



# 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.

---

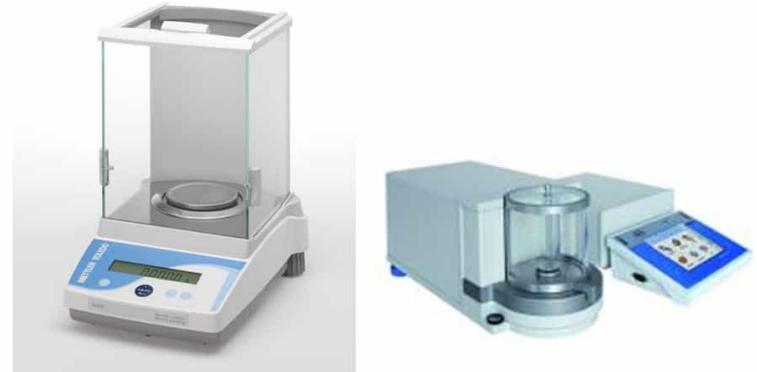


# Metodi per la determinazione quantitativa delle proteine

---

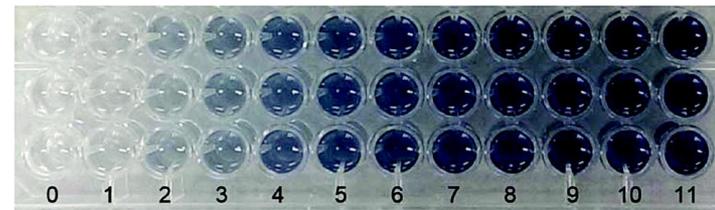
## **Metodo gravimetrico**

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.

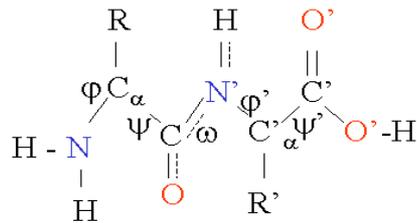
Misure relative a proteine di riferimento. Metodi sensibili, accuratezza variabile.

---

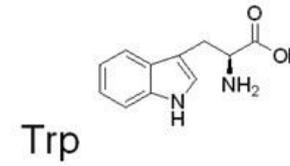
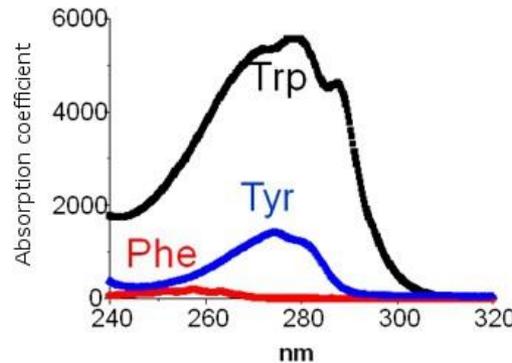


# Metodo diretto: misura dell'assorbanza

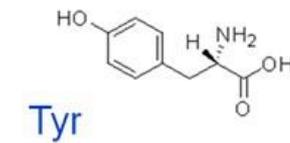
Sfrutta le proprietà dei gruppi chimici che assorbono la luce nella regione dell'UV



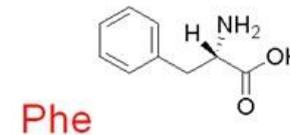
Il legame peptidico (210 nm)



$\lambda = 280 \text{ nm}$



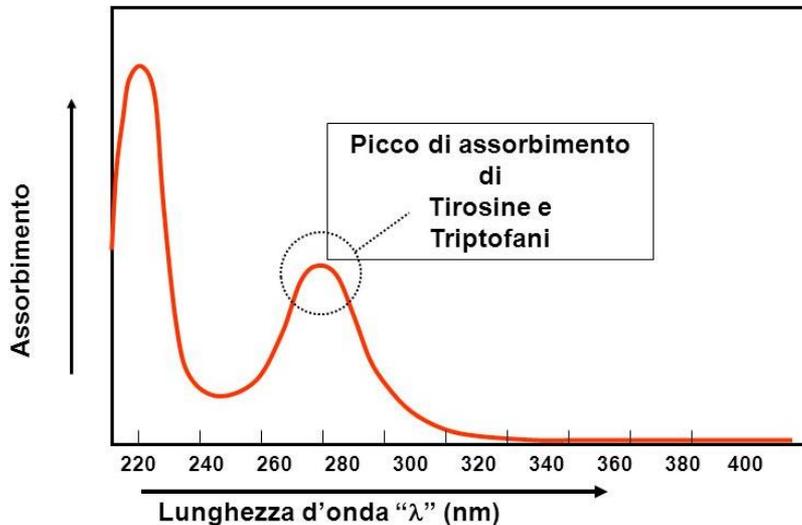
$\lambda = 276 \text{ nm}$



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

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

Spettro di assorbimento UV-Vis di una proteina



- ✓ 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

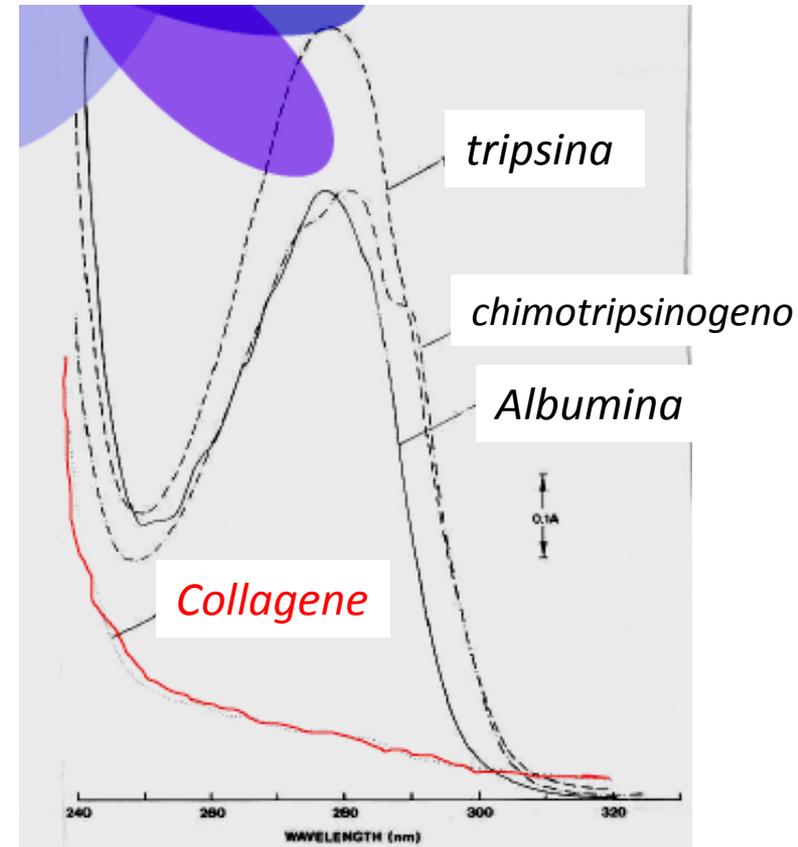
Spettro di assorbimento di quattro proteine diverse:

- **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  $\epsilon_{280nm}$  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  
WEDPISANGGKWTISCGRGKSDTFWLHTLLAMIGEQFDGDEICGAVVSVRQKQERVAIWTKNAANEA  
QISIGKQWKEFLDYKDSIGFIVHEDAKRSDKGPKNRYTV

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

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

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

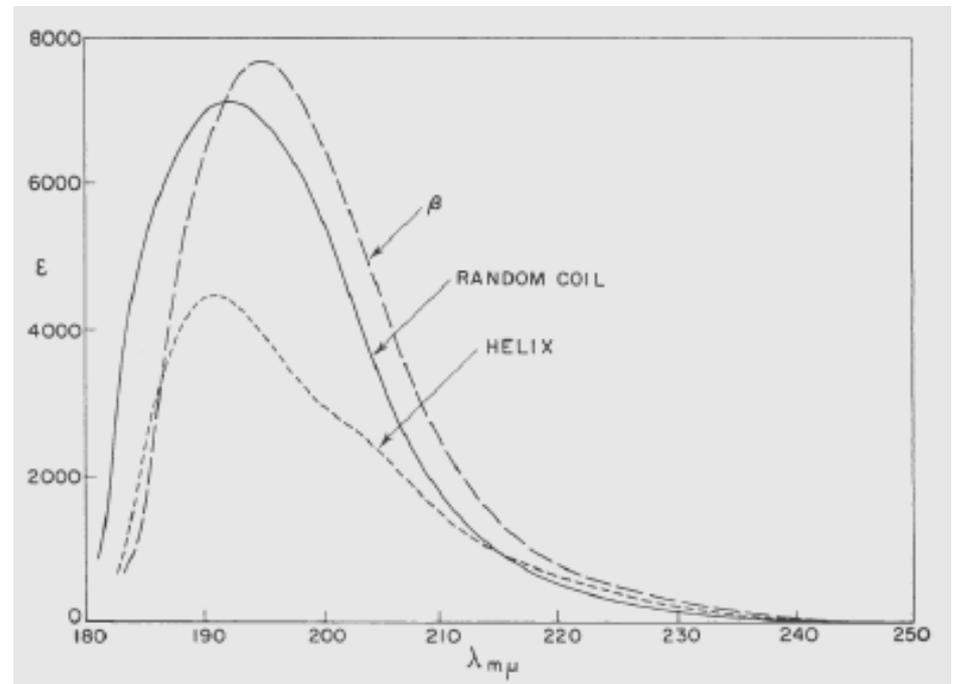
$$\epsilon_{280} = 54345 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

# 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:

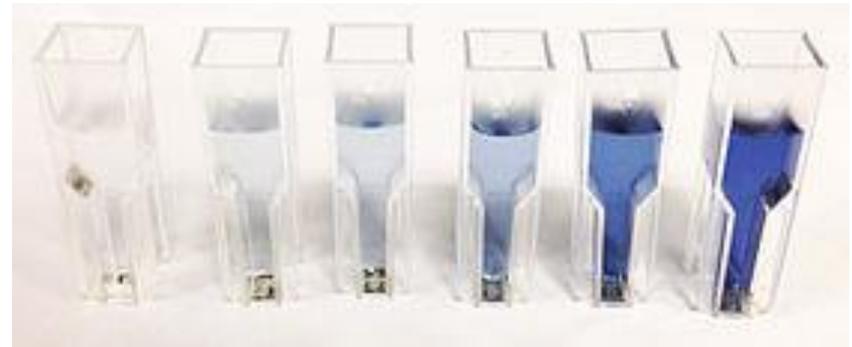
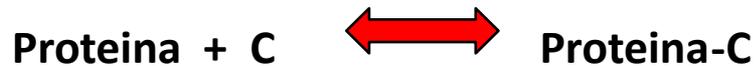
- **effetto di un aumento di pH** che induce la formazione dell' $\alpha$ -elica da una struttura disordinata (random coil)
- **effetto di un aumento di temperatura** che converte il polipeptide in  $\beta$ -foglietto.



# Metodi indiretti di determinazione della concentrazione

---

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



Caratteristiche:

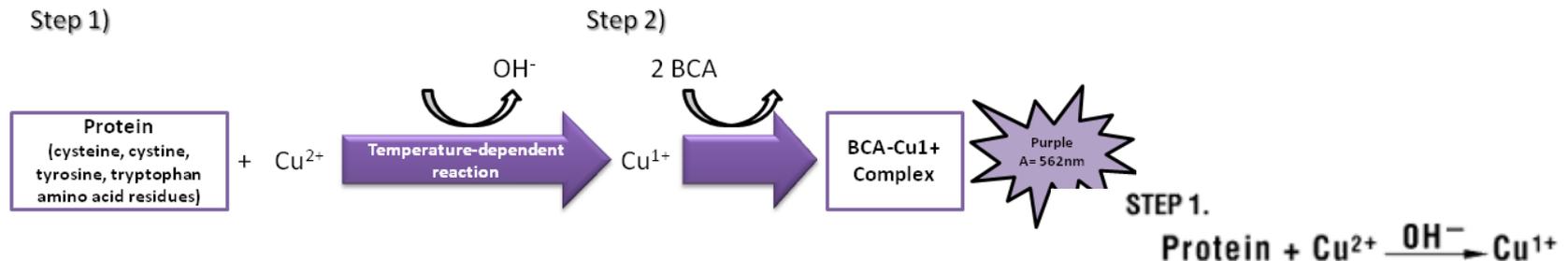
- 1) Hanno proprietà spettroscopiche diverse quando si legano alle proteine (Proteina-**C**)
- 2) **C** deve essere in largo eccesso rispetto alla proteina per poterla complessare completamente.
- 3) Il cromoforo non deve essere selettivo per il tipo di proteina. La conformazione della proteina non dovrebbe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



# Metodo dell'acido bicinconinico (BCA)

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

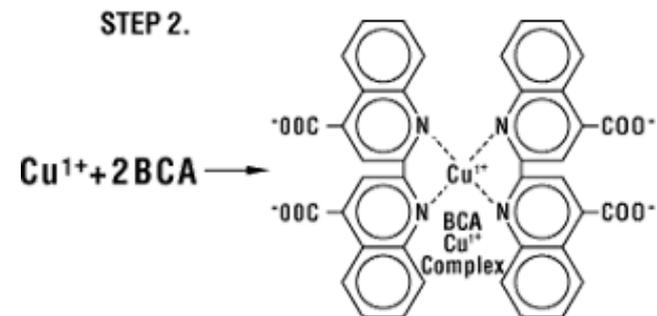
$\text{Cu}^{1+}$  prodotto viene rilevato mediante reazione con **acido bicinconinico (BCA)** per ottenere un composto di color porpora (**max 562 nm**) (step 2).



Responsabili della formazione del colore sono i legami peptidici. Cys, Trp, Tyr, His, Asn contribuiscono alla riduzione del  $\text{Cu}^{2+}$  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.



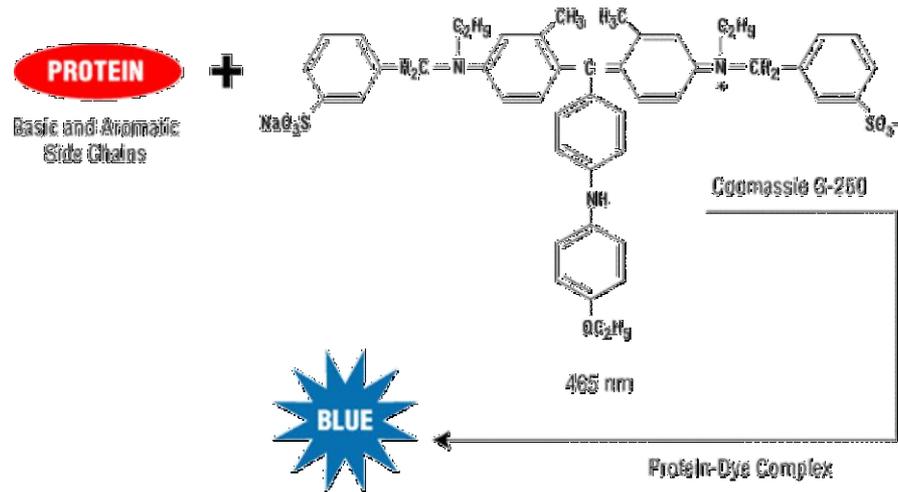
Intervallo di utilizzo: 0,5-2000  $\mu\text{g/ml}$

# 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  $\mu\text{g/ml}$

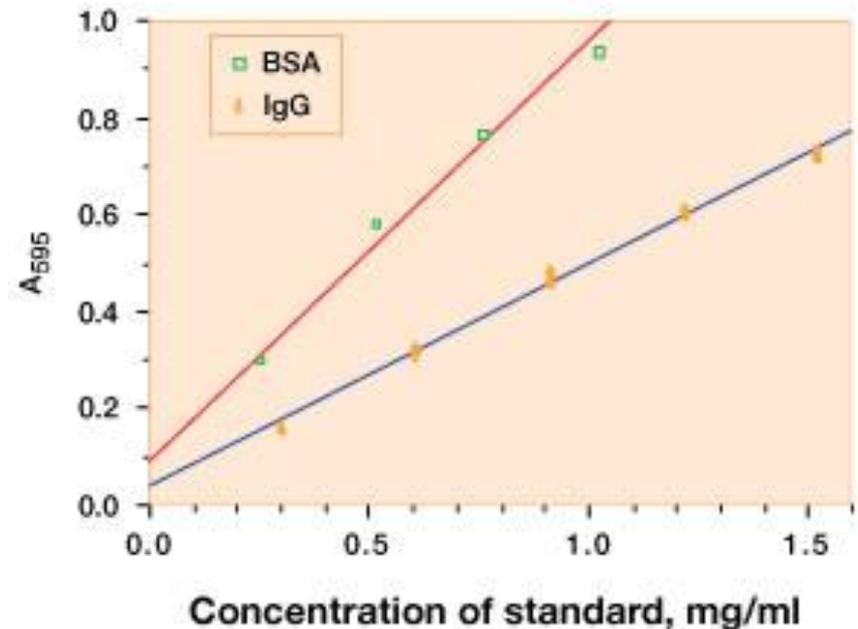
# Le proteine di riferimento

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  $\gamma$ -globulin standards

# Conclusioni

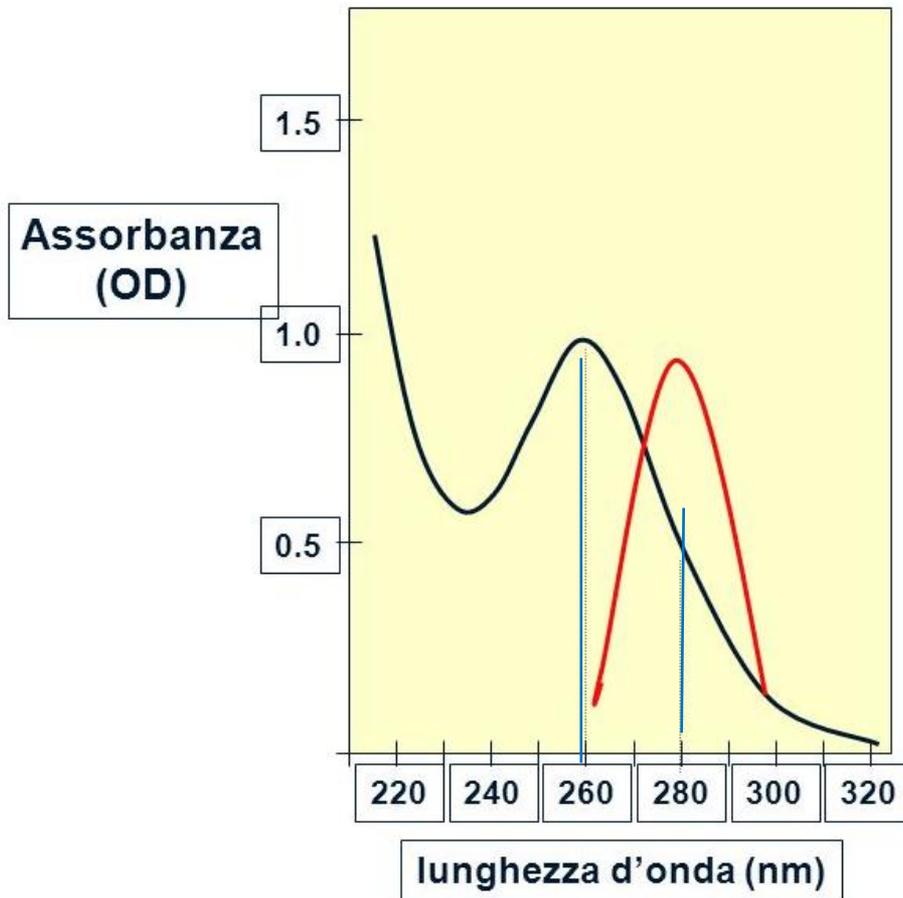
---

- ✓ 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

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

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

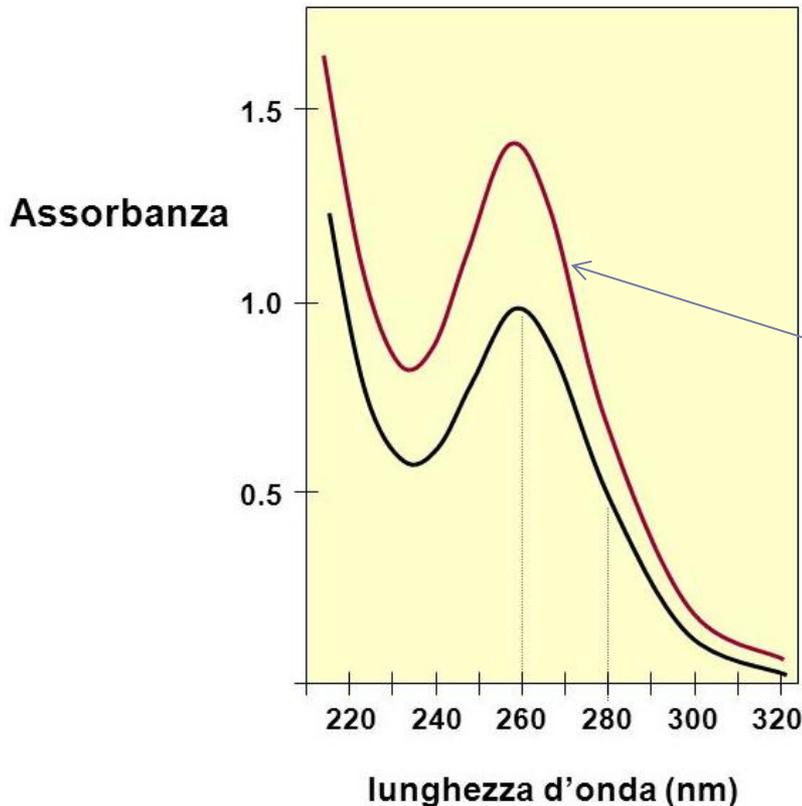
# Effetto ipercromico degli acidi nucleici

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

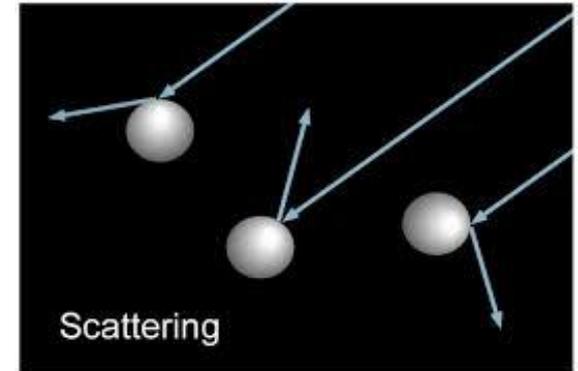
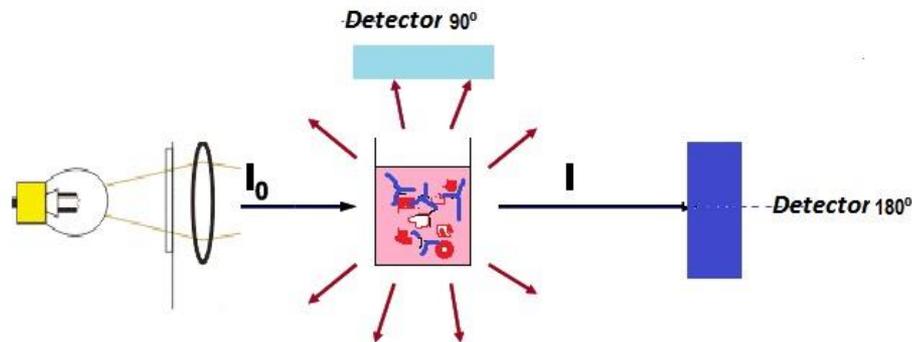
Le misure spettrofotometriche non distinguono tra DNA e RNA

# 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  $\lambda$



Lo scattering contribuisce a ridurre la quantità di luce trasmessa

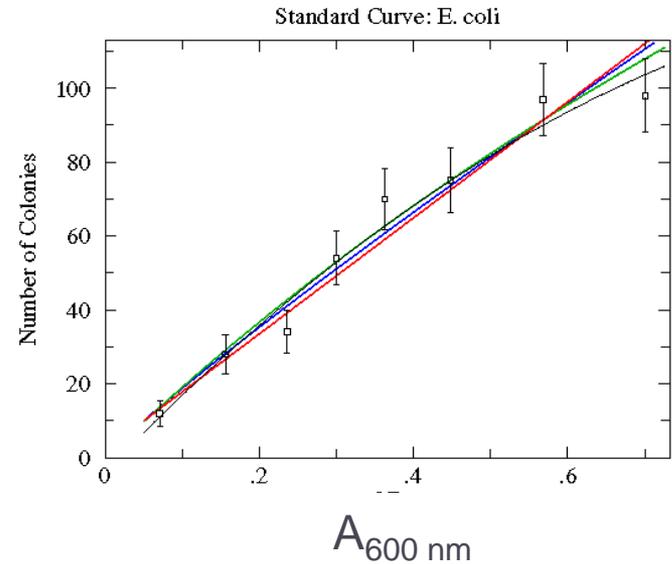
L'intensità della luce trasmessa è misurata attraverso il mezzo (detector 180°) (Turbidimetria).

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

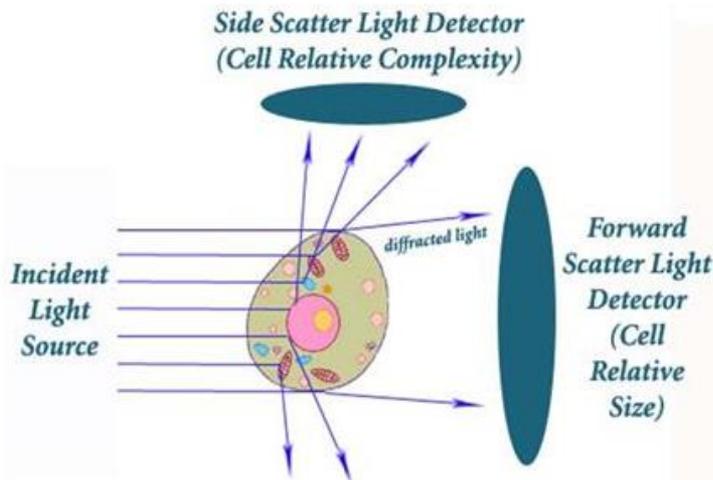
Applicazioni: 1) misura della concentrazione di particelle, ad esempio conta di microorganismi (numero/ml) o di cellule

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



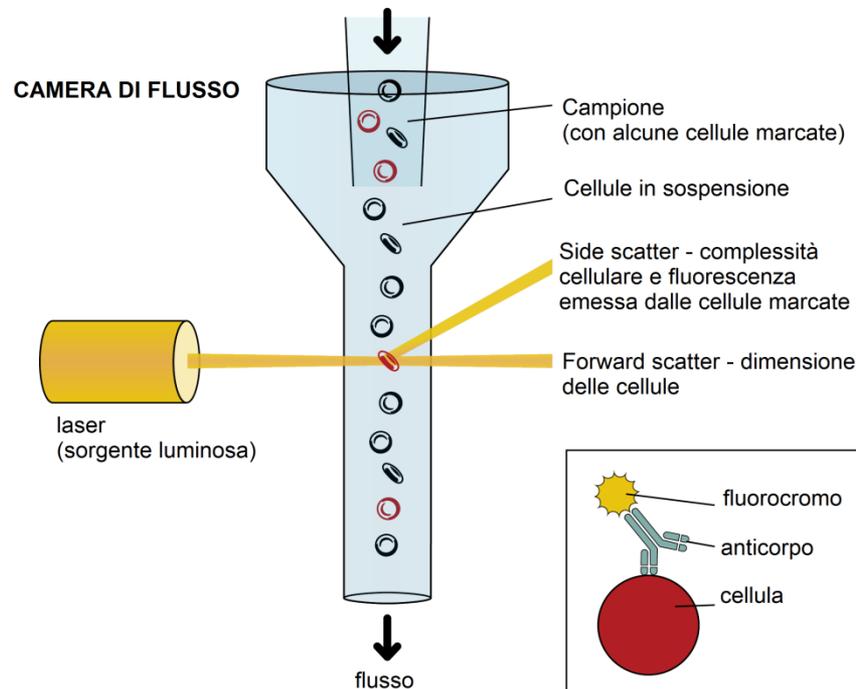
Determinazione della densità batterica

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



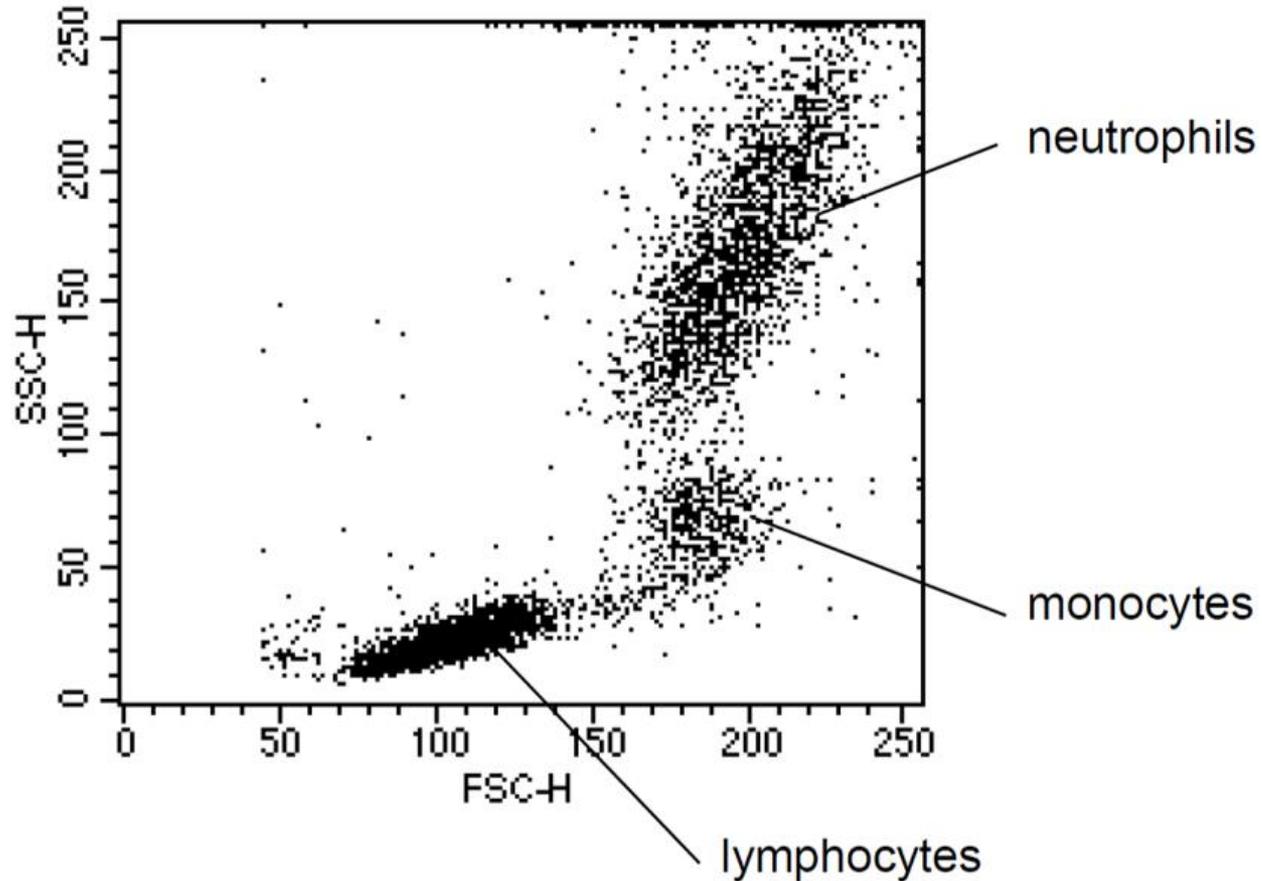
# La citometria a flusso

## 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.

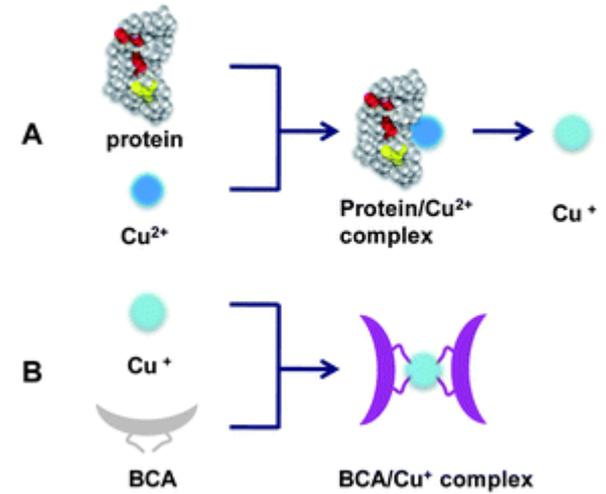
# Riconoscimento di popolazioni cellulari tramite light scattering in citofluorimetria



FSC = forward scattering, SSC = side scattering



# BCA protein Assay kit



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

