



Prof Barbara Manconi  
Corso di Laurea in CTF  
Lezioni di Biochimica Applicata.

E' vietata la copia e la riproduzione dei contenuti e immagini in qualsiasi forma.

E' inoltre vietata la redistribuzione e la pubblicazione dei contenuti e immagini non autorizzate espressamente dall'autore.

**Di seguito titolo, autore e editore delle fonti da cui sono state prese le immagini e i video mostrati durante le lezioni di **Biochimica applicata** come supporto didattico e utili per la preparazione dell'esame:**

Biochimica applicata  
(Stoppini- Bellotti, Ed. EdiSES)

Metodologie Biochimiche  
Bonaccorsi di Patti–Contestabile-Salvo.  
(Casa ed. Ambrosiana/ Zanichelli)

**Corso da 5 CFU:**

**4 CFU (32 ore) lezioni frontali**



**Biochimica Applicata**

**1CFU (12 ore ) Laboratorio**



**Esercitazioni di laboratorio sulle  
principali metodologie di  
Biochimica Applicata**

Tutor Didattico:

Dott.ssa Alessandra Schirru

# **PROGRAMMA DI BIOCHIMICA APPLICATA (5 CFU)**

**Passaggi iniziali di purificazione:**

**Cromatografia:**

**Elettroforesi:**

**Fotometria e Spettrofotometria UV/VIS:**

**Purificazione delle proteine: lab.informatico (?)**

Genoma  
(insieme dei geni di un organismo vivente)

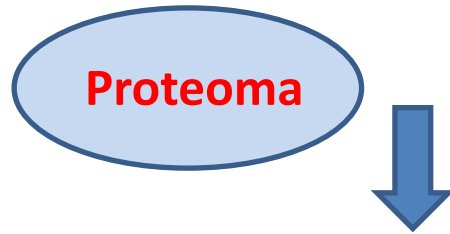
Proteoma  
(insieme delle proteine di un organismo vivente)

Ma solo teoricamente possiamo ipotizzare quali proteine dovrebbero essere presenti

a partire dal genoma **non** possiamo stabilire:

- quali siano realmente espresse in ogni specifico tessuto
- se subiscono modificazioni post-traduzionali (fosforilazione, glicosilazione)
- quale sia la loro funzione

Solo con l'analisi del contenuto proteico  
di una cellula o di un tessuto  
possiamo ottenere tali informazioni



Il complesso delle proteine espresse da un organismo, un tessuto, una cellula o un singolo organello.

Il termine **Proteomica** introdotto per la prima volta nel 1994 da Marc Wilkins e collaboratori,  
rappresenta

Insieme delle tecniche molecolari applicabili allo studio delle proteine espresse da un genoma in un sistema biologico che può essere rappresentato da un organismo, un tessuto, una cellula o un singolo organello.

Quali tipi di studi ci permette di fare la proteomica

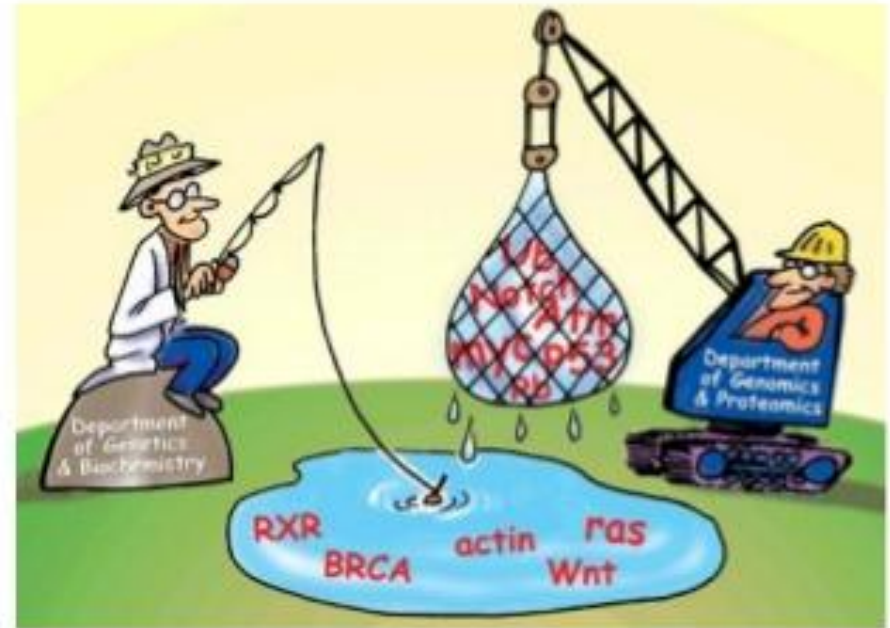
?

- Identificazione nuove proteine o nuove funzioni
- Studio degli effetti di un farmaco
- Confronto tessuto normale con uno malato
- Cambiamenti durante i diversi stadi del ciclo cellulare

# WHAT IS PROTEOMICS?

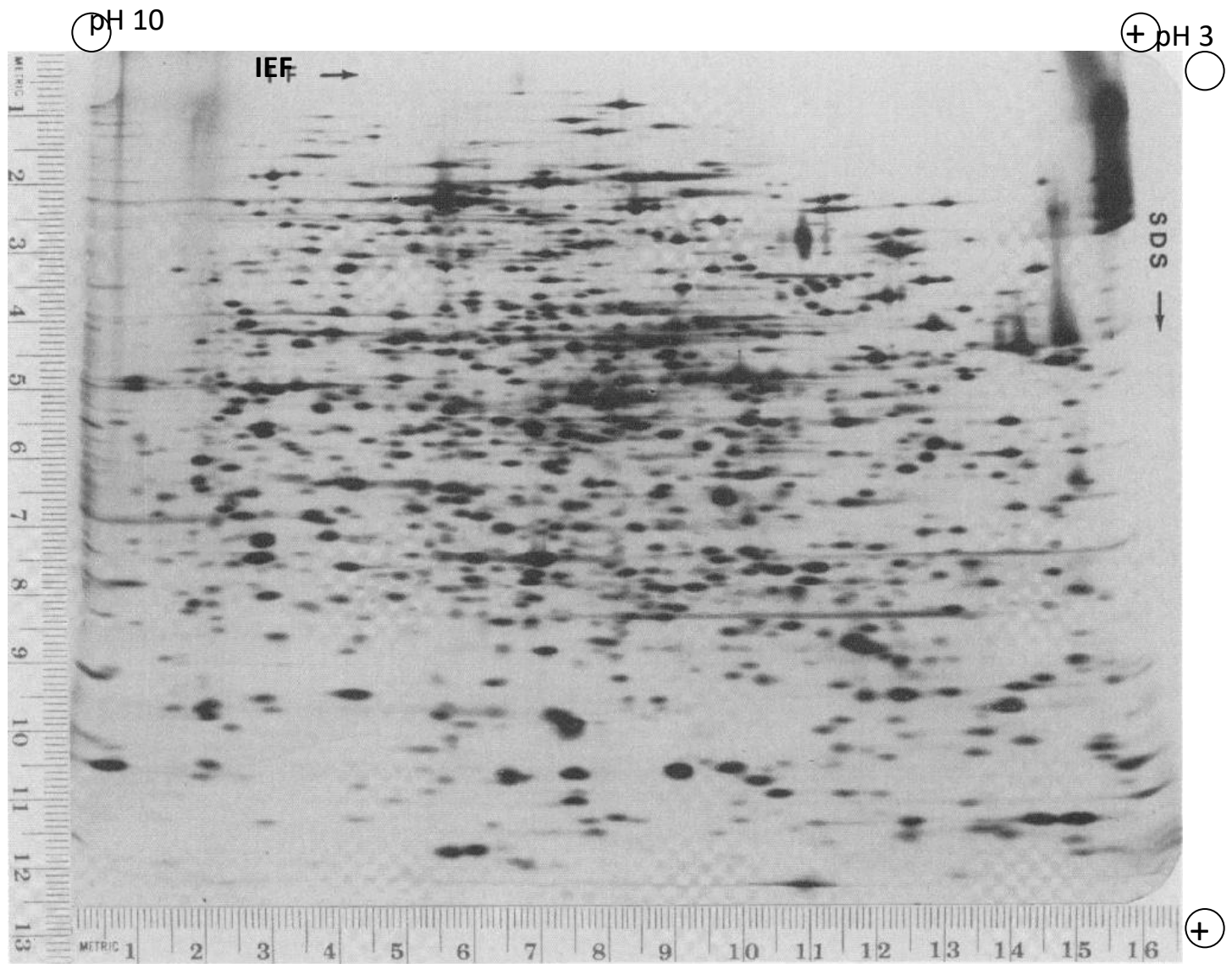
The analysis of complete complements of proteins: identification and quantification; modifications; interactions; and activities. FUNCTION.

AND HOW DO THESE CHANGE DURING A BIOLOGICAL RESPONSE?



Science 291 (2001) 1221.

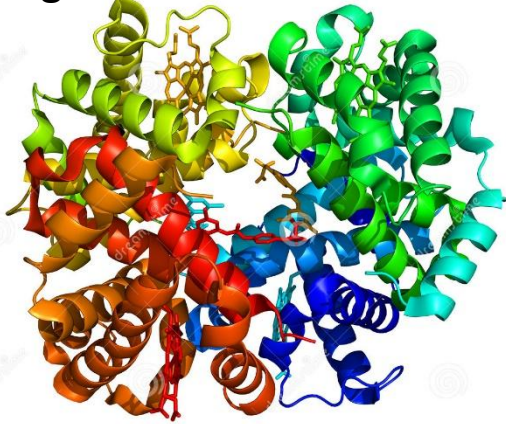
> la proteomica si avvale ampiamente di tecniche biochimiche di base per la preparazione, la separazione e l'analisi dei campioni proteici, integrando questi metodi tradizionali con tecnologie avanzate come la spettrometria di massa



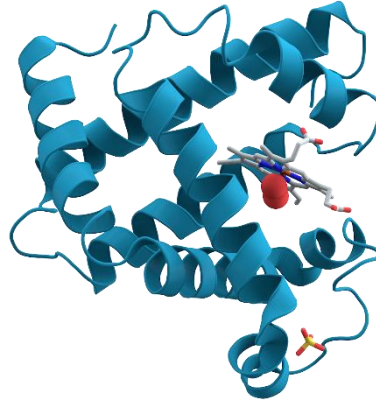
2D-PAGE di un lisato di cellule di *E. coli* 10 $\mu$ g di proteine  $\rightarrow$  1000 macchie  
1 $^{\circ}$  elettroforesi bidimensionale pubblicata nel 1975

Oggi è nota la sequenza di più di **10.000** proteine:

emoglobina



Catene alfa 141 aminoacidi  
Catene beta 146 aminoacidi



mioglobina

153 aminoacidi

Per la maggior parte degli studi di caratterizzazione delle proteine è necessario **che la proteina di interesse sia stata purificata**

E' difficile purificare una proteina?

Una proteina è in genere presente in **piccole quantità**  
nel materiale di partenza 0.001-10%

E' necessario scegliere opportunamente la fonte

Rimozione della proteina dal suo ambiente naturale  
aumenta la probabilità di denaturazione

Ciascuna proteina è un caso a sé

Il protocollo di purificazione deve essere messo a punto sperimentalmente  
per ciascuna proteina

# Ricerca bibliografica

- Moltissimo (quasi tutto) è disponibile nella bibliografia specifica.
- Bibliografia: <http://www.pubmed.org>
- Struttura proteine: <http://www.rcsb.org>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

# Strategia di purificazione di una Proteina

## ▪ Tipo di studio



### Studi enzimatici

(non è necessaria una purezza del 100%)

### Studi strutturali

(elevato grado di purezza)

## ▪ Quantità



- Analitica
- Preparativa

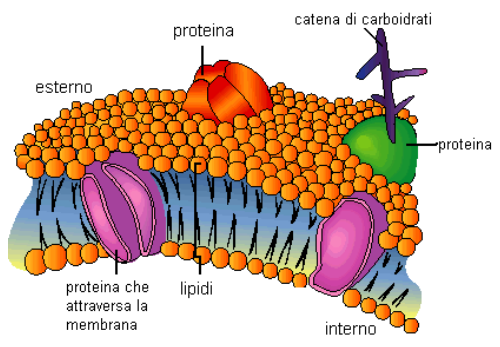
Le **tecniche analitiche** servono per identificare e quantificare i componenti di un campione, mentre quelle **preparative** mirano a isolare e purificare quantità significative di sostanze per usi successivi

## Localizzazione



- Extracellulare
- Intracellulare
- Proteina di membrana :
  - periferica
  - Integrale

# Strategia di purificazione di una Proteina in base alla sua LOCALIZZAZIONE



## ▪ Extracellulare

- circolanti nel siero
- brodo di coltura



## ▪ Centrifugazione



## ▪ Filtrazione

## Intracellulare

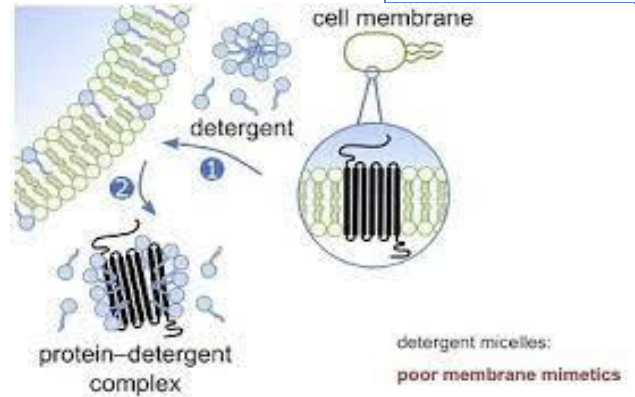


- Rottura delle cellule (Tipo di cellula)

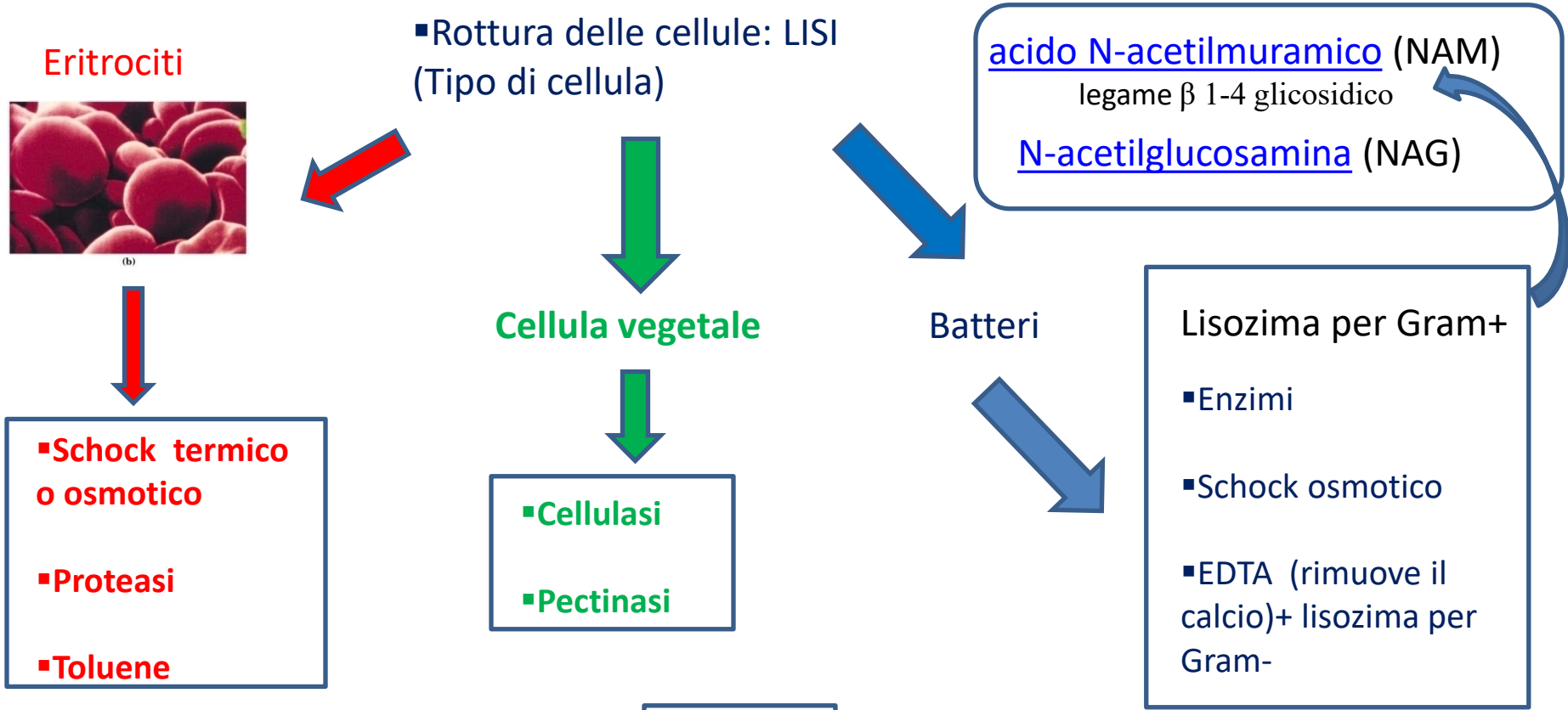
## Proteina di membrana :

**Periferica**  
 (legami H e attrazioni elettrostatiche)  
 Variazione del pH  
 O della forza ionica

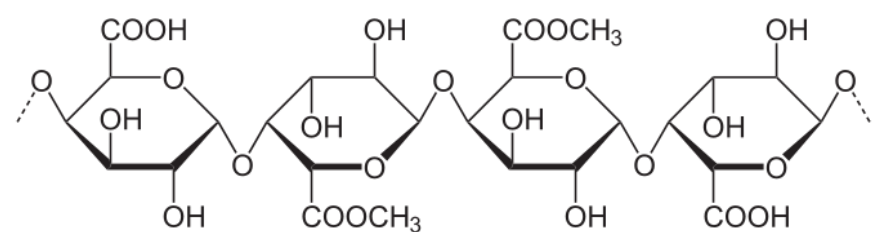
**Integrale**  
 (interazioni idrofobiche)  
**Detergenti che contengono catene lipofile (Triton X-100)**



# ESTRAZIONE DELLE PROTEINE intracellulari DALLE CELLULE



**pectina**



acido galatturonico con legami di tipo  $\alpha$ -(1-4)

La degradazione delle membrane operata da solventi organici (ad es., 0.5% toluene, etile acetato)

Il rilascio di enzimi idrolitici endocellulari completa la degradazione delle membrane.

# ROTTURA DELLE CELLULE E Omogenizzazione DEL Tessuto

L'**omogeneizzazione** consiste in azione meccanica mediante la quale un tessuto o cellule vengono resi omogenei.

## Condizioni sperimentali ottimali per l'omogeneizzazione di tessuti e cellule:

- Si opera in ghiaccio, a circa 4°C e si usano inibitori di proteasi.
- A basse temperature si bloccano le attività enzimatiche proteolitiche e digestive che si trovano nei lisosomi e nei perossisomi e che si possono liberare durante la lisi.
- uso di tamponi ipotonici a pH fisiologico (7.4) e di detergenti, per solubilizzare proteine.

I **LISOSOMI** sono vescicole formate da un doppio strato lipidico, contenenti enzimi che funzionano a pH acido, dette idrolasi acide, per la digestione intracellulare di macromolecole (ottenute dalle cellule che fagocitano al proprio interno piccole particelle della macromolecola); presenti solo nelle cellule eucariote.

Nei **PEROSSISOMI** si svolgono importanti funzioni metaboliche come lo smaltimento delle tossine, l'accorciamento degli acidi grassi a lunga catena e altre. Le reazioni chimiche avvengono servendosi di ossigeno molecolare, O<sub>2</sub>, che reagendo con i substrati produce perossido di idrogeno, una specie chimica molto reattiva che viene subito convertita in acqua e ossigeno all'interno del perossisoma proteggendo la cellula da potenziali danni.

# ROTTURA DELLE CELLULE E Omogenizzazione DEL Tessuto

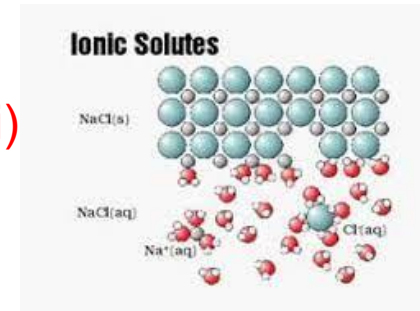
## Scelta del tampone

### Caratteristiche dei tamponi usati per l'estrazione delle proteine:

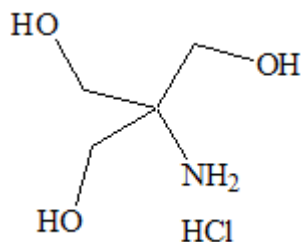
- Elevata solubilità (TRIS; Fosfato) (mantiene il pH fisiologico)
- Non penetrare attraverso le membrane
- Non assorbire la luce nella regione del visibile
- Non essere tossico

## Deve contenere:

- Ioni per mantenere la pressione osmotica della soluzione tampone simile a quella intracellulare
  - **KCl/ NaCl**
  - **Saccarosio (impedire la lisi osmotica di mitocondri o lisosomi)**
  - **Magnesio (per mantenere l'integrità della membrana)**
- Chelanti degli ioni metallici che legato i gruppi tiolici
  - **EDTA** (acido etilendiaminotetracetico **(rimuove ioni )**)
  - **EGTA** (etilenebis-ossietilenenitrilo-tetracetico **rimuove ioni ma non chela il Mg<sup>++</sup>)**
- Inibitori delle proteasi : **PMSF** (fenilmetilsulfonil fluoruro)
- Composti tiolici antiossidanti
  - **2-mercaptoetanol**,
  - **DTT** (ditiotreitolo)
- Triton X-100 (detergente non ionico) impedisce l'aggregazione di proteine idrofobiche

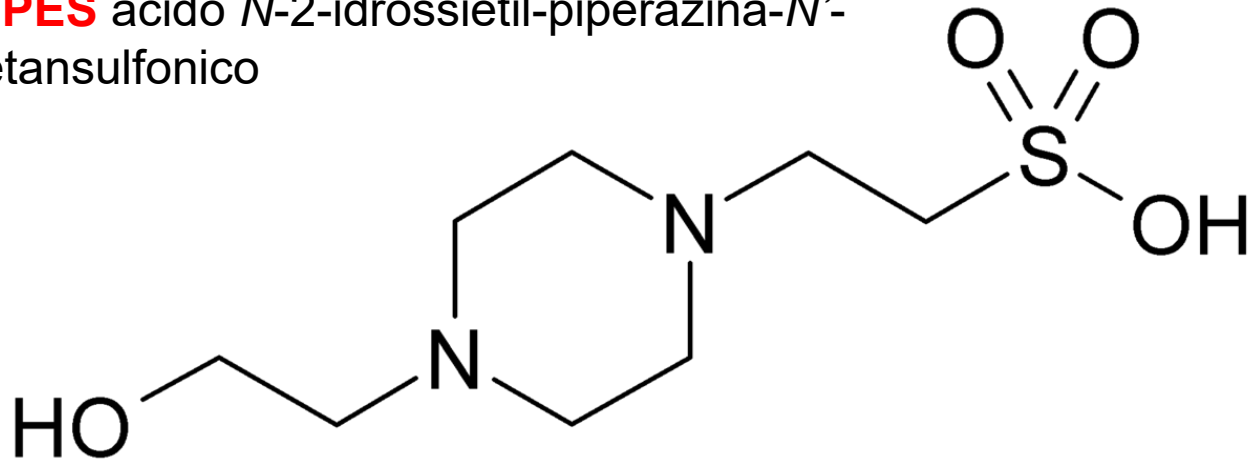


	pKa (a 25°C)	Note
<b>MES</b> acido 2-( <i>N</i> -morfolino)- etansulfonico	6.1	È uno dei cosiddetti 'Good buffers' (dal nome di chi ne ha esplorato l'uso in biochimica e biologia cellulare), come anche Bicina, PIPES, HEPES ed altri. Poco tossico per le cellule.
<b>HEPES</b> acido <i>N</i> -2- idrossietil-piperazina- <i>N'</i> -2- etansulfonico	7.5	Vedi PIPES.
<b>PIPES</b> acido 1,4 piperazindietansulfonico	6.8	Relativamente costoso, ma valido. Interagisce pochissimo con i metalli divalenti (Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> ). Può interferire con il metodo di Lowry per la determinazione della concentrazione proteica.
<b>Tris</b> Tris (idrossimetil)aminometano	8.1	Poco costoso e molto usato. Tuttavia può dare effetti inibitori con molti sistemi enzimatici ed interagire fortemente con i metalli di transizione. Il suo pKa varia sensibilmente con la temperatura



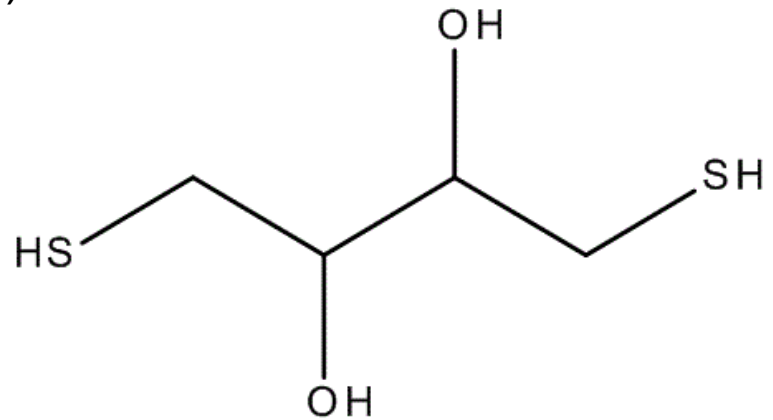
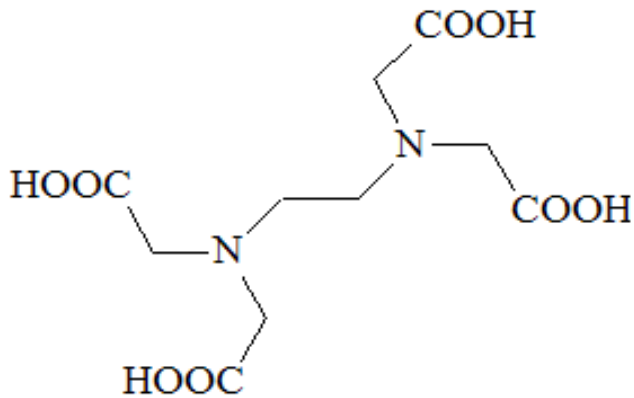
Acido o base	pKa (a 25°C)	Note
Acido acetico	4.75	È efficace come tampone solo a pH acidi (4-5.5).
Acido citrico	4.76 (pKa2) 6.4 (pKa3)	È efficace come tampone a pH <7. Tende a chelare gli ioni polivalenti.
Acido fosforico	7.2 (pKa2) 12.3 (pKa3)	Poco costoso. È spesso metabolita o inibitore di sistemi enzimatici. Tende a precipitare i cationi polivalenti.
Acido borico	9.2	Forma complessi con gli acidi nucleici.
Imidazolo	7.0	
Bicina <i>N,N'</i> -bis-(2-idrossietil) glicina	8.35	
Glicina	9.8 (pKa2)	

**HEPES** acido *N*-2-idrossietil-piperazina-*N'*-2-etansulfonico



**-DTT** (ditiotreitolo)

**-EDTA** (acido etilendiamino tetraacetico)



# Metodi di lisi cellulare

Tecnica	Applicazione
<b>Metodi non meccanici</b>	
Shock osmotico	Tessuti animali molli, alcune cellule vegetali
Congelamento/scongelamento	Tessuti animali molli, alcuni batteri
Enzimi litici	Cellule animali e vegetali
Detergenti (NP40, SDS)	Cellule in coltura, batteri
<b>Metodi meccanici</b>	
Pestello e mortaio	Tessuti resistenti
Sfere di vetro	Batteri e funghi
Omogenizzatore a motore	Tessuti vegetali e animali
Omogenizzatore a mano	Tessuti molli delicati
Estrusione solida (Hughes press)	Materiale vegetale resistente
Estrusione liquida (French press)	Microorganismi
Ultrasonificazione	Microorganismi

# Metodi per rompere le cellule

- **-metodi blandi:**
  - lisi per osmosi
  - digestione enzimatica
  - solubilizzazione chimica
  - omogenizzatori
- **-metodi moderati**
  - omogenizzatori a lama
  - mortaio
- **-metodi vigorosi**
  - French press
  - Sonicazione
  - Macinazione con microsfere

# Disintegrazione cellulare

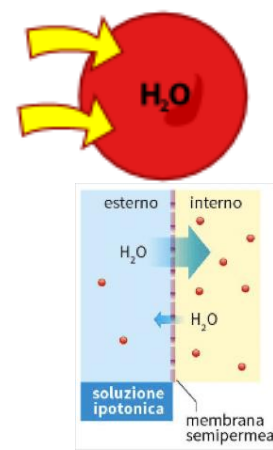
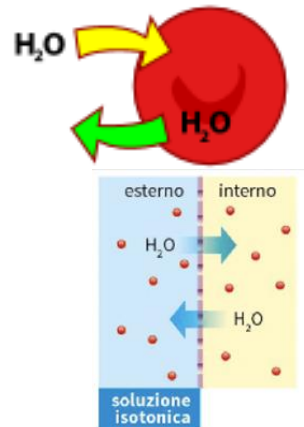
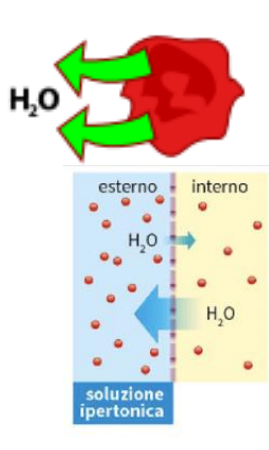
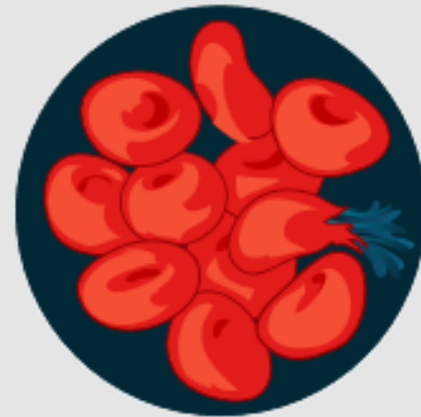
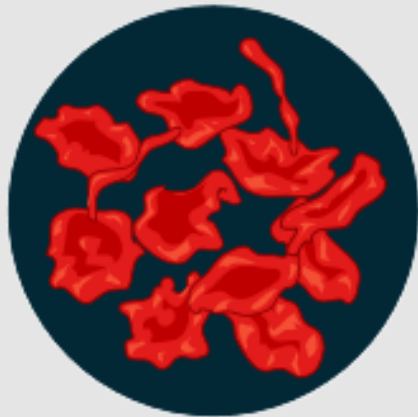
Metodi non meccanici blandi:

- Shock osmotico (globuli rossi in acqua),

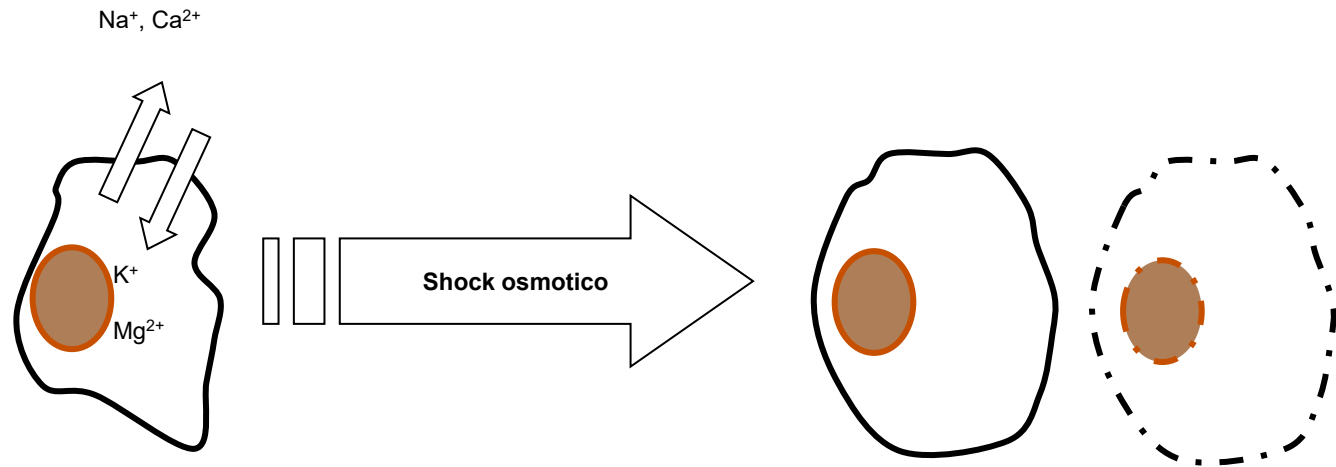
Iperotonico

Isotonico

Ipotonico



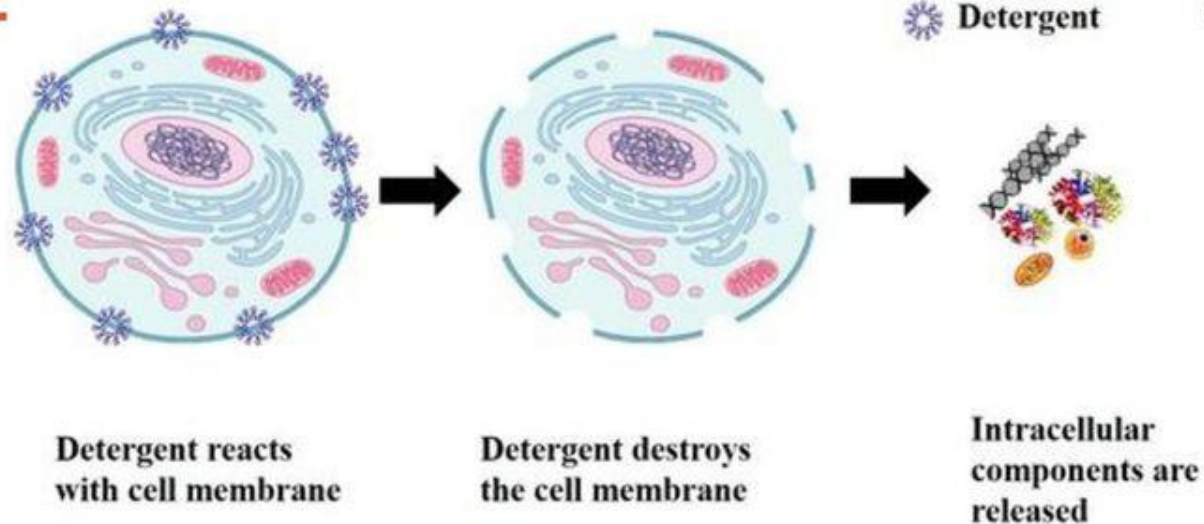
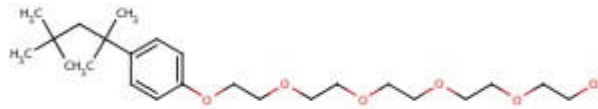
L'osmosi è un processo fisico spontaneo in cui un solvente (solitamente acqua) attraversa una membrana semipermeabile, passando da una soluzione meno concentrata (ipotonica) a una più concentrata (ipertonica), fino a raggiungere l'equilibrio delle concentrazioni.



Le cellule animali riescono a mantenere costante la concentrazione intracellulare di soluti scambiando attivamente (consumo di ATP) ioni con l'esterno.

Un abbassamento drastico della pressione osmotica esterna (immersione in acqua distillata) provoca un rigonfiamento delle cellule ed una 'esplosione' delle membrane.

# Lisi del campione : DETERGENTI



- TritonX, Tween, sono detergenti non ionici: separano gli acidi nucleici dalle proteine e inibiscono le nucleasi
- CTAB: detergente anionico che ha la capacità di formare complessi con il DNA e con proteine e polisaccaridi. Favorisce la purificazione da polisaccaridi, fenoli e altre impurità che spesso si trovano associate al DNA

# Metodi di lisi cellulare

Tecnica	Applicazione
<b>Metodi non meccanici</b>	
Shock osmotico	Tessuti animali molli, alcune cellule vegetali
Congelamento/scongelamento	Tessuti animali molli, alcuni batteri
Enzimi litici	Cellule animali e vegetali
Detergenti (NP40, SDS)	Cellule in coltura, batteri
<b>Metodi meccanici</b>	
Pestello e mortaio	Tessuti resistenti
Sfere di vetro	Batteri e funghi
Omogenizzatore a motore	Tessuti vegetali e animali
Omogenizzatore a mano	Tessuti molli delicati
Estrusione solida (Hughes press)	Materiale vegetale resistente
Estrusione liquida (French press)	Microorganismi
Ultrasonificazione	Microorganismi



**Homogeniser** A cell suspension is forced under high pressure through a discharge valve and impinges on an impact ring. The discharge pressure is regulated by a spring loaded valve rod.

## Pestello e mortaio



## frullatore



White  
Model KSB3WH

b- omogenizzatori, con pestelli mossi a mano o elettricamente:  
Dounce:  
Potter: teflon vetro



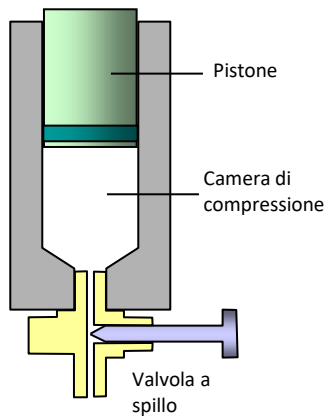
## OMOGENIZZATORE Potter-Elvehjem



Mortaio in vetro borosilicato, pestello in PTFE con asta in acciaio.

Sono costituiti da una provetta in vetro borosilicato e da un pistone in PTFE (Teflon); l' interstizio fra provetta e pistone varia da 0,15 a 0,25 mm.

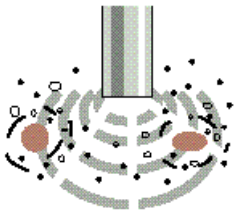
## French press



La **sospensione** di cellule è inserita in una camera di compressione di acciaio inox, dotata di pistone e chiusa da una valvola a spillo. Si rimuove tutta l'aria dalla camera (così che rimanga solo la sospensione di cellule) e mediante il pistone vengono applicate sulle cellule pressioni idrauliche elevatissime (fino a  $10^5$  kPa, cioè 1000 atmosfere).

•Le cellule subiscono una compressione notevole.

## SONICAZIONE (ultrasuoni)



**Sonicazione** Nella sospensione viene immersa la sonda metallica di un sonicatore, che vibrando è in grado di emettere onde sonore ad altissima frequenza.

Le cellule vengono rotte dalle elevate pressioni locali indotte da queste onde.

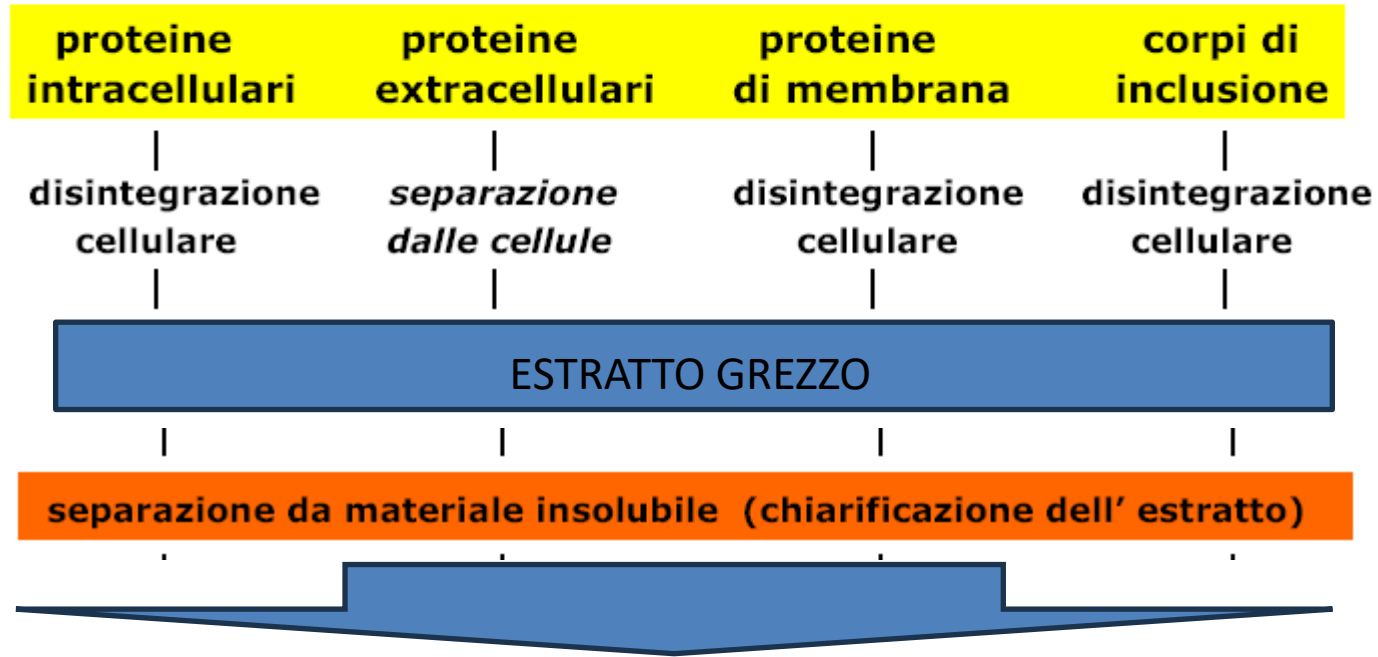
**Svantaggi:** sviluppo di calore (si rimedia lavorando con le soluzioni in bagno di ghiaccio e programmando il funzionamento 'pulsato', cioè intermittente, della sonda), pericolo di danni per l'udito dell'operatore (è necessario usare cuffie).

## Rotori-Statore



Sono dotati di un rotore, con lame di acciaio inossidabile, inserito all'interno di un cilindro che funge da stativo

# Solubilizzazione della proteina e sviluppo dei passaggi di purificazione



**Purificazione della proteina  
che si vuole studiare**

L'estratto grezzo, ottenuto immediatamente dopo il processo di omogeneizzazione (rottura meccanica delle cellule), è una sospensione o miscela non purificata contenente i costituenti cellulari rilasciati, come proteine, lipidi, acidi nucleici e altri metaboliti. Questo materiale, spesso descritto come omogeneizzato o lisato, ha una consistenza uniforme ma richiede ulteriori passaggi di separazione e purificazione

# Chiarificazione dell'estratto

- L'estratto grezzo deve essere “pulito” prima di procedere al frazionamento
- Allontanare subito gli acidi nucleici, ribosomi mediante precipitazione (**protamina solfato** determina la precipitazione selettiva degli acidi nucleici)
- Nel caso contenga molto materiale insolubile si può centrifugare

# PROTOCOLLO di PURIFICAZIONE

Proprietà chimico-fisiche delle proteine che vengono sfruttate nelle tecniche di FRAZIONAMENTO

Le diverse tecniche sfruttano diverse caratteristiche:

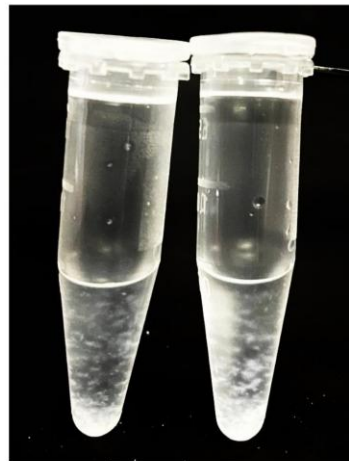
- **SOLUBILITA'**
- MASSA MOLECOLARE
- CARICA ELETTRICA
- PROPRIETA' di ADSORBIMENTO
- AFFINITA' di LEGAME ad altre biomolecole

Le proteine  
possono essere  
frazionate sulla  
base della loro  
**solubilità** in  
diverse  
condizioni  
sperimentali

## PRECIPITAZIONE

- al variare del pH = precipitazione al punto isoelettrico
- al variare della temperatura = precipitazione per denaturazione al calore
- In presenza di solventi organici= precipitazione con solventi organici
- al variare della forza ionica= precipitazione frazionata con sali

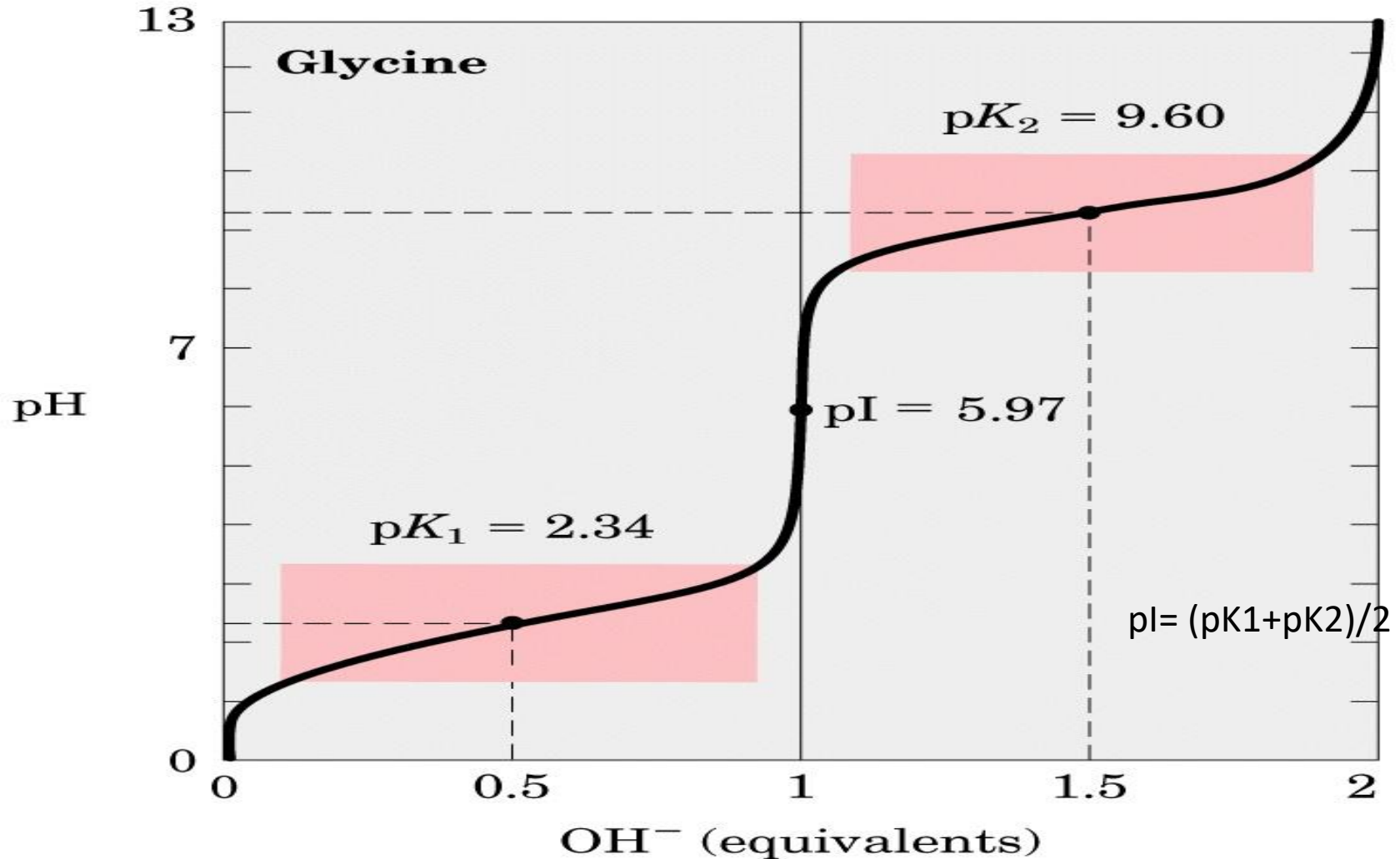
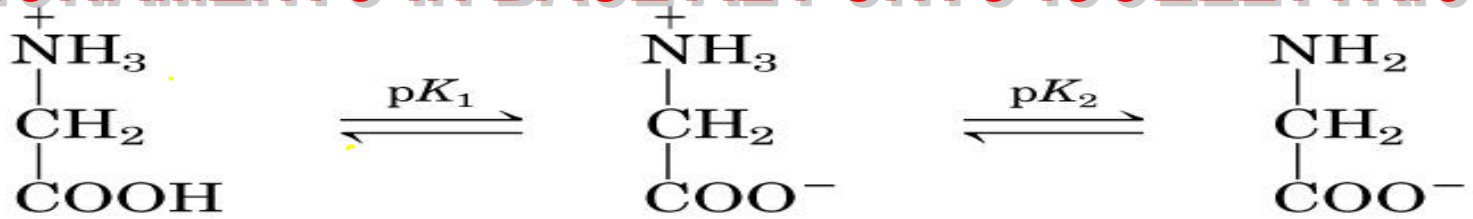
A)



B)



# FRAZIONAMENTO IN BASE AL PUNTO ISOELETTRICO

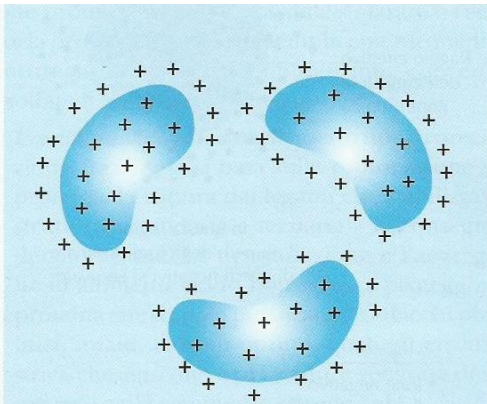


# FRAZIONAMENTO IN BASE AL PUNTO ISOELETTRICO

## PRECIPITAZIONE

Se il pH è minore  
del punto isoelettrico (pI)  
La proteina è carica ?

**carica netta (+)**

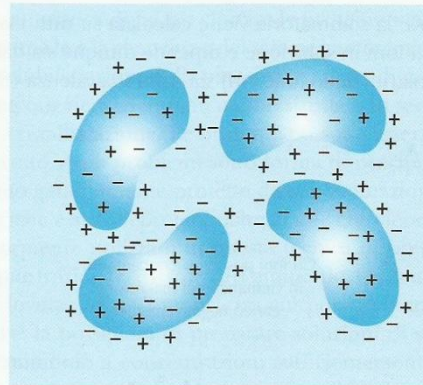


C A valori di pH inferiori al pI, le catene polipeptidiche sono protonate, quindi posseggono cariche positive che si respingono. La proteina rimane in soluzione.

$$\text{pH} = (\text{pI})$$

La proteina è carica ?

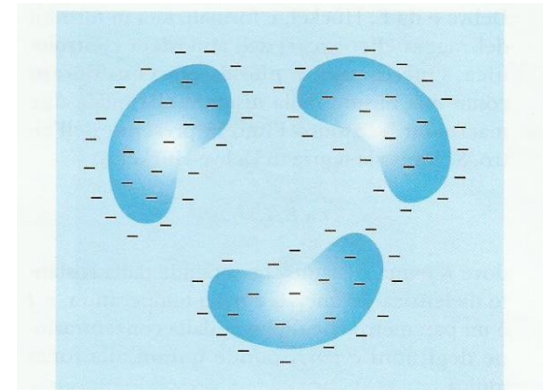
**carica netta (0)**



B In corrispondenza del pI, le catene polipeptidiche interagiscono tra loro e si aggregano.

Se il pH è maggiore del  
punto isoelettrico (pI)  
La proteina è carica ?

**carica netta (-)**



A A valori di pH superiori al punto isoelettrico (pI), le catene polipeptidiche sono deprotonate, quindi posseggono cariche negative che si respingono. La proteina rimane in soluzione.

**Si basa sulla minore solubilità delle molecole proteiche a valori di pH pari al loro punto isoelettrico**

**A tale valore di pH una proteina possiede un numero uguale di cariche positive e negative, per cui risultano minimi gli effetti repulsivi e massime le interazioni intermolecolari, le quali determinano la formazioni di **aggregati insolubili****

# FRAZIONAMENTO IN BASE AL PUNTO ISOELETTTRICO

- ❖ **SVANTAGGIO**: la proteina precipitata spesso subisce **denaturazione**
- ❖ Tale metodica dovrebbe essere usata per precipitare (e quindi) rimuovere le proteine contaminanti, e non la proteina in esame
- ❖ Può essere utilizzata con buoni risultati se la proteina di interesse possiede un **pI** molto diverso da quello della maggior parte delle proteine cellulari

**Se non si conosce il pI della proteina di interesse è necessario determinarlo in un esperimento pilota su piccola scala**

Tabella 5.1 Punti isoeletrici di alcune proteine comuni

<i>Proteina</i>	<i>pH isoeletrico</i>
Pepsina	< 1,0
Ovalbumina (pollo)	4,6
Albumina del siero (umano)	4,9
Tropomiosina	5,1
Insulina (bovina)	5,4
Fibrinogeno (umano)	5,8
$\gamma$ -globulina (umana)	6,6
Collagene	6,6
Mioglobina (cavallo)	7,0
Emoglobina (umana)	7,1
Ribonucleasi A (bovina)	7,8
Citocromo c (cavallo)	10,6
Istone (bovino)	10,8
Lisozima (pollo)	11,0
Salmina (salmone)	12,1

# FRAZIONAMENTO IN BASE AL PUNTO ISOELETTRICO

Si basa sulla minore solubilità delle molecole proteiche a valori di pH pari al loro punto isoelettrico

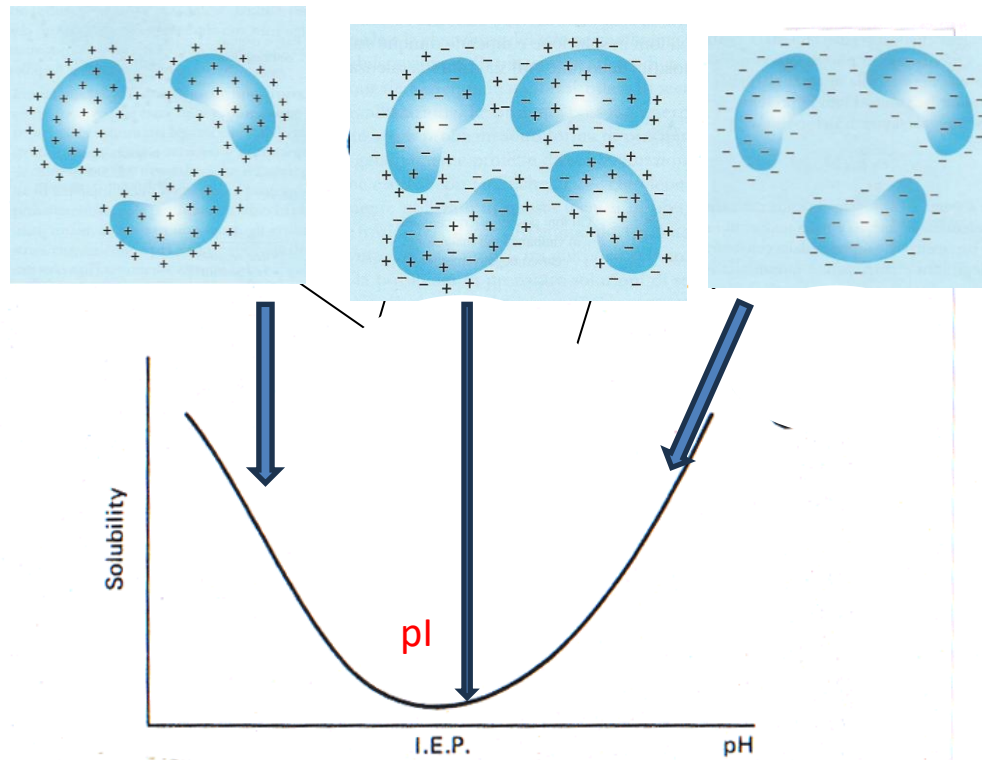


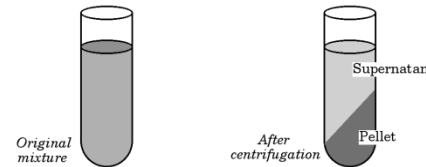
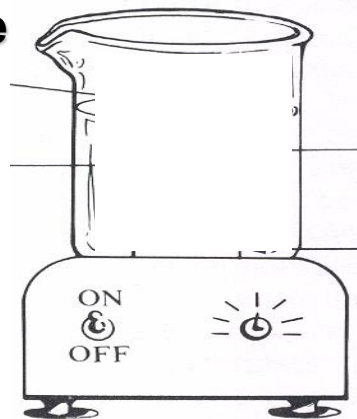
Figure 4.3. Solubility of a globulin-type protein close to its isoelectric point

# FRAZIONAMENTO PER PRECIPITAZIONE al calore

- ❖ Si basa sulla differente sensibilità alla temperatura delle proteine
- ❖ Il calore denatura le proteine che perdono la loro struttura terziaria, esponendo residui idrofobici che nello stato nativo sono nel core proteico e causa la formazione di aggregati.
- ❖ La temperatura alla quale una data proteina va incontro a precipitazione (**temperatura critica**) è determinata in un esperimento pilota su piccola scala
- ❖ Una volta determinata la temperatura critica, le proteine contaminanti termolabili sono allontanate scaldando la miscela ad una temperatura di 5-10°C al di sotto della temperatura critica, per 30-60 minuti

❖ Le proteine denaturate con questo processo sono rimosse per centrifugazione

Precipitazione  
IRREVERSIBILE

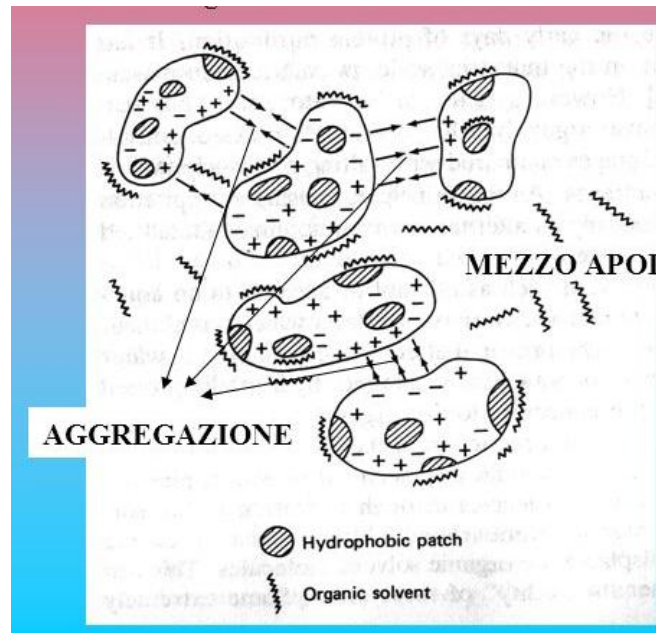


**Metodica analitica** x localizzare la proteina

# Frazionamento con solventi organici.

- Sfrutta la **differente solubilità** delle proteine in soluzioni miste acqua-solventi organici (quali metanolo, etanolo, acetone, butanolo-tutti alcoli solubili in acqua).
- I solventi organici riducono la costante dielettrica dell'acqua principalmente perché sono meno polari dell'acqua stessa e ne disturbano la struttura interna, stabilizzata da legami idrogeno, riducendo la capacità complessiva della miscela di schermare le cariche elettriche
- Il solvente organico **favorisce le interazioni elettrostatiche (a discapito di quelle idrofobiche)** proteina-proteina a discapito di quella proteina-acqua.

indica la capacità dell'acqua di ridurre l'intensità del campo elettrico tra due cariche, schermando le interazioni elettrostatiche.



Solventi organici:

- Aumentano le interazioni tra gruppi carichi e polari sulla superficie delle proteine e quindi le proteine precipitano.

Aumenta l'interazione tra AA che posseggono carica opposta e che si trovano sulla superficie della molecola, favorendo l'aggregazione e la precipitazione.

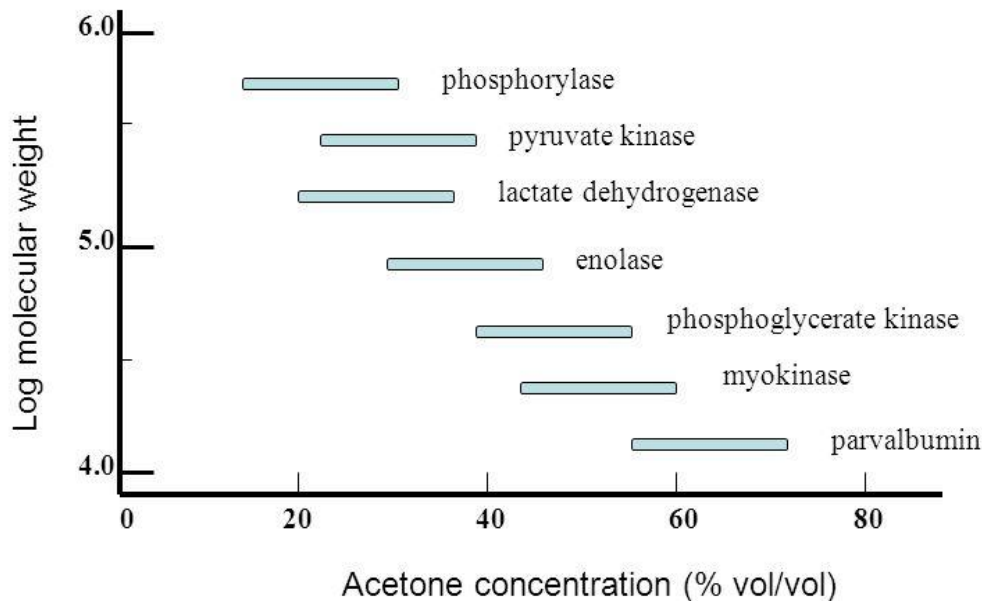
Proteine di **grandi dimensioni** precipitano a **basse** concentrazioni di solvente organico

Proteine di **piccole dimensioni** precipitano ad **alte concentrazioni** di solvente organico

In ordine crescente a seconda del n° di gruppi carichi presenti sulla loro superficie mentre aumenta la concentrazione di solvente organico.

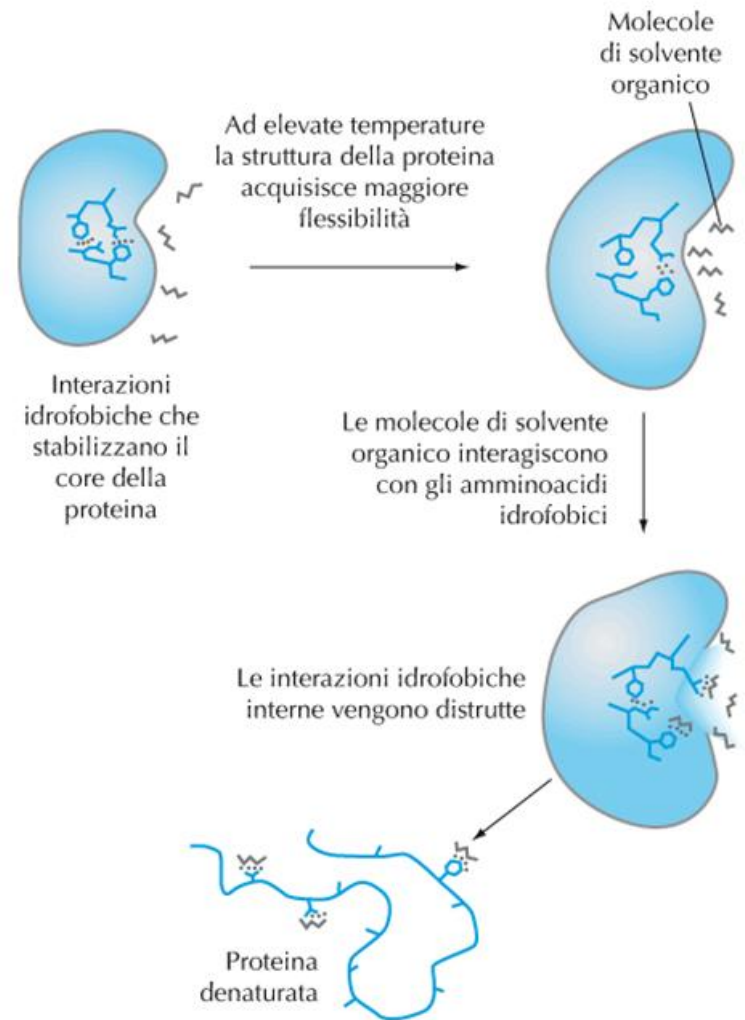
## Precipitation with Organic Solvents

The size of protein molecule is an important factor for aggregation; the larger the molecule, the lower the percentage of organic solvent required to precipitate it



Il problema con l'uso dei solventi organici è che si ha in genere un certo grado di **denaturazione proteica** (maggiore a temperature più alte)

Si lavora da 0 a -20°C



**Figura 3.10** ► Denaturazione di una proteina ad opera di un solvente organico.

# Precipitazione frazionata con i sali

I Sali influenzano la solubilità delle proteine

Interagiscono con i residui carichi sulla superficie delle proteine

Basse concentrazioni di Sali



Aumentano la solubilità della proteina

(salting in)

gli ioni del sale mascherano i gruppi carichi della proteina e diminuisce l'attrazione tra molecole; **Promuovono le interazioni proteina-solvente**

Alte concentrazioni di Sali

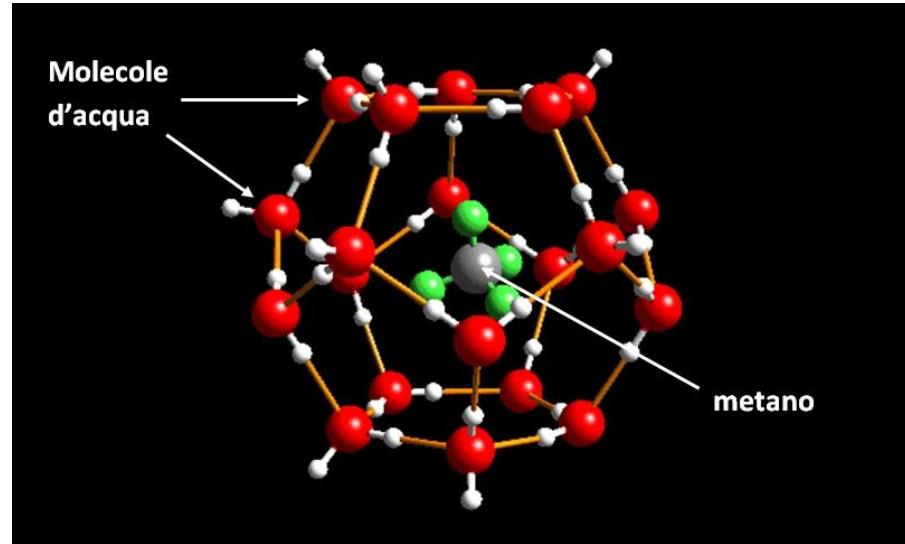
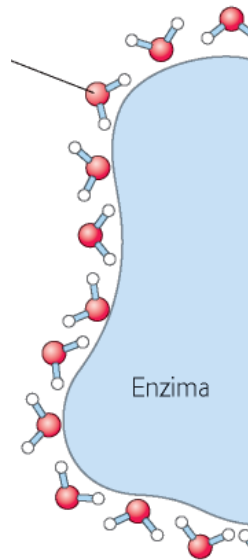


Diminuiscono la solubilità della proteina

(salting out)

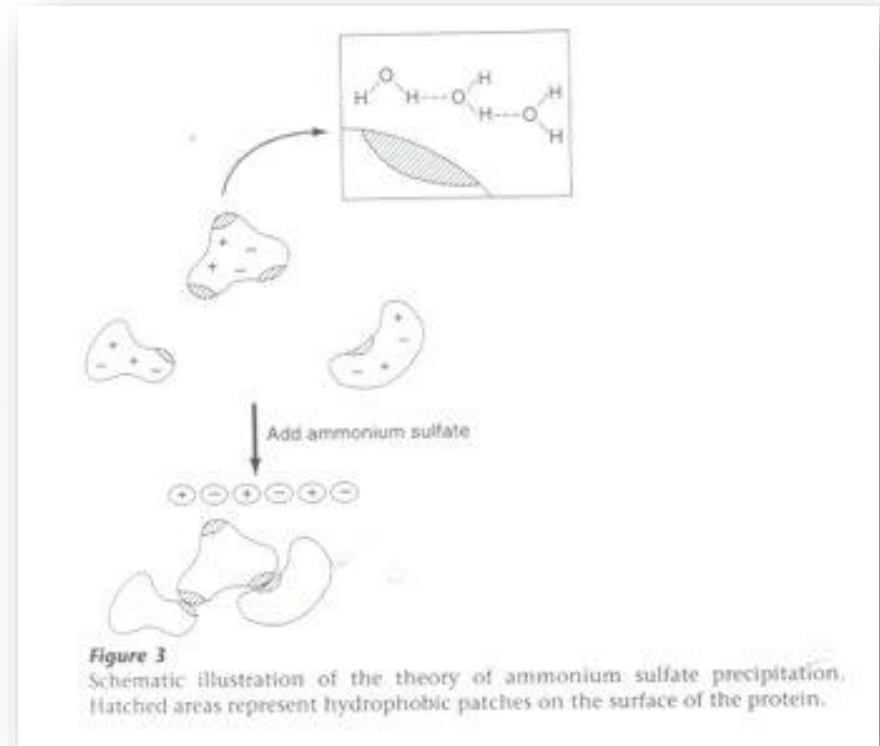
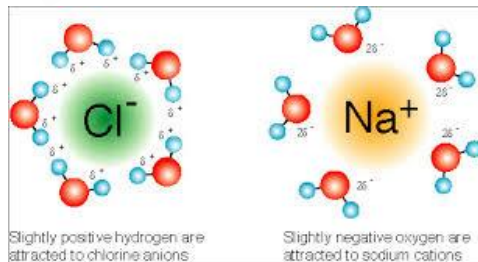
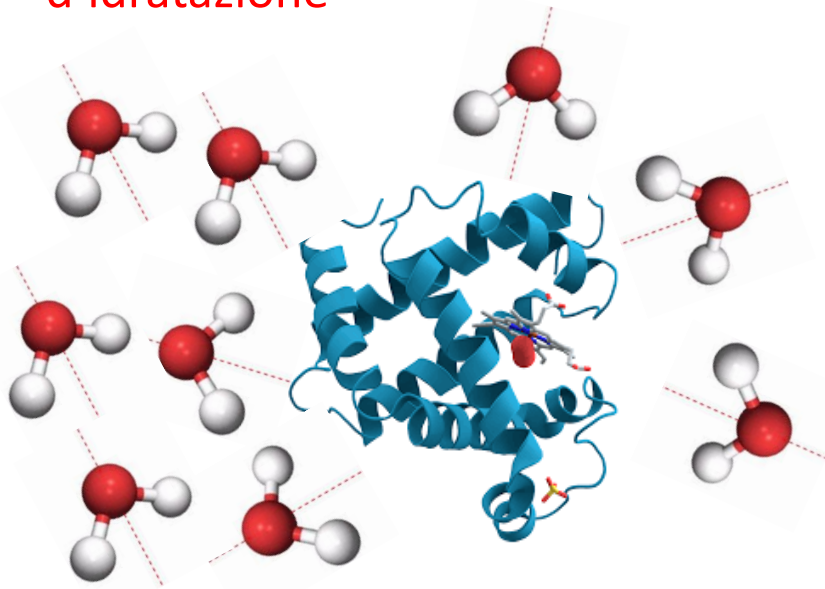
Competizione per le molecole d'acqua di idratazione tra il sale e le proteine

L'acqua interagisce con i **gruppi idrofilici** delle proteine mediante legami idrogeno



L'acqua vicino ai **gruppi idrofobici** forma strutture molto ordinate chiamate «clatrati»: strutture poliedriche di molecole d'acqua, legate tra di loro da legami idrogeno, con una cavità centrale che racchiude la molecola apolare

→ Le reg. idrofobiche sono le prime a perdere le molecole d'acqua d'idratazione

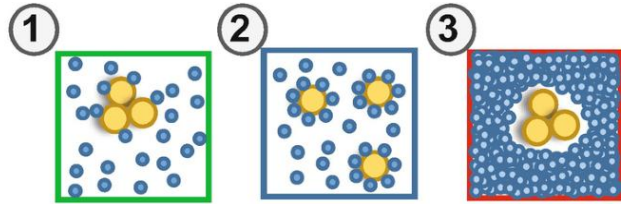


I gruppi idrofobici superficiali possono quindi interagire tra loro → fenomeni di **aggregazione e precipitazione delle proteine**

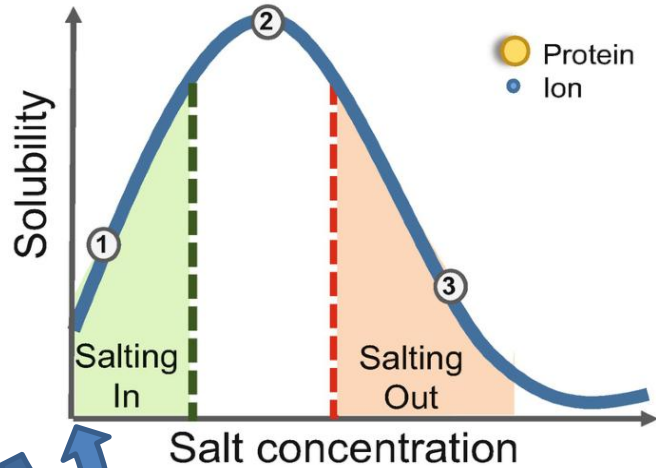
Le proteine **molto idrofobiche** precipitano a bassa concentrazione di sali

Le proteine **meno idrofobiche** precipitano ad alte concentrazione di sali

# Precipitazione frazionata con i sali



Competizione tra gli ioni del sale aggiunti e le proteine per le molecole d'acqua d'idratazione



**Salting out:** ad elevate forze ioniche la solubilità delle proteine diminuisce all'aumentare della forza ionica,

**forza ionica**  $I = 1/2 \sum c \cdot z^2$

$c$  = concentrazione Molare dello ione

$z$  = carica dello ione

**Salting in:**

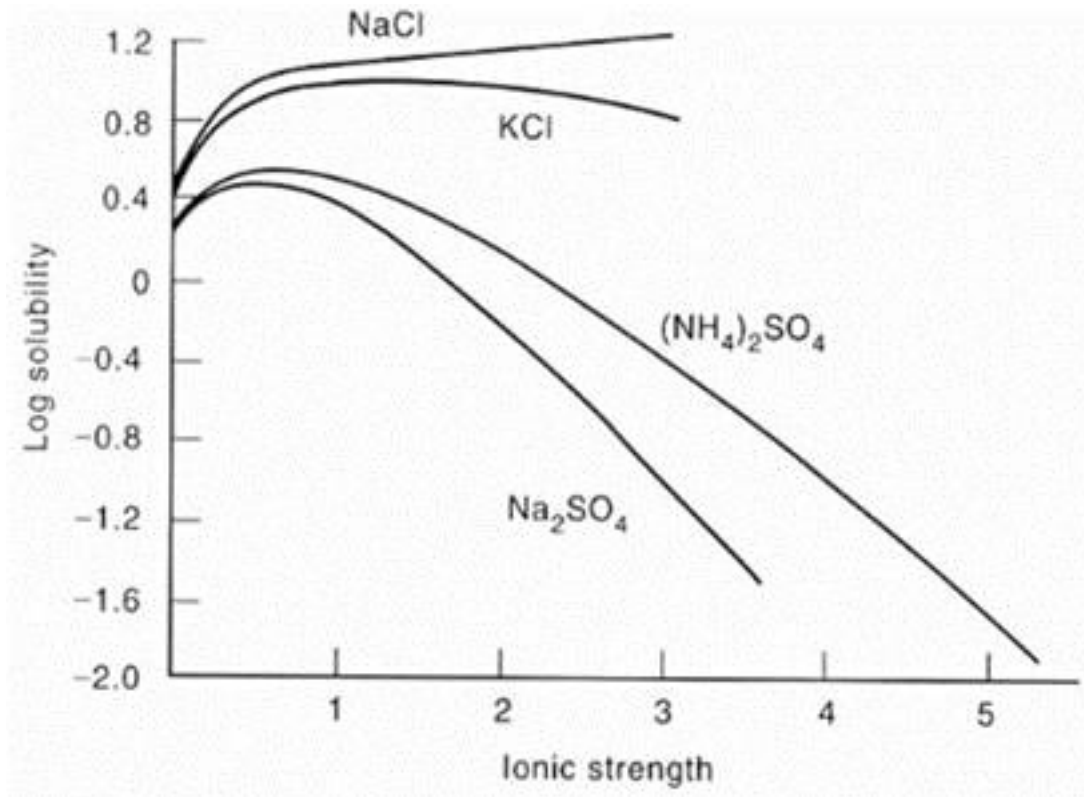
a bassa forza ionica L'AGGIUNTA DEL SALE provoca un aumento di SOLUBILITA'

gli ioni del sale mascherano i gruppi carichi della proteina e impediscono la formazione di aggregati proteici

-ioni monovalenti (NaCl) la concentrazione coincide con la forza ionica

-ioni multivalenti (Mg<sup>2+</sup>):  $I > M$

## Precipitazione frazionata con i sali

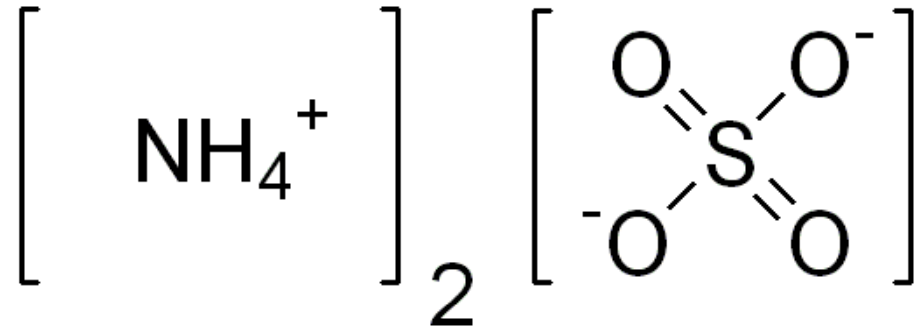
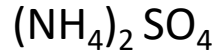


Solubilità della proteina nella soluzione salina

L'effetto del sale dipende dal tipo di sale, dalla concentrazione del sale ( forza ionica)

# Precipitazione frazionata con solfato d'ammonio

SOLFATO di AMMONIO

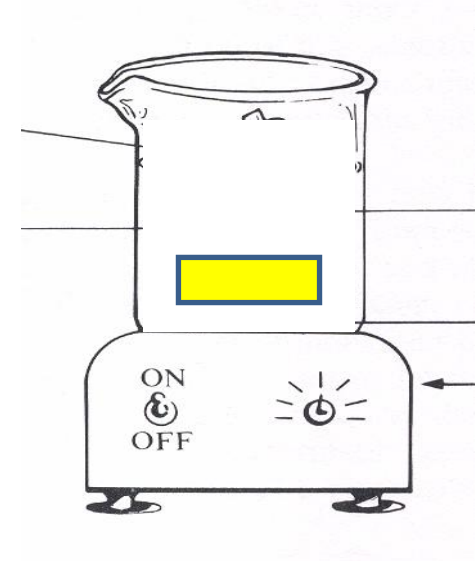
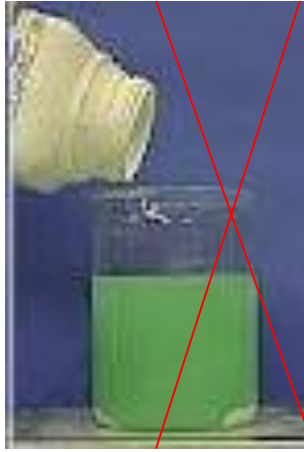


- È molto solubile (3.9M) → elevate forze ioniche **forza ionica**  $I = 1/2 \sum c \cdot z^2$
- È disponibile ad elevato grado di purezza
- Non altera la struttura delle proteine
- **Precipitazione reversibile**
- **Economicamente conveniente**
- **Batteriostatica**

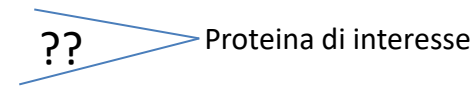
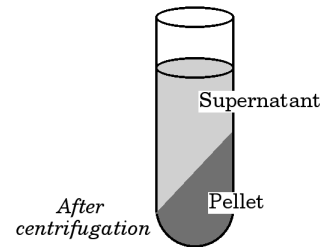
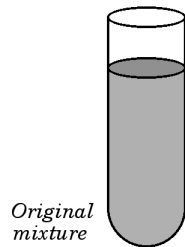
Esempio: - Precipitazione al 60%:

		Saturazione percentuale finale da ottenere																
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
Saturazione percentuale di partenza		Quantità di ammonio solfato da aggiungere (grammi) per litro di soluzione a 20° C																
0		113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5		85	115	146	179	212	246	282	319	358	397	439	481	526	572	621	671	723
10		57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15		28	58	88	119	151	185	219	255	293	331	371	413	456	501	548	596	647
20		0	29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25			0	29	60	91	123	157	191	228	265	304	344	386	429	475	522	571
30				0	30	61	92	125	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35					0	30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40						0	31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45							0	31	64	98	132	169	206	245	286	329	373	419
50								0	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55									0	33	66	101	138	175	215	256	298	343
60										0	33	67	103	140	179	219	261	305
65											0	34	69	105	143	183	224	267
70												0	34	70	107	146	186	228
75													0	35	72	110	149	190
80														0	36	73	112	152
85															0	37	75	114
90																0	37	76
95																	0	38

390 grammi/L



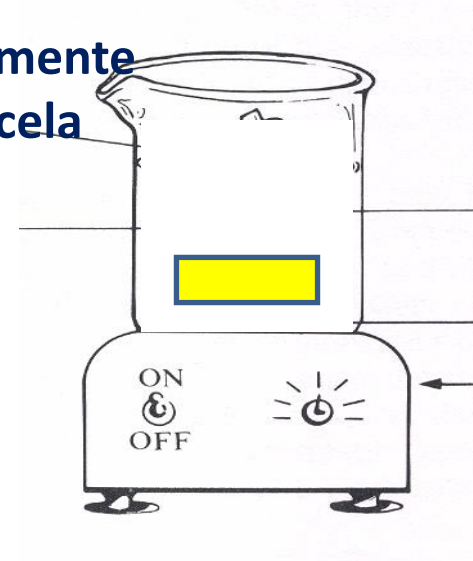
1. Si aggiunge il sale alla soluzione proteica **in agitazione** sino a raggiungere la  **saturazione**  desiderata
2. Si centrifuga il campione



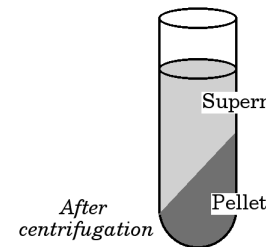
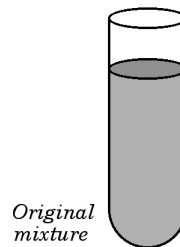
3. Si utilizza una tecnica analitica per verificare localizzazione della proteina di interesse nel precipitato o nel supernatante
  - A) proteina nel pellet: si recupera e si procede con un altro step
  - B) proteina nel supernatante: si recupera e si aumenta la % di Solfato d'ammonio



**Precipitazione frazionata:** si aumenta la forza ionica (I) gradualmente per precipitare in tempi diversi le diverse proteine della miscela



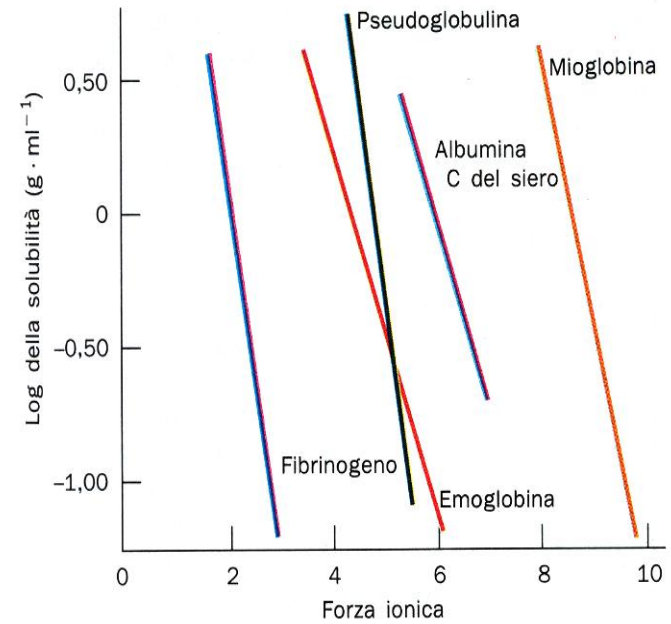
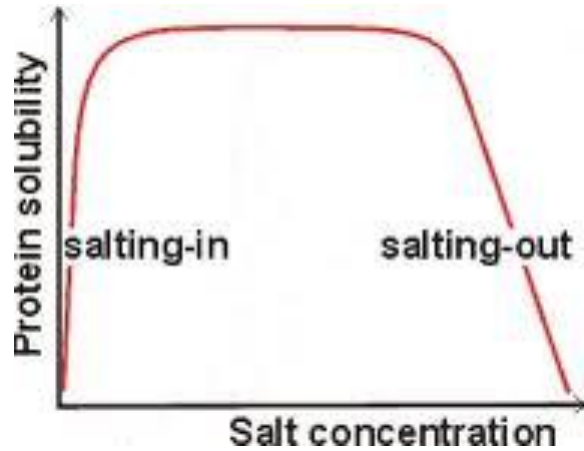
1. Si aggiunge il sale alla soluzione proteica **in agitazione** sino a raggiungere la  **saturazione**  desiderata
2. Si centrifuga il campione



??

Proteina di interesse

3. Si utilizza una tecnica analitica per verificare localizzazione della proteina di interesse nel precipitato o nel supernatante



**Figura 5.2** Solubilità di alcune proteine in soluzioni di ammonio solfato. (Fonte: COHN, E.J. e EDSALL, J.T., *Proteins, amino acids and peptides*, p. 602, Academic Press, 1943.)

Una proteina con un maggior numero di regioni idrofobiche superficiali precipita a forza ionica più bassa

# Frazionamento con i Sali

## Vantaggi:

- Tecnica di separazione adatta ai **passaggi preliminari** del protocollo di purificazione (alta capacità: lavora con grossi volumi di campione)
- Riduzione di volume (**in caso di utilizzo del pellet**)
- Allontanamento di **Contaminanti** con  $\neq$  solubilità
- Ha attività batteriostatica

## Svantaggi:

- **Bassa Risoluzione:** non è possibile purificare una proteina utilizzando esclusivamente questa tecnica

## IMPORTANTE

### ELIMINARE IL SOLFATO D'AMMONIO

(una alta forza ionica «impedisce» una corretta purificazione con le tecniche cromatografiche)

- 1) DIALISI (per grossi volumi di campione)
- 2) ULTRAFILTRAZIONE: Amicon o Centricon (per piccoli volumi)

# Dialisi

- Sfrutta le grandi dimensioni delle proteine
- Si utilizza un sacchetto o tubo da dialisi (membrana semipermeabile)

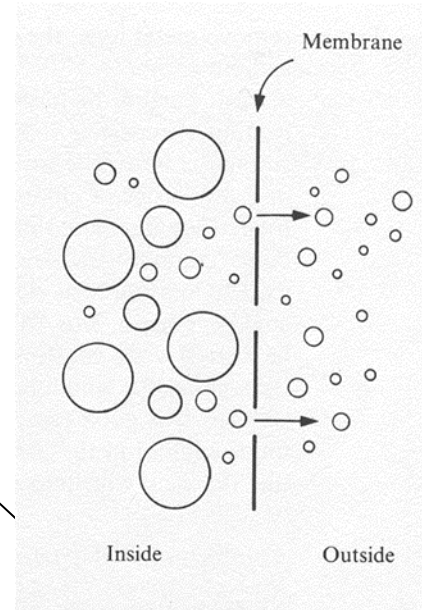
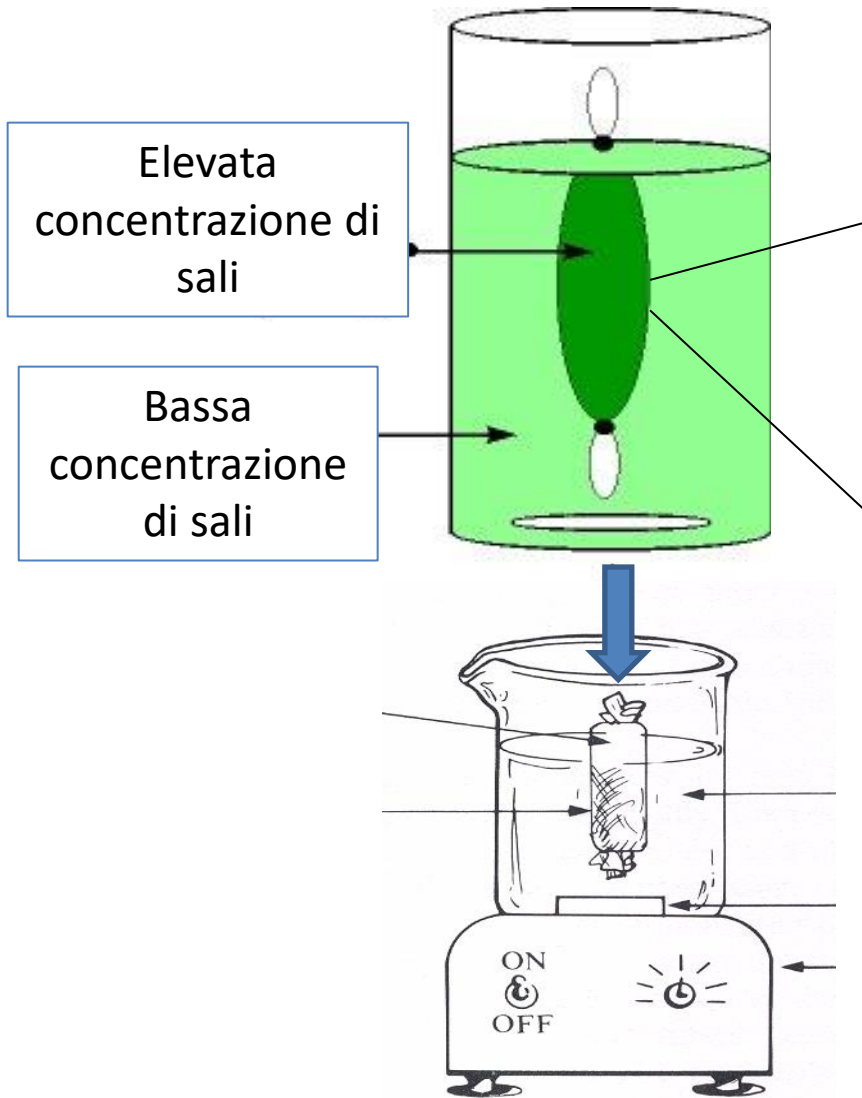


**Tampone (forza ionica appropriata)**

**Permette di rimuovere soluti a basso PM (sali, ad es.)**

**Viene utilizzata ad esempio per rimuovere il solfato d'ammonio dalla soluzione**

# Dialisi



## Accorgimenti:

- Scelta della membrana con opportuno Cut- Off
- Bollire e sciacquare la membrana (condizionamento)
- Non riempire troppo la membrana
- Utilizzare grossi volumi di solvente
- Mantenere in agitazione
- Cambiare più volte il solvente

# ULTRAFILTRAZIONE

Filtrazione sotto pressione attraverso una membrana semi-permeabile (piatta o conica). È una tecnica di separazione basata su differenza di dimensioni e di peso molecolare: **Scelta della membrana con opportuno Cut- Off**

Ad una soluzione adiacente ad una membrana semi-permeabile è applicata una pressione maggiore e opposta alla pressione osmotica. RITENUTO PERMEATO (FILTRATO)

## Microcon 0.5 ml



## Centricon 15 ml

## Centriprep 50 ml

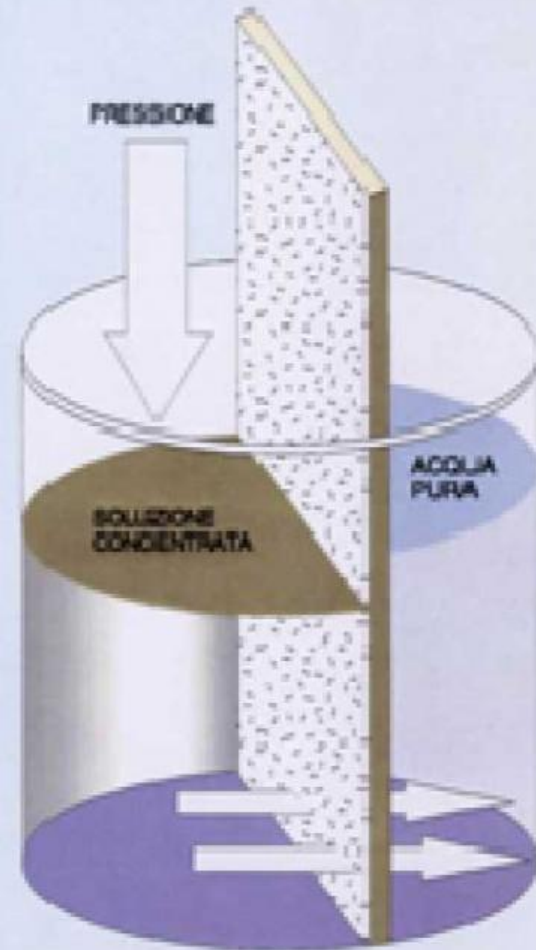


**MEMBRANA SEMIPERMEABILE**

**MEMBRANA SEMIPERMEABILE**



**OSMOSI**



**OSMOSI INVERSA**

# CENTRIFUGAZIONE

SEPARAZIONE di sostanze basata sul differente comportamento di particelle (o molecole) in CAMPO GRAVITAZIONALE

PREPARATIVA per separare:

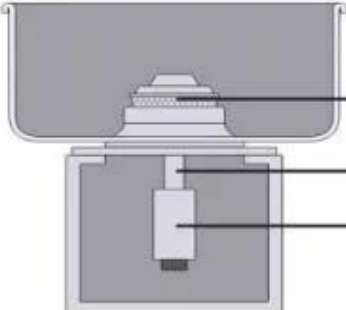
- cellule
- frazioni subcellulari
- organelli, virus, membrane
- macromolecole

SI PARTE da grandi quantità di materiale

ANALITICA

• per studiare macromolecole già pure o praticamente pure  
SI UTILIZZANO piccole quantità di materiale da analizzare

# Parts of a Centrifuge



centrifugal spinning machine

- Roter
- Drive Shaft
- Electric Motor



- Latch
- Lid / Cover
- Chamber
- Control Panel
- Tubes
- Tubes Holder

La forza di sedimentazione sviluppata artificialmente dalla centrifuga viene chiamata **RCF (Relative Centrifugal Force)** e viene indicata con un numero che rappresenta un multiplo della forza di gravità terrestre "**x g**".

In tal senso le centrifughe si distinguono in base alla RCF massima che possono raggiungere.

Il rapporto esistente tra la RCF , le **rotazioni per minuto (rpm)** sviluppate dalla macchina ed il raggio del rotore (**r**), è descritto dalla seguente equazione:

RCF (g)  RPM

Definisce la **VELOCITA'** della centrifuga



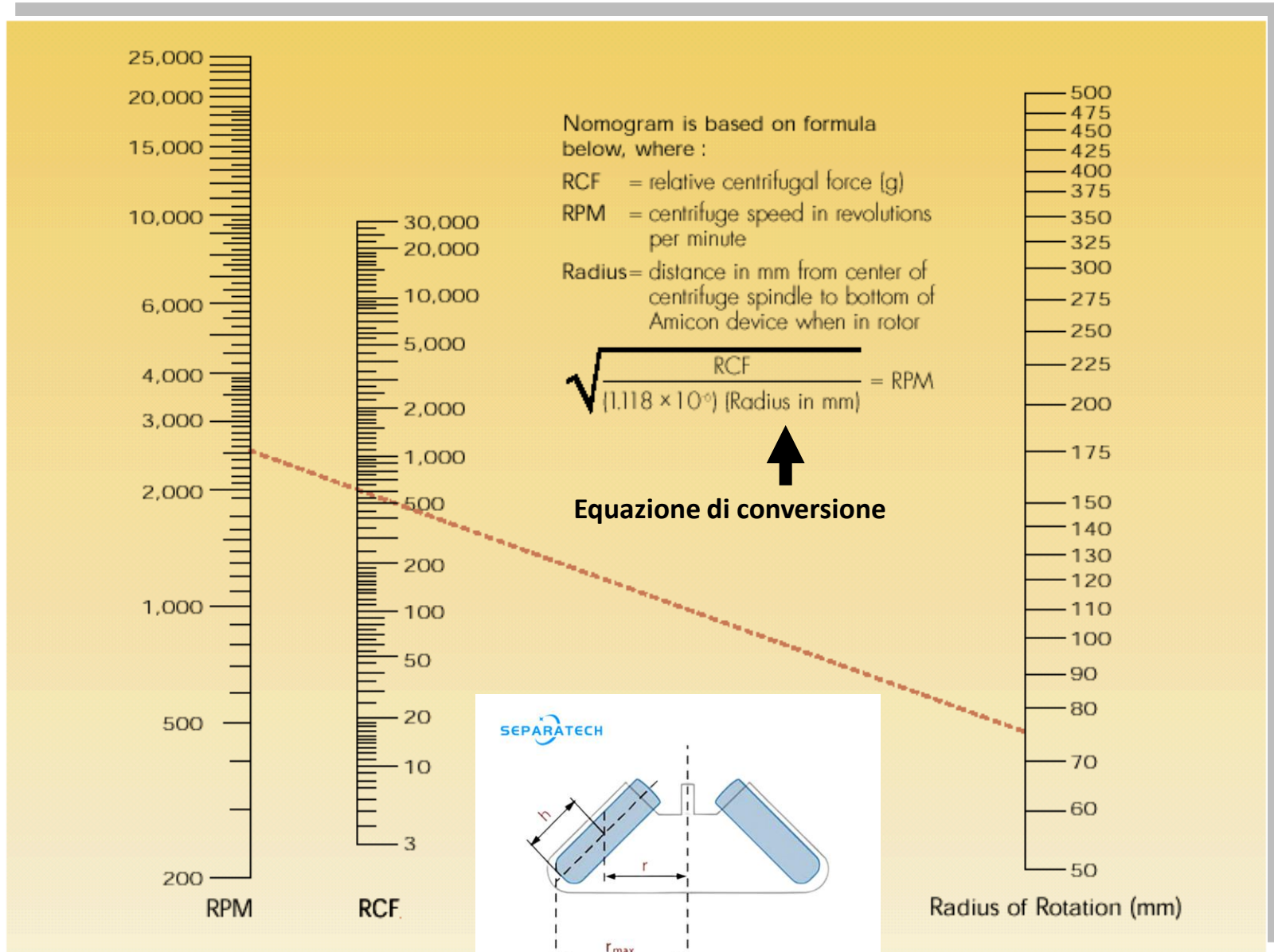
$$rcf = 1.118 \times 10^{-5} \times r_{cm} \times n_{rpm}^2$$

$$rpm = \sqrt{\frac{g}{r \times 1.118 \times 10^{-5}}}$$

Le ditte costruttrici forniscono opportuni normogrammi di riferimento dai quali è possibile dedurre per ogni rotore ed in modo rapido e diretto, la conversione tra rpm ed RCF .

# NOMOGRAMMA:

## Relazione tra RCF (campo centrifugo relativo:g) e RPM (rivoluzioni per minuto)



- Tipi di centrifughe: a) piccole centrifughe da banco e microcentrifughe; b) centrifughe refrigerate a grande capacità; c) centrifughe refrigerate ad alta velocità; d) centrifughe a flusso continuo; e) ultracentrifughe (preparative ed analitiche).



**Rotori swing-out – a braccio oscillante**



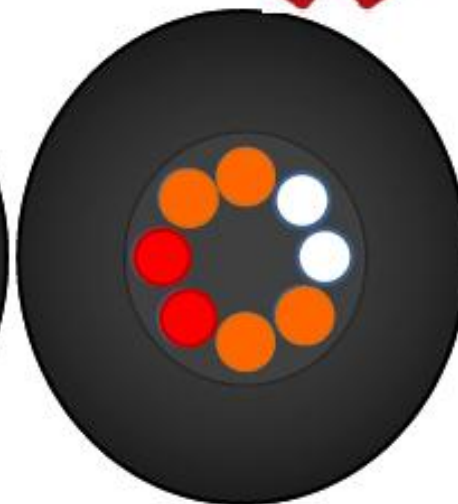
**Rotori ad angolo fisso**

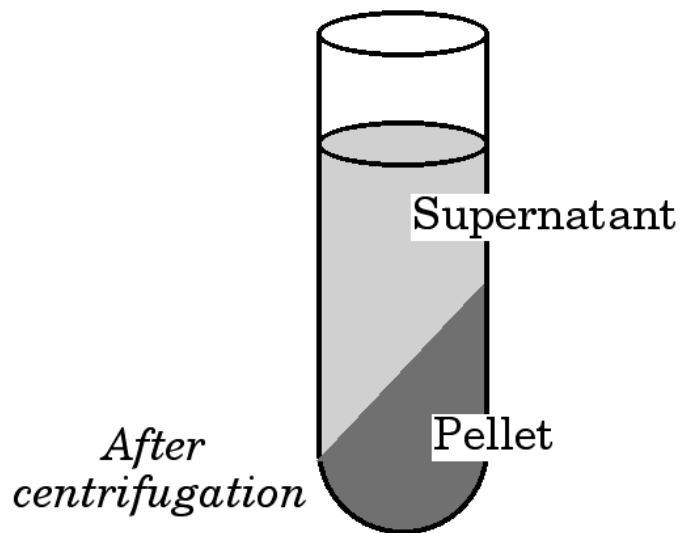
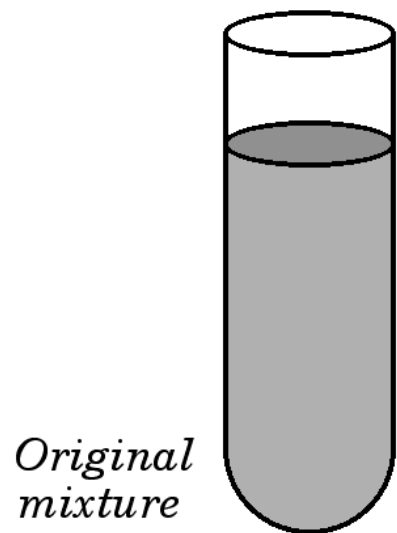
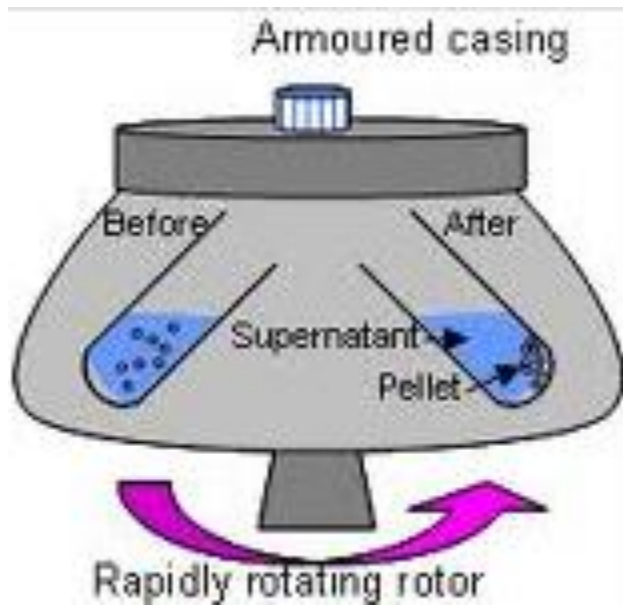


## RIEMPIMENTO DEI ROTORI



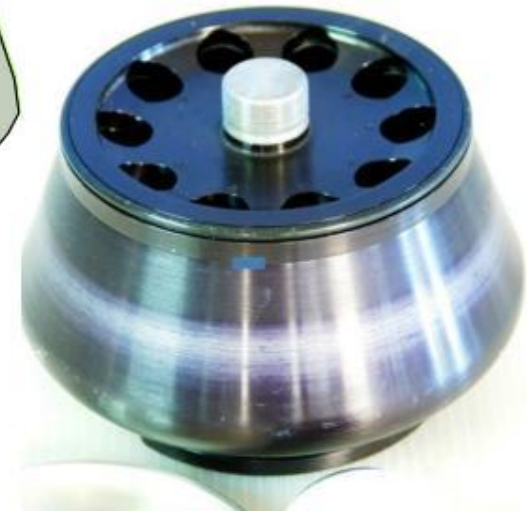
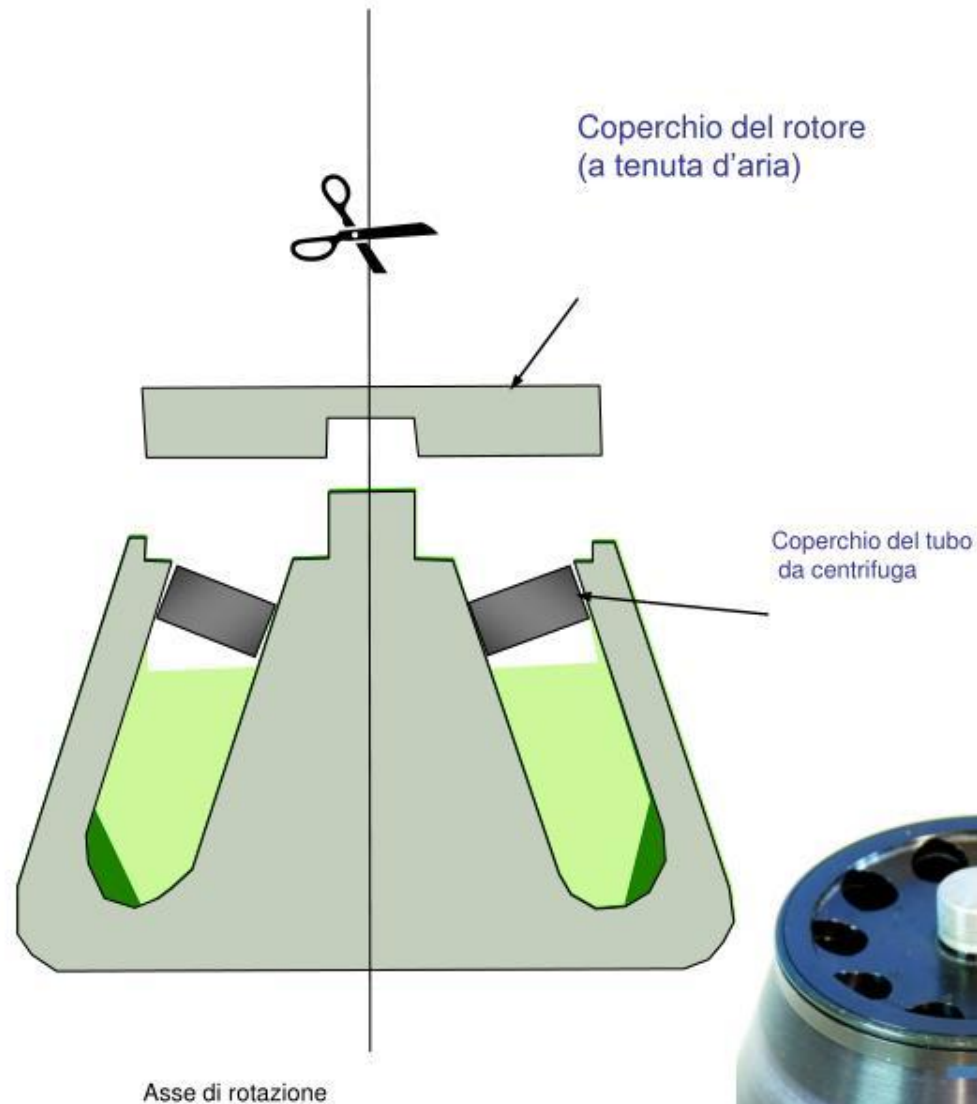
Se devo caricare 2 o più campioni?



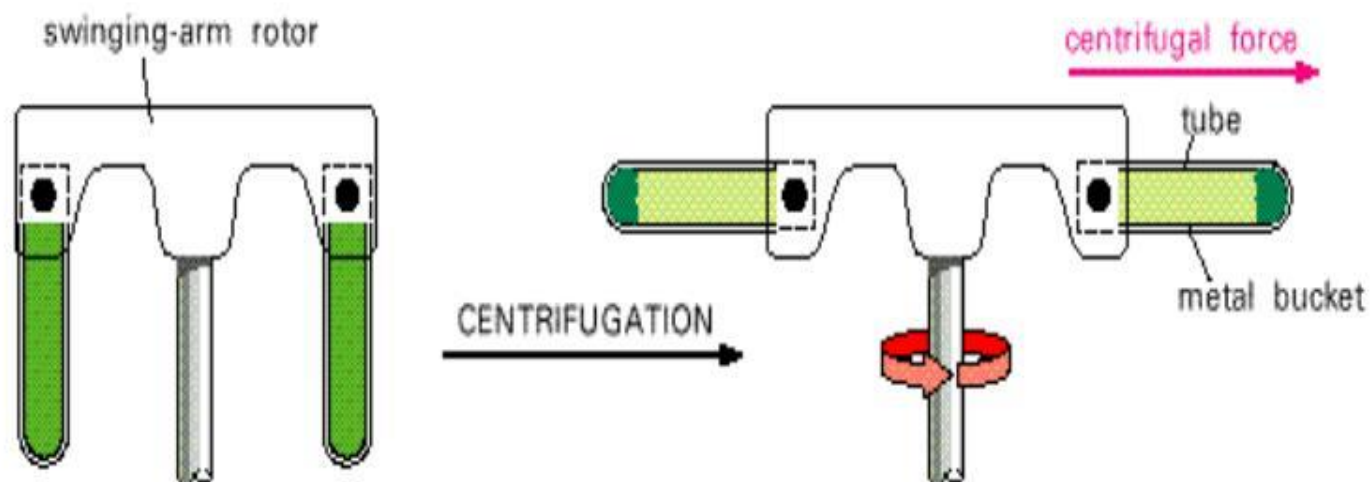


**Rotori ad angolo**  
**fisso** - hanno gli

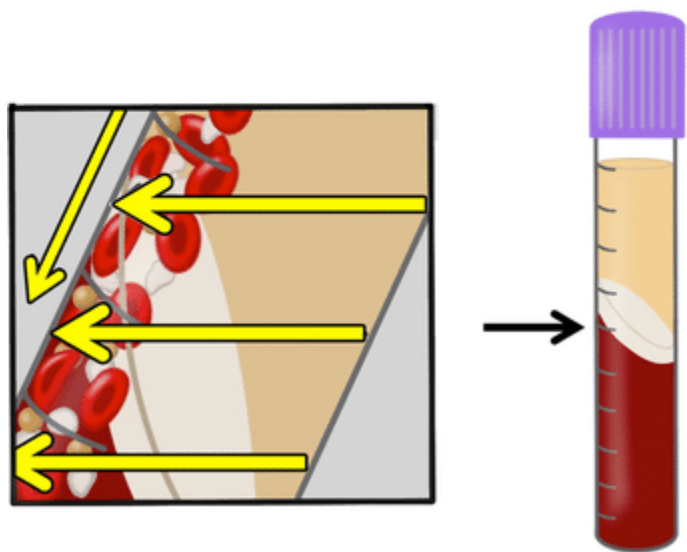
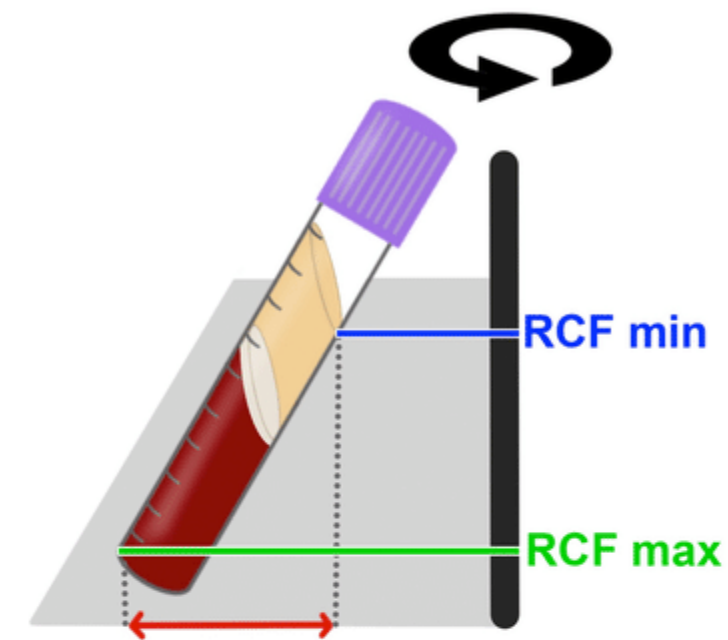
alloggiamenti per i  
tubi disposti  
circolarmente  
attorno all'asse di  
rotazione ad un  
certo angolo  
prefissato che varia  
in genere tra 20° e  
40°. Quando le  
particelle sono  
proiettate contro le  
pareti, scivolano  
verso il fondo con la  
formazione del  
pellet.



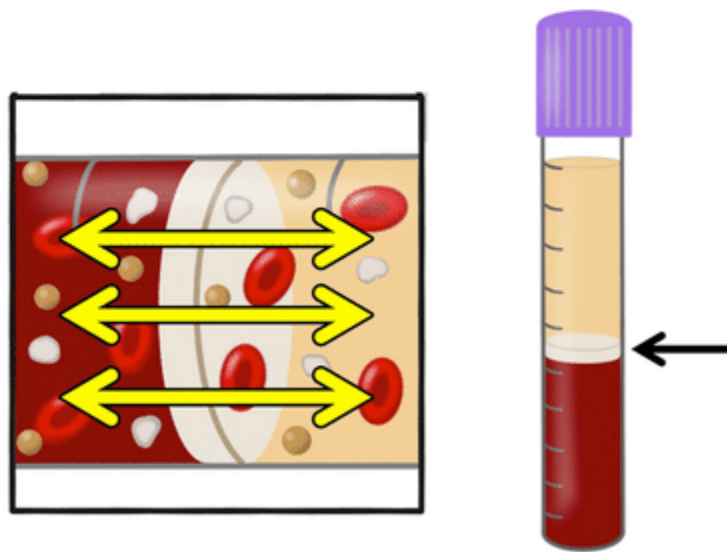
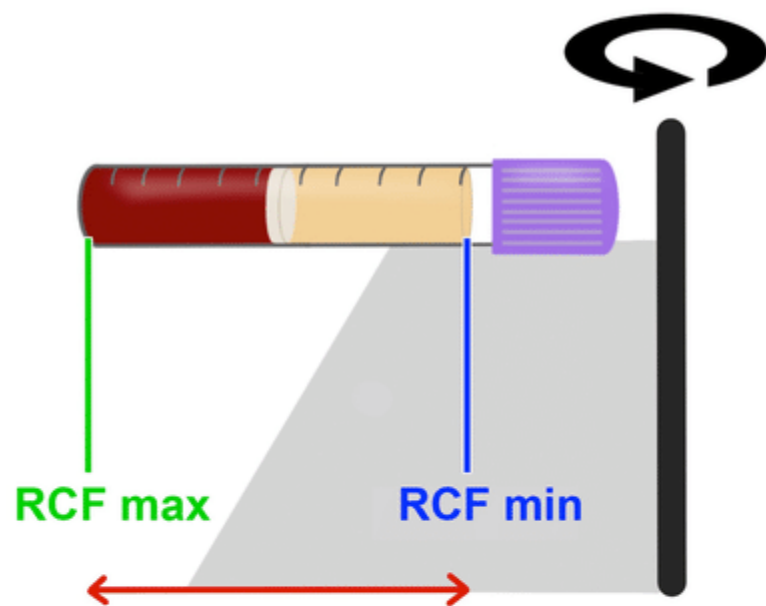
**Rotori oscillanti o ad angolo mobile** - A riposo, i tubi rimangono in posizione orizzontale, ma quando il rotore inizia a girare, per effetto della accelerazione centrifuga, i tubi ruotano sui perni verso l'esterno, disponendosi orizzontalmente. I rotor oscillanti consentono una formazione di bande di sedimento ben differenziate e di pellets più uniformi ma hanno una maggiore delicatezza rispetto ai rotor ad angolo fisso.



### Fixed-angle centrifugation



### Horizontal centrifugation



## Blood (Human, Mouse or Rat)

- For each 1 ml of blood, add 14 ml of room temperature the Lysing solution to lyse the red blood cells. The cells will not lyse correctly if the solution is cold.
- Incubate for 5 minutes at room temperature on a rotator. Do not exceed 5 minutes, as the white blood cells will begin to lyse beyond 5 minutes.
- Centrifuge for 5 minutes at 1000 RPM for human blood, 2000 RPM for mouse or rat blood.
- Carefully aspirate supernatant, then resuspend pellet in approximately 50 ml cold 1X PBS. Take a small sample to perform a cell count.
- Centrifuge for 5 minutes at 1000 RPM for human blood, 2000 RPM for mouse or rat blood.
- Aspirate supernatant.

## CENTRIFUGAZIONE NELLA SEPARAZIONE DI PROTEINE

### Coefficienti di sedimentazione

**S** (unità Svedberg,  $10^{-13}$  s) dipende da caratteristiche della **particella** e della **soluzione**

- densità
- PM
- forma
- densità soluzione
- viscosità soluzione

# Centrifugazione differenziale

tecnica più usata per il **frazionamento cellulare** centrifugando un omogenato cellulare per tempi relativamente brevi ed a velocità modeste sarà possibile ottenere la sedimentazione dei nuclei ma non degli altri organelli, che hanno densità e/o dimensioni minori e che rimarranno nel surnatante. Il surnatante può essere ulteriormente processato per ottenere altri tipi di particelle

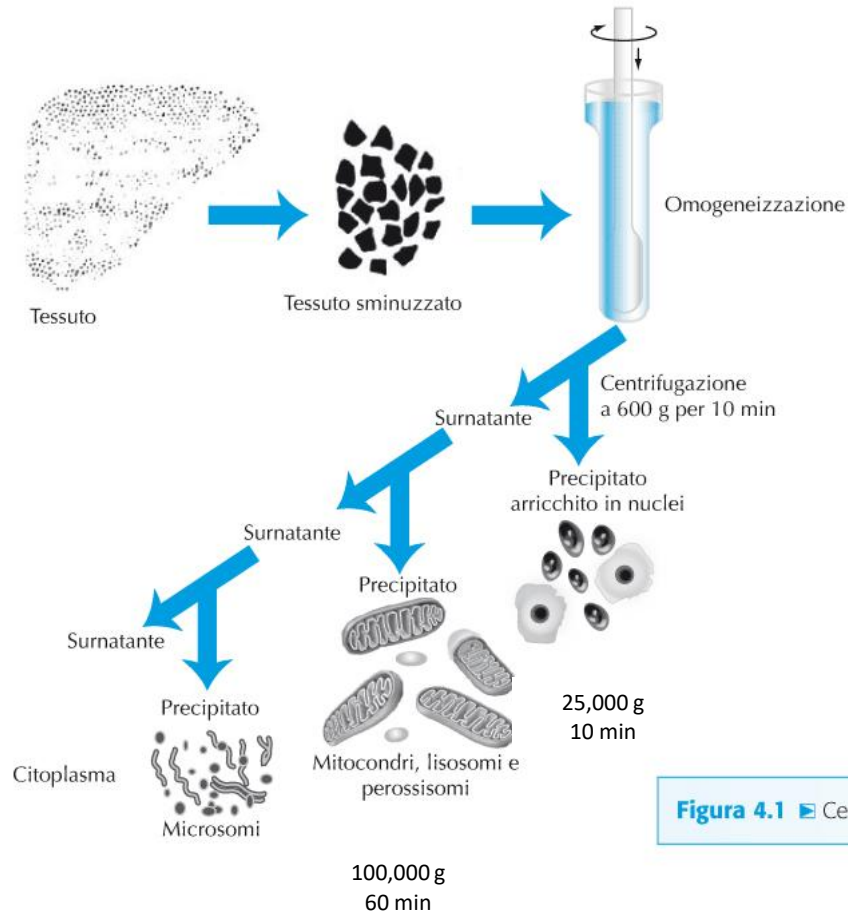
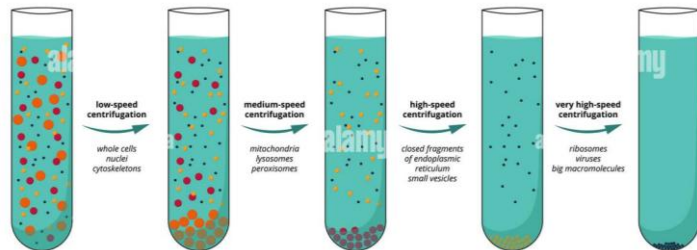






Figura 4.1 ▶ Cent



Stoppini, Bellotti  
Biochimica applicata  
EdiSES

**centrifugazioni ripetute:** con una serie di centrifugazioni opportune si possono ottenere le principali frazioni sub-cellulari; con le metodiche in gradiente di densità le frazioni possono essere ottenute con un solo passaggio.

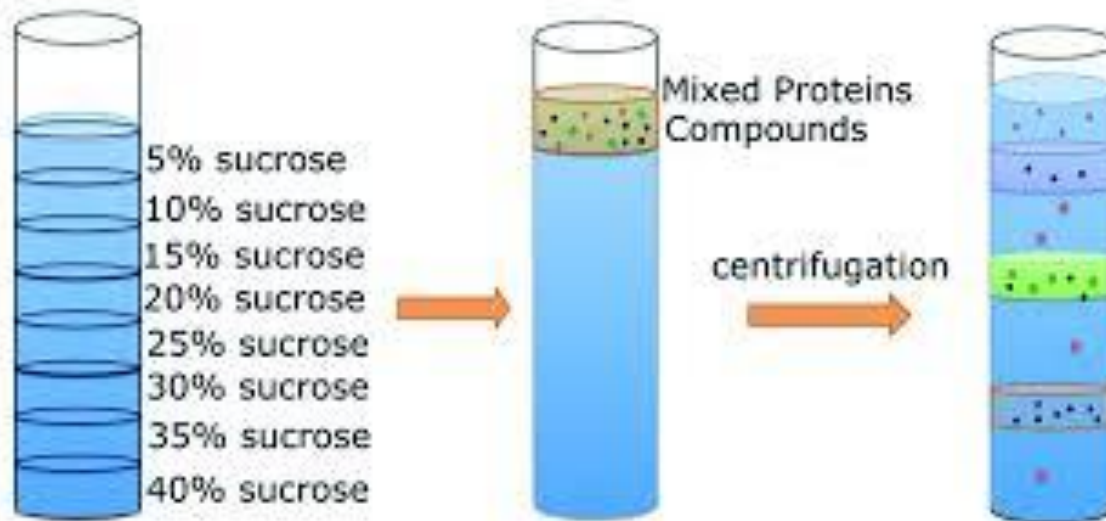
# Frazionamento sub-cellulare e centrifugazione

<b>Organello</b>	<b>Diametro (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Densità (<math>\text{g}/\text{cm}^3</math>)</b>
<b>Nucleo</b> 	5-10	1.40
<b>Mitocondrio</b> 	1-2	1.18
<b>Lisosoma</b> 	1-2	1.13
<b>Ribosoma</b> 	0.02	1.61

## Centrifugazione zonale

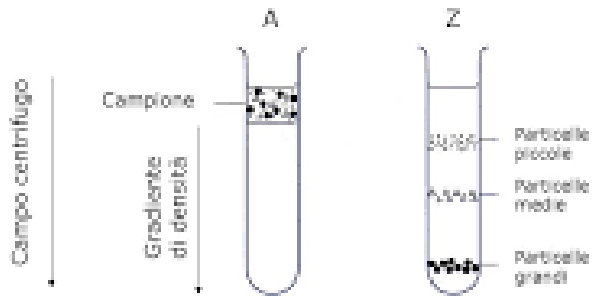
Sfrutta la diversa velocità con cui le particelle si muovono all'interno di un gradiente di densità. (saccarosio, glicerolo, cloruro di cesio,)

- 1) Costruire il gradiente in provetta (in basso densità maggiore ed in alto densità minore)
- 2) Caricare il campione in alto
- 3) Centrifugare: al termine le particelle si separano in zone (o bande) che rispecchiano la loro dimensione e densità in base al coefficiente di sedimentazione.



**Si possono separare particelle con densità simile ma di massa diversa!**

# 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.

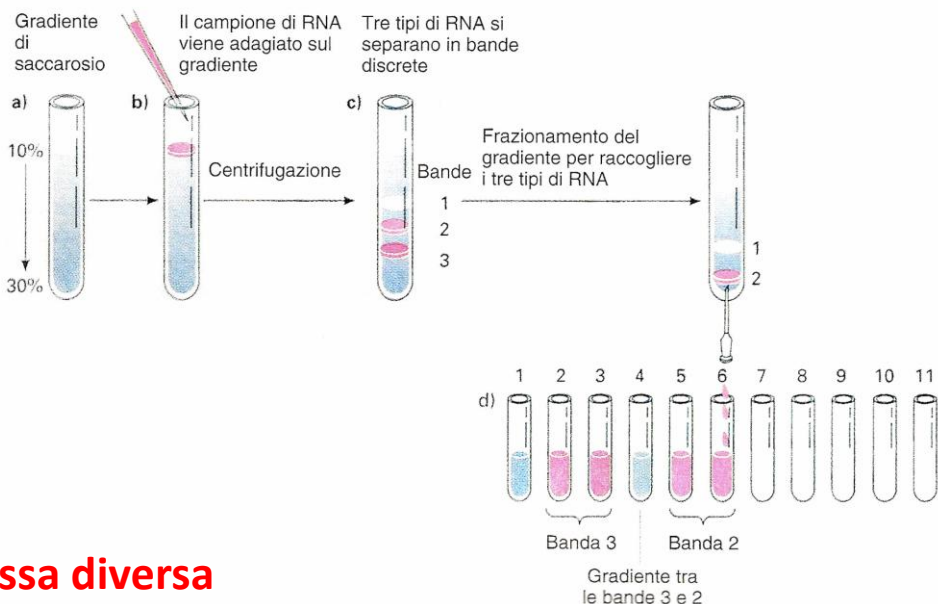
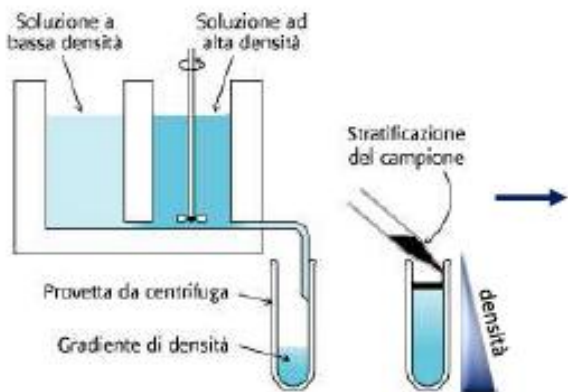
## CENTRIFUGAZIONE ZONALE

separazione di particelle con densità simile ma massa (e quindi dimensioni) diversa.

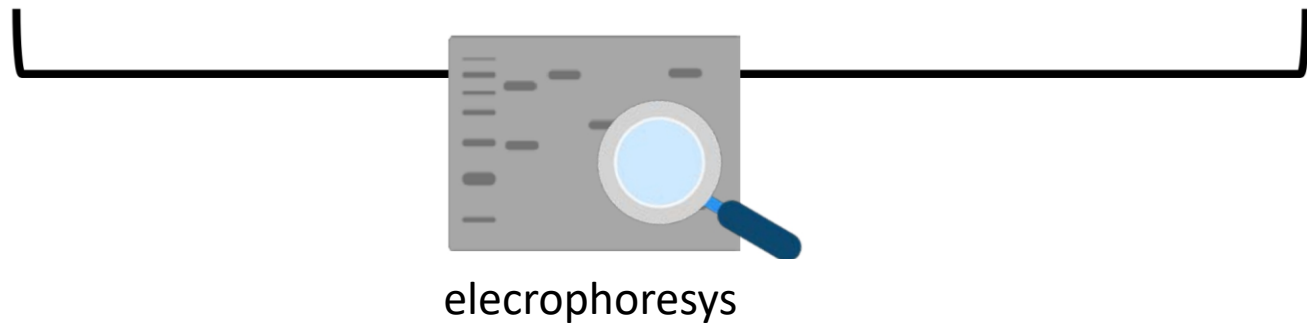
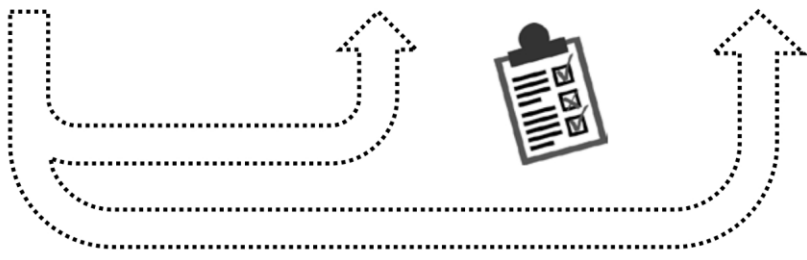
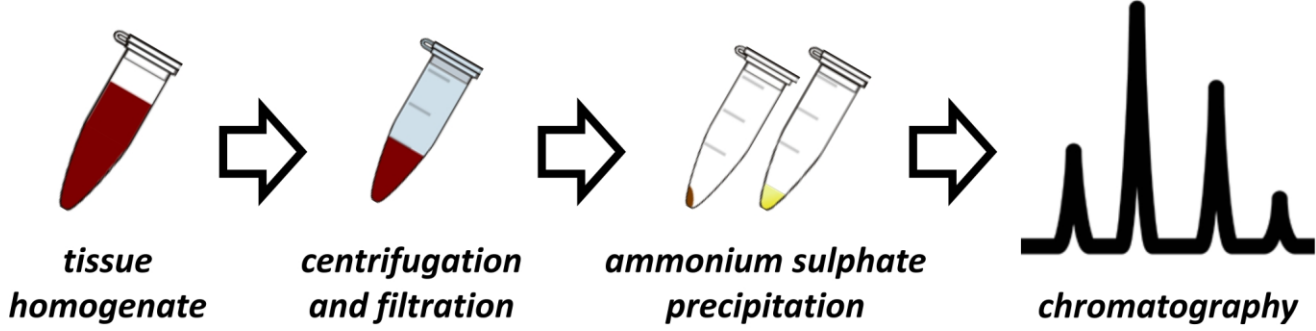
- 1) **Formazione di un gradiente continuo di densità**
- 2) **stratificazione del campione sul gradiente di SACCAROSIO**
- 3) **centrifugazione per un tempo sufficiente alla sedimentazione delle particelle in ZONE discrete, ma NON sufficiente per la sedimentazione al fondo della provetta**
- 4) **raccolta di frazioni per l'analisi**

Usata per la separazione di organelli, proteine, ibridi RNA –DNA, subunità ribosomali etc.

# Gradiente continuo



**separa particelle con densità simile e massa diversa**



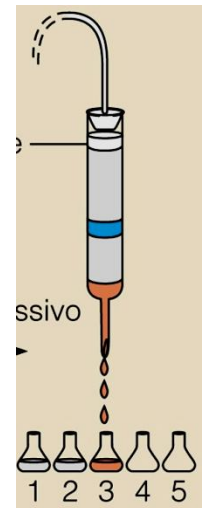
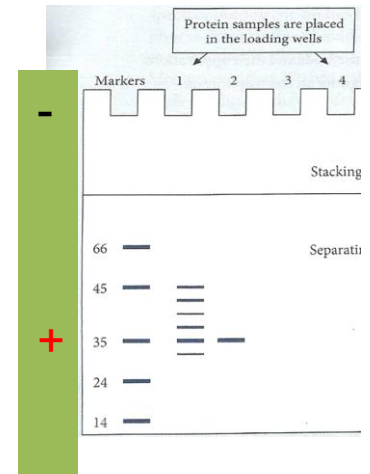
## PROTOCOLLO di PURIFICAZIONE:

???

Insieme di **tecniche di separazione** che sfruttano principi diversi e vengono effettuate secondo un preciso ordine al fine di purificare una proteina a partire da una miscela complessa

Nelle **tecniche di separazione di tipo analitico** l'obiettivo è l'identificazione e la quantificazione di piccole quantità di un dato analita. Gli analiti non vengono recuperati dopo la separazione: p.e. **tecniche elettroforetiche**

Nelle **tecniche di separazione di tipo preparativo** lo scopo principale è l'isolamento e il recupero con un alto grado di purezza di quantità (più grandi possibili) di un dato analita per studiarne successivamente le proprietà chimiche e/o biologiche: p.e. **tecniche cromatografiche**



La purificazione enzimatica è un processo a più stadi volto a isolare un enzima specifico da una miscela grezza (cellule, tessuti), mantenendone intatta l'attività biologica. Il **monitoraggio dell'efficienza** avviene calcolando **la resa** (quantità di enzima recuperato) e il grado di purificazione (**attività specifica**) a ogni passaggio.



- Riduzione della quantità totale di proteine
- Aumento del rapporto: Q proteina da purificare/Q tot

**-Unità Internazionali di Enzima (U)** è la misura standard dell'attività catalitica: quantità di enzima che è in grado di convertire 1  $\mu$ mole di substrato in 1 min in condizioni definite di pH e T.

**RESA:** Unità enzimatiche nella frazione purificata/Unità enzimatiche nella miscela iniziale

**ATTIVITA' SPECIFICA:** unità TOT di enzima nella frazione /quantità totali di proteine nella frazione

**TABELLA 3.5** Tabella di purificazione di un ipotetico enzima

Procedimento e tappa	Volume della frazione eluita (mL)	Proteine totali (mg)	Attività (unità)	Attività specifica (unità/mg)
1. Estratto cellulare grezzo	1400	10000	100000	10
2. Precipitazione con ammonio solfato	280	3000	96000	32
3. Cromatografia a scambio ionico	90	400	80000	200
4. Cromatografia per esclusione molecolare	80	100	60000	600
5. Cromatografia per affinità	6	5	45000	15000

Nota: tutti i dati rappresentano lo stato del campione dopo che la tappa indicata nella prima colonna è stata effettuata. I termini "attività" e "attività specifica" sono definiti a p. 91.

[http://www.agbooth.com/pp\\_ajax/](http://www.agbooth.com/pp_ajax/)