

Lezione 4 Determinazione quantitativa di biomolecole



Corso di Laboratorio di Chimica e Biochimica

Anno accademico 2020-21

Marco Scocchi

Determinazione quantitativa della concentrazione delle proteine

Perché determinare la concentrazione delle proteine ?

Attività biologica, livelli di espressione, interazione tra due proteine

Quali metodi ?

La scelta dipende dalla natura della proteina, dai componenti presenti nel campione, dalla velocità, dall'accuratezza e la sensibilità del metodo richiesti.

Accuratezza: indica quanto un valore medio si scosta dal valore atteso

La sensibilità analitica è data dalla minima quantità di un analita rilevabile in un campione biologico.



Metodi per la determinazione quantitativa delle proteine

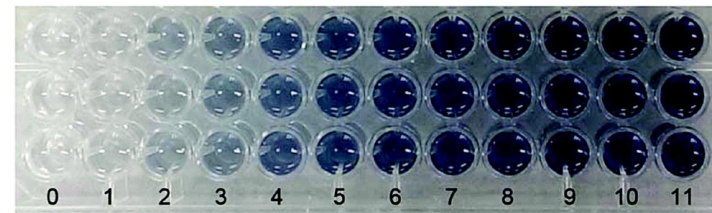
Metodo gravimetrico

Pesata del campione solido. Poco sensibile, necessario disporre di un campione allo stato solido e elevato grado di purezza.



Metodi diretti

Misura dell'assorbanza dei cromofori presenti nelle proteine.
Sensibilità variabile, Influenzati dalla composizione amminoacidica.



Metodi indiretti (reazioni cromogene)

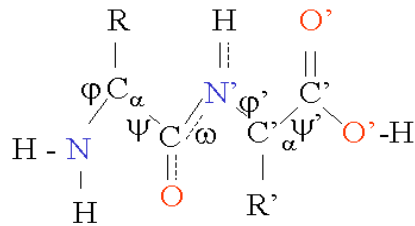
Legame delle proteine ad opportune sostanze cromogene rilevabili mediante spettrofotometria.

Misure relative a proteine di riferimento. Metodi sensibili, accuratezza variabile.

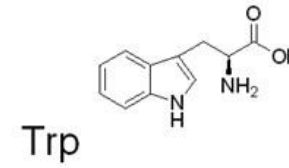
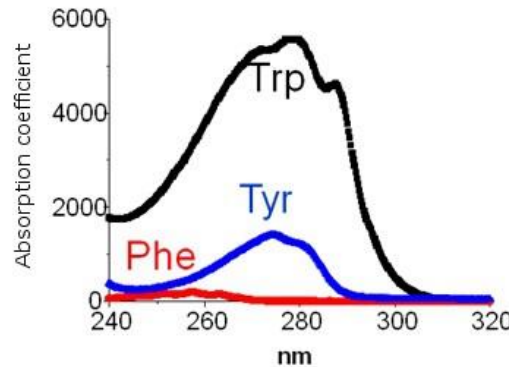


Metodo diretto: misura dell'assorbanza

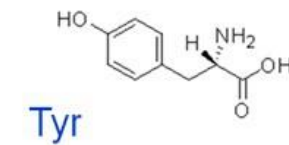
Sfrutta le proprietà dei gruppi chimici che assorbono la luce nella regione dell'UV



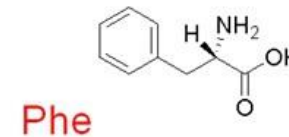
Il legame peptidico (210 nm)



$\lambda = 280 \text{ nm}$

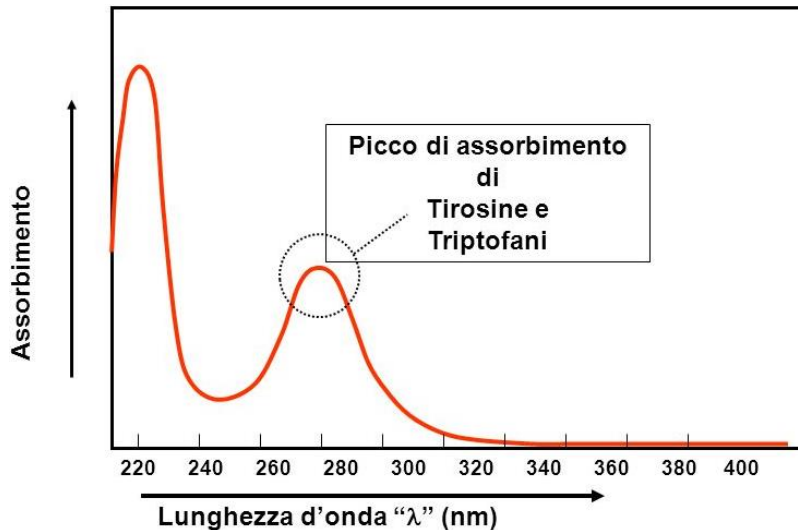


$\lambda = 276 \text{ nm}$



$\lambda = 256 \text{ nm}$
(debole)

Spettro di assorbimento UV-Vis di una proteina



Cys ($\lambda = 235 \text{ nm}$) (debole)

- ✓ Applicabile a proteine purificate: risente della presenza di contaminanti e tamponi che assorbono attorno a 200 nm, interferendo con l'assorbimento del legame peptidico.
- ✓ Metodo non distruttivo
- ✓ Dipende dalla composizione aa e dalla struttura della proteina

Influenza della composizione sullo spettro ultravioletto delle proteine

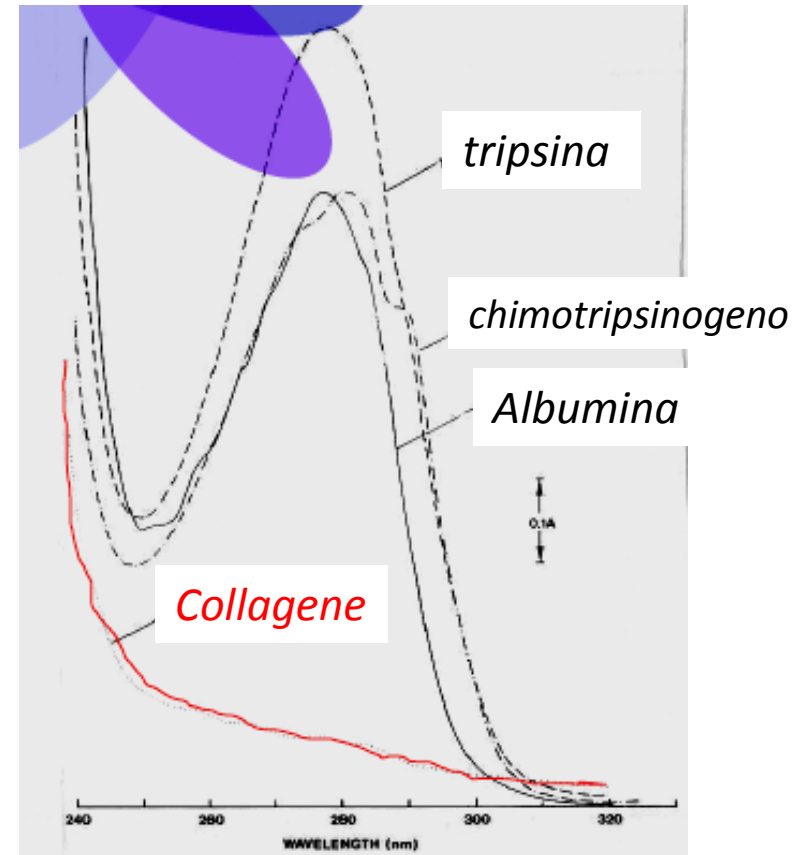
Spettro di assorbimento di quattro proteine diverse:

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

A parità di concentrazione (1 mg/ml) lo spettro e il valore A_{280} cambiano a seconda della composizione aa

Utilizzando il medesimo valore di ϵ_{280nm} da misure di A_{280} si ottengono i seguenti valori di concentrazione $c = A / \epsilon l$

<i>Albumina</i>	<i>0.7 mg/ml (-30%)</i>
<i>tripsina</i>	<i>1.6 mg/ml (+ 60%)</i>
<i>chimotripsinogeno</i>	<i>1.0 mg/ml</i>
<i>Collagene</i>	<i>0.1 mg/ml (-90%)</i>



Coefficiente di estinzione calcolato

Il coefficiente di estinzione molare può essere calcolato per ogni proteina tenendo conto della sua composizione (nel numero e tipo di aa aromatici):

$$\epsilon_{280} \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)} = 5500 \text{ (n. di Trp)} + 1490 \text{ (n. di Tyr)} + 125 \text{ (n. di Cys)}$$

Non è applicabile a miscele di proteine ed a proteine ad identità non nota.

Esempio:



AHPLENAWTFWFDNPQGKSRQVAWGSTIHPIHTFSTVEDFWGLYNNIHNPSKLNVGADFHCFKNKIEPK
WEDPISANGGKWTISCGRGKSDTFWLHTLLAMIGEQDFGDEICGAVVSVRQKQERVAIWTKNAANEA
QISIGKQWKEFLDYKDSIGFIVHEDAKRSDKGPKNRYTV

Calcolo : Numero di a.a. = 177
Massa molare= 20197.6 g/mole

n. W= 9, Y= 3, C=3

$$\epsilon_{280} \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)} = (5500 \times 9) + (1490 \times 3) + (125 \times 3)$$

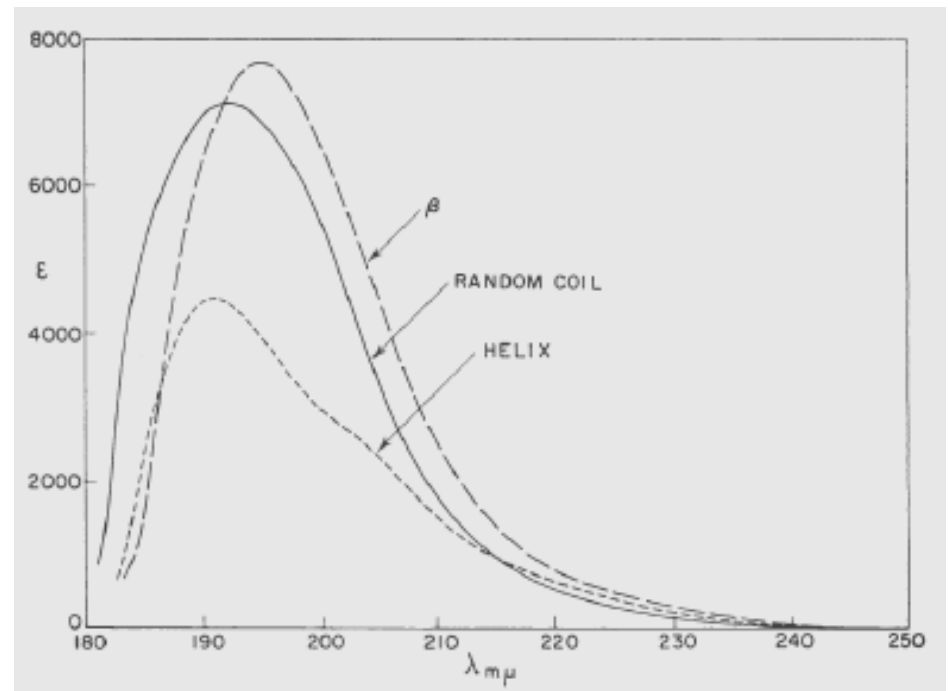
$$\epsilon_{280} = 54345 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Influenza della struttura sullo spettro ultravioletto delle proteine

L'assorbimento del gruppo peptidico (190-210 nm) è influenzato dalla struttura secondaria delle proteine

Lo spettro della poli-L-lisina può modificarsi per:

- **effetto di un aumento di pH** che induce la formazione dell' α -elica da una struttura disordinata (random coil)
- **effetto di un aumento di temperatura** che converte il polipeptide in β -foglietto.



Metodi indiretti di determinazione della concentrazione

Sfruttano peculiari cromofori che si legano in rapporto stechiometrico alle proteine modificando le proprie proprietà spettroscopiche



Caratteristiche:

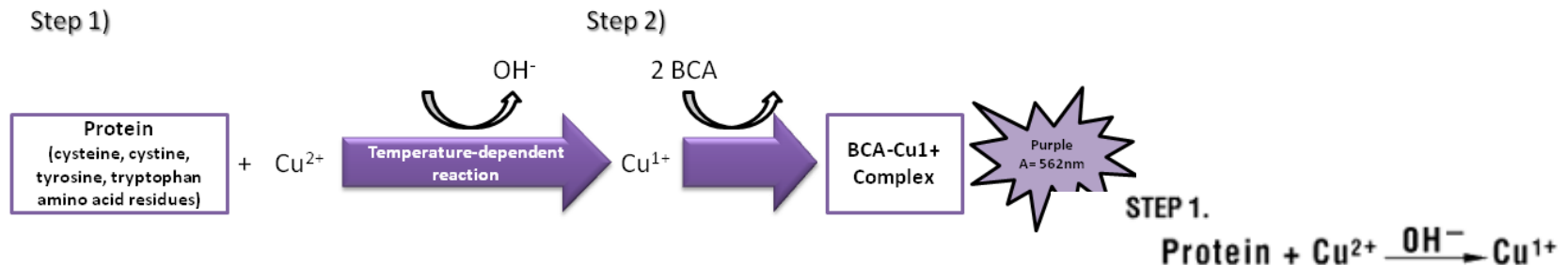
- 1) Hanno proprietà spettroscopiche diverse quando si legano alle proteine (Proteina-**C**)
- 2) **C** deve essere in largo eccesso rispetto alla proteina per poterla complessare completamente.
- 3) Il cromoforo non deve essere selettivo per il tipo di proteina. La conformazione della proteina non dovrebbe influire sul risultato .
- 4) Richiede una retta di calibrazione (misura relativa).



Metodo dell'acido bicinconinico (BCA)

Basato sulla reazione conversione di Cu^{2+} in Cu^{1+} in condizioni alcaline in proporzione alla Q di proteine (step 1);

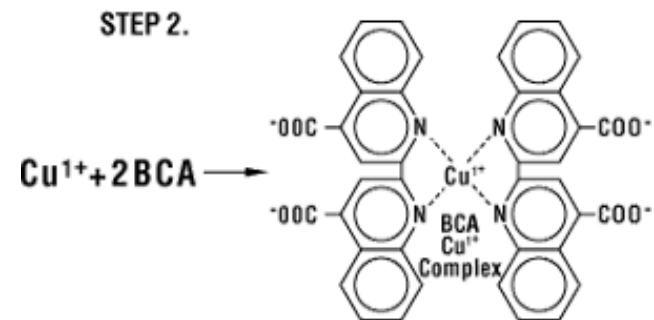
Cu^{1+} prodotto viene rilevato mediante reazione con **acido bicinconinico** (BCA) per ottenere un composto di color porpora (**max 562 nm**) (step 2).



Responsabili della formazione del colore sono i legami peptidici. Cys, Trp, Tyr, His, Asn contribuiscono alla riduzione del Cu^{2+} incrementando la produzione di colore.

Poco influenzato alla presenza di detergenti, tamponi ed altre sostanze.

Ampio range di rilevamento, lineare, relativamente influenzato dalla composizione aa.



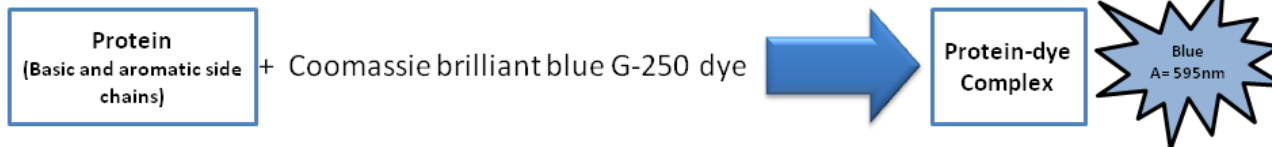
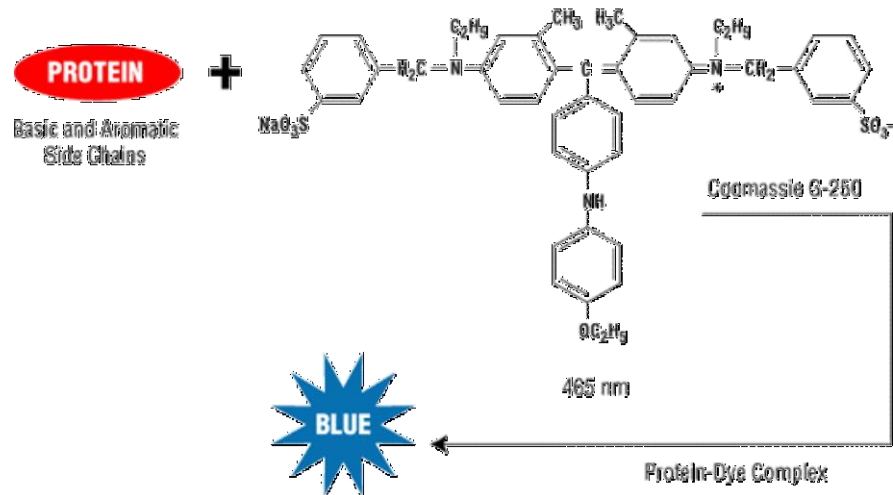
Intervallo di utilizzo: 0,5-2000 $\mu\text{g/ml}$

Metodo di Bradford

Il metodo di Bradford si basa sul legame alle proteine del colorante **Coomassie Brilliant Blue G-250**.

In condizioni acide il BB G-250 è protonato, ha un aspetto rossastro ($A_{\max} = 465 \text{ nm}$) ma quando si lega alle proteine è convertito in una forma deprotonata blu ($A_{\max} = 595 \text{ nm}$).

Si lega a residui basici (soprattutto Arg) e aromatici.



Metodo molto rapido (10 min). Dipendente dalla composizione aa

Intervallo di utilizzo: 1-2000 $\mu\text{g/ml}$

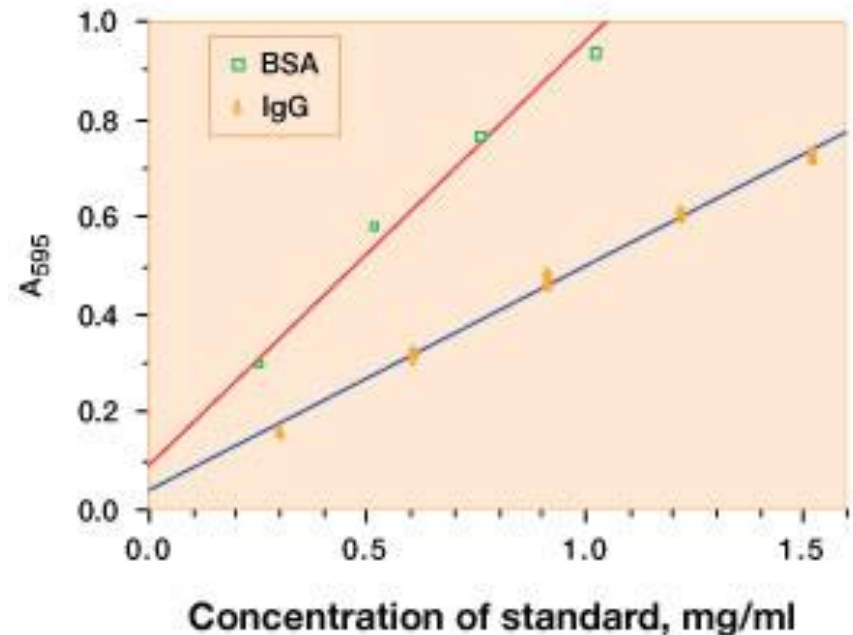
Le proteine di riferimento

I metodi indiretti utilizzano delle **proteine di riferimento** a concentrazione nota per poter convertire una certa A ad una concentrazione proteica.

Questa si ottiene dall'interpolazione della retta di calibrazione.

La **proteina ideale** da usare come proteina di riferimento è la forma assolutamente pura della proteina da dosare.

Ma comunemente si usano **proteine di riferimento standard**. Le proteine più usate per questa funzione sono la **BSA (siero albumina bovina)** e le **gamma-globuline (IgG)**. Non danno rette sovrapponibili.



Typical standard curve for the Bio-Rad protein assay standard assay procedure bovine serum albumin and bovine γ -globulin standards

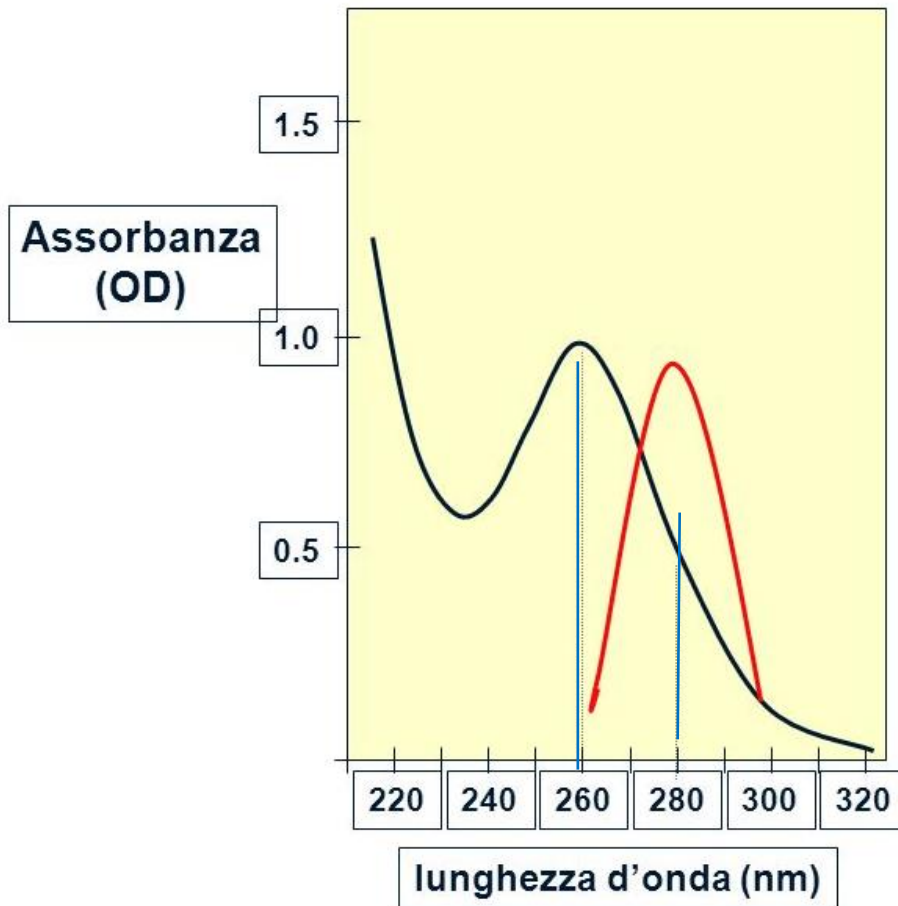
Conclusioni

- ✓ Metodi diretti o indiretti sono tutti basati sulle proprietà spettroscopiche.
- ✓ Strategie diverse a seconda se campioni puri o miscele
- ✓ Nessun metodo soddisfa pienamente la necessità di determinare con precisione la concentrazione proteica
- ✓ Utile utilizzare più metodiche



Spettro di assorbimento del DNA

Assorbimento nel vicino UV degli acidi nucleici è determinato quasi esclusivamente dalle basi pirimidiniche e puriniche



Lettura spettrofotometrica a $\lambda = 260$ nm

$$A_{260 \text{ nm}} = 1,0 = 50 \mu\text{g/ml DNA} \\ (l=1 \text{ cm})$$

Il rapporto di A_{260}/A_{280} fornisce un'indicazione del *grado di purezza* dell'acido nucleico rispetto a contaminazioni proteiche presenti

$$A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}} \text{ tra } 1,8 - 2,0$$

Indica una soluzione pura di DNA

In rosso: spettro di assorbimento delle proteine

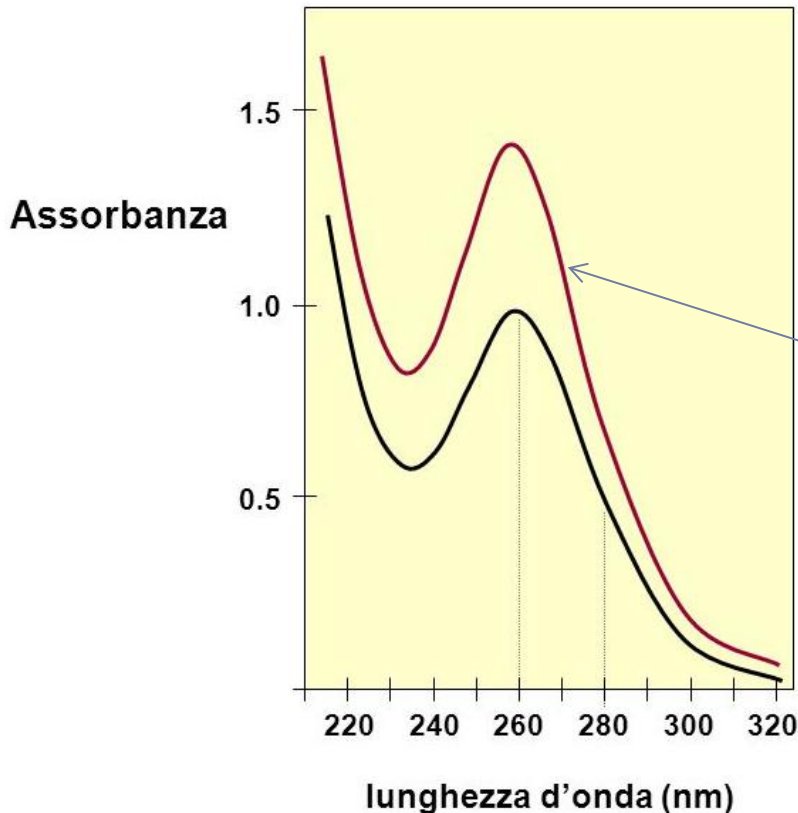
Effetto ipercromico degli acidi nucleici

Le singole basi assorbono di più quando non sono impilate, e i singoli filamenti assorbono di più dei filamenti doppi.

Spettro di assorbimento del DNA

$$A_{260 \text{ nm}} = 1,0 = 50 \mu\text{g/ml DNA}$$

$$A_{260 \text{ nm}} = 1,0 = 40 \mu\text{g/ml RNA}$$



**effetto
ipercromico**

Singolo filamento

L'assorbanza a 260 nm di una soluzione di DNA aumenta quando la doppia elica è separata nei singoli filamenti

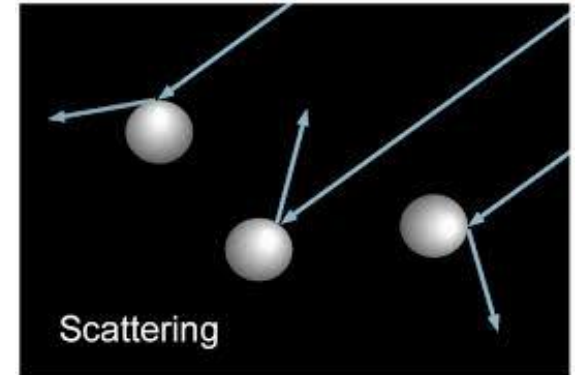
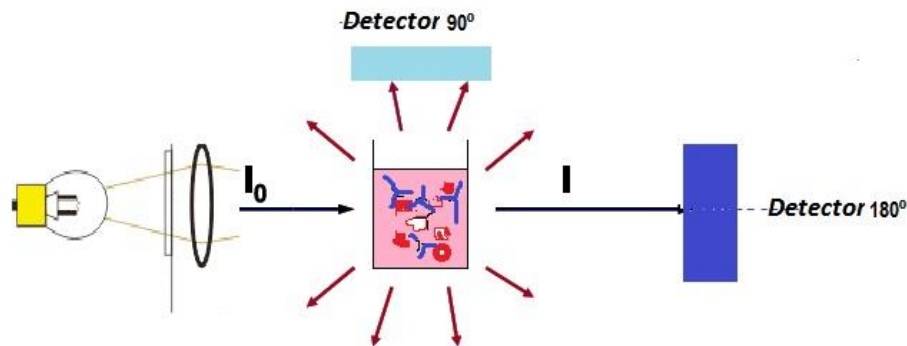
Le misure spettrofotometriche non distinguono tra DNA e RNA

Misura dello scattering

Quando una radiazione elettromagnetica attraversa una particella in sospensione parte della luce non viene assorbita ma viene deflessa, cioè cambia traiettoria, in maniera disorganizzata: fenomeno dello **scattering**.

Dipende da:

- Dalla concentrazione delle particelle
- La grandezza delle particelle e dalla loro forma
- Dalla lunghezza d'onda utilizzata: la diffusione aumenta al diminuire della λ



Lo scattering contribuisce a ridurre la quantità di luce trasmessa

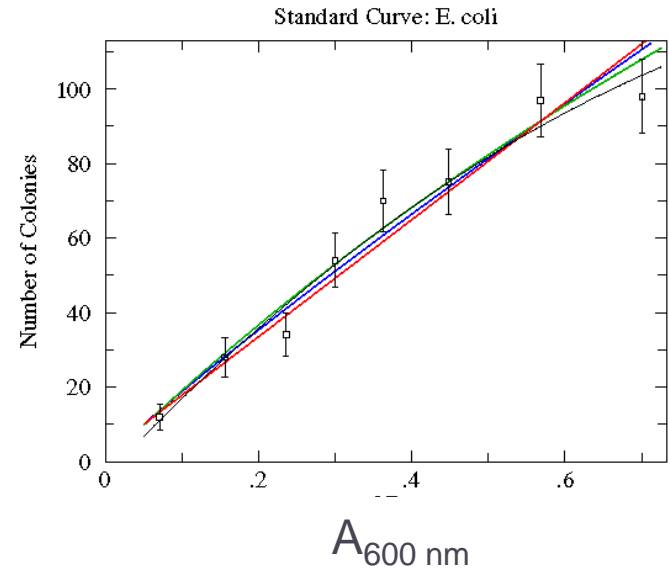
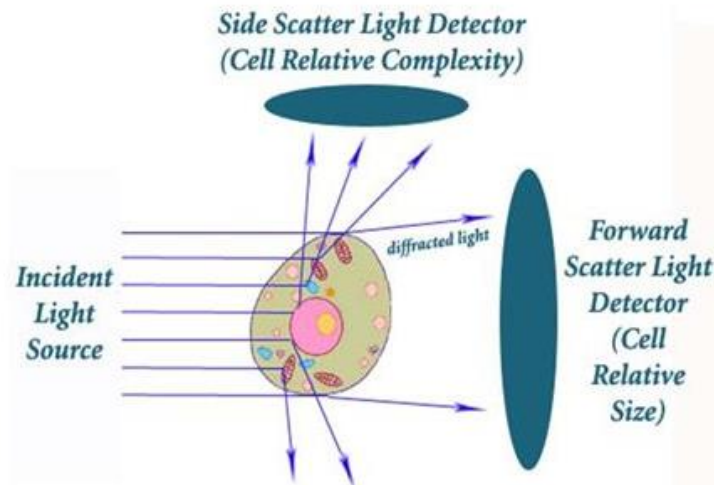
L'intensità della luce trasmessa è misurata attraverso il mezzo (detector 180°) (Turbidimetria).

Oppure: l'intensità della luce diffusa è misurata da rilevatori posti ad angoli di 90° rispetto alla direzione della luce incidente

Light scattering: considerazioni pratiche e applicazioni

Applicazioni: 1) misura della concentrazione di particelle, ad esempio conta di microorganismi (numero/ml) o di cellule

Selezione della λ : per misurare solo lo scattering, meglio evitare radiazioni di lunghezza d'onda in cui c'è anche assorbimento

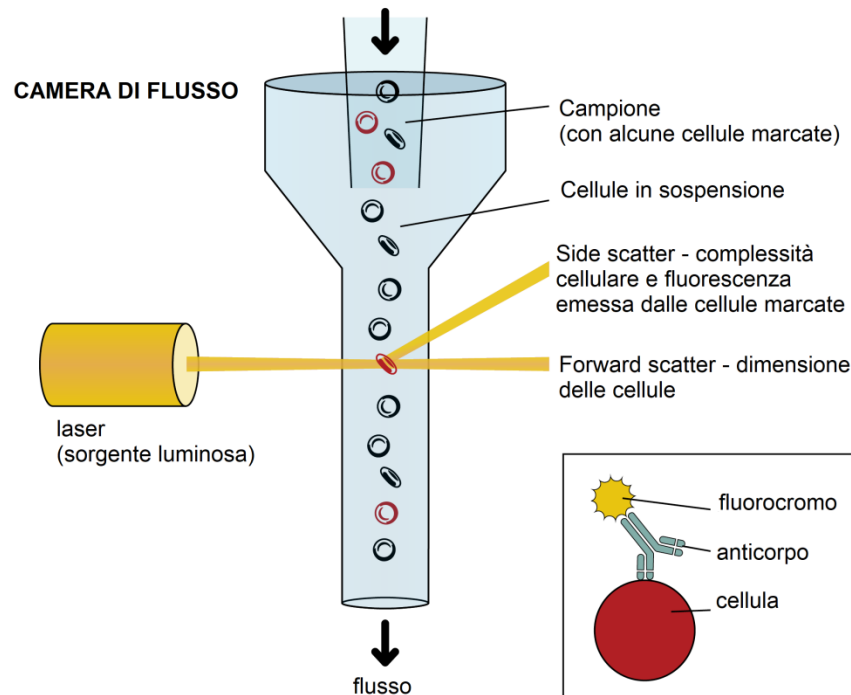
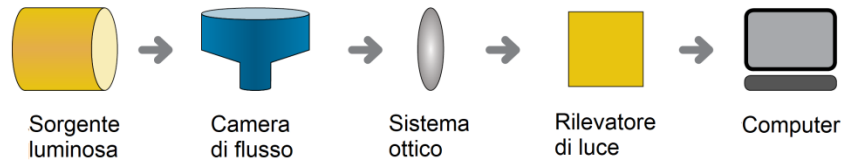


Determinazione della densità batterica

2) Determinazione delle dimensioni e della complessità cellulare (granulosità)

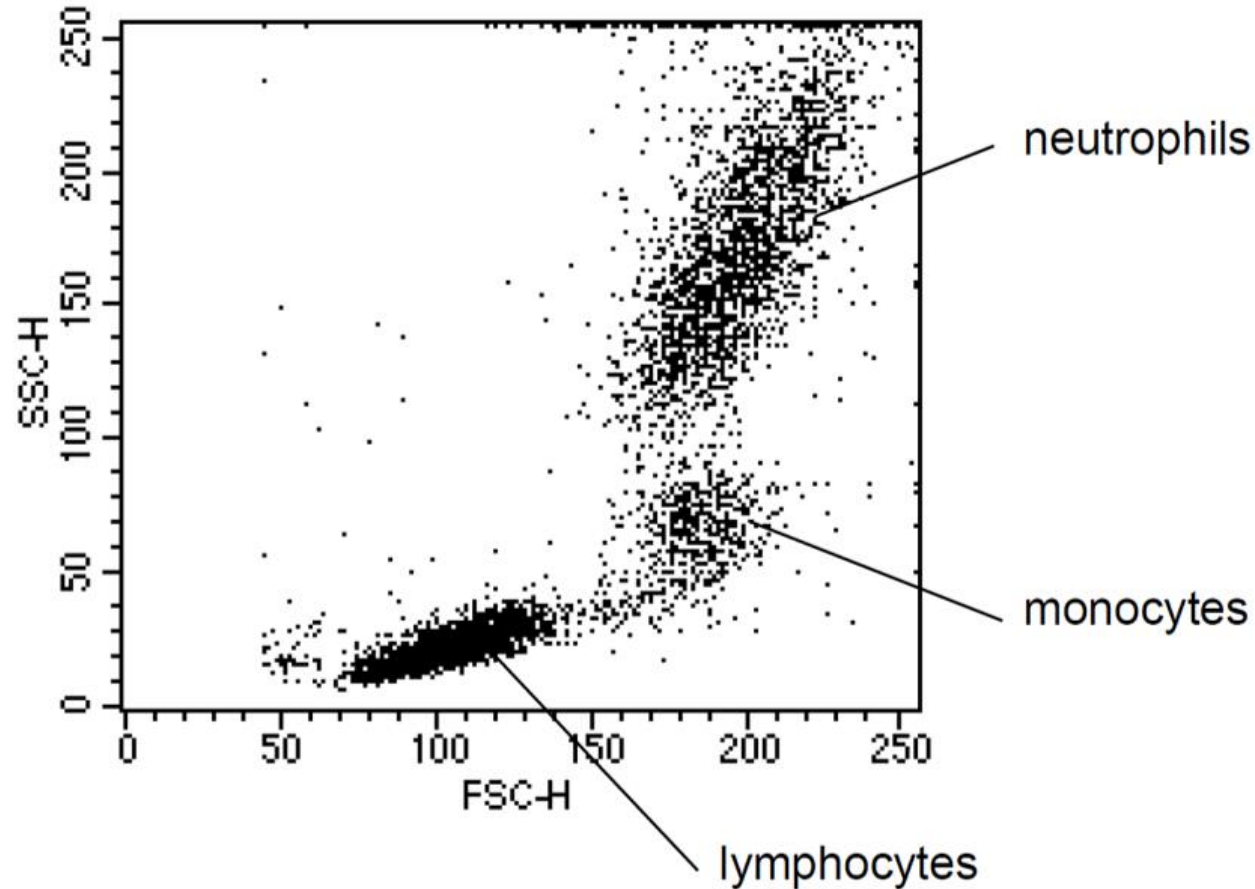
La citometria a flusso

COMPONENTI DI BASE DEL CITOFUORIMETRO



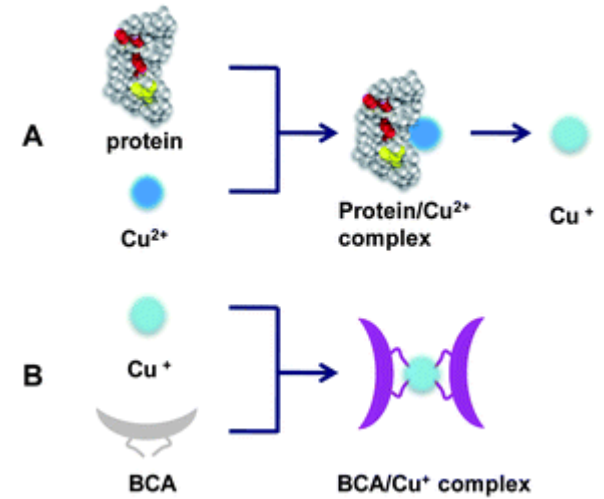
Citofluorimetria: cellule colpite da un raggio laser di luce. Detectors misurano il volume (forward scattering) e la complessità (side scattering) delle cellule.

Riconoscimento di popolazioni cellulari tramite light scattering in citofluorimetria



FSC = forward scattering, SSC = side scattering

BCA protein Assay kit



Reagente A = Soluzione BCA
Reagente B = soluzione contenente Cu^{2+}

