

## PREPARAZIONE DEL CAMPIONE per ANALISI CROMATOGRAFICHE ed ELETTROFORETICHE

**Regola generale e fondamentale:** Compatibilità della soluzione utilizzata per l'estrazione con la metodica analitica utilizzata (sia da un punto di vista analitico che da un punto di vista dell'integrità strumentale).



### FONDAMENTALE CONOSCERE I PRINCIPI SEPARATIVI UTILIZZATI

Alcuni esempi:

Metodo separativo adottato: **SDS-PAGE** – Le proteine devono essere “saturate” con il detergente SDS, devo fare in modo che il mio campione contenga almeno 1% (1 grammo su 100 mL) di SDS.

Non ci devono essere altri detergenti che possano interferire con il legame dell'SDS alle proteine (come ad esempio detergenti carichi positivamente) e se sono presenti, devono esserlo in concentrazioni tali per cui non disturbano il legame dell'SDS (devono essere diluiti).

Metodo separativo adottato: **Gel elettroforesi in condizioni NATIVE** – Le proteine non devono esser state denaturate (detergenti, calore, agenti caotropici). Il tampone d'estrazione deve essere pensato considerando l'aspetto della denaturazione delle proteine (non deve contenere detergenti forti e carichi, urea o tiourea, il pH deve essere il più possibile conforme alla condizione fisiologica delle proteine sottoesame, etc.

Metodo separativo adottato: **Isoelettrofocalizzazione (IEF)** – Le proteine devono migrare in base alla variazione della loro carica in un gradiente di pH. Questo significa che non devono essere presenti detergenti che alterino la carica della proteina!

Metodo separativo adottato: **Cromatografia a scambio ionico** – Le proteine vengono ad essere separate in base alla loro carica ad un determinato pH. Non devono essere presenti detergenti carichi in modo da non alterare la carica stessa della proteina. Inoltre, siccome la separazione delle molecole avviene in base ad interazioni elettrostatiche, è opportuno considerare anche la forza ionica della soluzione utilizzata per l'estrazione.

Metodo separativo adottato: **Cromatografia a fase inversa** – La separazione si basa sull'interazione tra porzioni idrofobiche delle proteine e pendenti alchilici. Detergenti in grado d'interferire con questo tipo d'interazioni devono essere evitati. Inoltre, c'è la possibilità che questi detergenti si leghino in modo irreversibile alla fase stazionaria compromettendo il sistema cromatografico stesso.

Metodo separativo adottato: **Cromatofocalizzazione** – La separazione si basa su interazioni elettrostatiche tra proteine e matrice cromatografiche dipendenti dal pH della soluzione. Le cariche delle proteine non devono essere modificate da detergenti carichi.

Metodo separativo adottato: **Cromatografia in generale**: - il campione iniettato in colonna non deve contenere particolato o residui solidi (intasamento della colonna) e non deve precipitare in colonna (proteine possono andare incontro a precipitazione se cambiano repentinamente il mezzo in cui sono disciolte e se questo cambio porta ad aggregazione => le proteine devono essere state preventivamente condizionate nello stesso tampone/solvente in cui si trova la colonna cromatografica e si deve aver verificato che non avvenga precipitazione.

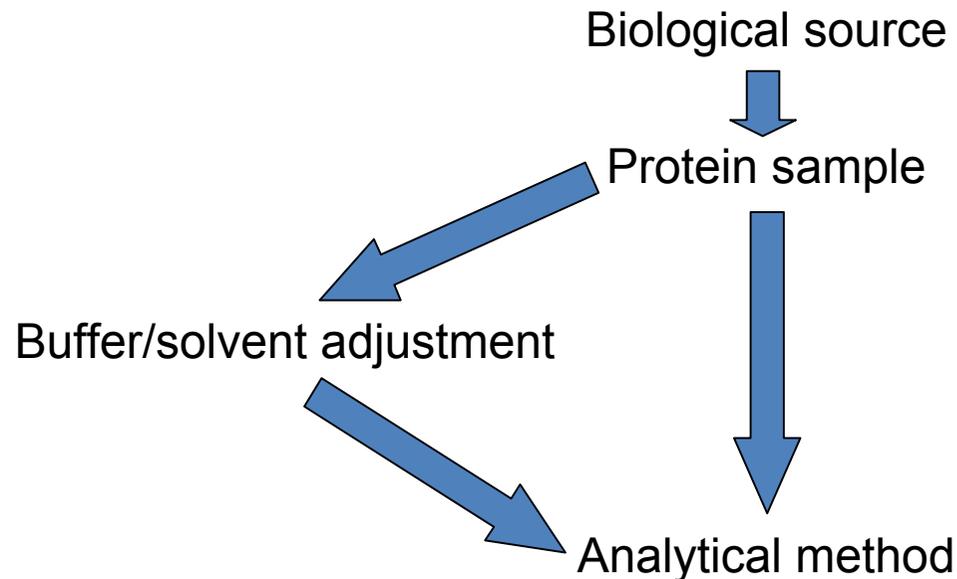
Metodo separativo adottato: **Elettroforesi in generale** – Il campione non deve essere sciolto in solventi che possano intaccare la matrice di poliacrilamide.

Molto spesso per questioni legate all'efficienza di estrazione devono essere utilizzati reagenti/tamponi/condizioni che non sono compatibili con le analisi successive

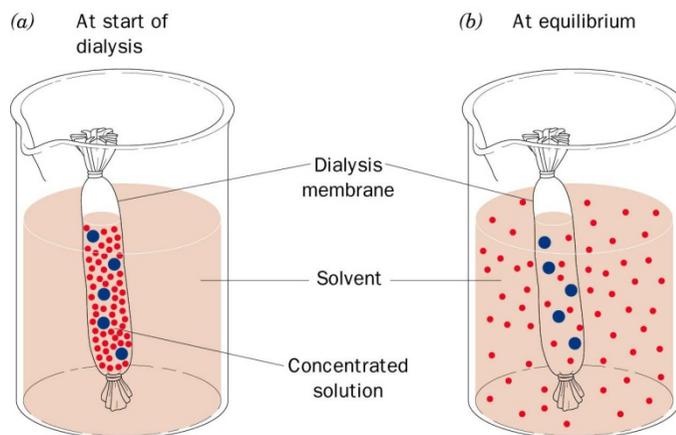
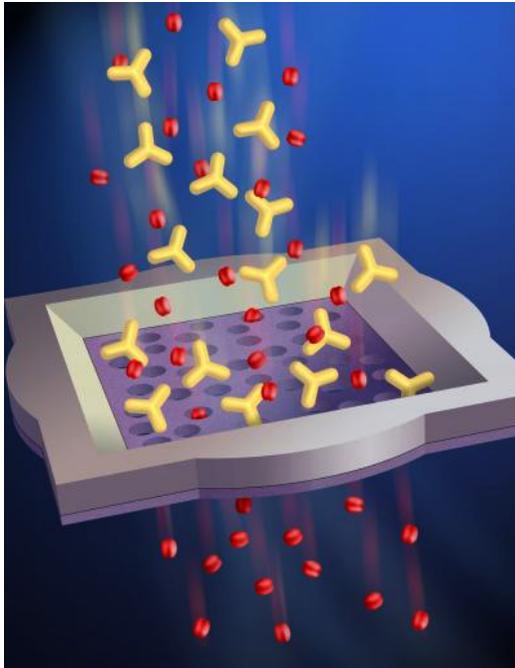
La dove, per qualsiasi ragione non si possa adottare un metodo d'estrazione compatibile con il processo separativo adottato ci sono delle operazioni che possono essere effettuate al fine di rendere compatibile la soluzione proteica con la metodica analitica prescelta.

### **Metodi di condizionamento del campione**

- 1)Dialisi;
- 2)Ultrafiltrazione;
- 3)Precipitazione;
- 4)Cambio del solvente mediante gel permaton/size exclusion chromatography (trattata più avanti)



## DIALISI



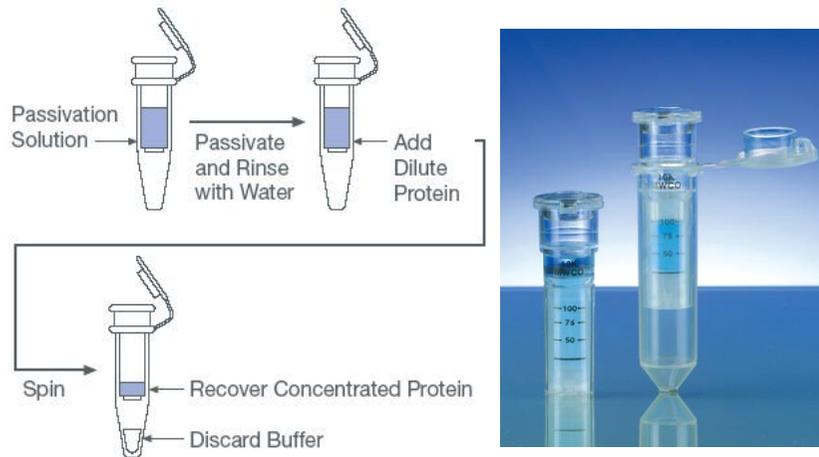
Il processo di dialisi si basa sulla permeabilità selettiva attraverso una membrana.

Ciascuna membrana è caratterizzata da un peculiare valore di “cut-off” ovvero dimensioni delle molecole (peptidi o proteine, solitamente espresso in Da e assumendo una conformazione globulare).

Molecole con una massa inferiore al valore di cut-off sono libere di equilibrarsi ai due lati della membrana, mentre quelle di dimensioni superiori non riescono a passare la membrana e rimangono da un lato o all'interno del sacchetto da dialisi.

Tipico esempio dell'utilizzo della dialisi è per la rimozione di alte concentrazioni saline dal proprio campione proteico. I sali (come ad esempio NaCl) hanno delle dimensioni tali per cui hanno libero passaggio attraverso la membrana da dialisi e si possono quindi equilibrare in modo da rendere la loro concentrazione uguale ai due lati della membrana stessa (Vedasi figura a lato). In questo modo, la concentrazione salina della soluzione dove sono contenute le proteine viene a diminuire. Effettuando vari cambi della soluzione esterna si abbatta sempre più la concentrazione salina del campione proteico. La dialisi può essere anche utilizzata per cambiare il tampone/soluzione nel quale è disciolto un campione proteico.

# ULTRAFILTRAZIONE



Il processo della ultrafiltrazione si basa sempre sulla **permeabilità selettiva** delle molecole attraverso una membrana, quindi è concettualmente molto simile alla DIALISI, ma in questo caso si utilizza la **forza centrifuga** per forzare le proteine attraverso la membrana stessa. Anche in questo caso le membrane da ultrafiltrazione sono caratterizzate da un valore di **cut-off**.

L'ultrafiltrazione può essere utilizzata per:

- **Cambiare** il solvente in cui è sciolto un campione proteico;
- **Ridurre** il volume di un campione proteico;
- **Frazionare**, secondo peso molecolare, un campione proteico. Infatti, a seconda del cut-off scelto, alcune molecole passeranno oltre alla membrana mentre altre no. Effettuando una serie di ultrafiltrazioni utilizzando membrane a cut-off diverso si possono operare dei frazionamenti proteici in base alle dimensioni delle molecole.

Centrifugation Guidelines for Microcon Devices

Ultrafil Membrane	Color Code	Membrane NMWL	NCO		Maximum g-Force	Spin Times* 25 °C**
			SS	DS		
YM-3	Yellow	3,000	10	10	14,000	100
YM-10	Green	10,000	30	20	14,000	30
YM-30	Clear	30,000	60	50	14,000	12
YM-50	Rose	50,000	125	100	14,000	12
YM-100	Blue	100,000	300	125	14,000 500 <sup>1</sup>	12

Membrane caratterizzate da cut-off  
Naturalmente più piccolo è il cut-off – NMWL - (ovvero minori sono le dimensioni dei pori), maggiore sarà il tempo necessario per effettuare l'ultrafiltrazione (Spin Times).

**Attenzione alla compatibilità chimica delle membrane!**

# PRECIPITAZIONE

Con le due metodiche descritte precedentemente non è possibile fare delle distinzioni tra le varie categorie di molecole biologiche (proteine, acidi nucleici etc.). L'unico criterio selettivo è la dimensione delle molecole.

A volte, durante la preparazione del campione, a seconda del tipo di mezzo estrattivo e della particolare procedura utilizzata si ha il campione contaminato da sostanze che interferiscono con le analisi separative, siano esse di tipo elettroforetico che cromatografico.

Inquinanti possono essere:

- 1) DNA
- 2) Lipidi
- 3) Sali
- 4) detergenti
- 5) polisaccaridi



Possono disturbare i processi separativi

Le procedure di precipitazione rendono possibile separare la componente proteica (che precipita) dagli inquinanti (che rimangono in soluzione).

Dove possibile **è preferibile non adottare** tale procedura poichè:

- 1) non è detto che l'efficienza di precipitazione sia uguale per tutte le proteine => alterazione del campione;
- 2) Non è detto che tutte le proteine precipitate siano facilmente riportabili in soluzione => alterazione del campione.

NB: Vale sempre la regola generale per cui meno passaggi subisce il campione meglio è ai fini dell'obiettivo finale: **avere un campione il più possibile rappresentativo in termini di composizione proteica rispetto al materiale di partenza.**

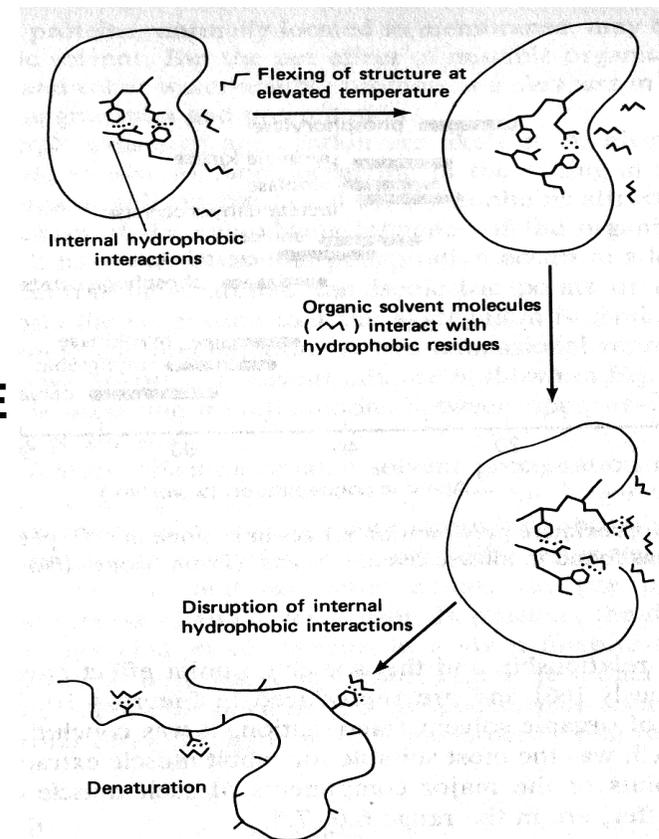
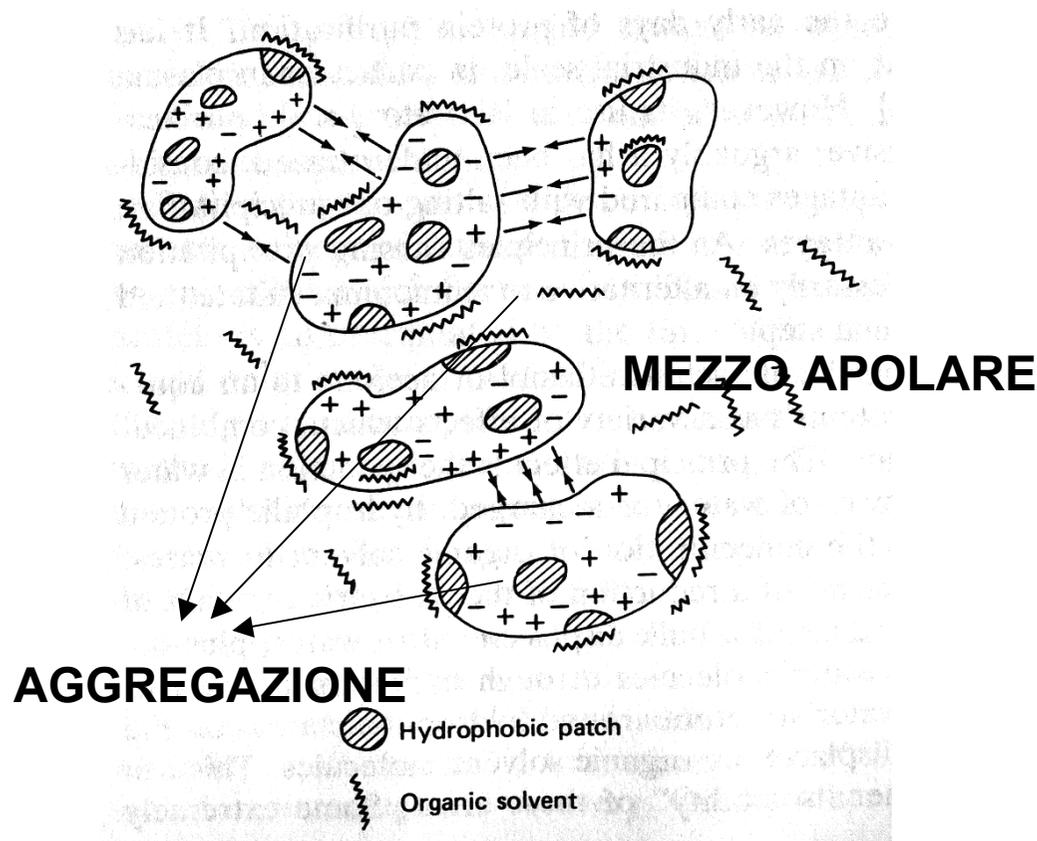
**TABLE 7. PRECIPITATION PROCEDURES**

<b>Precipitation method</b>	<b>General procedure</b>	<b>Limitations</b>
<b>Ammonium sulphate precipitation</b> ("Salting out") In the presence of high salt concentrations, proteins tend to aggregate and precipitate out of solution. Many potential contaminants (e.g., nucleic acids) will remain in solution.	Prepare protein so final concentration of the protein solution is >1 mg/ml in a buffer solution that is >50 mM and contains EDTA. Slowly add ammonium sulphate to the desired percent saturation [41] and stir for 10–30 minutes. Pellet proteins by centrifugation.	Many proteins remain soluble at high salt concentrations, so this method is not recommended when total protein representation is desired. This method can, however, be used for prefractionation or enrichment. Residual ammonium sulphate will interfere with IEF and must be removed [42]. See section 2.4 on removal of salts.
<b>TCA precipitation</b> TCA (trichloroacetic acid) is a very effective protein precipitant.	TCA is added to the extract to a final concentration of 10–20% and the proteins are allowed to precipitate on ice for 30 minutes [43]. Alternatively, tissue may be homogenized directly into 10–20% TCA [32,44]. This approach limits proteolysis and other protein modifications. Centrifuge and wash pellet with acetone or ethanol to remove residual TCA.	Proteins may be difficult to resolubilize and may not resolubilize completely. Residual TCA must be removed by extensive washing with acetone or ethanol. Extended exposure to this low-pH solution may cause some protein degradation or modification.
<b>Acetone precipitation</b> This organic solvent is commonly used to precipitate proteins. Many organic-soluble contaminants (e.g., detergents, lipids) will remain in solution.	Add at least 3 volumes of ice-cold acetone to the extract. Allow proteins to precipitate at –20 °C for at least 2 hours. Pellet proteins by centrifugation [43,45–47]. Residual acetone is removed by air drying or lyophilization.	
<b>Precipitation with TCA in acetone</b> The combination of TCA and acetone is commonly used to precipitate proteins during sample preparation for 2-D electrophoresis and is more effective than either TCA or acetone alone.	Suspend lysed or disrupted sample in 10% TCA in acetone with either 0.07% 2-mercaptoethanol or 20 mM DTT. Precipitate proteins for at least 45 minutes at –20 °C. Pellet proteins by centrifugation and wash pellet with cold acetone containing either 0.07% 2-mercaptoethanol or 20 mM DTT. Remove residual acetone by air drying or lyophilization [4,25,31,40,48,49].	Proteins may be difficult to resolubilize and may not resolubilize completely. Extended exposure to this low-pH solution may cause some protein degradation or modification.
<b>Precipitation with ammonium acetate in methanol following phenol extraction</b> This technique has proven useful with plant samples containing high levels of interfering substances.	Proteins in the sample are extracted into water- or buffer-saturated phenol. Proteins are precipitated from the phenol phase with 0.1 M ammonium acetate in methanol. The pellet is washed several times with ammonium acetate in methanol and then with acetone. Residual acetone is evaporated [39,40,44,50].	The method is complicated and time consuming.

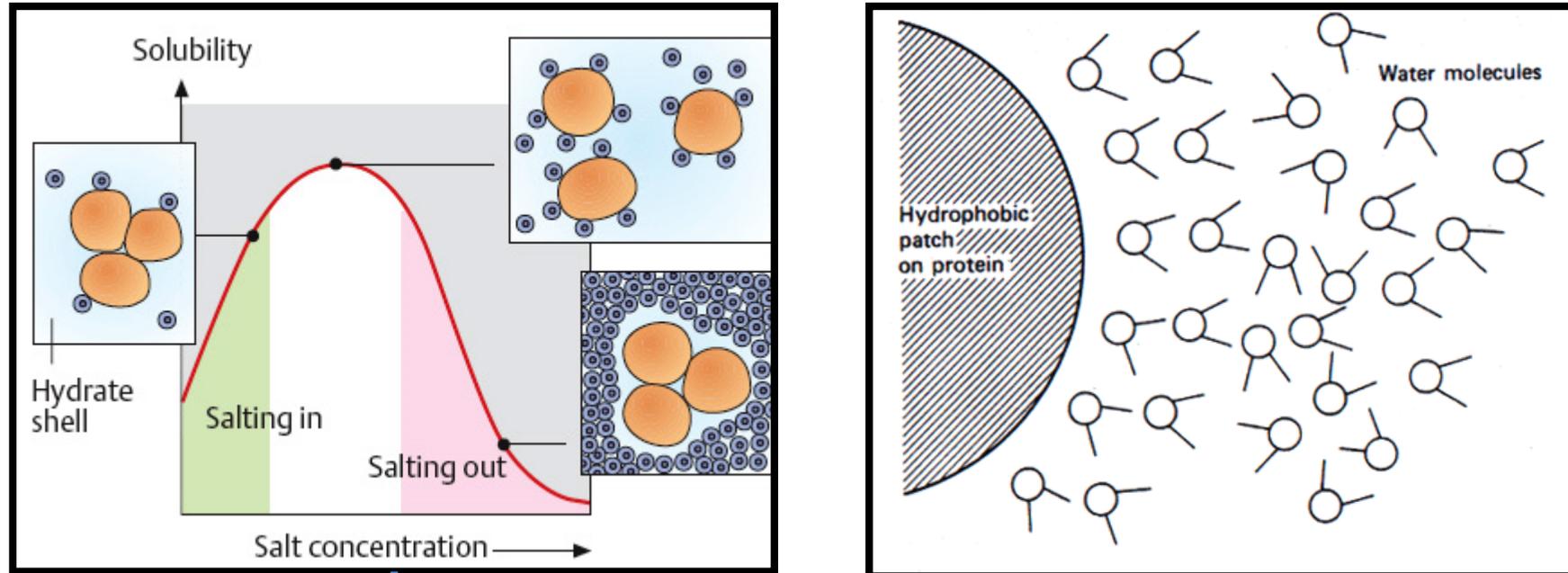
## PRECIPITAZIONE CON SOLVENTI ORGANICI

Le proteine nella loro forma nativa presentano una superficie con un carattere prevalentemente idrofilico e un interno prevalentemente idrofobico. In un tampone fisiologico esse rimangono in soluzione grazie all'acqua che forma legami idrogeno con i residui presenti sulla loro superficie.

Cambiare il mezzo in cui sono disciolte con un solvente organico apolare preservando la loro struttura terziaria (basse temperature) porta ad fare in modo che le porzioni idrofiliche si aggregino. Sostanzialmente si ha un effetto opposto all'effetto idrofobico durante la strutturazione delle proteine.



## Precipitazione attraverso il Salting out



A basse concentrazioni saline, i sali schermano le cariche presenti sulla superficie delle proteine ed in tal modo prevengono interazioni tra cariche di segno opposto che andrebbero a favorire l'aggregazione proteica e quindi la precipitazione. L'aggiunta di piccole quantità di sali favorisce quindi il mantenimento in soluzione di una proteina, fenomeno noto come **“salting in”**.

Ad elevate concentrazioni saline, gli ioni del sale aggiunto “sequestrano” l'acqua che prima era impegnata nel creare una sfera di idratazione attorno alle proteine. In questo modo l'acqua non può più schermare regioni idrofobiche superficiali che venendo a contatto provocano la precipitazione delle proteine, fenomeno noto come **“salting out”**.

Le concentrazioni saline da utilizzare per far precipitare le proteine dipendono strettamente dalle singole proteine, poiché ciascuna di esse ha delle caratteristiche superficiali diverse.

=>

Si può utilizzare il “salting out” come metodo per il frazionamento selettivo delle proteine: utilizzare concentrazioni saline crescenti per far precipitare in modo differenziale le proteine (anche questo può esser visto come un metodo di prefrazionamento).

## PREPARAZIONE DEL CAMPIONE per ANALISI CROMATOGRAFICHE ed ELETTROFORETICHE

Nella preparazione del campione bisogna tener conto della sensibilità del metodo di rilevazione che verrà utilizzato. Ovvero si deve poter caricare nell'analisi elettroforetica o cromatografica una quantità sufficiente da permettere la rilevazione di quello che vogliamo vedere.

**In generale quindi è necessario che il campione sia :**

- **ad una concentrazione opportuna**  
⇒ precipitazione, evaporazione, liofilizzazione, ultrafiltrazione, etc
- **il più possibile privo di interferenti**  
⇒ metodica estrazione selettiva, precipitazione, ultrafiltrazione, etc
- **sciolto in un mezzo che non danneggi il gel o la colonna cromatografica**  
⇒ conoscenza del sistema separativo utilizzato
- **sciolto in un mezzo compatibile con la metodica separativa prescelta**  
⇒ conoscenza del processo separativo utilizzato

## Preparazione del Campione: FASP – Filter Aided Sample Preparation

