

Lez.1 - La strumentazione in laboratorio

Il comportamento da tenere in laboratorio è il seguente:

- Non si deve mangiare, bere o fumare in laboratorio; non si devono nemmeno portare bevande o cibi;
- Lavarsi le mani prima di uscire dal laboratorio;
- Non ingombrare i corridoi e le vie di fuga del laboratorio;
- Non sedersi mai sui banchi di laboratorio.
- Raccogliere, separare ed eliminare in modo corretto i rifiuti chimici, biologici e radioattivi, solidi e liquidi prodotti nei laboratori; è vietato scaricarli in fogna e nei cassonetti.
- Prima di lasciare il laboratorio accertarsi che il proprio posto di lavoro sia pulito ed in ordine e che tutti gli apparecchi, eccetto quelli necessari, siano spenti. Togliere il camice e i dispositivi individuali di protezione all'uscita dei laboratori.
- Scrivere sul contenitore, per ogni soluzione o composto preparato la descrizione, il vostro nome e la data.

Per **dispositivo di protezione individuale (DPI)** si intende qualsiasi attrezzatura destinata ad essere indossata allo scopo di proteggere il lavoratore contro uno o più rischi per la sicurezza o la salute durante il lavoro. In laboratorio si deve sempre indossare il camice. In particolare, ci sono i **guanti** (monouso di materiale compatibile con le sostanze manipolate e di materiale anallergico; in cotone (sottoganti); per alte temperature; per criogeni) e le **protezioni per piedi** (capriscarpe; calzature da lavoro a norma).

Informarsi sempre della pericolosità e tossicità dei prodotti chimici che utilizzate. Non toccare con le mani reattivi. In caso di contaminazione, lavare accuratamente le mani con molta acqua. Mai portare le mani sporche alla bocca e agli occhi. Usare gli appositi aspiratori per prelevare liquidi con le pipette.

Per quanto riguarda le **cappe** (chimiche e biologiche), bisogna:

- Accertarsi che la cappa sia in funzione e che l'aspirazione funzioni;
- Evitare di creare correnti d'aria in prossimità di una cappa in funzione;
- Il materiale in uso deve essere tenuto verso il fondo della cappa;
- Mantenere pulito ed ordinato il piano di lavoro;
- Tenere sotto cappa solo il materiale strettamente necessario;
- Quando la cappa non è in uso, spegnere l'aspirazione.

Le cappe agiscono come barriere per minimizzare il rischio di infezioni per via aerea, impedendo la fuoriuscita di questi aerosol nell'ambiente di laboratorio e la loro inalazione da parte dei lavoratori. Esistono tre tipi di cappe di sicurezza biologica:

- A. **Classe I:** è una cappa ventilata aperta frontalmente progettata per la protezione dell'operatore tramite un flusso d'aria entrante che non viene rimandata in circolo. È dotata di un filtro HEPA allo scarico per proteggere l'ambiente dalla fuoriuscita di microorganismi. Le cappe di classe I possono essere usate con agenti biologici che presentino un rischio basso o moderato (gruppi di rischio 2 e 3); proteggono l'operatore da contaminanti presenti nella cappa, ma non proteggono dalla contaminazione i materiali situati all'interno della cappa stessa (la sterilità non è garantita!).

- B. **Classe II:** una cappa ventilata aperta frontalmente e progettata per la protezione dell'operatore, dei prodotti al suo interno e dell'ambiente circostante. E' caratterizzata da un flusso d'aria in ingresso e con filtrazione sia dell'aria aspirata che di quella espulsa; il flusso laminare, proveniente dal sovrastante filtro HEPA, scende perpendicolarmente al piano di lavoro evitando di investire l'operatore; l'aria espulsa deve essere filtrata da un secondo filtro HEPA e, se ricircolata nello stesso locale, da un filtro supplementare a carbone attivo posto a valle dell'HEPA, per trattenere eventuali frazioni gassose.
- C. **Classe III:** una cappa ventilata totalmente chiusa che è a tenuta d'aria ed è mantenuta a pressione negativa. L'aria in ingresso passa per un filtro HEPA e quella in uscita passa per due filtri HEPA posti in serie. Il lavoro viene svolto con guanti a manica in gomma attaccati alla cappa. Sono usate per lavorare con agenti biologici ad alto rischio (gruppo di rischio 4) e forniscono una barriera totale tra l'operatore e il lavoro.

Le cappe possono essere a **flusso verticale** o a **flusso orizzontale**.

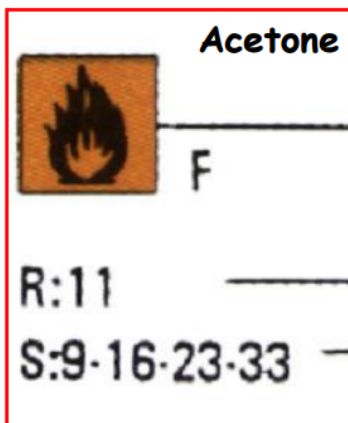
Il rischio legato all'utilizzo di una sostanza dipende dalle caratteristiche tossicologiche della sostanza stessa e, in funzione di queste, dalle modalità del contatto che si realizza nel corso dell'attività lavorativa. La classificazione delle sostanze viene fatta in base alla pericolosità. La pericolosità delle sostanze chimiche viene classificata in funzione delle proprietà chimico-fisiche, eco-tossicologiche e tossicologiche. Tali caratteristiche sono schematicamente rappresentate dal simbolo standard di pericolo o **pittogramma**.

In funzione degli effetti specifici sulla salute dell'uomo, le sostanze tossiche sono suddivise ulteriormente in:

- **Cancerogeni:** sostanze e preparati che possono provocare tumori;
- **Mutageni:** sostanze e preparati che possono interferire nella sintesi del DNA;
- **Teratogeni:** sostanze e preparati capaci di dare effetti dannosi sulle capacità riproduttive e difetti genetici ereditari.

Tali sostanze non hanno pittogramma, ma possono essere indicate con quelli delle sostanze "nocive" e "tossiche" e con le relative:

- **Fraasi di rischio (H, ex R):** descrivono in maniera sintetica i rischi connessi all'uso e alla manipolazione di sostanze pericolose e sono identificabili da una sigla costituita dalla lettera H seguita da un numero.
- **Fraasi di prudenza (P, ex S):** descrivono brevemente le procedure di sicurezza da mettere in atto al fine di minimizzare i rischi connessi all'uso e alla manipolazione di sostanze pericolose. Sono identificabili da una sigla costituita dalla lettera P seguita da un numero.



Frase di rischio

R11: facilmente infiammabile

Consigli di prudenza

S9: Conservare in un luogo ben ventilato

S16: Conservare lontano da fiamme o scintille

S23: Non respirare i vapori

S33: Evitare l'accumulo di cariche elettrostatiche

La **scheda di sicurezza (MSDS)** rappresenta una guida all'utilizzo, alla manipolazione e allo smaltimento della sostanza comprese le procedure da adottare in caso di imprevisti o emergenze. E' fornita su richiesta del consumatore, ma è reperibile su Internet.

I rifiuti prodotti devono essere contenuti in imballaggi con le seguenti caratteristiche:

- confezionati e chiusi in modo da impedire fuoriuscite del contenuto;
- costituiti da materiali inattaccabili dal contenuto e non suscettibili a formare con questo combinazioni nocive o pericolose;
- solidità e resistenza tali da garantire la sicurezza in tutte le fasi di manipolazione, raccolta e trasporto.

I rifiuti prodotti vengono raccolti in:

- **Taniche** omologate UN in HDPE da 20 L (raccolta liquidi);
- **Fusti** con ghiera omologati UN in HDPE da 60 L.

Per quanto riguarda le procedure di raccolta dei rifiuti chimici, bisogna seguire le seguenti raccomandazioni:

- Non devono essere mescolati rifiuti solidi con rifiuti liquidi;
- Tenere separati i COMPOSTI ALOGENATI (concentrazione di alogeni > 0.5%) da quelli NON ALOGENATI;
- Le sostanze conferite nello stesso contenitore NON devono essere CHIMICAMENTE INCOMPATIBILI (reazioni incontrollate);
- Riportare su ciascun contenitore i nomi delle sostanze sversate (NON sigle o abbreviazioni);
- In caso di miscele riportare l'elenco completo delle sostanze di partenza;
- I rifiuti solidi quali puntali, cuvette, vials, ecc., contaminati da sostanze chimiche NON vanno conferiti nello stesso contenitore di carta, guanti, cartine/navicella da pesata, ecc., a loro volta contaminati.

Per quanto riguarda i **rifiuti sanitari pericolosi**, vanno seguite le seguenti raccomandazioni:

- Nessun rifiuto sanitario pericoloso deve essere scaricato nella fognatura o smaltito con i rifiuti urbani;
- Tutti questi materiali pericolosi devono essere appropriatamente identificati, contenuti in maniera sicura ed eliminati attraverso adeguate procedure di smaltimento;
- Il materiale biologico contaminato da sostanze chimiche pericolose DEVE invece essere SMALTITO come rifiuto chimico;
- Il materiale biologico contaminato da sostanze radioattive DEVE essere SMALTITO come rifiuto radioattivo.
- Il materiale deve essere smaltito nei contenitori speciali (per rifiuti ospedalieri infetti, max peso 6 kg) dotati di sacco giallo.

Materiale da smaltire nei contenitori speciali:

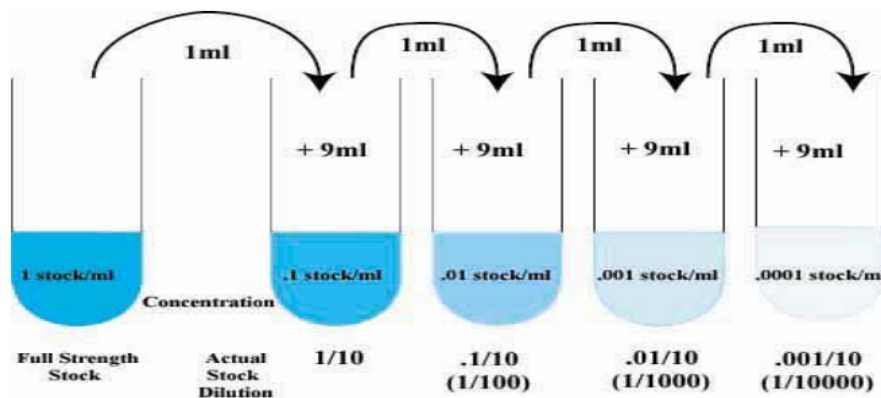
- materiale monouso (piastre, fiasche, provette, pipette, garze, ecc.) venuto a contatto con cellule o altro preparato biologico;
- i secchielli di plastica contenenti aghi e/o materiali taglienti contaminati con materiale biologico.

Le **bilance** vengono utilizzate per la misura delle masse. Le bilance scientifiche si distinguono tra loro per portata e sensibilità. La **portata** è il peso massimo che la bilancia può sopportare, effettuando ancora una misura corretta. La **sensibilità**, invece, è il peso minimo che questa riesce a pesare in maniera corretta. In particolare, la **bilancia analitica** consente di apprezzare fino al decimo o al centesimo di mg; mentre la **bilancia tecnica** presenta una sensibilità di 0,001 g (cioè di 1 mg).

Quando si ha la necessità di preparare spesso una soluzione dello stesso composto (a volte anche a concentrazioni differenti) è utile partire da una **soluzione stock**, cioè una soluzione più concentrata di quelle da preparare che poi si diluisce al momento dell'uso. La concentrazione dello stock può essere indicata in:

- **Valore assoluto:** molarità, % w/vol, % vol/vol;
- **Valore relativo alla concentrazione d'uso:** quante volte lo stock è più concentrato rispetto alla concentrazione d'uso;

La notazione relativa è particolarmente utile quando si utilizzano soluzioni a più componenti per le quali non ha senso definire la concentrazione assoluta. Per preparare una serie di soluzioni dello stesso soluto a concentrazioni diversa è utile, al fine di garantire la massima accuratezza, effettuare delle diluizioni seriali. Le diluizioni seriali prevedono la preparazione di soluzioni a concentrazione decrescente, separate da un rapporto di diluizione costante a partire da un'unica soluzione stock.



Per fare una diluizione

$$V_i \times C_i = V_f \times C_f$$

V_i = volume iniziale

C_i = concentrazione iniziale

V_f = volume finale

C_f = concentrazione finale

Lez. 2 - La misura del pH

Il pH dà l'indicazione numerica dell'acidità o della basicità di una soluzione. Le variazioni di pH possono spesso promuovere reazioni chimiche spesso indesiderate. Fortunatamente esistono dei modi per proteggere in maniera efficace i sistemi dalle variazioni di pH. Scegliendo opportunamente i soluti, è possibile preparare soluzioni che non vanno incontro a variazioni apprezzabili di pH, anche quando vi si aggiungono piccole quantità di acidi o di basi forti. Queste soluzioni vengono chiamate **tampone** proprio perché sono in grado di tamponare il sistema rispetto ad una variazione di pH. Per poter agire, un tampone deve essere in grado di neutralizzare l'aggiunta sia di un acido forte sia di una base forte, neutralizzando gli ioni H^+ o OH^- che vengono aggiunti al sistema:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]_{iniziale}}{[HA]_{iniziale}}$$

Questa espressione, conosciuta come **equazione di Henderson-Hasselbach**, permette di ricavare il pH di soluzioni costituite da un acido debole con la sua base coniugata. Il primo fattore che influenza il pH è la K_a dell'acido debole; il secondo è il rapporto fra le concentrazioni molari dei due membri della coppia coniugata acido-base. Quando le concentrazioni dei due componenti sono uguali, il sistema ha la massima efficienza e $pH = pK_a$. Di conseguenza, il fattore principale che determina il pH al quale la soluzione tampone agisce più efficacemente è il valore pK_a dell'acido debole.

Se dovessimo preparare una soluzione tampone con un valore di pH intorno a 5, la coppia acido-base coniugata scelta potrebbe essere quella costituita da acido acetico ed acetato di sodio.

HA	A ⁻	K _a	pK _a
CH ₃ COOH	CH ₃ COO ⁻	1.76 · 10 ⁻⁵	4.75

L'efficacia di un tampone dipende dai valori assoluti delle concentrazioni dell'acido e della sua base coniugata, ed è massima quando il rapporto delle due concentrazioni è uguale all'unità. Prepareremo quindi la soluzione tampone in modo che le concentrazioni di CH_3COOH e CH_3COO^- nella soluzione finale siano pressoché uguali.

Il pH di un tampone non cambia se l'intero sistema viene diluito (o concentrato). La diluizione determina una variazione di volume della soluzione ma non modifica il numero di moli dei soluti: il rapporto in moli rimane pertanto costante. Per le soluzioni tampone, possiamo usare indifferentemente le concentrazioni molari o le moli per rappresentare le quantità delle due sostanze che costituiscono la coppia coniugata acido-base. La diluizione determina invece una variazione della **capacità tamponante**, cioè della quantità di acido o base forte che il sistema è in grado di assorbire prima che il suo effetto sia esaurito.

Per preparare le soluzioni tampone utilizzeremo un pHmetro da banco. La prima operazione sarà quella di eseguire la **calibrazione** del pHmetro. Tutte le soluzioni dovrebbero essere miscelate quando si effettua una misura, al fine di garantire la rappresentatività del valore misurato. La calibrazione si esegue nel seguente modo:

1. Lavare accuratamente la punta dell'elettrodo;
2. Inserire l'elettrodo nella soluzione di taratura a pH 7.00, agitandola leggermente, fino alla stabilizzazione;
3. Sollevare l'elettrodo e sciacquarlo abbondantemente con acqua distillata;
4. Inserire l'elettrodo nella soluzione di taratura a pH 4.00, agitandola leggermente, fino alla stabilizzazione;
5. Se la calibrazione è OK, sciacquare l'elettrodo con acqua distillata e iniziare le misure.

Risulta utile seguire le seguenti indicazioni:

- Per ottenere dei risultati estremamente precisi, occorre prestare molta attenzione ai metodi di taratura degli strumenti.
- E' buona norma cambiare frequentemente tutte le soluzioni standard.
- Tutte le soluzioni devono essere mantenute alla stessa temperatura.
- Tra una misurazione e l'altra è buona norma lavare l'elettrodo con acqua distillata.
- Nel momento della calibrazione, lasciare l'elettrodo immerso per un tempo sufficiente affinché la lettura si stabilizzi.

Ogni amminoacido (eccetto la prolina) possiede un carbonio centrale, chiamato carbonio α , al quale sono legati quattro differenti gruppi:

- Un gruppo amminico basico ($-\text{NH}_2$);
- Un gruppo carbossilico acido ($-\text{COOH}$);
- Un atomo di idrogeno ($-\text{H}$);
- Una catena laterale, diversa per ciascun amminoacido ($-\text{R}$).

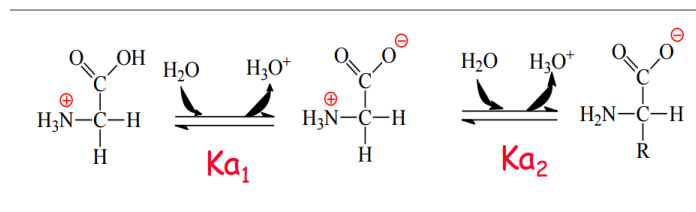
Gli amminoacidi naturali differiscono per la catena laterale che conferisce proprietà diverse a ciascun amminoacido. Tutti gli amminoacidi (tranne la glicina) hanno l'atomo di carbonio α legato a quattro gruppi diversi: il carbonio α (asimmetrico) è quindi un centro chirale o otticamente attivo.

Quando un amminoacido viene sciolto in H₂O diventa uno ione dipolare (zwitterione) che può agire sia come acido (donatore di protoni) che come base (accettore di protoni). Le sostanze che hanno questa doppia natura si definiscono anfòtere o anfolti. Al pH fisiologico (valore attorno a 7.4) tutti gli amminoacidi hanno:

- Il gruppo carbossilico dissociato (-COO⁻);
- Il gruppo amminico protonato (-NH₃⁺).

Gli amminoacidi possono essere considerati acidi diprotici. Ciascuno dei due equilibri comporta la possibilità che l'amminoacido funzioni da tampone:

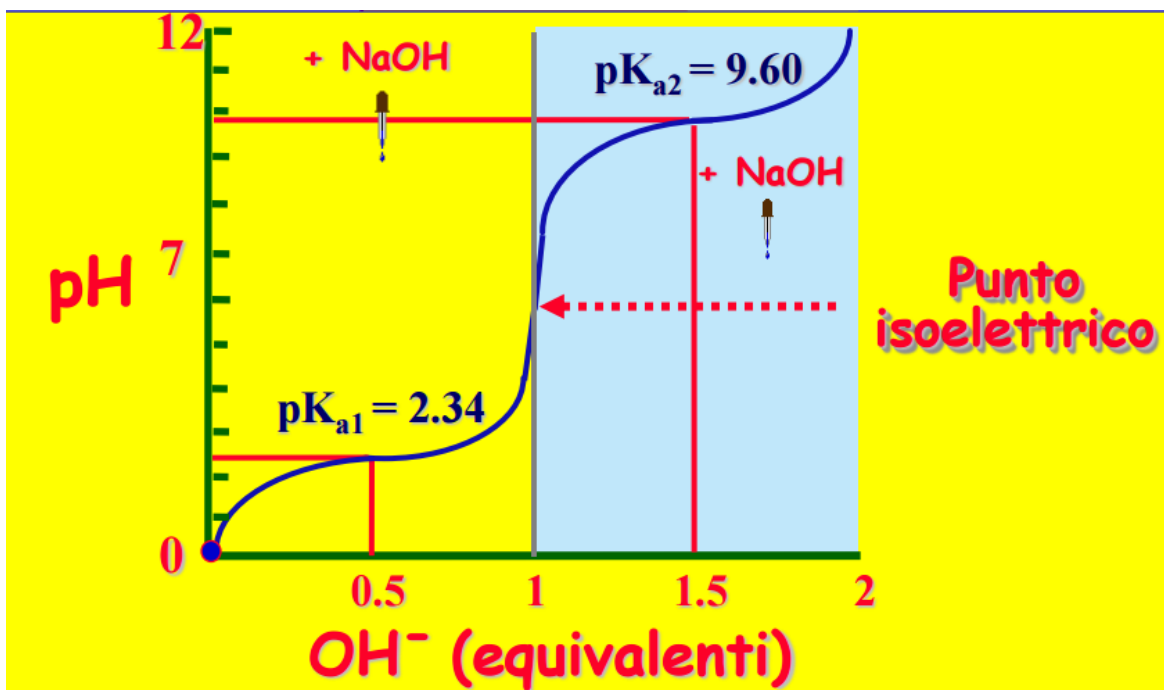
glicina

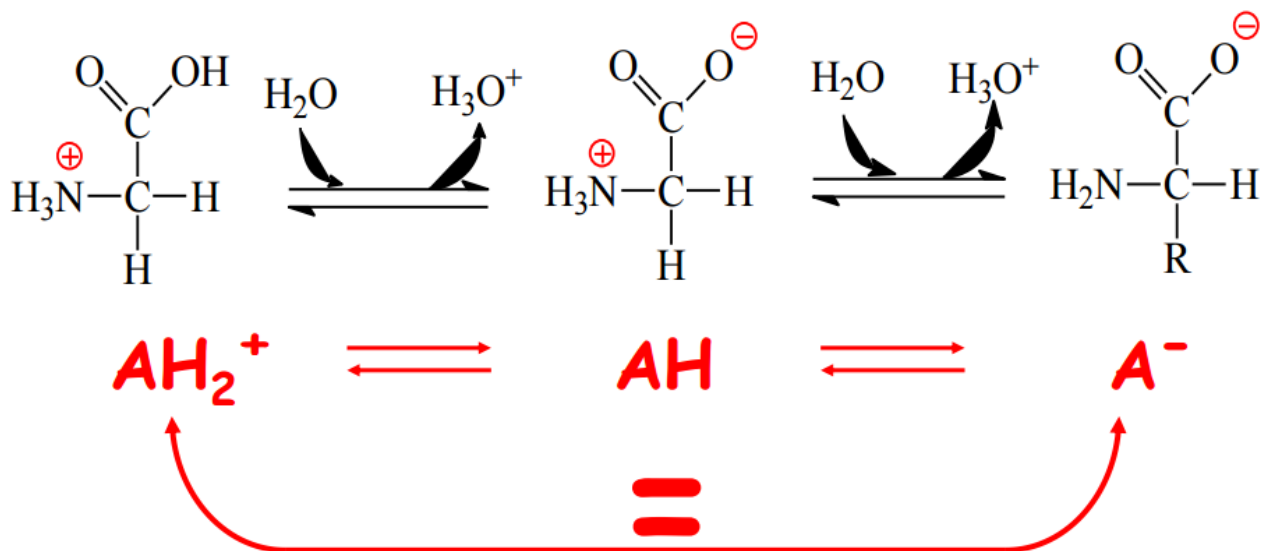


$$pK_1 = 2.3$$

$$pK_2 = 9.6$$

Il **punto isoelettrico (pI)** è il valore di pH al quale un amminoacido ha carica netta pari a 0, cioè è elettricamente neutro. Il pI è una caratteristica di ogni singolo amminoacido.





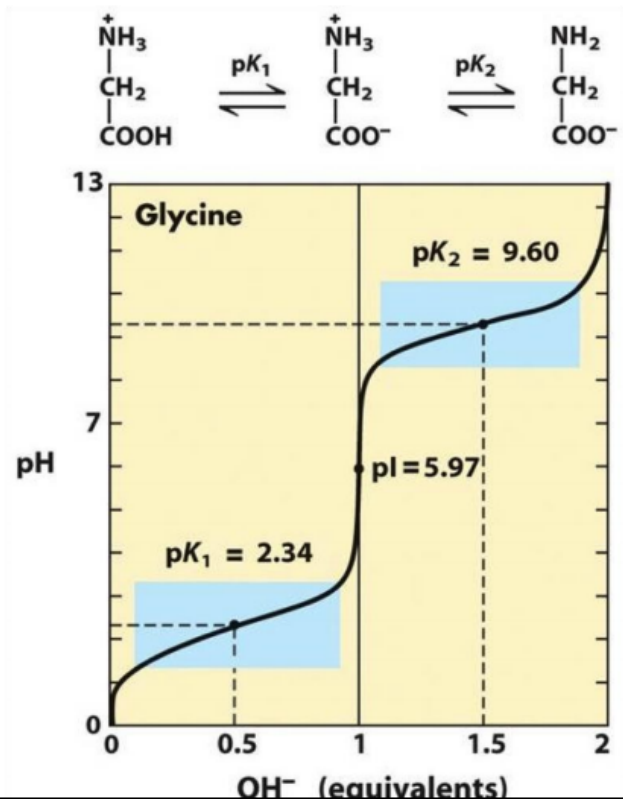
Per calcolare il pI si utilizza un artificio matematico, che porta alla seguente equazione:

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

La Glicina contiene due gruppi acidi deboli: il gruppo carbossilico con pKa pari a 2.3 e il gruppo amminico con pKa di 9.6.

Nella curva di titolazione della glicina, le aree azzurre sono le regioni tampone.

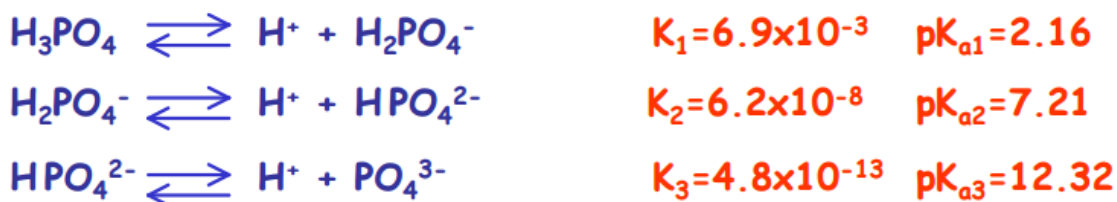
$$pI = (pK_1 + pK_2) / 2$$



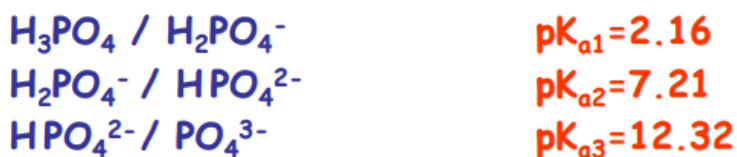
Es. TAMPONI FOSFATO

L'acido fosforico e i suoi anioni possono dar luogo a tre diversi tipi di tampone di particolare interesse.

Esso è infatti un acido triprotico:



e possono essere individuate tre coppie acido-base coniugate:



di cui è particolarmente importante la seconda che permette di preparare tamponi a pH intorno a 7.4

Lez.3 - Lisi cellulare e centrifugazione

Il primo passaggio della purificazione di una proteina è la rottura delle cellule che la contengono. Questa procedura, detta **frazionamento** (o **lisi**) **cellulare**, deve avvenire in un opportuno mezzo che preservi la struttura nativa delle proteine, ossia una soluzione tampone con precise caratteristiche. I tessuti devono essere inizialmente omogeneizzati tramite metodi meccanici, ossia sottoposti ad un processo che disintegra il tessuto, trasformandolo in un materiale omogeneo (**omogenato**). I metodi di rottura delle cellule possono invece essere **meccanici** o **non meccanici**, sono vari e dipendono dalla presenza o meno della parete cellulare e dalla natura chimica di questa:

- **Digestione enzimatica** (non meccanico): ad esempio, la parete cellulare dei batteri e dei lieviti può essere digerita con enzimi litici (lisozima e liticasi, rispettivamente) che vanno disciolti nel tampone in cui sono sospese le cellule;
- **Shock osmotico** (non meccanico): si crea una differenza di pressione osmotica tra l'ambiente intracellulare e quello extracellulare che causa l'entrata di acqua nella cellula e il suo conseguente rigonfiamento fino all'esplosione;
- **Sonicazione** (meccanico): gli ultrasuoni ad alta frequenza sono usati per rompere cellule batteriche e di lievito. Nella sospensione cellulare viene immersa la sonda metallica di un **sonicatore**, che è in grado di emettere onde sonore ad altissima frequenza. Le cellule vengono rotte dalle elevate pressioni locali indotte da queste onde. Lo svantaggio principale di questa tecnica è il notevole surriscaldamento al quale può andare incontro la sospensione cellulare.
- **French press** (meccanico): è una tecnica applicabile a microorganismi quali batteri e lieviti. La sospensione cellulare viene messa 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 e, mediante un pistone, viene applicata sulla sospensione cellulare una pressione idraulica molto elevata. Dopodiché si apre lentamente la valvola a spillo, così che le cellule possano fuoriuscire dalla valvola stessa. A causa della repentina variazione dei valori di pressione cui sono sottoposte uscendo dalla valvola, le cellule scoppiano e si frantumano.
- **Omogenizzazione**: le membrane sono rotte dalle forze frizionali che un pestello in teflon o vetro (**potter**), di solito tenuto in costante rotazione grazie ad un collegamento con un motore elettrico, esercita contro le pareti di uno spesso tubo di vetro (in cui è contenuta la sospensione cellulare), che deve avere un diametro leggermente superiore a quello del pestello. Le forze frizionali che si generano sono sufficienti per rompere la membrana delle cellule animali, ma non le cellule batteriche o vegetali.
- **Macinazione**: si applica in particolar modo a tessuti o cellule vegetali, che vengono mescolati con particelle abrasive (ad esempio granelli di sabbia) e tritati con un pestello a mano al fine di rompere le pareti cellulari tramite l'effetto abrasivo delle particelle.

Questi procedimenti rompono molte membrane ma lasciano intatti gli organuli che possono essere separati sulla base delle loro dimensioni e densità.

Un semplice metodo di separazione dei componenti dispersi in un liquido, che abbiamo ottenuto attraverso il **frazionamento cellulare**, consiste nel farli sedimentare. In un miscuglio di particelle o componenti diversi, infatti, le **velocità di sedimentazione** sotto l'effetto della gravità, sono diverse da componente a componente, il che darebbe la possibilità, con opportuni accorgimenti, di ottenerli separati l'uno dall'altro.

La velocità di sedimentazione è facilmente calcolabile partendo dalla legge di Stokes, la quale dice che la forza F di attrito che un liquido di viscosità η oppone al moto di una sferetta di raggio R che scorre in esso, è direttamente proporzionale alla velocità della sferetta, al suo raggio e al coefficiente di viscosità η del liquido. Si ha cioè in modulo

$$7.44) \quad F = 6\pi\eta Rv$$

Si osserva che un corpo che cade in un liquido viscoso dopo qualche tempo si muove di moto rettilineo uniforme. Prendiamo in esame una sfera di raggio R e densità ρ che venga lasciata cadere in un liquido viscoso di densità ρ_0 e che stia scendendo in esso con moto rettilineo uniforme. In queste condizioni deve essere necessariamente nulla la risultante delle forze agenti su di essa come vuole il principio d'inerzia. La forza F1, diretta verso il basso e causa del moto è equilibrata della forza viscosa F che si oppone al moto. F è pertanto diretta verso l'alto e il suo modulo è dato dalla legge di Stokes. Il modulo di F1 si può calcolare facilmente osservando che esso è dato dalla differenza tra la forza peso della sferetta

$$7.45) \quad mg = \frac{4}{3} \pi R^3 \rho g$$

e di quella dovuta alla spinta di Archimede

$$7.46) \quad f_A = \frac{4}{3} \pi R^3 \rho_0 g$$

Si ha cioè in modulo

$$7.47) \quad F_1 = mg - f_A = \frac{4}{3} \pi R^3 (\rho - \rho_0) g$$

Eguagliando la (7.44) e la (7.47) si ottiene:

$$6\pi\eta Rv = \frac{4}{3} \pi R^3 (\rho - \rho_0) g$$

da cui si ricava facilmente:

Posso utilizzare la sedimentazione che si ottiene dopo un certo tempo

Velocità di sedimentazione della particella v

Raggio della particella r

Densità della particella ρ_p

Densità del mezzo ρ_m

Viscosità del mezzo η

Accelerazione di gravità g

Costante per una sfera $\frac{2}{9}$

Coefficiente di sedimentazione (S)

Se:

$$\rho_p = \rho_m$$

$$\rho_p - \rho_m = 0$$

$$v = 0$$

.....non vi è sedimentazione

Il coefficiente di sedimentazione dipende dalla temperatura, dalla densità e dalla viscosità della soluzione. Poiché gli studi di velocità di sedimentazione vengono condotti impiegando svariati sistemi soluto-solvente, per convenzione si usa correggere il coefficiente di sedimentazione trovato sperimentalmente in quel valore che si otterrebbe in un mezzo la cui densità e viscosità fosse pari a quello dell'acqua a 20 °C: coefficiente di sedimentazione standard o s 20,w. $S = \text{Svedberg} = 10\text{-}13 \text{ sec.}$

Le velocità di sedimentazione dei componenti cellulari sono molto piccole ed è per accelerare questo processo che si ricorre alla centrifugazione, che consenta di ottenere gli stessi risultati in tempi notevolmente più brevi.

3.1 La centrifugazione

La **centrifugazione** è una delle principali metodologie separative utilizzate dell'indagine biochimica insieme alla dialisi, alla filtrazione, alla cromatografia o all'elettroforesi, in quanto permette la separazione meccanica in un mezzo liquido di materiali solidi dal liquido e di materiali solidi tra loro sottoponendoli ad una forza centrifuga. Questa operazione richiede l'uso di macchine dedicate, le **centrifughe** per provette, che fondamentalmente sono costituite da un **motore** a velocità variabile, al cui asse viene ancorato un **rotore** che porta gli alloggiamenti per le provette ed è confinato in una camera chiusa.

Lo scopo è quello di applicare un campo gravitazionale artificiale attraverso la rotazione ad alta velocità (**Campo centrifugo**), in quanto le particelle possono essere separate poiché sedimentano con velocità diversa a seconda delle diverse caratteristiche di densità, dimensione e forma.

L'equazione fondamentale che descrive la **velocità di sedimentazione** di una particella in sospensione, sottoposta ad un **campo centrifugo G**, è la seguente:

$$G = \omega^2 r$$

in cui r è la distanza radiale della particella dall'asse della rotazione espressa in cm, mentre ω è la velocità angolare del rotore espressa in angoli radianti/sec. Un angolo radiante rappresenta il rapporto tra la lunghezza dell'arco di circonferenza spazzato dall'angolo e la lunghezza del raggio di tale circonferenza. Più frequentemente la velocità angolare del rotore viene espressa in termini di **rivoluzioni per minuto (rpm)**, dove una rivoluzione (un giro) del rotore è pari a 2π rad. Quindi ω può essere espressa come:

$$\omega = \frac{2\pi}{60} \text{rpm}$$

Per cui, sostituendo il valore di ω all'equazione si ottiene:

$$G = \frac{4\pi^2(\text{rpm})^2 r}{3600}$$

Il campo centrifugo G può anche essere espresso in multipli dell'accelerazione gravitazionale terrestre (ossia g , pari a 981 cm/sec^2), cioè come rapporto tra il peso della particella sottoposta al campo centrifugo e il peso della particella in presenza della sola forza di gravità. In questo caso, quindi, G viene espresso in termini di **campo centrifugo relativo (RCF)** o, più comunemente, come **numero di g**.

$$RCF = \frac{F_c}{F_g} = \frac{m\omega^2 r}{mg} = \frac{4\pi^2 \cdot (\text{RPM})^2}{3600 \times 980} \cdot r$$

che diventa:

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

Per descrivere la modalità di centrifugazione in maniera completa bisogna pertanto indicare o la RCF o la velocità di rotazione (rpm) insieme al raggio del sistema. Il **normogramma** serve per convertire i g in rpm quando è noto il rotore che si deve adoperare e quindi si conosce r.

Il materiale biologico sottoposto ad una separazione mediante centrifugazione è sempre sospeso in un solvente. Quindi la velocità di sedimentazione di una particella non dipende solo dal campo centrifugo applicato, ma anche dalle caratteristiche fisiche (dimensione, peso, densità e forma) della particella stessa e dalla viscosità del solvente in cui si trova. Secondo la legge di Stokes, che tiene conto di tutti questi parametri, la velocità di sedimentazione di una particella sferica è la seguente:

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

La velocità di sedimentazione può essere divisa per il campo centrifugo applicato, ottenendo il **coefficiente di sedimentazione (s)**, ossia:

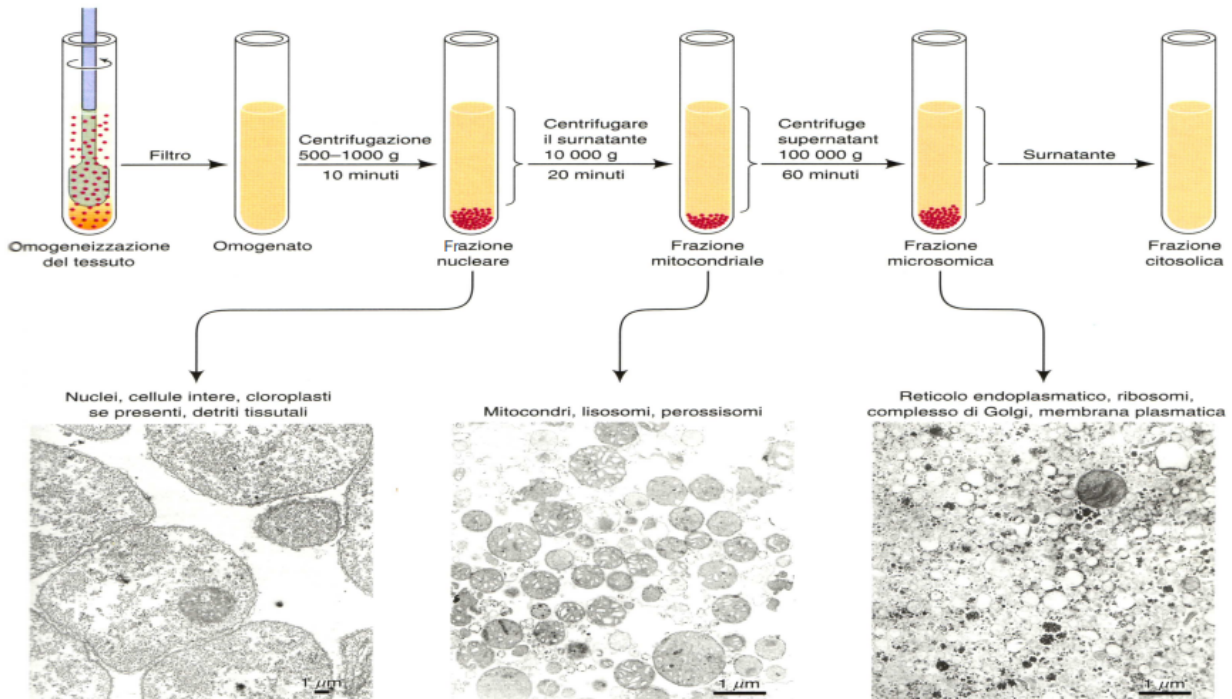
$$s = \frac{v}{\omega^2 r}$$

Il coefficiente di sedimentazione è espresso in secondi e dipende dalla temperatura, dalla densità e dalla viscosità della soluzione. Proprio per questo motivo, poiché gli studi di velocità di sedimentazione vengono condotti impiegando soluzioni diverse, per convenzione si usa correggere il coefficiente di sedimentazione trovato sperimentalmente nel valore che si otterrebbe in un mezzo la cui densità e viscosità fossero pari a quella dell'acqua a 20 °C. Il valore così trovato viene quindi espresso come **coefficiente di sedimentazione standard**. Valori tipici di s, per le diverse molecole biologiche, sono nell'ordine di 10^{-13} secondi, perciò questa quantità è stata definita 1 **unità Svedberg (S)**.

In generale le tecniche centrifugative possono essere suddivise in **preparative** e **analitiche**. La **centrifugazione preparativa** permette di separare e raccogliere cellule intere, o organelli subcellulari e macromolecole biologiche, come acidi nucleici o proteine. Nella centrifugazione preparativa è possibile lavorare con grandi quantità di materiale e a bassa velocità. La **centrifugazione analitica** viene invece utilizzata per studiare le caratteristiche di sedimentazione di un campione e per determinare il grado di purezza o la massa molecolare. Pertanto si lavora ad alta velocità e a volumi inferiori di materiale da analizzare. Le tecniche di **centrifugazione preparativa** comprendono la **centrifugazione differenziale** e la **centrifugazione in gradiente di densità**.

Nella **centrifugazione differenziale** il materiale da frazionare è sottoposto a centrifugazioni sequenziali, in cui in ogni passaggio successivo si aumenta il valore del campo centrifugo applicato. Per ogni centrifugazione si ottiene sempre un sedimento e un sopranatante, cioè una soluzione contenente il materiale che non è sedimentato. In ogni passaggio, alla fine della centrifugazione, si separa il sedimento dal soprinatante e il sedimento viene lavato più volte, risospingendolo nel tampone di omogeneizzazione

e centrifugandolo nuovamente nelle stesse condizioni. In questo modo si migliora la separazione e si ottiene una preparazione purificata del materiale presente nel sedimento, ma inevitabilmente si ha una riduzione della resa. La frazione del soprannatante viene sottoposta ad altri passaggi di centrifugazione, con valori di velocità e di tempo maggiori, per ottenere la sedimentazione degli organelli più piccoli. In questa tecnica si utilizzando campi centrifughi fino a 75 000 g, che però non sono sufficienti per sedimentare le macromolecole in soluzione (che rimangono nel soprannatante).



Per valutare l'efficacia di un frazionamento subcellulare, viene analizzata la presenza nelle diverse frazioni di enzimi o proteine (marcatori o *marker*), che sono localizzati in modo specifico in un determinato compartimento cellulare, e si valuta la loro **attività specifica** mediante saggi di attività enzimatica o analisi elettroforetiche.

$$\text{Attività specifica (in U/ mg di proteine)} = \frac{\text{Attività enzimatica (in U/mL)}}{\text{Concentrazione totale di proteine (in mg/mL)}}$$

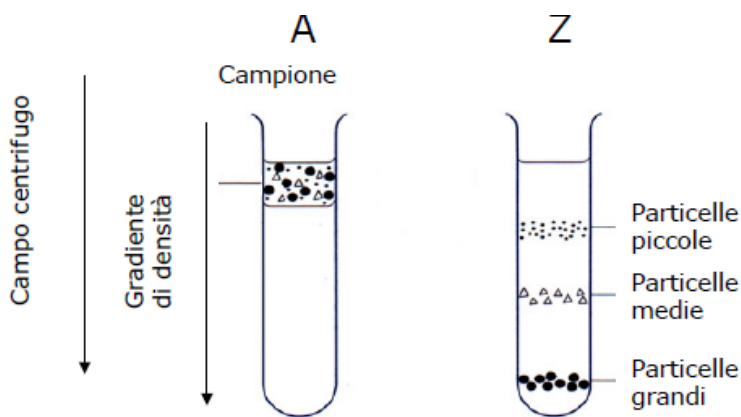
Se la centrifugazione è stata efficace l'attività specifica nella frazione purificata è maggiore dell'attività specifica di partenza.

La **centrifugazione in gradiente di densità** richiede la presenza di una colonna di liquido la cui densità sia crescente man mano che si raggiunge il fondo della provetta da centrifuga. Questo può essere ottenuto stratificando nella provetta piccole quantità di soluzioni a concentrazione decrescente, dal fondo verso l'imboccatura della provetta (**gradiente discontinuo**), oppure utilizzando un piccolo apparato mescolatore che consente la formazione di un **gradiente continuo**, dalla concentrazione maggiore a quella minore. Una volta formato il gradiente, si stratifica il campione da centrifugare sopra la miscela e, durante la centrifugazione, le particelle si separeranno secondo i loro coefficienti di sedimentazione, formando delle bande discrete. Le caratteristiche ideali dei materiali per gradienti sono le seguenti:

- Ampio intervallo di tossicità;
- Bassa pressione osmotica;

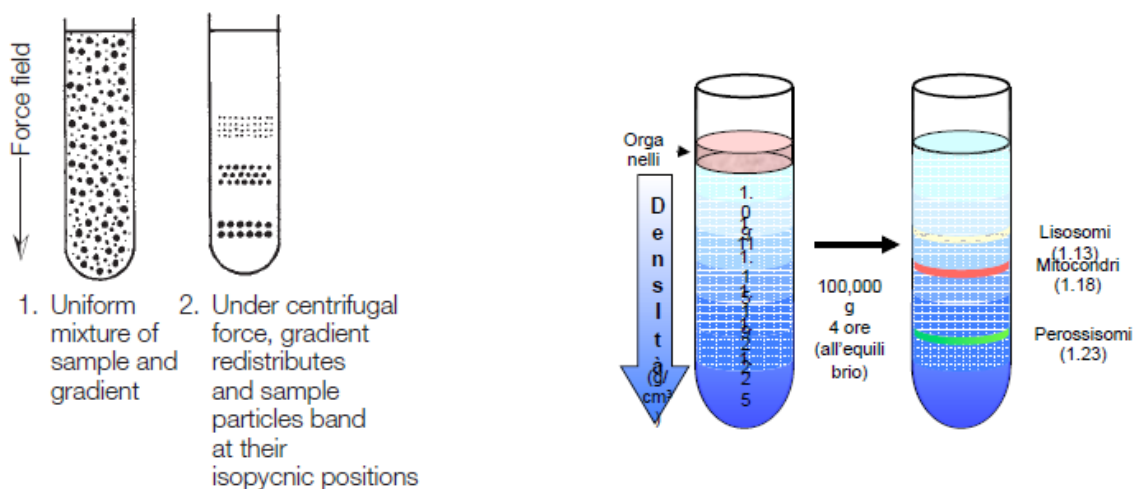
- Bassa viscosità;
- Nessuna tossicità;
- Compatibilità con materiali biologici;
- Incapacità di penetrare le membrane.

La **centrifugazione zonale** consiste nella sedimentazione delle particelle in zone discrete ed è usata per la separazione di particelle di densità simile ma di massa diversa. Trattandosi di un metodo dinamico, la durata della centrifugazione deve essere sufficiente a determinare la separazione delle componenti, ma inferiore al tempo necessario alla completa sedimentazione al fondo della provetta. Dal punto di vista operativo si procede come appena descritto nella centrifugazione a gradiente di densità.



A differenza della centrifugazione zonale, la **centrifugazione isopcnica** (o **all'equilibrio di densità**) è una centrifugazione all'equilibrio, che consiste nel portare ogni componente della miscela ad un livello corrispondente alla propria densità: il gradiente si forma durante la centrifugazione stessa. Si tratta, quindi, di una tecnica che separa le particelle di una miscela esclusivamente in base alla densità, e non in base alla forma ed alle dimensioni. Una volta raggiunto l'equilibrio, questo non viene alterato dal tempo di centrifugazione.

A volte il gradiente non è preformato ma si forma per effetto della F.C. sulle molecole del soluto. Gradienti continui e discontinui.



Una volta terminata la centrifugazione, si possono raccogliere le particelle contenute nelle bande così separate facendo un buco sul fondo della provetta e raccogliendo il gradiente goccia a goccia.

Le **ultracentrifughe preparative** possono raggiungere velocità massime fino a 70 000 rpm e campi centrifughi oltre i 200 000 g. In questo modo, riescono a separare particelle piccole quali microsomi, ribosomi, batteri, virus, acidi nucleici e proteine. Le **ultracentrifughe analitiche**, che invece possono operare a velocità che arrivano fino a 100 000 rpm (oltre 600 000 g), possiedono un sistema ottico che permette di osservare il materiale biologico mentre sedimenta. Man mano che la sedimentazione procede, l'insieme di particelle, e quindi il picco, si spostano, per cui la misura della velocità di spostamento del picco costituisce la velocità di sedimentazione della particella. Dalla velocità di sedimentazione si possono ricavare il coefficiente di sedimentazione, quello di diffusione, il peso molecolare, la densità, la concentrazione e l'omogeneità di una soluzione.

Le **centrifughe da banco** sono le più semplici e le meno costose, spesso usate per raccogliere piccole quantità di materiale che sedimenta rapidamente. Generalmente presentano velocità massime comprese tra 4000 e 6000 rpm con RCF massimi di compresi tra 3000 e 7000 g. Molte di esse operano a temperatura ambiente, tuttavia alcuni modelli sono provvisti di un sistema di refrigerazione.

Le **centrifughe refrigerate ad alta velocità** sono sistemi che possono raggiungere una velocità massima di 8000 - 20000 rpm e un RCF massimo di 10000 - 50000 g. Tutte posseggono camere refrigerate e le differenze tra una centrifuga e l'altra consistono essenzialmente nella capacità massima degli alloggiamenti dei rotori. Con queste centrifughe si possono usare sia rotori ad angolo fisso sia a bracci oscillanti.

Esistono diversi tipi di **rotori**:

- **Ad angolo fisso:** in cui le provette sono poste ad un certo angolo rispetto all'angolo di rotazione, dai 15 ai 45°; questi hanno piccole differenze fra r_{max} e r_{min} , presentano un tempo per la sedimentazione minore, sono più pesanti e necessitano di una maggiore energia per operare; infine si utilizzano per sedimentare macromolecole e particelle fini.
- **Verticali:** in cui le provette sono poste parallelamente all'asse di rotazione;
- **A bracci oscillanti:** in cui le provette in partenza sono poste parallelamente all'asse di rotazione, ma i portaprovette possono ruotare e quindi le provette vengono a trovarsi a 90° rispetto all'asse di rotazione durante la centrifugazione; analogamente a ciò che avviene in certe giostre ai seggiolini dei passeggeri. Questi sono da preferire per centrifugare particelle cellule e particelle e per la centrifugazione su gradiente.

Lez.4 - Metodi cromatografici

La **cromatografia** (dalle parole greche *chromos*, colore, e *graphein*, scrivere) è una tecnica di separazione basata sulla differente ripartizione tra due fasi immiscibili delle molecole che si vogliono separare. Nelle separazioni cromatografiche, una delle due fasi (**fase mobile**, che può essere liquida o gassosa) viene fatta scorrere attraverso l'altra fase (**fase stazionaria**, che può essere solida o liquida), che è immobilizzata su un supporto generalmente costituito da una colonna o una lastrina. Il fondamento di tutte le tecniche cromatografiche è il **coefficiente di ripartizione o di distribuzione (K_r)**, che definisce le proporzioni in cui una sostanza si distribuisce tra le due fasi immiscibili. Ad una determinata temperatura, una sostanza si distribuisce tra le due fasi con un coefficiente di ripartizione definito come:

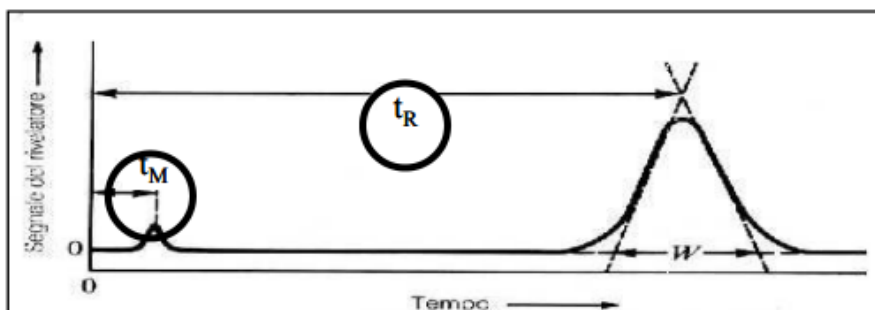
$$K_r = \frac{\text{Concentrazione nella fase mobile}}{\text{Concentrazione nella fase stazionaria}}$$

Ogni sostanza ha un suo caratteristico valore di K_r , che la identifica in modo univoco. Le molecole da separare devono, infatti, avere coefficienti di distribuzione diversi tra le due fasi.

In base alla forma del letto cromatografico su cui è realizzato il processo separativo, possiamo avere le seguenti varianti:

- **Cromatografia su colonna:** la fase stazionaria è contenuta all'interno di una colonna cilindrica, che può essere riempita completamente (**colonna impaccata**) oppure rivestita sulla superficie interna (**colonna tubulare**);
- **Cromatografia planare:** la fase stazionaria è distribuita su una superficie piana, che può essere un supporto cartaceo (**cromatografia su carta, PC**) o una lastrina in vetro o altri materiali (**cromatografia su strato sottile, TLC**).

Ponendo all'uscita della colonna un rivelatore che misuri la concentrazione del soluto nell'**eluuto** (cioè la fase mobile che esce dalla colonna) e riportando il segnale in funzione del tempo, si può ottenere un **cromatogramma**.



Dal punto di vista teorico, i principali parametri cromatografici sono i seguenti:

- **Tempo di ritenzione (t_R):** il tempo che intercorre dall'introduzione del campione in colonna all'uscita dalla colonna dell'apice del picco di eluizione corrispondente;

- **Tempo morto (t_M):** il tempo che una molecola non trattenuta (o la fase mobile) impiegano per uscire dalla colonna;
- **Tempo netto di ritenzione:** è dato dalla differenza fra tempo di ritenzione e tempo morto;
- **Volume di ritenzione (V_R):** il volume di fase mobile richiesto per eluire una molecola;
- **Volume morto (V_M):** il volume di ritenzione di un composto che non è trattenuto (corrisponde al volume di fase mobile che occupa una colonna).

La **larghezza della base (w)** assume solitamente la forma di una gaussiana. Le molecole di un analita, però, non si muovono lungo la colonna con la stessa velocità: la loro dispersione ha generalmente un profilo gaussiano, e il centro del profilo (**banda di eluizione**) rappresenta la velocità media. I fattori che provocano deviazioni dal valore medio sono:

- **diffusione longitudinale:** diffusione delle molecole dalla zona a maggiore concentrazione verso quella a minore concentrazione, in direzione parallela all'asse della colonna;
- **Trasferimento di massa** tra fase mobile e fase stazionaria;
- **Percorsi multipli.**

Oltre al tempo di ritenzione t_R , è possibile quantificare l'interazione di un soluto con la fase stazionaria in due modi:

1. **Volume di ritenzione:**

- $V_R = t_R \times F$; dove F è la velocità di flusso mediante il volume di fase mobile V_R necessario per eluire il flusso. La velocità di flusso dipende dalle dimensioni della colonna, dalle caratteristiche delle particelle e dalla viscosità della fase mobile.
- $V_R = V_M + K_d V_s$; dove V_s è il volume della fase stazionaria e K_d è il coefficiente di distribuzione tra le due fasi.

2. **Rapporto di ritenzione (o di capacità) K' :** è una misura del tempo effettivo che un analita impiega ad eluire dalla colonna confrontato con quello di un analita escluso o non ritenuto (non si ripartisce nella fase stazionaria, perciò $k'=0$). K' è tanto più elevato quanto più a lungo è trattenuto il soluto.

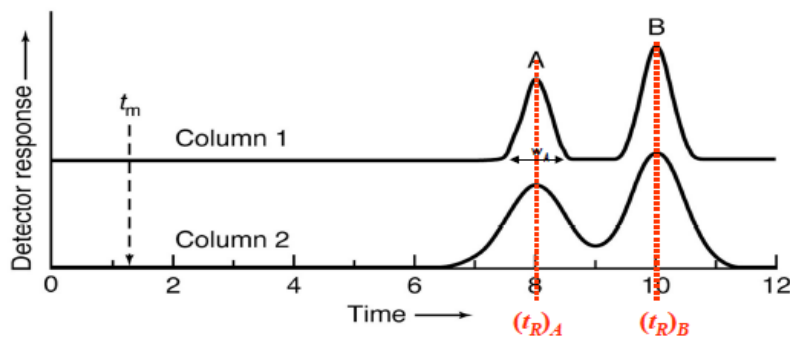
$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{V_R - V_M}{V_M}$$

Può essere ricavato dai parametri del cromatogramma

Nel suo complesso, la bontà di un sistema cromatografico dipende dai seguenti parametri:

- Selettività:** è la capacità di un sistema cromatografico (fase stazionaria + fase mobile) di discriminare tra due composti strutturalmente correlati e si misura come rapporto tra i tempi di ritenzione;
- Risoluzione (R):** è una misura quantitativa della capacità di separare due analiti.

$$R = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$



- C. **Efficienza:** la capacità di un sistema cromatografico di eluire tutte le particelle della stessa specie alla stessa velocità, in modo da formare bande strette in colonna da cui picchi stretti (in termini di ampiezza). È, in pratica, la misura degli effetti di diffusione, che provocano l'allargamento dei picchi e la loro sovrapposizione.

L'efficienza di un sistema cromatografico, e in particolare di una colonna, si quantifica con il cosiddetto numero di **piatti teorici**, cioè la serie di strati sottili in cui si considera composto un sistema cromatografico. In ognuno di questi microelementi della colonna si realizza l'equilibrio di distribuzione del soluto tra la fase stazionaria e la fase mobile. Lo spostamento lungo la colonna è dovuto all'azione dinamica della fase mobile. Dalla forma di un picco si può ricavare il numero di piatti teorici N per quella cromatografia, che considera il volume di eluizione (V_R) e l'ampiezza di un picco:

$$N = 16 (V_R / W)^2$$

Noto N , si può risalire all'**altezza equivalente del piatto teorico (H.E.T.P) H**, detta L la lunghezza della colonna:

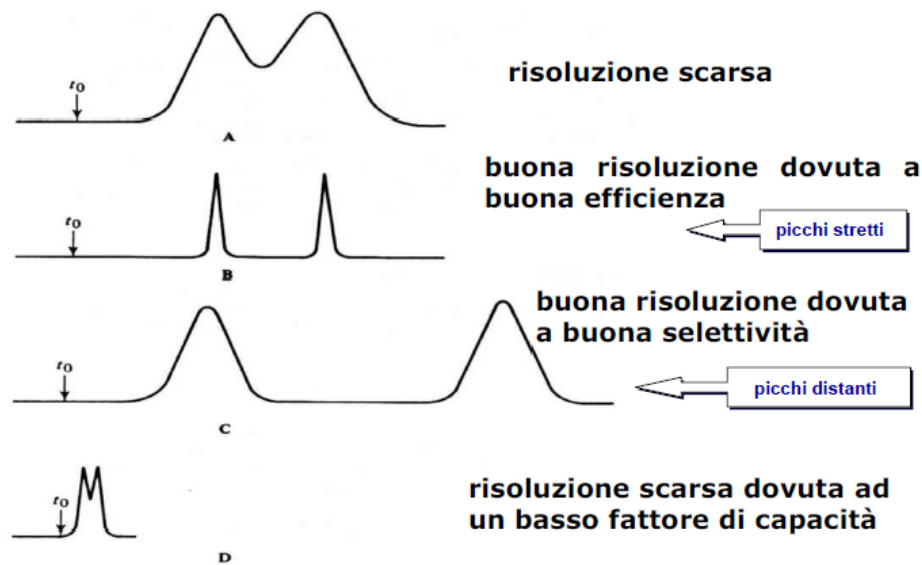
$$H = \frac{L}{N}$$

Le variabili che influenzano l'efficienza (la larghezza dei picchi) di una colonna sono:

- La velocità di flusso lineare (cm/s) della fase mobile;
- L'altezza equivalente del piatto teorico (H), che dipende proprio dalla velocità di flusso della fase mobile;
- L'impaccamento della colonna.

Le variabili che influenzano la risoluzione (separazione dei picchi) di una colonna sono:

- La scelta della fase stazionaria;
- La scelta della fase mobile;
- La lunghezza della colonna;
- La temperatura.



4.1 Cromatografia a scambio ionico

Il principio su cui si basa questo tipo di cromatografia è l'attrazione che si verifica tra molecole di cariche di segno opposto. La carica netta che questi composti presentano dipende dal loro **punto isoelettrico (pI)** e dal pH della soluzione tampone in cui sono disciolti. Ad esempio, proteine poste in una soluzione tampone avente un pH inferiore al loro punto isoelettrico avranno carica netta positiva, mentre se il tampone ha un valore di pH superiore al loro punto isoelettrico esse avranno carica netta negativa.

Tale metodo permette quindi di separare le molecole sulla base della **carica netta superficiale**. Le molecole modificheranno il grado di interazione con il mezzo cromatografico in base alla loro carica totale, alla densità di carica e alla distribuzione della loro carica. I gruppi che contribuiscono alla formazione della carica netta di una molecola hanno diversi valori di pKa dipendenti dalla loro struttura e dal microambiente in cui si trovano e la loro carica è strettamente dipendente dal pH. La cromatografia a scambio ionico si avvantaggia per il fatto che il rapporto esistente tra la carica netta e il pH per una specifica proteina è unico.

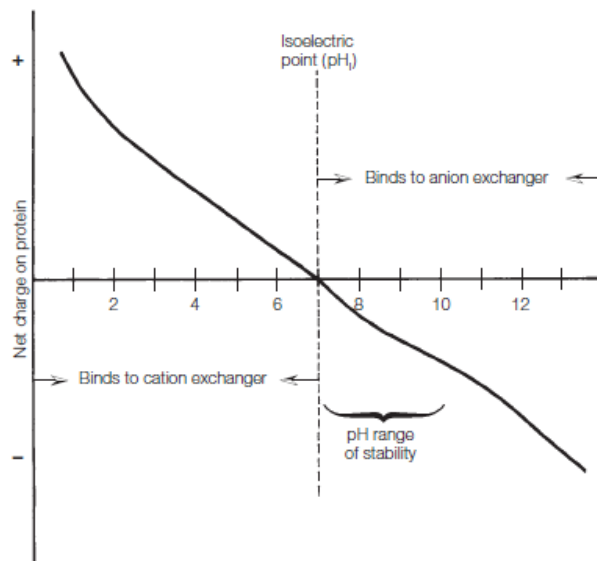


FIGURE 5.6 The effect of pH on the net charge of a protein.

Le separazioni per scambio ionico sono condotte in colonne impaccate con una resina scambiatrice di ioni. Esistono due tipi di resine:

- **Scambiatori cationici:** possiedono gruppi carichi negativamente e attraggono molecole cariche positivamente (i cationi); sono anche chiamati materiali acidi a scambio ionico, perché le loro cariche negative risultano dalla ionizzazione di gruppi acidi.
- **Scambiatori anionici:** possiedono gruppi carichi positivamente e attraggono pertanto molecole cariche negativamente (gli anioni). Sono anche chiamati materiali basici a scambio ionico, perché le loro cariche positive risultano generalmente dall'associazione di protoni con gruppi basici.

Esistono **scambiatori forti**, che mantengono la loro carica anche per valori di pH estremi, e **scambiatori deboli**, i cui gruppi ionizzabili titolano invece a tali valori di pH. Gli scambiatori sono legati covalentemente a matrici solide inerti. Queste resine scambiatrici di ioni sono formate da polimeri insolubili uniti tra loro da legami intrecciati, che formano una matrice più o meno intricata. Le particelle da cui sono formate queste resine possono essere di diverse dimensioni, dette **mesh**. Il *mesh* indica le dimensioni del setaccio molecolare: maggiore è il numero di *mesh*, più piccole sono le particelle che compongono la matrice.

Le resine possono essere porose o non porose, ma devono:

- Essere fisicamente stabili;
- Essere chimicamente resistenti anche a condizioni stringenti di lavaggio;
- Avere bassi livelli di interazione non specifica;
- Essere modificabili per diventare specifiche;

Tamponi cationici dovrebbero essere utilizzati con resine a scambio anionico, e tamponi anionici con resine a scambio cationico. In questo modo non si influisce sulla **capacità** della resina.

Una proteina che non ha carica netta ad un pH equivalente al proprio pI non interagirà con un mezzo carico ma ad un pH superiore al pI, la proteina legherà un mezzo carico positivamente o ad uno scambiatore di anioni; mentre ad un pH inferiore al proprio pI, la proteina legherà un mezzo carico negativamente o ad uno scambiatore di cationi.

La **risoluzione** è definita come la distanza massima tra i picchi in rapporto alla media della larghezza della base dei picchi (può essere determinata dal cromatogramma) e dipende:

- Dalle proprietà della matrice;
- Dalle condizioni di eluizione;
- Dalle condizioni di impaccamento della colonna;
- Dal flusso della fase mobile.

L'**efficienza** dipende:

- Dalla diffusione longitudinale, che a sua volta dipende dall'impaccamento della colonna, e dalla presenza di bolle;
- Dal tipo di resina utilizzata: più piccole sono le dimensioni delle particelle, migliore sarà la dimensione del picco.

La **selettività** dipende:

- Dalla natura e dal numero di gruppi funzionali presenti sulla matrice;
- Dalle condizioni sperimentali come il pH e dalla forza ionica;
- Dalle condizioni di eluizione.

La selettività, in funzione del pH, si raggiunge utilizzando la cromatografia a scambio ionico a valori di pH per i quali si possano rendere massime le differenze in termini di carica netta dei componenti di interesse. L'optimum di selettività si ottiene normalmente a valori di pH per i quali sia massima la differenza tra le curve di titolazione (maggiore differenza in carica netta) e utilizzando uno scambiatore di ioni con una carica opposta alla carica della proteina a quel particolare pH.

Talvolta la curva di titolazione di una proteina non è totalmente predittiva sul comportamento della proteina: il pI è dato dalla carica netta totale, mentre la cromatografia a scambio ionico è basata solo sulla presenza della carica netta superficiale.

4.2 Cromatografia di affinità

La purificazione tramite **cromatografia di affinità**, a differenza degli altri tipi di cromatografia, dell'elettroforesi e della centrifugazione, non si basa sulle differenze nelle proprietà chimico-fisiche delle molecole da separare, ma sfrutta le interazioni altamente specifiche che si possono instaurare tra le macromolecole biologiche. Tale tecnica permette, infatti, di separare proteine sulla base di un **legame reversibile** (interazioni di natura elettrostatica o idrofobica, forze di Van der Waals o ponti idrogeno) tra una proteina e uno specifico ligando agganciato alla matrice cromatografica. Pertanto, la tecnica è caratterizzata da alta selettività, alta risoluzione e alta capacità, permettendo di raggiungere una purificazione completa in una singola tappa, anche partendo da miscele complesse.

Se, in condizioni sperimentali corrette, si introduce in una colonna di affinità una miscela contenente la macromolecola da purificare, solo questa si legherà alla fase stazionaria, mentre gli altri elementi verranno rimossi con un semplice lavaggio. La macromolecola di interesse sarà poi recuperata eluendo la cromatografia con un tampone opportuno, utilizzando un ligando competitivo o modificando il pH, la forza ionica (la cui variazione provoca una diminuzione della forza del legame tra proteina e ligando) o la polarità.

Questo metodo è ovviamente basato sulla conoscenza approfondita della struttura e delle proprietà di legame della macromolecola che si vuole isolare, utile per scegliere il giusto ligando e scegliere (o sintetizzare) una buona resina di affinità. Il ligando utilizzato, che di solito è legato ad un braccio spaziatore per renderlo più accessibile alla macromolecola, deve avere le seguenti caratteristiche:

- Il gruppo chimico da legare alla matrice o al braccio spaziatore non deve essere coinvolto nel legame con la macromolecola da purificare;
- Deve essere attaccato alla matrice in modo da non interferire con la capacità di legare la macromolecola;
- Il braccio spaziatore tra ligando e matrice deve avere una lunghezza di 6-10 atomi di carbonio.

La matrice ideale da utilizzare nella cromatografia di affinità deve possedere le seguenti caratteristiche:

- Deve contenere numerosi gruppi reattivi adatti a legare covalentemente il ligando e deve risultare stabile nelle condizioni in cui avviene tale attacco;
- Deve essere stabile nelle condizioni di interazione della macromolecola e nella successiva eluizione;
- Non deve interagire, se non debolmente, con altre macromolecole, per evitare un adsorbimento aspecifico;
- Deve possedere buone capacità di flusso.

4.3 Cromatografia di adsorbimento

Questo tipo di cromatografia si basa sulla capacità di alcuni materiali solidi di adsorbire (legare tramite interazioni deboli, quali forze di Van der Waals e legami idrogeno) le molecole sulla loro superficie. Sulla superficie dei granuli si trovano **siti attivi** che possono stabilire legami deboli (reversibili!) con le molecole della miscela da separare. Utilizzando tale tecnica, le molecole che si vogliono separare si legano alla fase stazionaria solida e devono essere eluite utilizzando una fase mobile diversa da quella usata per l'equilibratura della colonna.

Si tratta quindi di cromatografia di adsorbimento, che può essere gas-solido o liquido-solido a seconda della natura della fase mobile ed è indicata per separare molecole con polarità diversa.

I siti di adsorbimento possono essere occupati dall'**eluente** o dall'**analita**. Un tipico adsorbente è la **silice**, che è leggermente acida e può interagire con gruppi polari dell'analita o dell'eluente. Le proprietà di separazione dipendono dalla disposizione dei gruppi di silanolo. Altre resine utilizzate sono l'**allumina** (Al_2O_3) e il **carbone**.

Tabella 3-2: Gruppi funzionali interessati dalla cromatografia di adsorbimento in ordine di polarità crescente.

Gruppo funzionale	Struttura
Metile	- CH ₃
Fluoro	- F
Cloro	- Cl
Nitro	- NO ₂
Aldeide	- CHO
Acetile	- O - C(=O) - CH ₃
Ossidrile	- OH
Chetone	- C(=O) -
Ammine	- NH ₂
Carbossile	- COOH
Ammide	- NH - C(=O) -

Note: A vertical arrow on the left of the table points downwards, labeled 'polarità', indicating increasing polarity from top to bottom.

I gruppi legati alla silice che più frequentemente vengono utilizzati sono:

- ottadecil - CCCCCCCCCCCCCCCCCC
- ottil - CCCCCCCC
- etil - CC
- fenil - c1ccccc1
- cianoetil - CC#N
- idrossietil - CCO
- amminoetil - CCN

A FASE DIRETTA

Note: A vertical arrow on the right of this block points downwards, labeled 'POLARITA'', indicating increasing polarity from top to bottom.

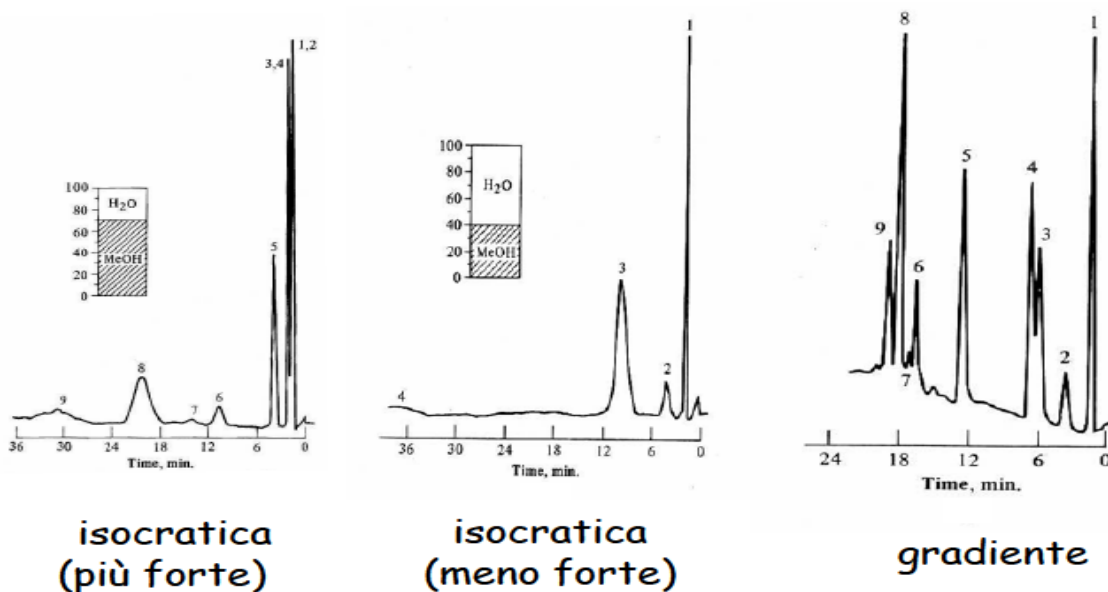
Esistono due tipi principali di cromatografia di adsorbimento, che si differenziano per la relativa polarità della fase stazionaria e della fase mobile:

- In **fase normale**: la fase stazionaria è polare (acqua o un'alchimmina legata alla silice) e la fase mobile è relativamente non polare (una miscela di acqua e solventi organici); viene eluito per primo l'analita meno polare e per ultimo quello più polare. La fase normale è adatta per separare analiti con scarsa solubilità in solventi acquosi.
- In **fase inversa**: la fase stazionaria è apolare, mentre quella mobile è relativamente polare. La fase stazionaria è costituita nella maggior parte dei casi da gruppi alchilici legati alla silice e i più utilizzati sono il butile (C4), l'ottile (C8) e l'ottadecile (C18). L'eluizione viene condotta utilizzando solventi acquosi, metanolo, acetonitrile, tetraidrofurano o miscele di questi. Gli analiti polari eluiscono per primi, in quanto la fase stazionaria è inerte e instaura solo interazioni apolari idrofobiche con gli analiti. L'eluizione può richiedere un gradiente con proporzioni crescenti di solvente a bassa polarità.

Basilare è la scelta del **solvente di eluizione** (fase mobile), che solitamente si sceglie con un grado di polarità paragonabile a quello dell'analità più polare presente nella miscela da separare:

- ✚ Alcoli: se la miscela contiene analiti con gruppi ossidrilici;
- ✚ Acetone o esteri: se gli analiti presentano gruppi carbonilici;
- ✚ Idrocarburi come esano, eptano e toluene per analiti non polari.

L'eluizione può essere **isocratica**, cioè a concentrazione costante, oppure essere in gradiente.



4.4 Cromatografia ad esclusione molecolare o gel filtrazione

La **cromatografia ad esclusione molecolare** o **gel-filtrazione** viene utilizzata per separare le macromolecole in base alle loro dimensioni. In questo tipo di cromatografia le fasi stazionarie sono costituite da materiali porosi che hanno proprietà di setaccio e riescono a filtrare le molecole a seconda delle loro dimensioni. I materiali più comunemente usati a questo scopo sono dei granuli costituiti da polisaccaridi insolubili che

formano un reticolo tridimensionale e, una volta immersi nella fase mobile acquosa, le assorbono aumentando il loro volume e assumendo la consistenza e le proprietà di un gel: la quantità di solvente assorbita per ogni grammo di gel secco dipende dalla dimensione dei pori. La fase stazionaria è quindi costituita da sferette gelatinose che si impaccano lasciando tra loro uno spazio interstiziale. Le molecole da separare, disciolte nella fase mobile, sono caricate sulla colonna e lasciate penetrare nel gel. Le molecole che sono troppo grandi per penetrare nel reticolo gelatinoso vengono completamente escluse dal volume delle sferette e quindi si muovono solo attraverso gli spazi interstiziali (che nel loro insieme costituiscono il cosiddetto **volume escluso** o **vuoto**). Le molecole più piccole invece riescono a penetrare nel reticolo gelatinoso e si ripartiscono all'equilibrio tra l'interno e l'esterno delle sferette. In questo modo esse sono rallentate rispetto alle molecole che passano nel volume escluso. Le molecole che penetrano nelle sferette sono a loro volta rallentate in modo diverso a seconda delle loro dimensioni, che determinano il coefficiente di distribuzione (tra solvente esterno ed interno alle sferette di gel). La fase mobile può essere un solvente organico (**Gel Permeation Chromatography, GPC**) oppure acqua o una soluzione tampone (**Gel Filtration Chromatography, GFC**).

Ogni fase stazionaria è caratterizzata da un **limite superiore di esclusione**, espresso come il valore di peso molecolare al di sopra del quale le proteine sono escluse dal volume interno delle sferette (ossia passano solo nel volume vuoto), e un **limite inferiore di esclusione**. Al di sotto di un certo peso molecolare, infatti, non c'è separazione tra le proteine, poiché queste passano con eguale facilità nel volume vuoto e tra le maglie del gel. Soltanto le proteine con peso molecolare compreso nell'intervallo tra i due limiti sono separabili tramite cromatografia su quella determinata resina. La qualità della separazione è tanto migliore quanto più ristretto è l'intervallo in cui si distribuiscono le dimensioni delle particelle. Le proprietà delle resine di partenza hanno le seguenti proprietà:

- **Limite di esclusione;**
- **Intervallo di frazionamento;**
- **Acqua guadagnata e volume di letto (bed volume);**
- **Forma e dimensione delle particelle di resina.**

Le fasi stazionarie più comunemente utilizzate comprendono destrani a legami incrociati (come la Sephadex), agarosio (Sepharosio, Bio-Gel A), poliacrilammide (Bio-Gel P), poliesteri, gel di silice, poliacrilomorfina e polistireni.

Anche nel caso della cromatografia ad esclusione molecolare abbiamo dei parametri fissi che dobbiamo tenere in considerazione:

- ✓ Il **volume morto** (V_0);
- ✓ Il **volume interno** (V_i);
- ✓ Il **Volume totale** (V_T) della fase mobile in colonna: è tutto il volume a disposizione delle particelle della miscela, cioè:

$$V_T = V_0 + V_i + V_{\text{matrice}}$$

- ✓ Il **volume di ritenzione** o **di eluizione** (V_R o V_E): il volume di fase mobile eluita dal momento dell'ingresso fino all'uscita dalla colonna di una determinata sostanza. Tale volume viene misurato in corrispondenza del massimo del relativo picco cromatografico. Il **volume di ritenzione corretto** ($V'e$) viene definito in modo del tutto analogo a quello per le altre tecniche cromatografiche:

$$V'_e = V_R - V_0$$

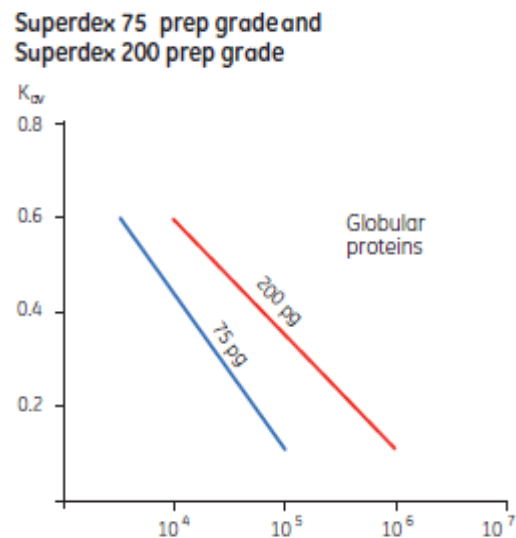
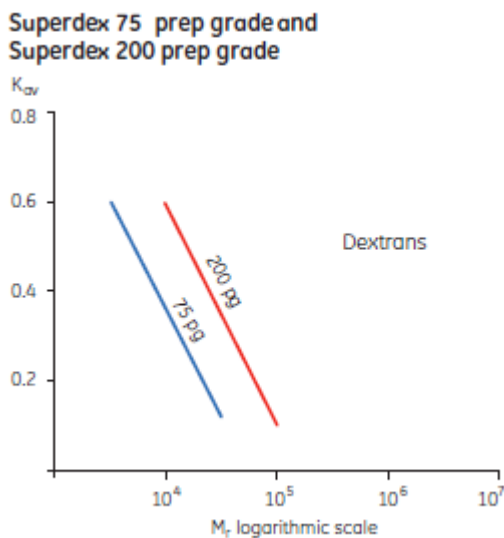
L'eluizione di un composto in una colonna è meglio caratterizzato dal **coefficiente di distribuzione (K_d)**, che esprime la frazione di fase stazionaria disponibile per una data molecola (V_i). K_d dipende dalla tipologia ed è definito come:

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0 - V_{matrice}} \quad \text{Dove } V_i = V_t - V_0 - V_{matrice}$$

Allo stesso modo, può essere definito un **coefficiente di avanzamento (K_{av})** come:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

K_{av} può essere ricavato dal tracciato cromatografico ed è in relazione con le dimensioni delle molecole: esso, infatti, correla linearmente con $\log MW$.



Per quanto riguarda il volume del campione, questo deve essere: il 10-25% di V_t se lo scopo finale è la separazione in gruppi (desalting); l'1-5% di V_t se lo scopo è la separazione frazionata di diversi composti.

Per quanto riguarda la fase mobile, si possono utilizzare **soluzioni acquose saline** oppure **solventi organici**. Nella preparazione delle soluzioni saline occorre tenere sotto controllo alcuni fattori. Alcune separazioni devono essere eseguite a pH ben determinati e ogni gel ha un ben preciso campo di applicazione, al di fuori del quale possono verificarsi idrolisi o modificazioni della struttura del polimero. Gli agenti ossidanti devono essere evitati, perché causano modificazioni nella struttura dei polimeri. Infine, per evitare la formazione di bolle nella colonna, i gas disciolti nell'eluente (soprattutto CO_2) devono essere eliminati.

Le caratteristiche di cui bisogna tenere conto per la scelta della colonna sono:

- ✓ Il tipo di separazione che si intende effettuare (suddivisione in due o più frazioni o gruppi);
- ✓ L'intervallo di frazionamento del gel;
- ✓ L'intervallo di distribuzione delle masse molari dei componenti del campione;

Le colonne per SEC sono di vetro borosilicato oppure di plastica (trasparente e inerte) con elevata resistenza meccanica. I volumi morti, prima e dopo la colonna, devono essere minimi (max 0,1 % del volume del gel), per evitare che il campione o la banda in uscita si diffondano o si diluiscano.

Gli impieghi sperimentali della cromatografia ad esclusione molecolare sono:

- A. **Purificazione:** le molecole di interesse devono cadere entro l'intervallo di separazione dello specifico gel usato, quindi per scegliere una certa matrice per la purificazione dobbiamo avere un'idea preliminare delle dimensioni o del peso molecolare della particella.
- B. **Determinazione del peso molecolare di proteine:** il tempo di ritenzione per le proteine globulari dipende dalle dimensioni e quindi dalla massa molecolare. Per una data colonna, i tempi di ritenzione di diverse proteine globulari dipendono linearmente dalla massa delle proteine stesse.
- C. **Dissalazione:** si possono separare soluti ad alto peso molecolare dei sali o dai solventi organici usando colonne impaccate con una resina per gel-filtrazione a pori piccoli (comunque il limite di esclusione del gel deve essere inferiori alle dimensioni della macromolecola d'interesse).

4.5 Cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC)

La strategia messa in atto nella **cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC)** è proprio quella di aumentare la superficie di scambio, in primo luogo riducendo le dimensioni delle particelle (di diametro variabile dai 3 ai 10 μm) che costituiscono la resina cromatografica. In questo modo, si ottiene un maggior numero di piatti teorici il che vuol dire una maggior risoluzione. Riducendo le dimensioni delle particelle che costituiscono la resina cromatografica, è necessaria una pressione maggiore (diverse centinaia di atmosfere), che deve essere generata da pompe meccaniche, per far passare attraverso di essa la fase mobile. L'HPLC non è quindi un metodo di separazione nuovo rispetto a quelli già illustrati, ma solo un sistema più sofisticato per sfruttare gli stessi principi al fine di ottenere prestazioni molto più elevate.

Un cromatografo HPLC è costituito dalle seguenti parti:

- **Riserva di solventi:** uno o più solventi che possono essere utilizzati singolarmente o in miscela;
- **Pompa:** con pressione fino a 400 atm e flusso stabile tra 0.1 e 10 ml/min;
- **Sistema di iniezione:** costituito da una valvola a più vie e da un circuito a volume fisso (o loop) nel quale mettere il campione;
- **Colonna cromatografica** (ed eventuale **precolonna**);
- **Rivelatore** per monitorare gli eluati;
- **PC** per gestire il sistema e i dati.

La lunghezza delle colonne nella cromatografia HPLC varia da 10 a 30 cm, mentre il loro diametro interno dai 4 ai 10 mm. Le particelle della fase stazionaria hanno un diametro dai 5 ai 10 μm , della quale la resina più utilizzata è la silice. Colonne di questo tipo arrivano generalmente a contenere dai 40000 ai 60000 piatti per metro di lunghezza.

Dal momento che vengono utilizzati dei volumi molto piccoli, i metodi di rivelamento devono essere molto sensibili e sono scelti in base alle singole esigenze:

- A. Rilevatore spettrofotometrico UV/visibile;
- B. Rilevatore a indice di rifrazione (RI);
- C. Rilevatore a fluorescenza;
- D. Spettrofotometro di massa.

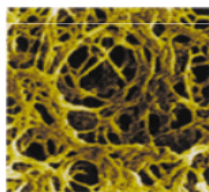
Lez. 5 - Elettroforesi

Il termine **elettroforesi** indica il movimento di particelle cariche all'interno di un mezzo percorso da un campo elettrico. Quando si applica una **differenza di potenziale (ΔV)** tra due elettrodi, si genera un **campo elettrico (E)**, che dipende dalla **distanza tra gli elettrodi (d)** verso l'elettrodo di carica opposta e che induce la mobilità di una molecola di **carica q** verso l'elettrodo di carica opposta, imprimendole una **velocità di migrazione (v)**. Le molecole si spostano verso il catodo se hanno carica positiva e verso l'anodo se hanno carica negativa. Amminoacidi, peptidi, proteine, nucleotidi ed acidi nucleici possiedono gruppi ionizzabili e quindi, ad ogni valore di pH, sono presenti in soluzione come specie elettricamente cariche e possono essere sottoposti ad elettroforesi.

La velocità con cui la molecola migra dipende, oltre che dalle proprietà di carica della molecola stessa e dall'intensità del campo elettrico applicato, da diversi altri fattori. In particolare, il **supporto elettroforetico** utilizzato esercita una frizione in opposizione al movimento delle molecole, che dipende dalle caratteristiche del supporto stesso e dalla forma della molecola, e che è espressa dal **coefficiente frizionale (f)**. La velocità di migrazione viene espressa come:

$$v = \frac{Eq}{f}$$

L'apparecchiatura necessaria è costituita da un **alimentatore di corrente** e da una camera o **cella elettroforetica**. Il supporto elettroforetico agisce da setaccio molecolare¹, contribuendo alla separazione della miscela nelle sue componenti durante la migrazione. I supporti che si utilizzano più frequentemente sono gel ottenuti sciogliendo **agarosio** (o talvolta amido) o polimerizzando acrilammide in **poliacrilammide** in un opportuno tampone per la corsa elettroforetica. Questa tecnica si chiama quindi **gel elettroforesi**. In passato si utilizzava anche carta da filtro o acetato di cellulosa, ma questo tipo di **elettroforesi su carta** è ormai utilizzato di rado e solo per piccole molecole (amminoacidi ad esempio). Qualunque sia il materiale utilizzato per il supporto poroso, questo deve essere imbevuto in una soluzione tampone, che ha il duplice scopo di condurre la corrente e di consentire lo spostamento delle molecole durante la corsa elettroforetica.



Reticolo di agarosio polimerizzato
"setaccio molecolare"

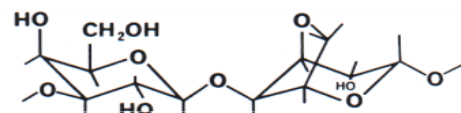
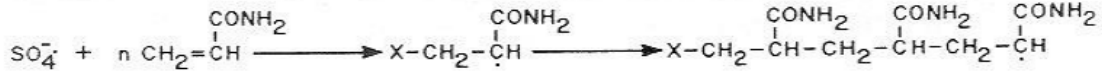


Fig. 26. Structure of the repeating unit of agarose. Note the presence of the unusual sugar 3,6-anhydro-L-galactose.

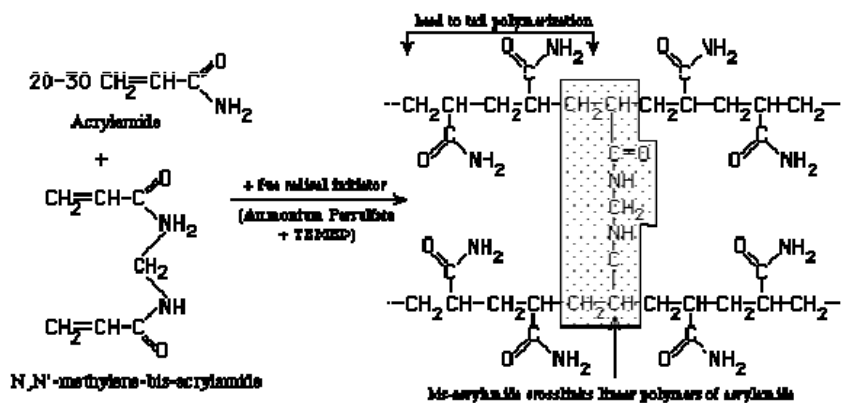
GEL FISICO REVERSIBILE

¹ Un gel in cui la resistenza al movimento di una particella aumenta all'aumentare delle dimensioni della particella stessa. In un gel con capacità di setaccio molecolare aumenta la differenza di mobilità tra proteine di diverso peso molecolare. Questa è la base per la separazione.

Il **gel di agarosio** viene ottenuto sciogliendo a caldo nel tampone quantità variabili di agarosio (dallo 0,6 al 3% peso/volume). L'agarosio è un polisaccaride lineare di unità di agarobiosio costituite da D-galattosio e 3,6 - anidro-L-galattosio. Una volta sciolto e dopo che ha raggiunto una temperatura moderata (circa 40 °C), a cui l'agarosio è ancora liquido, questo viene versato in una camera elettroforetica e lasciato solidificare.

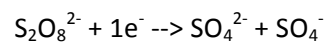


La formazione del gel si ha con l'ottenimento di legami crociati tra le catene → **N,N'-metilenbisacrilammide**



12 GEL CHIMICO IRREVERSIBILE

Il **gel di poliacrilammide** viene invece ottenuto mediante polimerizzazione di unità di acrilammide in presenza di piccole quantità (una parte su 20-30) di N,N'-metilen-bis-acrilammide, che formando legami crociati tra i polimeri di acrilammide genera un reticolo gelatinoso. La polimerizzazione dell'acrilammide è una reazione radicalica a catena, innescata dal **persolfato di ammoni** che tende a scindersi spontaneamente producendo radicali liberi. Per accelerare la formazione di questi radicali liberi, si include nella miscela di polimerizzazione la base **TEMED** (N,N,N',N'-tetrametilendiammina), che catalizza la decomposizione dello ione persolfato:



Il radicale $\text{SO}_4^{\cdot -}$ rappresenta la specie efficace (R·) nella catalisi della polimerizzazione con persolfato. L'attacco radicalico di R· ad una molecola di acrilammide (M) innesca la polimerizzazione, in quanto genera un radicale libero della stessa molecola di acrilammide, che attacca una seconda molecola di acrilammide e così via, formano una catena crescente.

La percentuale relativa di acrilammide determina la porosità e la consistenza del gel: un gel a 4-6% di acrilammide è estremamente morbido e ha pori grandi, mentre un gel a 10-15% è relativamente compatto e ha pori piccoli. Anche in questo caso l'acrilammide viene versata nella camera elettroforetica quando è ancora liquida e si lascia quindi avvenire la polimerizzazione.

La camera in cui viene allestito il gel per effettuare la migrazione elettroforetica può essere orizzontale o verticale. Nelle **celle orizzontali**, normalmente utilizzate per l'agarosio, il gel viene fatto formare in una vaschetta che durante la corsa elettroforetica viene immersa nel tampone in cui sono disposti gli elettrodi.

Camere elettroforetiche verticali, formate da due vetri o da un vetro e una lastra di alluminio separate da due spaziatori, vengono invece normalmente utilizzate per l'elettroforesi su gel di poliaccrilammide (**PAGE**). La PAGE viene talvolta effettuata su gel polimerizzato all'interno di un tubicino di vetro. Anche nella PAGE, una volta solidificato, il gel viene immerso nel tampone tra i due elettrodi. In entrambi i casi, gli elettrodi sono costituiti da due fili di platino paralleli e connessi all'alimentatore di corrente. Inoltre è sempre necessario formare all'interno del gel delle cavità (i **pozzetti**) in cui inserire i campioni da sottoporre ad elettroforesi. I pozzetti vengono ottenuti posizionando una barretta di plastica o teflon a forma di pettine nel gel non ancora solidificato. Quando il gel è solidificato, il pettine viene rimosso lasciando liberi i pozzetti che si sono formati in corrispondenza dei denti. I pozzetti possono avere un volume che varia dai 5 ai 50 μL , a seconda del tipo di gel elettroforetico.

5.1 Elettroforesi di proteine

Nel caso più semplice di separazione di una miscela di proteine, questa avviene su PAGE (acrilammide al 6-15%) in un tampone a pH vicino alla neutralità (spesso costituito da Tris-HCl e glicina) che consente di non denaturare le proteine. Queste migrano in base alla carica apparente, ma anche in base alle dimensioni, che ne condizionano l'interazione frizionale con il supporto poroso.

Un'importante e diffusa variante dell'elettroforesi di proteine su gel di acrilammide (PAGE) è quella condotta in presenza di **sodio dodecil-solfato (SDS)** su di un **gel discontinuo**, una tecnica nota come **SDS-PAGE**. L'SDS-PAGE utilizza un supporto formato da due parti:

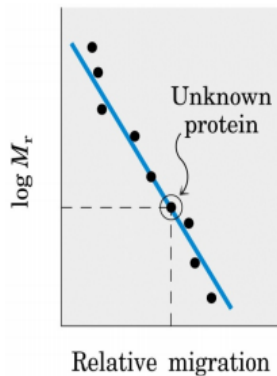
- Uno **stacking gel**: ha una concentrazione di acrilammide minore (4-5%), e quindi maggiore porosità, ed è preparato in un tampone a pH leggermente acido (pH 6,8), in cui la mobilità della glicina è minore della mobilità delle proteine; quando viene applicata la corrente, quindi, gli ioni Cl^- migrano velocemente, lasciando indietro la glicina e creando una zona a bassa conduzione che permette alle proteine di concentrarsi.
- Un **resolving gel**: ha maggiore concentrazione di acrilammide (10-20%) e un pH moderatamente basico (pH 8,8). Nel *resolving gel*, la mobilità della glicina aumenta di molto e quindi cessa l'effetto *stacking* (accumulo delle proteine in un'unica banda molto sottile) e prevale l'effetto di setaccio dovuto alla porosità del gel.

Diversamente dagli altri PAGE, in cui le proteine sono sottoposte a elettroforesi in condizioni native², nell'SDS-PAGE la presenza del detergente ionico SDS causa la **denaturazione** delle proteine. Queste vengono denaturate perché l'SDS impedisce le interazioni chimiche intracatena, che sono responsabili della struttura tridimensionale e dell'associazione di più subunità polipeptidiche in proteine multimeriche. Inoltre il detergente conferisce carica negativa a tutte le proteine della miscela, in maniera essenzialmente proporzionale alla loro massa, perché l'SDS si lega con un rapporto stechiometrico fisso di circa una molecola di SDS ogni due amminoacidi proteina. L'SDS è presente sia nel gel sia nel tampone utilizzato per caricare la miscela di proteine. Il tampone di caricamento, detto **sample buffer**, solitamente contiene anche un forte agente riducente, come il **DTT** (ditiotreitolo) o il **2-mercaptoetanol**, che rimuove eventuali ponti disolfuro intra- o inter- catena e ne impedisce la riformazione.

Nel SDS-PAGE, le proteine si comportano essenzialmente come filamenti carichi negativamente: la carica intrinseca della singola proteina diviene trascurabile rispetto alla carica conferita dall'SDS e quindi la

² Cioè in condizioni che preservano la loro struttura tridimensionale e la loro carica.

migrazione avviene in base alla lunghezza della proteina (oppure essenzialmente in base alla massa molecolare). Quindi nell'SDS-PAGE, per le proprietà di setaccio molecolare del gel, le proteine a minor peso molecolare si muovono più velocemente, mentre quelle a maggior peso molecolare migrano più lentamente.



Mobilità elettroforetica relativa = $R_f = d/l$
d= distanza percorsa dalla proteina
l= distanza percorsa dal tracciante

La **mobilità relativa**, cioè il rapporto tra la distanza percorsa da una determinata banda proteica e quella percorsa dal fronte del gel, di una proteina denaturata in un'elettroforesi SDS-PAGE è inversamente proporzionale al logaritmo della massa molecolare espressa in kDa. Ciò consente di usare questa tecnica per determinare, sia pure in maniera approssimativa, la **massa molecolare apparente** di una proteina. Infatti, se si confronta la mobilità relativa di una proteina X con una retta costruita facendo correre in un'altra corsia dello stesso gel una miscela di proteine di massa nota, dette **marcatori di peso molecolare**, è possibile risalire alla massa apparente della proteina X con una

precisione di circa 0,5 - 10 kDa.

L'SDS-PAGE viene quindi utilizzata per:

- Seguire il corso della purificazione di proteine. Permette di evidenziare i contaminanti e il grado di purezza;
- Determinazione della massa molecolare di catene polipeptidiche;
- Determinare la concentrazione di una proteina nelle cellule grazie ad una colorazione quantitativa o al successivo Western Blot (valutazione comparativa);

Il campione di proteine che viene caricato nel pozzetto, oltre alle proteine e ad un tampone che ne preserva le caratteristiche, contiene anche **glicerolo**, che serve per appesantire il campione e facilitare il caricamento nei pozzetti, e una piccola quantità di un colorante inerte (**blu di bromofenolo**) con una carica negativa, che migra velocemente nel campo elettrico e consente di seguire l'andamento della corsa elettroforetica. Una volta avvenuta la migrazione, le proteine contenute nella miscela e separate su gel si saranno disposte in **bande** disposte lungo **corsie** (o *lanes*), ciascuna corrispondente al campione caricato in un pozzetto.

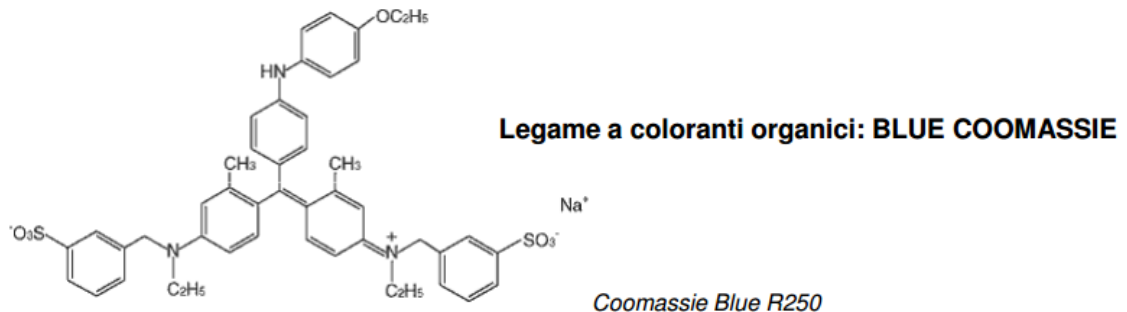
Il problema nella maggior parte dei tipi di elettroforesi è che la potenza generata nel mezzo in cui passa la corrente viene dissipata sotto forma di calore, che può avere i seguenti effetti negativi:

- Aumento della velocità di diffusione dei campioni e degli ioni del tampone, che determina la formazione di bande meno definite;
- Comparsa di correnti convettive, che portano al mescolamento dei campioni separati;
- Denaturazione di quei campioni che sono poco stabili alle alte temperature.

Le bande di proteine sono invisibili all'osservatore, a meno che non vengano evidenziate mediante **colorazione** con reagenti in grado di legarsi alla proteina. I metodi di visualizzazione più utilizzati sono:

- Legame a coloranti organici;

- B. Riduzione di ioni metallici (colorazione con nitrato d'argento; *Silver staining*);
- C. Fluorescenza (gel impregnato di una soluzione contenente una molecola fluorescente);
- D. Metodi radioattivi (proteine marcate in vivo con ^{35}S , ^{14}C , ^3H e, se fosfoproteine, con ^{32}P).



Le colorazioni più utilizzate sono quelle in **blu di Coomassie**, che lega gli amminoacidi aromatici, l'istidina e l'arginina, e quella con **sali d'argento** (solitamente nitrato) che lega i gruppi sulfidrilici (-SH), carbossilici (-COOH) e carbonilici delle catene laterali dei residui amminoacidici.

Il **blu di comassie** si lega in maniera aspecifica alle proteine per interazioni idrofobiche e ioniche con i gruppi idrofobici e cariche delle proteine, formando dei complessi colorati di blu. La colorazione è **quantitativa**, in quanto il colorante si lega alle proteine in **rapporto stechiometrico**: l'intensità del colore che si sviluppa è quindi direttamente proporzionale alla quantità di proteina presente nella banda elettroforetica³. La sensibilità di questo colorante è di circa 0,2-15 µg di proteina e, dal punto di vista operativo, si procede nel modo seguente:

1. **Fissazione**: si rendono insolubili le proteine e si rimuovono i composti che interferiscono con il colorante attraverso degli alcoli (metanolo o etanolo);
2. **Colorazione**: attraverso una soluzione di colorante;
3. **Destaining**: per diffusione (attraverso una soluzione di etanolo o acido acetico in acqua) o per elettroforesi (il blu di Coomassie è anionico, per cui viene eliminato per migrazione in un campo elettrico).

La colorazione con l'argento è circa 50 volte più sensibile di quella con il blu di Coomassie, ed è quindi utilizzata di preferenza per evidenziare quantità molto piccole di proteine. Tuttavia, a causa di una certa laboriosità della tecnica con l'argento e della maggiore specificità di riconoscimento per alcune proteine, spesso si preferisce usare il blu di Coomassie per la semplicità, economicità, riproducibilità e relativa aspecificità di questa colorazione. Dal punto di vista operativo, si procede nel modo seguente:

1. **Fissazione**: si rendono insolubili le proteine e si rimuovono i composti che interferiscono con il colorante;
2. **Sensitizzazione**: aumenta la sensibilità attraverso una reazione di ossidazione con il cromato di potassio (K_2CrO_4);
3. **Impregnazione con argento**: viene ottenuta mediante nitrato di argento o con argento ammoniacale;

³ E' possibile dare una stima quantitativa della proteina totale contenuta in una singola banda attraverso una **quantificazione densitometrica**.

4. **Sviluppo dell'immagine:** per riduzione dell'Ag⁺ ad argento metallico ad opera di un agente riducente quale la formaldeide, formando bande nero-brunastre.

Lez. 6 - Western blot e tecniche immunochimiche

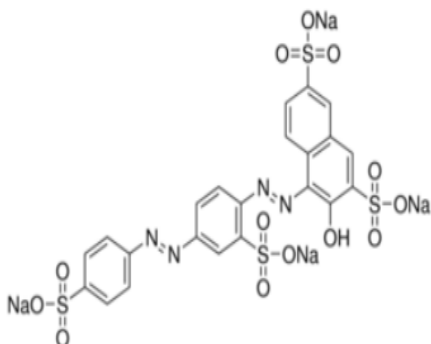
Il **blotting** è stato eseguito per la prima volta da **Southern** nel 1975 con il trasferimento di DNA dal gel di agarosio alla membrana di nitrocellulosa. Successivamente il blotting è stato applicato all'RNA (**Northern Blot**) e alle proteine (**Western Blot**).

Il **western blot** è una tecnica che permette di rivelare e quantificare proteine, che reagiscono con un anticorpo specifico. In questa tecnica, le proteine -dopo essere state frazionate in SDS-PAGE- vengono trasferite su membrana grazie ad un campo elettrico trasversale che le forza a migrare dal gel sulla membrana a cui aderiscono; su di essa si ottiene una replica esatta delle bande del gel e la banda della proteina di interesse viene identificata sfruttando il suo riconoscimento specifico da parte di un anticorpo. Schematicamente, la procedura da impiegare è la seguente:

1. La miscela proteica viene sottoposta a elettroforesi su gel di poliacrilammide. Solitamente si utilizza un classico SDS-PAGE su gel discontinuo. Finita l'elettroforesi, si taglia il gel a metà e si colora una delle due metà in blu di Coomassie. Dopo aver fatto ciò, si prendono le misure dell'altra metà e si taglia la membrana di PVDF delle medesime dimensioni.
2. Dopo la corsa, si trasferiscono le bande proteiche dal gel ad una **membrana di nitrocellulosa**, di **nylon** o di **PVDF (polivinildenfloruro)**. Per fare questo, il gel viene messo a contatto con la membrana in un *sandwich* fra due strati di spugna e carta da filtro. Il *sandwich* viene poi posto in un piccolo apparato che consente la migrazione delle proteine per elettroforesi, ma con il campo elettrico indirizzato ortogonalmente al *sandwich* (**elettrobloeting**).

Le membrane possono essere costituite dai seguenti materiali:

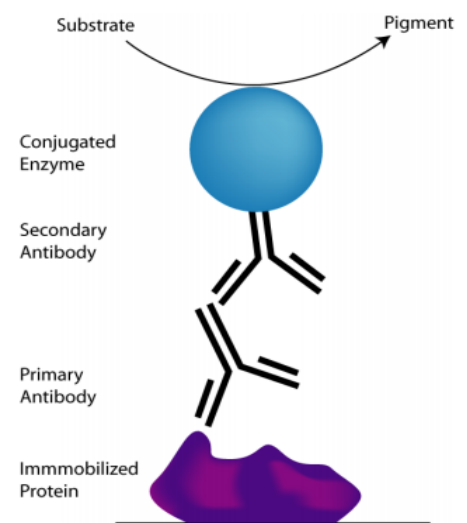
- a. **Nitrocellulosa:** presenta una capacità di *binding* di 100 mg/cm² e lega debolmente proteine con MW inferiore a 14 kDa attraverso interazioni idrofobiche non covalenti;
- b. **Nylon:** presenta una capacità di binding di 450 mg/cm²; sono membrane cationiche (+) che legano poco efficientemente proteine basiche e possiedono un elevato background nel rilevamento;
- c. **PVDF:** sono idrofobiche e presentano una capacità di *binding* di 120 mg/cm².



Il colorante **rosso Ponceau (Ponceau S)** è usato per colorare rapidamente e reversibilmente le bande proteiche su membrane di nitrocellulosa o PVDF nei Western Blot. Il Ponceau S è un colorante carico negativamente che si lega ai gruppi amminici (positivi) delle proteine. Inoltre, si lega non covalentemente a regioni non polari delle proteine. La tecnica non è sensibile come la colorazione con Blue Coomassie, però è utile per verificare se il trasferimento dal gel alla membrana è

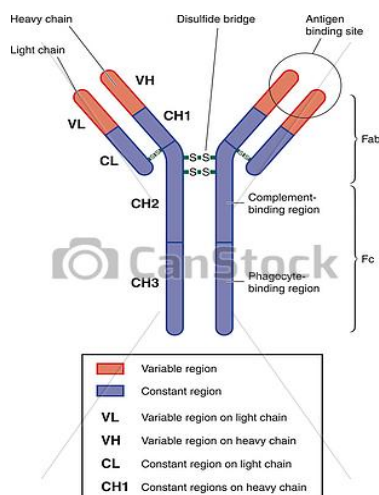
stato efficiente: se il gel risulta privo di bande proteiche, allora tutto il materiale è stato trasferito sulla membrana.

3. A trasferimento ottenuto, la membrana viene prelevata dal *sandwich* e incubata con una soluzione di blocco (solitamente BSA, cioè albumina di siero bovino, o latte) per saturare la membrana⁴.
4. Dopo il "blocco" della membrana, si incuba il tutto con un anticorpo diretto contro la proteina di interesse (**anticorpo primario**), a cui si lega specificamente, in un opportuno **tampone di binding**. L'anticorpo primario può essere indifferentemente **monoclonale** o **policonale** e la scelta dipende dalla disponibilità, ma anche dalla specificità richiesta.
5. Mentre l'anticorpo non legato viene rimosso con una serie di lavaggi con il tampone di *binding*, l'anticorpo presente sul filtro e legato all'antigene viene rivelato usando un **anticorpo secondario**, diretto contro l'anticorpo primario. L'anticorpo secondario viene scelto a seconda della specie animale che ha fornito l'anticorpo primario⁵.
6. L'anticorpo secondario viene coniugato ad un opportuno **marcatore (tag)**, così da effettuare il rilevamento della banda elettroforetica. infatti gli anticorpi secondari sono forniti in forma modificata, coniugate covalentemente alla **biotina** o ad un enzima come la **fosfatasi alcalina** o la **perossidasi di rafano**, poiché una singola molecola di enzima reagisce con più molecole di substrato e produce molte molecole di prodotto colorato: l'enzima amplifica il segnale. I **marcatori** sono enzimi capaci di convertire un substrato in un prodotto colorato che precipita in corrispondenza della banda elettroforetica (**reazione colorimetrica**) oppure in un prodotto **chemiluminescente**, cioè che emette radiazione luminosa rilevabile su lastra autoradiografica.



6.1 Tecniche immunochimiche

Un nutrito gruppo di metodi biochimici si basa sull'uso di **anticorpi** e sfrutta le proprietà di queste molecole di riconoscere uno o più **epitopi** (specifici raggruppamenti di atomi) presenti nella molecola **antigene (Ag;**



© Can Stock Photo - csp14738837

molecola che suscita una risposta anticorpale). Il grande pregio di queste metodiche è che la specificità del riconoscimento molecolare fra antigene e anticorpo consente di rivelare e dosare una determinata molecola in una miscela complessa senza purificarla dalle altri componenti, in qualche caso anche con notevole accuratezza e sensibilità.

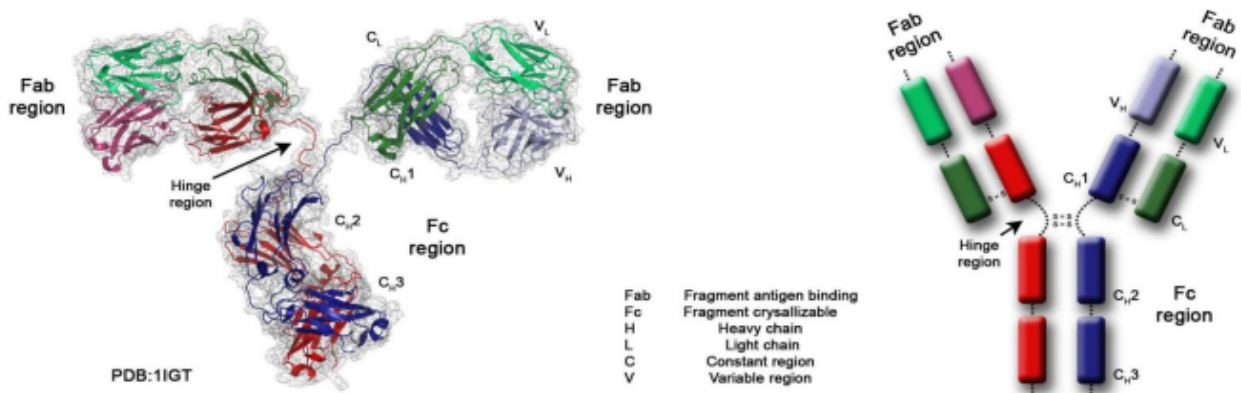
Gli **anticorpi (Ab o immunoglobuline)** sono una classe di glicoproteine del siero, prodotte dai **linfociti B**, il cui ruolo fisiologico è quello di legarsi in maniera specifica agli antigeni (microrganismi infettivi, tossine o qualunque macromolecola estranea all'organismo, ossia *non-self*) durante la risposta immunitaria. Le immunoglobuline presentano una

⁴ L'affinità della membrana per le proteine potrebbe bloccare gli anticorpi, impedendone l'azione.

⁵ Ad esempio, se l'Ab primario era stato preparato in topo, l'Ab secondario deve riconoscere gli Ab di topo e quindi deve essere stato preparato in un altro ospite (ad esempio, in pecora).

struttura generale formata da due catene pesanti e due catene leggere unite da ponti disolfuro, in cui si distinguono le regioni costanti in ogni classe di Ab e quelle variabili, che mediano la specificità del riconoscimento molecolare. Le immunoglobuline sono suddivise in classi, che differiscono per il tipo di catene pesanti. La loro struttura molecolare, che consente la combinazione di più moduli presenti nelle catene leggere e nelle catene pesanti, garantisce la possibilità di generare un altissimo numero di configurazioni diverse, capaci di coprire l'intero spettro antigenico virtualmente incontrabile dal sistema immunitario.

La **produzione di anticorpi** per l'impiego farmacologico o di laboratorio sfrutta il fatto che l'organismo reagisce all'incontro con un antigene estraneo stimolando un clone di linfociti B a proliferare, a differenziarsi in plasmacellule e a produrre e secernere anticorpi specifici contro quell'antigene (**risposta primaria**). Una successiva introduzione dello stesso antigene agisce su un sistema immunitario che conserva la memoria immunologica e quindi la **risposta anticorpale secondaria** è più pronta e più energica.



Isotipo	Catena H (sottoclasse)	Domini Ig nella catena H	Emivita (giorni)	Concentrazione nel siero (mg/ml)	Forma secreta	Presenza	Funzioni	Altro
IgA	α (IgA1 e IgA2)	3	6	3,5	Monomero, dimerico, trimero	Secrezioni mucose (principalmente), sangue, latte materno	Immunità e protezione delle mucose, debole opsonizzante e attivatore del complemento	La presenza nel latte materno permette il trasferimento di protezione dalla madre al figlio, resistenti alla proteolisi
IgD	δ	3	3	Tracce	Nessuna	Sangue	Recettore per i linfociti (BCR)	Sensibili alla digestione proteolitica
IgE	ε	4	2	0,05	Monomero	Sangue, tessuti	Difesa contro gli elminti e ipersensibilità immediata (reazioni allergiche)	-
IgG	γ (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4)	3	23	13,5	Monomero	Sangue, tessuti, placenta	Opsonizzazione, attivazione del complemento, citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC), inibizione dei linfociti B, immunità neonatale (fino a 6-12 mesi dalla nascita)	È la principale Ig del siero (80% ca.), sono i soli anticorpi che passano attraverso la placenta
IgM	μ	4	5	1,5	Pentamero	Sangue (a causa delle grosse dimensioni)	Attivazione del complemento, attività agglutinante, recettore per i linfociti B (BCR)	Sono i principali anticorpi durante la prima settimana d'infezione

30

L'**epitopo** (o **determinante antigenico**) è quella piccola parte di antigene che lega l'anticorpo specifico. Inoltre, la singola molecola di antigene può contenere diversi epitopi riconosciuti da anticorpi differenti. Si distinguono, in linea di massima, due epitopi differenti:

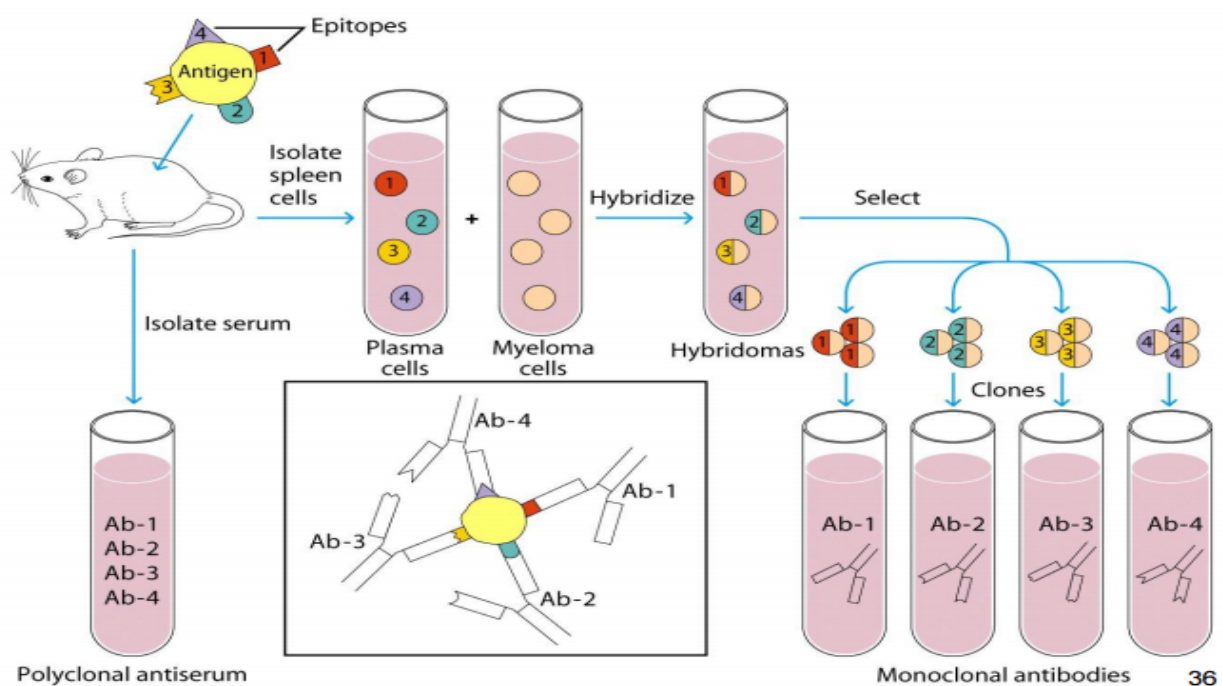
- **Epitopi sequenziali:** caratterizzati da una specifica sequenza lineare amminoacidica;
- **Epitopi conformazionali:** riconosciuti dal sistema immunitario come complessi tridimensionali. Gli epitopi conformazionali possono essere costituiti da elementi anche molto distanti tra loro in termini di sequenza primaria (lineare), ma estremamente vicini a livello della struttura terziaria (tridimensionale) a causa del ripiegamento che caratterizza le macromolecole biologiche. +

Per quanto riguarda gli anticorpi, in laboratorio se ne possono utilizzare di due tipologie:

- **Anticorpi policlonali:** sono una miscela di anticorpi, ciascuno dei quali prodotto da un diverso clone di linfociti B, che riconoscono epitopi dello stesso antigene. Le principali immunoglobuline ottenibili sono IgM ed IgG e vengono prodotte, dopo aver purificato una certa quantità di antigene, tramite:
 - **Iniezioni endovenose** multiple con dosi crescenti di antigene (con tempi brevi tra un'iniezione e l'altra per evitare la distruzione dell'antigene da parte del sistema immunitario);
 - **Iniezioni sottocutanee o intramuscolari:** garantisce un lento rilascio dell'antigene nel sangue assicurando, con un minor numero di iniezioni di richiamo, una presenza continua per diverse settimane.

In entrambi i casi, si preleva poi il **siero** dell'animale immunizzato, che contiene l'anticorpo.

- **Anticorpi monoclonali:** legano un unico epitopo, sono prodotti da un unico clone di linfociti B e la loro produzione è un po' più complessa e costosa di quella dei policlonali:
 1. L'antigene purificato viene iniettato in un topo e si provoca la produzione di anticorpi, come per gli anticorpi policlonali;
 2. Non si preleva il siero, bensì la milza (organo linfoide).
 3. Le cellule della milza vengono fuse con cellule di mieloma, che essendo cellule tumorali in condizioni opportune si propagano virtualmente in maniera indefinita.
 4. Le risultanti cellule ibride (dette **ibridomi**) vengono fatte crescere e poi diluite tanto da poter isolare un certo numero di **cloni cellulari**, derivati da singole cellule, che vengono selezionati per la capacità di produrre anticorpi in grado di riconoscere l'antigene. Ogni clone produce un solo tipo di anticorpo, diretto contro in singolo epitopo presente sull'antigene.



Gli anticorpi policlonali presentano i vantaggi: di essere molto sensibili, riuscendo a riconoscere quantità piccole della sostanza ricercata; di essere poco costosi e di rilevare la presenza degli antigeni anche se alcuni determinanti antigenici hanno subito modifiche o sono stati danneggiati. Viceversa, gli anticorpi policlonali presentano lo svantaggio di poter dare un riconoscimento aspecifico.

Gli anticorpi monoclonali, invece, presentano il vantaggio dell'alta specificità, non dando risposte aspecifiche, e lo svantaggio di una preparazione molto lunga e molto costosa.

Lez.7 - Biopolimeri

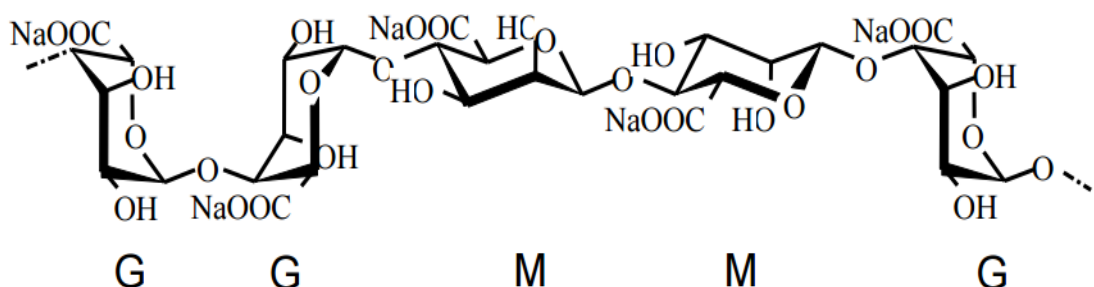
Negli ultimi decenni sono stati realizzati progressi molto importanti nella chimica dei carboidrati, soprattutto in termini di una migliore comprensione dell'attività biologica di molte di queste sostanze naturali. Tale attività biologica può andare ben oltre il relativamente semplice ruolo svolto da numerosi polisaccaridi nell'accumulo e nella successiva mobilizzazione di energia (ad esempio, l'amido nei vegetali e il glicogeno negli animali) oppure nel contribuire alla stabilità ed integrità di cellule e tessuti sia nei vegetali sia nell'uomo. Infatti, è ora noto che alcuni carboidrati svolgono un ruolo importante nel riconoscimento intercellulare. L'utilizzo delle biotecnologie convenzionali a livello industriale porta alla valorizzazione di macromolecole polisaccaridiche anche ad altissimo valore aggiunto (ad esempio, l'acido ialuronico) oppure a materiali polimerici che non trovano controparte in termini di rapporto prestazioni/prezzo nei polimeri sintetici.

È utile segnalare altri due importanti stimoli che agiscono in sinergia, a promuovere un semplice maggior utilizzo dei carboidrati (specie dei polisaccaridi):

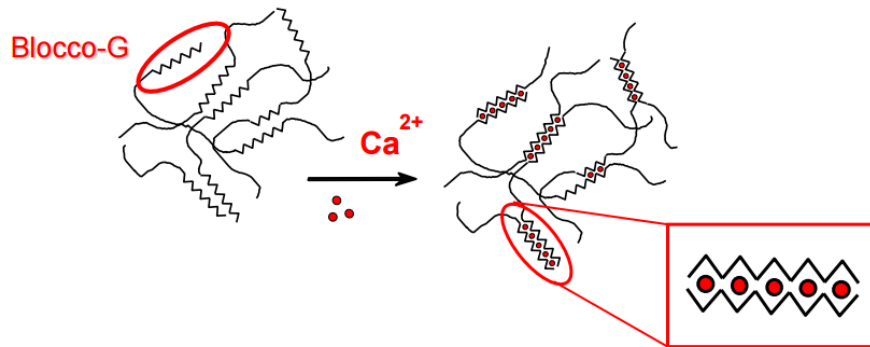
1. È necessario incrementare lo sfruttamento di fonti alternative rinnovabili (ad esempio, le biomasse vegetali) per ottenere materiali base (monomerici o polimerici) indispensabili per la chimica moderna;
2. È sempre più sentita l'esigenza di utilizzare materiali biocompatibili e biodegradabili in svariati settori applicativi, dall'alimentare al biomedico.

Numerosi polisaccaridi sono in grado di formare gel acquosi con buone caratteristiche meccaniche anche a concentrazioni basse, dell'ordine dell'1% in peso. Le catene polisaccaridiche interagiscono tra loro a formare un reticolo tridimensionale caratterizzato da zone di giunzione rigide, risultanti da interazioni specifiche tra catene. Questi gel vengono impiegati come biomateriali per la terapia cellulare e l'ingegneria tissutale (incapsulazione di cellule, *scaffold*), come riempitivi iniettabili e per applicazioni topiche.

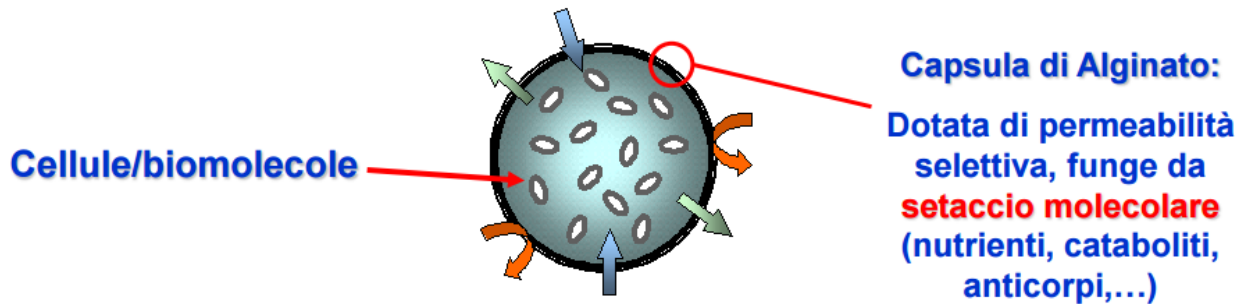
L'**alginato** appartiene ad una famiglia di copolimeri lineari di acido α -L-guluronico (G) e di acido β -D-mannuronico (M) concatenati attraverso legami glicosidici 1 \rightarrow 4. I residui possono formare all'interno della catena strutture a blocchi con regioni di soli residui G (blocchi-G) e di soli residui M (blocchi-M), interspaziate da regioni con struttura alternata (blocchi-MG).



L'alginato è caratterizzato da un elevato grado di **biocompatibilità** e dalla possibilità di formare dei **network tridimensionali** (gel) attraverso il legame di cationi bivalenti (Ca^{2+}) con le unità G.

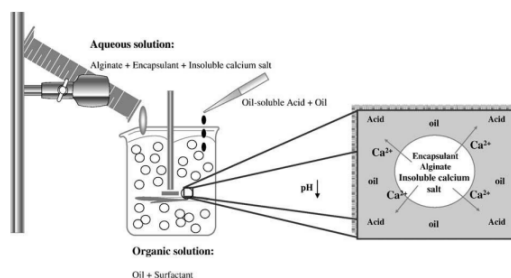


Per queste sue caratteristiche l'alginato viene ampiamente utilizzato come materiale per la **microincapsulazione**, che consiste nell'immobilizzazione e nella protezione di cellule e biomolecole all'interno di micro-sfere di gel.



Preparazione di micro- e nano-capsule

- Facile utilizzo
- Non richiede particolari strumentazioni
- Può essere effettuata a Temperatura ambiente



Le capsule di alginato vengono prodotte facendo gocciolare una soluzione di alginato in una soluzione contenente cationi bivalenti. Si utilizza in genere Ca^{2+} nei processi di gelificazione in ambito biomedico, perché non tossico. Talvolta può essere necessaria la riduzione delle dimensioni delle capsule di alginato (per esempio, per la nano-incapsulazione di farmaci). Questa si ottiene micronizzando le gocce di soluzione polimerica, portandole poi a gelificazione. Una metodologia molto utilizzata per ottenere tale effetto è l'emulsione acqua-olio.

L'alginato, nell'industria alimentare, viene utilizzato come addensante in numerose preparazioni, quali budini e gelati. L'alginato, in più, permette la formazione di matrici idonee alla protezione di principi attivi farmaceutici e al loro rilascio controllato. I polimeri di alginato sono estremamente importanti nel campo dell'ingegneria tissutale, dove vi è l'esigenza di strutture 3D porose che consentano la crescita delle cellule e vengano poi riassorbite lasciando spazio al solo tessuto biologico. Polimeri biodegradabili come PLGA e PLLA, idrogeli e polimeri di origine naturale sono utilizzati come scaffold per la generazione di nuovi tessuti

Lez. 8 - Tecniche spettroscopiche

Le **tecniche spettroscopiche** sono basate sullo studio dell'interazione di energia e materia. Al contrario di altre tecniche, permettono delle indagini sulla costituzione della materia e non risultano distruttive nei confronti del campione in esame, che può essere successivamente riutilizzato. Inoltre, spesso possono essere impiegate anche su campioni non purificati.

Quando una radiazione elettromagnetica attraversa la materia vi è sempre un'interazione. La materia è, infatti, costituita da cariche in movimento, che risentono delle perturbazioni di un campo elettromagnetico vicino.

Le **onde elettromagnetiche** possono propagarsi nella materia, ma anche nel vuoto, e sono generate da qualsiasi carica che subisca un'accelerazione. Ogni onda è caratterizzata dai seguenti parametri:

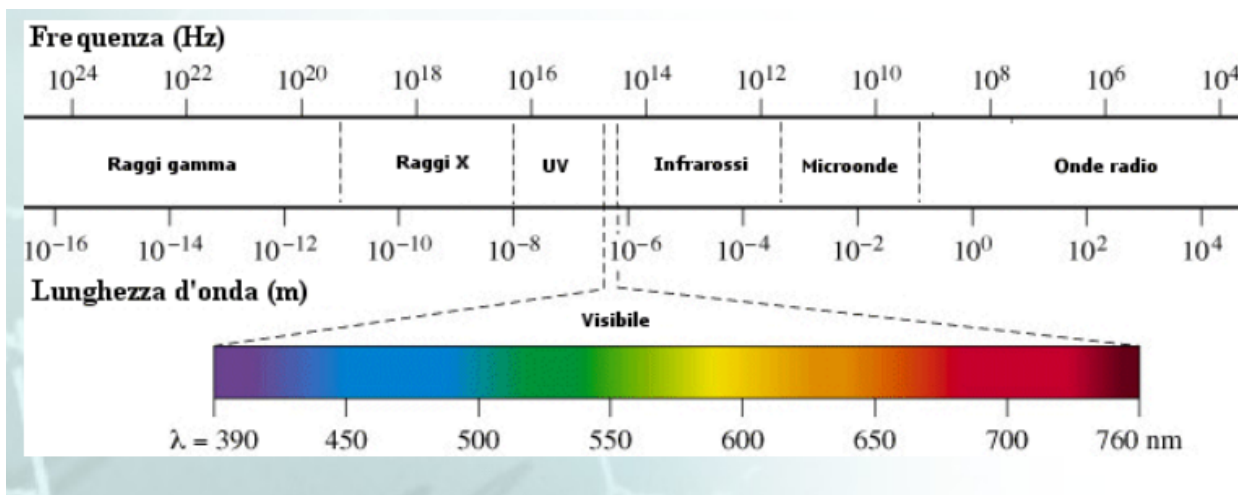
- **Lunghezza d'onda (λ):** la distanza fra due punti successivi in fase tra loro nel profilo spaziale, cioè la lunghezza dell'oscillazione dell'onda;
- **Frequenza (ν):** il numero di oscillazioni al secondo;
- **Periodo (T):** la distanza fra due punti consecutivi in fase tra loro nel profilo temporale dell'onda, che è pari al reciproco della frequenza ($T = 1/\nu$);
- **Ampiezza (A):** il massimo spostamento di un punto rispetto alla posizione di equilibrio;
- **Intensità (I):** l'energia che l'onda trasporta in un secondo attraverso una superficie di area unitaria perpendicolare alla direzione di propagazione;

La lunghezza d'onda e la frequenza sono due grandezze inversamente proporzionali: $\lambda = c/\nu$, dove c = velocità della luce nel vuoto.

L'insieme di tutte le radiazioni elettromagnetiche costituisce lo **spettro elettromagnetico**, che copre tutto l'intervallo compreso fra le onde radio ($\lambda > 1$ m) e i raggi cosmici ($\lambda < 10^{-13}$ m). A ogni radiazione è associata una energia che, in base alla **legge di Planck**, è direttamente proporzionale alla sua frequenza:

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

In termini di meccanica ondulatoria, ogni **fotone** (in pratica, un pacchetto di energia) possiede un'energia che dipende dalla frequenza dell'onda ad essa associata.

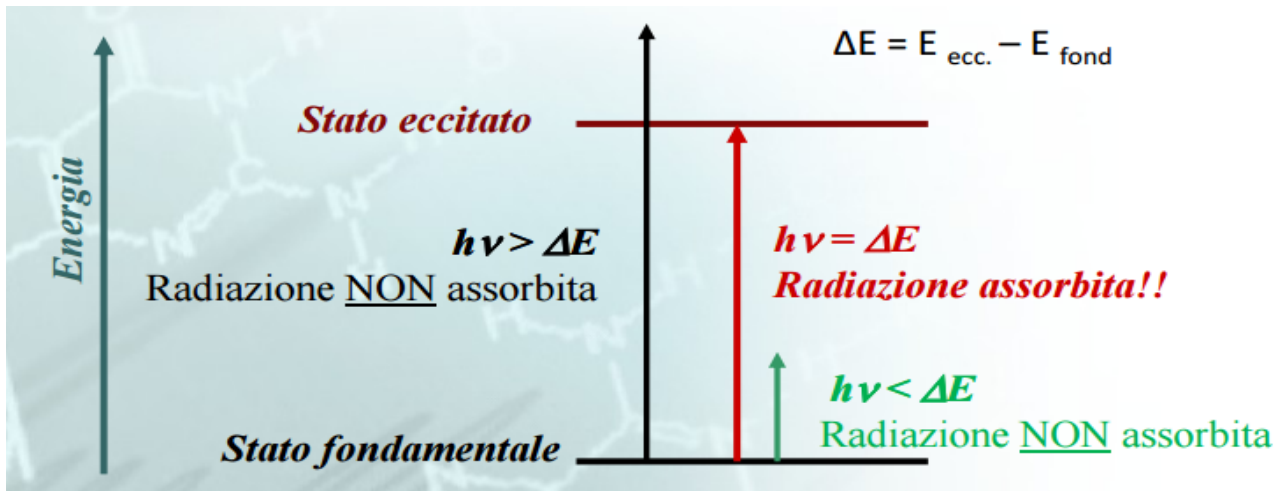


Lo spettro elettromagnetico viene classificato sulla base delle lunghezze d'onda e delle frequenze delle varie radiazioni elettromagnetiche che lo compongono. Queste, nonostante abbiano tutte caratteristiche molto simili, sviluppano delle interazioni con la materia molto diverse tra di loro. Lo spettro del visibile è una finestra molto ristretta dello spettro elettromagnetico, la sola parte che il nostro occhio riesce a percepire come colore.

γ	< 0,1 nm	emissione nucleare
raggi X	0,1-10 nm	transizioni elettroniche (elettroni interni)
UV	10-380 nm	transizioni elettroniche (elettroni di valenza)
Vis	380-800 nm	transizioni elettroniche (elettroni di valenza)
IR	800 nm-100 μ m	transizioni vibrazionali
Microonde	100 μ m- 1 cm	transizioni rotazionali
onde radio	1 cm- metri	rotazione nucleare

Le transizioni elettroniche che coinvolgono gli elettroni di valenza avvengono in un range di λ comprese tra 200 e 800 nm (**spettrofotometria UV/visibile**). Non tutti gli atomi e le molecole assorbono questa energia, in quanto l'assorbimento avviene soltanto quando $\Delta E = h\nu$. Gli orbitali di valenza sono quantizzati e si trovano normalmente allo stato fondamentale. Nel momento in cui arriva un raggio luminoso con un'energia che corrisponde alla ΔE tra lo stato fondamentale e lo stato eccitato, l'elettrone assorbe la

radiazione e passa per qualche frazione di secondo allo stato eccitato per poi rimettere nell'ambiente la radiazione sotto forma di calore.



Una sostanza che assorbe nella finestra del visibile una particolare lunghezza d'onda riemette una diversa lunghezza d'onda, che corrisponde al colore complementare con il quale noi la vediamo.

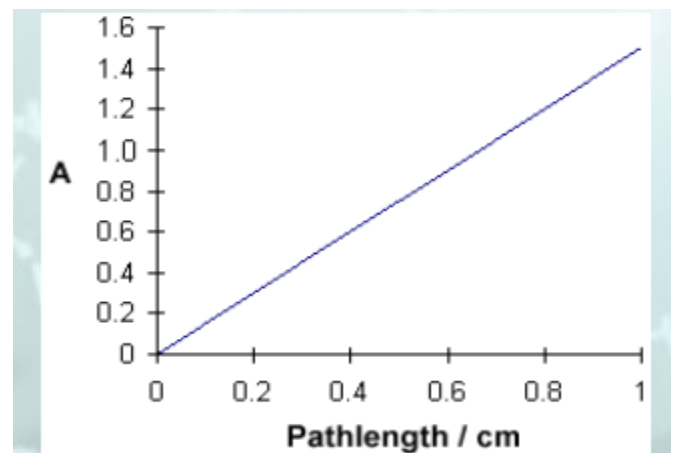
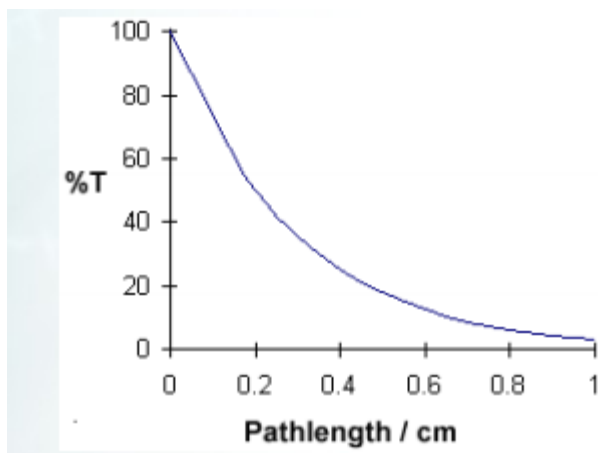
La misura dell'assorbimento avviene facendo passare attraverso un campione una frazione della **radiazione incidente** di una determinata λ , trasmettendola poi ad un rivelatore. Si definisce:

Trasmittanza (T) : $T = \frac{I}{I_0}$, dove I_0 è l'intensità di luce incidente e I è l'intensità di luce trasmessa.

La trasmittanza ci dice quanto della radiazione luminosa viene assorbita e otteniamo la T % se la moltiplichiamo per 100. Se $T = 1$, allora il campione è trasparente e non assorbe alcuna radiazione; se $T = 0$, allora il campione assorbe tutta la luce incidente.

Dal momento che la trasmittanza non è correlata linearmente al **cammino ottico** (spessore della soluzione attraversata dal raggio), si definisce un'altra grandezza:

Assorbanza (A) = $\log_{10} \left(\frac{1}{T} \right) = -\log_{10} T$



L'assorbanza è linearmente correlata con il cammino ottico della radiazione.

La **legge di Lambert-Beer** permette di mettere in relazione i valori di assorbanza con le concentrazioni di una specie chimica:

Legge di Lambert-Beer: $A = \epsilon \times l \times C$

L'assorbanza è proporzionale sia alla concentrazione della sostanza assorbente sia allo spessore dello strato attraversato. Il **coefficiente di assorbimento molare (ϵ)** è il valore di assorbanza del composto quando $l = 1$ cm e $C = 1M$ e dipende dalle proprietà intrinseche della molecola e dalla lunghezza d'onda della luce incidente. Se di una sostanza conosciamo ϵ e misuriamo A , allora riusciamo a calcolare la concentrazione del composto.

L'accuratezza della misura non è uniforme per tutto l'intervallo di trasmissione T , in quanto l'errore relativo da parte dello strumento di misurazione dell'assorbimento diventa particolarmente elevato quando $T\% < 20$ o $T\% > 100$.

Molte sostanze danno una risposta lineare solo in un certo intervallo di concentrazione. Se il campione è torbido si ha un'assorbanza fittizia, dovuta ad autoassorbimento o ad un insufficiente passaggio della luce attraverso la soluzione.

Cromoforo	Esempio	λ_{max} , nm	ϵ , [M ⁻¹ ,cm ⁻¹]
Alchene	C ₆ H ₁₃ CH=CH	177	13000
Alchene coniugato	CH ₂ =CHCH=CH ₂	217	21000
Carbonile	(CH ₃) ₂ C=O	186, 280	1000, 16
Carbossile	CH ₃ COOH	204	41
Ammide	CH ₃ CONH ₂	214	60
Azo	CH ₃ NNCH ₃	339	5
Nitro	CH ₃ NO ₂	280	22
Nitrato	C ₂ H ₅ ONO ₂	300, 665	12
Aromatico	Benzene (C ₆ H ₆)	204, 256	7900, 200

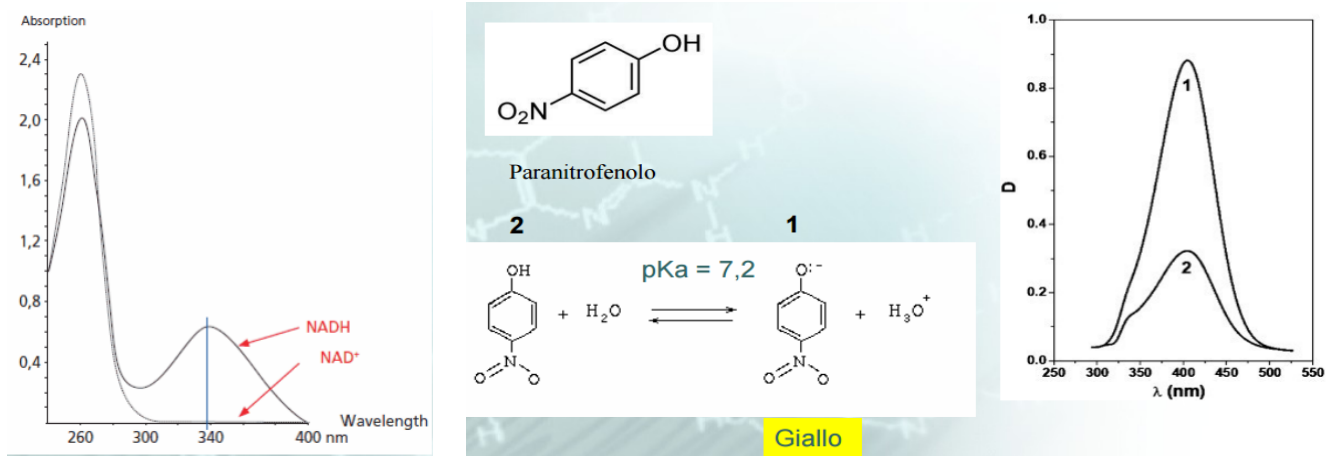
Cromoforo: gruppo chimico che assorbe.
Molecole con ϵ tra 1000 and 10000 = spesso presenza di un gruppo aromatico, doppi legami, doppi legami coniugati.

	λ_{max} , nm	ϵ , [M ⁻¹ ,cm ⁻¹]
Adenina	260	15200
Citosina	260	7050
Guanina	260	12010
Timina	260	8400

Tutti i gruppi indicati assorbono nella regione dell'UV e ci appaiono incolori, tranne il nitrato che però ha un ϵ molto basso. Le basi azotate, invece, assorbono tutte ad una $\lambda_{ass}=260$ nm ed hanno una ϵ molto elevata. Pertanto, sono facilmente individuabili con uno strumento capace di irradiare e rilevare una λ di 260 nm.

NAD⁺ e NADH (in basso a sx) presentano un segnale di assorbimento nel visibile sufficientemente diverso uno dall'altro per poter essere distinti: nel NAD⁺ scompare completamente il picco a 340 nm. Pertanto, dalla misura dell'assorbanza, sarò capace di comprendere quanto NAD⁺ e NADH si formano in seguito ad una reazione catalizzata da una deidrogenasi NAD⁺ dipendente.

Il parnitrofenolo (in basso a dx) è capace di cambiare il proprio spettro in base alle sue proprietà chimico-fisiche: nella sua forma indissociata è trasparente, mentre nella sua forma ionizzata assume una colorazione gialla. Ciò ci permette di sapere se in soluzione il parnitrofenolo assume la forma dissociata oppure quella indissociata, e di utilizzare il parnitrofenolo come indicatore del pH della soluzione sulla base della colorazione che questa assume.



Lo **spettrofotometro** consiste di 4 elementi:

- Una **sorgente**, cioè una lampada che emette radiazioni nell'intervallo spettrale di misura;
- Un **monocromatore**, che seleziona le lunghezze d'onda più opportune per la misura;
- Un **compartimento celle** (o **cuvette**) in cui è posto il campione;
- Un **rilevatore** che misura l'intensità della radiazione.

Le lampade possono emettere nel campo spettrale dell'UV oppure del visibile. Per la regione del visibile si utilizzano **lampade a filamento di tungsteno**. Per la regione dell'UV, **lampade a scarica di gas** (quali le lampade a deuterio, che sono importanti fonti di raggi UV).

Le lampade emettono radiazioni in tutte le direzioni dello spazio e quindi, per ottenere un fascio di luce sottile e ben focalizzato, è necessario un sistema ottico costituito da lenti, specchi e fenditure. Questo raggio viene poi inviato sul **monocromatore**, che scompone la radiazione policromatica in bande monocromatiche. I monocromatori sono sostanzialmente di due tipi:

- **Filtri**: assorbono una parte delle componenti spettrali della radiazione incidente e ne trasmettono una gamma più o meno ampia;
- **Elementi disperdenti** (quali **prismi** e **reticoli**): diffrangono la luce policromatica separandola nelle diverse componenti monocromatiche.

La **cella** (o **cuvette**) è la componente che contiene il campione da esaminare, generalmente in soluzione. Devono essere trasparenti alla radiazione impiegata e avere un ben preciso cammino ottico. Per misure nello spettro dell'UV, si utilizzano celle in quarzo (SiO_2), che sono però molto fragili e costose, o in plastica. Per misure nel campo del visibile, si utilizzano celle in vetro (che, invece, assorbe nell'UV) o in plastica. Recentemente, le cuvette in vetro sono state quasi completamente rimpiazzate da celle costituite da materiali polimerici trasparenti.

Il **rivelatore** trasforma l'intensità della radiazione elettromagnetica giunta ad esso in un segnale elettrico che può essere misurato. Il segnale viene poi amplificato e convertito in un valore numerico, proporzionale all'intensità del segnale, compreso tra 0 e 100 (il valore del segnale in assenza del campione), dal quale si

ottiene la trasmittanza e da questo l'assorbanza. Dal rivelatore dipende sia la sensibilità sia l'accuratezza dello strumento.

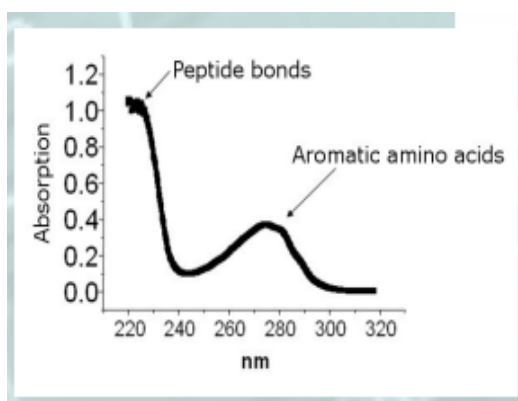
Gli **spettrofotometri monoraggio** sono usati prevalentemente nelle analisi quantitative. Per ogni λ , si deve ripetere l'azzeramento contro il bianco⁶ (solvente), oppure si deve registrare prima lo spettro del solvente o tampone (**linea di base**), poi lo spettro del campione ed infine sottrarre al secondo il primo. La registrazione della linea di base serve a togliere le disomogeneità fra le due cuvette e a fornire il valore di zero dell'assorbanza del solvente (tampone).

Gli **spettrofotometri a doppio raggio** hanno un sistema che invia due raggi identici per frequenza e intensità, uno attraverso il campione e l'altro attraverso il bianco, per cui si ha un confronto continuo fra l'assorbanza del campione e quella del bianco. In questo modo, è possibile effettuare misure direttamente a qualsiasi λ senza ripetere azzeramenti, e soprattutto registrare continuamente lo spettro di assorbimento. Per questo motivo il doppio raggio è preferito per le applicazioni qualitative.

Lez. 9 - Dosaggio di proteine

Determinare quantitativamente la concentrazione delle proteine può essere utile per conoscerne l'attività biologica, i livelli di espressione e l'interazione con altre proteine. La scelta del metodo per la determinazione quantitativa delle proteine dipende dalla natura della proteina, dai componenti presenti nel campione, dalla velocità, dall'accuratezza e dalla sensibilità del metodo richiesto. Comunque, i metodi che si possono utilizzare sono i seguenti:

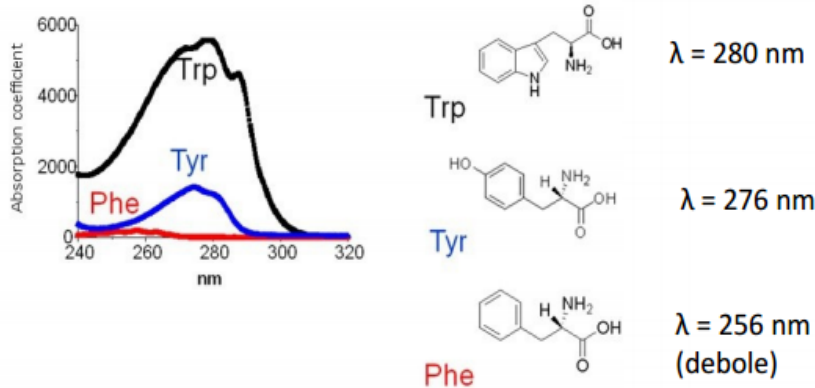
- **Metodo gravimetrico:** attraverso la pesata del campione solido; è un metodo poco sensibile, necessario per disporre di elevate quantità di campione allo stato solido e di elevato grado di purezza;
- **Metodi diretti:** attraverso la misura dell'assorbanza; è una determinazione assoluta, ma il contributo di ciascun amminoacido all'assorbanza totale risulta variabile e dipende dalla concentrazione;
- **Metodi indiretti (reazioni cromogene):** attraverso il legame delle proteine ad opportuni **cromofori**, in modo da misurarle mediante spettrofotometria. Sono metodi sensibili che vengono influenzati dalla composizione amminoacidica. Infine, la misura è relativa a proteine di riferimento.



Si definiscono **cromofori** i gruppi che assorbono la luce; essi sono caratterizzati da specifiche transizioni elettroniche e quindi differenti lunghezze d'onda di assorbimento. I principali cromofori delle proteine sono il legame peptidico e gli amminoacidi aromatici. Nei legami peptidici si possono osservare due diversi picchi di assorbimento nella regione 210-220 nm (ϵ circa $100 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e nella regione 190-210 nm dello spettro (ϵ circa $7000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Nelle catene laterali degli amminoacidi, oltre a transizioni comuni a quelle del legame peptidico, sono presenti

⁶ L'azzeramento viene effettuato versando il bianco in una cuvetta e selezionando la lunghezza d'onda di misura. Poi si versa il campione nella stessa cuvetta e si procede alla lettura di assorbanza. L'operazione deve essere ripetuta ogni volta che si cambia la lunghezza d'onda.

le transizioni elettroniche caratteristiche dei residui aromatici (triptofano, tirosina e fenilalanina) che ricadono nella regione dello spettro tra 260 e 280 nm.



L'amminoacido che contribuisce principalmente all'assorbimento delle proteine a 280 nm è il triptofano, mentre la tirosina e la fenilalanina hanno coefficienti di estinzione notevolmente più bassi. Tuttavia esse sono in genere molto più frequenti del triptofano nelle proteine e quindi il loro contributo è comunque importante e diventa molto evidente in proteine che possiedono pochi o nessun residuo di triptofano.

Il **metodo diretto**, cioè la misura dell'assorbanza, è applicabile a proteine purificate e garantisce il recupero del campione. Questo metodo dipende dalla composizione amminoacidica e dalla struttura della proteina, ma risente della presenza di contaminanti: solventi assorbono nella regione spettrale attorno a 200 nm, interferendo con l'assorbimento dei cromofori proteici. A parità di concentrazione, lo spettro e l'intensità di assorbimento cambiano a seconda della composizione amminoacidica.

A parità di concentrazione lo spettro e l'intensità di assorbimento cambiano a seconda della composizione aa

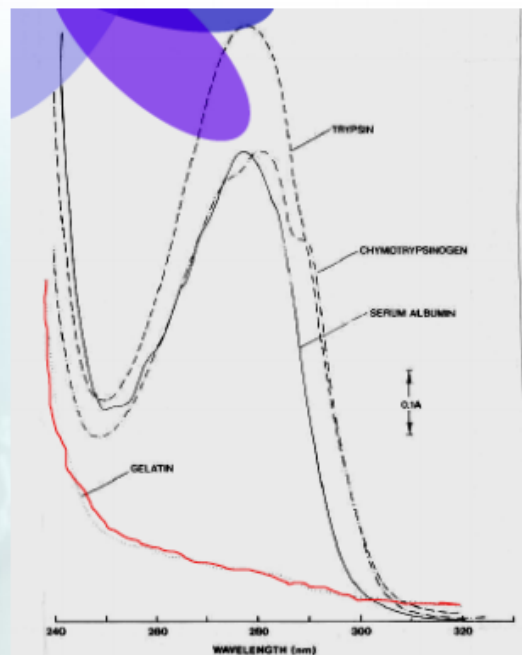
Spettro di assorbimento di quattro proteine diverse:

- **tripsina** (molte tirosine)
- **albumina** (molte fenilalanine)
- **chimotripsinogeno** (contiene triptofano)
- **collagene** (in rosso) ha un basso contenuto in tutti e tre questi aminoacidi.

Utilizzando lo stesso valore empirico di ϵ a A_{280} si ottengono i seguenti valori di concentrazione

<i>Albumina</i>	<i>0.7 mg/ml</i>
<i>tripsina</i>	<i>1.6 mg/ml</i>
<i>chimotripsinogeno</i>	<i>1.0 mg/ml</i>
<i>Collagene</i>	<i>0.1 mg/ml</i>

(tutte le proteine erano alla medesima concentrazione di 1mg/ml)



L'assorbimento del gruppo peptidico (190-210 nm) è sensibile alla struttura secondaria delle proteine. Lo spettro della poli-L lisina, ad esempio, può modificarsi per:

- L'effetto di un aumento del pH, che induce la formazione dell' α -elica da una struttura disordinata;

- L'effetto di un aumento di temperatura, che converte il polipeptide in β -foglietto;

Nel caso di una soluzione di proteina pura, la concentrazione della proteina è proporzionale al suo coefficiente di estinzione ($c = A/\epsilon l$) che deve essere ovviamente noto. E' comunque possibile determinare il coefficiente di estinzione molare ϵ a 280 nm di una proteina sulla base della sua composizione amminoacidica. Una formula semplice è:

$$\epsilon_{280} = N^{\circ}_{\text{Trp}} \cdot 5500 + N^{\circ}_{\text{Tyr}} \cdot 1490 + N^{\circ}_{\text{Cys}} \cdot 125$$

Nel caso la proteina venga completamente denaturata (in guanidinio cloruro) la formula da utilizzare è la seguente:

$$\epsilon_{280} = N^{\circ}_{\text{Trp}} \cdot 5690 + N^{\circ}_{\text{Tyr}} \cdot 1280 + N^{\circ}_{\text{Cys}} \cdot 120$$

Alla somma del numero di residui di triptofano e tirosina va aggiunto anche il numero di residui di cisteina, che contribuiscono debolmente all'assorbanza a 280 nm se presenti come ponti disolfuro. Se invece la soluzione proteica è eterogenea, cioè si tratta di una miscela di proteine diverse, è possibile utilizzare un coefficiente generico a 280 nm, espresso in unità di assorbanza per mg/mL, e normalmente compreso tra 0,6 e 1 a seconda dell'abbondanza in residui aromatici.

I **metodi indiretti** sfruttano peculiari proprietà spettroscopiche di molecole (cromofori) che si legano alle proteine. I cromofori devono presentare le seguenti proprietà:

- Possedere delle proprietà spettroscopiche diverse quando il cromoforo è libero rispetto a quanto è complessato con una proteina;
- Tutta la proteina deve essere complessata con il cromoforo, che pertanto deve essere in largo eccesso rispetto alla proteina;
- Il cromoforo non deve avere una selettività diversa per le diverse proteine;
- Bisogna costruire una curva di calibrazione utilizzando una proteina a concentrazione nota.

Un esempio classico di questo vasto gruppo di tecniche è quello del dosaggio delle **proteine totali** con il **metodo di Lowry**. In questo saggio si combinano la **reazione del biuretto** e la reazione del reagente di **Folin-Ciocalteu**. Le proteine vengono colorate:

1. Facendo reagire **ioni rame** (Cu^{2+}) con i legami peptidici in condizioni alcaline, provocando la riduzione del rame a Cu^+ e il viraggio da blu a violetto. In soluzione basica, gli ioni rame formano complessi tetradentati con gli azoti amidici di coppie opposte impegnate in legami peptidici; la reazione dipende in parte anche dalle proprietà delle catene laterali Trp e Tyr.
2. Ossidando i residui amminoacidi aromatici (principalmente triptofano e tirosina) in presenza del **reagente di Folin-Ciocalteu**, che reagisce con il Cu^+ , si riduce e forma il blu di molibdeno.

In seguito a queste reazioni, i campioni proteici appaiono colorati in blu ed è possibile misurare l'intensità del colore (l'assorbanza a 750 nm), che è proporzionale alla concentrazione delle proteine presenti nel campione. Per avere una stima quantitativa, però, è necessario costruire una **curva di taratura**, utilizzando campioni di proteine a concentrazioni note. La proteina ideale da usare come standard è la forma assolutamente pura della proteina da dosare. In assenza di questa, si può usare un'altra proteina come standard relativo quali la BSA (siero albumina bovina) e le gamma-globuline. Si esegue quindi il saggio di Lowry su soluzioni di BSA a concentrazione nota, se ne misura l'assorbanza a 750 nm e la si mette in grafico in funzione delle corrispondenti concentrazioni. Si esegue, poi, il test per i campioni a concentrazione

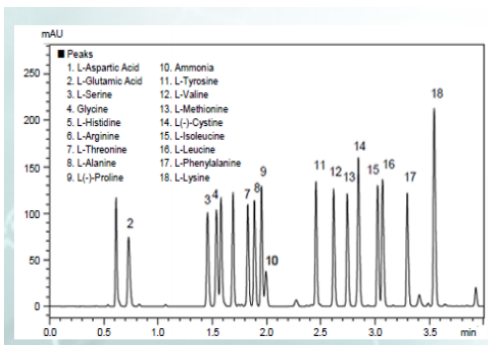
ignota. Una volta determinati i loro valori di assorbanza, dal confronto con la **retta di taratura** (ottenuta tramite **interpolazione grafica**) si ricavano le concentrazioni delle proteine a concentrazione ignota. Tamponi quali tris e tamponi zwitterionici e altre sostanze sono incompatibili con il saggio, perché interferiscono nella misura. Il metodo di Lowry è utilizzato principalmente per miscele di proteine ed ha un range di sensibilità di circa 10-1000 µg/mL.

Un'alternativa è quella di usare il **saggio dell'acido bicinconico (BCA)**. La reazione del BCA è simile a quella del reattivo di Lowry: lo ione Cu^{2+} è ridotto a Cu^+ dalle molecole proteiche in soluzione alcalina, due molecole di BCA chelano uno ione rameoso e questo evento determina la formazione di un complesso con un intenso colore violetto con un massimo di assorbimento a 562 nm. Il metodo BCA è praticamente insensibile ad interferenze da detergenti o tamponi ed è molto utilizzato, anche perché consente di valutare correttamente quantità tra 1 e 10 µg di proteina e può quindi essere utilizzato come micro-metodo su piccole quantità di campione. Il range di sensibilità di questo metodo è di 0,5-2000 µg/mL.

Un dosaggio delle proteine del tutto analogo è quello che si effettua con il **metodo Bradford**, che si basa sulla reazione delle proteine con il **Coomassie Brilliant Blue G-250**, un composto disulfonato del trifenilmetano, di colore bruno-rosso. Questo colorante si lega ai residui di arginina (molto efficientemente), triptofano, tirosina ed istidina. Questa interazione destabilizza il *fold* proteico, esponendo regioni idrofobiche a cui le regioni non polari del blu di Coomassie si legano mediante interazioni di Van der Waals. Una volta legato, il colorante nella sua forma anionica diventa blu e se può misurare l'assorbanza a 595 nm, che è proporzionale alla quantità di proteine. Anche in questo caso, per ottenere una misura quantitativa dei campioni, è necessario costruire una curva di taratura con una proteina standard. Il metodo è molto rapido (10 minuti), dipende dalla composizione amminoacidica ed ha un range di sensibilità di 1-2000 µg/mL.

L'**analisi amminoacidica** è un metodo utilizzato per determinare la composizione amminoacidica di proteine e peptidi. Inoltre, l'utilizzo di questo metodo, permette di determinare l'identità della proteina in base alla composizione amminoacidica, di quantificare la proteina e di identificare amminoacidi modificati nella proteina. operativamente parlando, si procede nel seguente modo:

1. **Idrolisi in fase liquida:** la proteina viene ripresa in HCl 6N all'interno di una fiala in cui viene fatto il vuoto in atmosfera di azoto. La fiala viene quindi messa in stufa a 110°C per un tempo variabile compreso tra 24-72 ore.
2. **Derivatizzazione** (attraverso PITC) e **separazione** (attraverso HPLC);



La separazione cromatografia permette di determinare l'identità e la quantità relativa di ogni amminoacido presente nella proteina. E' necessario, però, avere standard di confronto costituiti da miscele di amminoacidi a concentrazione nota. Tale metodo è preciso ma molto laborioso.

Le conclusioni dei metodi di dosaggio delle proteine sono i seguenti:

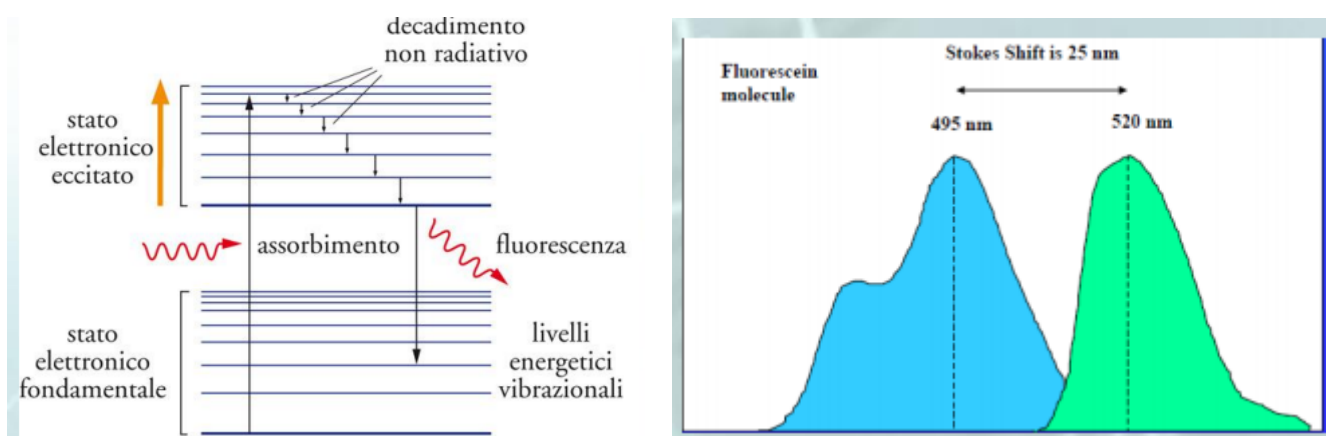
- I metodi diretti e indiretti sono tutti basati sulle proprietà spettroscopiche;
- Le strategie sono diverse a seconda che i campioni siano puri o in miscela;
- Nessun metodo soddisfa pienamente le necessità di determinare con precisione la concentrazione proteica;

- Può essere utile utilizzare più metodiche.

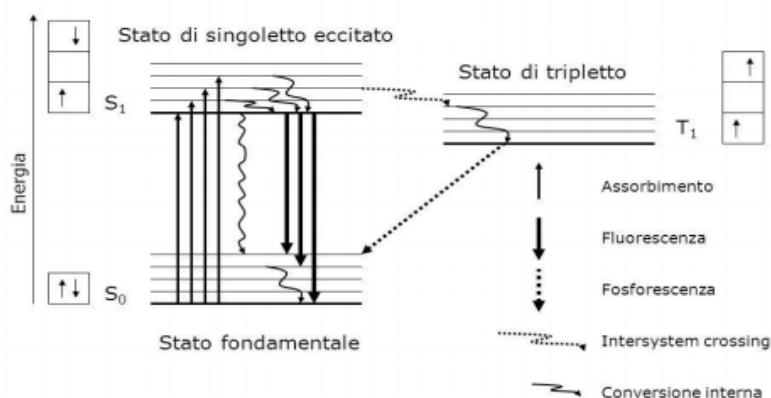
Lez. 10 - Tecniche spettroscopiche

La **luminescenza** è un fenomeno dovuto all'emissione di radiazione elettromagnetica (visibile o invisibile). La **fluorescenza** e la **fosforescenza** sono determinate dall'emissione di parte delle radiazioni assorbite. L'energia della luce assorbita da un composto qualsiasi viene generalmente dissipata sotto forma di calore, mentre certe sostanze liberano parte di questa energia sotto forma di emissione di radiazione. La **chemiluminescenza**, invece, viene determinata dall'energia che si libera da una reazione chimica. Nei sistemi biologici, queste reazioni sono catalizzate da enzimi (**bioluminescenza**).

La **fluorescenza** è un processo fotofisico secondo il quale una molecola eccitata con radiazioni di una determinata frequenza emette radiazioni nel corso di una transizione ad un livello energetico minore. L'assorbimento di luce avviene a lunghezze d'onda minori (cioè a maggiore energia) rispetto a quelle emesse (a minore energia) e la differenza fra queste due lunghezze d'onda è nota come **shift di Stokes**. L'origine di questa differenza dipende dal fatto che la molecola eccitata elettronicamente ritorna al più basso stato eccitato (rilassamento) attraverso una serie di **rilassamenti vibrazionali e rotazionali** (10^{-12} s) che dissipano energia senza emissione di luce (**conversione interna**). La transizione di energia da uno stato più alto ad uno più basso (10^{-8} s) è accompagnata da una emissione di radiazione di energia inferiore a quella di partenza.



Nella **fosforescenza** il rilassamento della molecola avviene tramite il passaggio dell'elettrone ad uno stato intermedio (T) dal quale la probabilità di ricadere sull'orbitale di partenza è estremamente bassa (transizione proibita). Gli elettroni non decadono tutti nello stesso istante, ma in modo casuale durante un tempo ben più lungo. Nella fosforescenza l'emissione ha un tempo di decadimento più lungo e persiste anche quando l'eccitazione è terminata (sec-min). Sia per i fenomeni di fluorescenza che per quelli di fosforescenza vale la legge di Stokes.



Una volta eccitata, la molecola può perdere energia sotto forma di calore, conversione interna, per collisione con altre molecole oppure attraverso transizioni intermedie che non producono fotoni con energia sufficiente. Si definisce quindi come **resa quantica** (o **quantum yield**, Φ_F) il rapporto tra i fotoni emessi e quelli assorbiti, che può variare tra 0 e 1:

$$\Phi = \text{resa quantica} = \frac{\text{fotoni emessi}}{\text{fotoni assorbiti}} \quad 0 \geq \Phi \leq 1$$

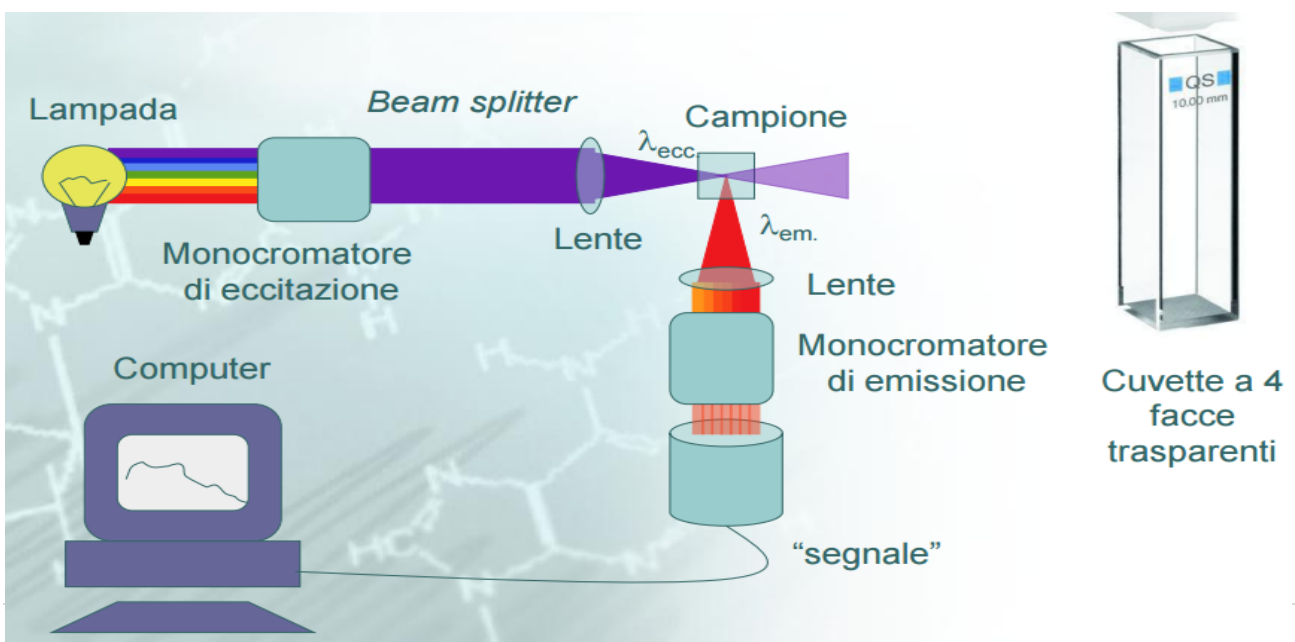
L'**intensità di fluorescenza (F)** è proporzionale alla concentrazione del fluoroforo, all'assorbimento di radiazione (ϵ) e alla resa quantica:

$$F \propto \Phi \cdot C \cdot \epsilon \cdot l \quad F \propto \Phi \cdot A$$

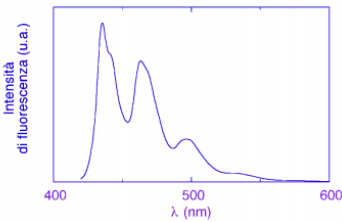
dove
 C = concentrazione molare del composto fluorescente;
 l = cammino ottico, in cm, del raggio che attraversa il campione;
 ϵ = coefficiente di estinzione molare del composto che assorbe alla lunghezza d'onda λ .

La fluorescenza è ulteriormente influenzata dalla presenza di altre sostanze in soluzione in grado di ridurre la luce emessa dal fluoroforo, dette inibitori o smorzatori (**quencher**). Mentre le misure di assorbanza sono corrette per intervalli di concentrazione molto ampi, la fluorescenza è proporzionale alla concentrazione solo a basse concentrazioni di fluoroforo. Infatti elevate concentrazioni portano ad un eccessivo assorbimento della luce, dovuto alla collisione con altre molecole, e di conseguenza ad un'attenuazione del segnale di emissioni (fenomeni di **auto-quenching** e di effetto filtro). Pertanto, la F è proporzionale alla concentrazione della molecola solo a basse concentrazioni.

Gli **spettrofluorimetri** sono dotati di monocromatori a prisma o reticolo e sono in grado di fornire analisi qualitative quali lo spettro di eccitazione e quello di fluorescenza. Le radiazioni provenienti dalla sorgente luminosa passano attraverso il sistema monocromatore (di eccitazione) e arrivano al campione. Lo schema ottico più comunemente utilizzato è quello a L o a 90°. Le radiazioni della luce di fluorescenza vengono prelevate ad un angolo di 90° ed inviate ad un secondo sistema monocromatore (di emissione) e quindi quantificate da un tubo fotomoltiplicatore. Questa disposizione permette di escludere le radiazioni trasmesse o non assorbite dalla soluzione e ottenere una misura della sola radiazione di fluorescenza.



I **fluorimetri** sono degli strumenti in cui la radiazione luminosa viene resa monocromatica attraverso filtri che sono utilizzati esclusivamente a scopo quantitativo.



L'intensità della luce di fluorescenza è una misura relativa che dipende da vari fattori, tra i quali la geometria dello strumento e la banda passante, e viene pertanto espressa in unità arbitrarie (u.a.). Lo spettro di emissione viene ottenuto eccitando il campione ad una lunghezza d'onda precisa e fissa (λ_{ecc}) e variando la λ_{em} da 400 a 600 nm. L'intensità di fluorescenza F risulta proporzionale alla λ_{em} .

La fluorescenza può essere utilizzata in biologia nelle seguenti tecniche e per le seguenti finalità:

A. Fluorimetria/Spettrofluorimetria:

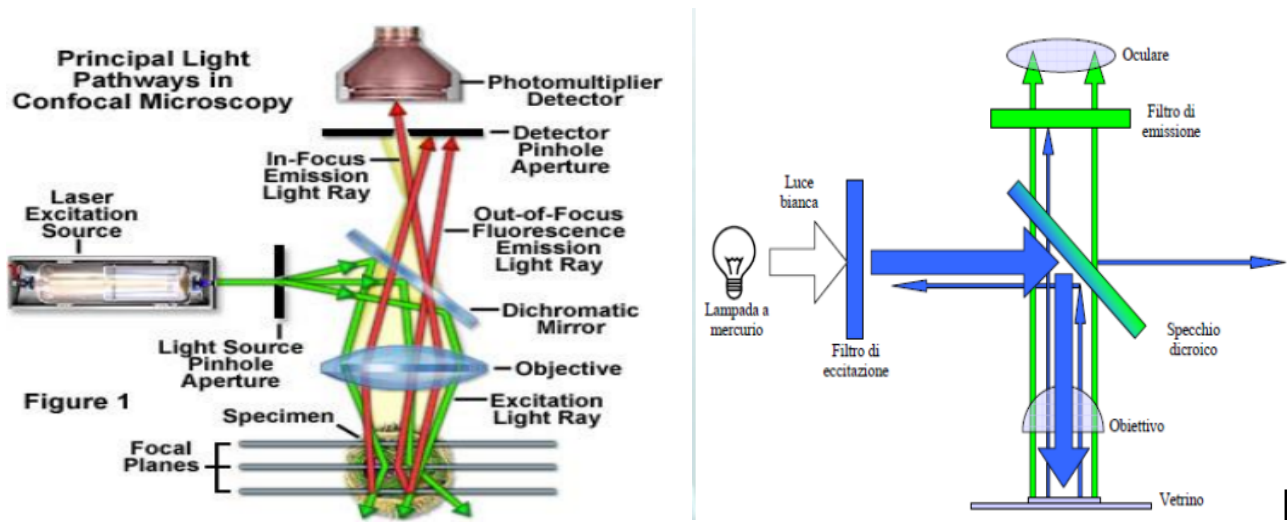
- a. Determinazione della concentrazione di molecole con fluorofori (mM);
- b. Interazioni proteina-proteina: distanza tra due fluorofori (FRET) e polarizzazione di fluorescenza;
- c. Informazioni sulla struttura: accessibilità al solvente.

B. Microscopia a fluorescenza:

- a. Permette di distinguere cellule e componenti subcellulari;
- b. Permette di localizzare singole proteine;

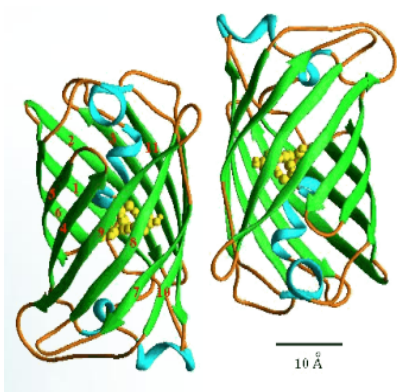
C. Citofluorimetria: permette un'analisi veloce ed automatica di popolazioni cellulari in sospensione, misurandone le caratteristiche fisiche e/o biochimiche (volume, granulosità e fluorescenza).

La **microscopia a fluorescenza** usa la luce ultravioletta ad una lunghezza d'onda di 200-400 nm e le strutture sono analizzate sulla base della fluorescenza che emettono nello spettro visibile. La fluorescenza indotta da una colorazione con sostanze fluorescenti, dette **fluorocromi**; vengono utilizzati degli anticorpi marcati o delle proteine in fusione con polipeptidi fluorescenti (GFP).



Nella **microscopia confocale** la luce viene generata da un laser che viene focalizzato dall'obiettivo sul campione, che quindi arriva in un solo punto del campione. Dal momento che si ottengono soltanto la luce del piano focale, si ottengono delle immagini molto nitide e pulite.

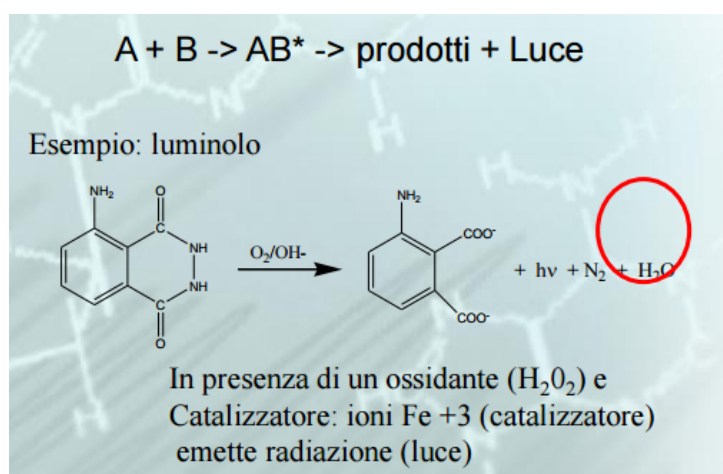
La **Green Fluorescent Protein (GFP)** viene frequentemente utilizzata come *reporter* fluorescente per rilevare l'espressione di geni di interesse in organismi sia procariotici sia eucariotici, in quanto è in grado di riemettere luce di colore verde acceso se colpita ed eccitata da una radiazione ad una specifica lunghezza



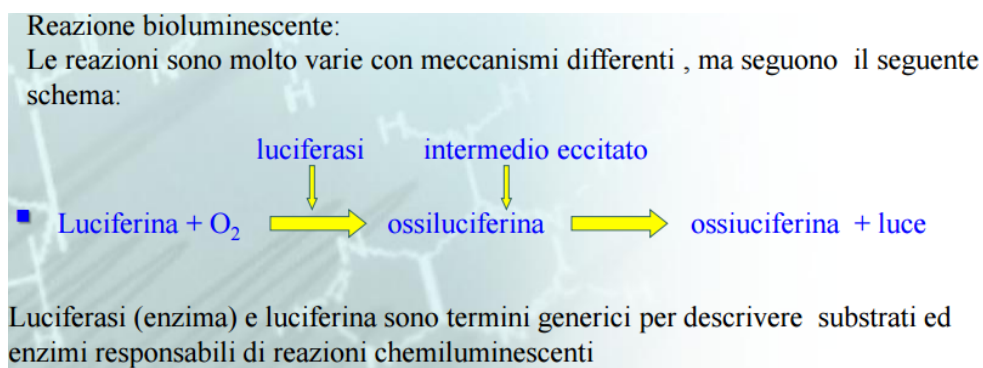
d'onda. Questa proteina ha una struttura tridimensionale pressoché cilindrica che racchiude al centro un cromoforo formato da tre amminoacidi consecutivi (serina 65, tirosina 66 e glicina 67), i quali reagiscono chimicamente fra loro in presenza di ossigeno per formare il cromoforo. Questi tre amminoacidi sono essenziali per l'emissione e la qualità della fluorescenza della proteina, visto che sostituzioni dei tre residui amminoacidici o di residui vicini ad essi modificano le proprietà della fluorescenza della GFP. Vennero identificate diverse varianti, tra le quali una in cui la mutazione della serina in posizione 65 in treonina generava una GFP più brillante (**EGFP**) e un'altra in cui la mutazione

della tirosina in posizione 66 in istidina generava la **Blue Fluorescent Protein (BFP)**. Il fatto che la mutazione della tirosina modificasse la lunghezza d'onda di emissione della fluorescenza spinse i ricercatori a provare a sostituire la tirosina con altri amminoacidi per vedere se si ottenevano altre varianti utili.

La **chemiluminescenza** è un fenomeno di emissione di radiazione luminosa dovuta ad una reazione chimica. I fotoni vengono prodotti direttamente da elettroni eccitati chimicamente di molecole che partecipano ad una reazione esoergonica che riguarda reazioni di ossidoriduzione.



La **bioluminescenza** è un processo di emissione di luce visibile negli organismi viventi dovuto ad una reazione chimica (enzimatica). Le reazioni di bioluminescenza avvengono tipicamente negli organismi degli abissi marini.



La luminescenza viene misurata attraverso la **luminometria**. Prima di essere registrato, il segnale luminoso viene raccolto da un fotomoltiplicatore collegato ad un amplificatore di corrente. Pertanto, non c'è

necessità di un fotomoltiplicatore. Tra tutte quelle che utilizzano la fluorescenza, le tecniche maggiormente selettive sono:

- Il dosaggio di substrati e di attività enzimatiche che coinvolgono ATP o NAD/NADH;
- Le tecniche di *Imaging* in bio- e chemiluminescenza;
- La marcatura di anticorpi o antigeni con molecole chemiluminescenti;
- I biosensori cellulari luminescenti.

Il numero di molecole naturalmente luminescenti è relativamente ristretto. In molti casi è però possibile rendere luminescenti molecole non emittenti mediante derivatizzazione, ovvero attraverso una reazione chimica indicatrice che comporta il legame della molecola ad una specie luminescente.

Lez.10 - Cinetica enzimatica

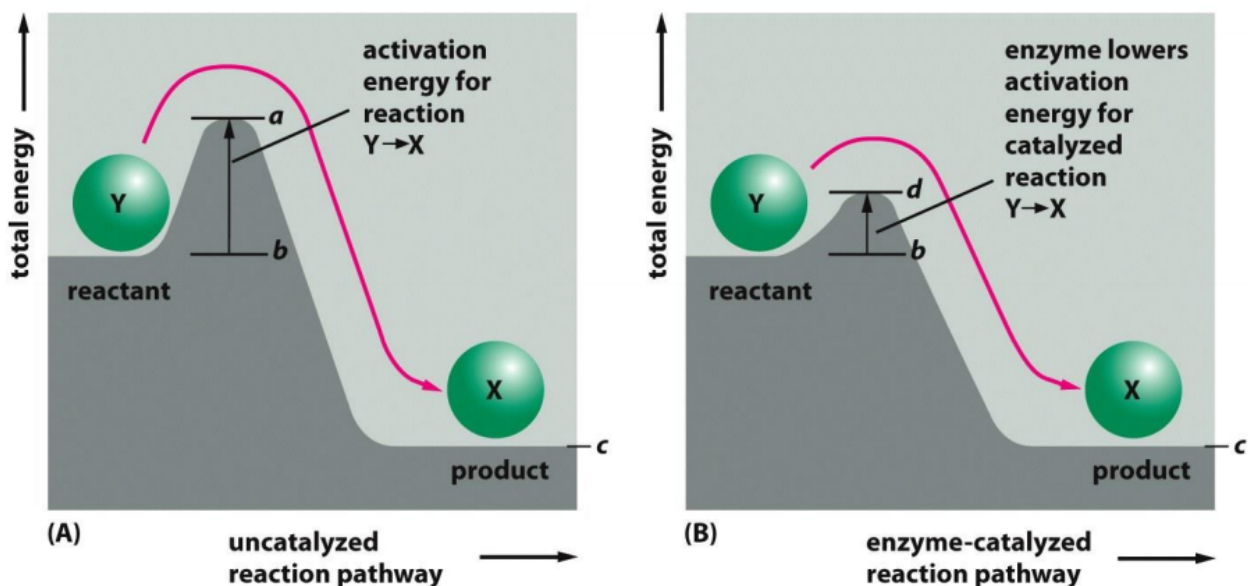
Gli **enzimi** sono macromolecole biologiche di natura proteica, con gruppi funzionali sui quali hanno luogo scambi o trasformazioni di sostanze, che svolgono una funzione di catalizzatori (biologici), accelerando le reazioni chimiche o facendo avvenire delle reazioni che altrimenti non avrebbero luogo.

L'**energia libera (G)** è una funzione termodinamica che rappresenta una misura dell'energia utile, cioè dell'energia in grado di compiere un lavoro. Ad una reazione chimica è sempre associata una variazione di energia libera (ΔG), che può essere:

- $\Delta G < 0$: **reazione esoergonica**, in cui la trasformazione dei reagenti nei prodotti avviene spontaneamente;
- $\Delta G > 0$: **reazione endoergonica**, in cui la trasformazione dei reagenti nei prodotti NON avviene spontaneamente;
- $\Delta G = 0$: reazione all'equilibrio.

Pertanto, la variazione di energia libera misura la **spontaneità** di una reazione. La ΔG non fornisce però informazioni sulla velocità di reazione e non significa nemmeno che la reazione avverrà ad una velocità apprezzabile. Gli enzimi, al contrario, aumentano la velocità della reazione ma non modificano la posizione dell'equilibrio.

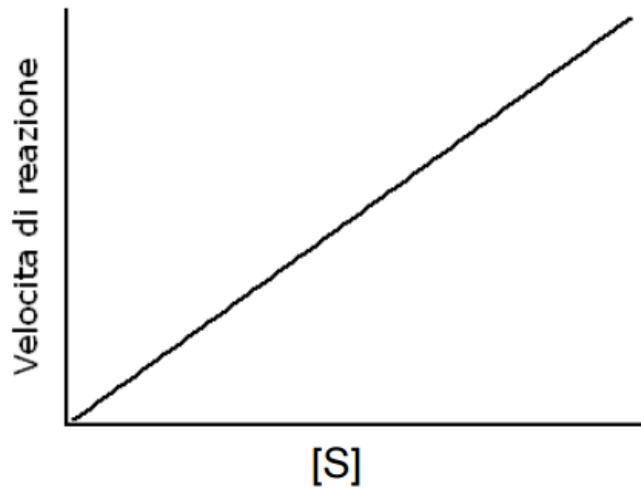
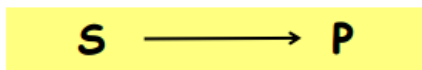
La conversione $Y \rightarrow X$ è termodinamicamente favorevole, ma la reazione non può avvenire se Y non acquisisce sufficiente energia per superare la barriera dell'**energia di attivazione**.



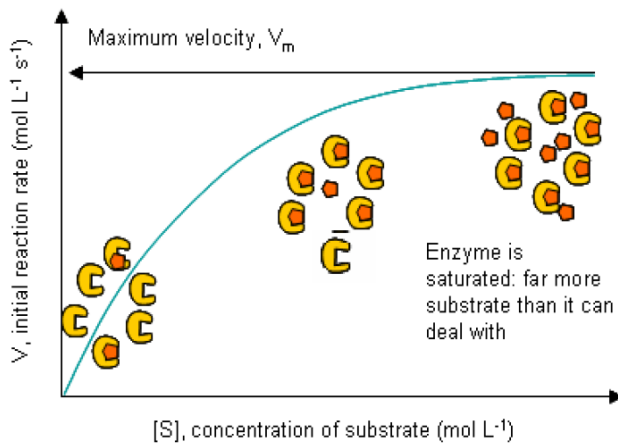
Gli enzimi si combinano transientemente con il substrato, abbassandone l'energia di attivazione. Gli enzimi non spostano l'equilibrio della reazione, ma soltanto la velocità con il quale questo viene raggiunto. Inoltre, gli enzimi non subiscono modificazioni permanenti durante la reazione e sono subito disponibili per catalizzare un nuovo ciclo di reazioni.

L'**attività di un enzima** viene misurata come velocità della reazione da esso catalizzata. La **velocità di reazione** viene misurata in termini di quantità di substrato trasformato, o di prodotto che si forma,

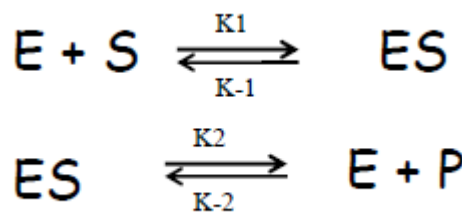
nell'unità di tempo. La velocità delle reazioni chimiche è soggetta a leggi chimico-fisiche ben definite che consentono di ricavare delle equazioni della velocità diverse a seconda del tipo di reazione. Queste equazioni mettono in relazione la velocità di reazione con la concentrazione dei reagenti. In una reazione chimica non catalizzata, la velocità di reazione è direttamente proporzionale a [S] e il grafico velocità-concentrazione è proporzionale ad una linea retta.



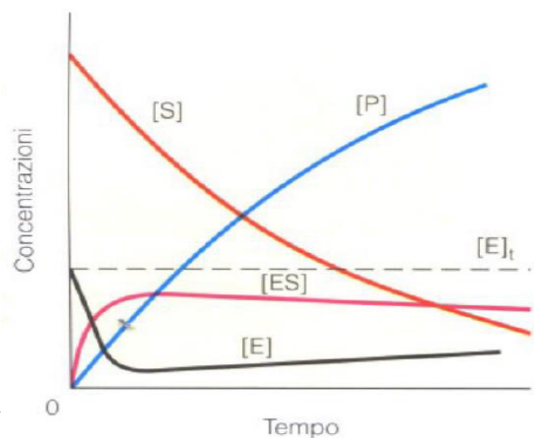
In una reazione enzimatica, la dipendenza della velocità di reazione dalla [S] non è costante ma varia al variare della concentrazione del substrato stesso. Il grafico velocità-[S] è un'iperbole rettangolare descritta dall'**equazione di Michaelis Menten**, in cui la velocità v e la [S] sono le due variabili, mentre V e K_m sono due costanti.



$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]}$$



ES è un intermedio di reazione il cui basso valore di energia di attivazione permette di fare avvenire una specifica reazione catalizzata. La formazione del complesso enzima-substrato (ES) è la prima tappa nella catalisi enzimatica (**step veloce**), mentre la seconda reazione è più lenta e limita quindi la velocità globale. In qualsiasi istante, l'enzima è presente nella forma libera e in quella combinata. Quando la [S] è bassa, l'enzima sarà per lo più

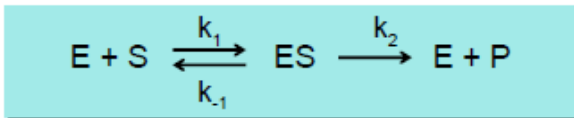


nella forma libera; man mano che la [S] tende ad aumentare viene favorita la formazione di ES.

La **velocità iniziale** (V_0) di una reazione aumenta quasi linearmente all'aumentare della concentrazione di substrato. La velocità qui è direttamente proporzionale alla concentrazione del substrato e la reazione è di primo ordine: $V = k \cdot [S]$. La proporzionalità fra V e $[S]$ diminuisce progressivamente: la velocità iniziale diventa indipendente dalla $[S]$ e la reazione è di ordine zero rispetto al substrato. La velocità iniziale massima della reazione (V_{max}) si osserva quando tutto l'enzima è presente sotto forma di complesso ES. Questa condizione esiste soltanto quando la $[S]$ è elevata. L'effetto saturante del substrato è responsabile dell'appiattimento della curva. L'equazione che descrive la relazione velocità-[S] in una reazione enzimatica è l'equazione di **Michaelis-Menten**:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Ad alte concentrazioni di substrato, l'enzima è saturato e perciò $[ES] = [E]$, da cui $V_{max} = K_2 \cdot [E]$. L'equazione può anche essere scritta in una forma diversa che evidenzia la dipendenza della velocità, oltre che dalla concentrazione di substrato, dalla concentrazione di enzima:

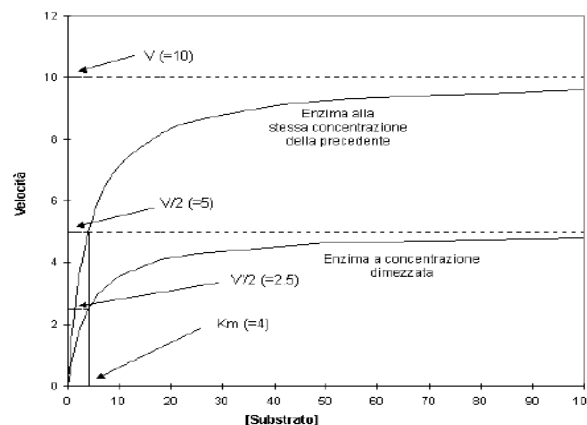


$$K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

costante di Michaelis-Menten

$$v = k_2 \frac{[E] \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Se $K_M = [S]$, allora $V_0 = 1/2 V_{max}$. Quindi K_M è equivalente alla concentrazione del substrato in cui V_0 è la metà della V_{max} . La V_{max} è direttamente proporzionale alla $[E]$, mentre K_M è indipendente dalla $[E]$ e dalla $[S]$.



K_2 è la costante che limita la velocità (stadio lento), per cui è molto minore rispetto a K_{-1} (che è la costante di dissociazione del complesso ES). Quindi la K_M è la $[S]$ alla quale la metà dei siti sono saturati. Quindi K_M fornisce una misura della $[S]$ richiesta affinché la catalisi abbia luogo. La V_{max} , invece, esprime il **numero di turnover** degli enzimi, cioè il numero di molecole di substrato convertite in prodotto da una molecola enzimatica nell'unità di tempo, quando l'enzima è totalmente saturato dal substrato. Il numero di turnover dipende da K_2 , che è anche detta K_{cat} . Se è nota la concentrazione totale di siti attivi $[E_T]$, allora $V_{max} = K_2 \cdot [E_T]$ e quindi: $k_2 = V_{max} / [E_T]$.





$$k_{cat} = k_2 \quad V_{max} = k_{cat} [E_T]$$

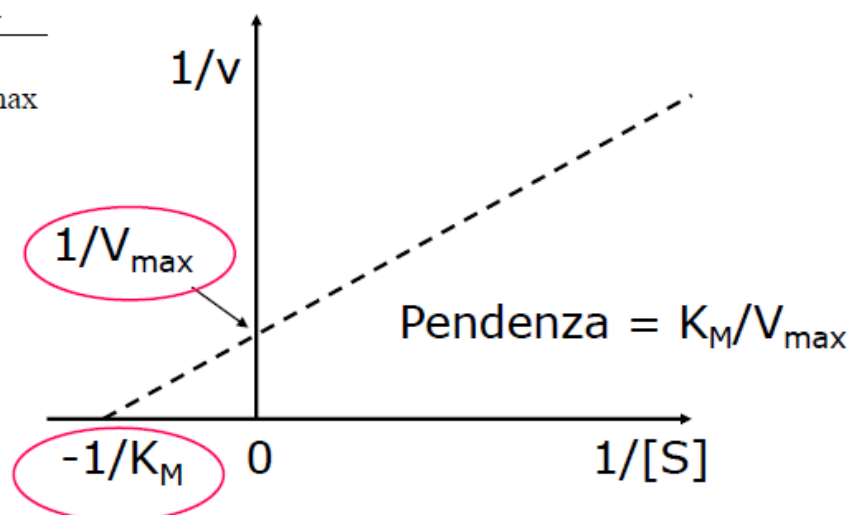
Il rapporto K_{cat}/K_M è una misura dell'efficienza catalitica. Quando la $[S]$ è molto più elevata di K_M la velocità della reazione catalizzata è uguale a V_{max} .

Riassumendo:

1. Ad una bassa $[S]$ la velocità V aumenta quasi linearmente all'aumentare della $[S]$. All'ulteriore aumentare della $[S]$, gli aumenti di V diventano progressivamente più piccoli. L'asintoto rappresenta la velocità massima della reazione (V_{max}) che non può essere superata indipendentemente dall'aumento di $[S]$, perché ad un'alta $[S]$ l'enzima viene saturato.
2. Ad una elevata $[S]$, lo stadio limitante della reazione è la conversione del complesso ES a $P + E$. Di conseguenza, **V_{max}** rappresenta una misura diretta dell'abilità dell'enzima di convertire il substrato in prodotto, cioè la sua **attività enzimatica**.
3. La posizione dell'equilibrio dipende anche dalla forza di legame tra il substrato e l'enzima. Più essi sono deboli, più alta è la concentrazione di substrato necessaria per avere il 50% di saturazione dell'enzima, quindi più alto sarà il valore di K_M . K_M è un'espressione dell'affinità dell'enzima per il substrato: se il suo valore è basso, l'affinità dell'enzima sarà alto; se il suo valore è alto, l'affinità dell'enzima per il substrato sarà basso.

Dal grafico di Michaelis-Menten non è agevole calcolare la velocità massima della reazione, perché ad alte $[S]$ la curva ha un andamento asintotico. Per questo motivo si usa l'elaborazione di Lineweaver-Burk, che permette di linearizzare l'equazione tramite il calcolo dei doppi reciproci. Nel grafico dei doppi reciproci (o di **Lineweaver-Burk**), si riporta graficamente l'andamento di $1/V$ in funzione di $1/[S]$. In tal modo, si ottiene una retta con intercetta sull'asse delle ascisse nel punto $-1/K_M$ e sull'asse delle ordinate nel punto $1/V_{max}$, e con pendenza pari al rapporto K_M/V_{max} .

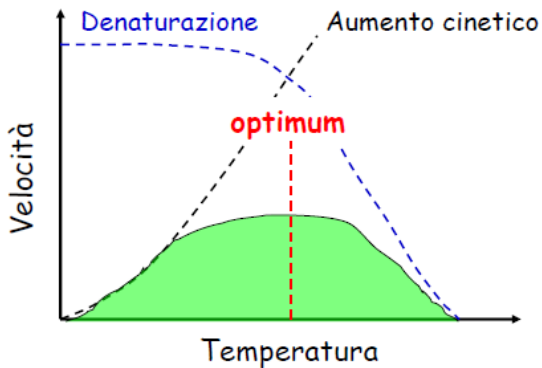
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$



Un enzima può essere misurato in termini di concentrazione come qualunque altra proteina. Da un punto di vista analitico, però, interessa la misura dell'**attività catalitica** (o **attività enzimatica**), che si esprime in **Unità Internazionali (U.I.)**. 1 U.I. è la quantità di enzima che catalizza la formazione di una macromolecola di prodotto in un minuto.

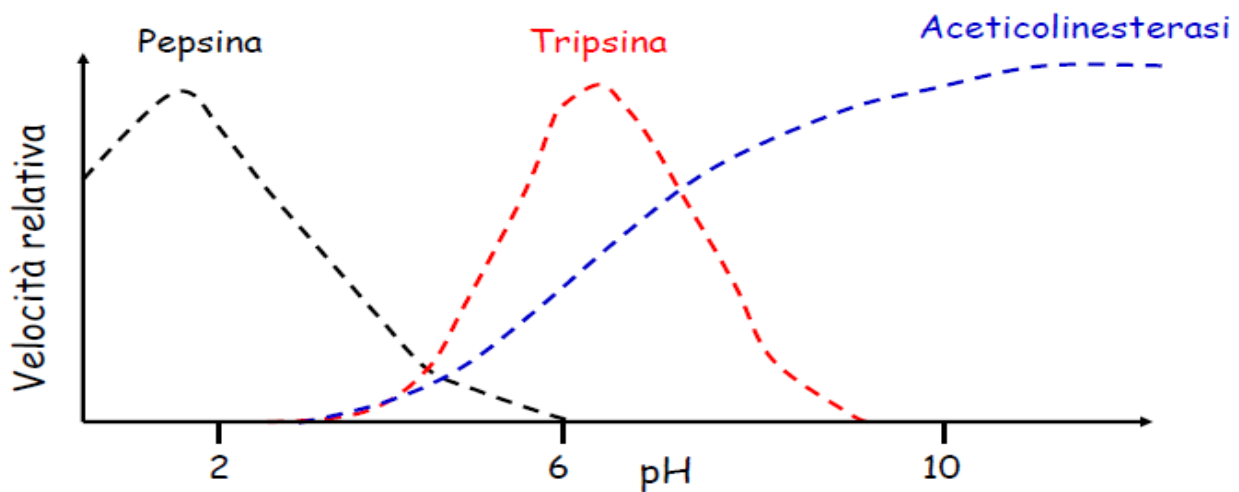
I fattori che influenzano la velocità di una reazione sono i seguenti:

- A. La concentrazione dell'enzima;
- B. La concentrazione del substrato;
- C. Nel caso di enzimi allosterici (con più subunità), la presenza di modulatori positivi e negativi;
- D. La temperatura;
- E. Il pH.



La velocità delle reazioni chimiche e la stabilità di una proteina dipendono dalla temperatura. Le molecole non possiedono, anche se catalizzate, l'energia sufficiente per superare la barriera dell'energia di attivazione. Un eccessivo aumento della temperatura, però, provoca la denaturazione degli enzimi, con la modificazione irreversibile del sito attivo e la drastica riduzione dell'attività catalitica.

La stabilità di una proteina dipende dal pH e, perché avvengano, alcuni processi necessitano di valori estremi di pH. Il cambiamento di pH altera il grado di ionizzazione dei gruppi ionizzabili eventualmente presenti nella molecola di substrato e/o nell'enzima: sia la natura ionica del substrato che quella dell'enzima modificano il modo di combinarsi dell'uno con l'altro.

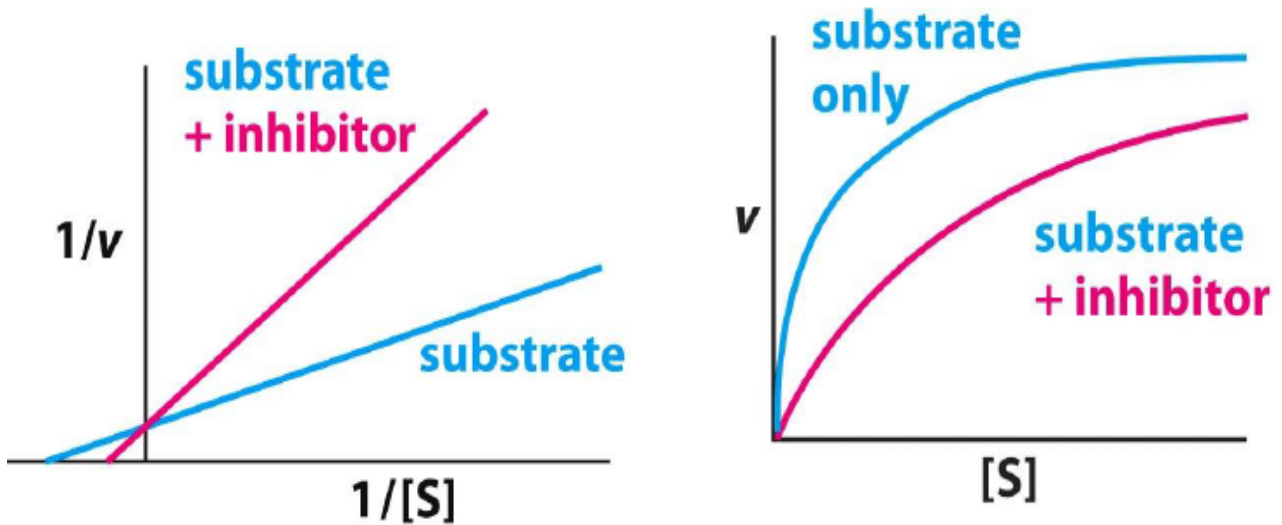


Le funzioni di un enzima sono quelle di accelerare le reazioni e di controllare e regolare i processi metabolici, anche attraverso l'**inibizione enzimatica**. Un inibitore enzimatico è una molecola che impedisce all'enzima di funzionare correttamente, e può essere:

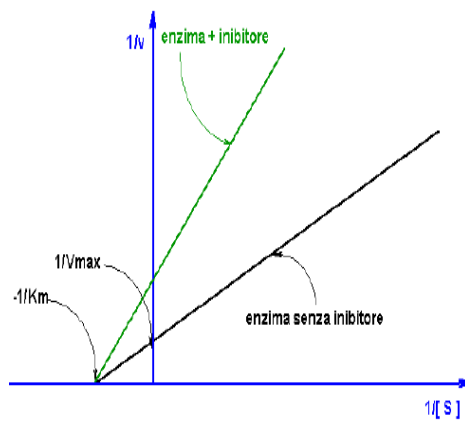
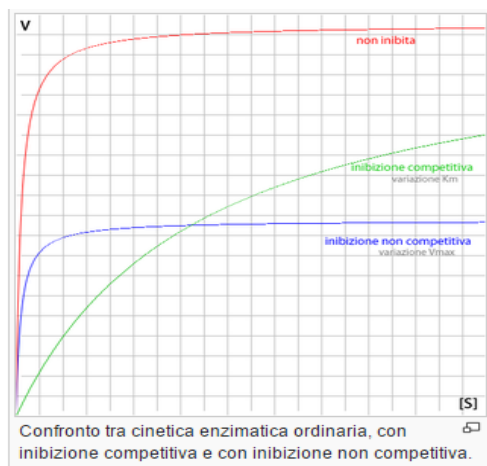
- **Reversibile:** agisce con modalità che consentono all'enzima di recuperare la propria funzionalità biologica;
- **Irreversibile:** si lega covalentemente ad un residuo amminoacidico presente nel sito attivo, modificandolo in modo irreversibile; pertanto annulla l'attività dell'enzima.

Gli **inibitori competitivi** sono molecole simili al substrato che occupano reversibilmente lo stesso sito di legame. La competizione per conquistare il sito attivo dipende dalla concentrazione dei due contendenti. Un inibitore competitivo riduce l'affinità dell'enzima per il substrato, aumentando il valore della sua K_M .

L'inibitore competitivo si può rimuovere aumentando la [S]. Ad alte concentrazioni di substrato, infatti, la reazione non viene rallentata e V_{max} è sempre la stessa.

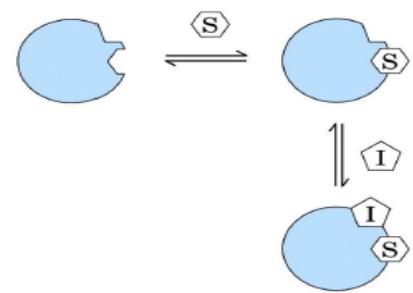
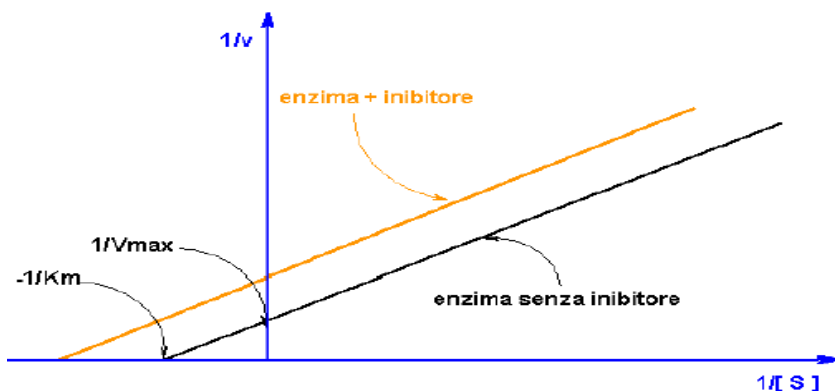


Gli **inibitori non competitivi** sono molecole diverse dal substrato e si legano ad un sito proprio. Gli inibitori non competitivi agiscono diminuendo il numero di Turnover, ma non agiscono sulla proporzione di molecole che legano il substrato. Il substrato può ancora legarsi al complesso EI oltre che all'enzima da solo. In ogni caso il complesso ESI non procede verso la formazione dei prodotti.



K_M rimane invariata
 V_{max} diminuisce
 L'inibitore abbassa la [E] funzionale

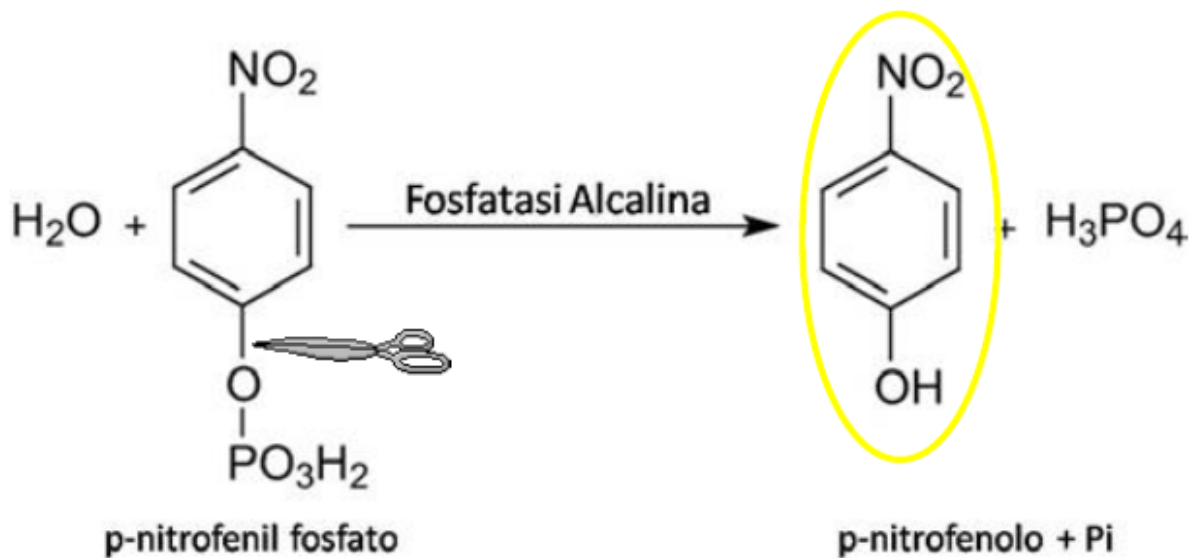
Nell'**inibizione incompetitiva**, l'inibitore si lega solo ad ES, e il complesso ESI non procede verso la formazione del prodotto. Il substrato quindi non viene più convertito in prodotto.



K_M aumenta
 V_{max} diminuisce

La possibilità di vedere una reazione enzimatica è legata al fatto che i substrati e i prodotti hanno diverse proprietà chimico-fisiche. Tali proprietà devono poter essere misurabili e i metodi di rivelazione più comuni in enzimologia sono spettrofotometrici e luminometrici.

Le fosfatasi, ad esempio, catalizzano la rimozione di gruppi fosfato da diversi tipi di molecole, e le distinguiamo fra acide e basiche a seconda del pH a cui si esplica la loro massima attività. La fosfatasi alcalina è presente in tutti i tessuti umani e animali, ed è pure diffusa tra i microorganismi. Come indica il nome, la massima efficienza di questo enzima si ottiene a pH basici. Si trova nei reni, nel fegato, nell'intestino e nelle ossa. Il migliore substrato per il dosaggio sperimentale della fosfatasi alcalina è il 4-nitrofenilfosfato. Tale composto non è certamente un substrato fisiologico dell'enzima. Tuttavia, viene rapidamente idrolizzato *in vitro* dalla fosfatasi, dando come prodotto di idrolisi il 4-nitrofenolato, che in ambiente alcalino sviluppa una colorazione nettamente gialla (che può essere così misurata mediante lettura spettrofotometrica a 405 nm).



Utilizzando la curva di taratura fatta con il PNP, che è il prodotto della reazione enzimatica, si estrapolano la [P] ottenuta a partire dalle diverse [S] utilizzate. Conoscendo il tempo di reazione, si calcola la velocità di formazione del prodotto per ogni [S] utilizzata e si riporta in un grafico la velocità in funzione di [S]. Infine, si calcolano i reciproci di v e di [S], riportandoli su un grafico di Lineweaver-Burk. In questo modo, si ricavano i valori di K_M e di V_{max}.