

Prof. Giorgio Sartor  
Corso di Laurea Specialistica in Scienze per l'Ambiente e il Territorio



## Misure con biomarcatori III. Tecniche di analisi

Copyright © 2001-2006 by Giorgio Sartor.  
All rights reserved.

Versione 3.0 - gennaio 2006

### Tecniche di analisi

- Tecniche separative
  - Centrifugazione
  - Cromatografia
    - Elettroforesi
- Tecniche analitiche
  - Cromatografia
    - Elettroforesi
    - Blotting
  - Spettrofotometria

# Tecniche separative: Centrifugazione

## 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  $\omega$  è la velocità di rotazione espressa in radianti·s<sup>-1</sup>  
 $r$  è la distanza dall'asse di rotazione.
- Per esprimere la velocità di rotazione in giri·min<sup>-1</sup> (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 cm·s<sup>-2</sup>):

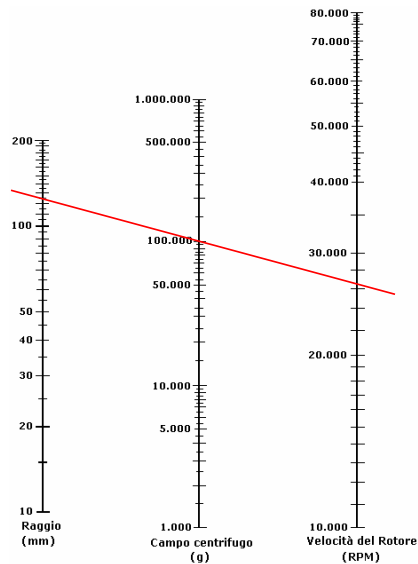
$$RCF = \frac{4\pi^2 \cdot (RPM)^2}{3600 \times 980} \cdot r$$

- 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.



gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

7

## 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:

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

Labels for the equation:
 

- $v$ : Velocità di sedimentazione della particella
- $\frac{2}{9}$ : Costante per una sfera
- $r_p^2$ : Raggio della particella
- $\rho_p$ : Densità della particella
- $\rho_m$ : Densità del mezzo
- $\eta$ : Viscosità del mezzo
- $g$ : Campo gravitazionale

gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

8

## Velocità di sedimentazione

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

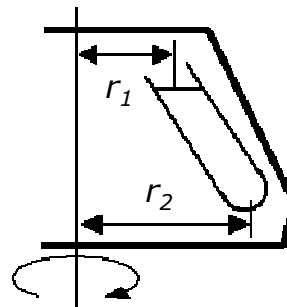
$$\rho_p = \rho_m$$
$$\rho_p - \rho_m = 0$$
$$v = 0$$

- Non vi è sedimentazione.

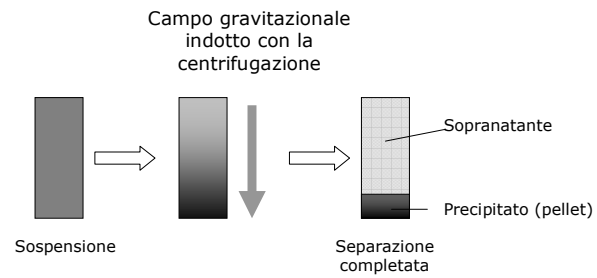
## Tempo di sedimentazione

- 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



gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

11

## Centrifughe



- Centrifuga da banco



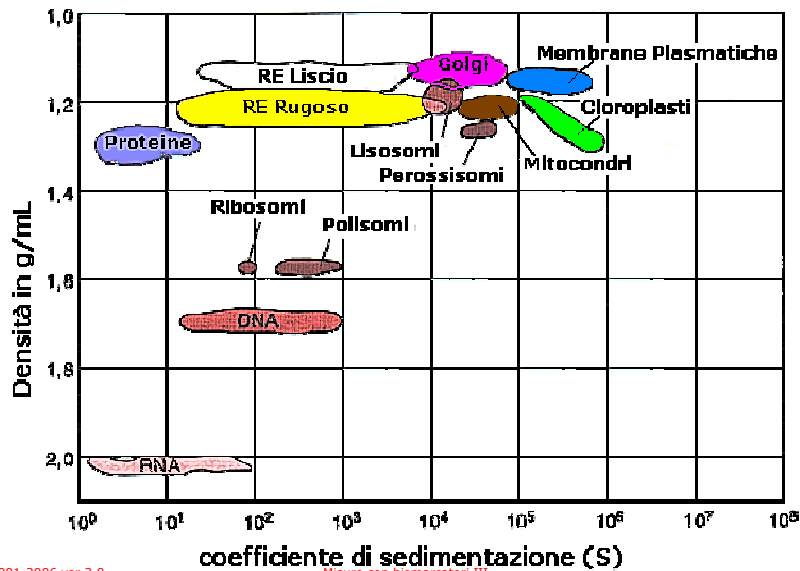
- Ultracentrifuga

gs © 2001-2006 ver 3.0

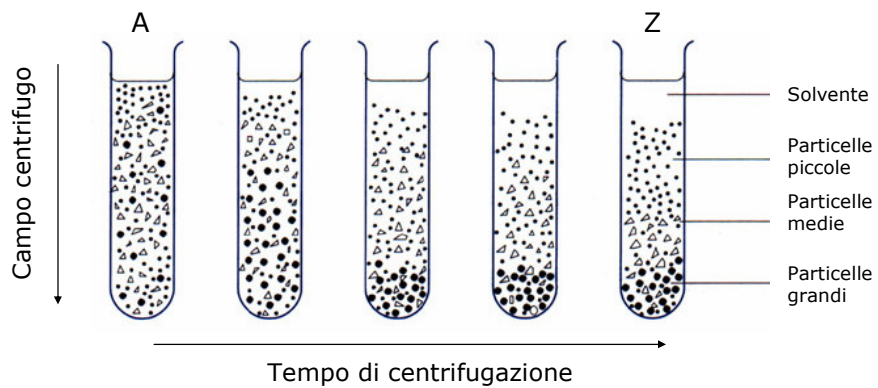
Misure con biomarcatori III

12

## Coefficiente di sedimentazione

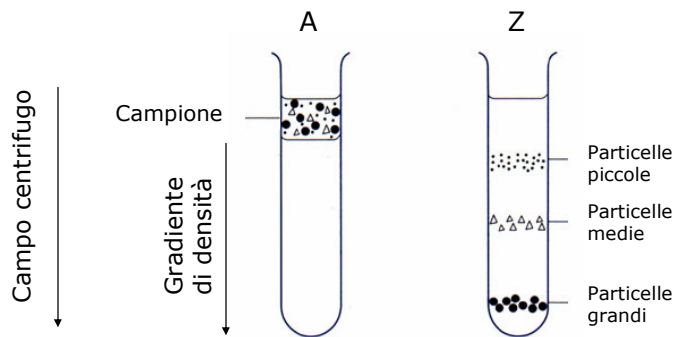


## Centrifugazione differenziale



- 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



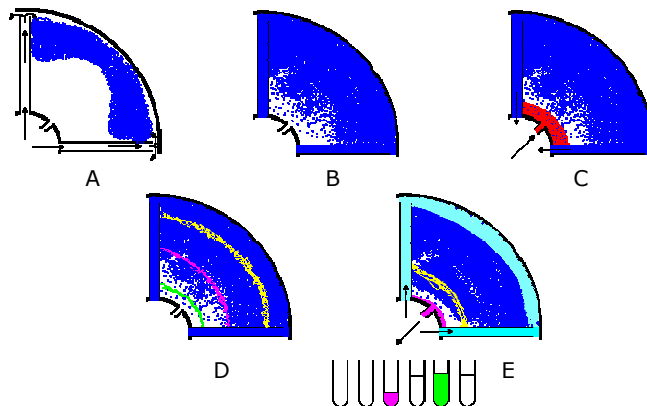
- All'inizio le particelle sono stratificate al di sopra del gradiente (A), alla fine (Z) sono sedimentate in funzione delle loro dimensioni, della loro densità e della densità del mezzo.

gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

15

## 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.

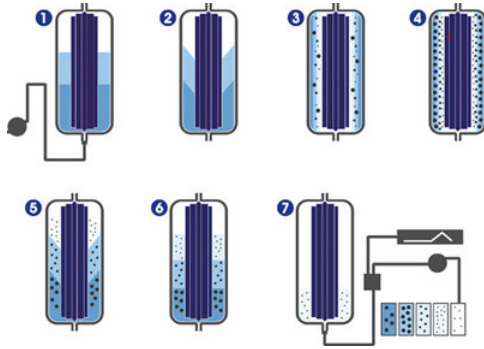
gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

16



## Centrifugazione zonale (con centrifuga apposita)



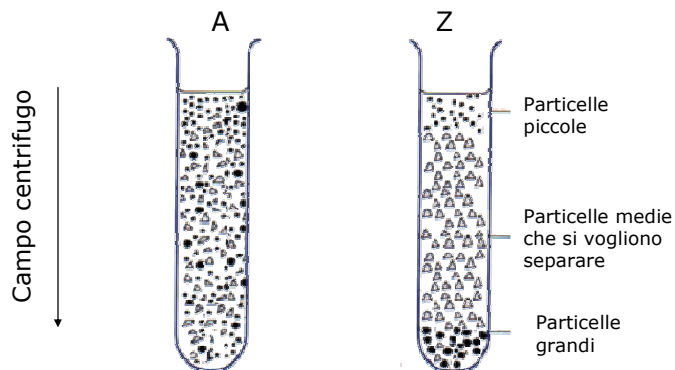
1. Il gradiente è caricato nel rotore.
2. il rotore è accelerato lentamente, il gradiente si riorienta
3. Il campione è pompato ad una estremità del rotore
4. Il campione sedimenta radialmente
5. Alla fine il rotore decelera lentamente,
6. Il gradiente si riorienta senza disturbare le bande di particelle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

gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

17

## Centrifugazione isopicnica



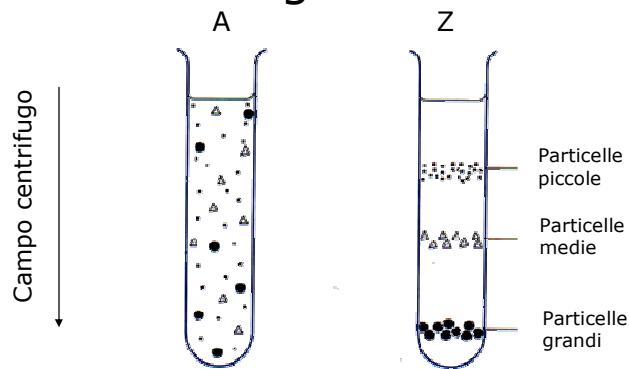
- All'inizio le particelle sono disperse nel mezzo (A) che ha densità uguale a quella delle particelle che si vogliono separare, alla fine (Z) le particelle galleggiano alla densità del mezzo uguale alla loro.

gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

18

## Centrifugazione isopicnica con gradiente



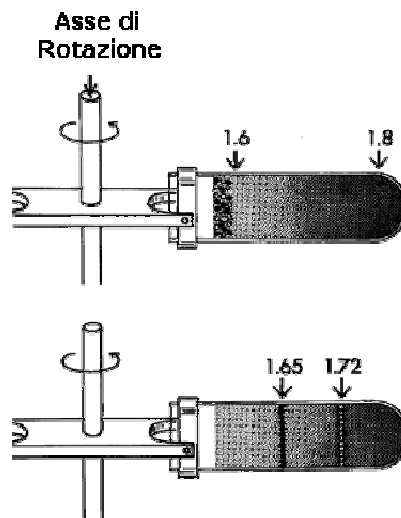
- All'inizio le particelle sono disperse nel mezzo (A), durante la centrifugazione si forma il gradiente, alla fine (Z) le particelle galleggiano alla densità del gradiente uguale alla loro.

gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

19

## Gradiente su rotore swing-out



gs © 2001-2006 ver 3.0

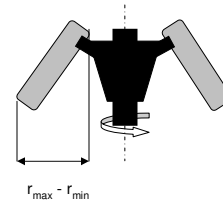
Misure con biomarcatori III

20

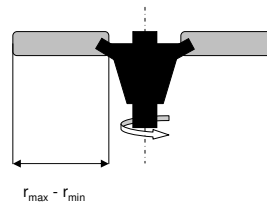
# Rotori

- 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

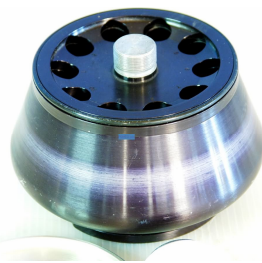


# Rotori

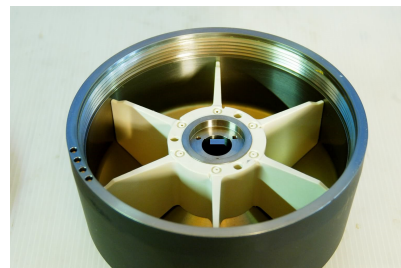
- Rotore swing-out



- Rotore ad angolo Fisso



- Rotore zonale



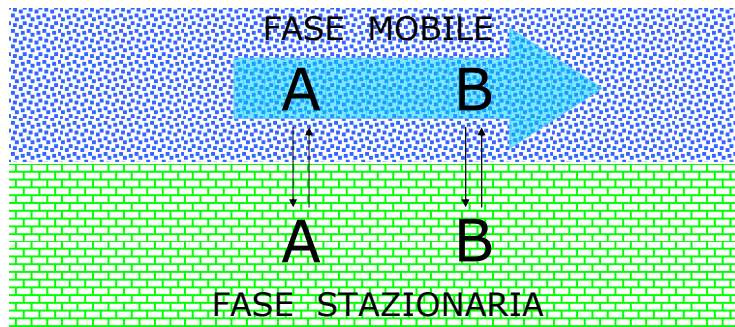
# Tecniche separative: Cromatografia

## 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 - $\alpha$

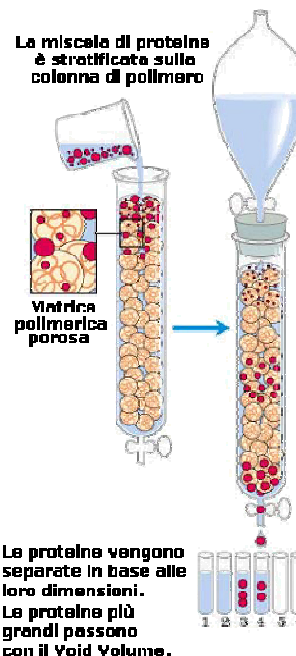
- Il coefficiente di partizione tra le due fasi,  $\alpha$ , è definito come il rapporto tra il soluto adsorbito sulla fase stazionaria rispetto a quello in soluzione nella fase mobile.

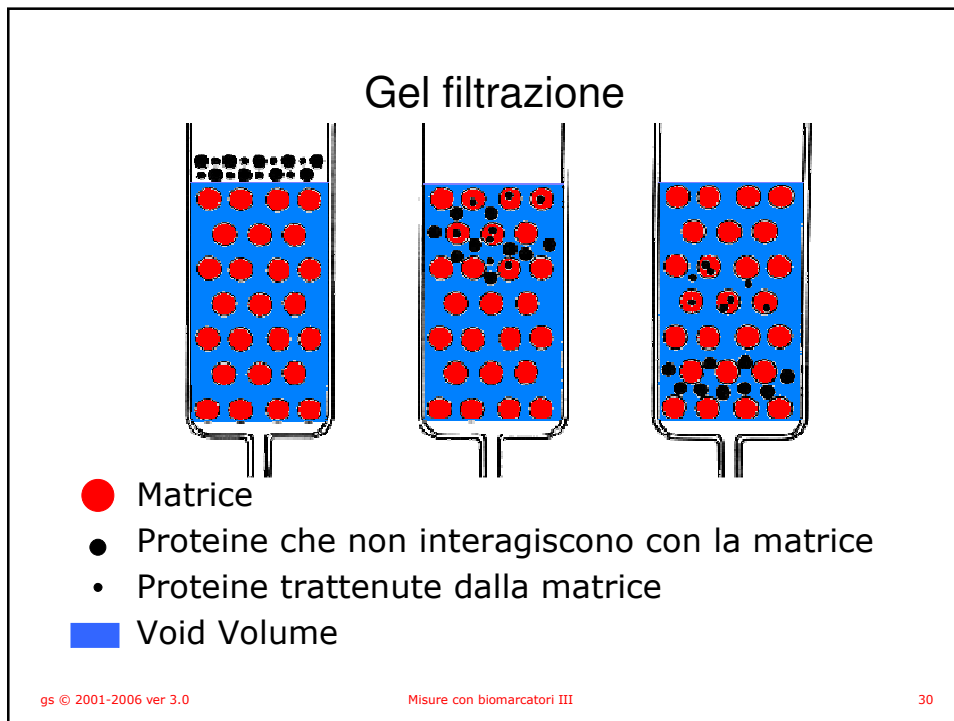
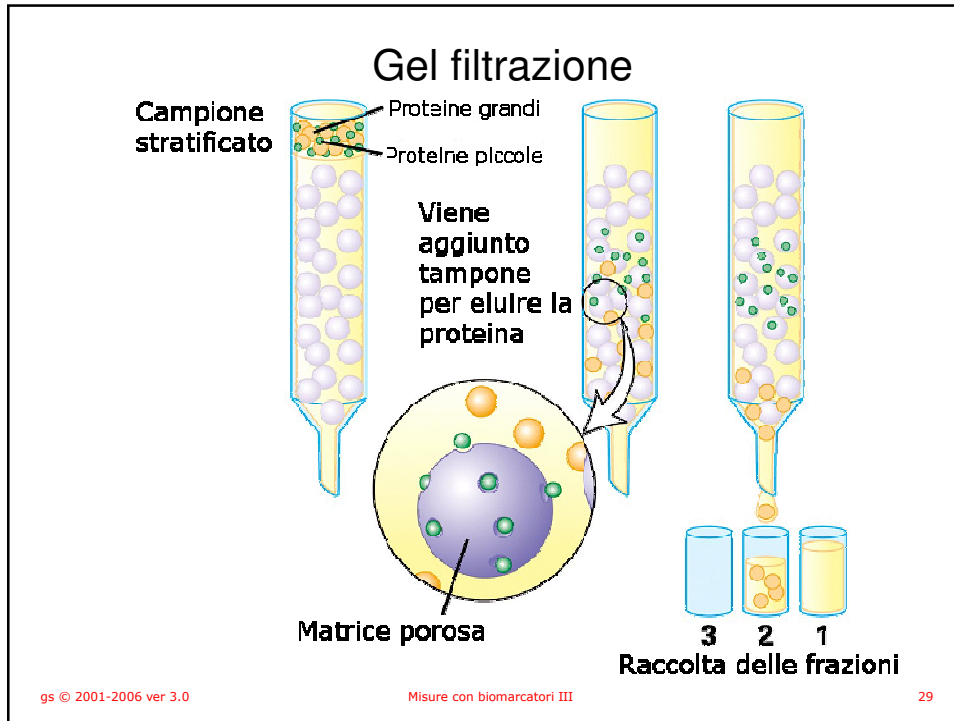
$\alpha = 0$  nessun adsorbimento

$\alpha = 1$  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).



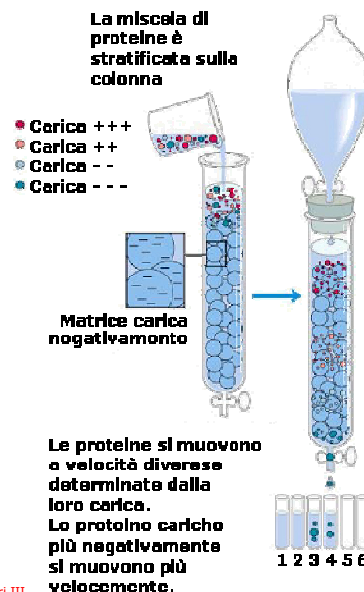


## Gel filtrazione

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

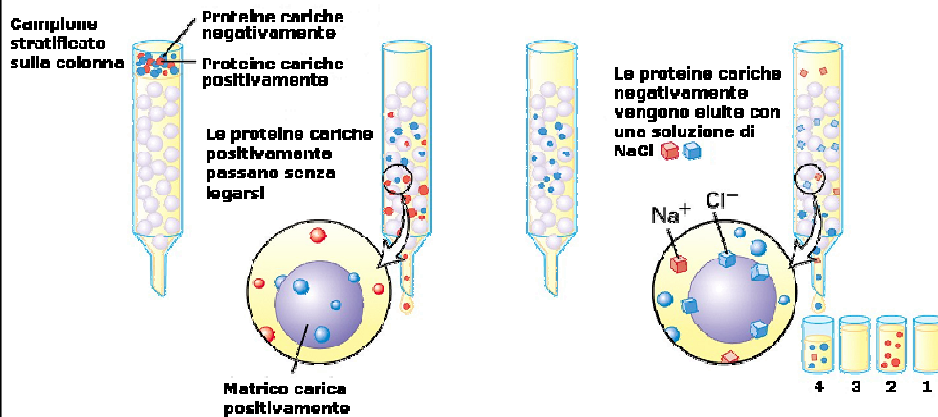
## Cromatografia scambio ionica

- **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.





## Cromatografia scambio ionica



gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

33

## Cromatografia scambio ionica

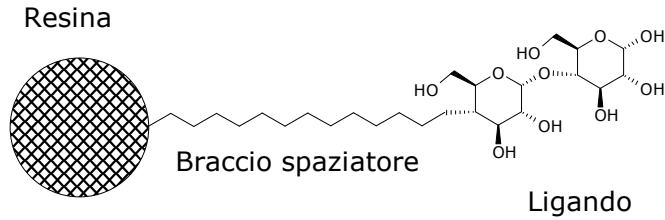
- **VANTAGGI**
  - Per grandi volumi,
  - Grandi quantità di proteina (1-5 g proteina per 100 ml),
  - Matrice molto robusta,
  - Condizioni molto flessibili, possibili molte variazioni.
- **SVANTAGGI**
  - Proteine allo stesso pH e concentrazioni di sali della colonna.
  - Ciò può essere scomodo poiché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

gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

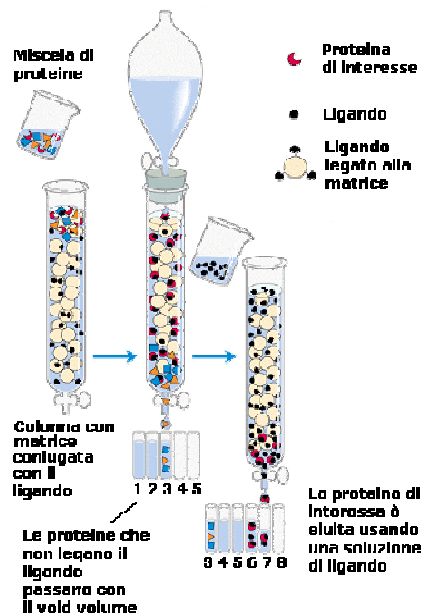
34

# Cromatografia di affinità



# 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.



## 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**

- GST
- MBP
- biotina
- Poli-His

- **LIGANDO**

- Glutathione
- Maltosio
- Avidina
- Nichel, Zinco

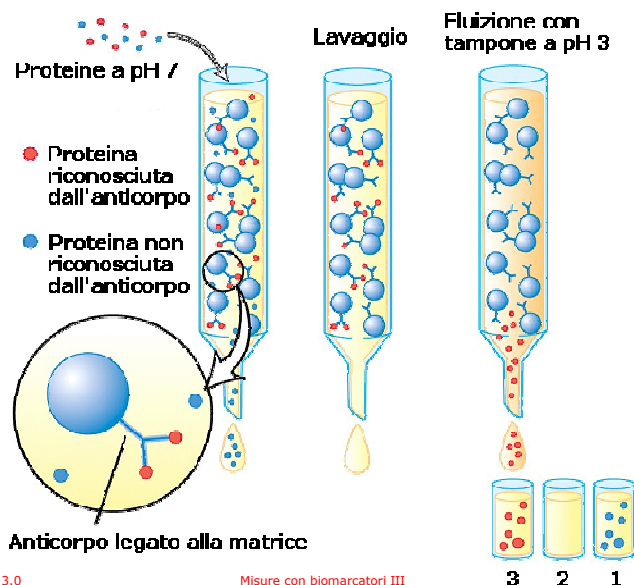
- Le proteine contenenti affinity tags sono poi isolate per cromatografia di affinità con i ligandi legati alla colonna.
- Le proteine isolate possono poi venire primate degli affinity tag attraverso proteolisi specifica.

gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

37

## Cromatografia di affinità con anticorpi



gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

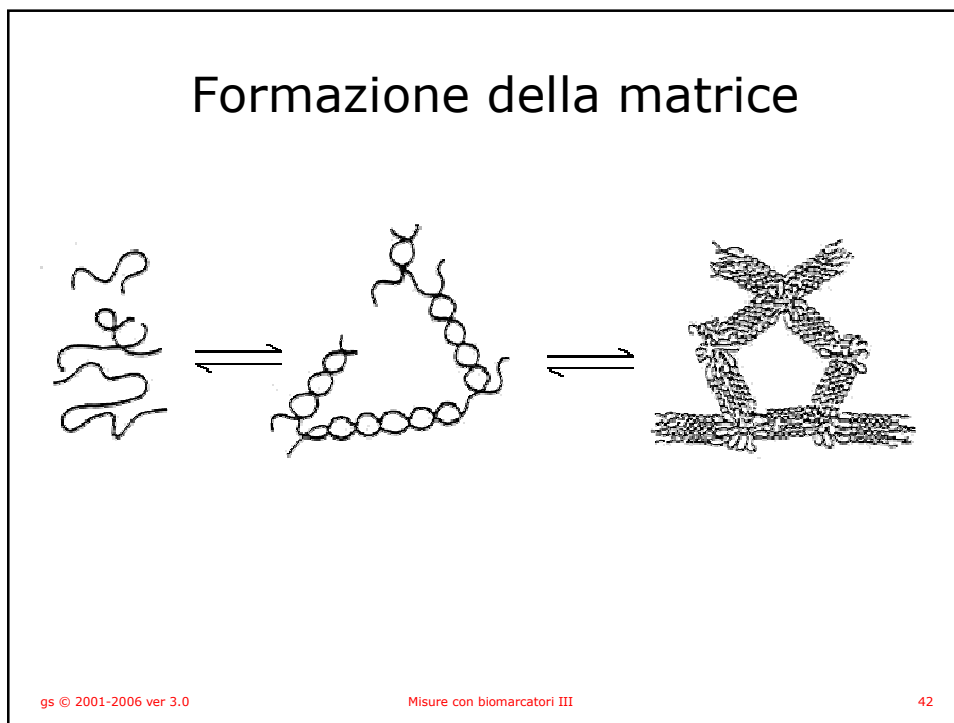
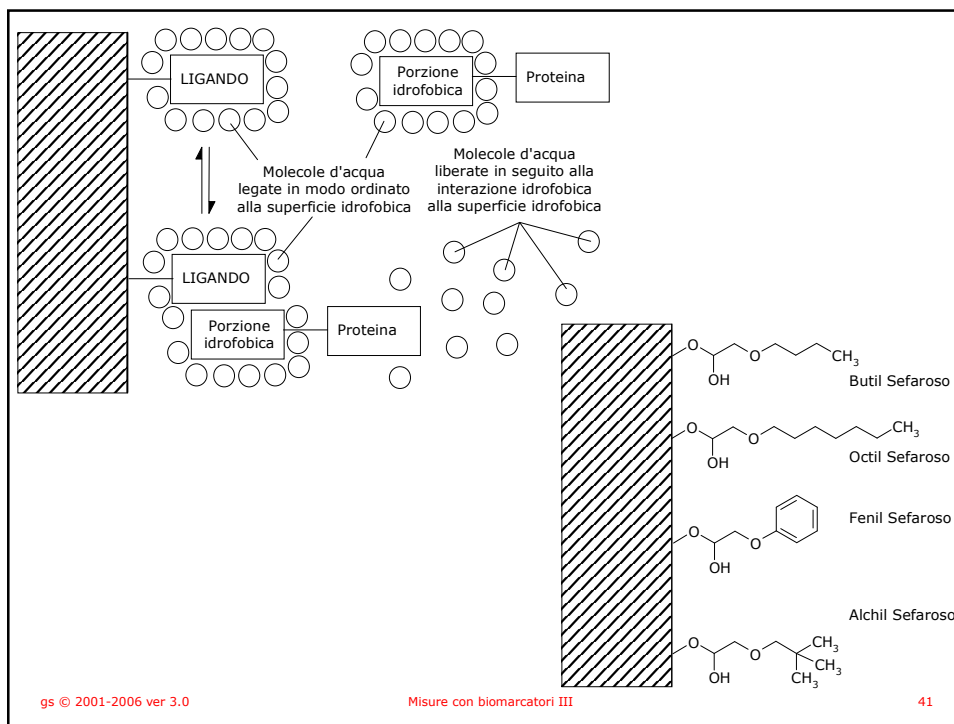
38

## Cromatografia di affinità

- VANTAGGI
- Alta affinità, costanti di dissociazione nell'ordine del  $\mu\text{M}$ , 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.
- 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.



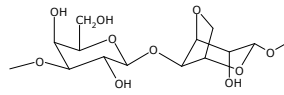
## Tipi di matrici utilizzate

- **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  $\beta$ -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  $\beta$ -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.

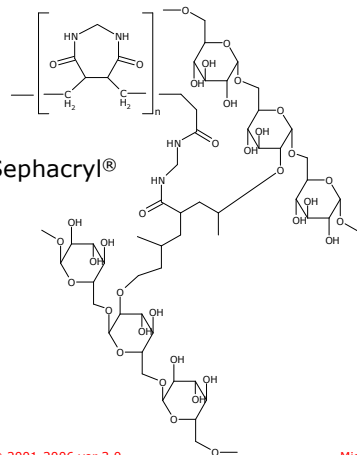
## Tipi di matrici utilizzate

- **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.

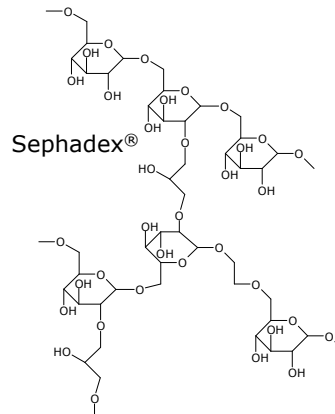
# Matrici



Agarosio

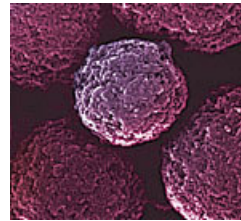


Sephacryl®



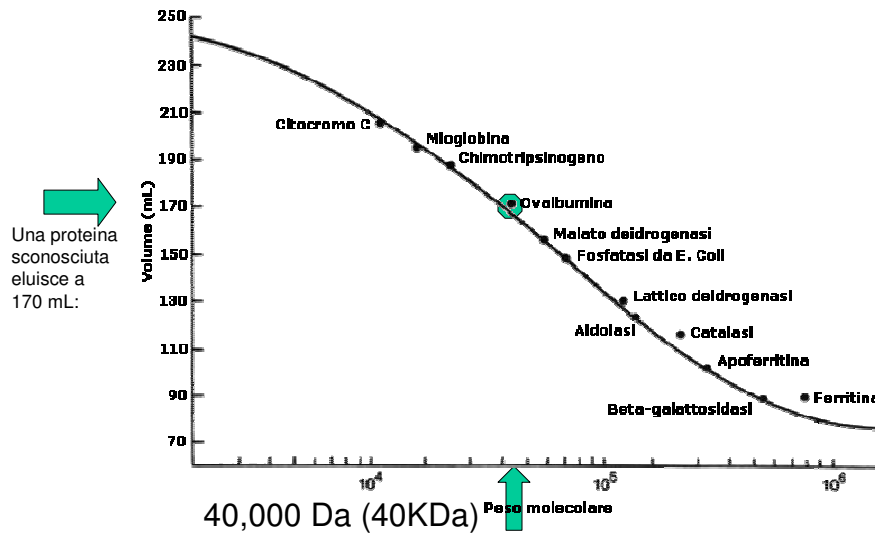
Sephadex®

Silice



# Cromatografia come tecnica analitica

## Determinazione peso molecolare



gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

47

## 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	$1 \times 10^6$ - $150 \times 10^6$
• La velocità dipende dalla forma	
- Denaturazione	

gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

48



## 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,  $\eta$  = viscosità del mezzo)

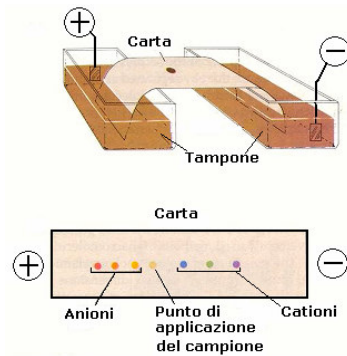
- Quando si bilanciano:

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

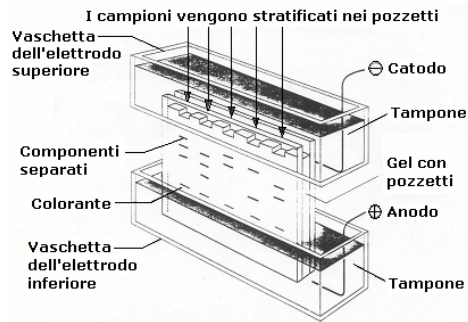
$$\text{mobilità elettroforetica : } \mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{f}$$

# Elettroforesi su supporto

su carta



su gel



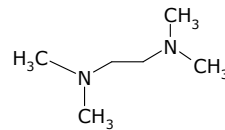
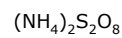
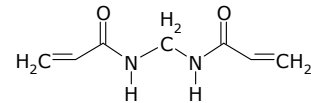
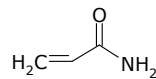
gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

51

# 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

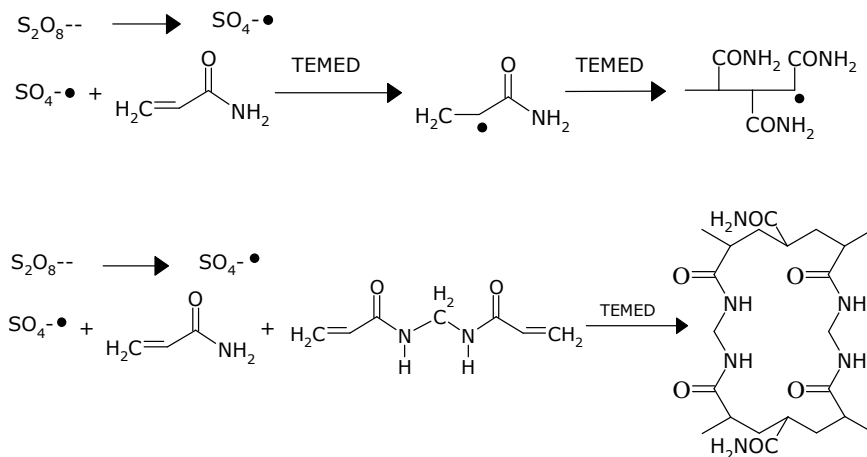


gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

52

## Polimerizzazione



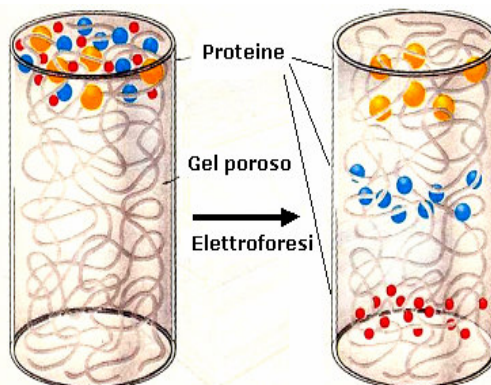
gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

53

## 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.



gs © 2001-2006 ver 3.0

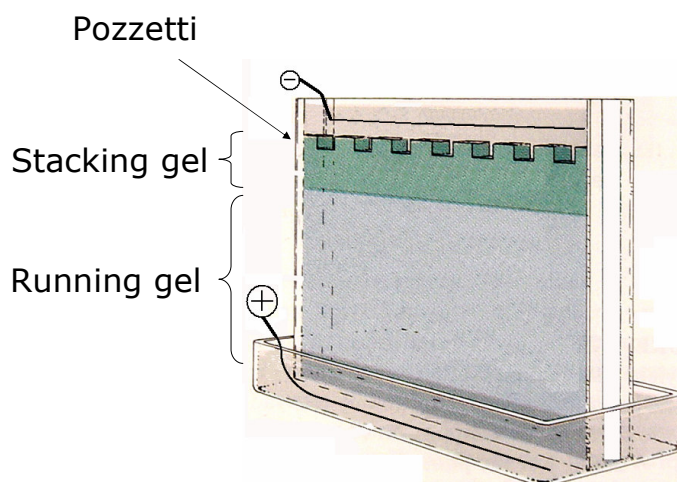
Misure con biomarcatori III

54

## 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%	



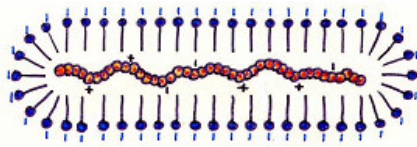
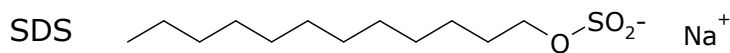
gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

57

## SDS-PAGE

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



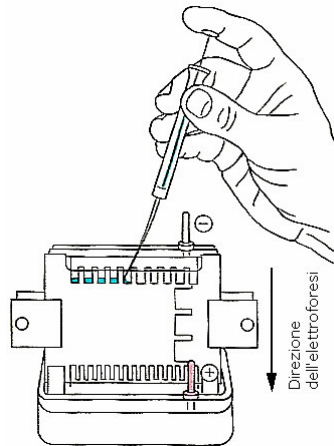
- Permettendo la determinazione dei pesi molecolari.

gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

58

## Caricamento di un gel

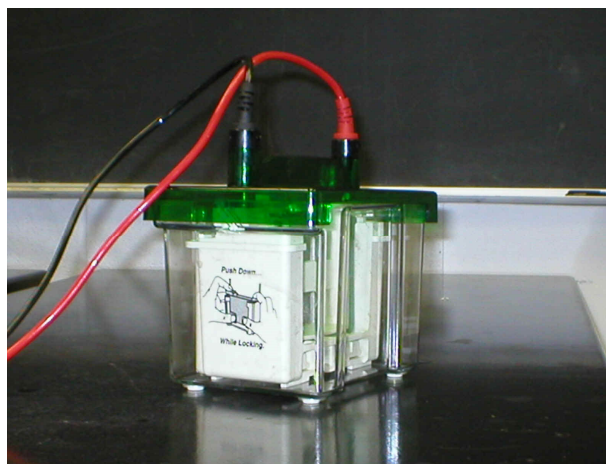


gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

59

## Cella per elettroforesi

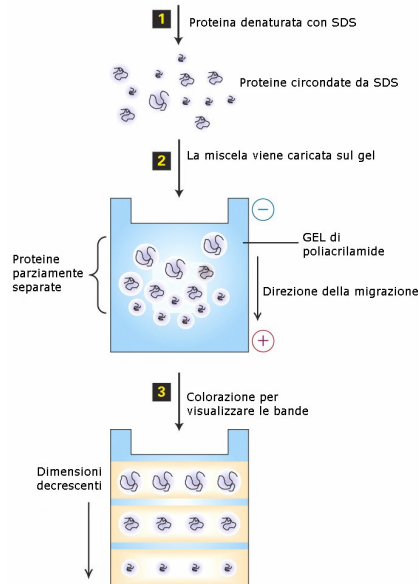


gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

60

## SDS-PAGE



- Separazione di proteine denaturate

gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

61

## 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.

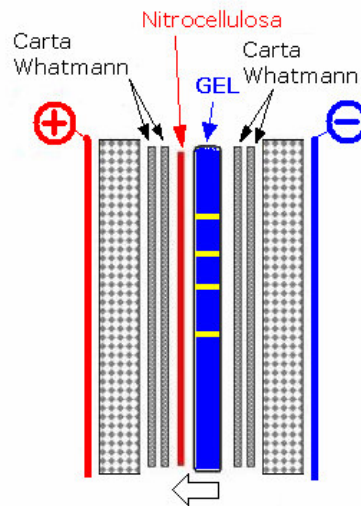
gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

62

## Colorazioni del GEL

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



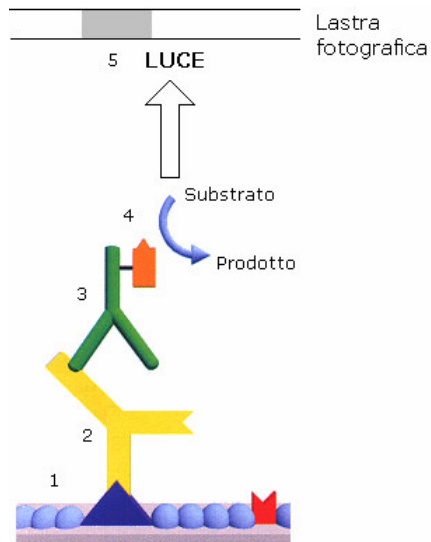
gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

63

## 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



gs © 2001-2006 ver 3.0

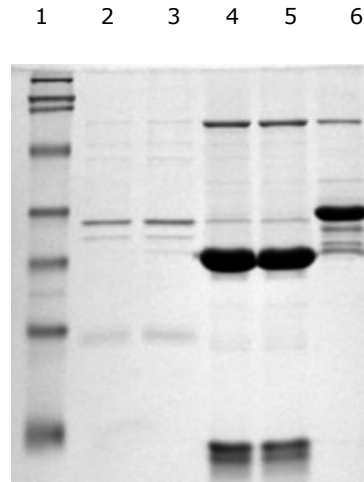
Misure con biomarcatori III

64



# Risultato

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

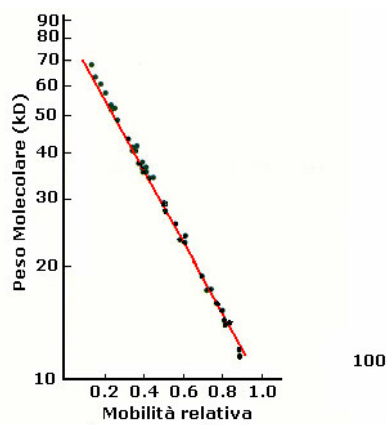


gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

65

# Risultato



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

gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

66

# 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

$\lambda$ (nm)	$\nu$ (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)

gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

69

### Principio di Frank-Condon:

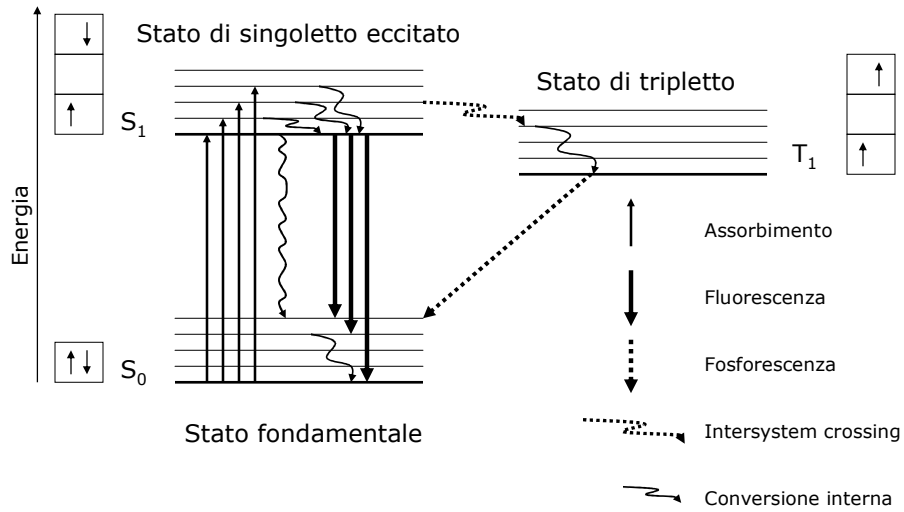
*Durante la transizione NON CAMBIA LA POSIZIONE degli atomi della molecola.*

gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

70

## Le transizioni elettroniche (Diagramma di Jablonsky)

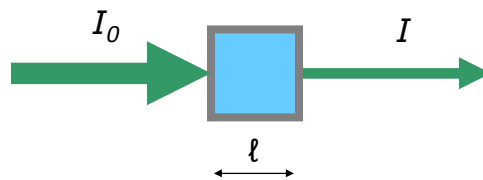


gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

71

## Legge di Lambert-Beer



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

$$0 < T < 1$$

La trasmittanza  $T$  è una funzione esponenziale di:  
 $l$  = percorso ottico  
 $\epsilon$  = assorbanza  
 concentrazione unitaria  
 $C$  = concentrazione

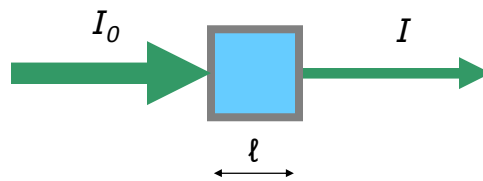
$$T = 10^{-\epsilon l c}$$

gs © 2001-2006 ver 3.0

Misure con biomarcatori III

72

## Legge di Lambert-Beer



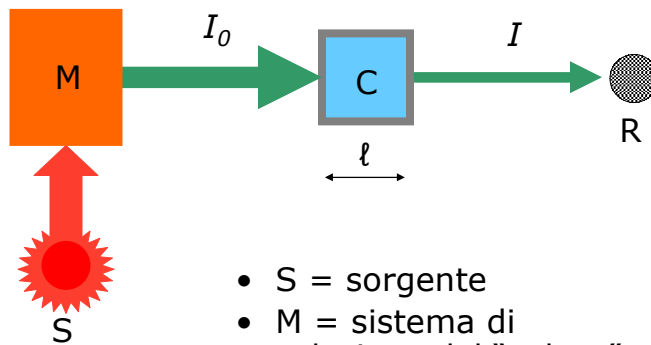
Trasmittanza

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

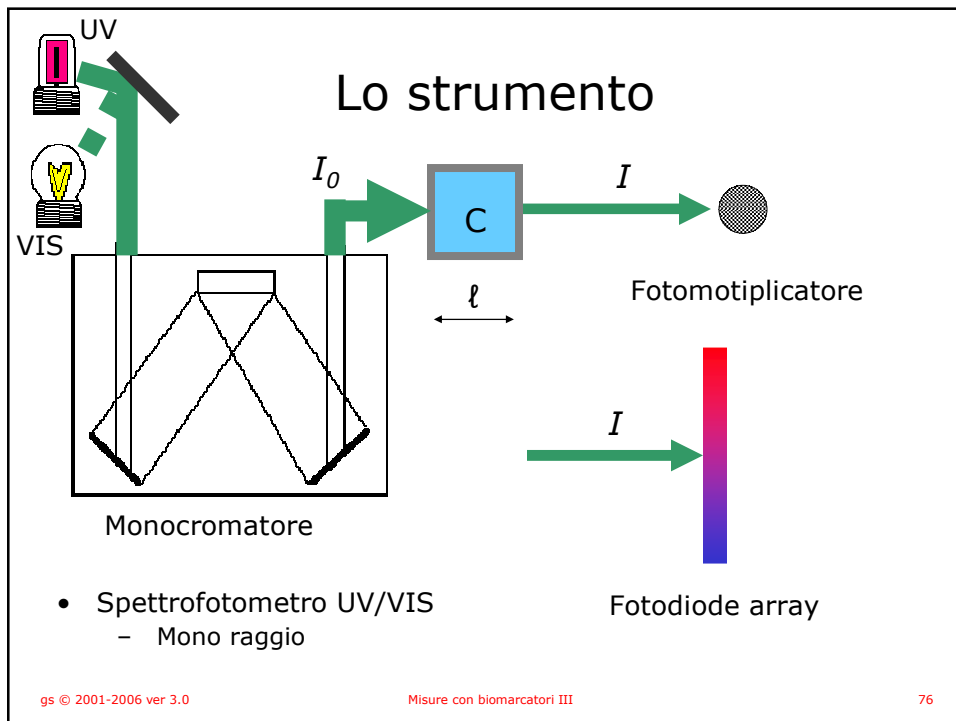
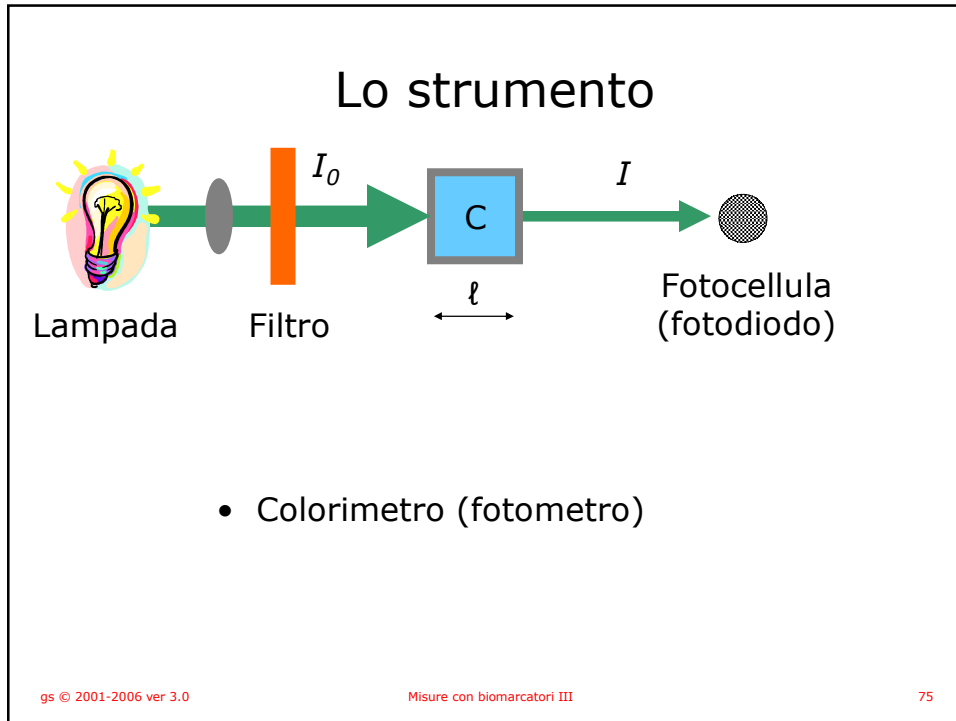
$$-\log T = \log \frac{1}{T} = \epsilon l c = A$$

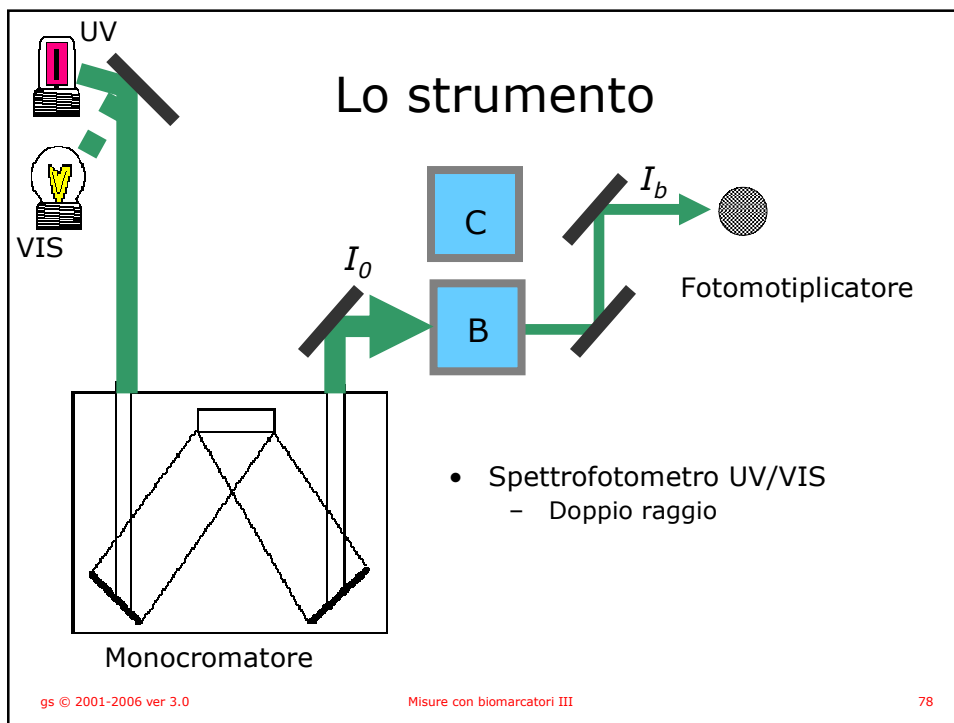
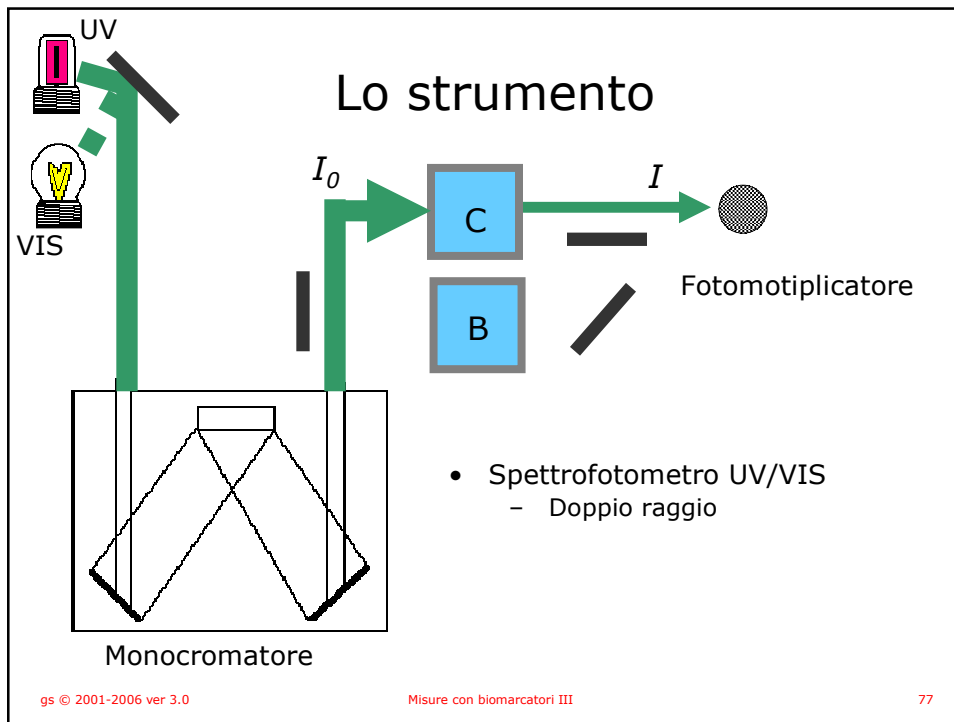
Assorbanza

## Lo strumento



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



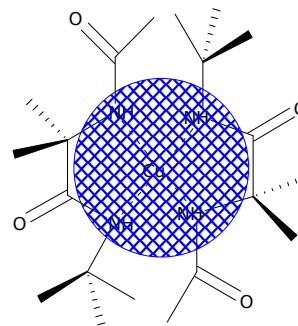


## Determinazione colorimetrica di proteine

- 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:
  - $\text{CuSO}_4$  in ambiente basico
  - Formazione di complessi rameici con i legami peptidici
  - Assorbimento a 550 nm
  - Interferiscono ioni  $\text{NH}_4^+$
  - Si producono ioni  $\text{Cu}^+$
- Folin-Lowry
  - Gli ioni  $\text{Cu}^+$  riducono una miscela di acidi misti fosfomolibdotungstici (reattivo di Folin-Ciocalteu)
  - Assorbimento a 750 nm





## Referenze sul WEB ...

- Vie metaboliche
  - KEGG: <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
    - Degradazione degli xenobiotici:  
<http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01196.html>
- Struttura delle proteine:
  - Protein data bank (Brookhaven): <http://www.rcsb.org/pdb/>
  - Hexpasy
    - Expert Protein Analysis System: <http://us.expasy.org/sprot/>
    - Prosite (protein families and domains): <http://www.expasy.org/prosite/>
    - Enzyme (Enzyme nomenclature database):  
<http://www.expasy.org/enzyme/>
  - Scop (famiglie strutturali): <http://scop.berkeley.edu/>
- 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/>
- Database di biocatalisi e biodegradazione: <http://umbbd.ahc.umn.edu/>
- Citocromo P450: <http://www.icgeb.org/~p450srv/>
- Metallotioneine: <http://www.unizh.ch/~mtpage/MT.html>
- Tossicità degli xenobiotici: Agency for Toxic Substances and Disease Registry  
<http://www.atsdr.cdc.gov>

## ...e naturalmente

- Questo ed altro materiale può essere trovato visitando il sito: <http://www1.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