

Giorgio Sartor

Tecniche analitiche in un Laboratorio di Biochimica

Copyright © 2001-2008 by Giorgio Sartor.
All rights reserved.

Versione 4.1 - may 2008

Laboratorio di Biochimica

- Strategia di separazione di proteine
- Tecniche separative
 - Centrifugazione
 - Cromatografia
 - Elettroforesi
- Tecniche analitiche
 - Cromatografia
 - Elettroforesi
 - Blotting
 - Spettrofotometria

Perché volete purificare una proteina?

- Per studi strutturali
 - Diffrazione raggi-X, NMR, altre tecniche spettroscopiche
- Preparare anticorpi
- Analisi di sequenza
- Studi funzionali
- Per venderla...

Strategia

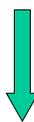
- La strategia di purificazione di una proteina dipende dallo scopo che ha la purificazione.
- Si dovrà valutare:
 - **In quale quantità la proteina dovrà essere purificata:**
 - Cristallografia raggi-X >10 mg
 - Studi strutturali 1-10 mg
 - Anticorpi 0.2-0.5 mg
 - Sequenziamento o spettrometria di massa - circa 1 pmol (50 ng per una proteina da 50 kDa)
 - **Con quale grado di purezza si intende ottenerla:**
 - Niente altro determinabile (pura al SDS-PAGE e all'HPLC)
 - Nessun contaminante con la stessa attività
 - Una banda sola sul gel
 - **Se in forma nativa o denaturata;**
 - **Quanto tempo e quante risorse si intende investire?**

Quali risultati devono essere raggiunti

- Considerando una purificazione *SDS-gel grade*
 - La proteina è al 10% del totale del vostro materiale di partenza
 - Si deve arricchire di 10 volte
 - La proteina è al 0.1% del totale del vostro materiale di partenza
 - Si deve arricchire di 1000 volte
- Quindi:
 - Fare un esame di coscienza sulle capacità del proprio laboratorio,
 - Scegliere la “sorgente” più opportuna.

Le fasi di una purificazione

- Scegliere il metodo di saggio
- Scegliere il materiale di partenza
- Procedere al frazionamento
 - Omogenato
 - Procedere alla solubilizzazione
 - ...
 - Procedere alla purificazione
 - Proteina purificata
- Concentrare se è il caso
- Scegliere il metodo di conservazione



Ricerca bibliografica

- Moltissimo è disponibile nella bibliografia specifica.
 - Enzimologia:
 - <http://www.brenda-enzymes.info/>
 - Bibliografia:
 - <http://www.pubmed.org>
 - Struttura proteine:
 - <http://www.rcsb.org>
 - Metabolismo:
 - <http://www.genome.ad.jp/kegg/>

Metodo di saggio

- Come deve essere:
 - Il più possibile **specifico**
 - Deve poter distinguere tra cose diverse
 - Il più possibile **sensibile**
 - Deve poter determinare la minore quantità possibile
 - Il più possibile **rapido**
 - Poco costoso
- Quale può essere:
 - Attività enzimatica
 - Analisi delle dimensioni
 - Attività immunologica
 - Marcatura (radioattiva o fluorescente)

Attività specifica

- Viene definita come l'attività (enzimatica) per unità di proteina (in peso).
- Viene espressa come *Quantità di prodotto (o di reagente consumato) (in moli o g) · (unità di tempo)⁻¹ · (unità di peso della proteina)⁻¹*
- Per esempio:
 - $U \cdot mg^{-1}$, dove le U(nità) possono essere, per esempio, nmoli di reagente consumato per minuto.

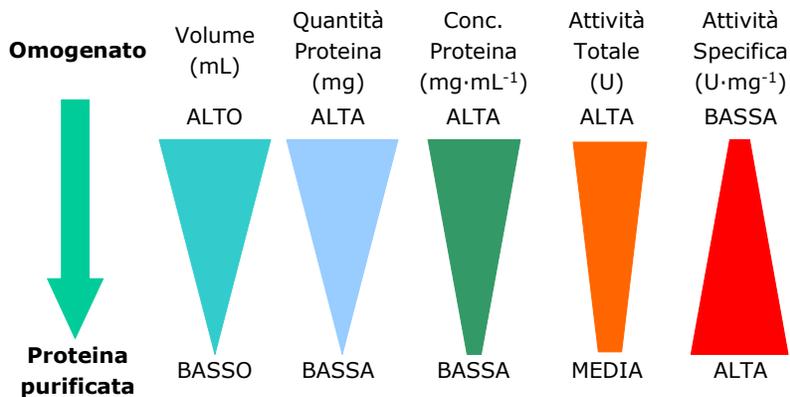
v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

9

Attività specifica

- In un buon processo di separazione l'attività specifica cresce.



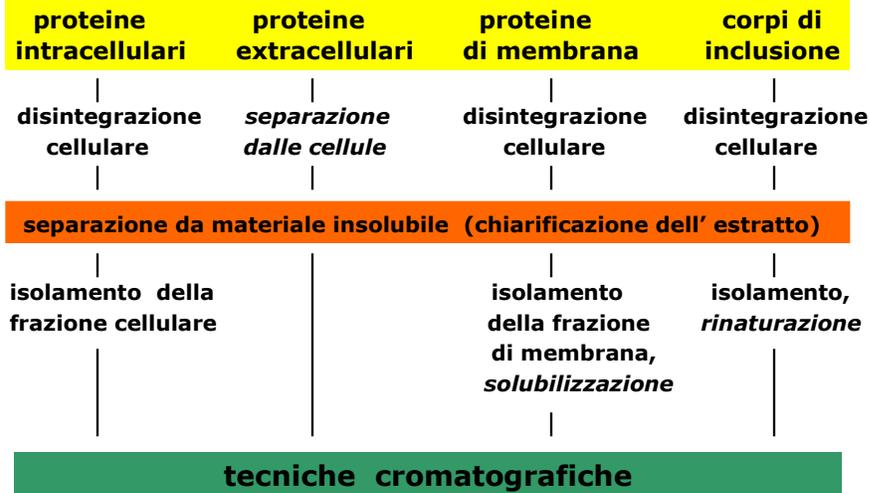
v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

10

Solubilizzazione della proteina e sviluppo dei passaggi di purificazione

TEMPO, TEMPERATURA, ANTI-PROTEASI



v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

11

Materiale di partenza

- Organismo, organo o tessuto con abbondante proteina
- Iperespressione in un sistema opportuno
 - Batteri (*Escherichia coli*...)
 - Lieviti

v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

12

Disintegrazione cellulare

- Shock osmotico (globuli rossi in acqua),
- Congelamento/scongelamento,
- Digestione chimica o enzimatica della parete cellulare (lisozima, chitinasi, ecc.)
- Solubilizzazione chimica,
- Metodi meccanici
 - Omogeneizzazione
 - Cavitazione (French press, sonicazione)

Sistemi meccanici

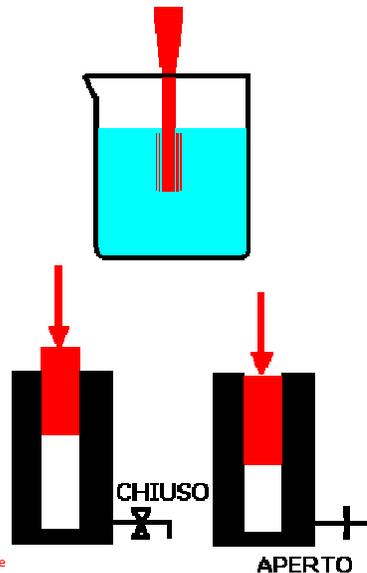


(1) (2)

- Omogeneizzatore di Potter-Envehjeim
 - La rottura del tessuto avviene a seguito della rotazione del pestello di Teflon® (1) all'interno del tubo di vetro (2) a causa del piccolissimo gioco tra il pestello e la parete di vetro.

Sistemi meccanici basati sulla cavitazione

- Producono cavità all'interno del liquido
- Sonicazione
 - Effetto di cavitazione dovuto agli ultrasuoni (10.000-15.000 Hz).
- French Press
 - Sistema pneumatico per portare la pressione sul liquido fino a circa 100 Atm,
 - Viene quindi aperto il rubinetto e il liquido si decomprime,
 - Effetto di cavitazione.



v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

15

Isolamento di proteine

- Metodo
 - Precipitazione
 - Cromatografia
 - Gel filtration
 - Scambio ionico
 - Affinità
- Proprietà
 - Solubilità
 - Interazione con matrice
 - Massa (Volume)
 - Carica
 - Legame specifico

v.4.1 © gsartor 2001-2008

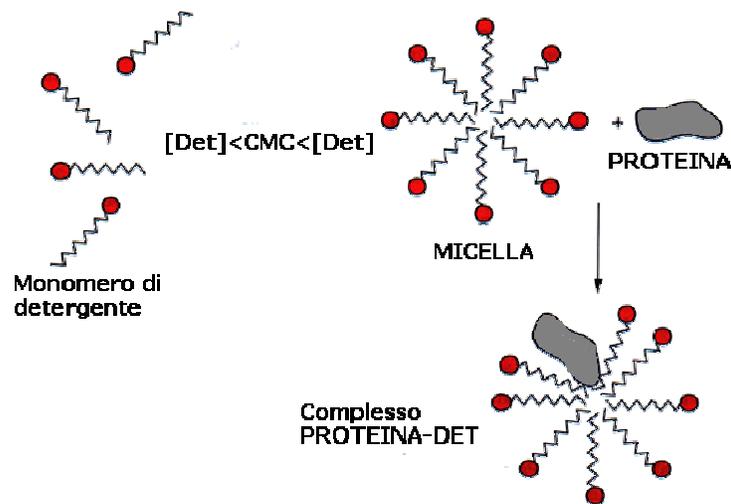
Tecniche analitiche

16

Precipitazione

- Diversa **solubilità** tra varie proteine in diverse condizioni
 - Usato per grossi volumi di omogenato
 - Esempio: etanolo e acido per estrarre insulina dal pancreas (le altre proteine precipitano)
- Variazione di pH: le proteine sono meno solubili al loro pI
- Variazione di forza ionica (Salting-in/Salting-out)
 - Il Salting-out con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (o K_3PO_4) rimuove l'acqua dalle superfici idrofobiche.
 - Le proteine aggregano tra loro.

Solubilizzazione con detergente



Centrifugazione

Una centrifuga è usata per separare particelle subcellulari e, in alcuni casi macromolecole che si separano in base a:

- Dimensione
- Densità
- Forma

Metodo:

- Viene sfruttata la differenza di densità tra le particelle ed il mezzo in cui sono sospese
- Alle sospensioni viene applicato un **campo gravitazionale artificiale** attraverso la rotazione ad alta velocità (Campo centrifugo).

Campo centrifugo

- Il campo centrifugo (G) è dato da:

$$G = \omega^2 r$$

- Dove ω è la velocità di rotazione espressa in radianti·s⁻¹
 r è la distanza dall'asse di rotazione.
- La velocità di rotazione si può esprimere in giri·min⁻¹ (RPM):

$$\omega = \frac{2\pi \cdot RPM}{60}$$

- Il campo centrifugo viene quindi definito come:

$$G = \frac{4\pi^2 \cdot (RPM)^2}{3600} \cdot r$$

Campo centrifugo relativo

- In genere il campo centrifugo viene espresso come *campo centrifugo relativo* (RCF) come multiplo della costante gravitazionale ($980 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-2}$):

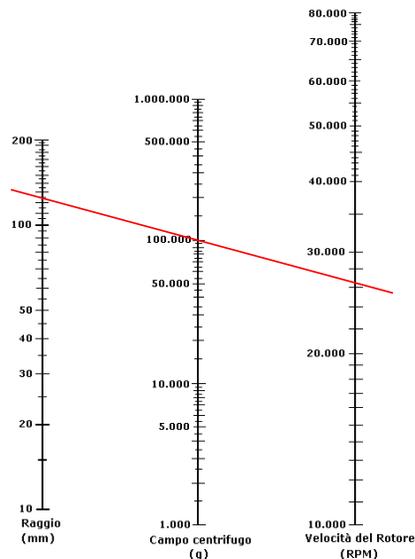
$$RCF = \frac{4\pi^2 \cdot (RPM)^2}{3600 \times 980} \cdot r$$

- Che diventa:

$$RCF = 1.11 \times 10^{-5} \cdot (RPM)^2 \cdot r$$

Nomogramma

- È quindi semplice convertire un campo centrifugo relativo ottenuto attraverso una centrifugazione effettuata con un rotore che ha un raggio definito (r) ad una certa velocità di rotazione (RPM) con un'altra centrifuga ed un altro rotore.



Velocità di sedimentazione

- La velocità di sedimentazione di una particella sferica dipende, oltre che dal campo gravitazionale anche da altri parametri attraverso la legge di Stokes:

$$v = \frac{2}{9} \cdot \frac{r_p^2 \cdot (\rho_p - \rho_m)}{\eta} \cdot g$$

Velocità di sedimentazione della particella

Raggio della particella

Densità della particella

Densità del mezzo

Costante per una sfera

Viscosità del mezzo

Campo gravitazionale

v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

23

Velocità di sedimentazione

- Se una particella ha una densità uguale a quella del mezzo:

$$\rho_p = \rho_m$$
$$\rho_p - \rho_m = 0$$
$$v = 0$$

- Non vi è sedimentazione.

v.4.1 © gsartor 2001-2008

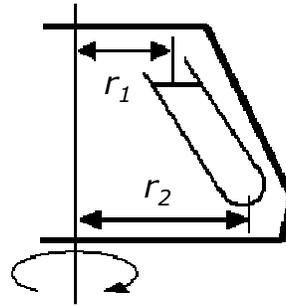
Tecniche analitiche

24

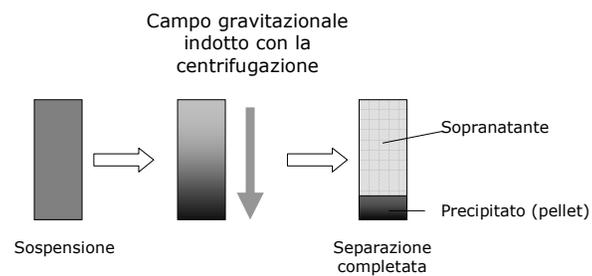
Tempo di sedimentazione

- Il tempo di sedimentazione si ottiene attraverso l'integrazione della legge di Stokes tra due raggi:
 - r_1 = raggio di rotazione alla superficie e
 - r_2 = raggio di rotazione al fondo

$$t = \frac{9}{2} \cdot \frac{\eta}{\omega^2 \cdot r_p^2 \cdot (\rho_p - \rho_m)} \cdot \ln \frac{r_2}{r_1}$$



Il principio della centrifugazione



Centrifughe



- Centrifuga da banco



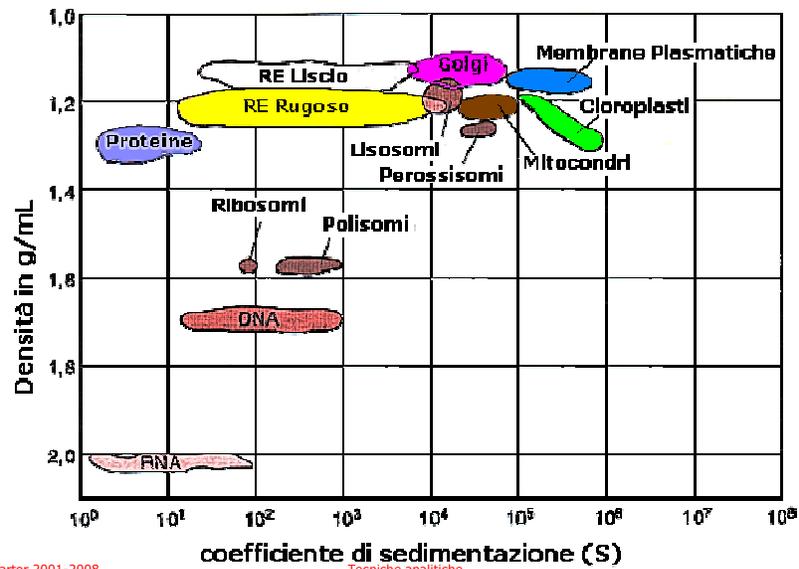
- Ultracentrifuga

v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

27

Coefficiente di sedimentazione



v.4.1 © gsartor 2001-2008

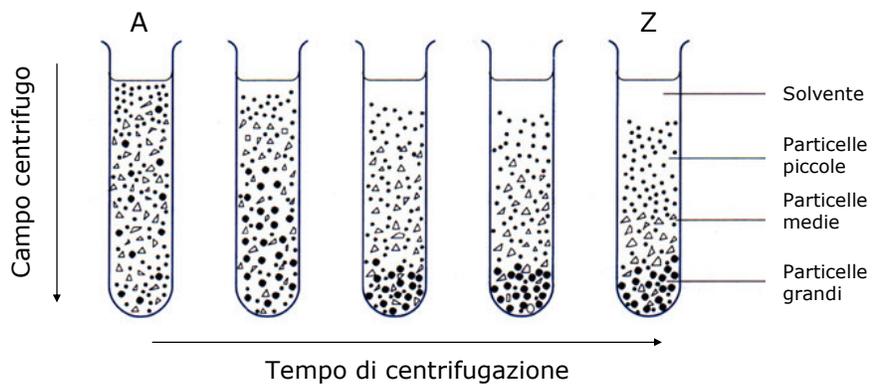
Tecniche analitiche

28

Tecniche di centrifugazione

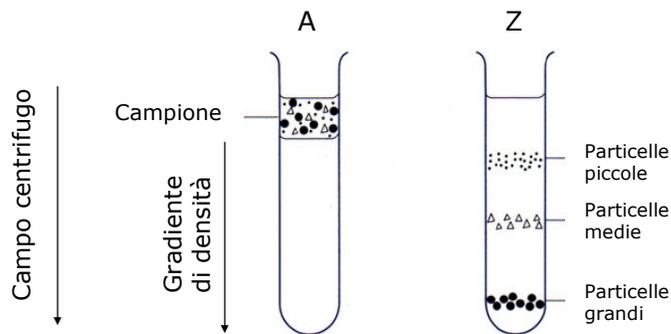
- Centrifugazione differenziale
- Centrifugazione zonale
- Centrifugazione isopicnica
- Centrifugazione isopicnica con gradiente

Centrifugazione differenziale



- All'inizio le particelle sono distribuite uniformemente nel mezzo (A), alla fine (Z) sono sedimentate in funzione delle loro dimensioni e della loro densità.

Centrifugazione zonale



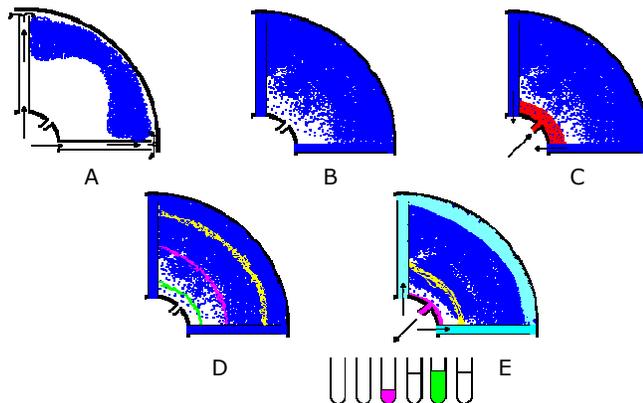
- All'inizio le particelle sono stratificate al di sopra del gradiente (A), alla fine (Z) sono sedimentate in funzione delle loro dimensioni, della loro densità e della densità del mezzo.

v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

31

Centrifugazione zonale (caricamento ed eluizione in moto)



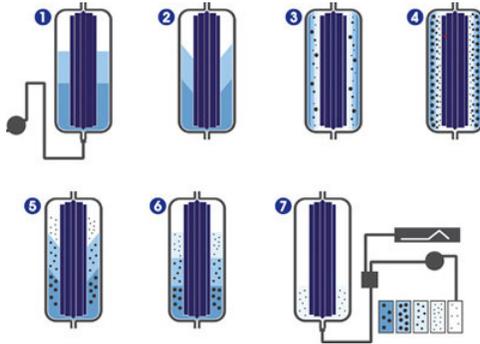
- Il rotore, in moto a bassa velocità, viene caricato con il gradiente dalla periferia.
- Il gradiente è formato
- Viene caricato il campione dal centro.
- Il rotore viene portato in velocità e avviene la sedimentazione.
- Il rotore viene rallentato e le bande vengono eluite usando un solvente più denso.

v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

32

Centrifugazione zonale (con centrifuga apposita)



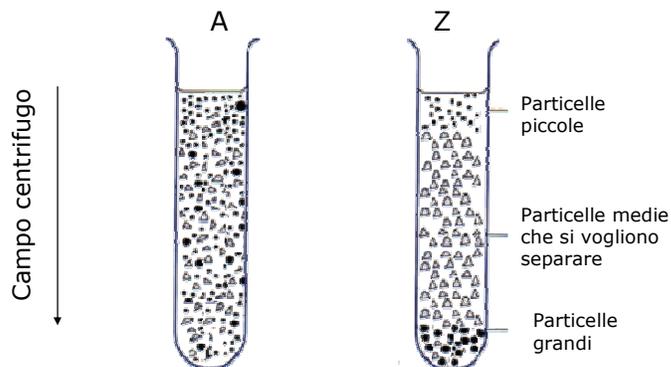
1. Il gradiente è caricato nel rotore.
2. il rotore è accelerato lentamente, il gradiente si riorienta
3. Il campione è pompato ad una estremità del rotore
4. Il campione sedimenta radialmente
5. Alla fine il rotore decelera lentamente,
6. Il gradiente si riorienta senza disturbare le bande di particelle
7. Le bande vengono estratte usando una pompa peristaltica.

v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

33

Centrifugazione isopicnica



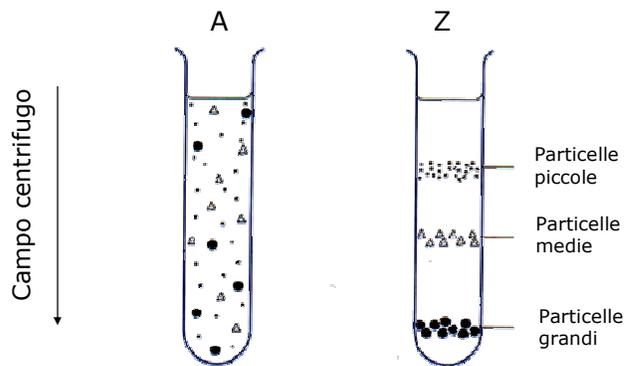
- All'inizio le particelle sono disperse nel mezzo (A) che ha densità uguale a quella delle particelle che si vogliono separare, alla fine (Z) le particelle galleggiano alla densità del mezzo uguale alla loro.

v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

34

Centrifugazione isopicnica con gradiente



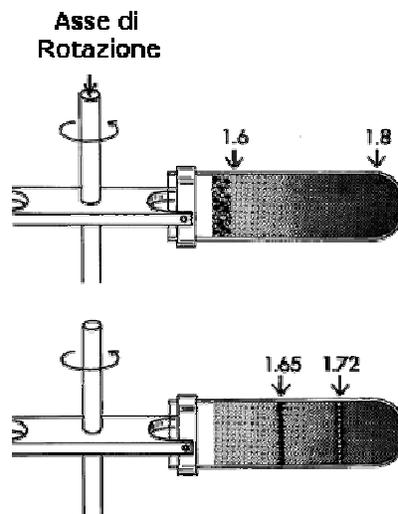
- All'inizio le particelle sono disperse nel mezzo (A), durante la centrifugazione si forma il gradiente, alla fine (Z) le particelle galleggiano alla densità del gradiente uguale alla loro.

v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

35

Gradiente su rotore swing-out



v.4.1 © gsartor 2001-2008

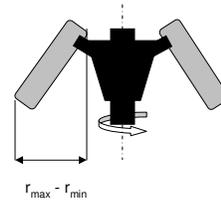
Tecniche analitiche

36

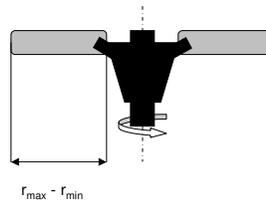
Rotori

- I rotori ad angolo fisso hanno piccole differenze tra r_{\max} e r_{\min}
- Il tempo richiesto per la sedimentazione è minore per rotori ad angolo fisso
- I rotori ad angolo fisso sono più pesanti e necessitano di una maggiore energia per operare
- I rotori a bracci mobili (Swing out) sono da preferire per centrifugare cellule e particelle
- Per sedimentare macromolecole e particelle fini si usano rotori ad angolo fisso
- I rotori a bracci mobili sono da preferire per la centrifugazione su gradiente.

Rotore ad angolo fisso



Rotore swing-out



v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

37

Rotori

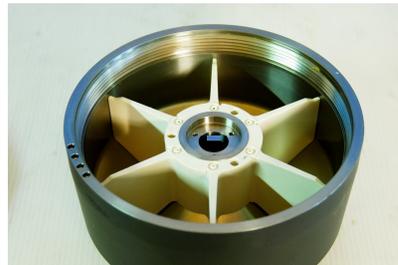
- Rotore swing-out



- Rotore ad angolo Fisso



- Rotore zonale



v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

38

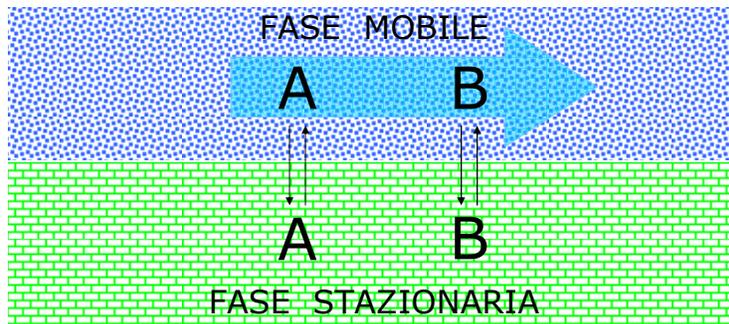
Tecniche separative: Cromatografia

Metodi cromatografici

- Le proteine differiscono in dimensione e carica, i metodi cromatografici usano queste differenze per la separazione e l'identificazione.
- Il principio si basa sulla differente affinità che una proteina ha per una fase stazionaria rispetto alla affinità per una fase mobile.
- Le due fasi sono tra di loro non miscibili.

Metodi cromatografici

EQUILIBRIO



Cromatografie

- Gel filtrazione
 - Separazione in base alle dimensioni
- Scambio ionico
 - Separazione in base alla carica
- Per affinità
 - Affinità per ligandi (anticorpi)
 - Proteine ingegnerizzate (His-tag)

Coefficiente di partizione - α

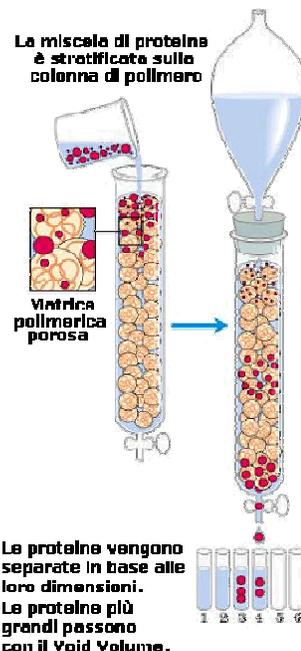
- Il coefficiente di partizione tra le due fasi, α , è definito come il rapporto tra il soluto adsorbito sulla fase stazionaria rispetto a quello in soluzione nella fase mobile.

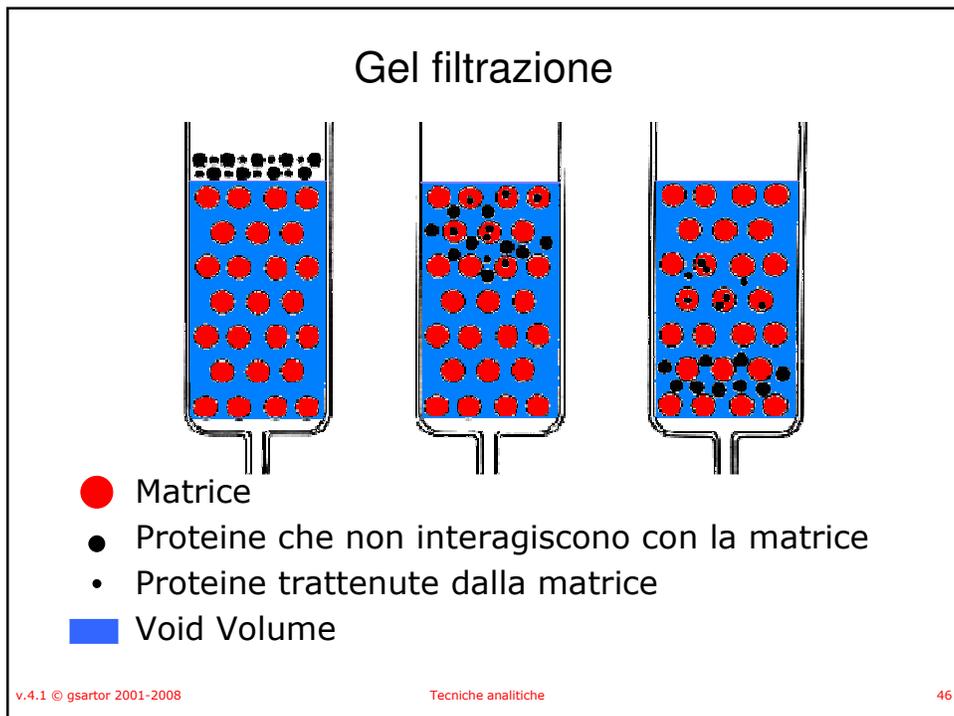
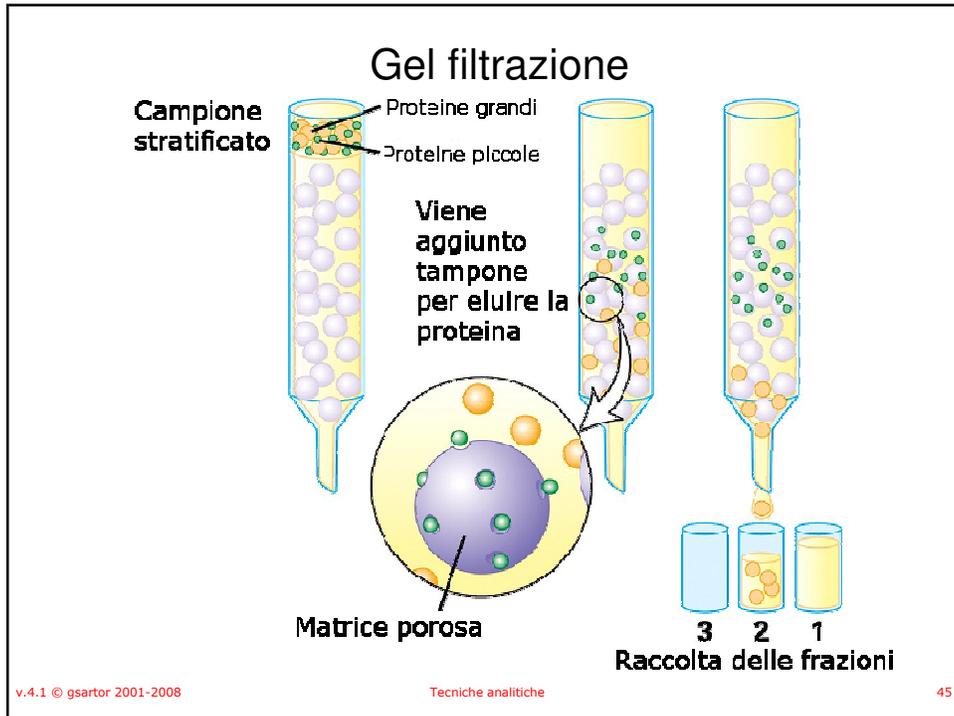
$\alpha = 0$ nessun adsorbimento

$\alpha = 1$ tutto adsorbito

Gel filtrazione

- L'interazione avviene tra la proteina e la matrice polimerica.
- La matrice polimerica è fatta di microsfere con porosità controllata.
- Le proteine interagiscono con i pori delle microsfere e vengono trattenute in base alla loro dimensione.
- Se una proteina, molto grande, non interagisce con la matrice esce con un volume di eluente pari al Void Volume (volume vuoto).





Gel filtrazione

- **Vantaggi**
 - Semplice
 - Prevedibile
- **Svantaggi**
 - Bassa capacità (piccoli volumi)
 - Soluzioni non viscosi

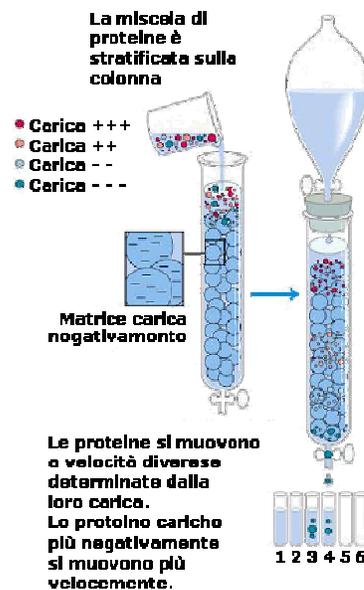
v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

47

Cromatografia scambio ionica

- **Scambio anionico**
 - A pH maggiore del pI (almeno una unità) la proteina è carica negativamente e lega la colonna a scambio anionico.
 - L'eluizione avviene con $[\text{Cl}^-]$ crescente o abbassando il pH (più difficile da controllare).
- **Scambio cationico**
 - A pH minore del pI (almeno una unità) la proteina è carica positivamente e lega la colonna a scambio cationico.
 - L'eluizione avviene con $[\text{Na}^+]$ crescente o alzando il pH.

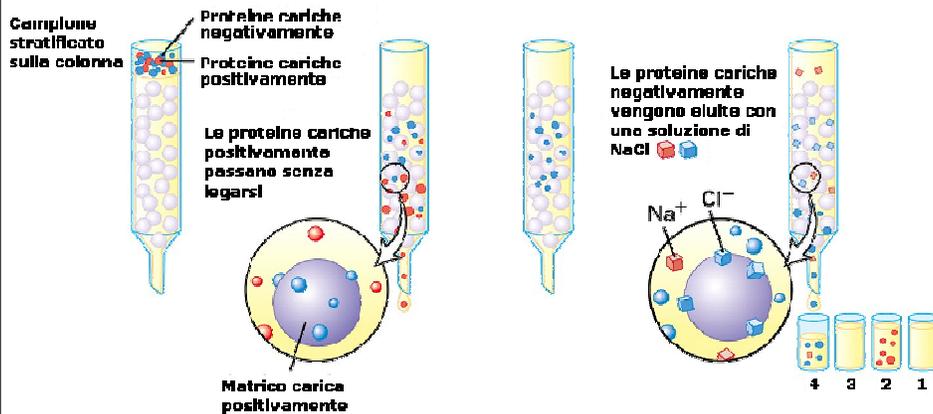


v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

48

Cromatografia scambio ionica



v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

49

Cromatografia scambio ionica

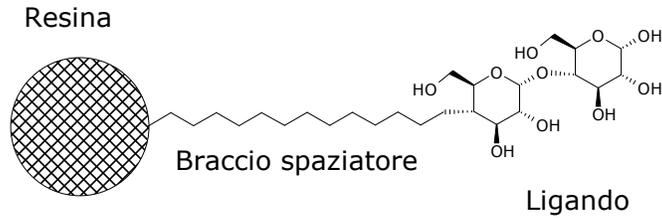
- **VANTAGGI**
 - Per grandi volumi,
 - Grandi quantità di proteina (1-5 g proteina per 100 ml),
 - Matrice molto robusta,
 - Condizioni molto flessibili, possibili molte variazioni.
- **SVANTAGGI**
 - Proteine allo stesso pH e concentrazioni di sali della colonna.
 - Ciò può essere scomodo poiché poi occorre passare in dialisi per togliere i sali.

v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

50

Cromatografia di affinità



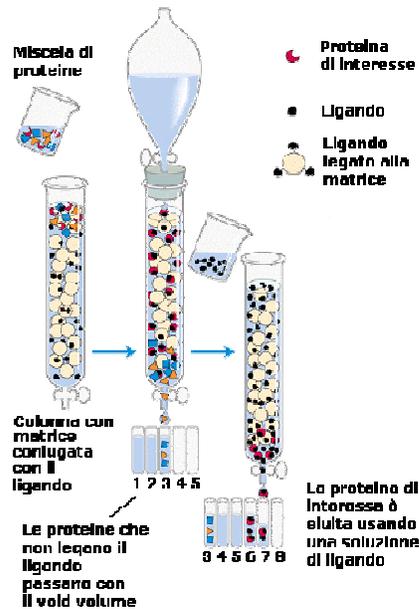
v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

51

Cromatografia di affinità

- Un ligando ad alta affinità per la proteina è legato alla matrice
- La proteina di interesse si lega al ligando e viene immobilizzata sulla colonna
- Le altre proteine vengono "lavate" via.
- La proteina di interesse viene eluita usando una soluzione di ligando.



v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

52

Affinity tags

- Gli affinity tags sono si ottengono attraverso la preparazione di proteine ricombinanti. Alla proteina di interesse è legato un tag che presenta affinità con un ligando:

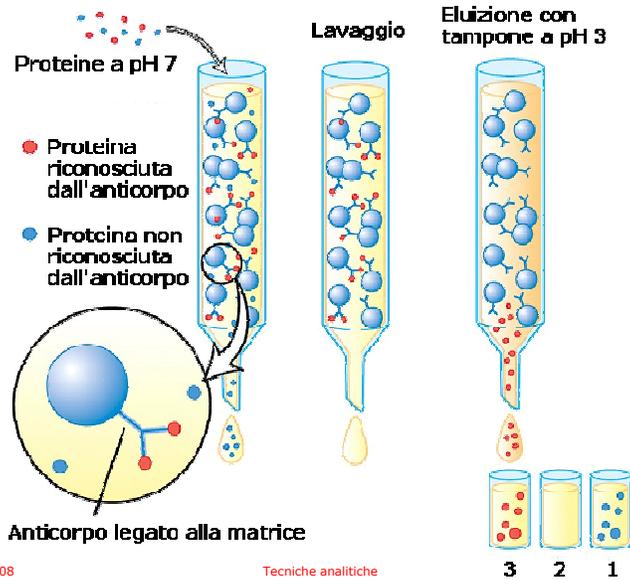
TAG	LIGANDO
Glutathione-S-transferasi	Glutathione
Maltose Binding Protein	Maltosio
Biotina	Avidina
Poly-His	Ni ⁺⁺ , Zn ⁺⁺ , Co ⁺⁺

Affinity tags

TAG	LIGANDO
Glutathione-S-transferasi	Glutathione
Maltose Binding Protein	Maltosio
Biotina	Avidina
Poly-His	Ni ⁺⁺ , Zn ⁺⁺ , Co ⁺⁺

- Le proteine contenenti affinity tags sono poi isolate per cromatografia di affinità con i ligandi legati alla colonna.
- Le proteine isolate possono poi venire private degli affinity tag attraverso proteolisi specifica.

Cromatografia di affinità con anticorpi



Cromatografia di affinità

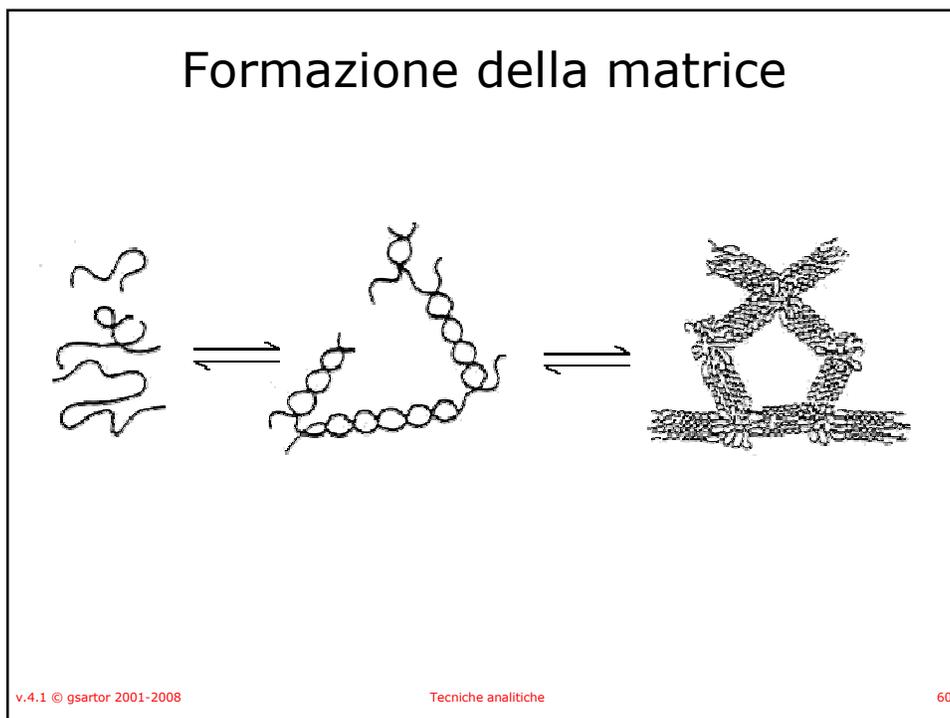
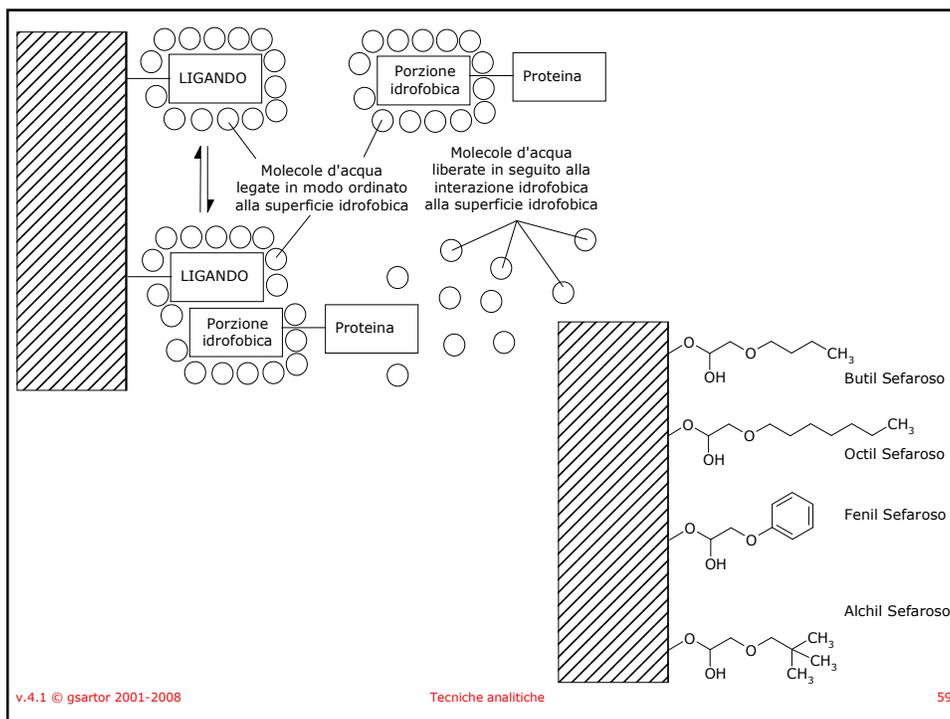
- VANTAGGI
- Alta affinità, costanti di dissociazione nell'ordine del μM , nM o anche pM.
- Legame tutto o nulla:
- Possibili molte variazioni (affinity tags)
- SVANTAGGI
- L'ingombro sterico spesso abbassa la capacità
- Il braccio spaziatore può avere influenza sul legame
- L'eluizione può richiedere un eluente specifico

Cromatografia per interazione idrofobica (HIC)

- È un tipo di cromatografia sviluppato per la purificazione di proteine, le separa sulla base della loro idrofobicità di superficie.
- I sali ad alta concentrazione riescono ad esporre le regioni idrofobiche, sottraendo le molecole d'acqua ordinate
- le proteine tendono così ad interagire fra loro ("*salting out*"). Nella HIC queste regioni così esposte tendono ad interagire con una fase stazionaria costituita da gruppi idrofobici.

Cromatografia per interazione idrofobica (HIC)

- È una cromatografia che è vantaggioso applicare ad esempio dopo il frazionamento con ammonio solfato.
- L'eluizione può essere fatta con forza ionica decrescente oppure per "spiazzamento" con detergenti non ionici (Tween 20, Triton X-100).
- Potenziali svantaggi:
 - in alcuni casi le condizioni di eluizione possono provocare denaturazione.
 - non è predicibile, può applicarsi bene ad alcune proteine ma non ad altre.



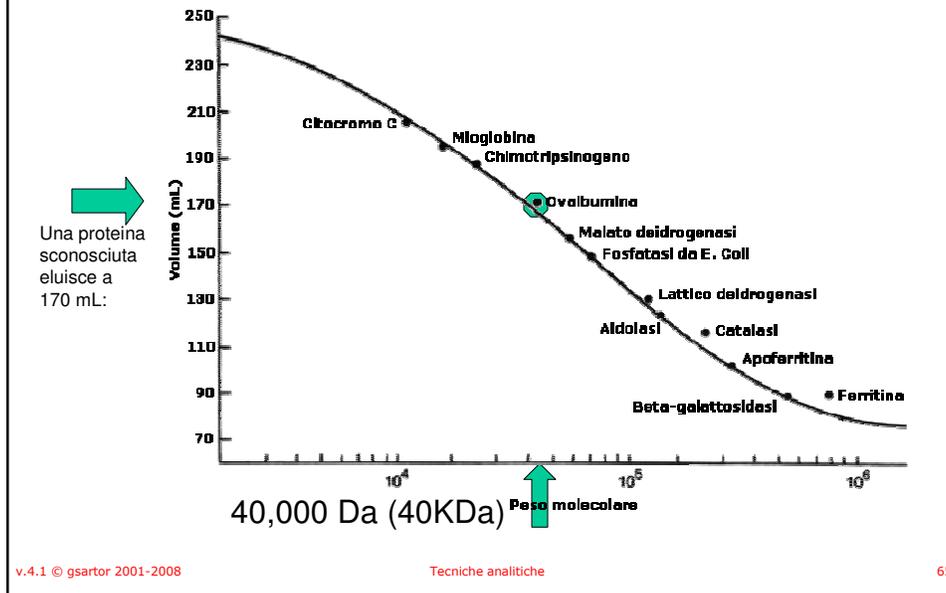
Tipi di matrici utilizzate

- **Agarosio** Polisaccaride derivante da particolari alghe rosse costituito da residui alternati di D-galattoso e 3,6-anidro-L-galattoso. Disponibile commercialmente come Sepharose, Sepharose CL (cross-linking con 2,3-dibromopropanolo), Superose, Bio-Gel A. Limiti di esclusione 10-40000 kD.
- **Cellulosa** Polimero di unità glucosidiche unito da legami β -1,4. Tramite epiclorigrina vengono ottenuti i legami crociati essenziali per l'utilizzo come matrice in cromatografia, il numero dei quali determina la dimensione dei pori.
- **Destrano** Polimero di residui di glucosio uniti da legami β -1,6 prodotto dal batterio *Leuconostoc mesenteroides*. In commercio con il nome di Sephadex. La porosità dei gel a base di destrano è controllata dalla massa molecolare del destrano usato e dall'introduzione di legami crociati ottenuti con epiclorigrina. Limiti di esclusione 0.7-800 kD.
Il Sephacryl è destrano con legami crociati ottenuti con N,N'-metilene bisacrilamide. Limiti di esclusione 1-8000 kD. Il Superdex è un gel composito costituito da destrano covalentemente legato ad agarosio.

Tipi di matrici utilizzate

- **Poliacrilamide**: Polimero di acrilamide e N,N'-metilenbisacrilamide (quest'ultimo determina la formazione di legami crociati). È disponibile in commercio come Bio-GelP, con limiti di esclusione tra 0.2 e 400 kD.
- **Polistirene** Polimero di stirene legato con divinilbenzene.
- **Silice** Polimero prodotto a partire dall'acido ortosilicico. I molti gruppi silanolo (Si-OH) rendono la matrice altamente idrofilica. Il loro eccesso può essere eliminato derivatizzando con triclorometilsilano.

Determinazione peso molecolare



L'intervallo di peso molecolare dipende dalla dimensione dei pori della matrice

Materiale	intervallo PM
• Dextran Sephadex G-25	1000-5000
• Dextran Sephadex G-200	5000-800,000
• Polyacrylamide Bio-gel P-60	3000-60,000
• Agarose Bio-gel A-150 M	1×10^6 - 150×10^6
• La velocità dipende dalla forma	
- Denaturazione	

La cromatografia come sistema analitico

- Gel filtrazione
 - Massa della proteina
- Poly Acrilamide Gel Electrophoresis
 - Denaturante (SDS-PAGE)
 - Non denaturante

Elettroforesi

- Sotto l'azione di un campo elettrico particelle cariche migrano verso l'elettrodo di segno opposto.
- È una tecnica soprattutto ANALITICA ma anche PREPARATIVA.
- È un mezzo di separazione molto potente, fra i più usati in biochimica

Forza elettrica : $F_{el} = q \cdot E$ (carica · campo elettrico applicato)
Forza frizionale : $F_{fr} = f \cdot v$ (fattore di frizione · velocità)
Fattore di frizione: $f = 6\pi r \eta$ (r = raggio, η = viscosità del mezzo)

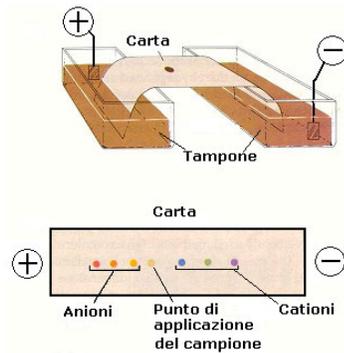
- Quando si bilanciano:

$$q \cdot E = f \cdot v$$
$$v = \frac{q}{f} \cdot E$$

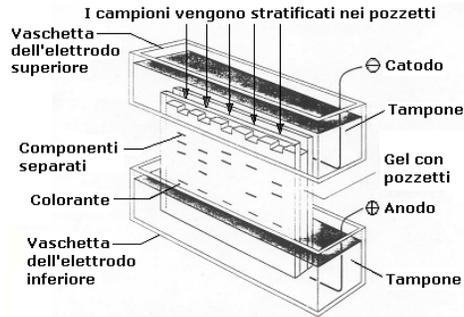
$$\text{mobilità elettroforetica : } \mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{f}$$

Elettroforesi su supporto

su carta



su gel



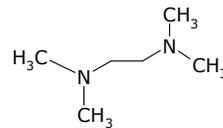
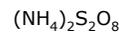
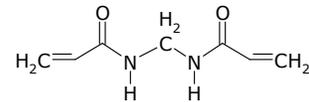
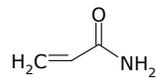
v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

69

Poly Acrilamide Gel Electrophoresis (PAGE)

- Acrilamide monomero (neurotossico)
- N,N'-bisacrilamide (BIS) ramificante
- Ammonio persolfato (APS) forma radicali
- N,N,N,N-Tetrametil-Etilenediamina (TEMED) stabilizza i radicali

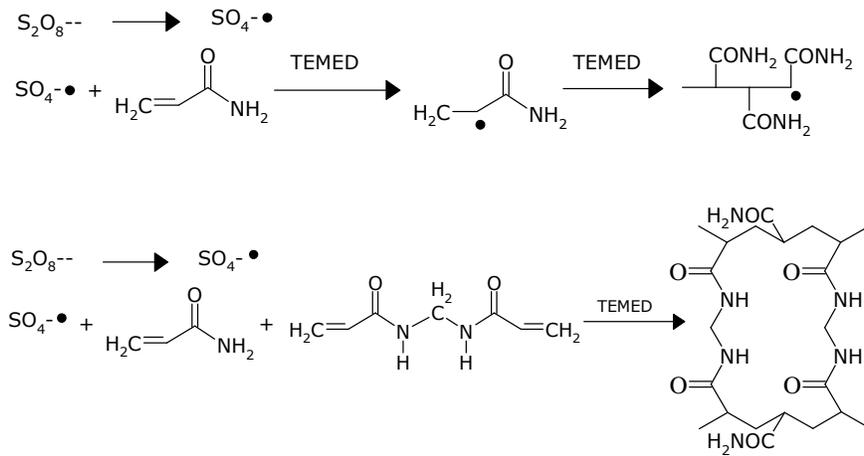


v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

70

Polimerizzazione



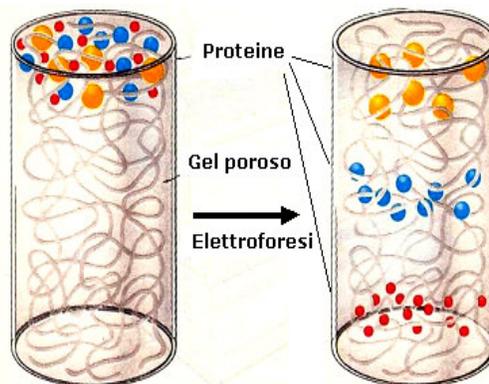
v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

71

Elettroforesi

- Il passaggio di corrente elettrica attraverso il gel permette la migrazione delle proteine (caricate negativamente a pH >8) verso l'anodo.
- La porosità del gel determina la resistenza al passaggio delle molecole, quelle di maggior dimensioni saranno più rallentate.



v.4.1 © gsartor 2001-2008

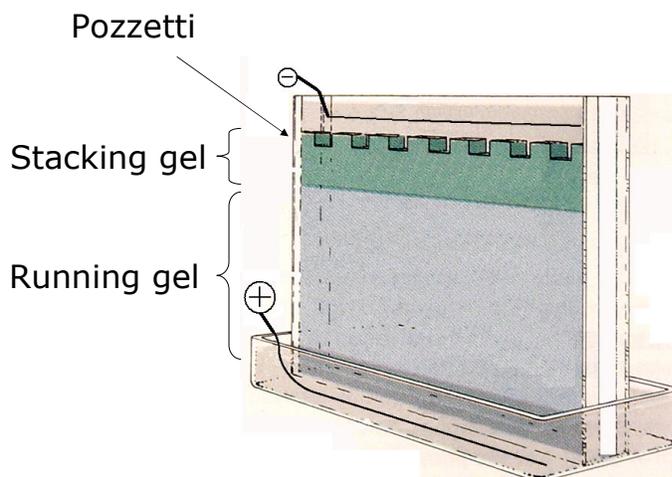
Tecniche analitiche

72

Struttura del gel

- Il gel consiste in due gel a differenti concentrazione di acrilamide e a diverso pH
- Running gel:
 - Questo gel viene fatto per primo e si trova nella parte inferiore, attraverso questo gel avviene la separazione delle proteine in base al peso molecolare.
 - La concentrazione di acrilamide definisce le proprietà separative del gel.
 - Il pH è basico (8.3) per avere le proteine nella forma anionica affinché migrino verso l'anodo.
- Stacking gel:
 - Ha una concentrazione di acrilamide minore (4.5%) ed è a pH 6.8 in modo da permettere l'entrata simultanea delle proteine nel running gel appena viene applicato il campo elettrico.
 - Viene polimerizzato in presenza di un pettine per creare i pozzetti.

Struttura del gel



Proprietà separative

% Acrilamide nel running gel	Intervallo di pesi molecolari separabili
5 - 10	20.000 - 150.000
10 - 15	10.000 - 80.000
>15	< 15.000
Bisacrilamide = 5%	



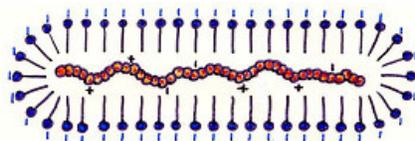
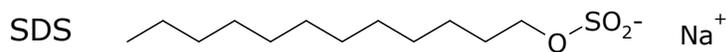
v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

75

SDS-PAGE

- La presenza di un detergente come il sodio dodecilsolfato (SDS) provoca la denaturazione delle proteine e la loro copertura con cariche negative.



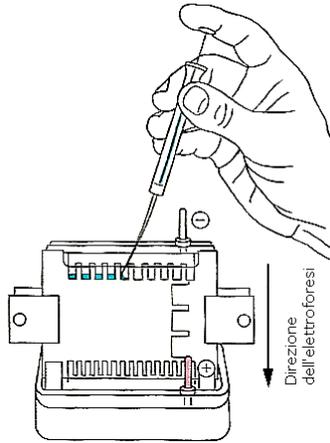
- Permettendo la determinazione dei pesi molecolari.

v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

76

Caricamento di un gel

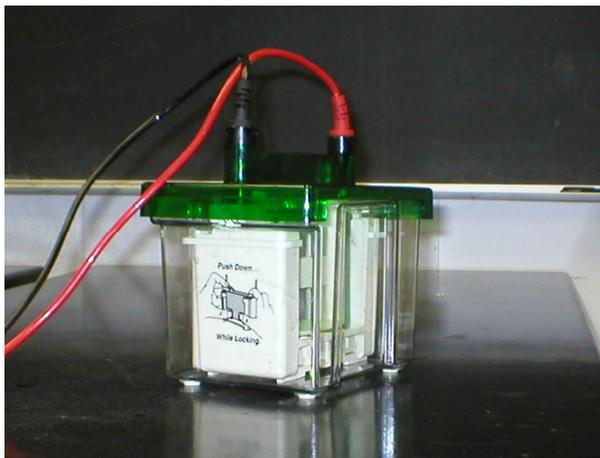


v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

77

Cella per elettroforesi

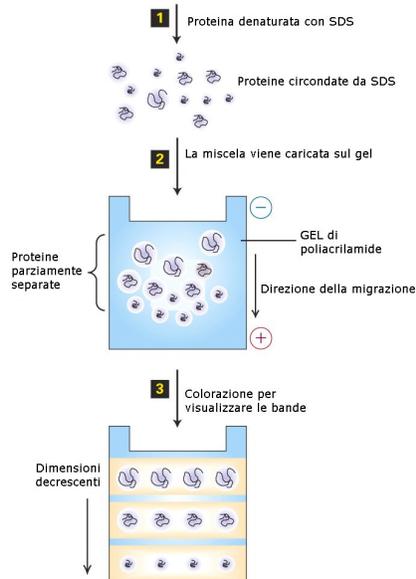


v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

78

SDS-PAGE



- Separazione di proteine denaturate

v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

79

Colorazioni del GEL

- Il gel può essere colorato con:
- Coloranti (Blù di Coomassie, nero d'amido)
- Metalli
 - **Rame** C. Lee, A. Levin and D. Branton: Copper staining: a five- minute protein stain for sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gels; *Anal. Biochem.* (1987) 166, 303-312;
 - **Argento** Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* (1987) 8, 93-99.

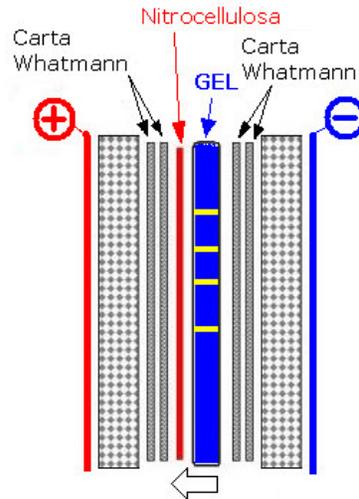
v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

80

Colorazioni del GEL

- Le proteine possono essere trasferite su un supporto più stabile (nitrocellulosa) e quindi colorate usando anticorpi specifici
 - Western-blotting



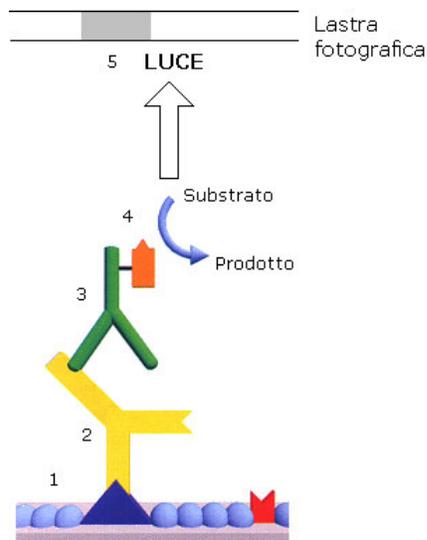
v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

81

Western-blotting

- Proteina su nitrocellulosa
- Anticorpo specifico per la proteina
- Anti-anticorpo coniugato con una
- Attività enzimatica che produce luce che impressiona
- una lastra fotografica



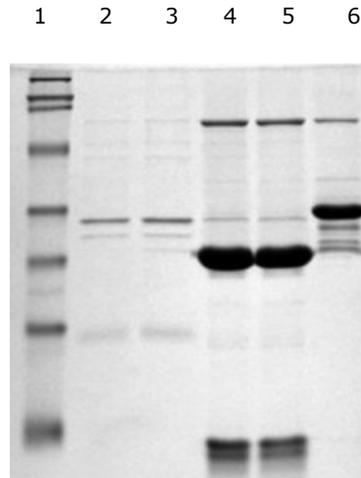
v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

82

Risultato

Lane 1: standard pei molecolari
Lane 2-6: campioni

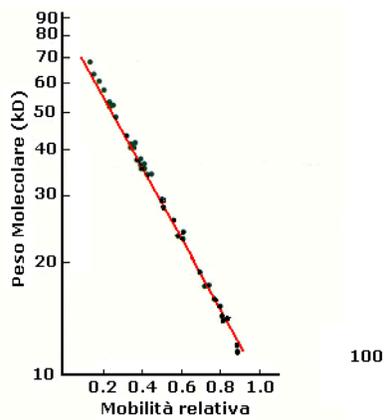


v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

83

Risultato



Weber, K. e Osborn, M., J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969)

v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

84

Tecniche analitiche: Spettrofotometria

Spettroscopia

- Tutte le spettroscopie consistono nella misura delle interazione energia-materia.
- L'assorbimento di energia da parte di una molecola può provocare delle variazioni chimiche o fisiche (proprietà degli elettroni o del nucleo) della specie chimica.
- L'assorbimento o l'emissione possono fornire informazioni sulla struttura della molecola e/o le variazioni che una essa subisce.

Interazione tra energia e materia

λ (nm)	ν (Hz)	Regione dello spettro	Interazioni (Spettroscopia)
$10^6 - 10^{10}$	$3 \cdot 10^{11} - 3 \cdot 10^7$	Radio	Spin nucleare, spin elettronico (NMR – EPR)
$10^3 - 10^5$	$3 \cdot 10^{14} - 3 \cdot 10^{12}$	Radiazioni InfraRosse	Vibrazioni, rotazioni (IR)
$4 \cdot 10^2 - 8 \cdot 10^2$ (400-800)	$7.5 \cdot 10^{14} - 3 \cdot 10^{14}$	Luce Visibile	Transizioni elettroniche (Spettroscopie ottiche)
$2 \cdot 10^2 - 3 \cdot 10^2$ (200-300)	$1.5 \cdot 10^{15} - 1 \cdot 10^{15}$	Luce UltraVioletta	
$10^{-3} - 10^0$	$3 \cdot 10^{20} - 3 \cdot 10^{17}$	Raggi X	Gusci interni (Spettroscopie X)

v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

87

Principio di Frank-Condon:

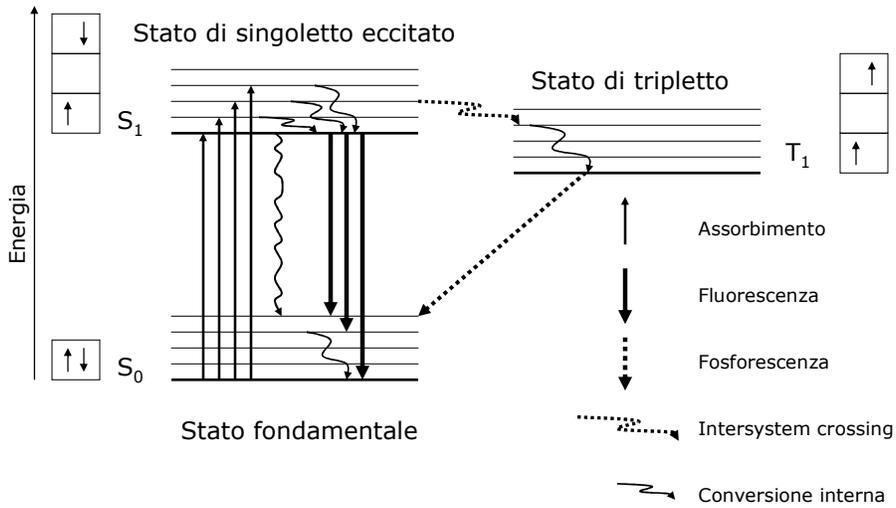
Durante la transizione NON CAMBIA LA POSIZIONE degli atomi della molecola.

v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

88

Le transizioni elettroniche (Diagramma di Jablonsky)

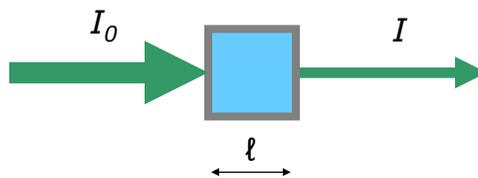


v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

89

Legge di Lambert-Beer



$$T = \frac{I}{I_0};$$

$$0 < T < 1$$

La trasmittanza T è una funzione esponenziale di:

l = percorso ottico
 ϵ = assorbanza
 concentrazione unitaria
 C = concentrazione

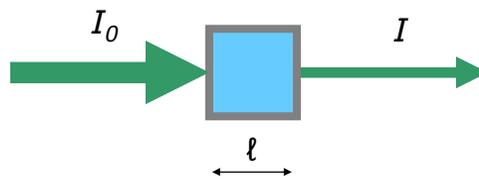
$$T = 10^{-\epsilon l c}$$

v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

90

Legge di Lambert-Beer



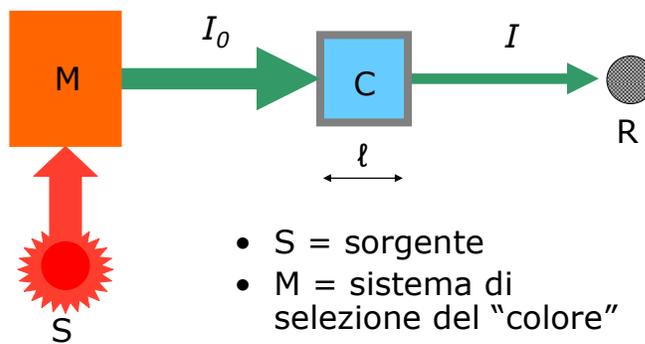
Trasmittanza

$$T = 10^{-\epsilon l c}$$

$$-\log T = \log \frac{1}{T} = \epsilon l c = A$$

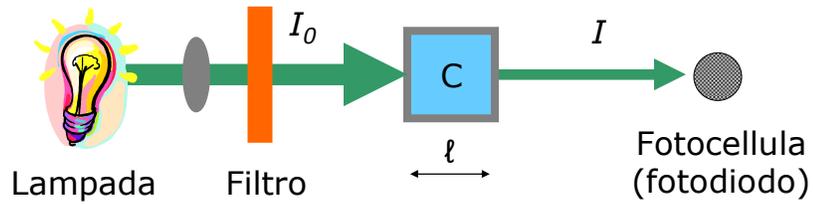
Assorbanza

Lo strumento



- S = sorgente
- M = sistema di selezione del "colore"
- C = campione
- R = rivelatore

Lo strumento



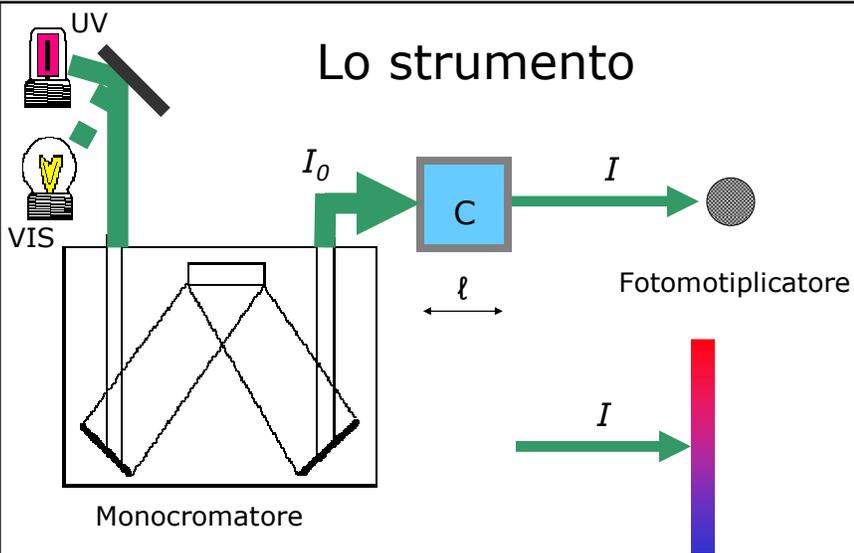
- Colorimetro (fotometro)

v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

93

Lo strumento

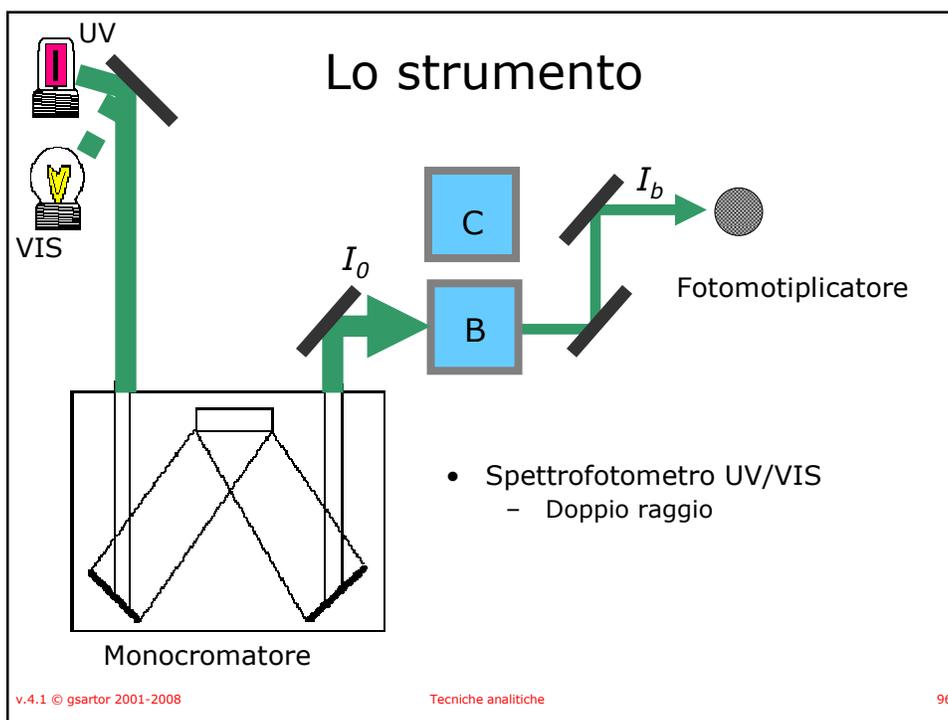
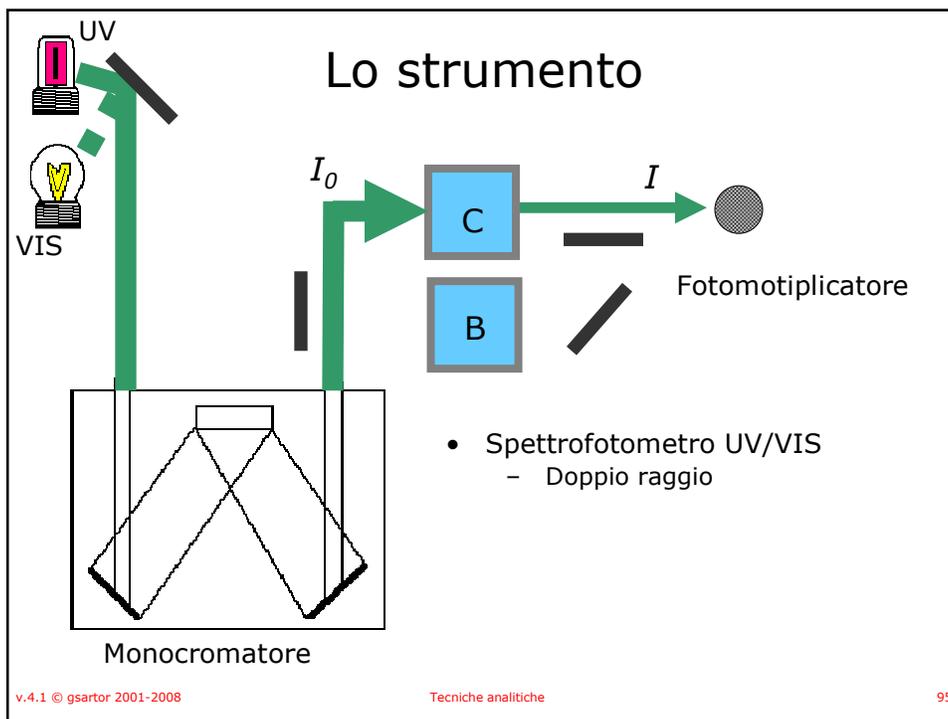


- Spettrofotometro UV/VIS
– Mono raggio

v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

94

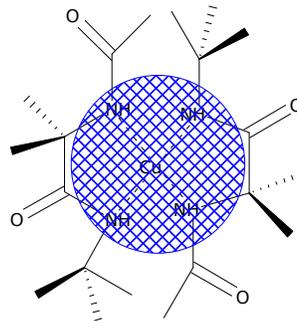


Determinazione colorimetrica di proteine

- Misura diretta a 280 nm
 - Aminoacidi aromatici
- Misura diretta a 205 nm
 - Legame peptidico
- Metodi indiretti
 - Biureto
 - Folin-Lowry
 - Acido bicinconinico
 - Bradford (blù di Coomassie)

Metodi indiretti

- Biureto:
 - CuSO_4 in ambiente basico
 - Formazione di complessi rameici con i legami peptidici
 - Assorbimento a 550 nm
 - Interferiscono ioni NH_4^+
 - Si producono ioni Cu^+
- Folin-Lowry
 - Gli ioni Cu^+ riducono una miscela di acidi misti fosfomolibdotungstici (reattivo di Folin-Ciocalteu)
 - Assorbimento a 750 nm



Assorbimento e fluorescenza

- La fluorescenza è un processo di **emissione di radiazioni** a seguito di un **assorbimento di energia**.
- Nell'uso più comune si intende per luce di fluorescenza un processo di **emissione di luce** a seguito del rilassamento di uno stato elettronico eccitato generato a da un **assorbimento di luce**.
- La scala dei tempi con la quale avviene l'emissione è diversa da quella con la quale avviene l'assorbimento.
- Come conseguenza sono diverse le proprietà della materia che influiscono sui due fenomeni e, quindi, diverse le informazioni che se ne possono ricavare.

Principio di Frank-Condon:

*Durante la transizione NON
CAMBIA LA POSIZIONE degli
atomi della molecola.*

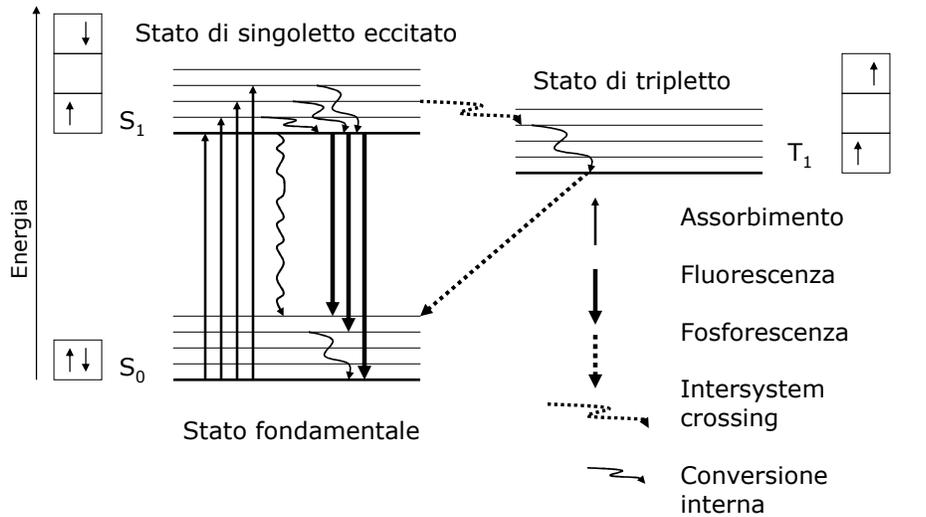
Tempi

- ASSORBIMENTO: 10^{-15} s (fs)
- EMISSIONE: 10^{-12} s - 10^3 (ps - ore)
 - Fluorescenza: 10^{-12} s - 10^{-6} s (ps - μ s)
 - Fosforescenza: 10^{-6} - 10^3 (μ s - ore)

Spettroscopia di fluorescenza vs. Assorbimento

- Vantaggi:
 - Non tutte le molecole che assorbono emettono
 - Segnali significativi anche a concentrazioni bassissime (nM)
 - Effetti del solvente
 - Unità arbitrarie
- Svantaggi
 - Non tutte le molecole che assorbono emettono
 - Segnali significativi anche a concentrazioni bassissime (nM)
 - Effetto del solvente
 - Unità arbitrarie

Le transizioni elettroniche (Diagramma di Jablonsky)



v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

103

Tipi di transizione

- L'assorbimento di luce da parte di una molecola corrisponde ad un assorbimento di energia che promuove un elettrone da uno stato fondamentale ad uno stato eccitato (singoletto eccitato).
- Una volta eccitata elettronicamente una molecola torna al più basso stato eccitato attraverso una serie di rilassamenti vibrazionali e rotazionali che dissipano energia senza emissione di luce (*conversione interna*).

v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

104

Elettroni

- Le transizioni elettroniche coinvolte sono in genere del tipo $n \rightarrow \pi^*$ o $\pi \rightarrow \pi^*$ (molto raramente sono coinvolti elettroni σ).
- Gli elettroni coinvolti nella transizione di fluorescenza sono generalmente elettroni π .
- La fluorescenza si osserva generalmente nei composti che presentano transizioni $\pi^* \rightarrow \pi$.

Lo stato eccitato

- L'assorbimento
 - Formazione dello stato eccitato



- L'emissione
 - Decadimento dello stato eccitato



$$v = -k_R [M^*]$$

$$d[M^*]/dt = -k_R [M^*]$$

Significato di k_R

- k_R è la costante di velocità della reazione di decadimento dello stato eccitato e viene espressa in s^{-1} (reazione di I ordine).

RAPPRESENTA IL NUMERO DI EVENTI PER L'UNITÀ DI TEMPO



$$d[M^*]/dt = -k_R [M^*]$$

$$k_R = 1/\tau_R \quad (s^{-1})$$

Cinetica dei fenomeni

- Fluorescenza $k_R = 10^8 s^{-1}$
- Fosforescenza $k_p = 10^2-10^4 s^{-1}$
- Intersystem crossing $k_{IC} = 10^8 s^{-1}$
- Conversione interna $k_{CI} = 10^{13} s^{-1}$

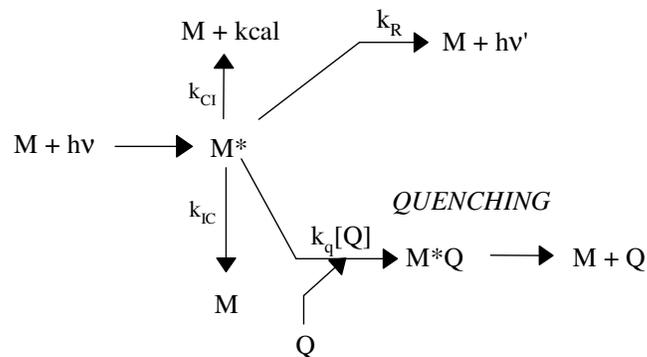
I processi di fosforescenza ed intersystem crossing prevedono l'inversione dello spin dell'elettrone, processo proibito, che però avviene poiché esiste l'interazione spin-orbita, cioè l'accoppiamento dello spin degli elettroni con i momenti angolari orbitali.

Processi radiativi e non-radiativi

- Oltre a conversione interna ed intersystem crossing, altri processi, *non radiativi*, competono con la fluorescenza (*processo radiativo*).
- In soluzione questi processi depopolano lo stato eccitato in modo non radiativo, quindi:

**IL NUMERO DI FOTONI EMESI È MINORE DEL
NUMERO DI FOTONI ASSORBITI**

In sintesi



- Il rapporto tra fotoni emessi ed assorbiti è il rendimento quantico della molecola.

$$\Phi_f = \text{quantum yield}$$

Φ_f = quantum yield

- Il quantum yield (rendimento quantico, efficienza quantica) della molecola.

$$\Phi_f = \frac{\text{Numero di fotoni emessi}}{\text{Numero di fotoni assorbiti}}$$

$$0 \leq \Phi_f \leq 1$$

- Per $\Phi_f = 0$ la molecola non è fluorescente (in quelle condizioni).

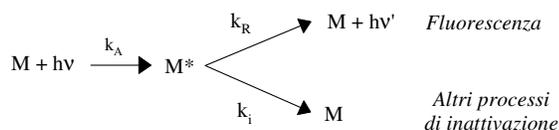
Illuminazione

Le condizioni di illuminazione con le quali si può rivelare la fluorescenza sono:

- Condizioni fotostazionarie
- Condizioni transienti

Condizioni fotostazionarie

- Corrispondono ad una eccitazione costante con intensità pari a I_0



$$k_i = k_{iC} + k_{iI} + k_q[Q] + \dots$$

$$d[M^*]/dt = k_A [M] hv - (k_R + k_i) [M^*]$$

- In condizioni fotostazionarie (equilibrio)

$$d[M^*]/dt = 0; \quad k_A [M] hv = (k_R + k_i) [M^*]$$

Condizioni fotostazionarie

In condizioni fotostazionarie (equilibrio)

$$k_A k_R [M] hv = k_R (k_R + k_i) [M^*]$$

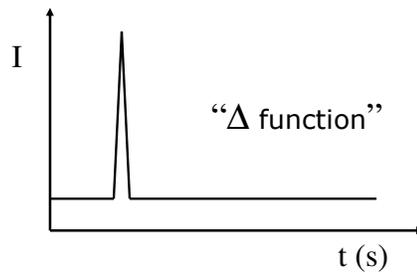
$$\frac{k_R}{k_R + k_i} = \frac{k_R [M^*]}{k_A [M] hv}$$

fotoni emessi per unità di tempo ←
fotoni assorbiti per unità di tempo ←

$$\Phi_f = \frac{k_R}{k_R + k_i}$$

Condizioni transienti

- Illuminazione con un di luce di durata trascurabile.



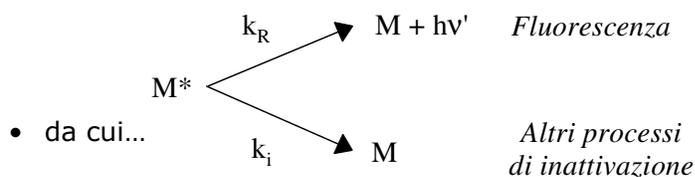
v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

115

Condizioni transienti

- Un impulso provoca una concentrazione iniziale ($t = 0$) di M^* ($[M]_0$) che può decadere, come già visto, con emissione o no di luce.



v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

116

Condizioni transienti

- da cui: $d[M^*]/dt = - (k_R + k_i) [M^*]$
- Integrando fra 0 e t:

$$\ln[M^*]_t = - (k_R + k_i) t + \text{costante}$$

$$t = 0 \longrightarrow [M^*] = [M^*]_0 \longrightarrow \text{costante} = \ln[M^*]$$

Condizioni transienti

- Se definiamo: $k_f = k_R + k_i$
 - e:
- $$k_f = 1/\tau_f$$

Condizioni transienti

- Moltiplicando entrambi i termini per k_R si ottiene:

$$k_R[M^*]_t = k_R[M^*]_0 e^{-\frac{t}{\tau_f}}$$

Funzione di decadimento di fluorescenza $\rightarrow I_t = I_0 e^{-\frac{t}{\tau_f}}$

$$\tau_f = \frac{1}{k_R + k_i} \leftarrow \text{Tempo di vita media di fluorescenza}$$

Condizioni transienti

- Per quanto riguarda il quantum yield:

$$\Phi_f = \frac{k_R}{k_R + k_i} = \frac{\tau_f}{\tau_R}$$

Relazioni fondamentali

$$k_R = \frac{1}{\tau} \text{ (s}^{-1}\text{)}$$

$$\Phi_f = \frac{k}{\{k_R + k_{IC} + k_{CI} + k_q[Q] + k_i\}} = \frac{k}{k_R + k_i}$$

$$\tau_f = \frac{1}{k_R + k_i}$$

$$\Phi_f = \frac{k}{k_R + k_i} = \frac{\tau_f}{\tau}$$

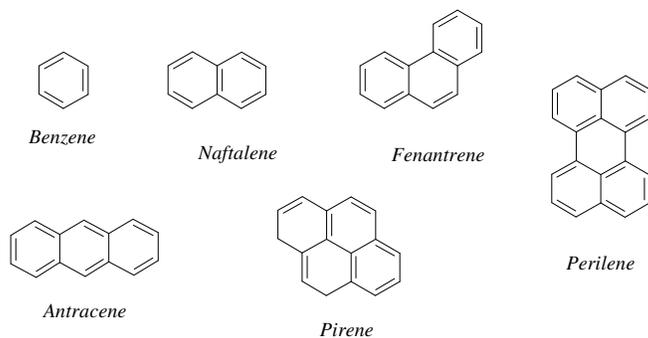
Identikit di una molecola fluorescente

- Una molecola è fluorescente quando:
 - Ha uno spettro di assorbimento (un elettrone, n o π , raggiunge uno stato eccitato);
 - Lo stato eccitato ha un tempo di vita (si rilassa lo stato eccitato);
 - Lo stato eccitato non si rilassa completamente allo stato fondamentale.

- **COMPOSTI AROMATICI!!!**

Sono in genere fluorescenti...

- I policiclici aromatici e i loro derivati:



v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

123

Effetto dei sostituenti sulla fluorescenza del benzene

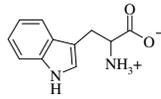
Molecola	$\lambda_{\text{ex}} - \lambda_{\text{em}}$ (nm)	Intensità	Molecola	$\lambda_{\text{ex}} - \lambda_{\text{em}}$ (nm)	Intensità
<chem>c1ccccc1</chem>	270-310	10	<chem>Oc1ccccc1</chem>	285-265	18
<chem>Cc1ccccc1</chem>	270-320	17	<chem>[O-]c1ccccc1</chem>	310-400	10
<chem>Clc1ccccc1</chem>	275-345	7	<chem>Nc1ccccc1</chem>	310-405	20
<chem>Ic1ccccc1</chem>	-	0	<chem>[NH3+]c1ccccc1</chem>	-	0

v.4.1 © gsartor 2001-2008

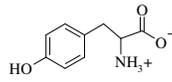
Tecniche analitiche

124

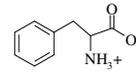
Biomolecole fluorescenti...



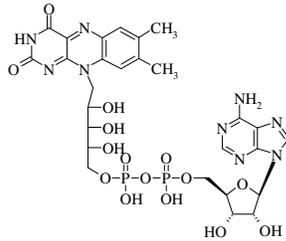
Triptofano (W)



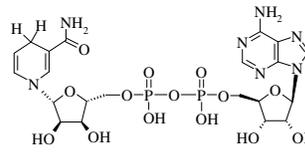
Tirosina (Y)



Fenilalanina (P)



FAD



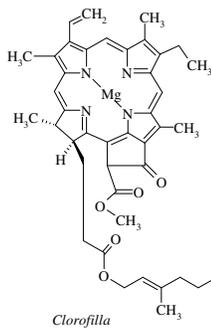
NADH

v.4.1 © gsartor 2001-2008

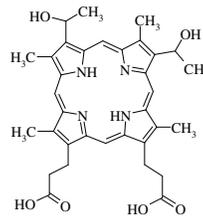
Tecniche analitiche

125

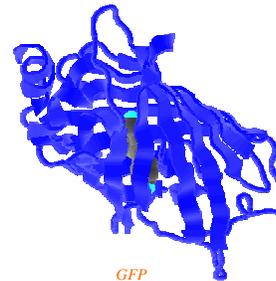
...altre biomolecole fluorescenti...



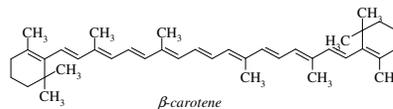
Clorofilla



Ematoporfirina



GFP



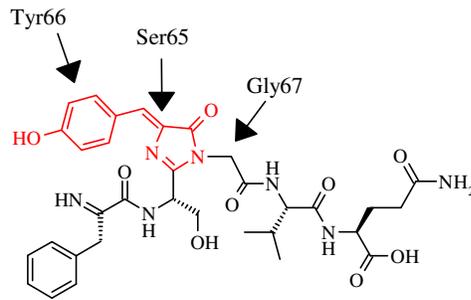
β-carotene

v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

126

GFP

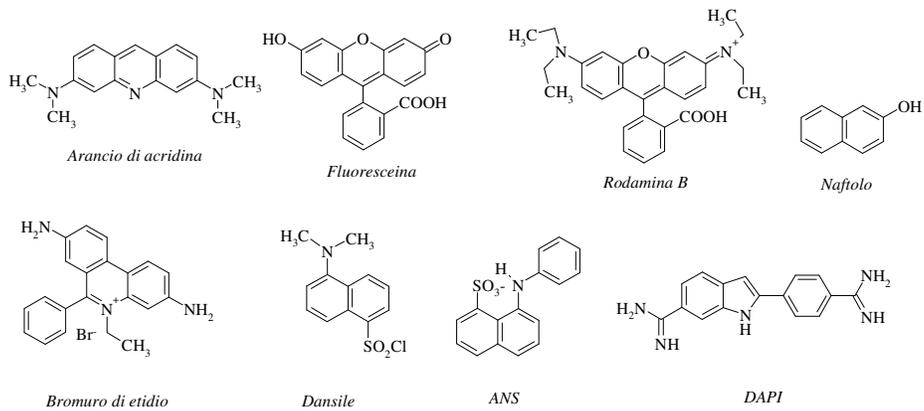


v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

127

...e molecole fluorescenti usate in biologia



v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

128

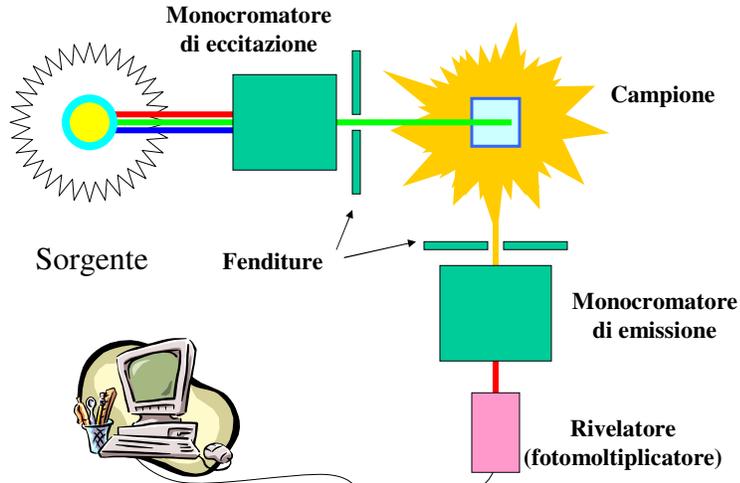
Strumentazione

- Fluorimetro "statico":
 - Sorgente: continua (*lampada a scarica in Xenon*).
 - Misura: Φ_f e gli spettri di emissione.
- Fluorimetro "dinamico":
 - Sorgente: pulsata (*Laser, luce di sincrotrone, lampada pulsata*).
 - Misura: tempi di vita di fluorescenza (τ_f).

Schemi ottici

- A **L**: il più comune.
- A **T**: misure di anisotropia di fluorescenza.
- A 0° : microscopia, epiluminescenza, analisi di superfici o strati.

Geometria a 90°

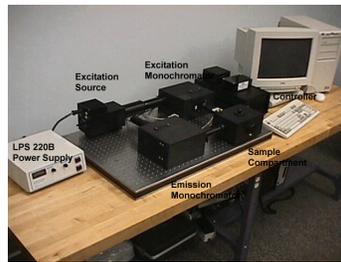
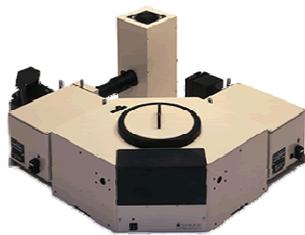


v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

131

Fluorimetri

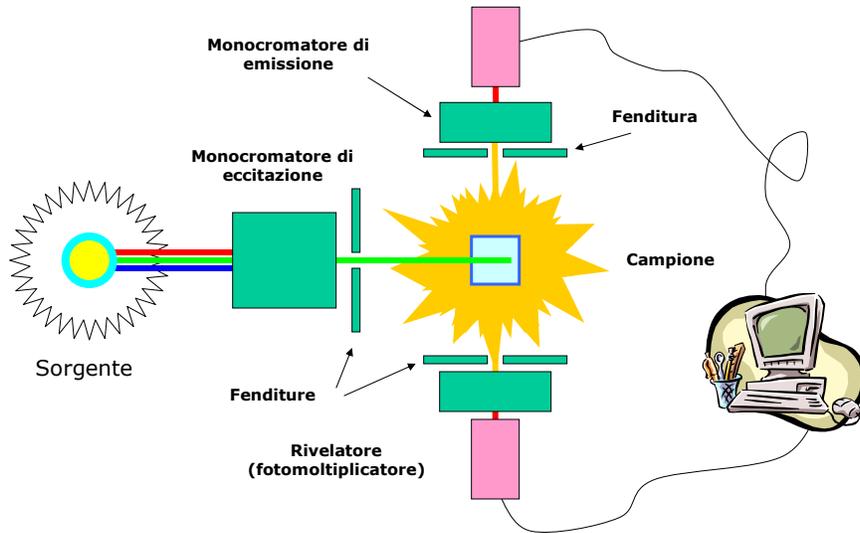


v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

132

Geometria a T



v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

133

La "vetreria"

- Vista la geometria degli strumenti i campioni deve essere contenuti in "cuvettes" che abbiano le quattro pareti trasparenti.
- Possibilmente in quarzo (il vetro è opaco nell'UV),
- Ma con sorgenti di alta intensità (laser) il quarzo è (leggermente) fluorescente.

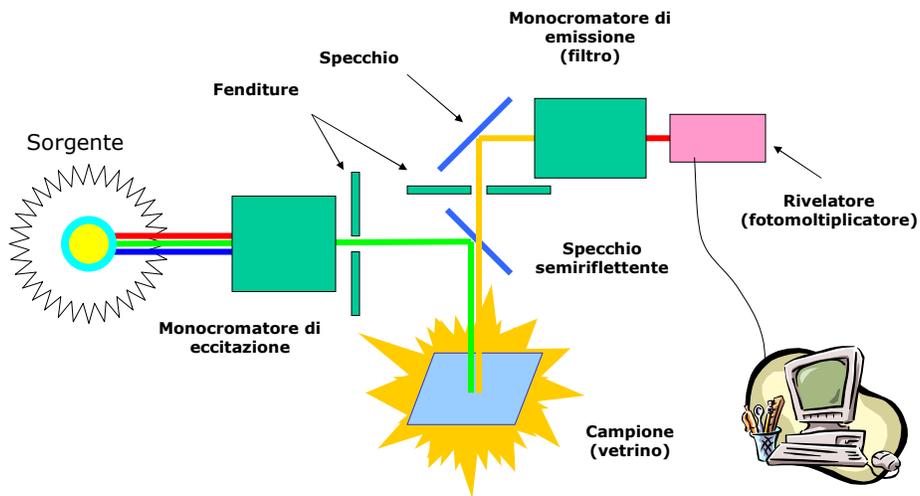


v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

134

Geometria a 0°



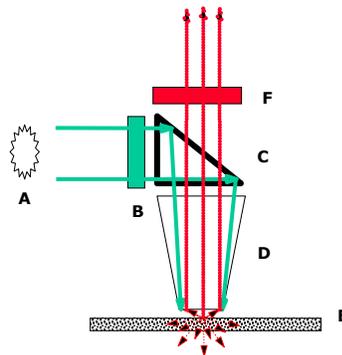
v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

135

Microscopio a fluorescenza

- A. Lampada
- B. Filtro di eccitazione
- C. Prisma semiriflettente
- D. Obiettivo
- E. Oggetto
- F. Filtro in emissione

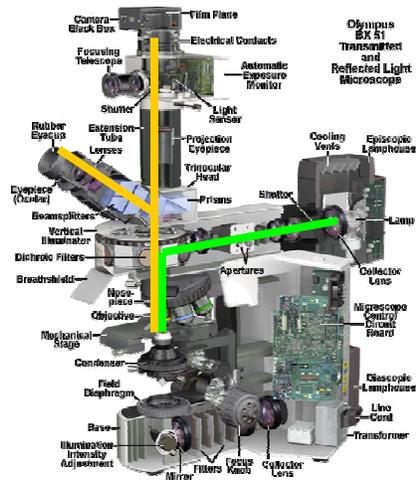


v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

136

Microscopio a fluorescenza



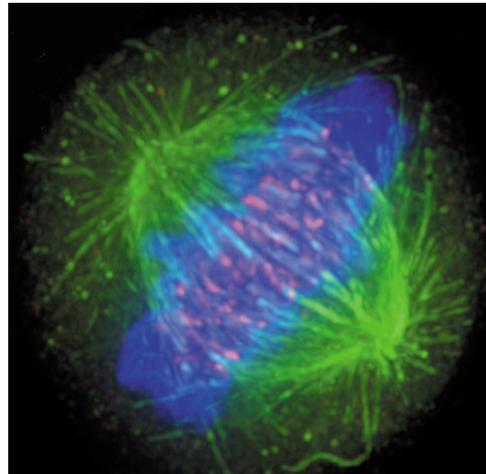
v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

137

Cosa si può vedere in un microscopia a fluorescenza

- Blu** DAPI legato al DNA.
- Rosso** anticorpo fluorescente legato al centromero.
- Verde** anticorpo fluorescente legato alla tubulina.



v.4.1 © gsartor 2001-2008

Tecniche analitiche

138

Referenze sul WEB ...

- Vie metaboliche
 - KEGG: <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
- Struttura delle proteine:
 - Protein data bank (Brookhaven)
 - <http://www.rcsb.org/pdb/>
 - Hexpasy
 - <http://us.expasy.org>
- Enzimi:
 - Nomenclatura – IUBMB
 - <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/>
 - Proprietà – Brenda
 - <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
 - Expasy (Enzyme nomenclature database)
 - <http://www.expasy.org/enzyme/>

...e naturalmente

- Questo ed altro materiale può essere trovato visitando il sito: <http://www.ambra.unibo.it/giorgio.sartor/>
- Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:
- **Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor**
Università di Bologna a Ravenna
Corso di Laurea in Scienze Ambientali