

Determinazione della concentrazione proteica

Perché è necessario sapere la concentrazione di una soluzione proteica?

Sostanzialmente per avere un controllo dei sistemi biologici sotto indagine.

Esempi:

- a) Per stabilire la costante d'affinità tra due molecole;
- b) Per studiare l'attività di un enzima;
- c) Per valutare cambiamenti nei livelli d'espressione;
- d) Per riuscire a riprodurre un saggio biologico dove era richiesta la presenza di una specifica quantità di uno specifico fattore/estratto proteico;
- e) etc.

In proteomica

Analisi comparativa => essenziale il controllo delle quantità che si vanno confrontando!

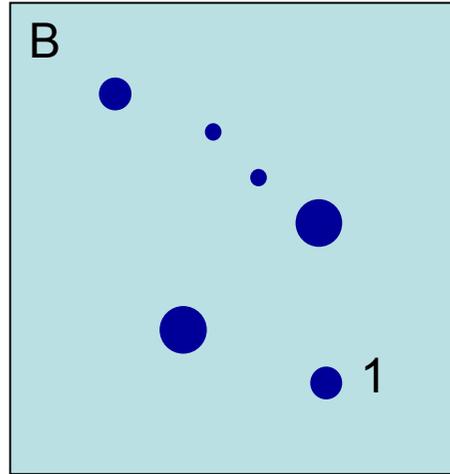
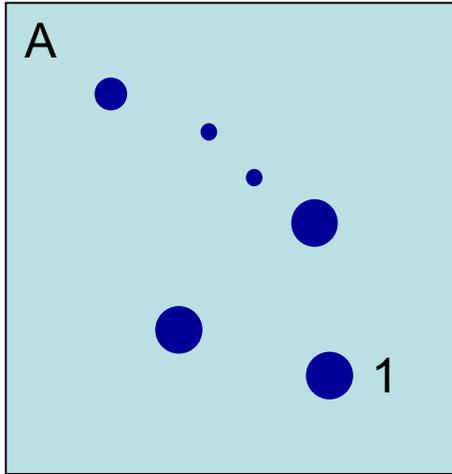
Anche se esistono dei metodi per riuscire ad ottenere informazioni circa l'abbondanza relativa di una proteina rispetto al totale delle proteine espresse/rilevate, partire da quantità equivalenti semplifica notevolmente l'analisi dei dati.

Scelta del metodo di analisi/rilevamento in funzione della quantità a disposizione

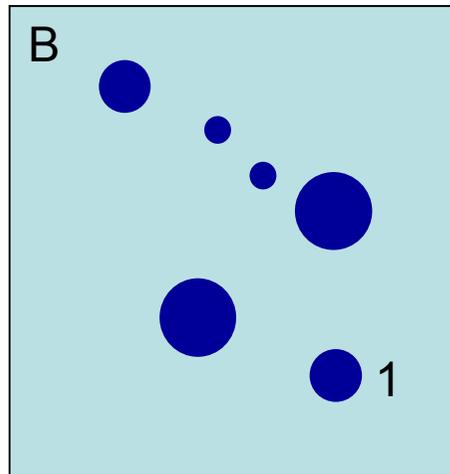
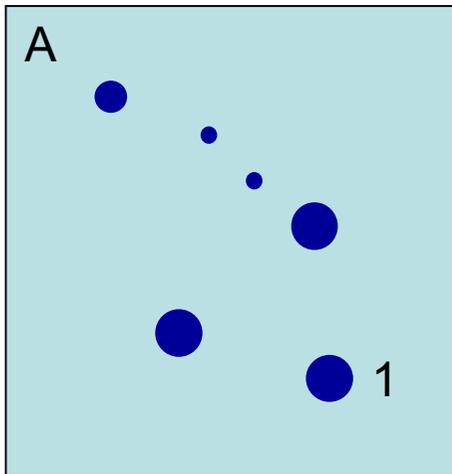
Rischio di non riuscire a visualizzare il campione poiché si ricade sotto la soglia di rilevabilità del metodo adottato

Non incorrere in problemi tecnici dovuti alla quantità di campione analizzata

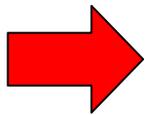
Esempio: precipitazione delle proteine durante le analisi elettroforetiche dovuta a sovra caricamento, bassa risoluzione in separazioni cromatografiche dovute a sovra caricamento, etc.



Quantità proteiche normalizzate: stessa quantità analizzata mediante elettroforesi in A e in B => dal confronto diretto tra gli spot presenti in A e quelli presenti in B, dall'intensità degli spot (vedasi avanti) si possono effettuare delle valutazioni circa la variazione dell'abbondanza di alcune proteine (nell'esempio la proteina 1 e più abbondante in A rispetto a B (A e B rappresentano due situazione/stati di cui si confronta il pattern proteico))



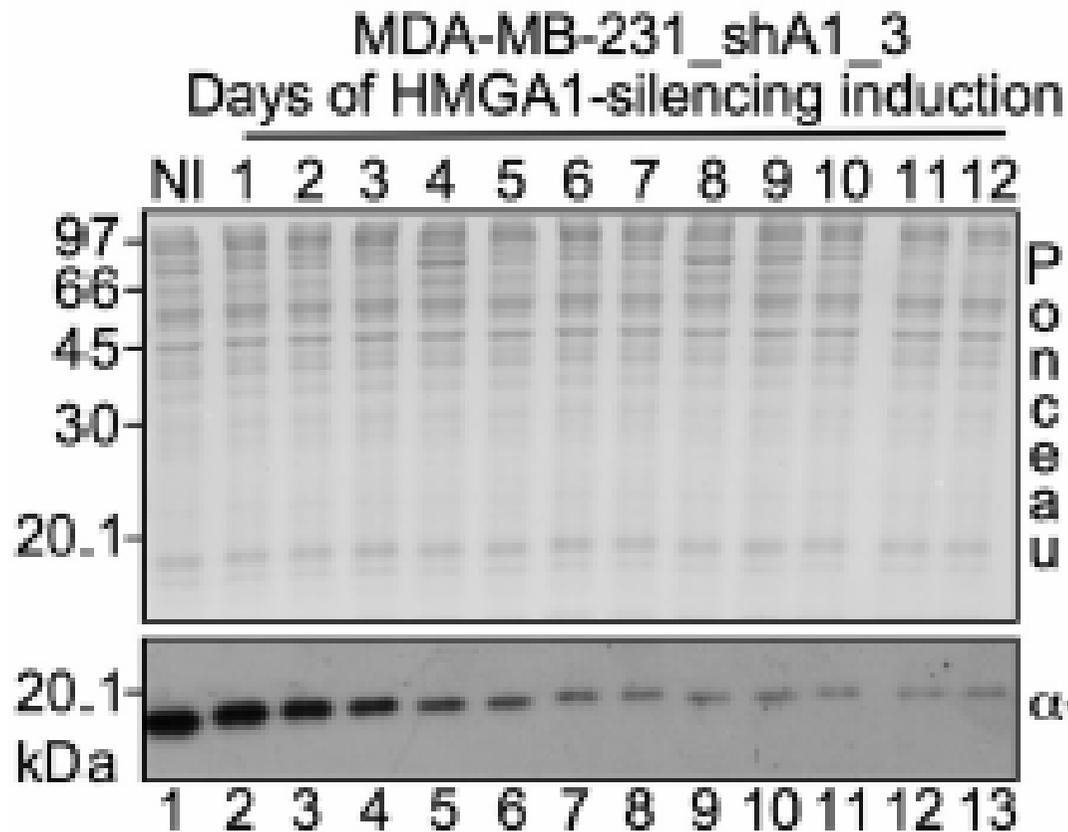
Quantità proteiche non normalizzate: diversa quantità analizzata mediante elettroforesi in A e in B => dal confronto diretto tra gli spot presenti in A e quelli presenti in B, dall'intensità degli spot (vedasi avanti) non si possono effettuare delle valutazioni circa la variazione dell'abbondanza di nessuna delle proteine presenti.



Come si procede nel caso di campioni non normalizzati:

- 1) Valutazione di tutte le intensità degli spot presenti e calcolo del totale (100%)
- 2) Lo spot 1 che % rappresenta rispetto al totale in ognuno dei due stati (A & B)?

Alla fine il risultato deve essere lo stesso!



VERIFICA della
normalizzazione

=>

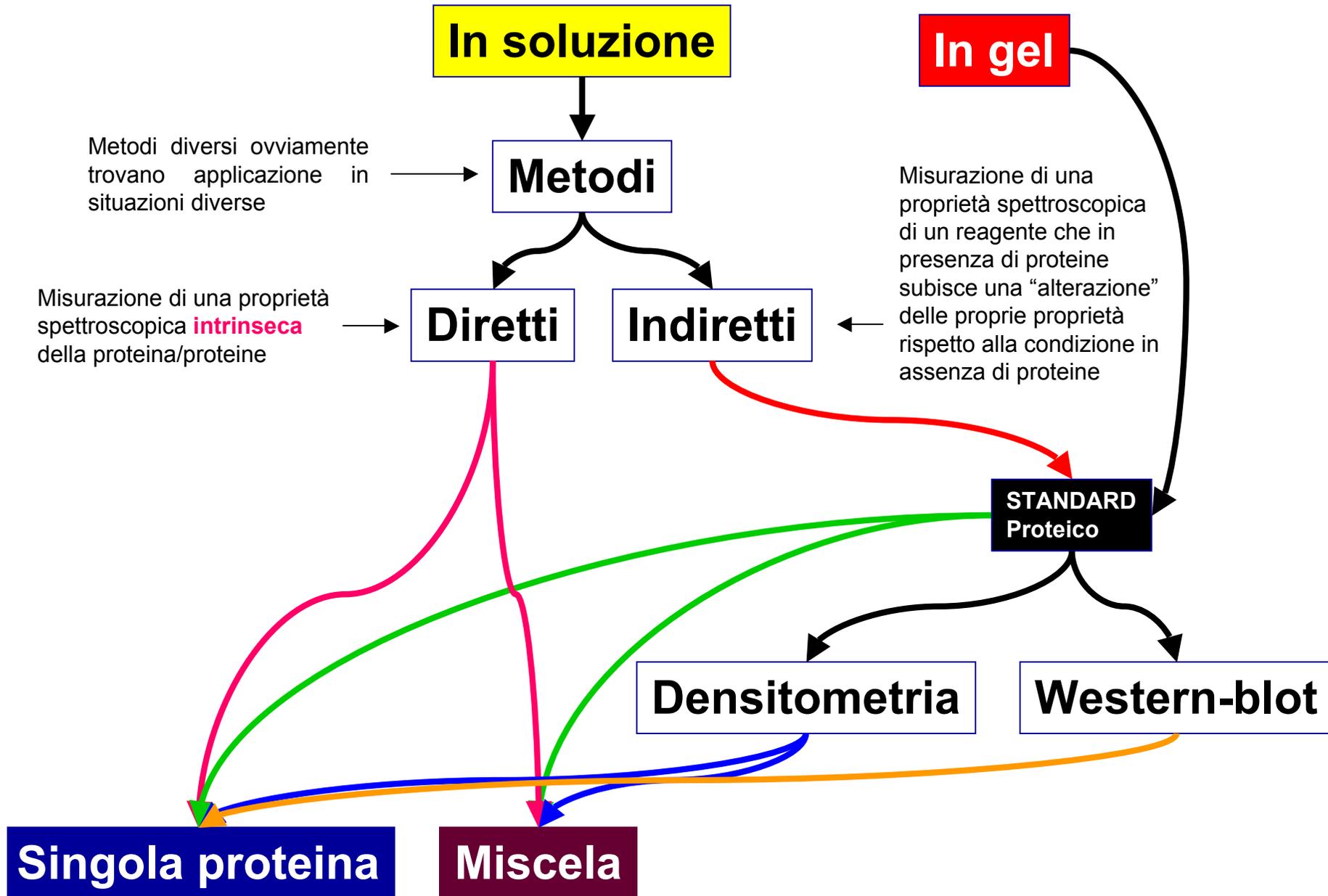
Di tutti i campioni è stata
 caricata la medesima
 quantità di proteine totali

RISULTATO: l'espressione della proteina HMGA1 viene progressivamente silenziata dall'induzione dello shA1_3

Da questa immagine si può anche costruire un grafico in cui vengono riportati i rapporti tra:

Intensità banda WB / Intensità tracciato intero proteine totali in WB (valori densitometrici)

Metodi per la determinazione della concentrazione Proteica e per la normalizzazione di campioni



Spettrofotometria - Assorbanza

The absorption of UV or visible radiation corresponds to the excitation of outer electrons. When an atom or molecule absorbs energy, electrons are promoted from their ground state to an excited state.

In a molecule, the atoms can rotate and vibrate with respect to each other. These vibrations and rotations also have discrete energy levels.

Legge di Lambert-Beer

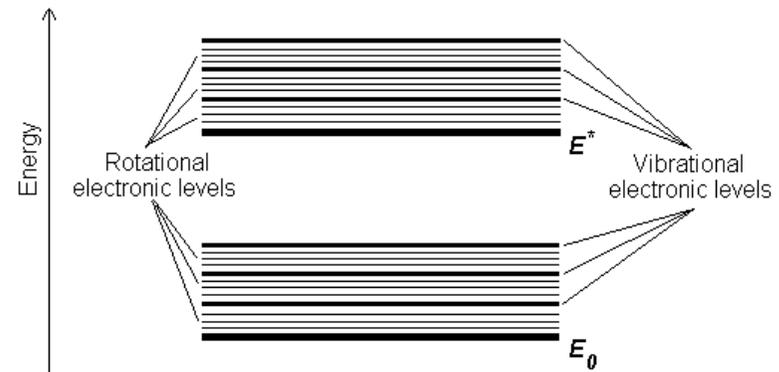
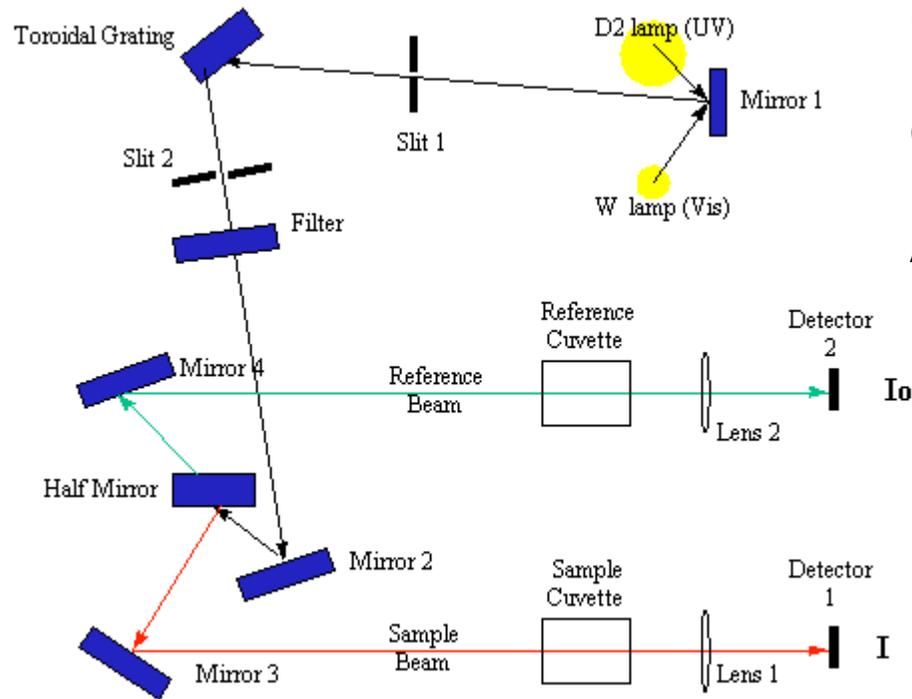
$$A = \epsilon l c$$

ϵ : coefficiente d'estinzione molare 1/cm[M]

l : cammino ottico (cm)

c : concentrazione [M]

$$A = \log_{10} (I_0/I)$$



IN SOLUZIONE – Metodi spettrofotometrici diretti

Metodo diretto: si basa su di una proprietà **intrinseca** della proteina

Metodo di Waddel:

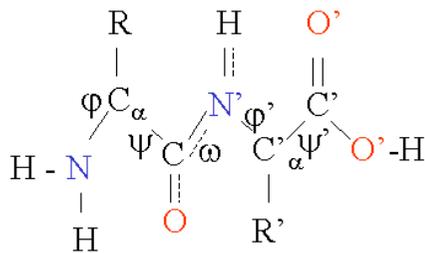
Metodo spettrofotometrico: si basa sull'**assorbimento** del legame peptidico (assorbe attorno ai 230-210 nm)

Relazione assorbimento/concentrazione: $[P] \text{ (ug/mL)} = (A_{215} - A_{225}) \times 144$ (A= assorbanza)

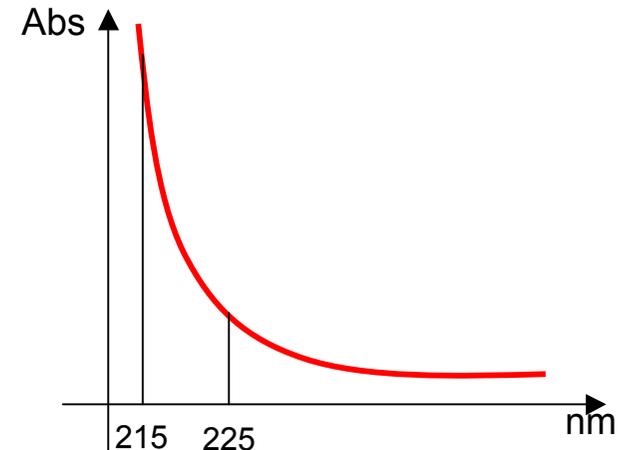
Intervallo di utilizzo: **1.5-45 ug/mL**

Principale campo d'applicazione: Determinazione della [P] di soluzioni "pure" di proteine

Svantaggi: molte molecole assorbono alle lunghezze d'onda utilizzate (215 e 225 nm). Praticamente inutilizzabile la dove siano presenti altre molecole oltre alle proteine (estratti) e la dove non si possa sottrarre con estrema precisione il contributo del solvente (bianco) in cui è sciolta la proteina.



NB: il coefficiente 144, che unisce la differenza di assorbimento a 215 e 225 nm è stato determinato empiricamente andando ad analizzare un numero molto elevato di proteine a **concentrazione nota**.



IN SOLUZIONE – Metodi spettrofotometrici diretti

Metodo di Warburg and Christian:

Metodo spettrofotometrico: si basa sull'**assorbimento** degli aa aromatici (F, Y e W)

Relazione assorbimento/concentrazione: $[P] \text{ (mg/mL)} = A_{280} \times F \times 1/d$

d: cammino ottico in cm / F (vedasi tabella sotto): coefficiente calcolato sulla base del rapporto A_{280}/A_{260}

Intervallo di utilizzo: **20-500 ug/mL**

Principale campo d'applicazione: Determinazione della [P] di soluzioni "pure" di proteine

Svantaggi: molte molecole assorbono alle lunghezze d'onda utilizzate (280 nm). Praticamente inutilizzabile la dove siano presenti altre molecole oltre alle proteine (estratti) e la dove non si possa sottrarre con estrema precisione il contributo del solvente (bianco) in cui è sciolta la proteina. Una delle principali molecole che interferisce con questo metodo è il DNA, che ha un picco d'assorbimento che parzialmente si sovrappone a quello dei residui aromatici. Per questo motivo si utilizza la lettura a 260 nm al fine di determinare il fattore F da utilizzare nel metodo. NB: proteine con composizioni aa molto sbilanciate per contenuto di W, Y e F daranno delle concentrazioni fortemente sovrastimate.

NB:

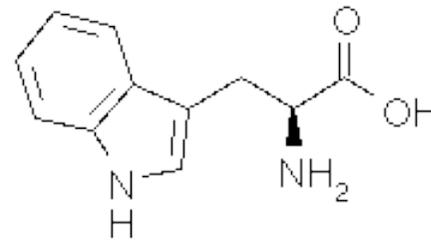
Questi due metodi sono metodi **empirici**. La relazione tra assorbanza e concentrazione è stata stabilita sperimentalmente. I coefficienti utilizzati derivano da una sorta di "media" di tutti gli esperimenti condotti.

IN SOLUZIONE – Metodi spettrofotometrici diretti

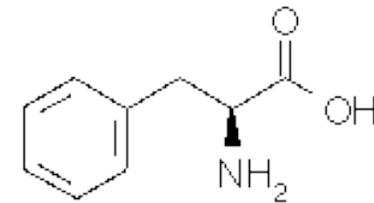
Metodo di Warburg and Christian:

Tabella coefficiente F

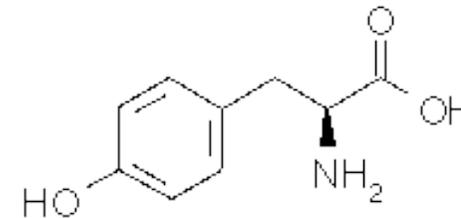
$A_{280,260}$	Nucleic acid %	F
1.75	0.0	1.116
1.52	0.5	1.054
1.36	1.0	0.994
1.16	2.0	0.899
1.03	3.0	0.814
0.939	4.0	0.743
0.874	5.0	0.682
0.822	6.0	0.632
0.784	7.0	0.585
0.753	8.0	0.545
0.730	9.0	0.508
0.705	10.0	0.478
0.645	14.0	0.377
0.595	20.0	0.278



trp w Tryptophan

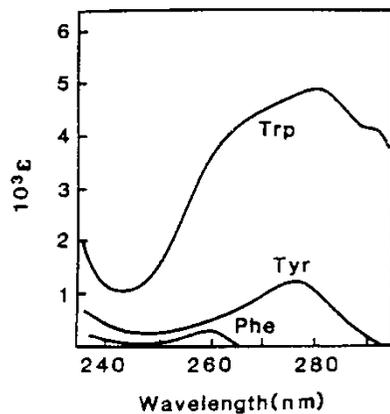


phe f Phenylalanin

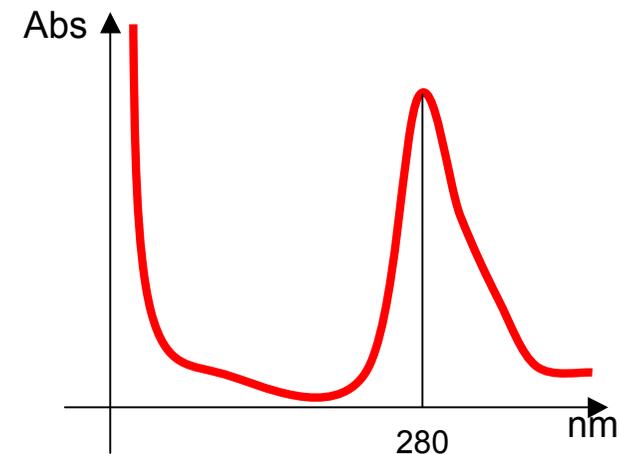


tyr y Tyrosin

Il rapporto 280/260 calcolato sulla base dello spettro di assorbimento misurato determina la percentuale di acidi nucleici (contaminante) presente nel campione.



Confronto tra i coefficienti d'estinzione molare di W, Y e F e i loro spettri d'assorbimento. Come si evince, il Trp ha un coefficiente maggiore di Tyr e la Phe ha uno spettro di assorbimento con un picco spostato a 260.



IN SOLUZIONE – Metodi spettrofotometrici diretti

Utilizzo diretto dei coefficienti di estinzione molare di W, Y e F

Metodo spettrofotometrico: si basa sul calcolo del coefficiente d'estinzione molare della proteina d'interesse sulla base del numero di residui W e Y (280nm)

Relazione assorbimento/concentrazione: $A = \epsilon \times l \times c$ (legge di Lambert-Beer)

Intervallo di utilizzo: secondo la linearità della legge di Lambert-Beer

Principale campo d'applicazione: Determinazione della [P] di soluzioni "pure" di proteine

Svantaggi: Assolutamente non applicabile a miscele di proteine e a proteine ad identità non nota. Anche se è in teoria calcolare il coefficiente d'estinzione molare sulla base del numero di aa aromatici e sui loro valori di coefficiente d'estinzione molare bisogna calcolare che questi coefficienti sono calcolati a partire da aa singoli e che quando questi sono inseriti nelle proteine vengono a trovarsi in un ambiente completamente diverso e pertanto anche il loro coefficiente d'estinzione molare risulterà diverso e dipendente dallo specifico intorno molecolare che è diverso per ciascuna proteina. In pratica con questo metodo si rischia di effettuare grossi errori nella valutazione della concentrazione proteica.

NB: Il coefficiente di estinzione molare di qualsiasi molecola dipende dal mezzo in cui è stata effettuata la misurazione. Per quanto riguarda una molecola in condizioni native, gli aa esterni possono essere considerati praticamente in acqua, mentre per quanto riguarda quelli interni, il loro ambiente è molto diverso da un ambiente acquoso in quanto esso è costituito dai residui aa adiacenti (stesso discorso valido per la fluorescenza).

IN SOLUZIONE – Metodi spettrofotometrici indiretti

Sfruttano peculiari proprietà spettroscopiche di molecole che si legano alle proteine oppure delle “**trasformazioni**” indotte dalla presenza di residui aa



Requisiti:

- 1) M: Proprietà spettroscopiche diverse quando **M**, Proteina/**M**, o **M***
- 2) Nel caso di Proteina/**M**, tutta la Proteina deve essere complessata con M per ottenere questo M deve essere in largo eccesso rispetto a proteina
- 3) M non deve avere una selettività diversa per le diverse proteine (comportamento uniforme con tutte le proteine)
- 4) Necessario costruire una curva di calibrazione utilizzando una proteina a concentrazione nota

IN SOLUZIONE – Metodi spettrofotometrici indiretti

4 metodi:

- 1)Lowry
- 2)BCA – bicinchoninic acid
- 3)Biureto (poco utilizzato)
- 4)Bradford

Quale metodo scegliere?

⇒valutare la compatibilità con la soluzione proteica

- Tre metodi (Lowry, BCA e Biureto) sono basati sull'utilizzo di Cu^{++} e quindi la presenza di reagenti che chelano il rame non sono compatibili con essi.
- Inoltre sempre questi tre si basano su reazioni di ossido-riduzione, quindi neanche la presenza di reagenti riducenti non è compatibile con loro.
- La presenza di detergenti (fino al 5%) è compatibile con il metodo BCA.
- I metodi di Lowry, BCA e Bradford sono maggiormente adatti alla determinazione di concentrazioni proteiche basse (1-2000 microg/mL).

⇒Attenzione a valutare le incompatibilità di ciascun metodo!

La concentrazione proteica ottenuta con questi metodi è strettamente dipendente dal tipo di proteina utilizzata per costruire la curva di calibrazione e dalla composizione proteica del campione sotto indagine poichè ciascuno di essi si basa su delle particolari proprietà di legame/reazione di una molecola nei confronti di particolari gruppi delle proteine, la cui presenza/abbondanza può variare a seconda del campione sotto indagine.

IN SOLUZIONE – Metodi spettrofotometrici indiretti

Metodo del Biureto

Metodo spettrofotometrico indiretto: si basa sulla lettura spettrofotometrica a 540 nm. Non è tempo dipendente.

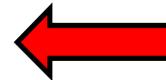
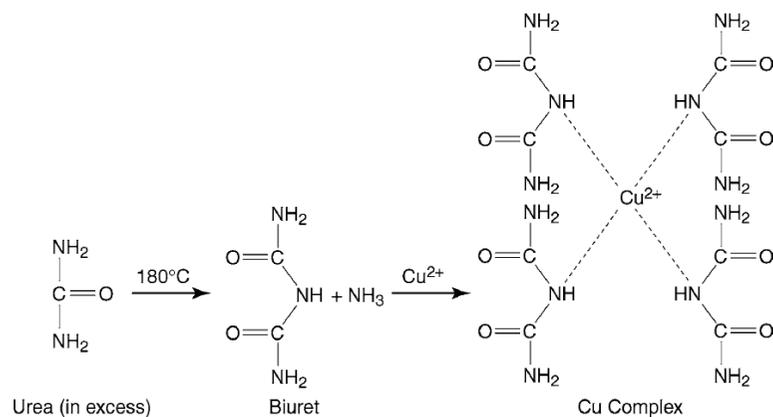
Relazione assorbimento/concentrazione: **determinata mediante curva di calibrazione con standard a concentrazione nota**

Intervallo di utilizzo: 5-160 mg/mL

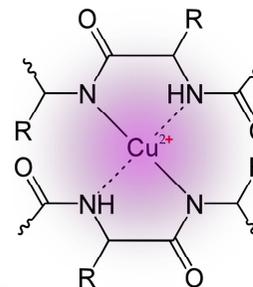
Principale campo d'applicazione: Determinazione della [P] di soluzioni proteiche

Svantaggi:

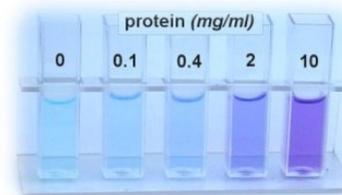
- dipende dal pH (il pH deve essere alcalino)
- attenzione ai diversi componenti che interferiscono (chelanti Cu, agenti riucenti, etc.)



In pratica lo stesso avviene con il legame peptidico. Questo complesso ha un colore violetto e quindi assorbe circa a 540 nm

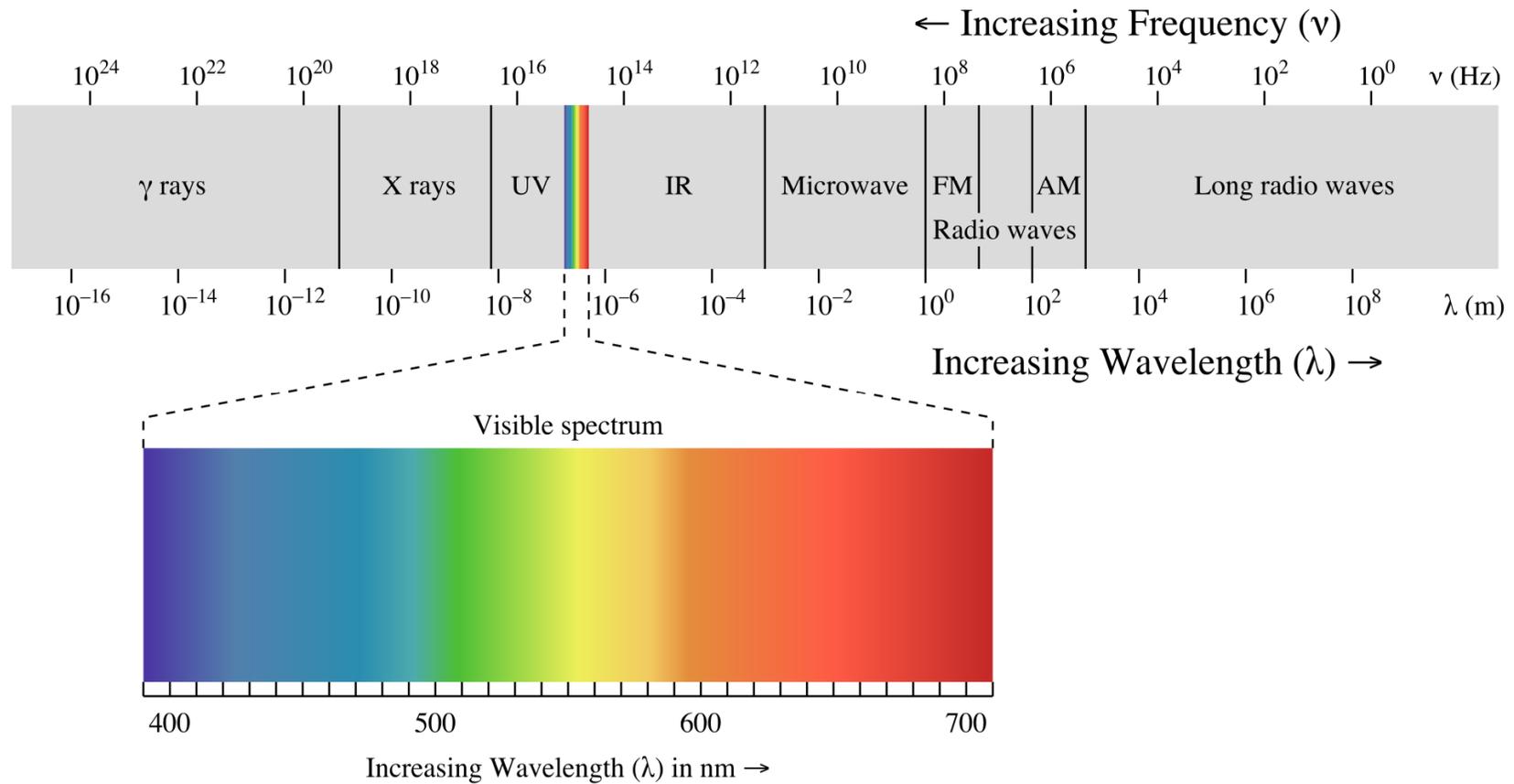


NB: In queste condizioni il Cu^{++} viene poi ridotto a Cu^+



← Esempio di una curva di calibrazione

Lunghezze d'onda delle varie radiazioni elettromagnetiche



IN SOLUZIONE – Metodi spettrofotometrici indiretti

Metodo di Lowry:

Metodo spettrofotometrico indiretto: si basa sulla lettura spettrofotometrica a 750 o 550 nm (vedasi metodo del Biureto). Non è tempo dipendente.

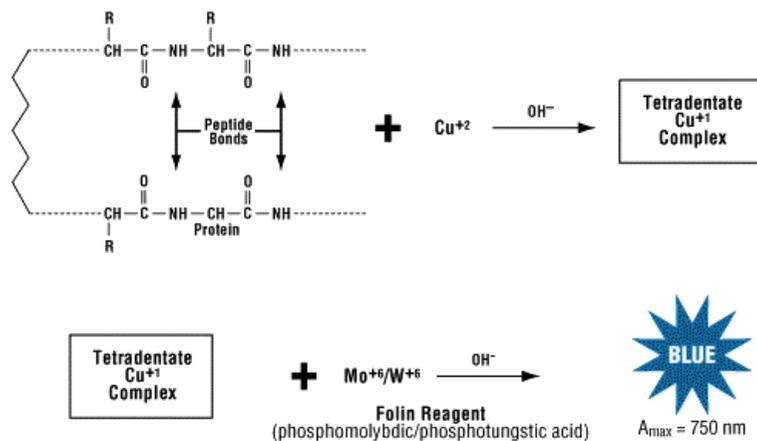
Relazione assorbimento/concentrazione: **determinata mediante curva di calibrazione con standard a concentrazione nota**

Intervallo di utilizzo: $\approx 1-1000$ microg/mL

Principale campo d'applicazione: Determinazione della [P] di soluzioni proteiche

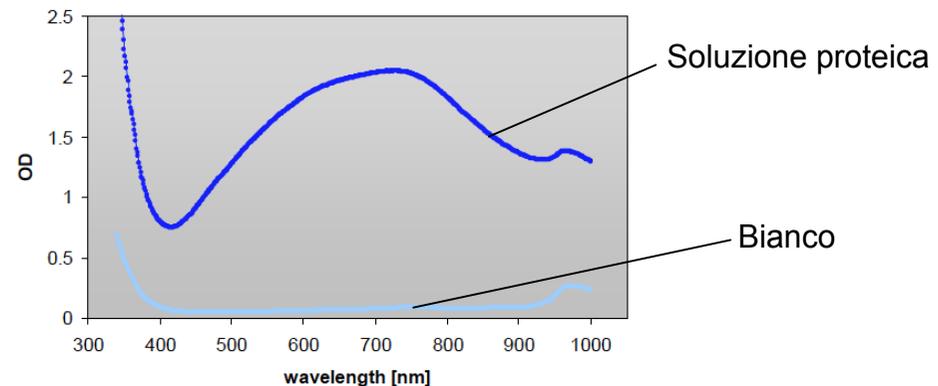
Svantaggi:

- dipende dalla presenza di residui aromatici (soprattutto **Tyr e Trp**)
- dipende dal pH (alcalino)
- non lineare ad elevate concentrazioni
- attenzione ai diversi componenti che interferiscono (buffer, carboidrati, acidi nucleici etc, chelanti Cu, agenti riducenti)



Il metodo sfrutta il metodo del Biureto aggiungendo un'altra reazione.

Il Cu^+ catalizza la riduzione del reagente di Folin con la concomitante ossidazione dei residui aromatici (tirosina e triptofano)



IN SOLUZIONE – Metodi spettrofotometrici indiretti

COSTRUZIONE di una curva di CALIBRAZIONE

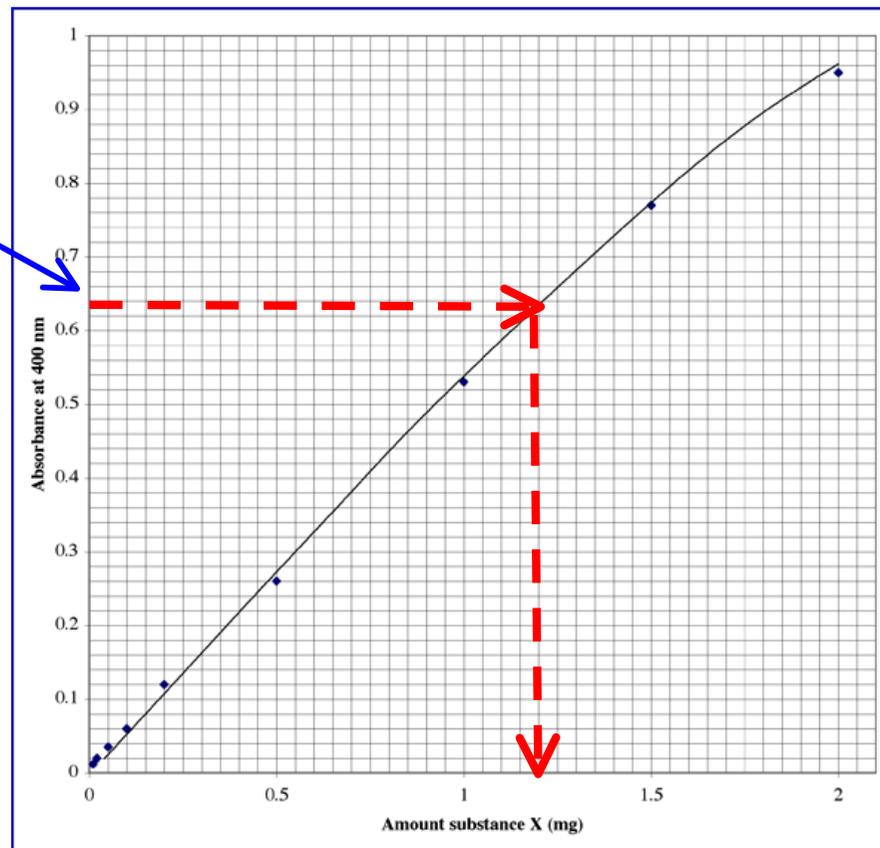
Con il metodo spettrofotometrico indiretto prescelto vengono fatte delle letture con soluzioni proteiche a **concentrazione nota**. Si riportano quindi i valori di **assorbanza** contro le rispettive **concentrazioni**.

Interpolando i punti si ottiene la curva di calibrazione.

Leggendo quindi il valore di assorbanza della soluzione proteica a concentrazione incognita si può risalire, tenendo conto delle diluizioni effettuate, alla sua concentrazione proteica. **Importante: la lettura fatta da la concentrazione della soluzione misurata e non della soluzione madre di cui si vuole determinare la concentrazione.**

Valore di assorbanza
delle soluzione
proteica a
concentrazione
incognita

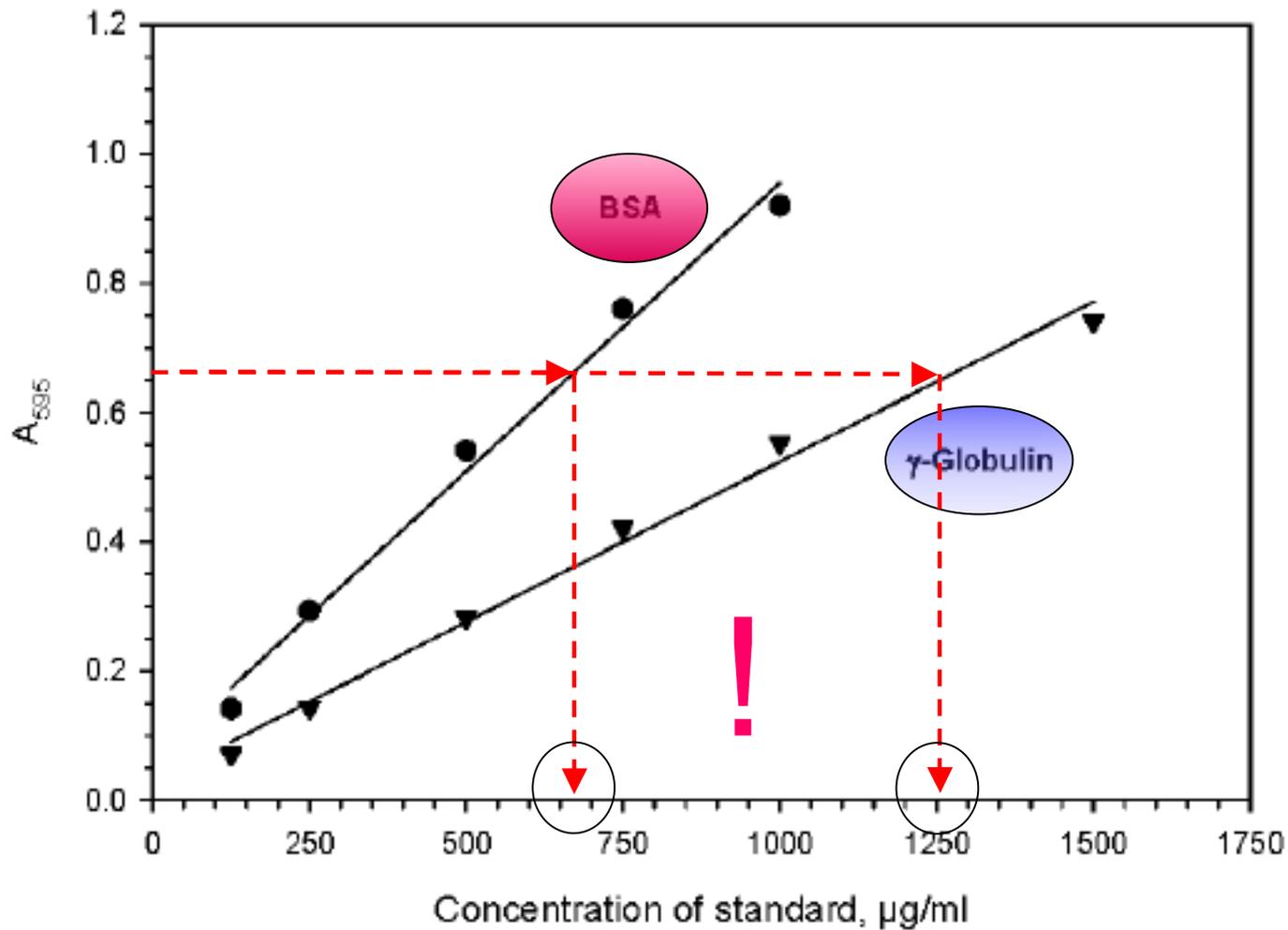
ASSORBANZA



CONCENTRAZIONE

COSTRUZIONE di una curva di CALIBRAZIONE

Curve di calibrazioni diverse in dipendenza della proteina utilizzata come standar proteico



IN SOLUZIONE – Metodi spettrofotometrici indiretti

Metodo BCA (bicinchoninic acid)

Metodo spettrofotometrico indiretto: si basa sulla lettura spettrofotometrica a 562 nm. La formazione del complesso BCA/Cu¹⁺ è tempo dipendente e quindi anche l'assorbanza varia nel tempo.

Relazione assorbimento/concentrazione: **determinata mediante curva di calibrazione con standard a concentrazione nota**

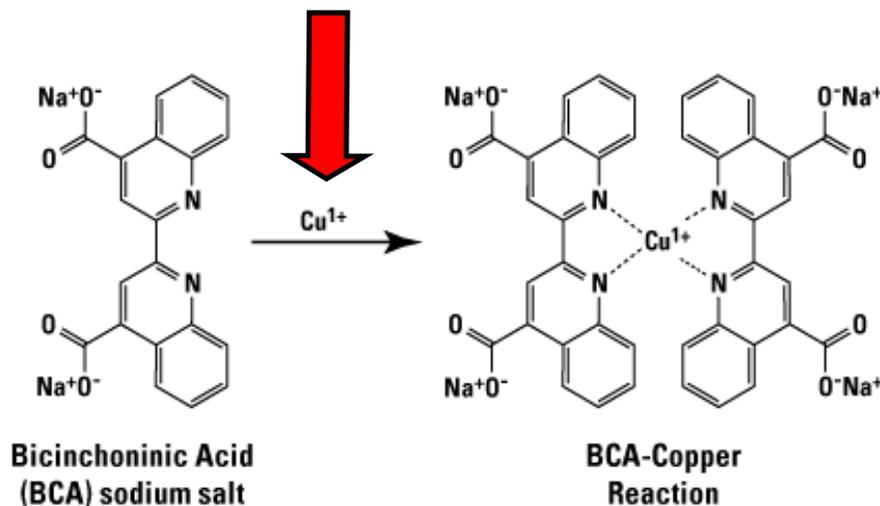
Intervallo di utilizzo: 25-2000 microg/mL

Principale campo d'applicazione: Determinazione della [P] di soluzioni proteiche

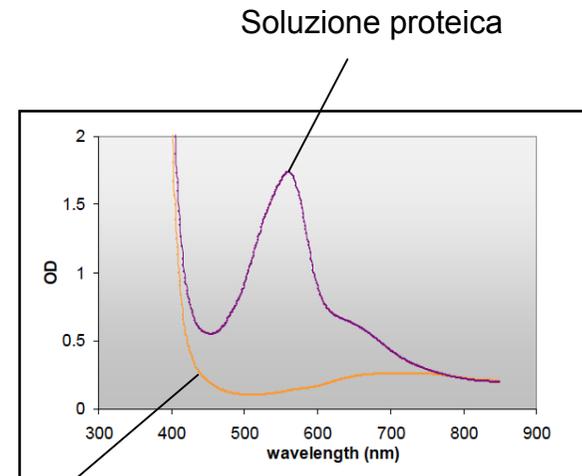
Svantaggi:

- dipende dal pH (alcalino)
- attenzione ai diversi componenti che interferiscono (chelanti Cu, agenti riucanti, lipidi, catecolamine, etc.)

Formazione di Cu⁺: Uguale prima parte del Lowry/Biuretto



Abs 562 nm



IN SOLUZIONE – Metodi spettrofotometrici indiretti

Metodo Bradford

Metodo spettrofotometrico indiretto: si basa sulla lettura spettrofotometrica a 595 nm

Relazione assorbimento/concentrazione: **determinata mediante curva di calibrazione con standard a concentrazione nota**

Intervallo di utilizzo: 1.25 - 10 / 125-1500 microg/mL (due tipi di saggi diversi)

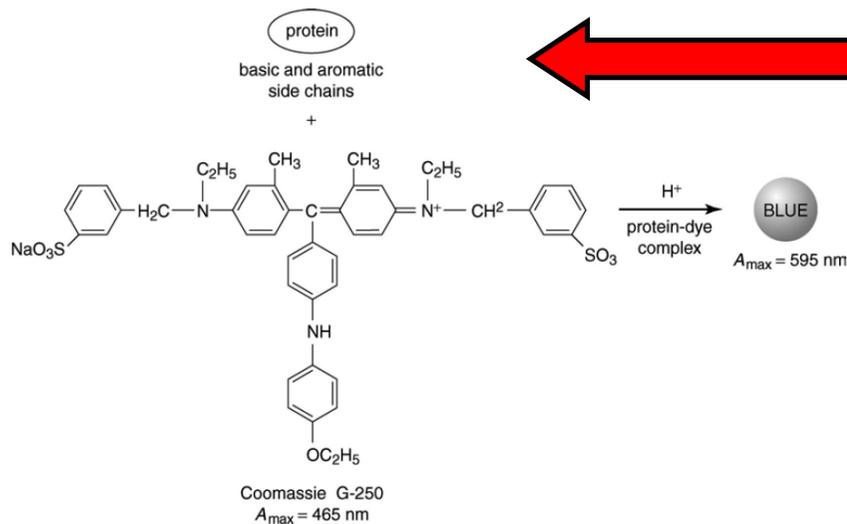
Principale campo d'applicazione: Determinazione della [P] di soluzioni proteiche

Svantaggi:

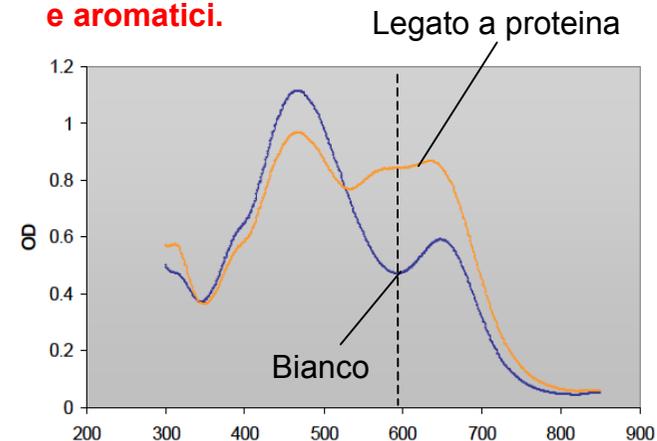
- sensibile ai detergenti (causano precipitazione del blue coomassie (il colorante utilizzato) e al pH (ottimale pH acido). Non funziona con proteine a basso peso molecolare (< 3000 Da).

Vantaggi:

- compatibile con la maggior parte dei reagenti utilizzati per l'estrazione delle proteine (sali, solventi, tamponi etc.)



Attenzione: il legame è influenzato fortemente dalla presenza di residui basici e aromatici.



Alcune compatibilità - ciascun metodo ha delle limitazioni specifiche

(controllare la composizione della propria soluzione da sottoporre a determinazione della concentrazione proteica)

Substance tested	BCA method	Coomassie plus method	Modified Lowry method
<i>Detergents</i>			
Brij 35	5.0%	0.062%	0.031%
Brij 56	1.0%	0.031%	0.062%
Brij 58	1.0%	0.016%	0.062%
CHAPS	5.0%	5.0%	0.062%
CHAPSO	5.0%	5.0%	0.031%
Deoxycholic acid	5.0%	0.04%	Not tested
Lubrol PX	1.0%	0.031%	0.031%
Nonidet P-40	5.0%	0.5%	0.016%
Octyl glucoside	5.0%	0.5%	0.031%
Octyl β-thioglucoiside	5.0%	3.0%	Not tested
SDS (lauryl)	5.0%	0.016%	1.0%
SPAN 20	1.0%	0.5%	0.25%
Triton X-100	5.0%	0.062%	0.031%
Triton X-114	1.0%	0.062%	0.031%
Triton X-305	1.0%	0.125%	0.031%
Triton X-405	1.0%	0.25%	0.031%
Tween 20	5.0%	0.031%	0.062%
Tween 60	5.0%	0.025%	Not tested
Tween 80	5.0%	0.016%	0.031%
Zwittergent 3-14	1.0%	0.025%	Not tested
<i>Salts and buffers</i>			
ACES, pH 7.8	25 mM	100 mM	Not tested
Ammonium sulfate	1.5 M	1 M	Not compatible
Asparagine	1 mM	10 mM	5 mM
Bicine, pH 8.4	20 mM	100 mM	Not tested
Bis-Tris, pH 6.5	33 mM	100 mM	Not tested
Borate (50 mM), pH 8.5 (BupH pack)	Undiluted	Undiluted	Not tested
B-PER cell lysis reagent	Undiluted	Diluted 1:2	Not tested
Calcium chloride in TBS	10 mM	10 mM	Not tested
Carbonate/bicarbonate, Na (0.2 M), pH 9.4	Undiluted	Undiluted	Not tested
Cesium bicarbonate	100 mM	100 mM	50 mM
CHES, pH 9.0	100 mM	100 mM	Not tested
Cobalt chloride in TBS	0.8 mM	10 mM	Not tested
EPPS, pH 8.0	100 mM	100 mM	Not tested
Ferric chloride in TBS	10 mM	10 mM	Not tested
Glycine	1 mM	100 mM	100 mM
HEPES	100 mM	100 mM	1 mM
Imidazole, pH 10.2	50 mM	200 mM	25 mM
MES, pH 6.1	100 mM	100 mM	100 mM

continued

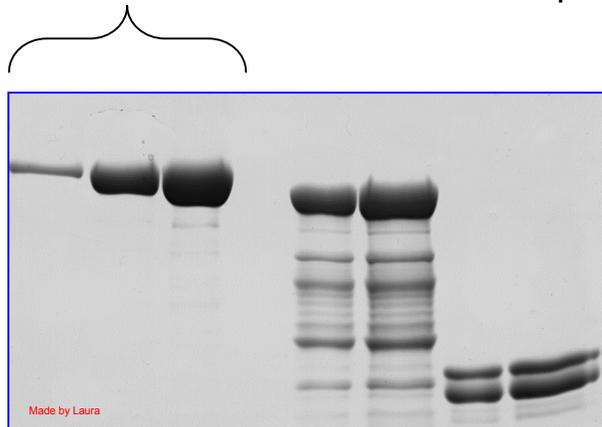
Substance tested	BCA method	Coomassie plus method	Modified Lowry method
<i>Salts and buffers (continued)</i>			
0.1 M MES/0.9% NaCl, pH 4.7	Undiluted	Undiluted	Not tested
MOPS, pH 7.2	100 mM	100 mM	Not tested
Modified Dulbecco's PBS	Undiluted	Undiluted	Not tested
Nickel chloride in TBS	10 mM	10 mM	Not tested
Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2	Undiluted	Undiluted	Not tested
PIPES, pH 6.8	100 mM	100 mM	Not tested
RIPA lysis buffer, pH 8.0	Undiluted	Diluted 1:40	Not tested
Sodium acetate	200 mM	180 mM	200 mM
Sodium azide	0.2%	0.5%	0.2%
Sodium bicarbonate	100 mM	100 mM	100 mM
Sodium chloride	1.0 M	1 M	1 M
Sodium citrate, pH 4.8	200 mM	200 mM	Not tested
Sodium phosphate	100 mM	100 mM	100 mM
Tricine, pH 8.0	25 mM	100 mM	Not tested
Triethanolamine, pH 7.8	25 mM	100 mM	Not tested
Tris	250 mM	2 M	10 mM
TBS, pH 7.6	Undiluted	Undiluted	Not tested
25 mM Tris/192 mM glycine, pH 8.0	Diluted 1:3	Undiluted	Not tested
25 mM Tris/192 mM glycine/0.1% SDS, pH 8.0	Undiluted	Diluted 1:4	Not tested
Zinc chloride in TBS	10 mM	10 mM	Not tested
<i>Reducing agents</i>			
N-acetylglucosamine in PBS	10 mM	100 mM	Not tested
Ascorbic acid	Not compatible	50 mM	1 mM
Catecholamines	Not compatible	Not tested	Not tested
Creatinine	Not compatible	Not tested	Not tested
Glucose	10 mM	1 M	0.1 mM
Melibiose	Not compatible		
Potassium thiocyanate	3 M		
<i>Thiol-containing agents</i>			
Cysteine	Not compatible	10 mM	1 mM
Dithioerythritol (DTE)	1 mM	1 mM	Not compatible
Dithiothreitol (DTT)	1 mM	5 mM	Not compatible
2-Mercaptoethanol	0.01%	1 M	1 mM
Thimerosal	0.01%	0.01%	0.01%
<i>Chelating agents</i>			
EDTA	10 mM	100 mM	1 mM
EGTA	Not compatible	2 mM	1 mM
Sodium citrate, pH 4.8	200 mM	200 mM	0.1 mM

IN GEL– Metodo densitometrico indiretti – Colorazione con Blu Coomassie

Si basa sulla misurazione della luce che attraversa un oggetto (trasmissione)

Metodo che dipende dalla costruzione di una curva di calibrazione. Può essere utilizzato sia per determinare la concentrazione di una singola proteina che di estratti complessi. Nel primo caso è necessario avere una proteina singola come riferimento, nel secondo caso è necessario avere un'estratto proteico. In entrambi i casi però si deve avere un'informazione precedente circa la concentrazione del riferimento, che può essere stata ottenuta con una qualsiasi delle metodiche precedentemente descritte.

Riferimenti per la costruzione della curva di calibrazione: quantità scalari di una determinata proteina di riferimento



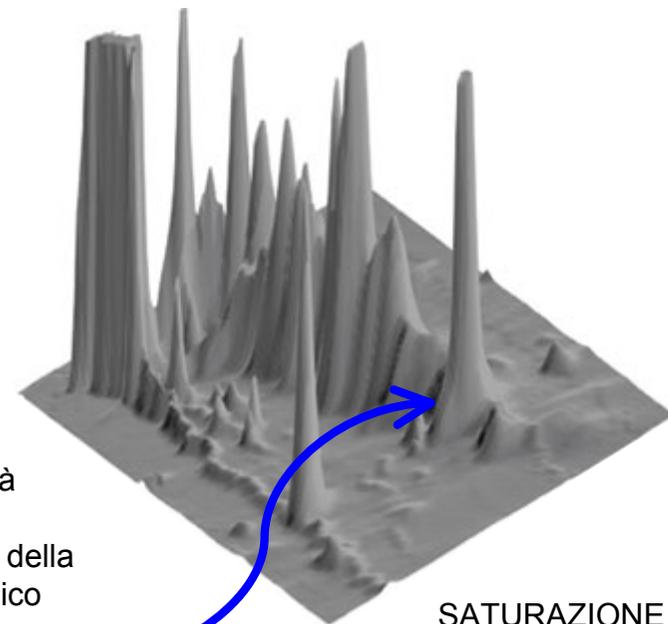
INCOGNITE

Densitometro

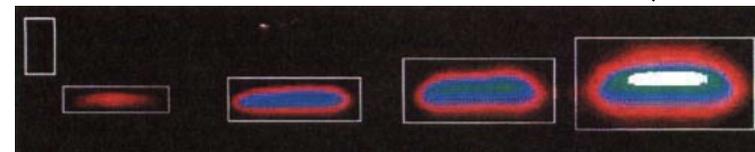
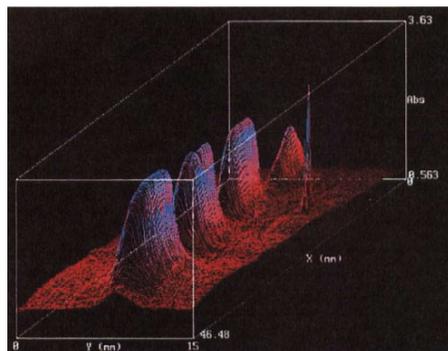
Ogni singolo pixel ha un valore d'intensità

=>

si può parlare di "volume" della banda o dello spot proteico



SATURAZIONE



E' necessario rimanere nell'intervallo di linearità dello strumento e non raggiungere la saturazione (se si raggiunge la saturazione di segnale non è possibile effettuare alcuna valutazione quantitativa - considerazione generale)

COMMENTI sui metodi di quantificazione delle proteine

- Tutti i metodi descritti portano ad ottenere delle **stime** più che a vere e proprie quantificazioni. Infatti tutti soffrono di problemi relativi a fattori che inficiano l'esatta determinazione della concentrazione proteica.
- Probabilmente il metodo più accurato per la determinazione della concentrazione proteica è **l'idrolisi acida accoppiata alla analisi amminoacidica**. Ma questa è una procedura molto lunga poiché richiede la costruzione di curve di tarature in cromatografia liquida per ciascuno dei venti amminoacidi.
- Nell'effettuare la scelta di una proteina/estratto da utilizzare come riferimento per la costruzione di una curva di calibrazione è conveniente sceglierne una/uno con le caratteristiche chimico/fisiche il più possibile simili a quelle delle proteine sotto indagine.

E' un problema non sapere in modo assoluto quanta proteina abbiamo?

Dipende da quello che si vuole fare!

Nel caso di analisi proteomiche comparative è più importante riuscire a normalizzare i campioni tra loro più che avere la loro esatta concentrazione.

Una pratica comune è quella di determinare la concentrazione proteica mediante un metodo e poi verificarla con un altro (ad esempio normalizzare mediante Bradford e verificare la normalizzazione mediante western blot contro una proteina di riferimento [molto spesso l'actina o la tubulinaattenzione che il vostro riferimento non subisca delle alterazioni nei campioni che analizzate]).

NB: Recentemente per verificare la normalizzazione in un'analisi di WB si preferisce fare riferimento alla colorazione della membrana con rosso ponceau per visualizzare l'intero pattern di proteine.