

LAVORARE CON LE PROTEINE

DEVO PURIFICARE UNA PROTEINA CHE NON È MAI STATA PURIFICATA PRIMA



- esperienze pregresse (leggere letteratura) e usare il buonsenso
- Dovrò usare in successione diverse tappe di purificazione, basate su principi diversi, fino ad arrivare alla proteina pura.
- Scelta dei metodi è in una certa misura empirica e probabilmente dovrò fare vari tentativi.
- Per evitare troppi errori e un numero eccessivo di tentativi, è bene seguire i procedimenti di purificazione sviluppati per proteine simili a quella di interesse. Sono disponibili protocolli di purificazione per molte migliaia di proteine.
- Inizierò con le tecniche meno costose, come il salting out, quando il numero delle proteine e dei contaminanti è molto elevato.
- Man mano che si procede con la purificazione, generalmente il volume del campione diminuisce rendendo possibile l'uso di metodiche più sofisticate, ma anche più costose, nei passaggi successivi.

PER STUDIARE IN DETTAGLIO UNA PROTEINA È NECESSARIO:

- **SEPARARLA DALLE ALTRE**
- **OTTENERLA CON UN BUON GRADO DI PUREZZA**
- **UTILIZZARE TECNICHE ADATTE PER CARATTERIZZARLA**

METODI CLASSICI

sfruttare le proprietà di grandezza, carica e le proprietà di legame

METODI RICOMBINANTI

Introducono una modificazione a livello genetico che facilita la successiva separazione

METODI CLASSICI

sfruttare le proprietà di grandezza, carica e le proprietà di legame

FLUSSO DI LAVORO

- Tessuto o cellula batterica
- Rottura delle cellule che provoca il rilascio delle proteine in una soluzione = **estratto grezzo**
- Inattivazione degli enzimi che possono degradare le proteine (es. lavorando a freddo e aggiungendo alla sospensione inibitori per gli enzimi proteolitici)
- Se necessario: utilizzare la centrifugazione frazionata per preparare frazioni subcellulari o isolare specifici organuli
- Si procede alla separazione delle proteine in «frazioni» (= frazionamento) sfruttando le differenze di carica e grandezza
- Si eliminano altri tipi di macromolecole solubili (es. acidi nucleici) con enzimi specifici che li degradano (nucleasi)

ESTRAZIONE DELLE PROTEINE DA FONTE BIOLOGICA

Primo passaggio: rottura delle cellule che contengono la proteina di interesse (lisi cellulare)

Deve avvenire in un opportuno mezzo che preservi la struttura nativa della proteina (soluzione tampone)

- Batteri o lieviti: separare le cellule dal mezzo di coltura mediante centrifugazione o filtrazione e risospenderle nel tampone.
- Tessuti prelevati da organismi interi: vanno immersi direttamente nel tampone.

I metodi impiegati per rompere le cellule devono tener conto:

- della fonte biologica (batteri, lieviti, cellule vegetali, cellule animali, tessuti)
- della localizzazione cellulare della proteina che si vuole purificare.
- ❖ Proteina presente negli organelli o nelle membrane: isolare queste componenti dopo la rottura delle cellule per poi estrarne il contenuto proteico.
- ❖ Proteine di membrana: solubilizzazione con detergenti a catene lipofile in grado di legarsi alle porzioni idrofobiche della proteina e rompere le interazioni proteina-membrana.
- ❖ Proteine extracellulari: estrazione è molto più facile perché è spesso sufficiente concentrare le proteine tramite filtrazione (nel siero o secrete nel brodo di coltura da batteri e lieviti)

METODI DI ROTTURA DI CELLULE E TESSUTI

Per la rottura delle cellule animali sono sufficienti condizioni relativamente blande, mentre per quelle vegetali, batteriche o di lievito la presenza della parete cellulare richiede metodi di rottura più drastici.

METODI DI ROTTURA MECCANICI

1) Omogeneizzatori Potter-Elvehjem o Dounce.

Le membrane sono rotte dalle forze frizionali che un pestello in teflon esercita contro le pareti di uno spesso tubo di vetro dove si trova la sospensione cellulare. Questo metodo rompe la membrana delle cellule animali ma non quelle batteriche o le cellule vegetali.



2) Sonicazione. Gli ultrasuoni ad alta frequenza sono usati per rompere cellule batteriche e di lievito. Nella sospensione cellulare viene immersa la sonda metallica di un sonicatore che emette onde sonore ad altissima frequenza. Le cellule vengono rotte dalle elevate pressioni locali indotte da queste onde. Svantaggio: surriscaldamento della sospensione cellulare. Per questo i contenitori delle sospensioni cellulari sono immersi in ghiaccio.



3) Omogeneizzatori a lama (waring blender).

Questo procedimento, adatto a tessuti animali o vegetali, utilizza dei frullatori costituiti da lame capaci di ruotare ad alta velocità. Il tessuto viene sminuzzato per azione delle lame



4) French Press

Tecnica applicabile a batteri e lieviti. La sospensione cellulare viene messa in una camera di compressione di acciaio inox, dotata di pistone e chiusa da una valvola a spillo. Si rimuove tutta l'aria dalla camera e, mediante un pistone, viene applicata sulla sospensione cellulare una pressione idraulica molto elevata (fino a $10,4 \cdot 10^6$ Pa, cioè 1000 atmosfere). In questo modo le cellule sono sottoposte a una compressione notevole. Dopodiché si apre lentamente la valvola a spillo, così che le cellule possano fuoriuscire dalla valvola stessa. A causa della repentina variazione dei valori di pressione cui sono sottoposte uscendo dalla valvola, le cellule scoppiano e si frantumano.



METODI DI ROTTURA NON MECCANICI

1) Lisi per osmosi (o shock osmotico). Cellule fragili, come per esempio gli eritrociti, si lisano semplicemente sospendendole in acqua distillata. In tal modo si crea una differenza di pressione osmotica tra l'ambiente intracellulare e quello extracellulare che causa l'entrata di acqua nella cellula e il suo conseguente rigonfiamento fino all'esplosione.

2) Digestione enzimatica. La parete cellulare dei batteri e dei lieviti può essere digerita con enzimi litici che vanno disciolti nel tampone in cui le cellule sono sospese. Se il tampone è ipotonico rispetto all'ambiente intracellulare, dopo trattamento enzimatico si ha la lisi della membrana per osmosi.

Alternativamente, una volta digerita la parete è possibile rompere le cellule congelando e scongelando ripetutamente la sospensione o con metodi meccanici blandi.

Una volta che le cellule sono state lisate, è possibile separare la frazione solubile (contenente le proteine, gli acidi nucleici, i metaboliti cellulari ecc.), dalla frazione insolubile (frammenti di membrane e parete cellulare, il DNA genomico se rimasto integro, proteine precipitate come corpi di inclusione) mediante centrifugazione.

CENTRIFUGHE

Centrifugazione: sottoporre i campioni a forti accelerazioni centrifughe.

- per sedimentare un precipitato e separarlo da un soprannatante
- per separare diverse frazioni subcellulari
- per raccogliere batteri o cellule da una sospensione

Costituite da un motore a velocità variabile al cui asse è ancorato un rotore che porta gli alloggiamenti per le provette ed è confinato in una camera chiusa, che può essere termostata e in cui può essere fatto il vuoto. Quando il motore viene azionato, il rotore inizia la sua rotazione e accelera fino al valore impostato dall'operatore (questo valore è espresso in numero di giri o rivoluzioni per minuto, rpm), imprimendo ai campioni presenti nelle provette un'accelerazione centrifuga (misurata come multipli di g, l'accelerazione di gravità) che viene mantenuta per un tempo a scelta dell'operatore.

CENTRIFUGA



CENTRIFUGHE

rpm (rivoluzioni al minuto): è la velocità con cui il rotore ruota indipendentemente dalle sue dimensioni.

rcf (forza centrifuga relativa) o x g (g = forza di gravità) è la forza esercitata sul contenuto del rotore.

rcf è il risultato della rotazione del rotore, quindi dipende dal numero di giri e dalle dimensioni del rotore. Si calcola in base al numero di giri e al raggio di centrifugazione (distanza dal centro del rotore al fondo della provetta in rotazione). Si può calcolare con la seguente equazione:

$$RCF \text{ (or G Force)} = 1.12 \times \text{Radius (mm)} \times \left(\frac{RPM}{1000}\right)^2$$

Le tecniche centrifugative si possono suddividere in **preparative** e **analitiche**.

Centrifugazione preparativa: separazione e raccolta di cellule intere, organuli subcellulari e macromolecole biologiche, come acidi nucleici o proteine. Permette la centrifugazione anche di grandi quantità di materiale.

Centrifugazione analitica: utilizzata per studiare le caratteristiche di sedimentazione di un campione e per determinarne il grado di purezza o la massa molecolare.

Ci sono diversi tipi di centrifughe a seconda di tre variabili principali.

1) Massimo campo centrifugo relativo raggiungibile:

- centrifuga da banco: utilizzata per esempio per raccogliere batteri in sospensione, si raggiungono al massimo 8000-10000 g
- ultracentrifuga: raggiunge anche 900000 g e si possono separare classi di molecole relativamente simili, come DNA plasmidico e DNA genomico presenti nella stessa preparazione. Queste altissime velocità di rotazione, con conseguenti altissimi valori di xg, si raggiungono tuttavia soltanto se la camera che alloggia il rotore viene posta sotto vuoto spinto. È inoltre necessario refrigerare la camera per evitare effetti di surriscaldamento.

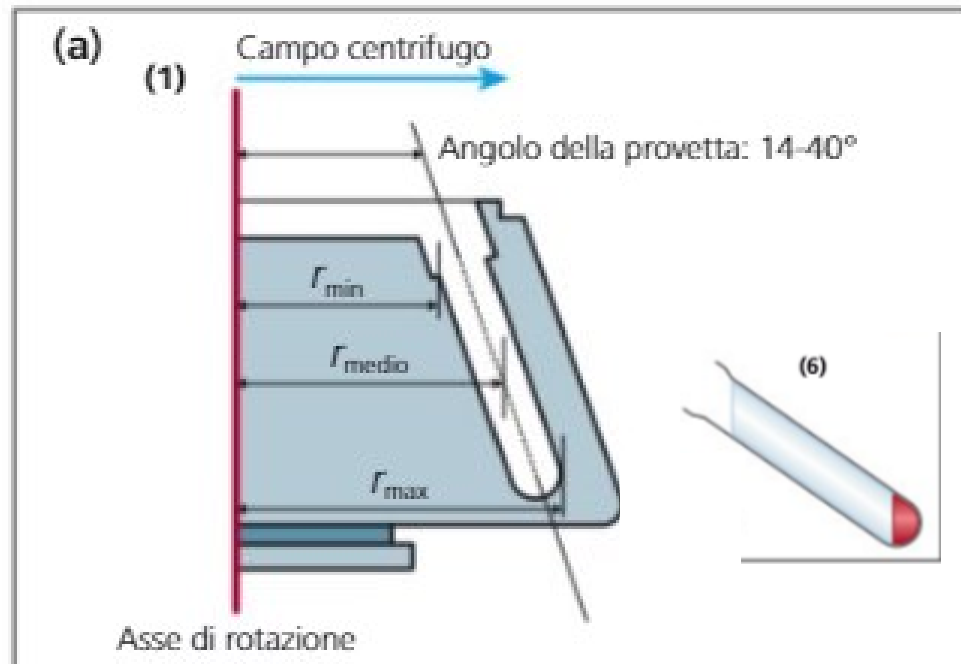
2) Tipo di rotore:

- ad angolo fisso (per esempio rotor in cui le provette sono poste a 45° rispetto all'asse di rotazione)
- oscillanti (in cui le provette in partenza sono poste parallelamente all'asse di rotazione, ma i portaprovette possono ruotare e quindi durante la centrifugazione le provette sono poste a 90° rispetto all'asse di rotazione (analogamente a ciò che avviene in certe giostre ai seggiolini dei passeggeri)).

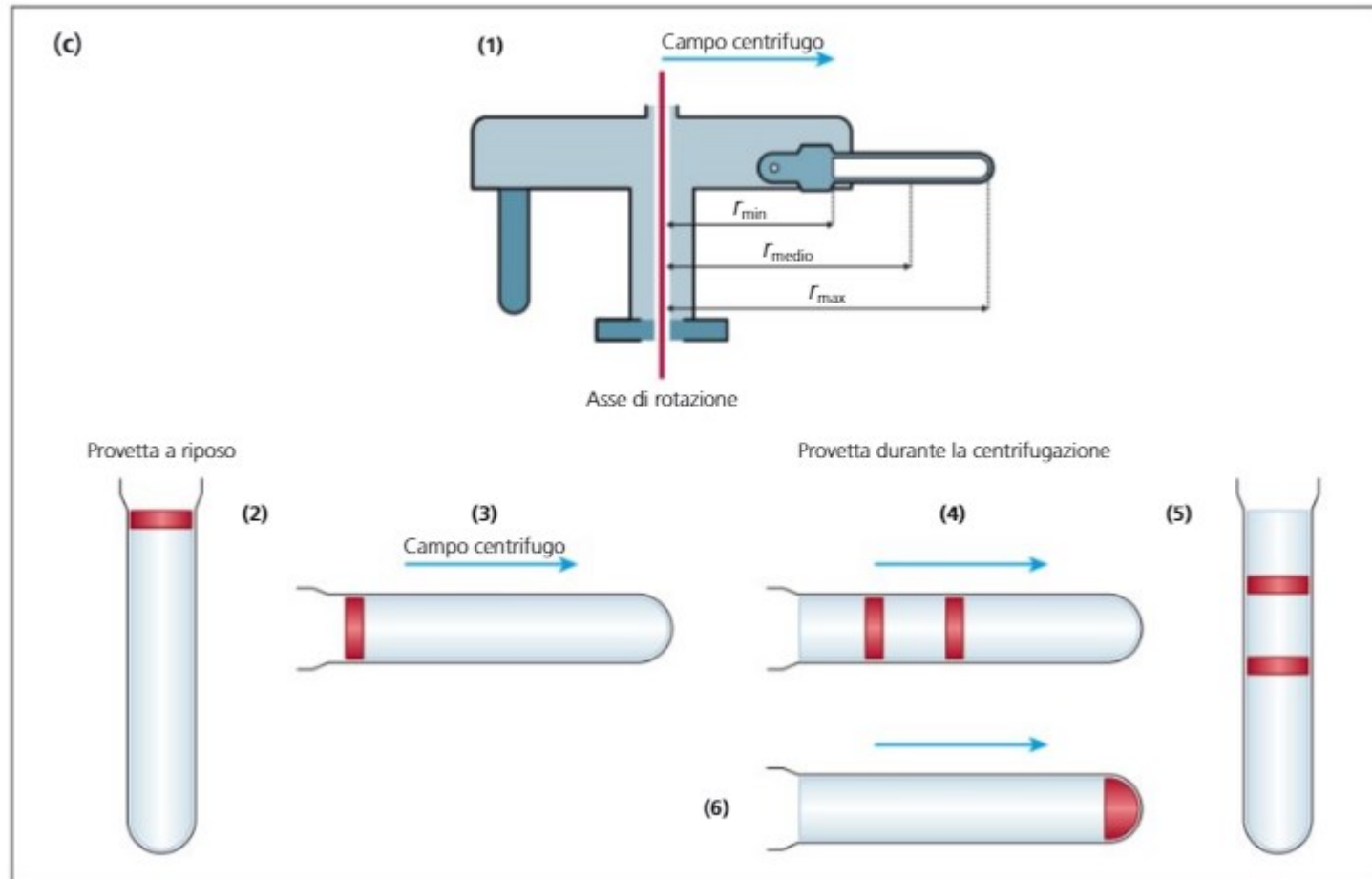
3) Controllo della temperatura:

può essere indispensabile per ridurre il riscaldamento da attrito con l'aria e per conservare i campioni in condizioni controllate durante la centrifugazione, per esempio per evitare fenomeni di denaturazione termica in un campione proteico. Tanto più la centrifugazione è lunga e ad alta velocità, quanto più il controllo della temperatura è indispensabile.

ROTORE AD ANGOLO FISSO



ROTORE A BRACCI OSCILLANTI

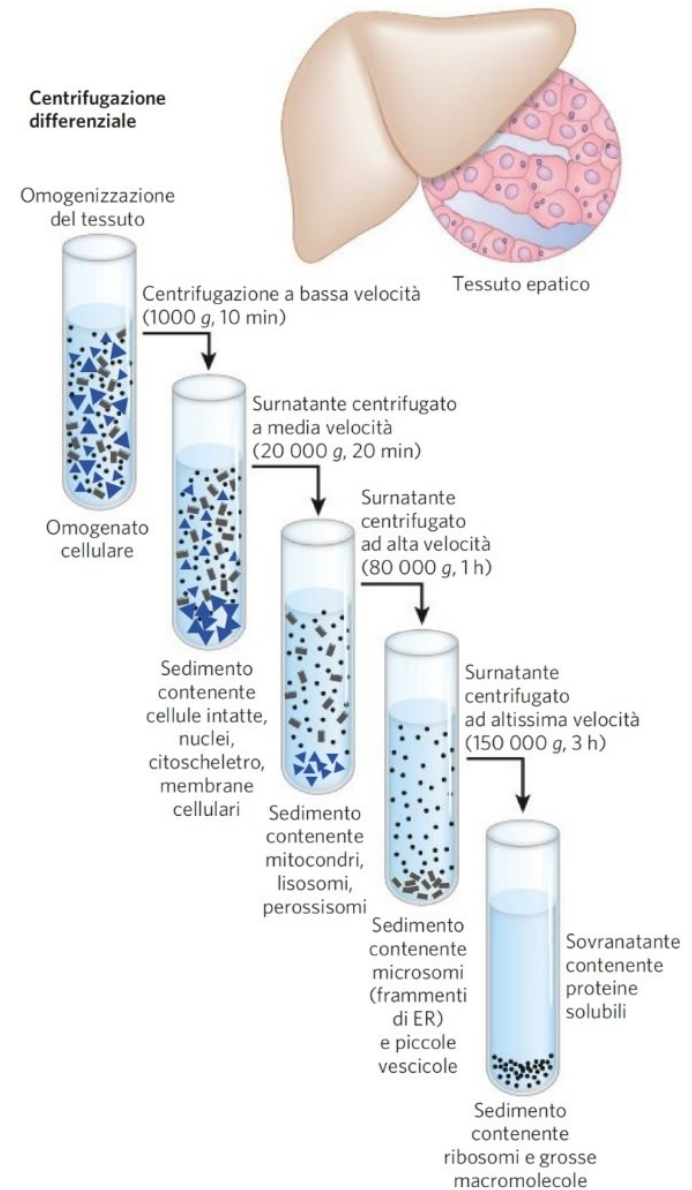


CENTRIFUGA



CENTRIFUGAZIONE FRAZIONATA

Figura 1.7 Frazionamento subcellulare di un tessuto. Un tessuto, per esempio il fegato, viene omogenizzato meccanicamente, per rompere le cellule e disperdere il loro contenuto in una soluzione acquosa tamponata di saccarosio. Questa soluzione ha una pressione osmotica simile a quella degli organuli e ciò impedisce la diffusione dell'acqua all'interno degli organuli; se l'osmolarità fosse più bassa le cellule si gonfierebbero e romperebbero (vedi Figura 2.12). Le particelle di diverse dimensioni presenti in sospensione possono essere separate variando la velocità di centrifugazione. Le particelle più grandi sedimentano più velocemente delle particelle più piccole e il materiale solubile non sedimenta. Le frazioni subcellulari possono essere separate tra loro mediante successiva caratterizzazione biochimica tramite una scelta accurata delle condizioni di centrifugazione. [Fonte: Alberts, B. et al., *L'essenziale di biologia molecolare della cellula*, 5ª ed., Zanichelli, Bologna, 2020, p. 163.]





(a)

Figura 2.17

(a) Esempio di rotore “danneggiato”. Evidentemente la centrifuga non era stata posta sotto manutenzione adeguata. Spesso le soluzioni utilizzate durante le centrifugazioni sono corrosive (per esempio acidi, solventi organici, soluzioni concentrate di sali). Un’esplosione del genere in laboratorio può ovviamente essere molto pericolosa



(b)

(tratta da mit.edu/charliew). (b) Incidente occorso alla Cornell University. Non è solo il rotore a essere stato danneggiato: le finestre del laboratorio sono state frantumate, il soffitto e i muri danneggiati e l’ultracentrifuga distrutta. Chissà che fine ha fatto il prezioso campione... (tratta da AIHA, Protecting Worker Health).

Le prime tappe del frazionamento sfruttano le differenze di SOLUBILITÀ delle proteine che dipende da pH, temperatura, concentrazione di sali.

PRECIPITAZIONE FRAZIONATA CON SALI

I sali influenzano la solubilità di una proteina perché gli ioni disciolti interagiscono con i residui carichi presenti sulla superficie delle proteine. A basse concentrazioni i sali aumentano la solubilità delle proteine (salting in) perché gli ioni in soluzione promuovono le interazioni delle proteine con il solvente e impediscono la formazione di aggregati proteici.

A concentrazioni elevate alcuni sali hanno invece l'effetto di diminuire la solubilità delle proteina (**SALTING OUT**).

A elevate forze ioniche, la solubilità di una proteina tende a diminuire a causa della competizione per le molecole di acqua d'idratazione tra il sale aggiunto e le proteine. Le interazioni proteina-proteina diventano più forti delle interazioni proteina-solvente, con formazioni di aggregati proteici che precipitano. La concentrazione del sale in grado di determinare la precipitazione è diversa da proteina a proteina; le proteine molto idrofobiche precipitano a bassa concentrazione, mentre quelle meno idrofobiche precipitano ad alta concentrazione di sale. La precipitazione mediante salting out di miscele complesse di proteine causa sì un arricchimento della frazione desiderata, ma non produce una vera e propria purificazione

SALTING OUT

La precipitazione salina può essere un metodo molto efficace per purificare le proteine per precipitazione.

solfo di ammonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

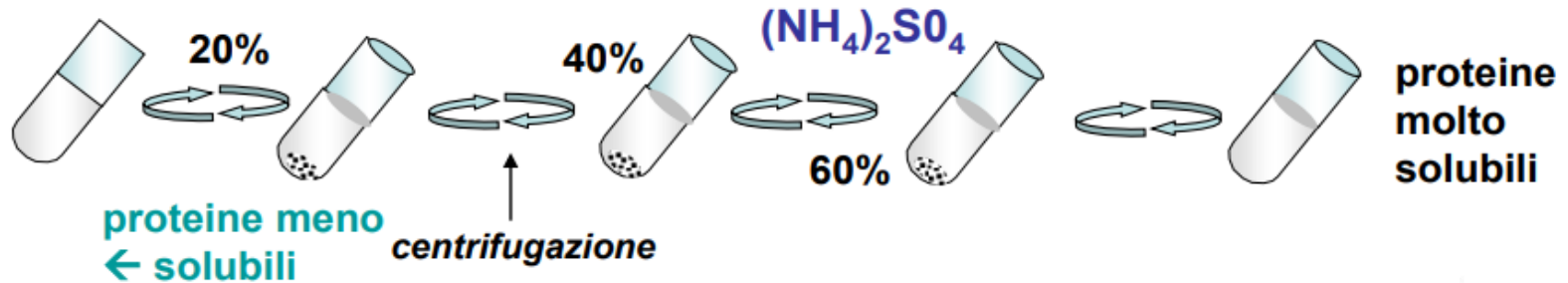
- economico
- molto solubile in acqua
- disponibile con un elevato grado di purezza
- si idrata molto di più (interagisce con un maggior numero di molecole d'acqua) rispetto a quasi tutti gli altri solventi ionici
- viene aggiunto direttamente come solido o come soluzione (solitamente) satura per precipitare le proteine desiderate.

Il principio della precipitazione con solfo di ammonio consiste nel «salting out» delle proteine dalla soluzione. Alle proteine viene impedito di formare legami idrogeno con l'acqua e il sale facilita la loro interazione reciproca formando aggregati che poi precipitano dalla soluzione.

SALTING OUT

Le proteine in soluzione possono essere frazionate, poiché precipitano in funzione della concentrazione di sale. In questo modo è possibile purificare proteine specifiche aggiungendo una quantità specifica di solfato di ammonio per far precipitare le proteine non desiderate, recuperando il surnatante e aggiungendo un po' più di solfato di ammonio per far precipitare la proteina desiderata e salvare il pellet di proteine precipitate. Poiché **la precipitazione salina influisce solo sulla solubilità delle proteine e non le denatura**, la frazione recuperata può essere conservata nella soluzione salina per periodi prolungati senza doversi preoccupare della contaminazione batterica, poiché l'elevato contenuto di sale inibisce la crescita microbica e l'attività delle proteasi.

aggiunta di solfato di ammonio - un sale altamente igroscopico



RIMOZIONE DEL SALE IN ECCESSO

Per piccoli volumi: da 0,5 a 20 mL si può usare la cromatografia per gel-filtrazione

Per volumi più grandi è più conveniente usare la dialisi.

Campione in un sacchetto da dialisi costituito da una membrana semipermeabile, che permette la libera diffusione degli ioni (e di tutte le molecole piccole) ma non delle proteine (molecole grandi). Questo viene immerso in un recipiente contenente un abbondante volume di tampone mantenuto in agitazione e a 4 °C.

Una volta stabilito l'equilibrio tra l'interno e l'esterno del sacchetto, la concentrazione del sale si è ridotta in misura del rapporto tra volume del sacchetto e volume del recipiente. Viene quindi cambiato il tampone esterno al sacchetto un certo numero di volte e il processo di dialisi viene fatto procedere fino a quando la maggior parte del sale è stato eliminato.

La dialisi richiede tempi piuttosto lunghi (ore o giorni). Le membrane da dialisi esistono in versioni con pori di diversa misura (cut-off), da 1 a 50 kDa a seconda delle diverse necessità.

DIALISI

Tecnica che separa le proteine da piccole molecole in soluzione



ULTRAFILTRAZIONE

centrifugal ultrafiltration

an ultra-fancy name for spin concentrating
you put your sample in the top...

... & spin it in a centrifuge

molecules (including water and salts) which
are smaller than the membrane's pores will
get pulled through

