

Esercitazione di dosaggio proteico

Scopo dell'esercitazione: determinare la concentrazione totale di proteine in campioni complessi con metodo indiretto (A) e di una proteina pura attraverso un metodo diretto (B).

Metodi utilizzati: misura diretta dell'assorbanza a $\lambda=280$ nm e metodo indiretto dell'acido bicineoninico (BCA)

A) Determinare la concentrazione di campioni complessi con il metodo indiretto BCA

- 1) Poiché i metodi che utilizzeremo permettono di determinare la concentrazione del campione solo entro una certa gamma di concentrazioni, prepareremo delle diluizioni del campione (vedi schema sotto), per aumentare la probabilità che almeno una delle diluizioni rientri nell'intervallo utile per la determinazione della sua concentrazione. **(NB! Dopo la diluizione, riporre in freezer la preparazione iniziale di mitocondri).**

Materiali: Acqua, mitocondri
 Provette di tipo eppendorf da 1,5 ml
 Pipette da 20, 200 e 1000 μ l

Nome	Diluizione	Vol. acqua(μ L)	Vol campione (μ L)	Vol. finale (μ L)	
H ₂ O	-	-	-	-	
Mitocondri (M)	1:10			1000	(Mescolare!)
Mitocondri (M1)	1:20			1000	(Mescolare!)
Mitocondri (M2)	1:40			1000	(Mescolare!)

Per questo metodo è necessaria una retta di calibrazione, costruita con una serie di riferimenti a concentrazione nota. Per la retta di calibrazione utilizziamo la sieralbumina bovina (BSA) (2 mg/ml) come proteina di riferimento.

Materiali: 1 soluzione di BSA alla concentrazione di 2 mg/ml
 Kit BCA (Soluzione A e Soluzione B)
 Provette di tipo eppendorf da 1,5 ml, Pipette da 20, 200 e 1000 μ l
 Cuvette di plastica trasparenti alle radiazioni UV (280 nm) da 1 ml
 Incubatore a 37°C.

- 2) Preparare in provette eppendorf la serie di campioni di BSA a diversa concentrazione in un volume finale di 200 μ L diluendo in acqua la BSA (2 mg/ml) secondo lo schema sottostante. Mescolare!

	Conc finale BSA (mg/mL)	Vol. acqua (μ L)	Vol BSA 2 mg/ml (μ L)
BSA 1(bianco)	0	200	0
BSA 2	0,05		
BSA 3	0,1		
BSA 4	0,2		
BSA 5	0,5		
BSA 6	1		

- 3) Preparare 11 ml di soluzione di reazione (SR) unendo la soluzione A e la soluzione B del kit BCA in un rapporto di 50:1 (49 parti di A + 1 parte di B) (MESCOLARE BENE).
- 4) Preparare una serie di 10 provette eppendorf, contrassegnarle per distinguerne il contenuto (BSA 1- 6, H₂O, M, M1, M2) e trasferire in ognuna 50 μ L di uno dei 6 campioni di BSA preparati al punto 2) o di uno dei 4 campioni preparati in precedenza al punto 1).

- 5) Aggiungere 950 μl della SR ad ognuna delle 10 provette contenenti i 50 μl di campioni e mescolare. Riporre i campioni originali M, M1 e M2 in freezer.
- 6) Mettere ad incubare i campioni per 30 minuti a 37°C nella stufa
- 7) Leggere le assorbanze a $\lambda=562\text{ nm}$ di tutti i campioni (azzerare con il bianco, BSA1).
- 8) Costruire la retta di calibrazione con le Abs ottenute in funzione delle concentrazioni di BSA.
- 9) Calcolare le concentrazioni dei campioni in base all'interpolazione sulla retta di calibrazione.
- 10) Tenendo conto delle diluizioni effettuate, calcolare la concentrazione proteica dei campioni di partenza. Se più di un campione era valido per la misura della concentrazione (assorbanza compresa tra $0,05 < A < 1$), fare la media dei valori di concentrazione ottenuti.

B) Calcolare la concentrazione della proteina X da valori di assorbanza a $\lambda=280\text{ nm}$

Materiali: *Provette di tipo eppendorf da 2 ml*
 Pipette da 20, 200 e 1000 μl
 Cuvette di plastica trasparenti alle radiazioni UV (280 nm) da 1 ml

Nome	Diluizione	Vol. acqua (mL)	Vol. campione mL)	Vol. finale	
X1	Non diluito	-	-	-	
X2	1:4			1,6	(Mescolare!)
X3	1:16			1,6	(Mescolare!)

- 1) Calcolare il coefficiente di estinzione molare a 280 nm ($\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) della proteina X (massa molare 69323 Da) stimato dalla sequenza (in basso) utilizzando la seguente formula che tiene conto dei coefficienti di estinzione molare dei singoli amminoacidi che la compongono:

$$\epsilon_{280} = 5500 \times (\text{n. di Trp}) + 1490 \times (\text{n. di Tyr}) \quad \epsilon_{280} = \underline{\hspace{2cm}}$$

MKWVTFISLLLLFSSAYSRGVFRDTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPFDEHVKL
 NELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCEKQEPERNECFLSHKDDS
 PDLPLKLPDPNTLCDEFKADEKKFWGKYLIEIARRHPYFYAPELLYYANKYNGVFQECCQAEDKG
 ACLLPKIETMREKVLTSARQLRCASIQKFGERALKAWSVARLSQKFPKAEFVEVTCLVTDLTQVH
 KECCHGDLLECADDRADLAKYICDNQDTISSKLKECCDKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADF
 AEDKDVCKNYQEAKDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECCAADDPHACYSTVFD
 KLKHLVDEPQNLIKQNCQFEKLGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRLGKVGTRCCTKPE
 SERMPCTEDYLSLILNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTFH
 ADICTLPDTEKQIKKQTALVELLKHKPKATEEQKKTVMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPKLV
 VSTQTALA

- 2) Predisporre lo spettrofotometro per la lettura a 280 nm e azzerarlo con 1 ml di acqua in una cuvette di plastica per UV.
- 3) Trasferire 1 ml dei campioni X1, X2 e X3 in cuvette di plastica per UV e leggerne i valori di assorbanza.
- 4) Calcolare i valori di concentrazione molare dei campioni che hanno mostrato una assorbanza compresa tra $0,05 < A < 1$ mediante la legge di Lambert-Beer. Tenere conto dei fattori di diluizione per calcolare la concentrazione del campione non diluito. Se più di una diluizione ha consentito di determinare una concentrazione del campione di partenza, fare la media aritmetica dei valori di concentrazione ottenuti.
- 5) Il valore di concentrazione trovato è: _____, che espresso in mg/ml corrisponde a _____