

# LAVORARE CON LE PROTEINE

# IDENTIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE DI PROTEINE

**Sistema di dosaggio per identificare e quantificare una proteina in una miscela a ogni stadio della purificazione.**

**Se devo purificare un enzima, come posso procedere?**

La concentrazione dell'enzima in una data soluzione o in un dato estratto grezzo può essere misurata ricorrendo alla reazione catalizzata dall'enzima stesso.

**DEVO CONOSCERE:**

1. l'equazione complessiva della reazione catalizzata
2. un procedimento analitico per misurare la scomparsa del substrato o la comparsa del prodotto
3. se l'enzima richiede cofattori, come ioni metallici o coenzimi
4. la dipendenza dell'attività dell'enzima dalla concentrazione del substrato
5. il pH ottimale dell'enzima
6. la temperatura ottimale. Di solito gli enzimi vengono dosati al pH ottimale e a una temperatura compresa nell'intervallo da 25 a 38 °C.

**1 unità di attività enzimatica = la quantità di enzima necessaria per trasformare 1,0 mmol di substrato al minuto a 25 °C nelle condizioni di dosaggio ottimali.**

**L'attività specifica = il numero di unità di enzima per mg di proteine totali presenti nel campione. Indica la purezza dell'enzima.**

L'attività specifica aumenta durante la purificazione di un enzima e diventa massima e costante quando l'enzima è puro.

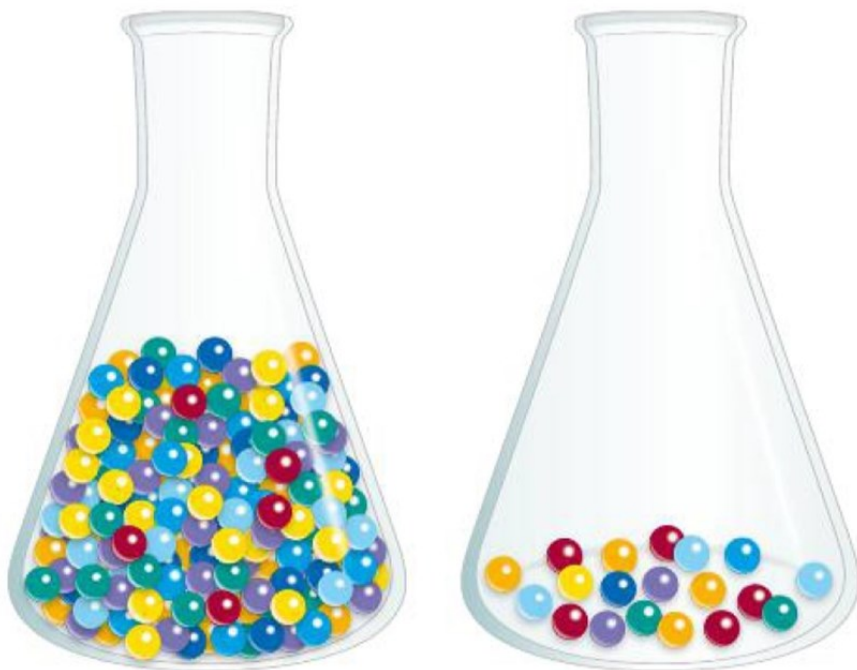
### **Come si procede?**

Ad ogni tappa di purificazione si misurano l'attività (espressa in unità di attività enzimatica) e la quantità totale di proteine.

**attività/tot proteine = attività specifica**

In ogni tappa di purificazione l'attività enzimatica e le proteine totali tendono a diminuire. L'attività decresce per effetto dell'inattivazione o di una non perfetta interazione con i materiali cromatografici o con altre molecole in soluzione. Le proteine totali diminuiscono per effetto della eliminazione delle proteine che non interessano. In una “buona” tappa di purificazione la perdita di proteine non specifiche deve essere molto maggiore della perdita di attività, per cui l'attività specifica aumenta, anche se l'attività totale tende a diminuire.

# ATTIVITÀ E ATTIVITÀ SPECIFICA



Le due beute contengono lo stesso numero di palline rosse (proteina) ma il recipiente di destra ha un'attività specifica maggiore perché le palline rosse rappresentano una frazione maggiore rispetto al totale delle palline.

**Attività = unità totali di enzima nella soluzione.**

**Attività specifica = numero di unità di enzima per mg di proteine totali presenti nel campione.** L'attività specifica è una misura della purezza dell'enzima; aumenta durante la purificazione di un enzima e diventa massima e costante quando l'enzima è puro

Una tabella di purificazione tiene traccia dei risultati di ciascun passaggio di un protocollo di purificazione.

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

Procedimento o tappa	Volume della frazione eluita (mL)	Proteine totali (mg)	Attività (unità)	Attività specifica (unità/mg)
1. Estratto cellulare grezzo	1400	10 000	100 000	10
2. Precipitazione con ammonio solfato	280	3000	96 000	32
3. Cromatografia a scambio ionico	90	400	80 000	200
4. Cromatografia per esclusione molecolare	80	100	60 000	600
5. Cromatografia per affinità	6	3	45 000	15 000

**Nota:** tutti i dati rappresentano lo stato del campione *dopo* che la tappa indicata nella prima colonna è stata effettuata. I termini "attività" e "attività specifica" sono definiti a p. 93.

**fattore di purificazione = attività specifica finale/ attività specifica iniziale**

La percentuale dell'attività totale ottenuta nell'ultimo passaggio (45 000 unità) rispetto all'attività totale del materiale di partenza (100 000 unità) fornisce la resa della procedura di purificazione pari al 45%.

# COME CAPISCO SE LA PROTEINA CHE HO PURIFICATO È PURA

- ❑ ulteriori tappe di purificazione non incrementano la sua attività specifica
- ❑ è possibile identificare una sola specie proteica (per esempio, con l'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS).

# COME SI QUANTIFICANO LE PROTEINE NON ENZIMATICHE?

- ❖ Gli approcci applicabili sono vari quanto le proteine stesse
- ❖ Le proteine di trasporto possono essere dosate mediante il legame alla molecola che trasportano
- ❖ ormoni e tossine: mediante gli effetti biologici che producono
- ❖ Alcune proteine strutturali rappresentano una grossa frazione della massa tissutale e possono essere estratte e purificate senza che sia necessario dosarne l'attività.

# DOSAGGIO DELLE PROTEINE

Spesso è necessario dosare le proteine totali in un campione (un estratto cellulare, un siero, un omogenato di tessuto, un campione purificato)

Utilizzo di tecniche che sfruttano la capacità delle molecole stesse o di loro derivati di assorbire la luce visibile o ultravioletta.

## TECNICHE COLORIMETRICHE O SPETTROFOTOMETRICHE

Spettroscopia elettronica di assorbimento UV-VIS (o spettrofotometria)

Molto comune in biochimica

Osserva l'assorbimento di radiazione dovuto alle transizioni la cui energia è compresa nella regione visibile e ultravioletta dello spettro elettromagnetico

Descritta quantitativamente con la legge di Lambert e Beer



Molte biomolecole assorbono la luce ad una determinata lunghezza d'onda  
La misura dell'assorbimento della luce con uno spettrofotometro dà informazioni sul tipo di molecole e sulla loro concentrazione in soluzione

## LEGGE DI LAMBERT-BEER

è una relazione empirica che correla la quantità di luce assorbita da un materiale, alla concentrazione e allo spessore del materiale stesso attraversato

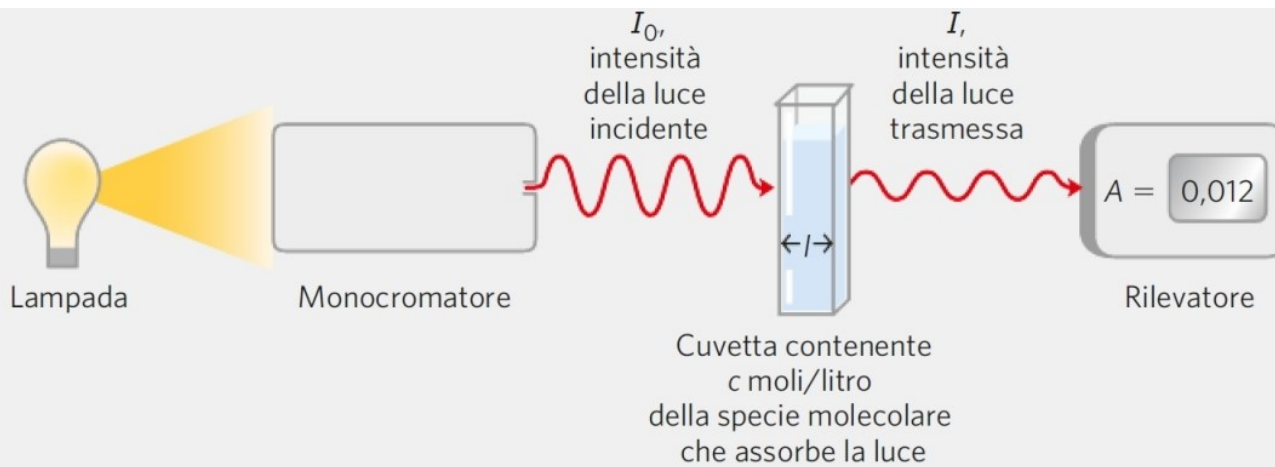
$$A = \varepsilon_{\lambda} l M \qquad M = \frac{A}{\varepsilon_{\lambda} l}$$

$\varepsilon_{\lambda}$  = coefficiente di estinzione molare ( $\varepsilon_M$ ), espresso in  $M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$c$  = concentrazione delle specie che assorbono la luce (in moli/L)

$l$  = lunghezza del cammino ottico (cm) del campione che assorbe la luce.

$\varepsilon_{\lambda}$  varia in base al composto, al solvente, alla lunghezza d'onda



**Figura 1** I principali componenti di uno spettrofotometro. Una sorgente luminosa emette luce con una vasta gamma di lunghezze d'onda; il monocromatore sceglie e trasmette una luce di una particolare lunghezza d'onda. La luce monocromatica passa at-

traverso il campione, posto in un apposito recipiente (detto cuvetta), con un cammino ottico  $l$ . L'assorbanza del campione, pari a  $\log(I_0/I)$ , è proporzionale alla concentrazione della specie che assorbe la luce. La luce trasmessa viene misurata da un rivelatore.

$$\log \frac{I_0}{I} = A$$

$$A = \epsilon_{\lambda} l M$$

Radiazione UV: lunghezza d'onda 10-380 nm

Radiazione Visibile: lunghezza d'onda 380-800 nm

## Spettrofotometri:

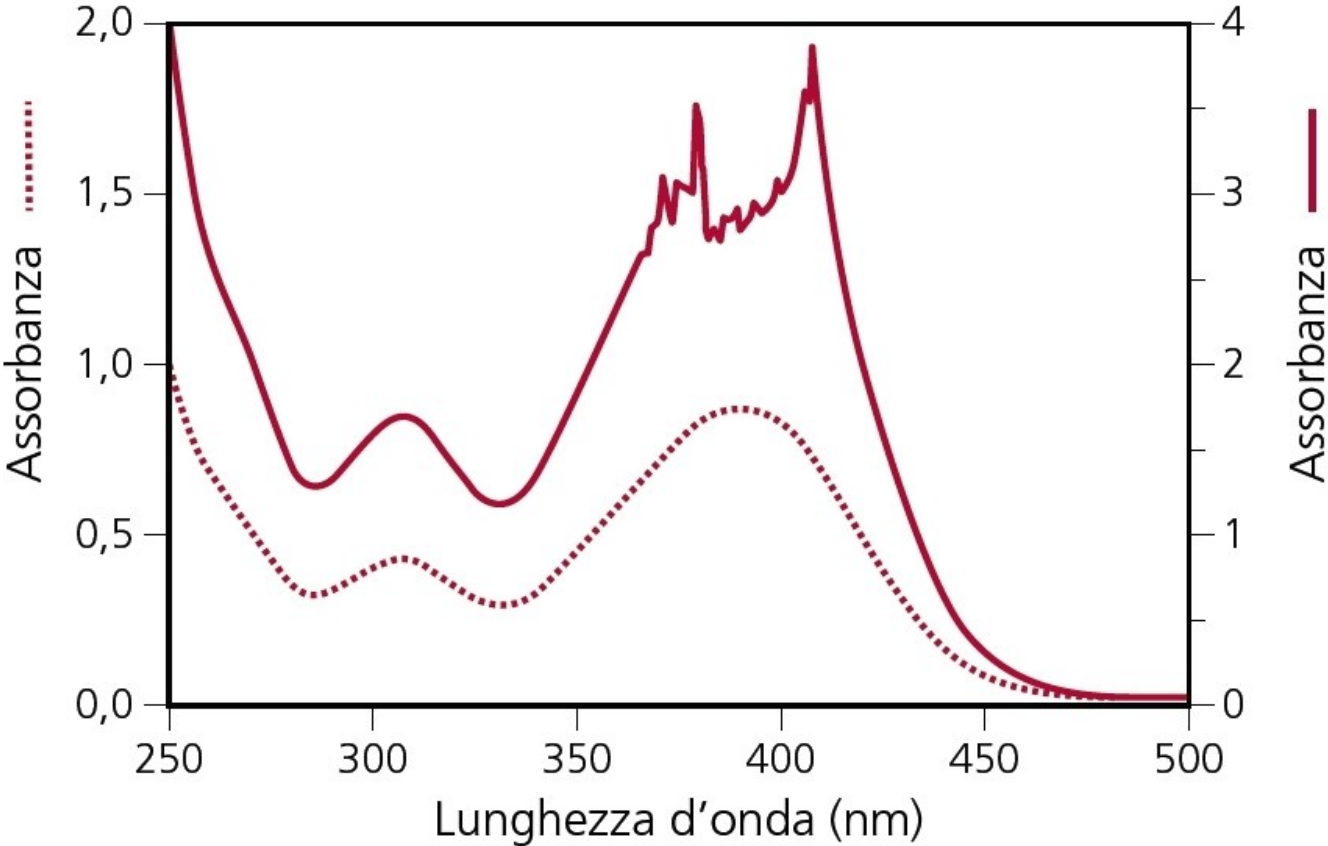
- dotati di due sorgenti di luce per misurare gli spettri di assorbimento e per coprire l'intero ambito spettrale UV e visibile (circa 190-800 nm).
- Possono essere classificati in base all'intervallo di lunghezze d'onda nei quali operano, e le loro caratteristiche tecniche
- Altre caratteristiche importanti includono il potere risolutivo e l'intervallo di linearità del rivelatore.
- Possono misurare la variazione continua della lunghezza d'onda spostando la finestra che seleziona la luce in uscita dal monocromatore, prelevando così radiazioni a diversa frequenza.

## Limitazioni pratiche:

le misure di assorbanza tendono a deviare dalla linearità quando la concentrazione del campione è molto elevata. (sono necessari rivelatori estremamente sensibili per determinare con accuratezza valori di intensità luminose molto piccoli, quali quelli trasmessi da soluzioni a elevata concentrazione). Spettrofotometri oggi in commercio: linearità fino a valori di assorbanza di circa 1,5-2 e valori molto alti ( $>2$ ) non sono attendibili.

**Figura 8.7**

Spettri di assorbimento di un campione a una concentrazione che ne permette un dosaggio corretto (spettro tratteggiato) e di un campione troppo concentrato e quindi non dosabile con accuratezza (spettro continuo). Notare la diversa scala dell'assorbanza nei due casi.



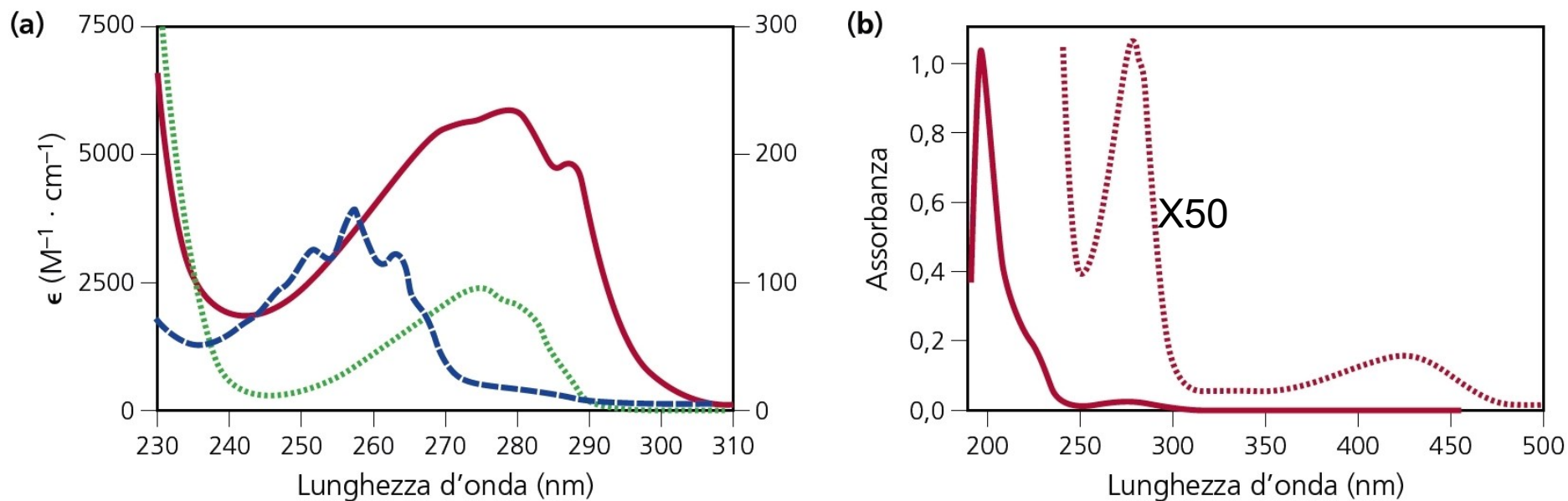
## **Cromofori (“portatori di colore”): gruppi che assorbono la luce**

sono caratterizzati da specifiche transizioni elettroniche e, quindi, differenti lunghezze d’onda di assorbimento.

Principali cromofori delle proteine: il legame peptidico e gli amminoacidi aromatici. Questi gruppi assorbono nell’UV, quindi le proteine (per la maggior parte) appaiono incolori all’occhio umano

Nei legami peptidici si possono osservare due diversi picchi di assorbimento nella regione 210-220 nm ( $\epsilon$  circa  $100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) e nella regione 190-210 nm dello spettro ( $\epsilon$  circa  $7000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

Gli amminoacidi, presentano transizioni elettroniche caratteristiche dei residui aromatici (triptofano, tirosina e fenilalanina) nella regione dello spettro tra 260 e 280 nm.



**Figura 8.8**

**(a)** Spettri di assorbimento degli aminoacidi triptofano (spettro rosso), tirosina (spettro verde) e fenilalanina (spettro blu).

**(b)** Spettro di assorbimento di una proteina. Nella figura sono

mostrati i picchi di assorbimento del legame peptidico ( $\lambda$  inferiore a 250 nm) e lo spettro fino a 500 nm (amplificato 50 volte), dove si può osservare il picco degli aminoacidi aromatici a 280 nm e un picco tra 400 e 450 nm dovuto alla presenza di un cofattore.

# METODI SPETTROFOTOMETRICI

## DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE

- METODI SPETTROFOTOMETRICI (non distruttivi)
  - assorbimento del legame peptidico ( $\epsilon_{214} \approx 1000 - 2800 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ )
  - assorbimento della tirosina ( $\epsilon_{276} \approx 1400 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ )
  - assorbimento della triptofano ( $\epsilon_{280} \approx 5500 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ )

### METODI COLORIMETRICI (distruttivi)

- Metodo di Lowry
  - Metodo Bradford
  - Saggio acido bicinconinico
- ANALISI AMMINOACIDICA (distruttivo)
    - **metodo molto preciso**
    - **determina la concentrazione dei singoli residui**

# Saggi colorimetrici per la determinazione della concentrazione delle proteine

## Utilizzo di un colorante che lega in modo specifico le molecole da dosare

L'assorbanza = misura solo delle molecole colorate e non di tutte le altre eventualmente presenti nel campione.

**Metodo di Lowry.** Le proteine vengono colorate:

- ioni rame reagiscono con i legami peptidici in condizioni alcaline (nella cosiddetta reazione del biureto, in cui le proteine vengono mescolate a una soluzione di idrossido di potassio, solfato di Cu(II) e sodio-potassio tartrato) che provoca la formazione di  $\text{Cu}^+$  e il viraggio da blu a violetto;
- Si aggiunge acido fosfomolibdico/fosfotungstico (come reattivo di Folin-Ciocalteu) che interagisce con gli ioni rameici e le catene laterali di tirosina, triptofano e cisteina per produrre un colore blu-verde che può essere rilevato tra 650 nm e 750 nm.

In seguito a queste reazioni, i campioni proteici appaiono colorati ed è possibile misurare l'intensità del colore (l'assorbanza a 700 nm), che è proporzionale alla concentrazione di proteine.



**Metodo di Bradford** (disponibile commercialmente anche sotto forma di un insieme di reagenti pronto per l'uso, o kit, molto semplice da utilizzare):

- si basa sulla reazione delle proteine con il Coomassie Brilliant Blue G-250 (lo stesso colorante utilizzato per la rivelazione delle bande proteiche dopo l'elettroforesi su gel di poliacrilammide), un composto disulfonato del trifenilmetano di colore bruno-rosso
- Questo colorante si lega ai residui di arginina (molto efficientemente), triptofano, tirosina e istidina e interagisce inizialmente con le proteine, donando il suo elettrone libero a gruppi ionizzabili. Questa interazione destabilizza il folding 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 ne può seguire 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

## Saggio dell'acido bicinconinico (BCA)

- La reazione del BCA è simile a quella del reattivo di Lowry:
- lo ione  $\text{Cu}^{2+}$  è ridotto a  $\text{Cu}^+$  dalle molecole proteiche in soluzione alcalina,
- si forma un complesso con un intenso colore violetto con un massimo di assorbimento a 562 nm.
- Il metodo BCA è insensibile a interferenze da detergenti o tamponi
- è molto utilizzato perché consente di valutare correttamente quantità tra 1 e 10  $\mu\text{g}$  di proteina e, quindi, può essere utilizzato come micro-metodo su piccole quantità di campione

## **Determinare la quantità di proteine presenti in un campione:**

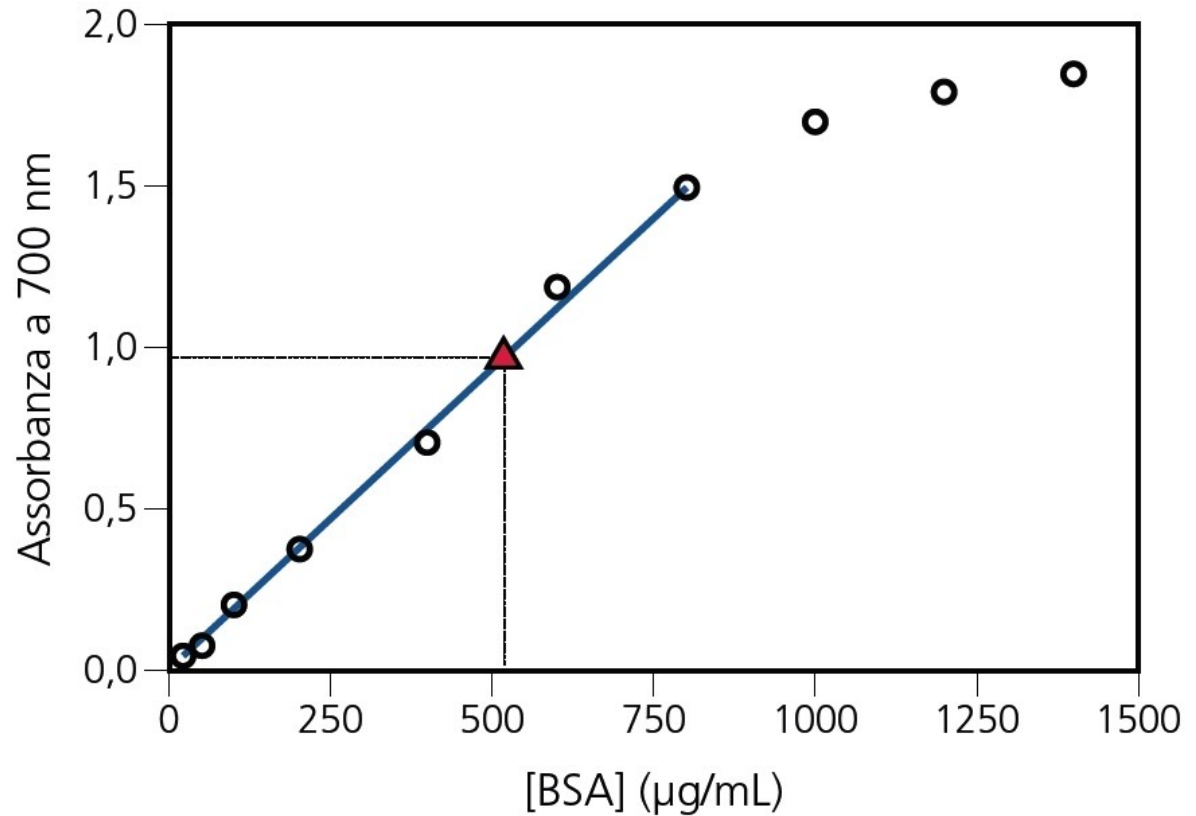
**costruire una curva di taratura, utilizzando campioni di proteine a concentrazione nota.**

- Come standard si usano soluzioni di albumina serica bovina (BSA), una proteina facilmente disponibile e poco costosa.
- Saggio di Lowry su soluzioni di BSA a concentrazione nota (per esempio da 20 a 800  $\mu\text{g/mL}$ ), se ne misura l'assorbanza a 700 nm e si mette in grafico in funzione delle corrispondenti concentrazioni.
- Attenzione alla linearità!!!!
- Si esegue poi il test per i campioni a concentrazione ignota.
- Una volta determinati i valori di assorbanza per i campioni, per confronto con la retta di taratura, si ricavano le concentrazioni di proteina ignote
- È necessario includere nel saggio almeno due campioni in cui non sono state aggiunte proteine, ma solo i vari reagenti (bianco). Questi campioni forniscono il valore di assorbanza che va sottratto da tutti i campioni perché non è dovuto alle proteine ma ai reagenti stessi.

### Figura 6.23

Determinazione della concentrazione proteica mediante il metodo di Lowry. La figura mostra una retta di taratura ottenuta utilizzando soluzioni di BSA a concentrazioni note. È evidente che per concentrazioni superiori a 800 µg/mL la linearità tra assorbanza e concentrazione viene meno. La concentrazione proteica del campione ignoto (triangolo magenta) viene determinata per interpolazione nella zona lineare del saggio e, nell'esempio in figura, corrisponde a circa 500 µg/mL.

$$M = \frac{A}{\epsilon l}$$



Quando la luce colpisce una sostanza essa viene in parte riflessa, in parte trasmessa e in parte assorbita.

Se la sostanza è in soluzione la quantità di luce riflessa è minima ed esiste una relazione tra la quantità di luce incidente e quella trasmessa dopo il passaggio attraverso la sostanza.

La quantità di luce assorbita è proporzionale al numero di molecole che la radiazione incontra nel suo cammino e, quindi, dipende dalla concentrazione e dalla lunghezza del cammino stesso.

La variazione dell'intensità della radiazione  $dI$  nel cammino infinitesimo di lunghezza  $dx$  è proporzionale all'intensità  $I$  e alla concentrazione della sostanza  $c$ , attraverso un coefficiente di proporzionalità  $k$  specifico della sostanza stessa.

$$\frac{I_t}{I_0} = e^{(-klc)}$$

$I_t$  = luce trasmessa,  $I_0$  = luce incidente e  $l$  = lunghezza del cammino  
legge di Lambert e Beer, equazione fondamentale della spettrofotometria.

la quantità di radiazione trasmessa è proporzionale allo spessore della soluzione in esame e alla sua concentrazione. analisi quantitativa

Si definisce trasmittanza (T) il rapporto tra luce trasmessa e luce incidente. Questo valore può variare tra 0 o 0%, quando tutta la luce viene assorbita dalla soluzione, e 1 o 100% quando in assenza di assorbimento la luce trasmessa è uguale a quella incidente.

$$T = \left( \frac{I_t}{I_0} \right) \quad \text{e} \quad T\% = T \cdot 100$$

Poiché  $\ln(I_t / I_0) = \ln T = -klc$ , la trasmittanza è correlata alla concentrazione in maniera non lineare e questo rappresenta un inconveniente per l'analisi quantitativa. Per questo è stato introdotto un parametro diverso chiamato assorbanza (A) o densità ottica (DO oppure, più comunemente, OD dall'inglese Optical Density), il cui valore varia linearmente con la concentrazione della soluzione e corrisponde al logaritmo dell'inverso della trasmittanza. Si definisce, inoltre, coefficiente di estinzione ( $\epsilon$ ) la densità ottica di una soluzione a concentrazione unitaria e misurata in un cammino ottico lungo 1 cm. La formulazione della legge di Lambert e Beer più utilizzata in biochimica mette in relazione l'assorbanza con il coefficiente di estinzione e la concentrazione:

$$A = \log \left( \frac{I_0}{I_t} \right) = \epsilon l c$$

dove  $l$  è il cammino ottico (cm) e  $c$  è la concentrazione della sostanza. Per il passaggio da  $\ln$  a  $\log$  si ha che  $\ln x = \ln 10 \cdot \log x \approx 2,3 \cdot \log x$  e quindi  $\epsilon = k/2,3$ . La concentrazione di una sostanza può essere ricavata attraverso una misura dell'assorbanza:

$$c = \frac{A}{\epsilon l}$$

Il coefficiente d'estinzione è una costante specifica di ogni sostanza a una data lunghezza d'onda. In genere, si utilizza  $\epsilon_M$ , espresso in  $M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , che corrisponde all'assorbanza di una soluzione della sostanza alla concentrazione 1 M, e il valore di  $c$  calcolato è espresso in termini di molarità.

Molte biomolecole assorbono la luce ad una determinata lunghezza d'onda  
La misura dell'assorbimento della luce con uno spettrofotometro dà informazioni sul tipo di molecole e sulla loro concentrazione in soluzione

### **Legge di Lambert e Beer**

$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon c l \qquad A = \epsilon c l$$

$I_0$  = intensità della luce incidente

$I$  = intensità della luce trasmessa

il rapporto  $I/I_0$  (l'inverso del rapporto presente nell'equazione) = trasmittanza

$\epsilon$  = coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon_M$ ), espresso in  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$

$c$  = concentrazione delle specie che assorbono la luce (in moli/L)

$l$  = lunghezza del cammino ottico (in centimetri) del campione che assorbe la luce.

$\epsilon$  varia in base alla natura chimica del composto, al solvente, alla lunghezza d'onda