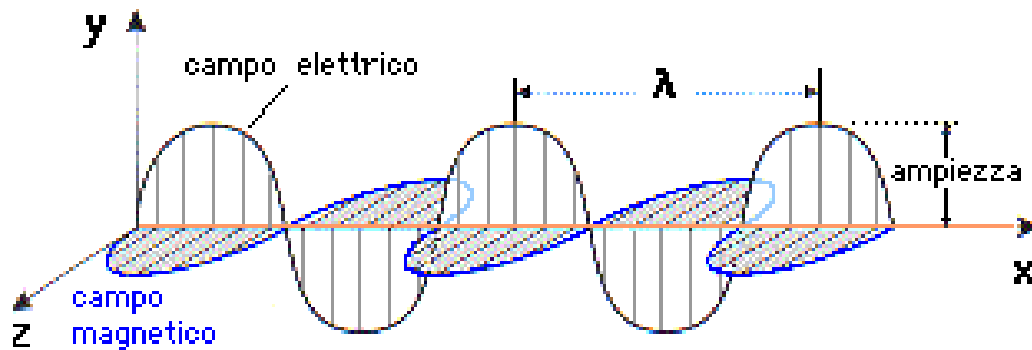
- Tecniche spettroscopiche (*UV-Vis*)
- Tecniche cromatografiche (*scambio ionico, setaccio molecolare, affinità*)
- Tecniche elettroforetiche (*SDS-PAGE, isoelettrofocusing*)
- Tecniche di spettrometria di massa

Tecniche spettroscopiche

Le tecniche spettroscopiche consentono di ottenere informazioni sulla struttura delle molecole e si basano sull'interazione tra la materia e la radiazione elettromagnetica.

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.



λ = **lunghezza d'onda** distanza tra un picco e quello successivo (lunghezza di un ciclo completo dell'onda) ($100 \text{ nm} = 1 \mu\text{m}$)

ν = **frequenza** ovvero numero di cicli per secondo (sec^{-1})

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

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

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.

Tecniche spettroscopiche

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

$$E = h \nu = h \frac{c}{\lambda}$$

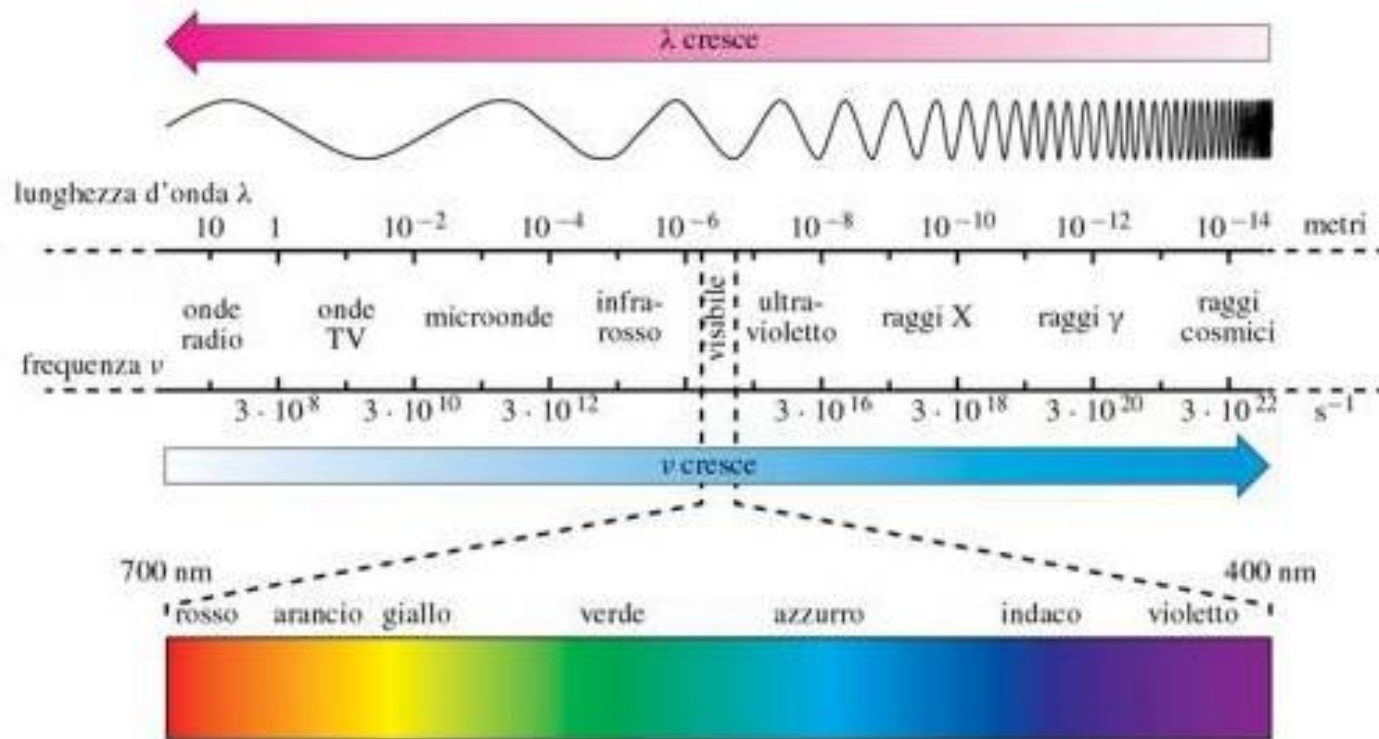
h = **costante di Planck** (6.62×10^{-34} Jsec)

c = **velocità** della luce nel vuoto (3×10^{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 λ .

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

Tecniche spettroscopiche



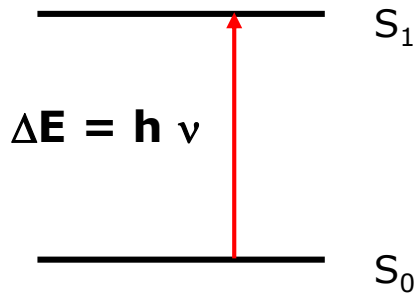
Lo spettro della radiazione elettromagnetica

I nostri occhi percepiscono la radiazione elettromagnetica di lunghezza d'onda compresa tra 700 nm (luce rossa) e 400 nm (luce violetta), chiamata **luce visibile**; la frequenza della luce visibile ne determina il colore. La luce bianca, che comprende quella solare, è una miscela di tutte le lunghezze d'onda della luce visibile.

Tecniche spettroscopiche

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.

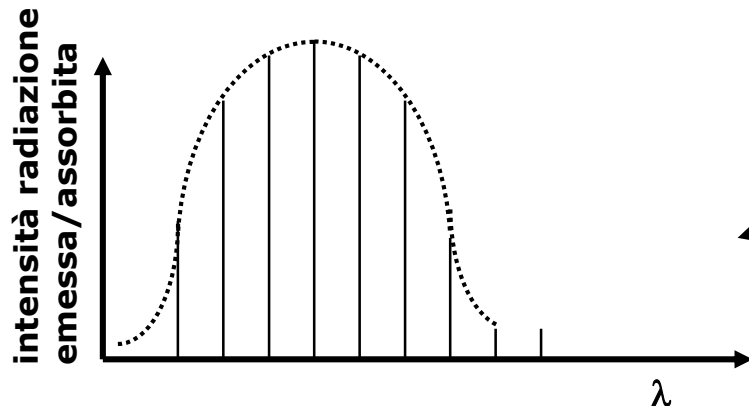
Da tali spettri si possono ottenere informazioni sia di carattere qualitativo (tipo di elemento, composto) che di tipo quantitativo (concentrazione delle specie analizzate).



La quantità di luce assorbita o emessa dalla materia sono quantizzate e comportano un passaggio da uno stato fondamentale (S_0) o eccitato (S_1) a seconda dei casi

assorbimento: si misura la perdita d'intensità della radiazione che attraversa il campione, al variare della λ

emissione: si registra l'intensità della radiazione emessa dal campione dopo l'irraggiamento al variare della λ della radiazione



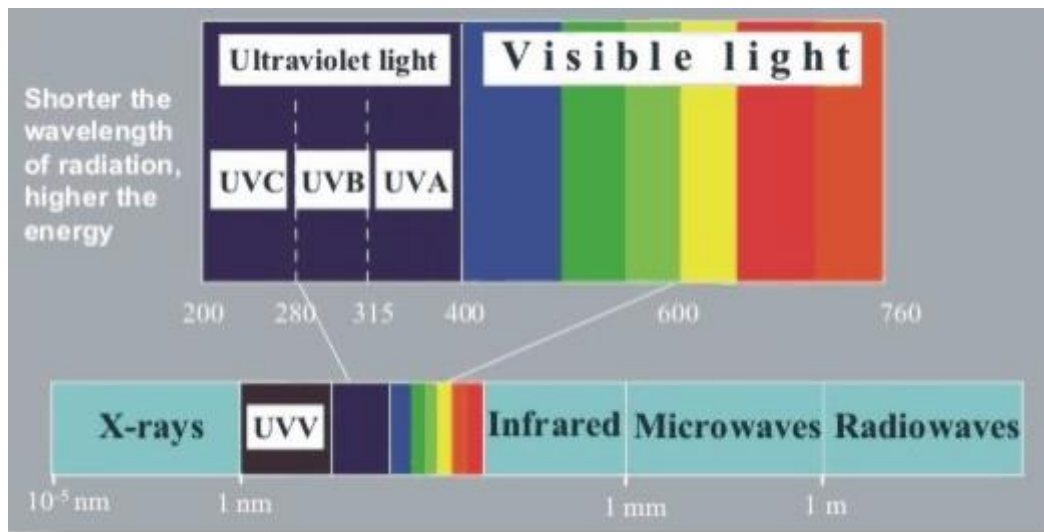
spettro di assorbimento o di emissione: rappresentazione schematica

Spettroscopia UV-Vis

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 200nm ai 750nm**.

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 λ più alte ed E minore) hanno elettroni più facilmente eccitabili di quelle che assorbono nella regione dell'UV che comprende radiazioni più energetiche.



raggi **UVC**: λ tra 280 e 100 nm

raggi **UVB**: λ tra 320 e 280 nm

raggi **UVA**: λ tra 400 e 320 nm

VIS λ da 400nm fino a 750nm circa

Spettroscopia UV-Vis

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** secondo cui:

$$A = \varepsilon \times l \times c$$

Legge di Lambert-Beer

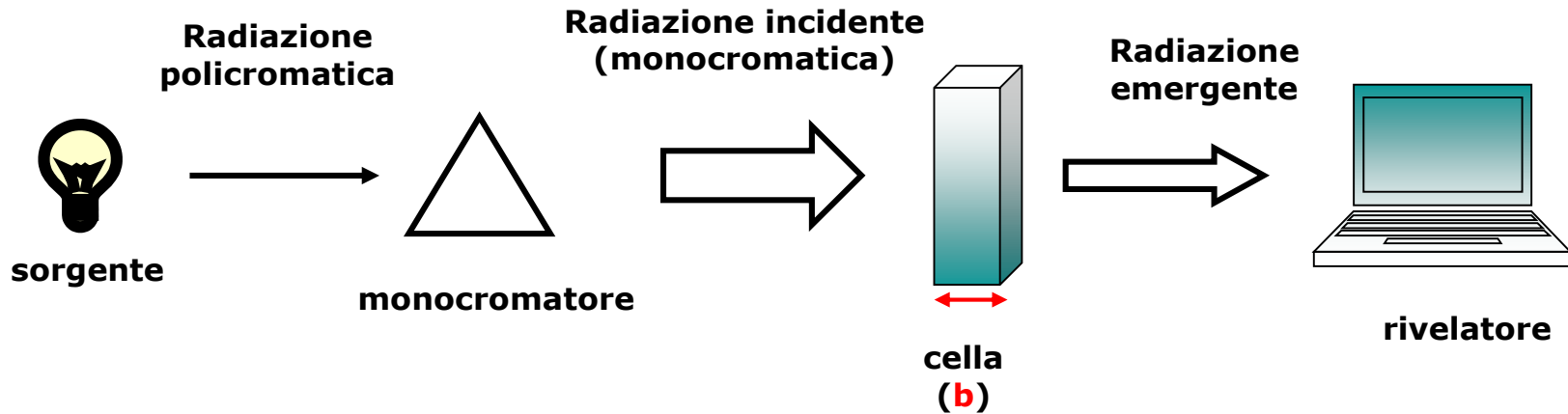
A è l'**assorbanza**, quantità direttamente proporzionale alla concentrazione delle specie in esame

$\varepsilon = a/2.303$ coefficiente di estinzione molare, assorbanza di una soluzione 1 M ($M^{-1}cm^{-1}$)

l = lunghezza cammino ottico

c = concentrazione molare della specie

Misura dell' assorbimento delle radiazioni nell'UV-Vis



Sorgente: lampade a filamento di tungsteno per il campo del visibile (da 930 nm a 330 nm) e lampade al deuterio per l'UV che emettono uno spettro continuo al di sotto dei 400 nm

Monocromatore: scompone la radiazione policromatica in bande monocromatiche

$$A = \varepsilon \times l \times c$$

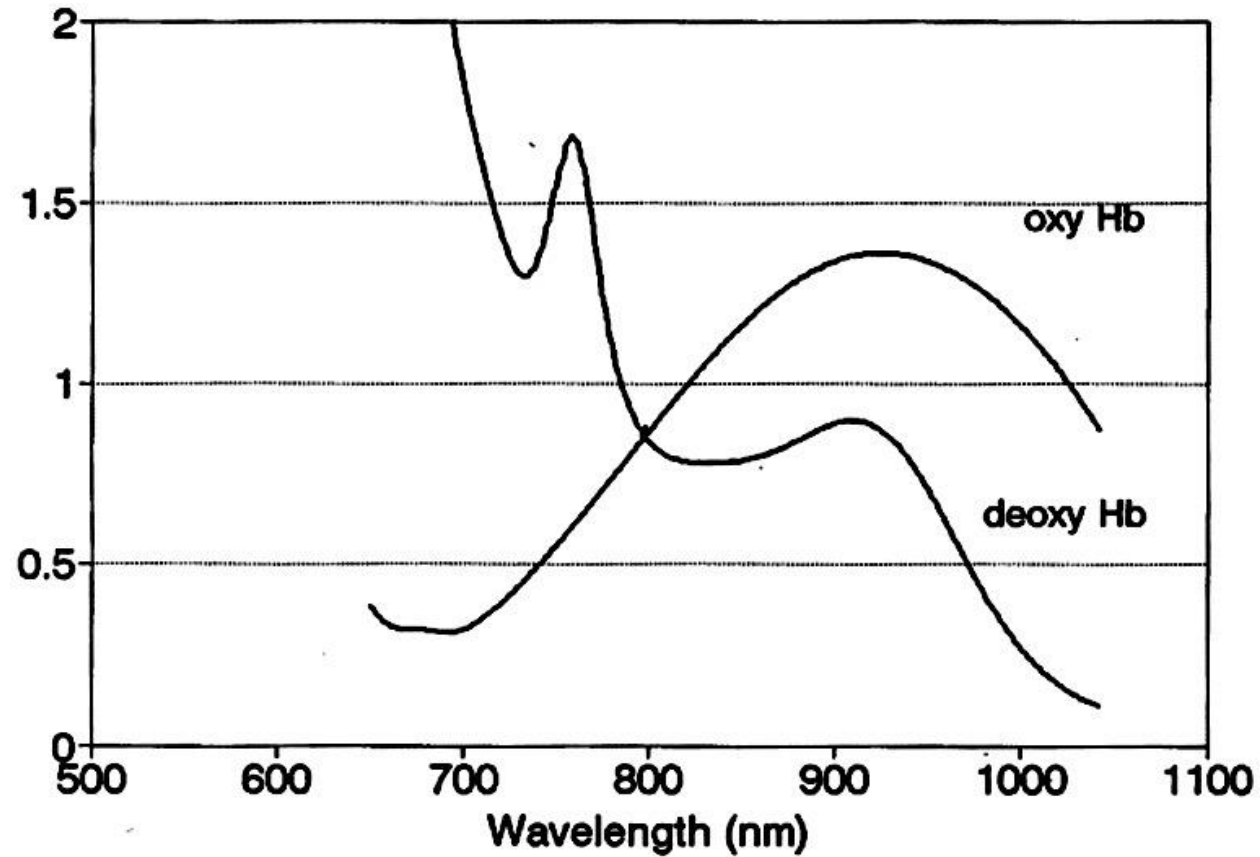
$$c = \frac{A}{\varepsilon \times l}$$

$$\Delta c = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times l}$$

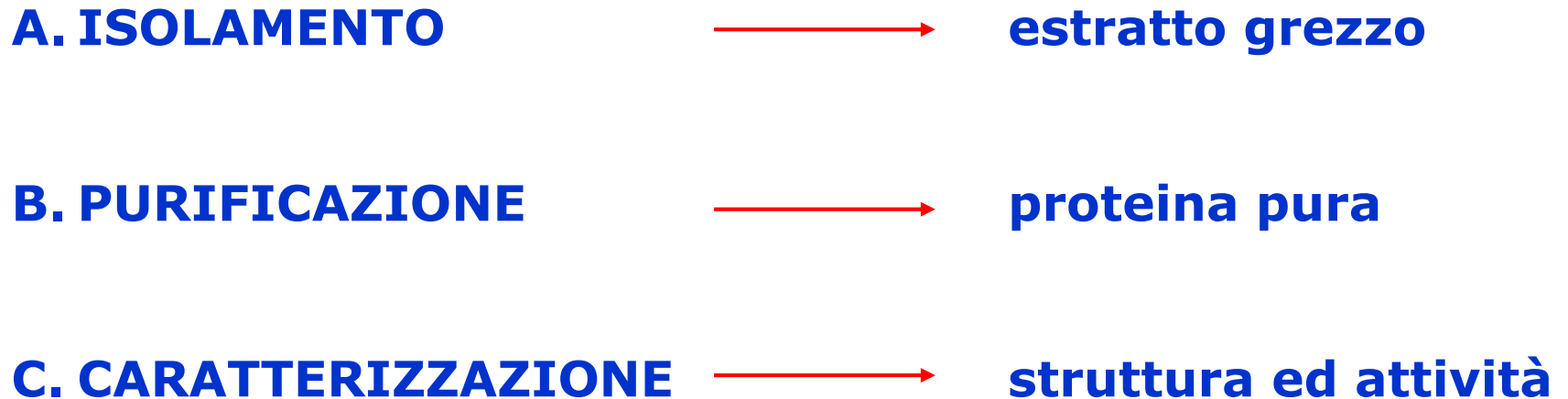
calcolo utile per i saggi di attività enzimatica!!

Spettroscopia UV-Vis

Spettro di assorbimento dell'emoglobina



LO STUDIO DELLE PROTEINE



FASI NELLO STUDIO DELLE PROTEINE

- Isolamento (rottura; centrifugazione)**
- Purificazione (frazionamento; cromatografia)**

L'andamento dell'isolamento e delle successive fasi di purificazione può essere seguito usando un metodo che consenta di:

- 1. Identificare la proteina di interesse fra tutte le altre proteine del campione di partenza**
- 2. Misurare la quantità della proteina di interesse e delle proteine totali nel campione**
- 3. Valutare la presenza di proteine contaminanti nel campione di interesse**

FASI NELLO STUDIO DELLE PROTEINE

Ad ogni passaggio della procedura di isolamento e purificazione si ottiene la separazione delle proteine totali presenti nel campione in una serie di frazioni (frazionamento).

Per ciascuna frazione è necessario determinare la quantità di proteine **totali** e la quantità della proteina **di interesse**.

La determinazione della proteina di interesse può essere effettuata sfruttando le proprietà biologiche della proteina stessa.

E' necessaria pertanto la messa a punto di un **SAGGIO BIOLOGICO**: se la proteina in oggetto è un enzima allora il saggio consisterà nella determinazione dell'attività enzimatica.

FASI NELLO STUDIO DELLE PROTEINE

- la determinazione della concentrazione proteica ed il dosaggio dell'attività enzimatica si basano su **metodi spettrofotometrici**
- metodi che sfruttano la capacità delle molecole (sia proteine che substrati di enzimi) di assorbire radiazioni elettromagnetiche nella regione dell'UV-Vis*

$$A = \varepsilon \times l \times c$$

Legge di Lambert e Beer

A: assorbanza (ad una data λ)

ε : coefficiente di estinzione molare [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$], assorbanza di una soluzione 1 M della sostanza in esame (ad una data λ)

l: lunghezza del cammino ottico [cm]

c: concentrazione molare della sostanza in esame

* vicino UV 200 – 350 nm; VIS = 350 – 700 nm

1. Determinazione della concentrazione proteica totale

- Assorbimento della luce ultravioletta a 280nm

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

Dipende dalla presenza degli amminoacidi aromatici (Tyr, Phe e Trp) però soffre dell'interferenza degli acidi nucleici che a 280nm assorbono 10 volte in più: correzione a 260nm per sottrarne il contributo.

Metodo non distruttivo, utile per piccole quantità di proteina.

- Metodo di Lowry (Folin-Ciocalteu)

La soluzione proteica è trattata con il reattivo di Folin (soluzione di sali sodici di tungstato, molibdato e fosfato) ed una soluzione di ioni Cu^{2+}

colore blu-porpora: $A_{660\text{nm}}$

Lo sviluppo di colore è dovuto alla reazione del rame con i residui aromatici. Il saggio richiede circa 130 min per essere completato.

La concentrazione proteica si deduce per confronto con opportune rette di taratura ricavate dosando soluzioni a titolo noto di proteine standard.

1. Determinazione della concentrazione proteica totale

- **Metodo di Bradford o del Coomassie Brilliant Blue**

Il colorante Coomassie Brilliant Blue ha un massimo di assorbanza a 470 nm che si sposta a 595 nm quando viene aggiunto ad una soluzione proteica. Il colorante si lega specificatamente a residui di arginina, triptofano, tirosina, istidina e fenilalanina.

La concentrazione proteica si deduce per confronto con opportune rette di taratura ricavate dosando soluzioni a titolo noto di proteine standard (BSA*).

Questo metodo è molto popolare perché semplice, rapido (12 min), economico e sensibile.

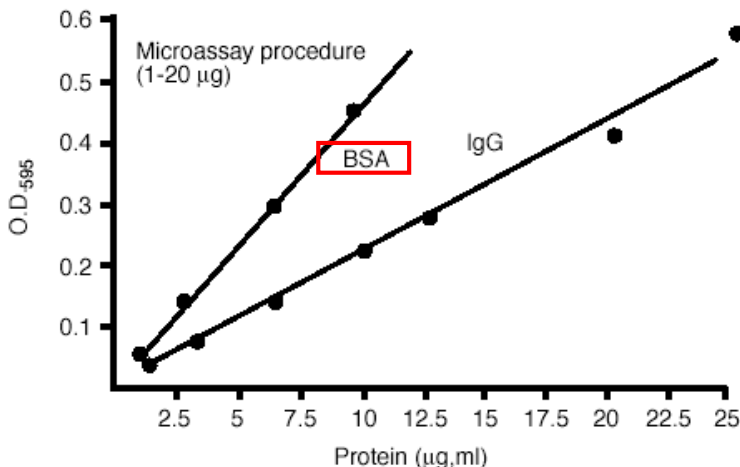
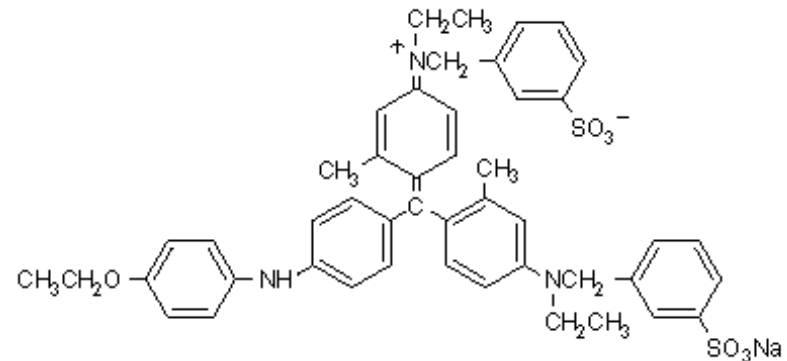


Fig. 2. Typical standard curve for the Bio-Rad Protein Microassay (1-20 $\mu\text{g/ml}$), bovine gamma globulin (standard I), bovine serum albumin (standard II). O.D.₅₉₅ corrected for blank. 1.25-25 $\mu\text{g/ml} \times 0.8 \text{ ml} = 1-20 \mu\text{g}$ protein.

* BSA = Bovine Serum Albumin



Coomassie Brilliant Blue

$$\lambda_{\text{MAX}} = 470\text{nm}$$

2. SAGGIO BIOLOGICO: determinazione della proteina di interesse

Il saggio biologico consente di identificare e quantificare la proteina di interesse fra tutte le altre proteine presenti nel campione di partenza

Il saggio deve essere eseguibile rapidamente su molti campioni

Il saggio deve indicare in maniera affidabile la quantità della proteina desiderata presente ai vari stadi di purificazione

Il saggio deve essere eseguibile con una piccola quantità di campione proteico

2. SAGGIO BIOLOGICO: determinazione di un enzima

attività enzimatica: determinazione della concentrazione di un enzima in termini della sua attività catalitica

Unità di misura dell'attività enzimatica: Unità internazionale (U)

1 U: quantità di enzima che trasforma 1 μ 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

Metodi di dosaggio dell'attività enzimatica

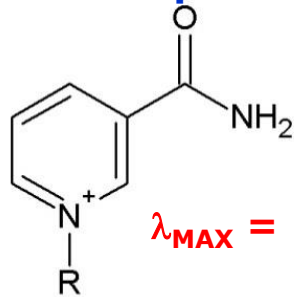
• Spettrofotometrici, Spettrofluorimetrici, In luminescenza, Radioisotopici, Immunochimici, et cetera

2. SAGGIO BIOLOGICO: determinazione della proteina di interesse attività enzimatica (metodi diretti)

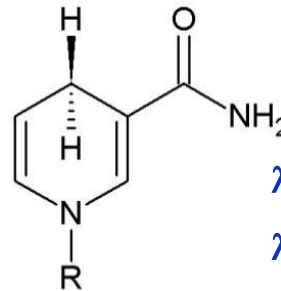
•Metodi spettrofotometrici per il dosaggio dell'attività enzimatica

Sfruttano la capacità dei substrati o dei prodotti di assorbire radiazioni UV-Vis

ESEMPIO: Deidrogenasi NAD⁺ dipendenti



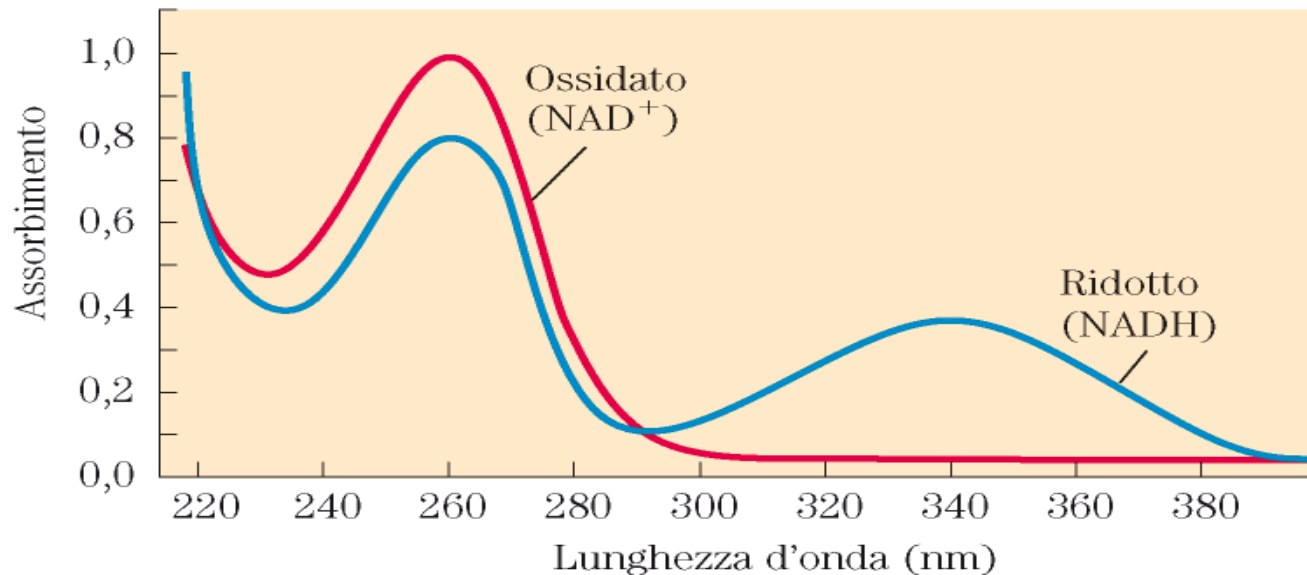
$\lambda_{\text{MAX}} = 260\text{nm}$



$\lambda_{\text{MAX}} = 260\text{nm}$

$\lambda_{\text{MAX}} = 340\text{nm}$

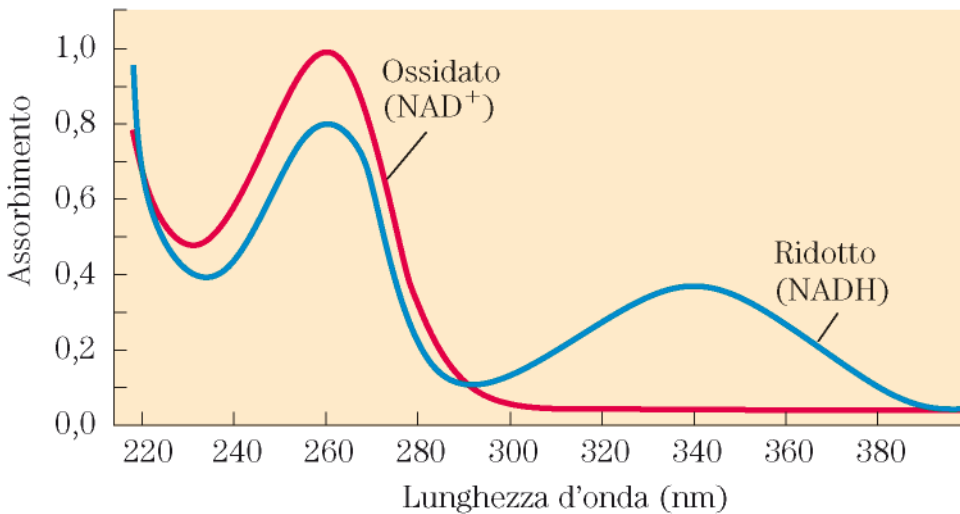
Spettro dell'assorbimento della luce ultravioletta delle due forme del coenzima



2. SAGGIO BIOLOGICO: determinazione della proteina di interesse attività enzimatica (metodi diretti)

•Metodi spettrofotometrici per il dosaggio dell'attività enzimatica

ESEMPIO: Deidrogenasi NAD⁺ dipendenti



Il dosaggio dell'attività enzimatica viene effettuato valutando la quantità di NADH (Δc) prodotto in un minuto

ovvero

Valutando l'incremento dell'assorbanza (ΔA) a 340nm (valore di λ al quale si registra un massimo di assorbimento del NADH)

$$A = \varepsilon \times l \times c$$

$$\Delta A = A_{1\text{minuto}} - A_0 \quad \longrightarrow \quad \Delta c = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times l}$$

$$\text{Unità} = \Delta c / \text{min} = \left(\frac{\Delta A_{340\text{nm}}}{\varepsilon \times l} \right) / \text{min}$$

LA PURIFICAZIONE DI UN ENZIMA

•Ad ogni stadio della procedura di purificazione si ottiene una frazione per la quale è necessario calcolare:

$$\times \text{ ATTIVITA' RELATIVA} = \frac{\text{U di proteina di interesse}}{\text{ml di soluzione proteica}}$$

$$\times \text{ ATTIVITA' SPECIFICA} = \frac{\text{U di proteina di interesse}}{\text{mg di proteine totali}}$$

$$\times \text{ RESA} = \frac{\text{quantità (mg o U) di proteina di interesse}}{\text{quantità (mg o U) di prot. di int. nella fraz. iniziale}}$$

LA PURIFICAZIONE DI UN ENZIMA

- Ad ogni stadio della procedura di purificazione si ottiene una frazione**
- Per ogni frazione (o stadio della purificazione) è necessario determinare sia la quantità di proteine totali che le unità di attività enzimatica della proteina di interesse**
- nel corso di una purificazione ottimale ad ogni stadio la resa diminuisce e l'attività specifica aumenta**

LA PURIFICAZIONE DI UN ENZIMA

Costruzione della tabella di purificazione di un enzima

Stadio della purificazione	proteine totali (mg)	attività totale (U)	attività specifica (U/mg)	resa (%)	Grado di purezza
-----------------------------------	---------------------------------	--------------------------------	--------------------------------------	---------------------	-------------------------

PURIFICAZIONE



proteina pura

Grado di purezza richiesto per la proteina in esame

Dipende dagli scopi per cui si è effettuato l'isolamento

IMPIEGO	Grado di purezza
uso terapeutico, studi in vivo	Molto alto >99%
studi di carattere strutturale (cristallografia, caratterizzazione chimico-fisica)	Alto 95-99%
antigene per anticorpo, sequenziamento N-terminale, studi cinetici	Moderato <95%
preparazione di enzimi per usi industriali	~ 50%

LO STUDIO DELLE PROTEINE

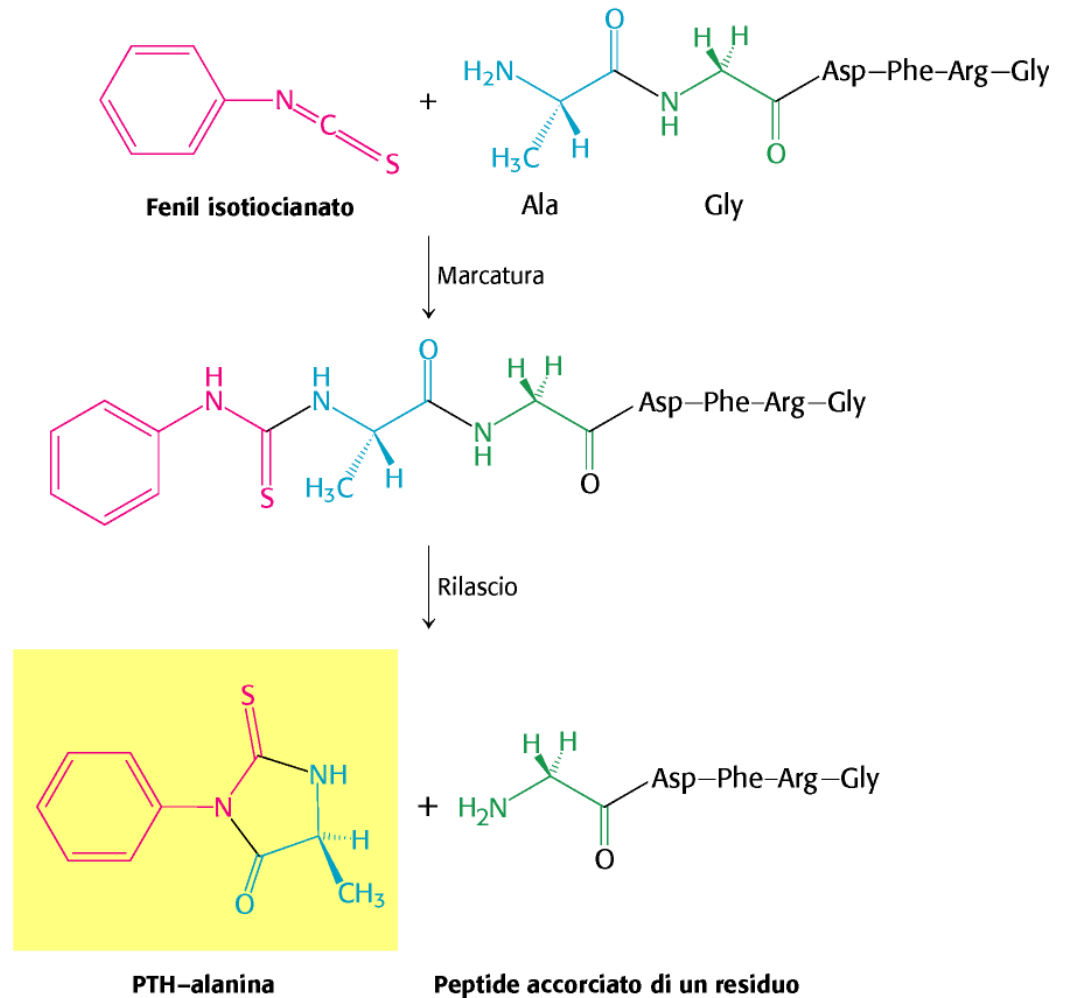
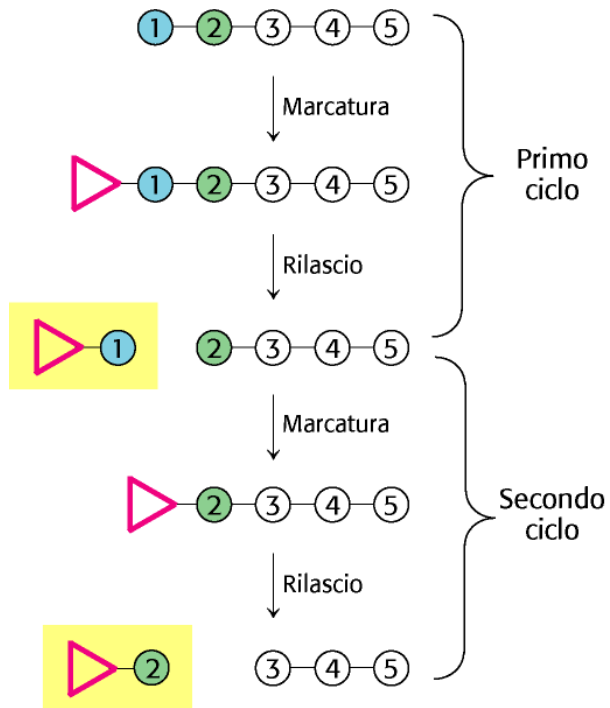
A. ISOLAMENTO  **estratto grezzo**

B. PURIFICAZIONE  **proteina pura**

C. CARATTERIZZAZIONE  **struttura ed attività**

Determinazione della sequenza primaria

DEGRADAZIONE DI EDMAN



**Efficiente fino a sequenze di 50 amminoacidi:
sequenza parziale all'N-terminale**

Determinazione della sequenza primaria

**Degradazione di EDMAN:
sequenza all'N-terminale**



Banca dati

Se già nota → identificazione

**Se incognita
→ sequenziamento
dell'intera proteina**

Determinazione della sequenza primaria

sequenziamento dell'intera proteina



Determinazione della sequenza primaria

sequenziamento dell'intera proteina

•SPETTROMETRIA DI MASSA

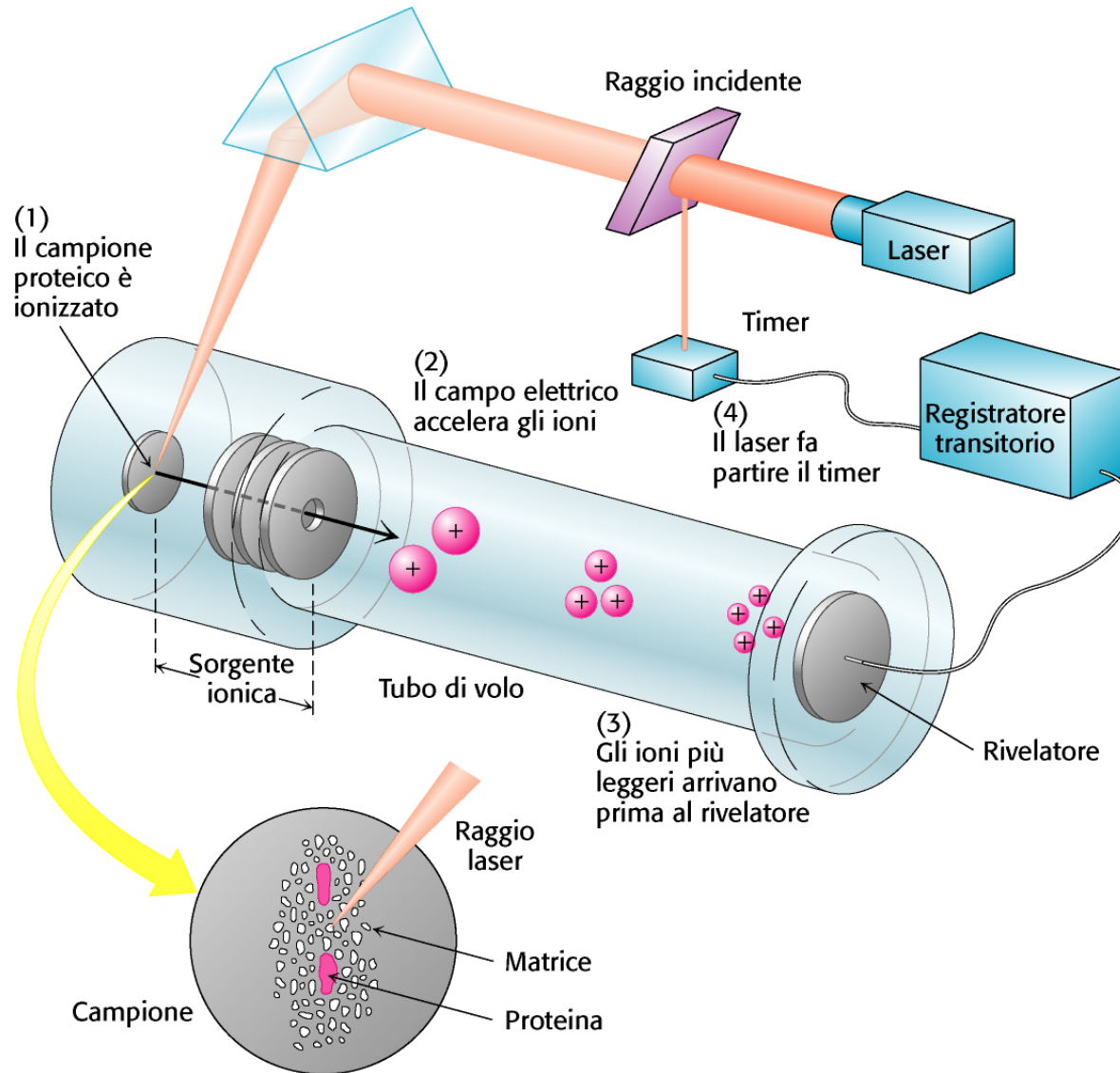
La spettrometria di massa è una tecnica strumentale analitica che consente di identificare e sequenziare (determinare la struttura primaria) le proteine

La spettrometria di massa separa ed identifica particelle ionizzate in base al loro rapporto carica/massa

Le moderne tecniche di ionizzazione (MALDI, ESI) hanno permesso l'applicazione della spettrometria di massa allo studio delle proteine in particolare per ciò che concerne il sequenziamento

Il sequenziamento viene effettuato dal confronto dell'analisi del pattern di frammentazione ottenuto sperimentalmente ed i dati riportati in banca dati: i singoli pepetidi ottenuti per digestione chimica o enzimatica sono identificati sulla base della loro massa

SPETTROMETRIA DI MASSA: MALDI



MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

Determinazione della sequenza primaria

sequenziamento dell'intera proteina

