

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

CONTENUTI DEL CORSO

- Principali tecniche per la purificazione e la caratterizzazione di proteine ed enzimi
- Esempi di utilizzo di enzimi per il monitoraggio ambientale
- Esempi di utilizzo degli enzimi per la salvaguardia dell'ambiente

CONTENUTI DEL CORSO

- **Principali tecniche per la purificazione e la caratterizzazione di proteine ed enzimi**
 - Cromatografie
 - Elettroforesi
 - Metodi immunochimici
 - Dosaggio delle proteine
 - Saggi enzimatici
 - Determinazione massa molecolare; numero e peso molecolare delle subunità
 - Analisi conformazionali
 - Spettrometria di massa (MS)

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

- Omogeneizzazione e frazionamento del tessuto e/o della cellula
- Centrifugazione
- Separazione delle proteine da acidi nucleici, lipidi, et cetera
- Separazione della proteina di interesse: 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

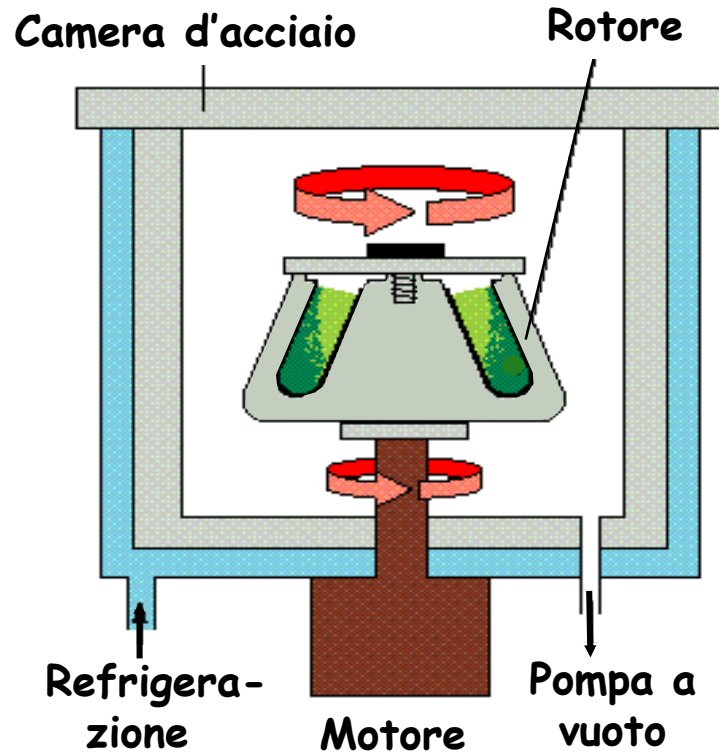


La particolare geometria dei provettoni assicura la circolazione uniforme del prodotto durante la rotazione del pestello.

OMOGENEIZZATORI OMNI MIXER

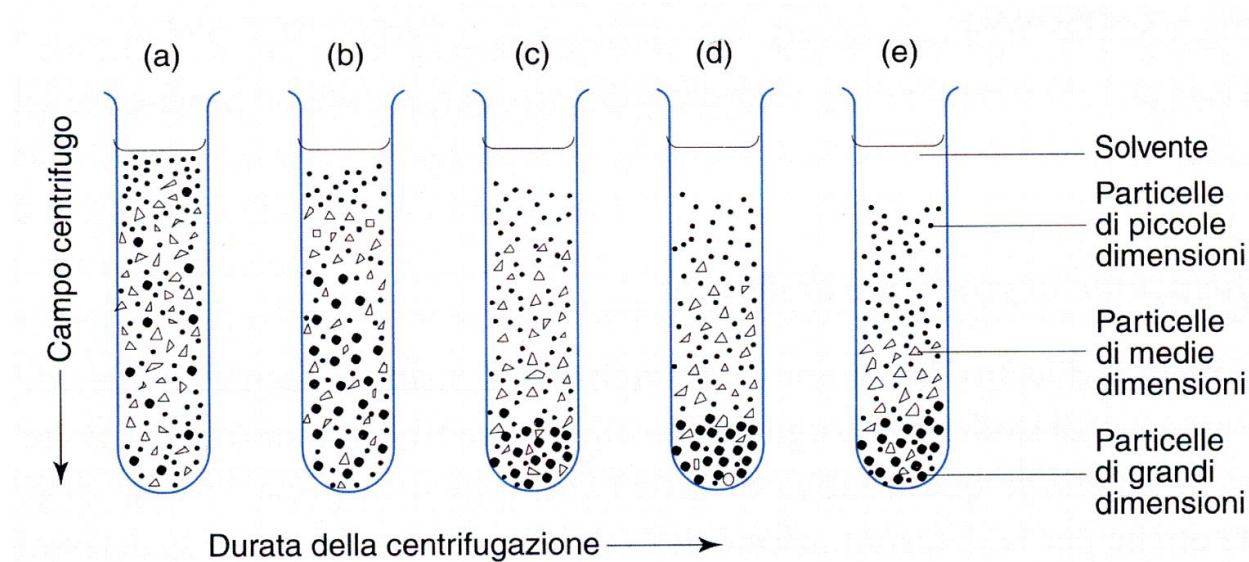


2) Centrifugazione



Metodi di separazione nella centrifugazione preparativa

• Centrifugazione differenziale



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

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

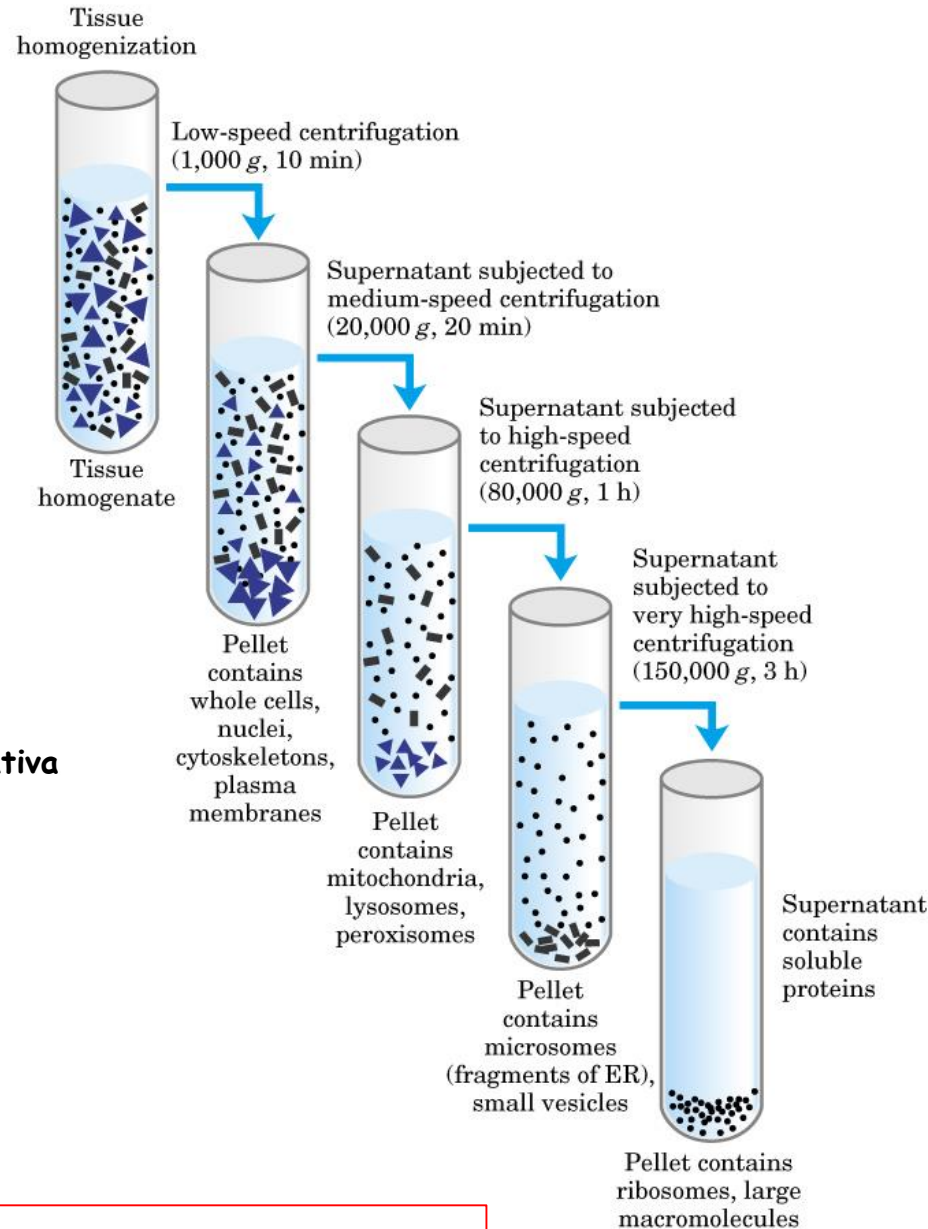
r = distanza radiale
 ω = velocità angolare

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

Purificazione delle proteine: centrifugazione

Centrifugazione differenziale

RCF = Forza centrifuga relativa

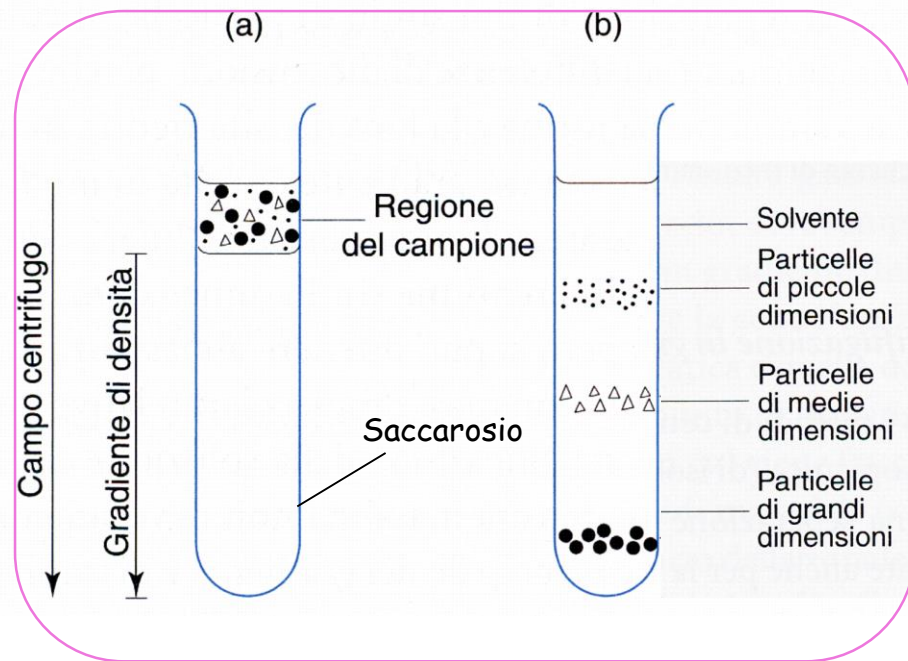


Purificazione delle proteine: centrifugazione

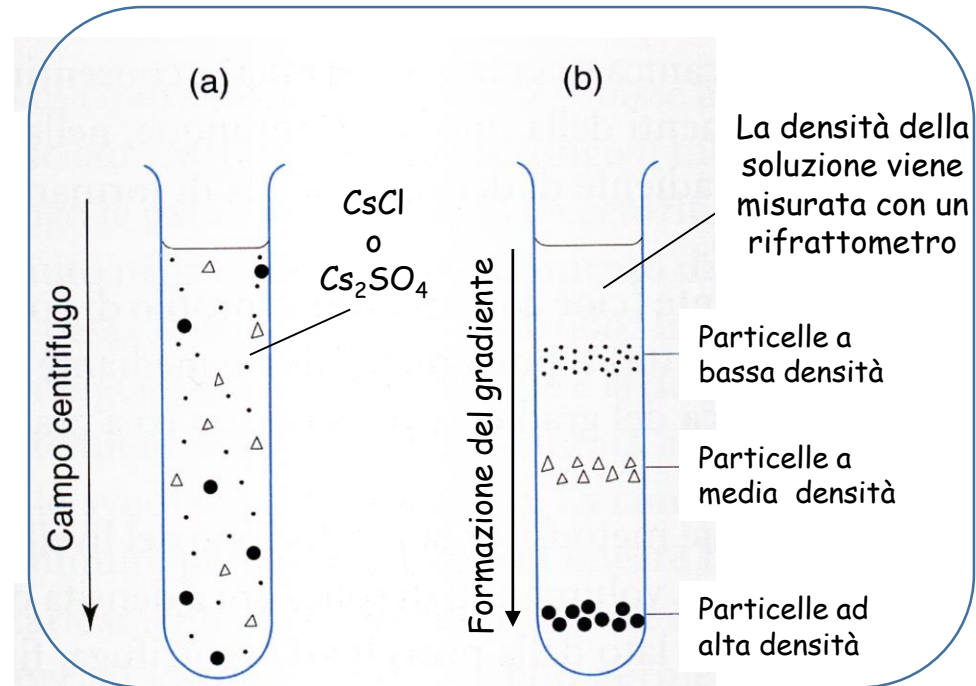
Metodi di separazione nella centrifugazione preparativa

• Centrifugazione in gradiente di densità

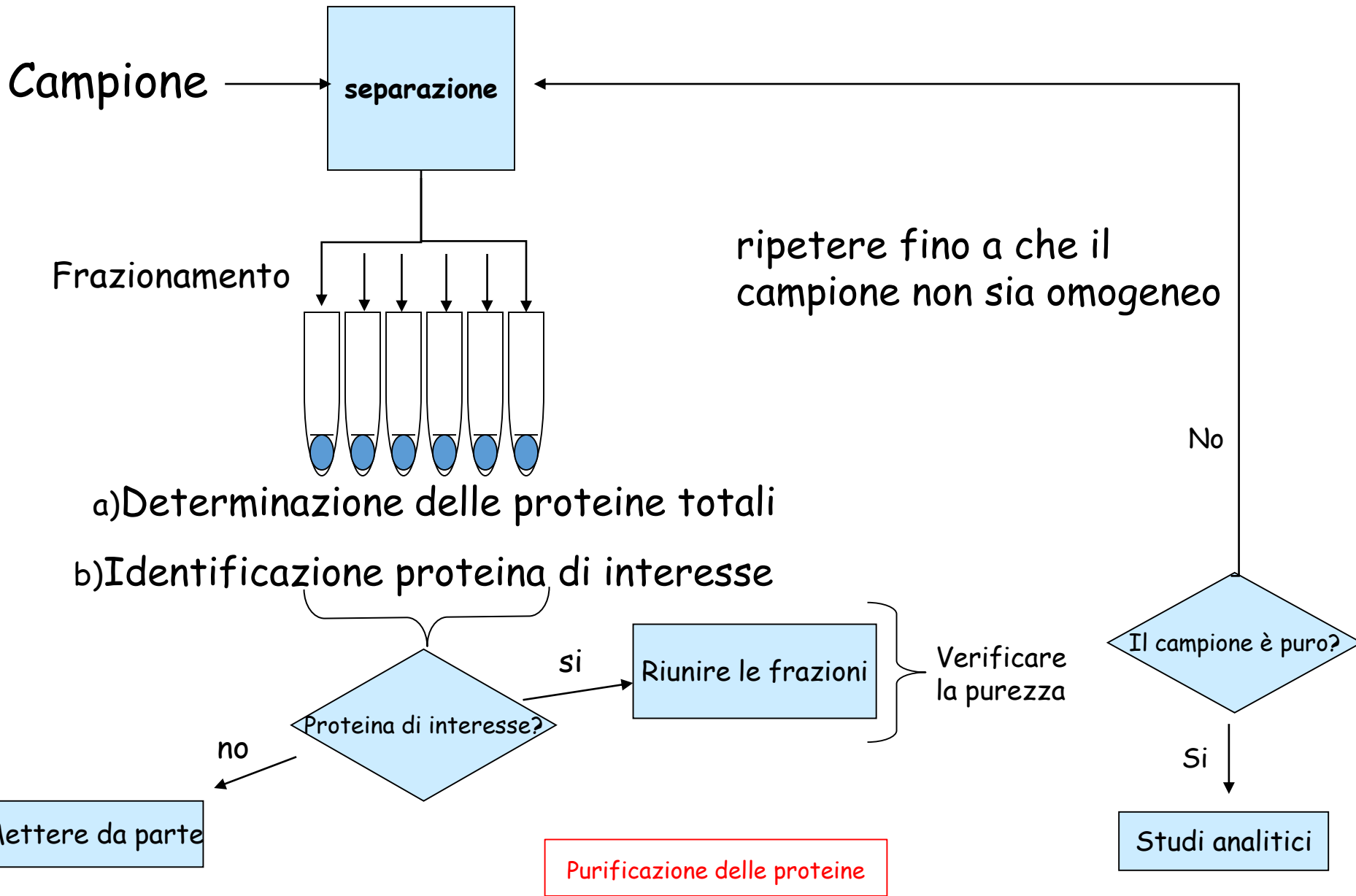
➤ Centrifugazione zonale (separa in base alle dimensioni delle particelle)



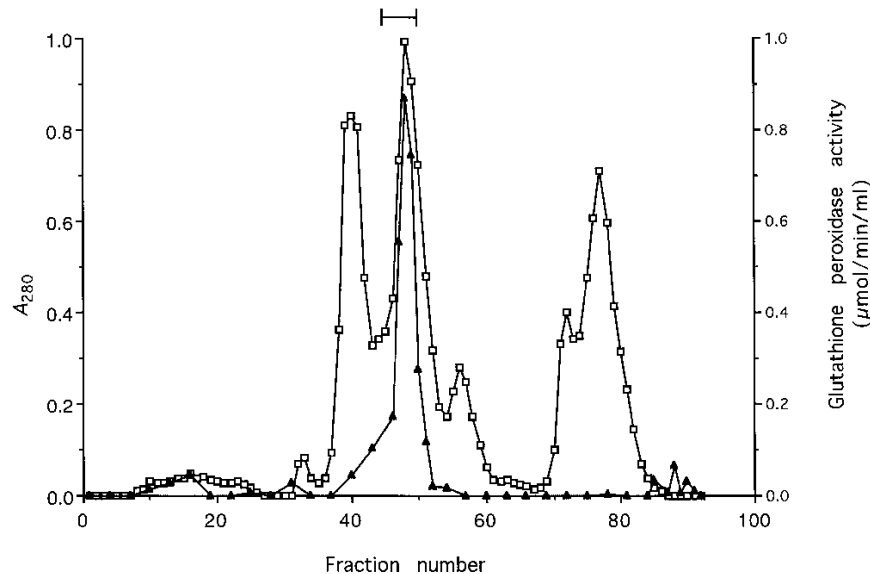
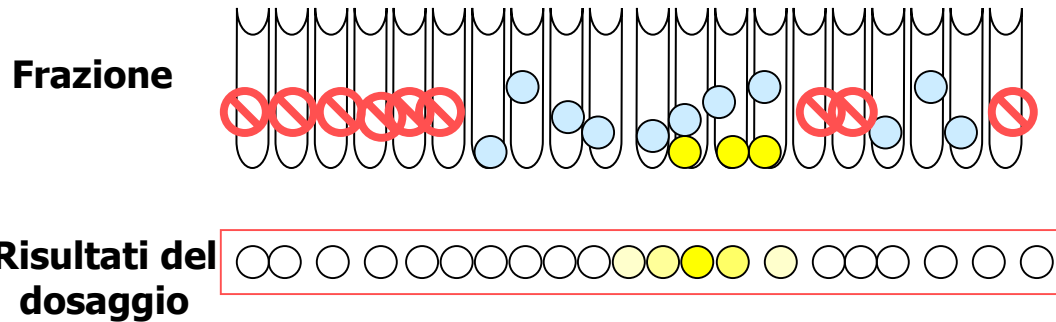
➤ Centrifugazione in gradiente di densità all'equilibrio o isopichnica (separa in base alla densità delle macromolecole)



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.

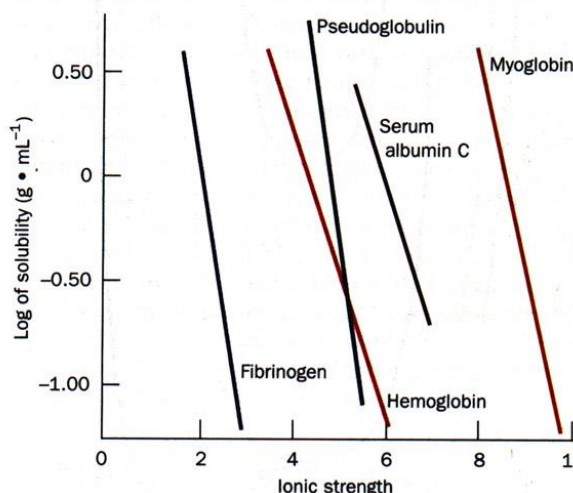


Figure 5-2
Solubilities of several proteins in ammonium sulfate solutions. [After Cohn, E. J. and Edsall, J. T., *Proteins, Amino Acids and Peptides*, p. 602, Academic Press (1943).]

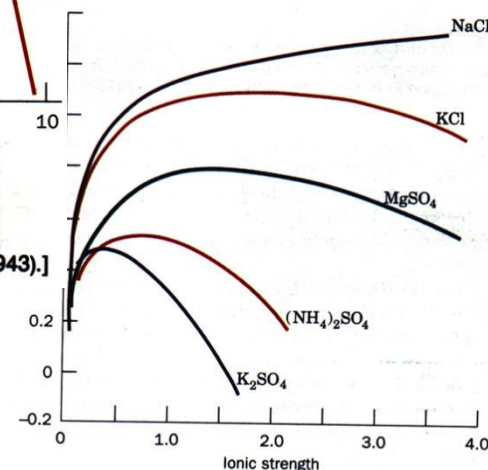


Figure 5-3
Solubility of carboxy-hemoglobin at its isoelectric point as a function of ionic strength and ion type. Here S and S' are, respectively, the solubilities of the protein in the salt solution and in pure water. The logarithm of their ratios is plotted so that the solubility curves can be placed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

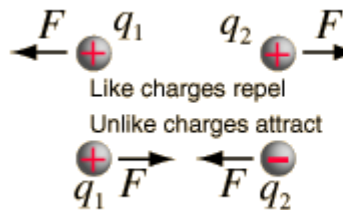
3) Solubilità delle proteine

Precipitazione in solventi organici

Coulomb's Law

Like charges repel, unlike charges attract.

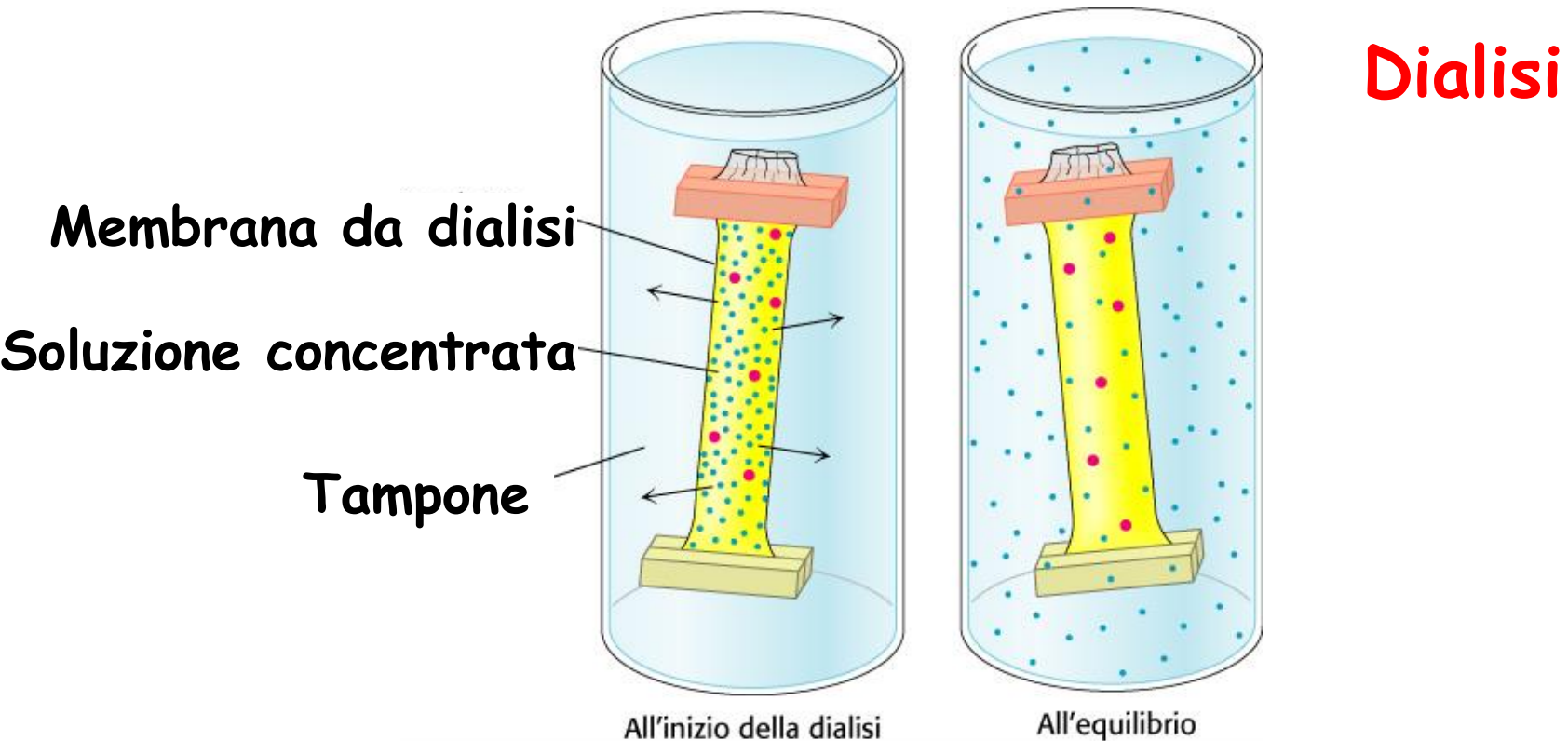
The electric force acting on a point charge q_1 as a result of the presence of a second point charge q_2 is given by Coulomb's Law:



The diagram shows two scenarios of point charges q_1 and q_2 . In the top scenario, both charges are positive (indicated by a '+' sign in a red circle). Arrows labeled F point away from each other, indicating repulsion. In the bottom scenario, q_1 is positive and q_2 is negative (indicated by a '-' sign in a red circle). Arrows labeled F point towards each other, indicating attraction. Text labels 'Like charges repel' and 'Unlike charges attract' are placed between the two diagrams.

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

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

