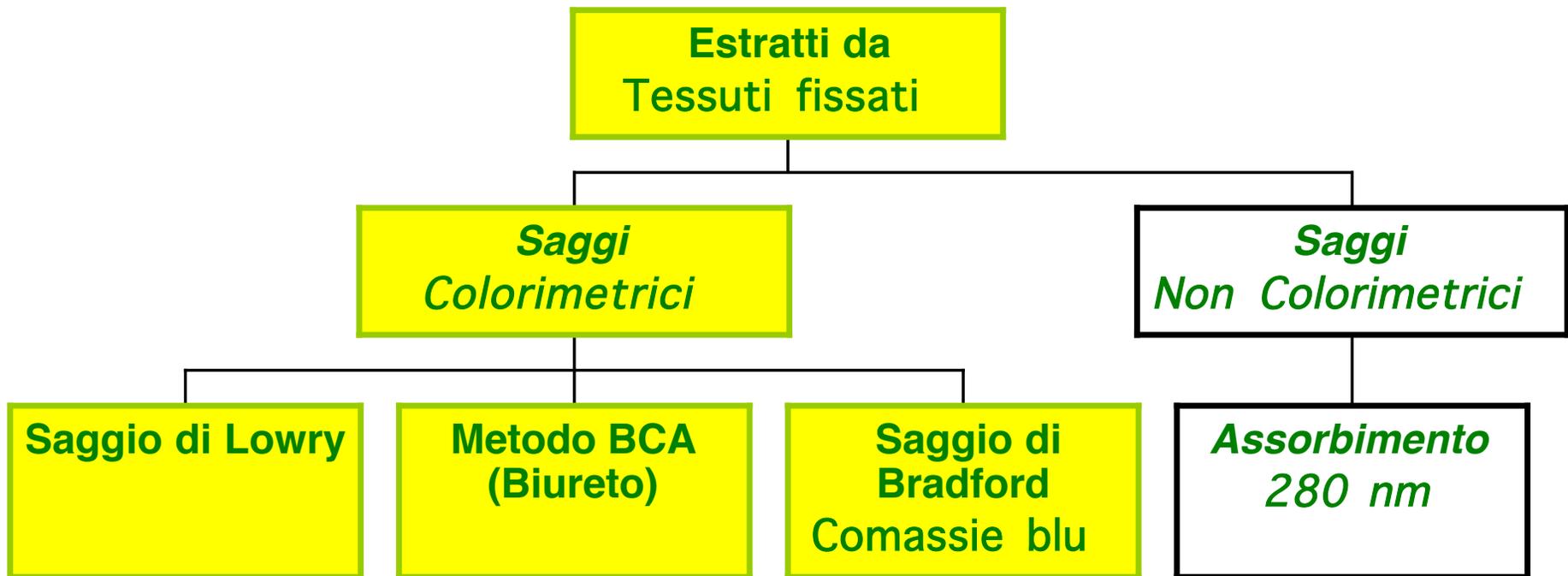


# **ANALISI PROTEICHE IN TESSUTI D' ARCHIVIO**

*Metodologie su proteine estratte*

# Quantificazione degli estratti



# LEGGE DI LAMBERT-BEER

L'assorbanza di una soluzione è direttamente proporzionale alla concentrazione del materiale assorbente quando il percorso della luce è mantenuto costante.

$$A = \log_{10}(I_0/I_1) = \epsilon cl$$

coefficiente di  
estinzione

L'assorbanza è adimensionale.

Quando la concentrazione è espressa in molarità (M) ed il percorso della luce in centimetri (cm),  $\epsilon$  è noto come **coefficiente di estinzione molare** ( $M^{-1}cm^{-1}$ ) di un dato composto.

$\epsilon^{0.1\%}_{280nm}$  è l'assorbanza a 280 nm di una soluzione allo 0.1% (1 mg/ml) della sostanza in esame (ad es. una proteina) in una cuvetta lunga 1 cm.

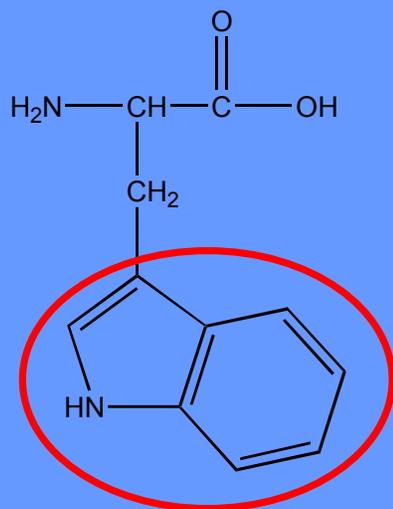
# **Metodi non colorimetrici: Assorbanza a 280 nm**

(metodo di Warburg e Christian)

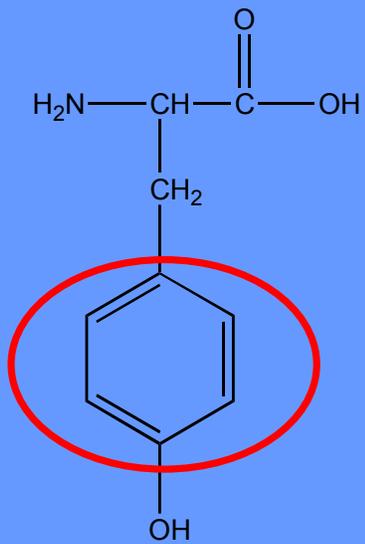
- ❖ **La concentrazione delle proteine può essere stimata misurando l'assorbanza delle soluzioni contenenti le proteine a 280 nm (UV)**
- ❖ **Il metodo è adoperato comunemente perché non distrugge il campione ed è molto rapido**
- ❖ **La maggior parte delle proteine ha un massimo di assorbimento a 280 nm per la presenza degli amminoacidi aromatici triptofano (W), tirosina (Y) e fenilalanina (F)**
- ❖ **Poiché la composizione in amminoacidi delle proteine varia notevolmente, l'assorbimento molare varierà anch'esso di molto, a seconda del contenuto di questi amminoacidi**

**Proteine che non contengono W, Y e F non avranno un massimo di assorbimento a 280 nm, mentre proteine che contengono molti residui di W, Y e F avranno elevati valori di assorbimento molare, con un massimo di assorbimento a 280 nm.**

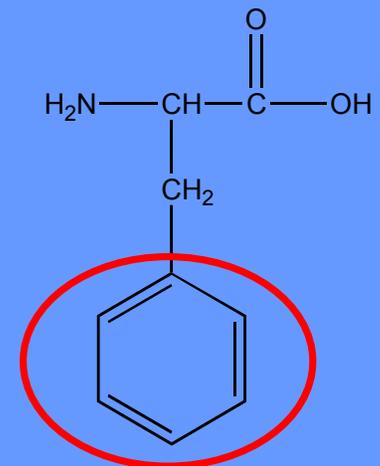
**Il metodo non è quindi molto accurato a meno che la proteina sia pura e ne sia noto l'assorbimento molare.**



Trp (Tryptofano)



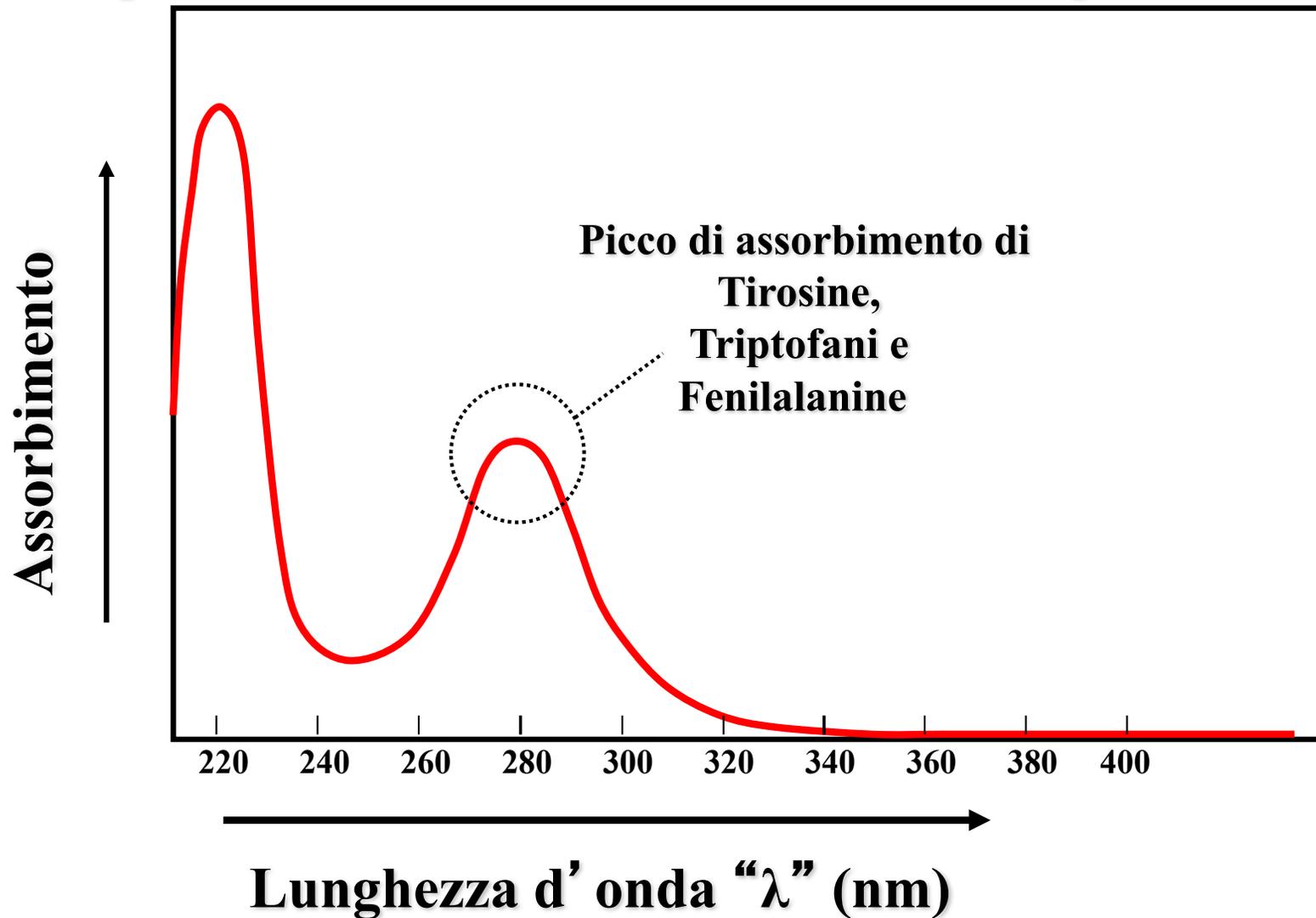
Tyr (Tirosina)



Phe (Fenilalanina)

# Determinazione della concentrazione proteica mediante spettrofotometria

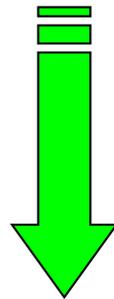
## Spettro di assorbimento UV-VIS di una proteina



UV = 200 nm – 350 nm

# **SVANTAGGI**

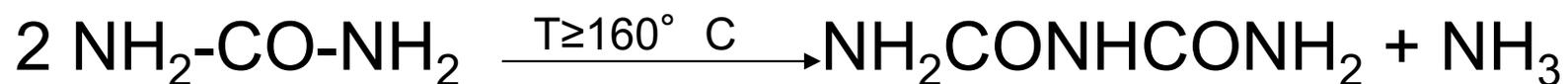
- **A meno che la proteina non sia libera da altri composti che assorbono luce a 280 nm, i risultati saranno poco accurati**
- **Gli acidi nucleici interferiscono perché gli anelli purinici e pirimidinici hanno massimi di assorbimento vicini a 260 nm, con un assorbimento considerevole che si estende fino a 280 nm**



**Se gli acidi nucleici sono gli unici contaminanti, la concentrazione della proteina può essere stimata adoperando una formula che corregge ragionevolmente bene per il contenuto in acidi nucleici:**

$$\text{[proteina]} \text{ (mg/ml)} = 1,55 A_{280} - 0,76 A_{260}$$

# Reazione del biureto



I doppietti liberi dell' azoto possono coordinare ioni metallici come il rame(II) dando una caratteristica **colorazione viola porpora**.

Il **reattivo al biureto** è una soluzione di solfato di rame in ambiente alcalino, in presenza di acido tartarico per evitare la precipitazione degli ioni  $\text{Cu}^{++}$  come idrossido.

Questa reazione **non è specifica del biureto**, ma gli ioni rameici in ambiente alcalino reagiscono con qualsiasi composto contenente **due o più gruppi  $\text{CONH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$  o  $\text{CSNH}_2$** . La reazione quindi è negativa con gli AA e con i dipeptidi, mentre è positiva con i polipeptidi, partendo dai tripeptidi e con le le proteine, visto che sono presenti più gruppi  $\text{CONH}_2$ .

## Metodi Colorimetrici

- **Saggio di Lowry (BioRad DC Protein Assay ):**

- Saggio colorimetrico basato sulla reazione di Lowry, ma modificato per renderlo compatibile con agenti riducenti e detergenti.
- Consiste nella reazione del biureto, seguita dalla riduzione in condizioni alcaline del reagente di Folin-Ciocalteu (acidi misti fosfomolibdotungstato)
- Gli ioni di rame facilitano il processo di riduzione
- Metodo di Lowry originariamente utilizzava il **reattivo di Folin**, una soluzione di Sali di sodio degli acidi tungstico, molibdico e fosforico, che reagisce con i **gruppi fenolici delle tirosine** e produce, in presenza di ioni rameici, una colorazione blu/porpora che ha un picco di assorbimento a 660 nm.
- I gruppi cromogeni principali sono i legami peptidici complessati con rame (biureto) ed i molibdotungstati ridotti blu, che sono ridotti in gran parte da tirosina, triptofano ed amminoacidi polari

## Section 3 Reagent Compatibility

The listed reagents were tested and found to be compatible with the *RC DC* Protein Assay. The presence of one or more of these substances may change the response of the protein to the assay reagents. Thus the protein standard should always be prepared in the same buffer as the protein sample.

<b>Reagents</b>	<b>One Wash</b>	<b>Two Washes (Optional)</b>
Dithiothreitol (DTT)	100 mM	350 mM
Tributylphosphine (TBP)	2 mM	-
$\beta$ -mercaptoethanol	5%	10%
Sequential Extraction Buffer 2 <sup>†</sup>	Not Compatible	Full Strength
Sequential Extraction Buffer 3 <sup>††</sup>	Not Compatible	Full Strength
Laemmli Buffer (with 5% $\beta$ -mercaptoethanol)	Full Strength	-
CHAPS	2%	-
Tween 20 <sup>*</sup>	2%	-
Triton X-100 <sup>**</sup>	2%	-
EDTA	100 mM	-
Imidazole	500 mM	-
Tris, pH 8.4	500 mM	-
NaOH	2.5 M	-

<sup>\*</sup>Tween is a registered trademark of ICI Americas, Inc.

<sup>\*\*</sup>Triton is a registered trademark of Rohm and Haas.

<sup>†</sup>40 mM Tris, 8 M urea, 4% (w/v) CHAPS, 0.2% (w/v) Bio-Lyte 3/10 ampholyte, 2 mM TBP  
(Catalog #163-2103)

<sup>††</sup>40 mM Tris, 5 M urea, 2 M thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 2% (w/v) SB 3-10, 0.2% (w/v)  
Bio-Lyte 3/10 ampholyte, 2 mM TBP (Catalog #163-2104)

## Metodi Colorimetrici

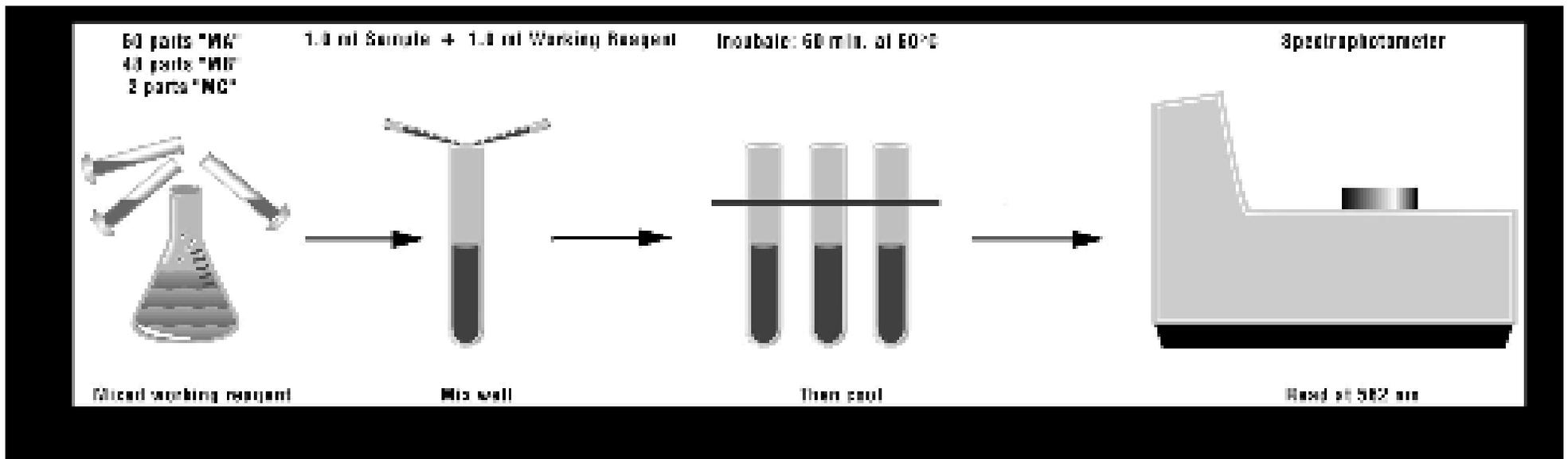
- **Metodo del BCA (Pierce micro BCA Protein Assay Kit):**

- Formula compatibile con i detergenti basata sull'ac bicinconinico (**BCA**).
- Il saggio combina la riduzione del  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  da parte delle **proteine** in ambiente alcalino (Reaz. Biureto)

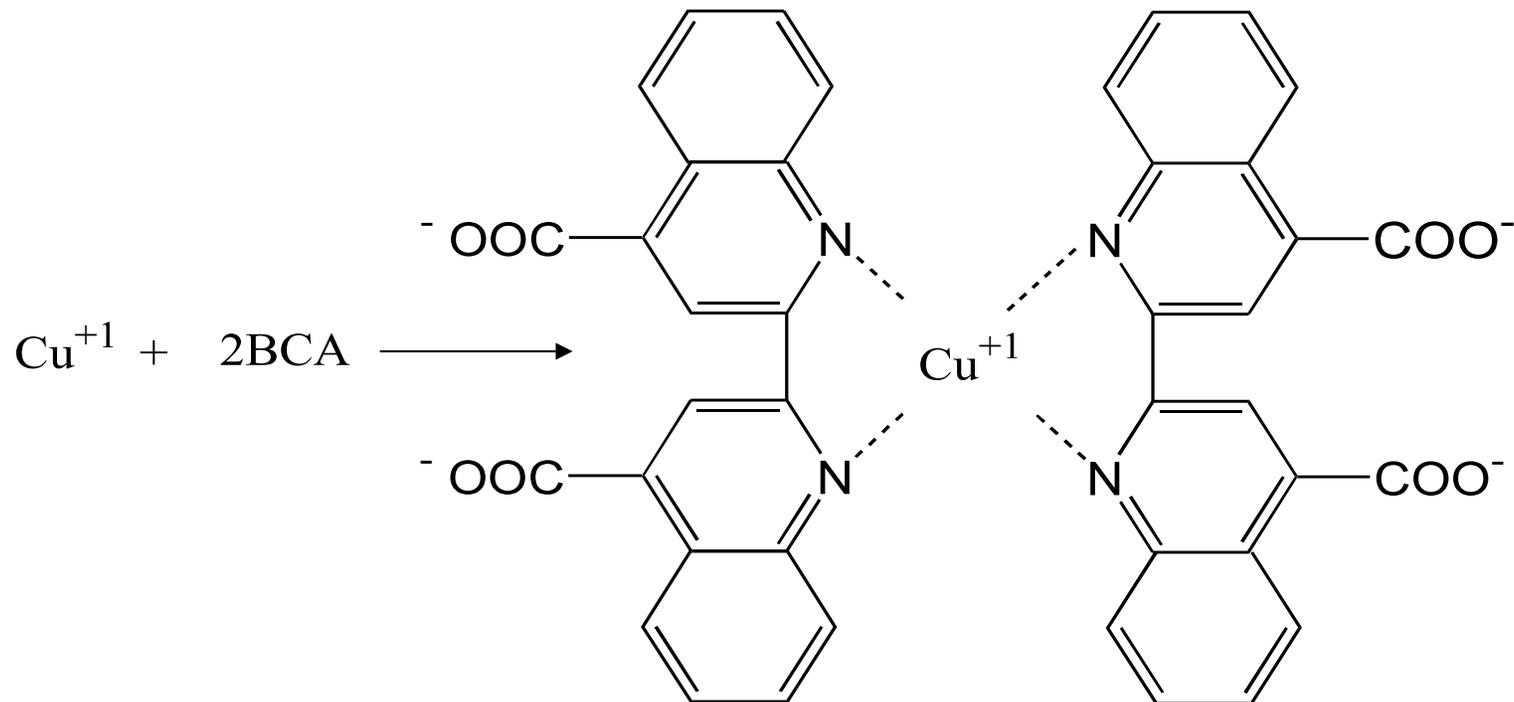
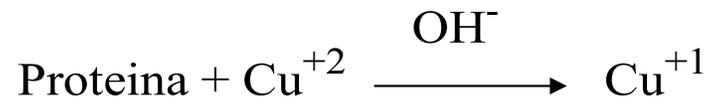
Si forma un prodotto colorato di indaco che deriva dalla chelazione di 2 molecole di BCA con uno ione  $\text{Cu}^{+}$ .

Il composto solubile assorbe a 562 nm e A cresce al crescere della [proteica] in modo lineare in un range proteico di 20-2000  $\mu\text{g/ml}$ .

Si può incubare @37° C per 2 ore o 60° C per 1 ora



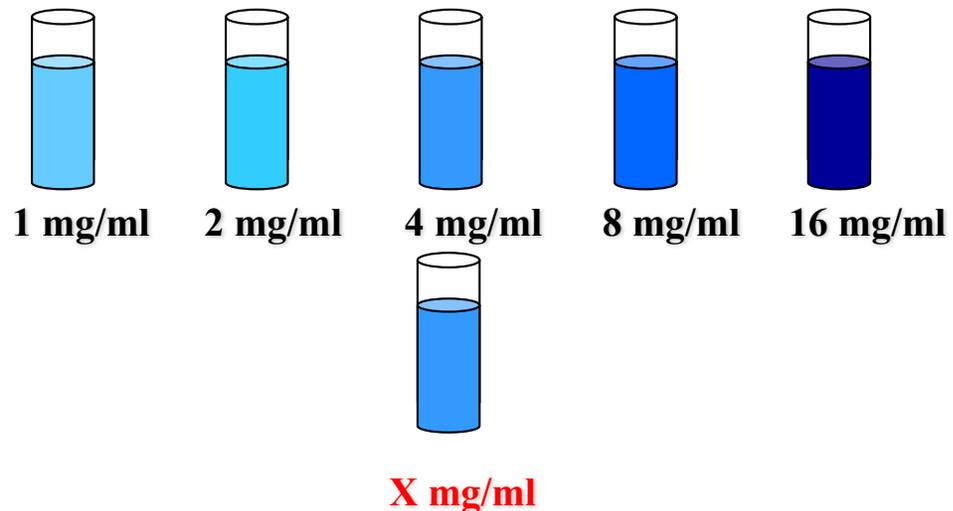
# REAZIONE BCA

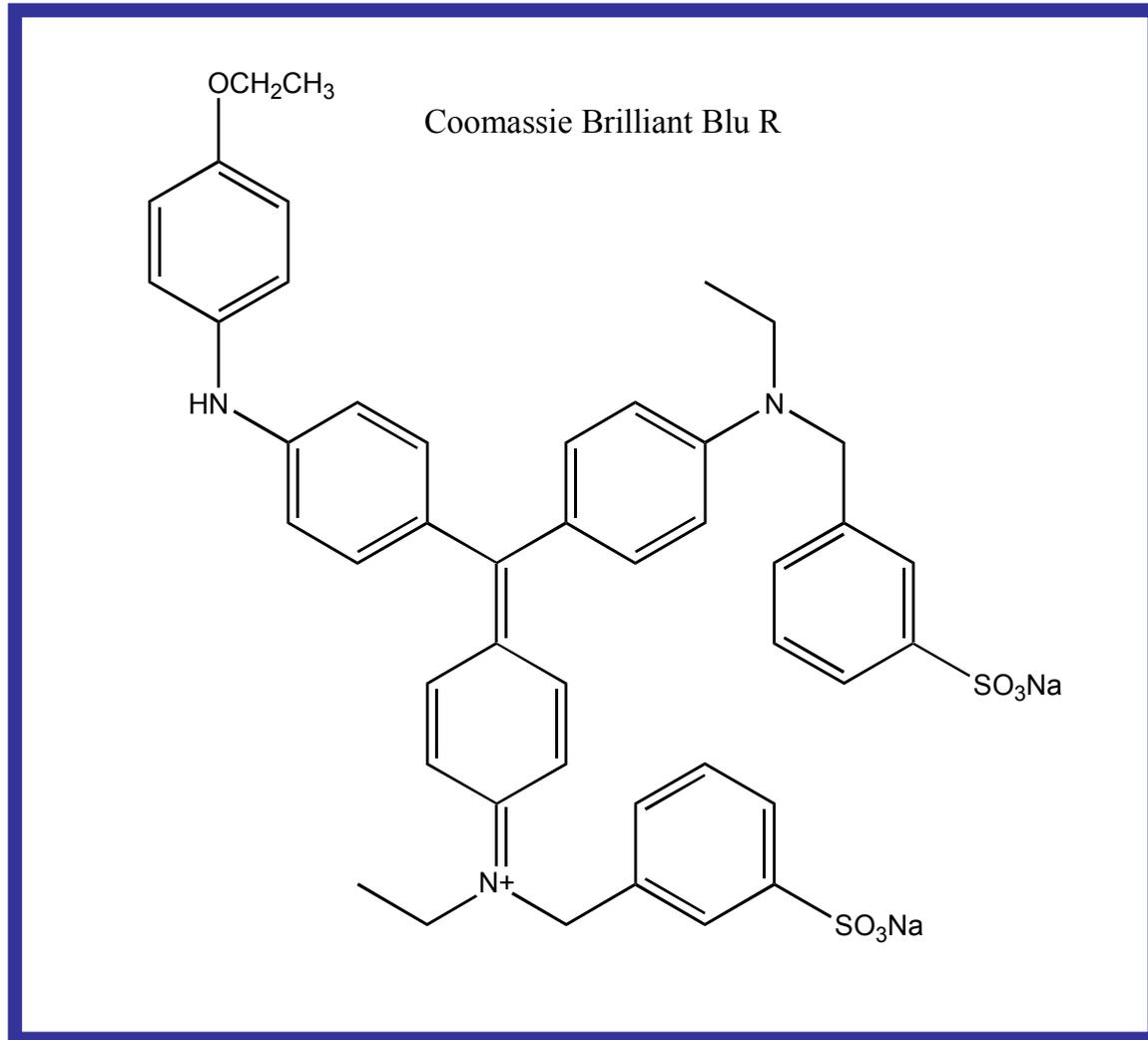


# Metodi Colorimetrici

## Metodo di Bradford (BioRad Protein Assay)

- Il legame del colorante *Coomassie Brilliant Blue G-250* alle proteine determina uno spostamento del massimo di assorbimento del colorante da 465 nm (rosso) a 595 nm (blu) in soluzioni acide (Bradford, 1976)
- Tale colorante forma forti complessi non covalenti con le proteine tramite interazioni elettrostatiche con gruppi aminici e carbossilici e tramite forze di van der Waals
- Il colorante è preparato come soluzione *stock* in acido fosforico
- Il metodo è un semplice procedimento costituito da un unico passaggio in cui il colorante è aggiunto ai campioni e si determina l'assorbanza a 595 nm



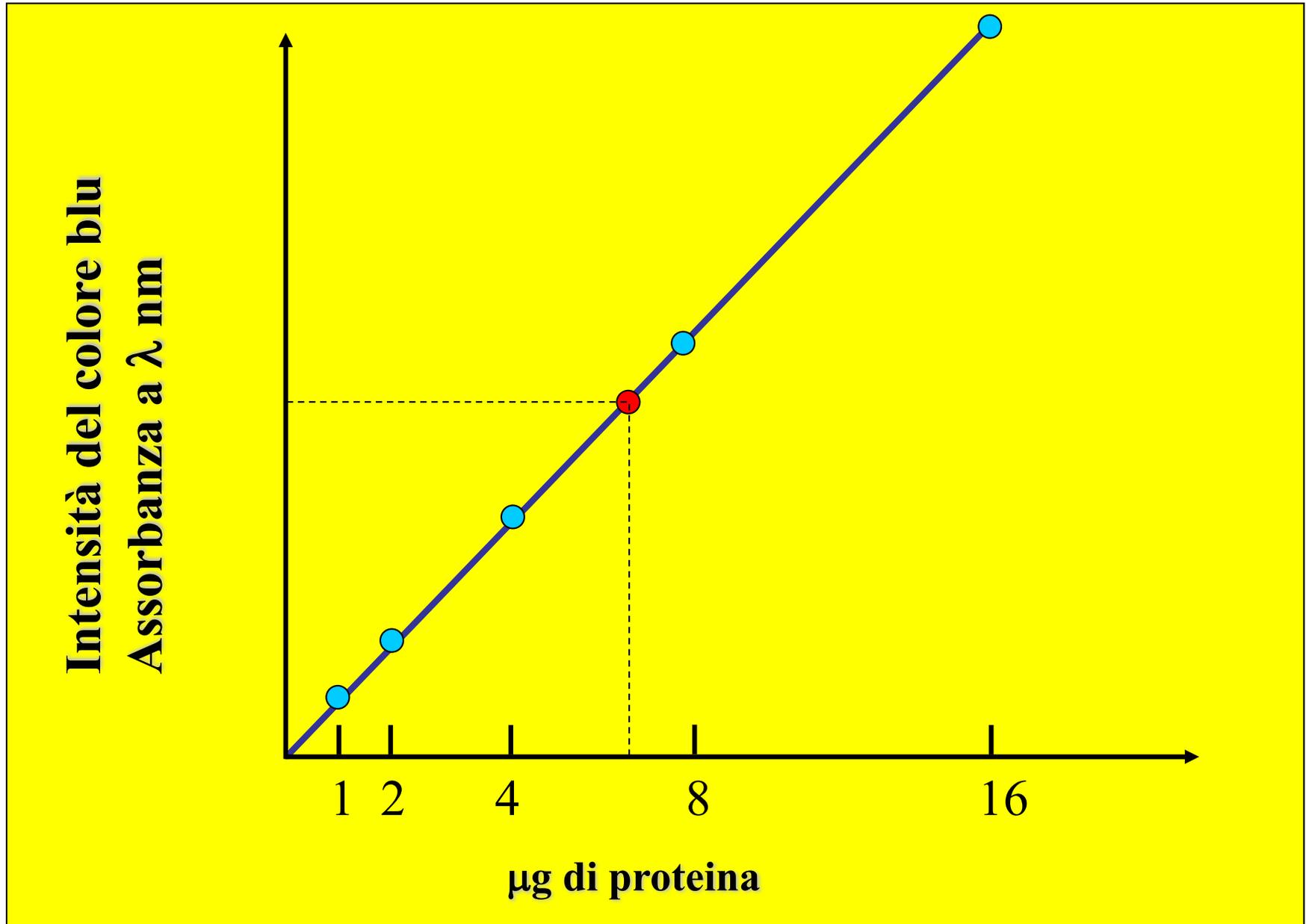


La quantità di colorante che si lega è proporzionale alla quantità di proteina presente in soluzione.

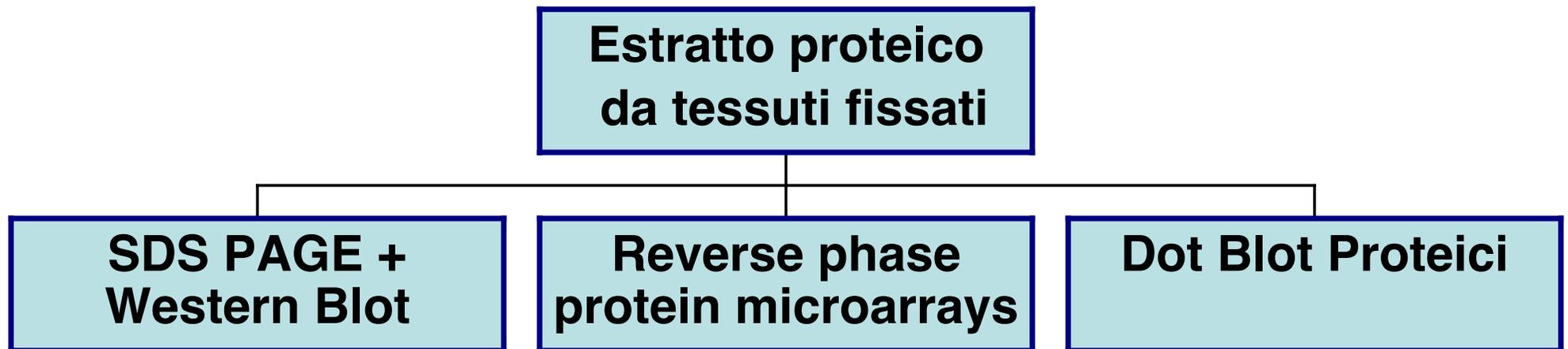
L'intensità del colore blu (e dunque l'assorbimento) è proporzionale alla concentrazione proteica.

In genere quantità uguali di proteine differenti legano la stessa quantità di colorante → **il saggio è indipendente dal tipo di proteina**

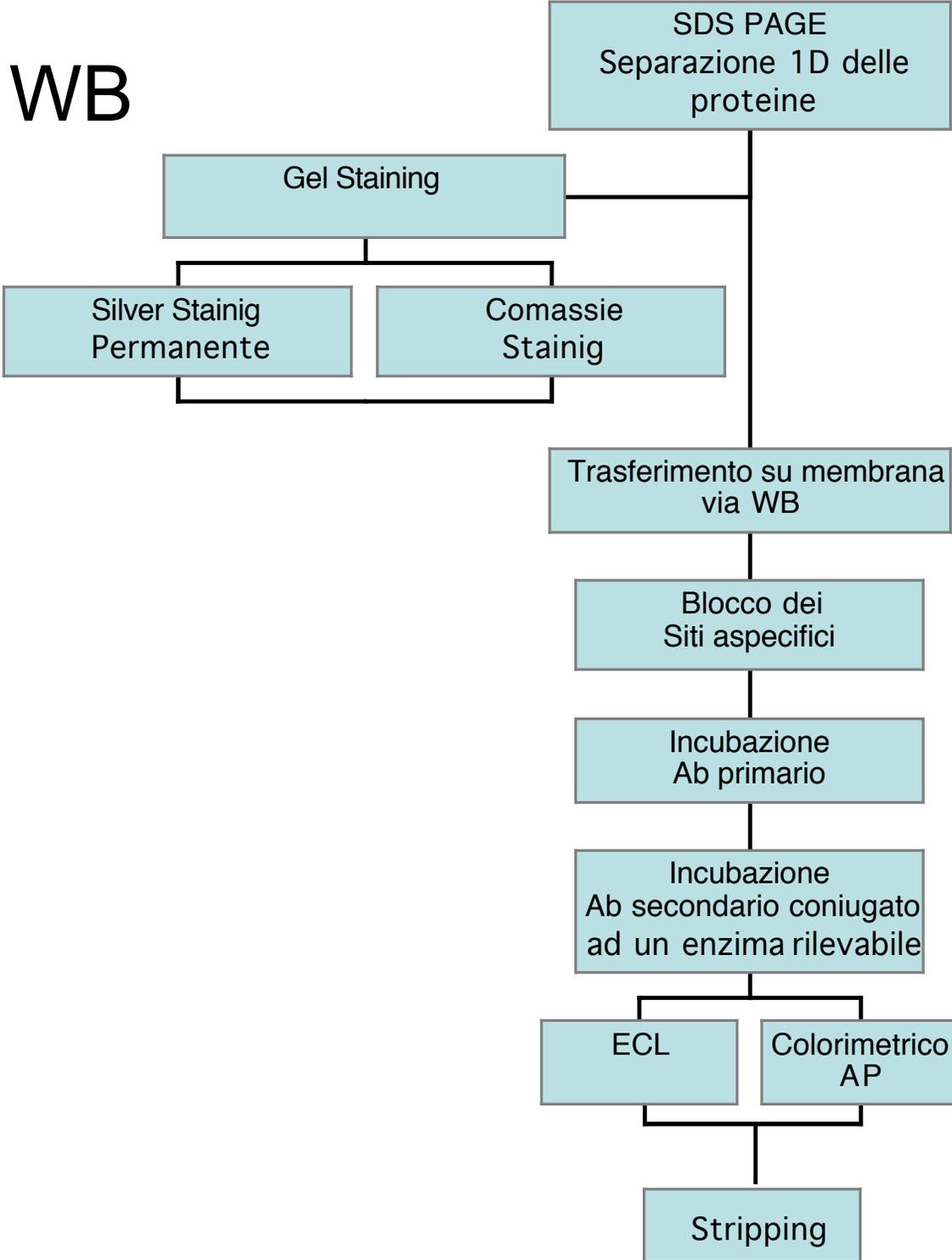
## Retta di taratura per la determinazione della [proteica] con metodi colorimetrici



# Saggi immunologici su estratti proteici da tessuti di archivio



# SDS PAGE+ WB





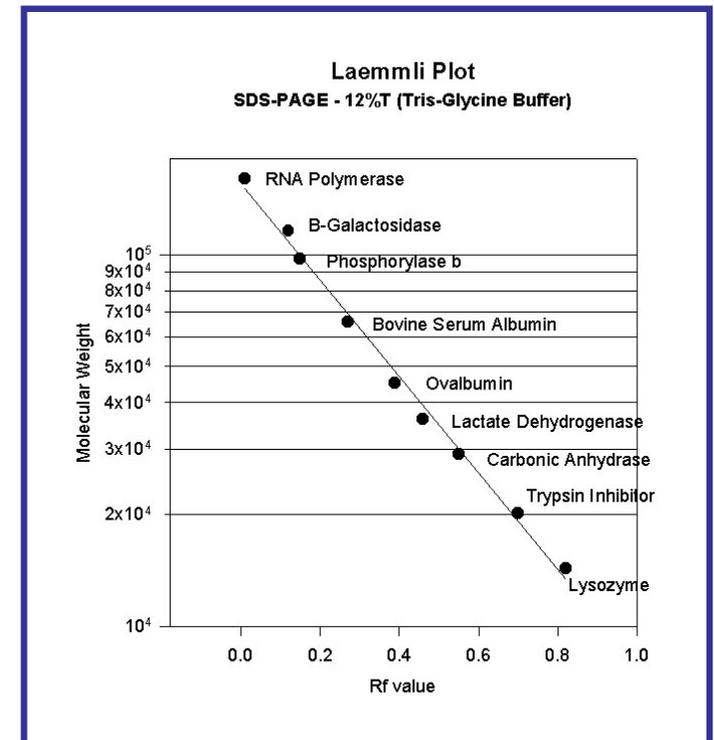
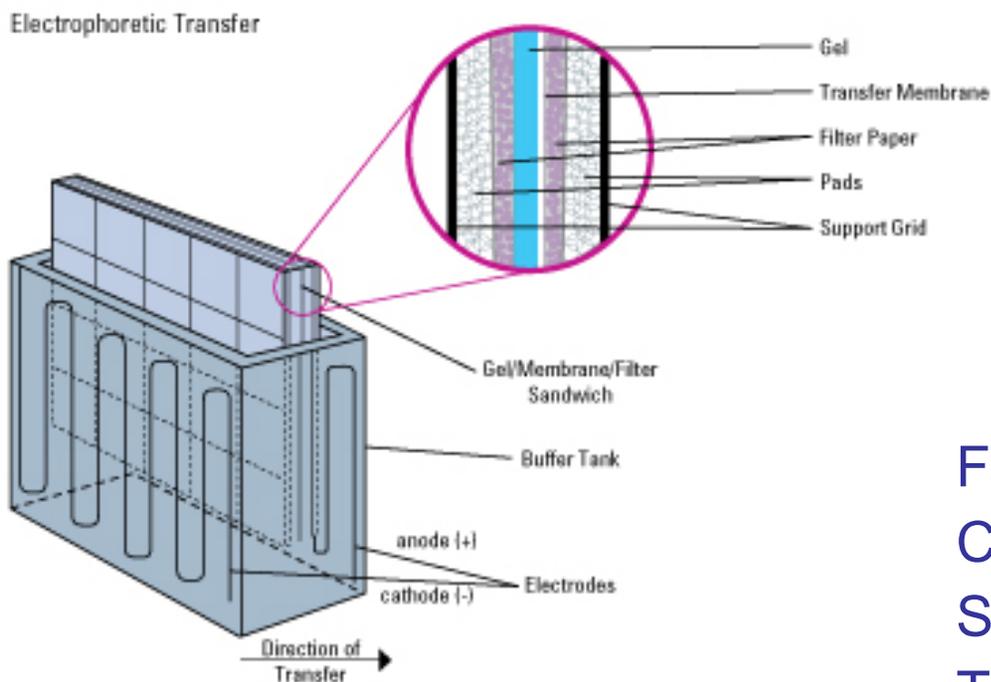
# Snap id

Western blot optimization of anti-Tau-1 antibody in Alzheimer's disease brain and healthy brain samples

	SNAP i.d.® 2.0 MultiBlot	SNAP i.d.® 2.0 Mini Blot	SNAP i.d.® 2.0 Midi Blot	Standard Western blot detection
<b>MW</b>				
<b>Blocking</b>	0.5% NFDm for 20 sec	0.5% NFDm for 20 sec	0.5% NFDm for 20 sec	0.5% NFDm for 1 hr
<b>Primary Antibody</b>	Anti-Tau1 1: 1,000 for 10 min	Anti-Tau1 1: 1,000 for 10 min	Anti-Tau1 1: 1,000 for 10 min	Anti-Tau1 1: 5,000 for 1 hr
<b>Secondary Antibody</b>	Goat anti-Mouse 1: 10,000 for 10 min	Goat anti-Mouse 1: 10,000 for 10 min	Goat anti-Mouse 1: 10,000 for 10 min	Goat anti-Mouse 1: 50,000 for 1 hr
<b>Total Time</b>	< 30 min	< 30 min	< 30 min	3 hr 30 min

# SDS-PAGE + WB

- SDS, detergente anionico, denatura le proteine e le rende tutte cariche negativamente  $\Rightarrow$  elimina la carica ionica degli aa.
- Le proteine vengono separate in base al loro peso molecolare.
- Esiste una relazione lineare fra  $\log MW$  delle proteine e il loro  $R_f$ =distanza dal top del gel al polipeptide/distanza dal top del gel al fronte del colorante.



Fasi: running e stacking gel.  
Corsa Elettroforetica  
Sandwich  
Trasferimento

### Stacking gel:

Tris-HCl 1M pH6.8	520µl
Acril-Bis (30:0.8)	640 µl
SDS 10%	40 µl
H <sub>2</sub> O	2.96 ml
Temed 6 µl, APS 80 µl	

### Running Gel:

H <sub>2</sub> O	3 ml
Tris-HCl 1.5 M pH8.8	4.5 ml
Acril-Bis (30:0.8)	8 ml
SDS 10%	150 µl
Temed 6 µl, APS 150 µl	

**Running Buffer 10x:** Tris 0.25 M (30.3 g Tris), Glicina 1.9 M (144.2 g) SDS 1% (10 g). Per 1 l.

**Sample buffer:** 2 ml glicerolo, 4 ml SDS 10%, 0.5 ml Tris 1M pH 6.8, H<sub>2</sub>O 3 ml, 50 µl di 2-mercapto etanolo per ogni ml di soluzione. Toccare con un puntale sporco di BPB.

Elettroforesi:

Proteine + sample buffer @95° C 5-10 min  
120 V fino all'uscita dallo stacking, poi 180V.

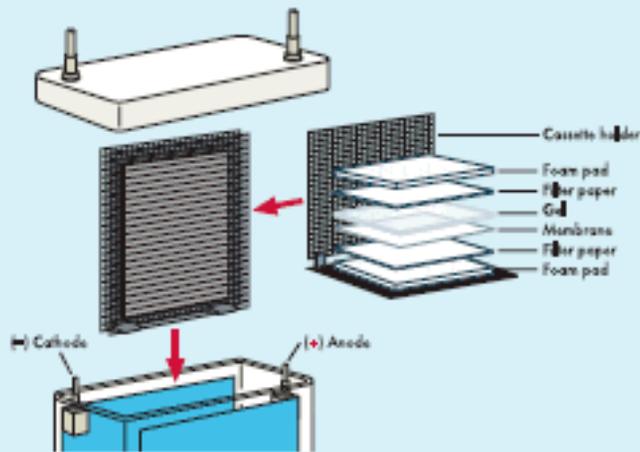
% PAA	Range di proteine (kDa)
8	40-200
10	21-100
12	10-40

# Transfer di proteine

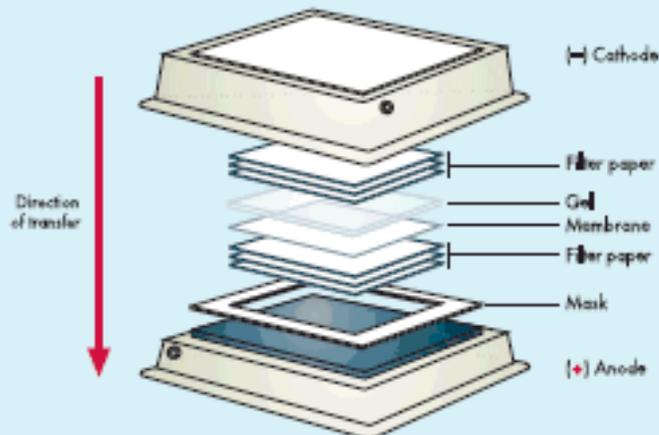
**Semy Dry blotting  
Orizzontale**

**Wet Blotting  
Verticale**

Tank (Wet) Transfer System



Semi-dry Transfer System



*Tris -Glicina 10x: 30 g Tris, 144 g glicina -1l*

*Transfer Buffer: Tris -Glicina 1x finale-MeOH (20% v/v finale)*

### Wet:

- Gel in transfer buffer 15 min
- Equilibratura della membrana (PVDF prima MeOH poi transfer)
- Sandwich-No bolle aria
- Transfer sotto agitazione on @ 30 V (per piccoli 18 V) oppure 3-4 h @45 V(25mA)
- Rt con buffer freddo oppure camera fredda

### Semidry

- Gel in transfer buffer 15-20 min
- Lavare il piatto dell' anodo con ddH<sub>2</sub>O
- Equilibratura della membrana (PVDF prima MeOH poi transfer)
- Sandwich-No bolle aria con 3MM bagnata in transfer buffer
- Piatto catodico pulito in ddH<sub>2</sub>O
- 0.5 kg sopra
- Transfer 15V 15 min minigel; 25 V 30 min grandi

# Colorazione delle Membrane con Rosso Ponceau

Soluzione acquosa: 0.2% di colorante in 3% di TCA  
Stain per 3-5' R.T

Lavare con acqua finchè compaiono le bande, segnare i markers ed eventualmente fotografare.

Proseguire con le usuali incubazioni dell'immuno blotting.

Il rosso non interferisce con la visualizzazione ECL, ma va comunque via con il PBS o altra soluzione salina.

## Membrane Stripping

Stripping Buffer : 2% SDS, 100 mM beta-mercaptoethanol, 50 mM Tris, pH 6.8

### Procedure:

1. Heat stripping buffer to 50° C in water bath
2. Incubate blot with stripping buffer at 50C for 15 to 30 minutes with shaking
3. Rinse blot multiple times in TBS
4. Block and blot as normal

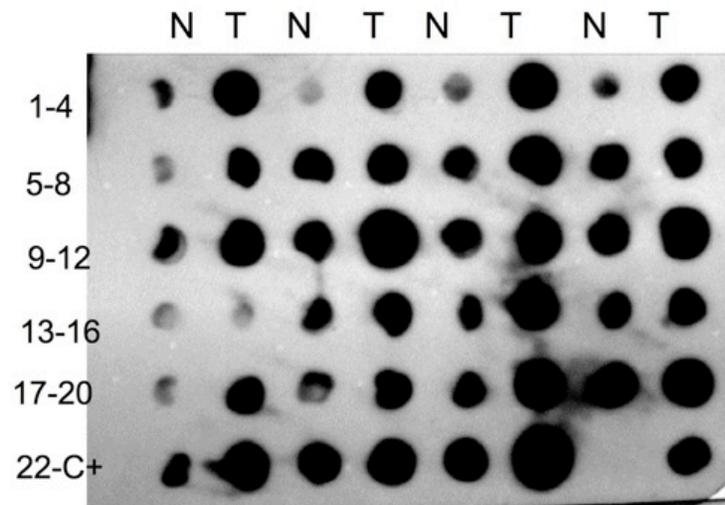
# RILEVAZIONE COLORIMETRICA

- ✓ Il metodo di rivelazione del Western blot è basato sul **legame dell'Ab primario ad un Ab secondario coniugato con la fosfatasi alcalina o perossidasi**.
- ✓ Nel caso dell'AP il substrato per la colorazione è costituito da 5-Br-4-Cl-indolil-fosfato (BCIP) in combinazione con il nitro-blu di tetrazolio (NBT).
- ✓ L'enzima converte il BCIP al composto idrossilico (enolo) che precipita e tautomerizza a chetone
- ✓ Il chetone ossida e dimerizza per formare **l'indigo, color blu**. Gli ioni idruro rilasciati dalla reazione di dimerizzazione vengono presi dall'NBT. La **riduzione causa** la formazione di un composto **porpora** che si deposita con l'indigo sul sito di attività enzimatica.
- ✓ Con AP lo sviluppo del colore può continuare per ore o ON, mentre la HRP viene inattivata dal substrato, per cui il tempo effettivo di reazione risulta essere di circa 30'.

# DOT BLOT PROTEICO

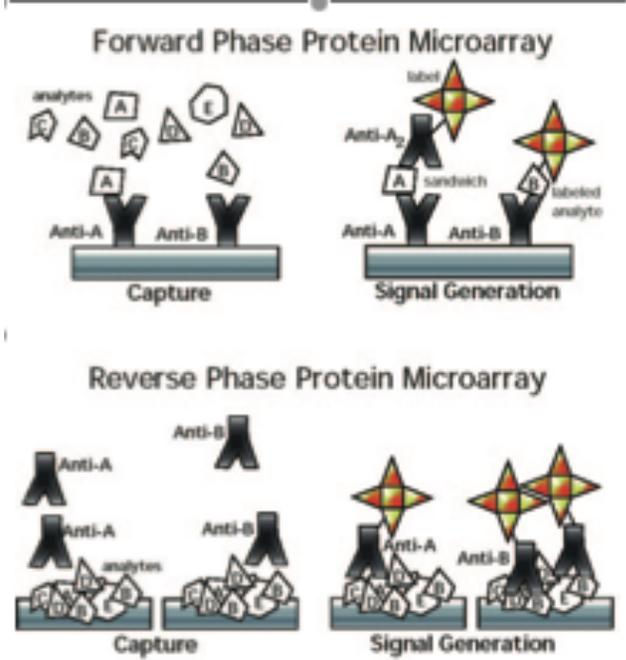
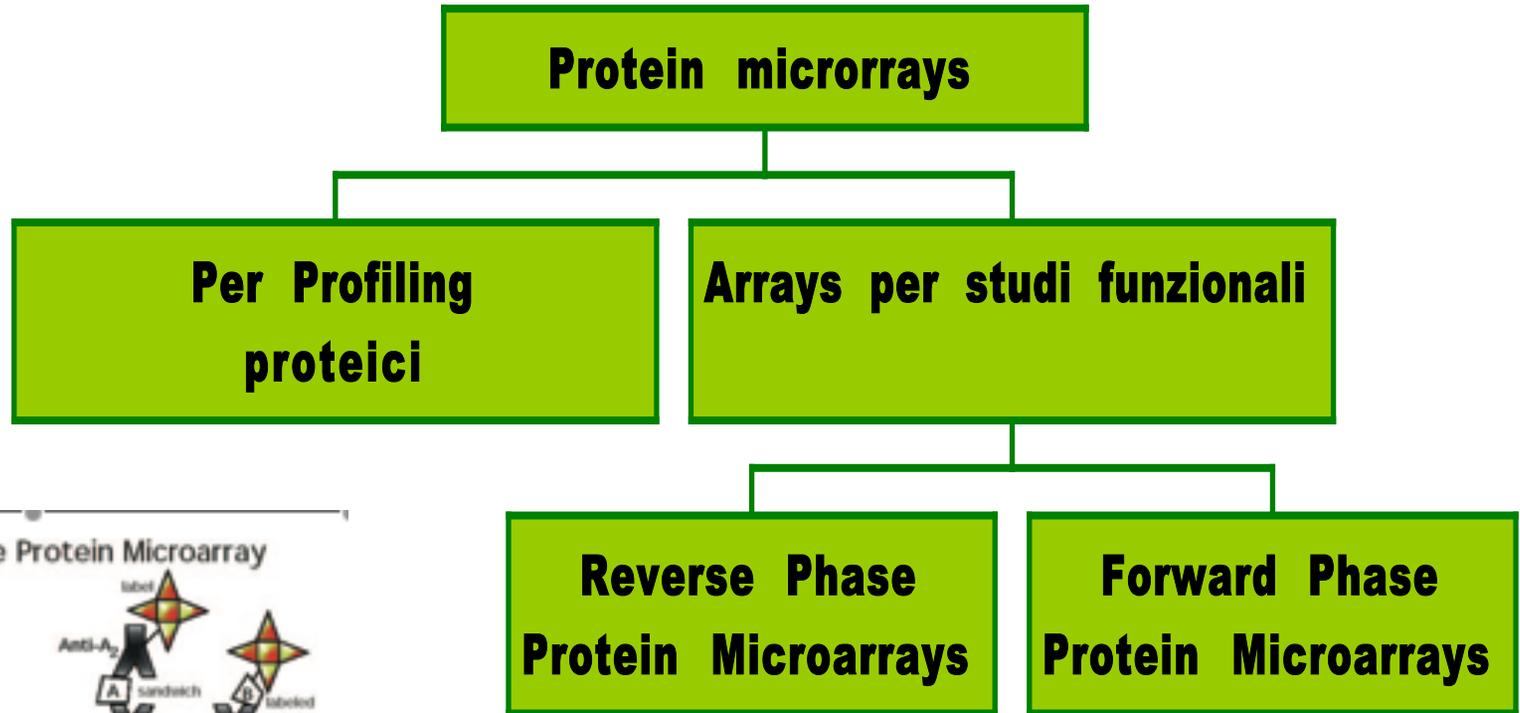
1. Attivare la membrana se PVDF
2. Equilibrare la membrana in PBS
3. Montaggio dell' apparato
4. Spottare la quantità desiderata di proteine nel buffer estrattivo originale.
5. Proseguire con il blocco come da WB

Cdk2 1:2500



2 $\mu$ g di estratto proteico per ogni campione; 5' di esposizione

# Protein microarrays



# Protein microarrays

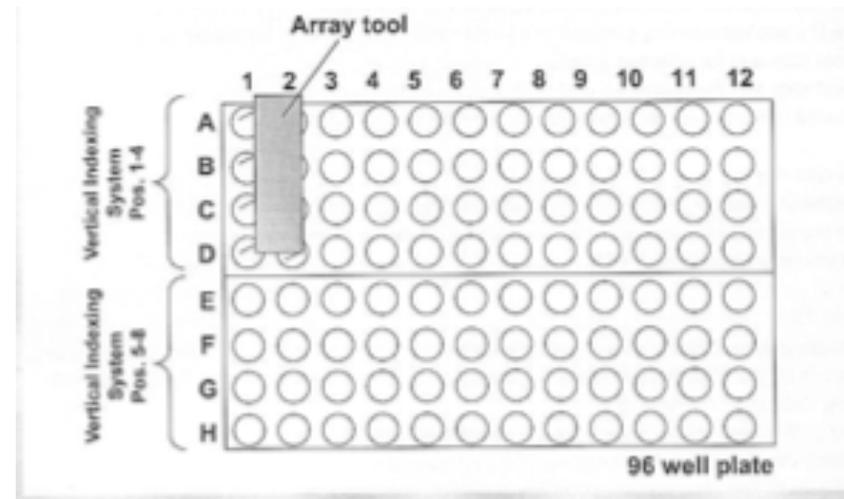
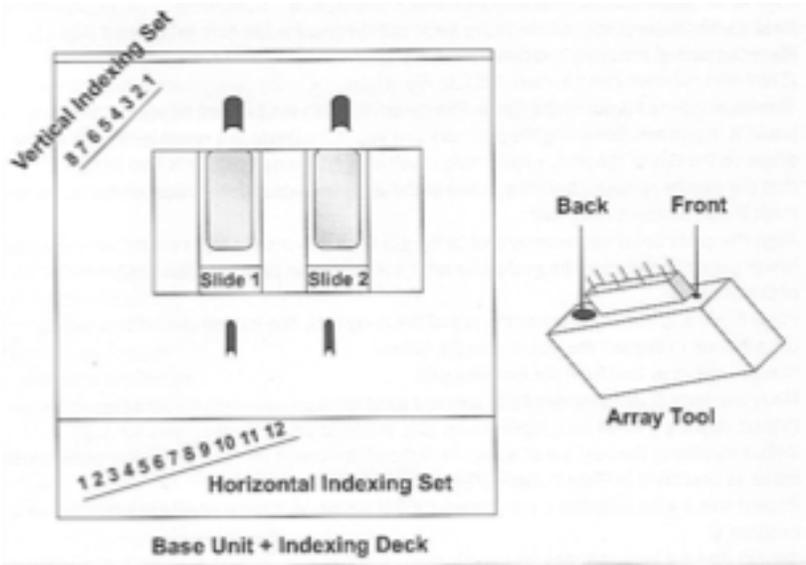
## Forward protein microarrays

- *L' array immobilizza una serie di Ab o proteine per catturare i diversi analiti.*
- *Ciascun array, con sistemi multipli di rilevazione, viene incubato con un solo campione (lisato o siero di pazienti).*
- *Più analiti dello stesso campione vengono analizzati contemporaneamente.*

## Reverse phase protein microarrays

- *Micro dot-blot che consentono la simultanea analisi di numerosi campioni.*
- *Un singolo array può alloggiare centinaia di campione.*
- *Limitati alla disponibilità di Ab per la rilevazione delle proteine.*
- *Non rilevano la specificità Ab  $\Rightarrow$  crossreattività.*

# MicroCaster System

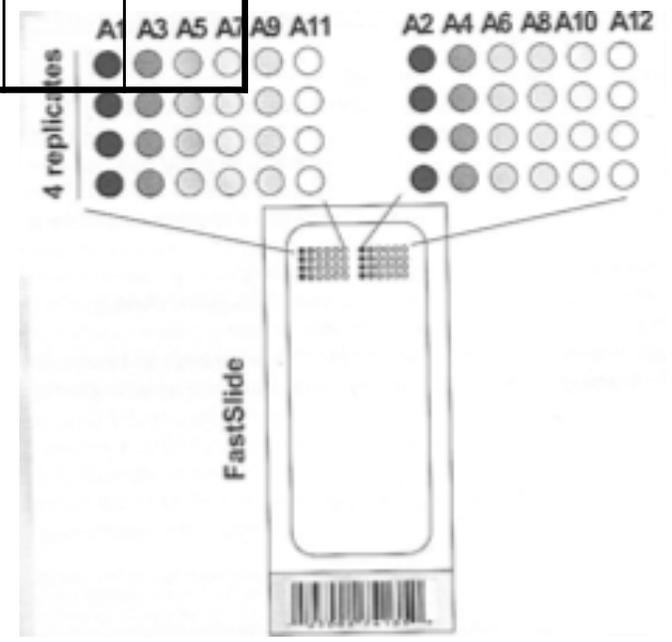


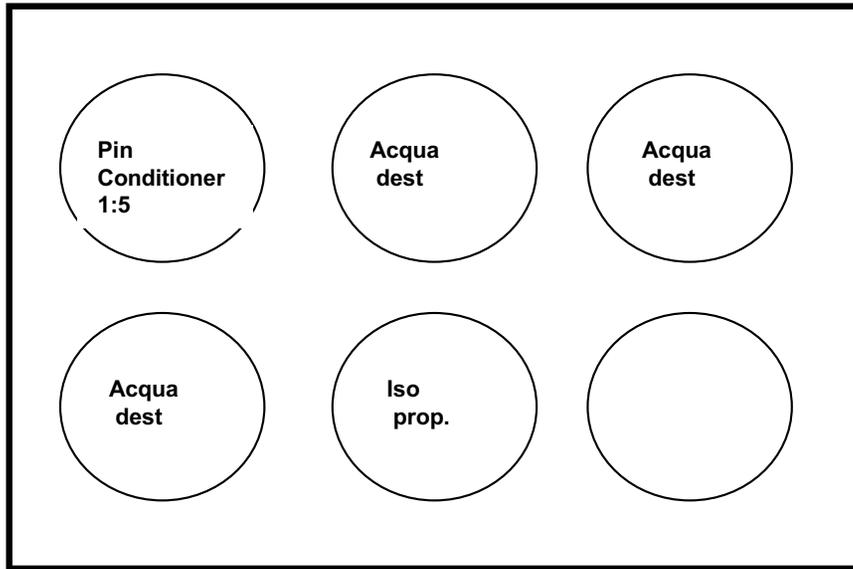
*Orientamento delle slides e pins*

*Piastra con campioni e loro prelevamento*

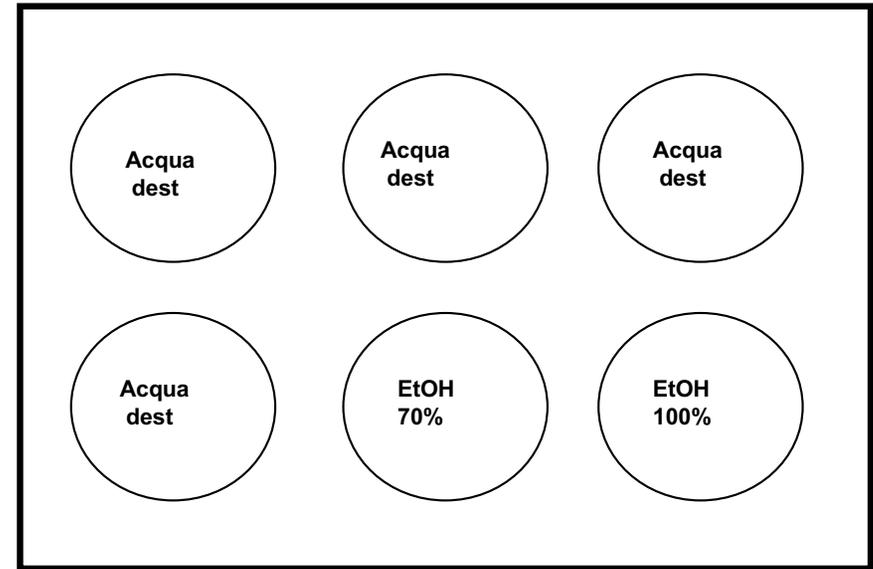
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>	<b>S1</b> undil	<b>S2</b> undil	<b>S1</b> 1:2	<b>S2</b> 1:2	<b>S1</b> 1:4	<b>S2</b> 1:4	<b>S1</b> 1:8	<b>S2</b> 1:8	<b>S1</b> 1:16	<b>S2</b> 1:16	Buff.C trl.	Buff.C trl.
<b>B</b>	<b>S5</b> undil	<b>S6</b> undil	Ect.									
<b>C</b>												
<b>D</b>												
<b>E</b>	<b>S3</b> undil	<b>S4</b> undil	<b>S3</b> 1:2	<b>S4</b> 1:2	<b>S3</b> 1:4	<b>S4</b> 1:4	<b>S3</b> 1:8	<b>S4</b> 1:8	<b>S3</b> 1:16	<b>S4</b> 1:16	Buff.C trl.	Buff.C trl.
<b>F</b>	<b>S7</b> undil	<b>S8</b> undil	Ect.									
<b>G</b>												
<b>H</b>												

*Dal campione all'array*





**Plate A: per il coating**



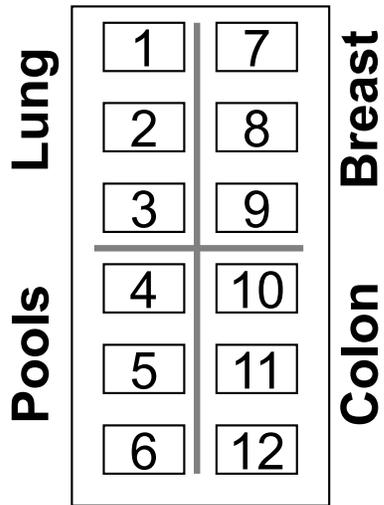
**Plate B: per lavaggi**

## **Fasi:**

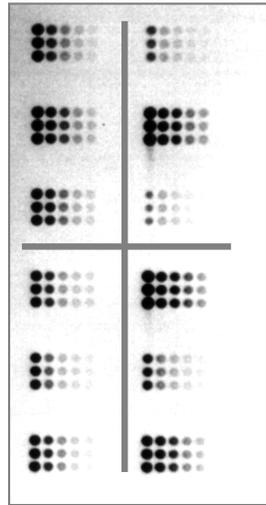
- 1. Preparare la piastra con le diluizioni, sigillarla, centrifugarla e conservarla in ghiaccio.**
- 2. Trattare i pins**
- 3. Allestire l'array**
- 4. Lavare fra uno spot e l'altro**

# Protein microarrays

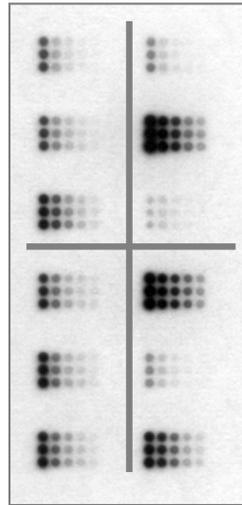
**FFPE**



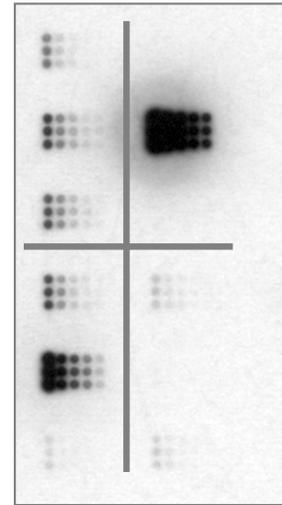
Outline



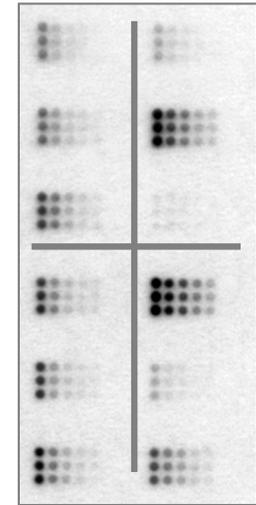
**Sypro**



**E-cad**



**EGFR**



**HER2**

**FineFix**

