



uniss
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**PIANO NAZIONALE
LAUREE SCIENTIFICHE**



Dosaggio colorimetrico delle proteine

Docenti:

Prof. Marilena Formato, formato@uniss.it Dr. Gabriele Nieddu, ganiemdu@uniss.it Dr.ssa Manuela Galioto, galioto@uniss.it

Dipartimento di Scienze Biomediche

Referente Progetto PLS-Sassari: Prof. Marilena Formato
Dipartimento di Scienze Biomediche
E-mail: formato@uniss.it

Estrazione di proteine da tessuti

Dopo l'acqua, le proteine sono le sostanze più abbondanti nelle cellule e sono coinvolte nella maggior parte dei processi biologici che si svolgono in esse.

Nell'organismo umano si trovano più di 100000 tipi di proteine diverse. Grazie alla loro varietà, le proteine svolgono molte funzioni, tra cui:

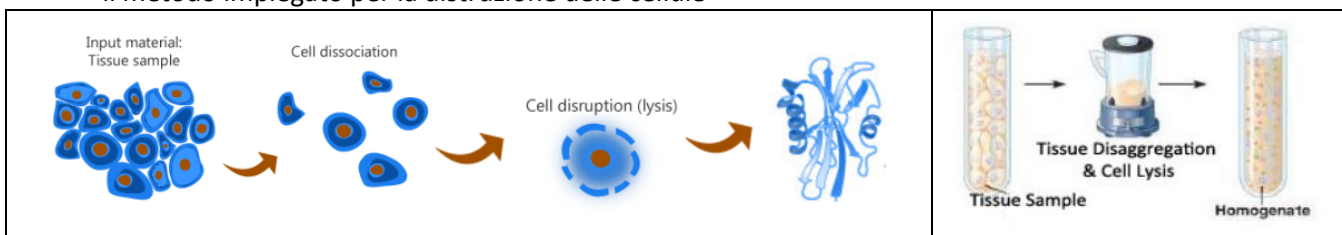
- facilitano le reazioni chimiche che avvengono nelle cellule (ruolo di enzimi),
- regolano l'entrata e l'uscita di alcune sostanze dalle cellule (proteine di membrana),
- servono come sostegno e sono coinvolte nel movimento cellulare (proteine strutturali).

Alcune proteine formano strutture visibili a occhio nudo, come le ragnatele e i capelli. Le macromolecole proteiche sono polimeri lineari di amminoacidi.

La prima tappa nell'isolamento delle proteine prevede l'estrazione dalla cellula. Tale processo avviene mediante un'omogeneizzazione che distrugge il tessuto e rilascia i componenti intracellulari in sospensione.

L'omogeneizzazione viene anche usata come fase preliminare per la purificazione parziale di organuli cellulari per gli studi sulla compartimentazione metabolica. Per il successo della omogeneizzazione sono molto importanti:

- la scelta del tessuto di partenza
- le proprietà fisiche e chimiche della soluzione fisiologica adoperata
- il metodo impiegato per la distruzione delle cellule



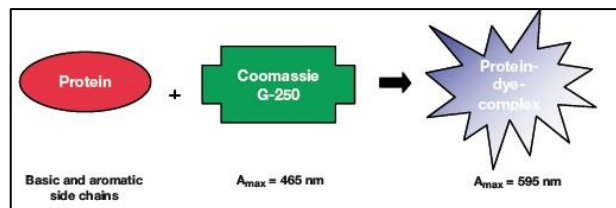
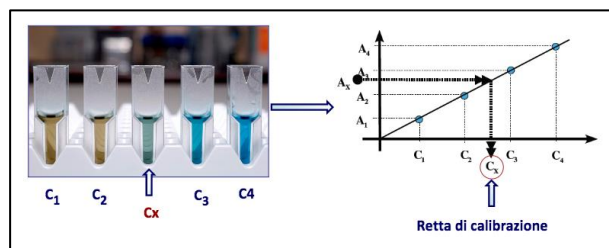
Le procedure di omogeneizzazione per la purificazione delle proteine implicano necessariamente una fase di distruzione cellulare con metodi che possono essere meccanici, chimici ed enzimatici. La scelta del metodo dipende dalla natura della parete/membrana cellulare.

Il contenuto proteico può successivamente essere quantificato utilizzando metodi colorimetrici come il dosaggio mediante saggio Bradford, e le proteine successivamente purificate mediante procedure di frazionamento basate sulle proprietà chimico-fisiche della proteina di interesse. Pur perdendo in parte la proteina desiderata si mira ad eliminare in maniera selettiva le altre componenti dalla miscela.

Caratteristica della proteina	Procedura di purificazione
Solubilità	Salting out
Carica ionica	Cromatografia a scambio ionico Elettroforesi Focalizzazione isoelettrica
Polarità	Cromatografia idrofobica
Dimensioni	Cromatografia per filtrazione su gel SDS-PAGE Ultracentrifugazione
Specificità di legame	Cromatografia per affinità

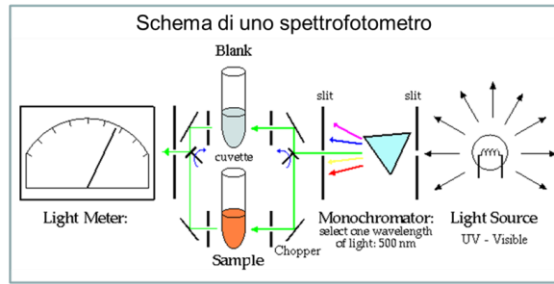
Quantificazione di proteine.

Reagenti specifici vengono incubati con quantità NOTE di una proteina standard (es. Albumina da siero bovina- BSA) e si ottiene una retta di calibrazione. Poi si fa reagire con lo stesso colorante un volume noto di miscela di proteine e si relaziona l'assorbanza con la quantità sulla retta di calibrazione.



Dosaggio mediante Metodo di Bradford (legame con coloranti). Il legame del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 alle proteine (mediante formazione di complessi non covalenti con gli amminoacidi basici) provoca uno spostamento del massimo di assorbimento del colorante da 465nm (rosso) a 595 nm (blu) in soluzioni acide (50% acido fosforico).

Spettrofotometria



$$T \text{ (trasmissione)} = I/I_0$$

I_0 = intensità della luce incidente
 I = intensità della luce trasmessa

$$A \text{ (assorbanza)} = \log 1/T$$

L'assorbanza esprime la quantità di luce assorbita da una sostanza (è adimensionale)

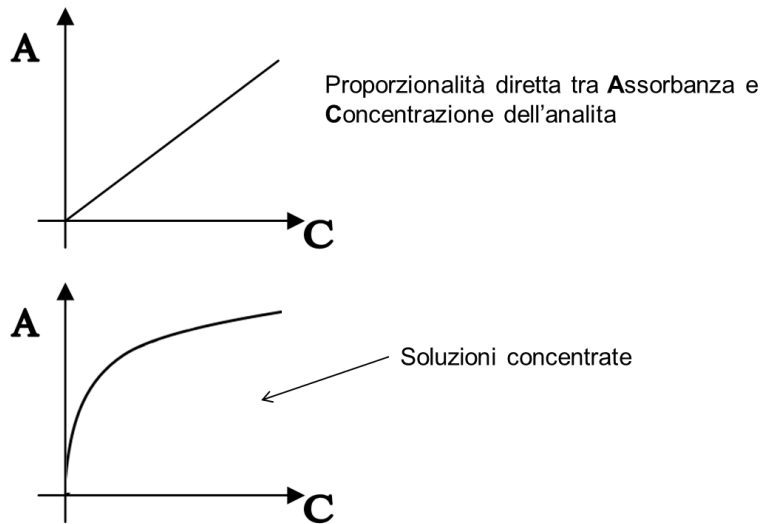
Legge di Lambert-Beer

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

C = concentrazione dell'analita (M ovvero mol/l)
 l = cammino ottico (centimetri)
 ϵ_{λ} = coefficiente di estinzione molare ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

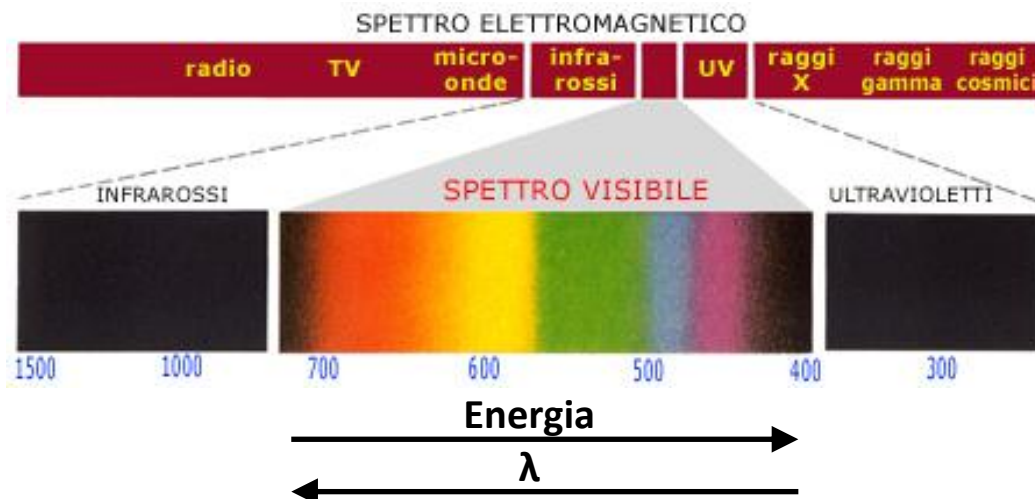
ϵ_{λ} dipende:
 ♦ dalla lunghezza d'onda della radiazione assorbita (λ)
 ♦ dalla natura del solvente
 ♦ dal pH
 ♦ dalla specie chimica che assorbe
 □ è indipendente dalla temperatura

La legge di Lambert-Beer è valida solo per soluzioni molto diluite



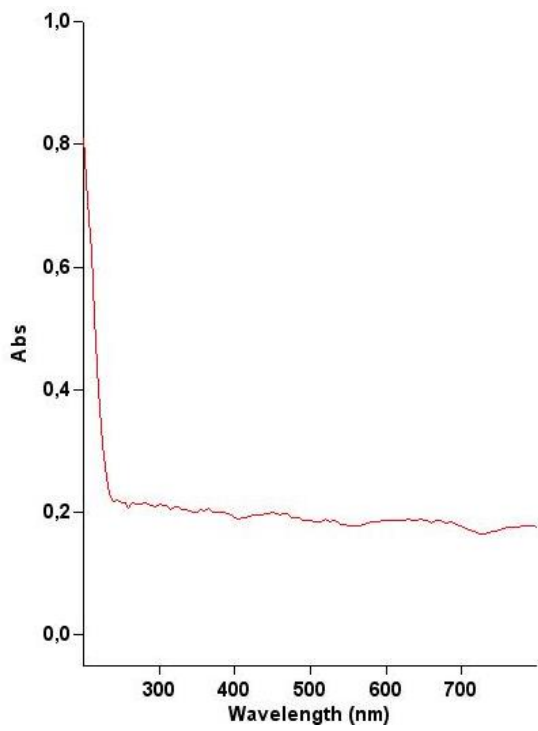
Lo spettro elettromagnetico

I vari intervalli dello spettro elettromagnetico sono sfruttati a scopo analitico per ottenere informazioni strutturali quali-quantitative sulla materia analizzata

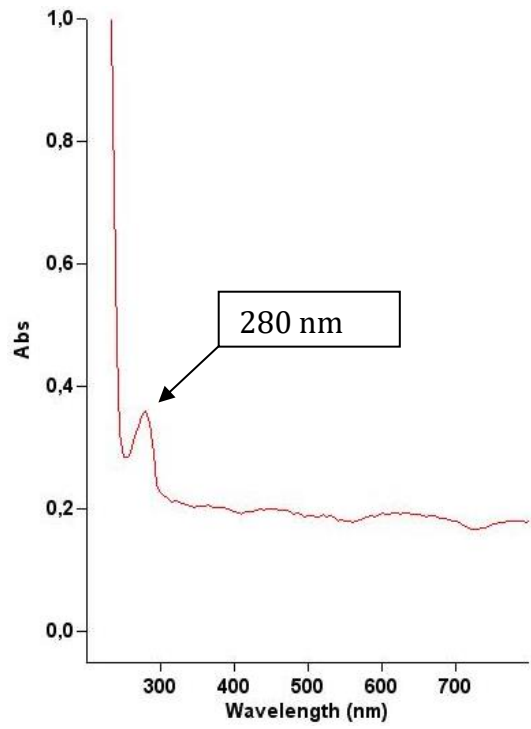


Spettri di Assorbimento

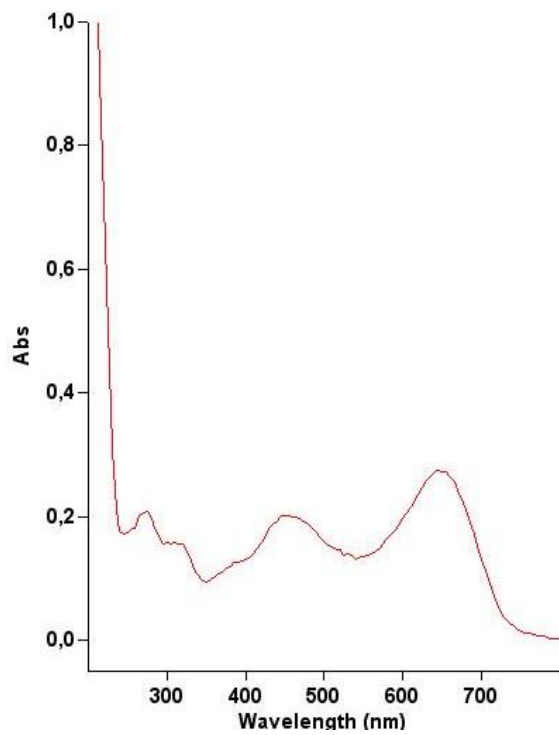
Bianco reagenti



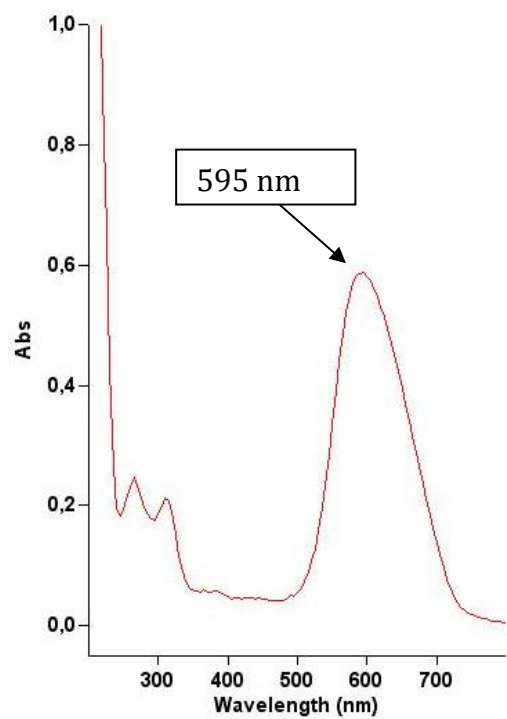
Albumina serica bovina (BSA)

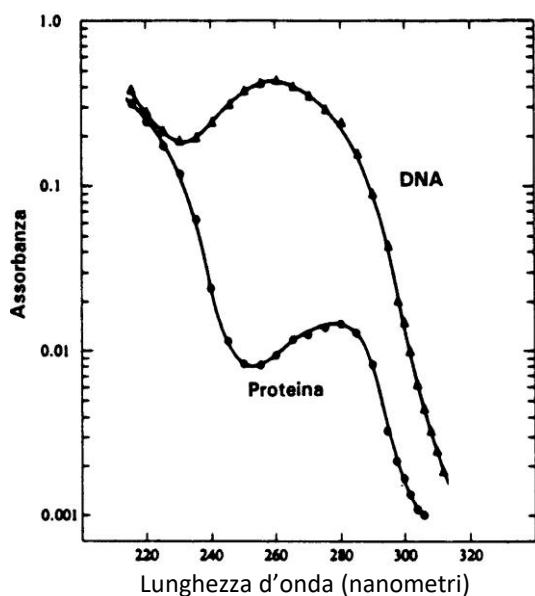


Bradford



BSA + Bradford





PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Dosaggio delle proteine con il metodo Bradford

Preparazione soluzioni standard

Per la costruzione della retta di taratura preparare 5 soluzioni a concentrazione nota della proteina standard diluendo opportunamente una "soluzione stock" (2 mg/ml). Volume finale della soluzione diluita 200 μ L.

STANDARD	Soluzione BSA Stock (2 mg/ml)	H ₂ O
0,2 mg/ml	20 μ L	180 μ L
0,4 mg/ml	40 μ L	160 μ L
0,6 mg/ml	60 μ L	140 μ L
0,8 mg/ml	80 μ L	120 μ L
1 mg/ml	100 μ L	100 μ L

Esecuzione dosaggio

- Per l'esecuzione del dosaggio utilizzare provette da 1,5 ml ed aggiungere nell'ordine (*in duplicato*):
 - 20 μ L di campione proteico a concentrazione incognita (A, B, C) o di proteina standard a concentrazione nota precedentemente preparata (utilizzare una micropipetta P200)
 - Per la preparazione del bianco (BR) mettere acqua al posto del campione.
 - 1000 μ L del reattivo Bradford (utilizzare la soluzione prediluita).
- Agitare su vortex e trasferire il contenuto in cuvette di plastica.
- Effettuare le letture di assorbanza allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm dopo 5 min di incubazione con il reattivo (il colore blu è stabile per circa 45 min).
- Leggere prima l'assorbanza del bianco (BR), quindi azzerare lo spettrofotometro e procedere con le letture di standard e campioni incogniti (A, B, C).
- Per il calcolo della concentrazione proteica utilizzare la retta di taratura ottenuta mettendo in relazione le misure di assorbanza e le concentrazioni della proteina standard.

Riportare in tabella le letture di assorbanza ottenute

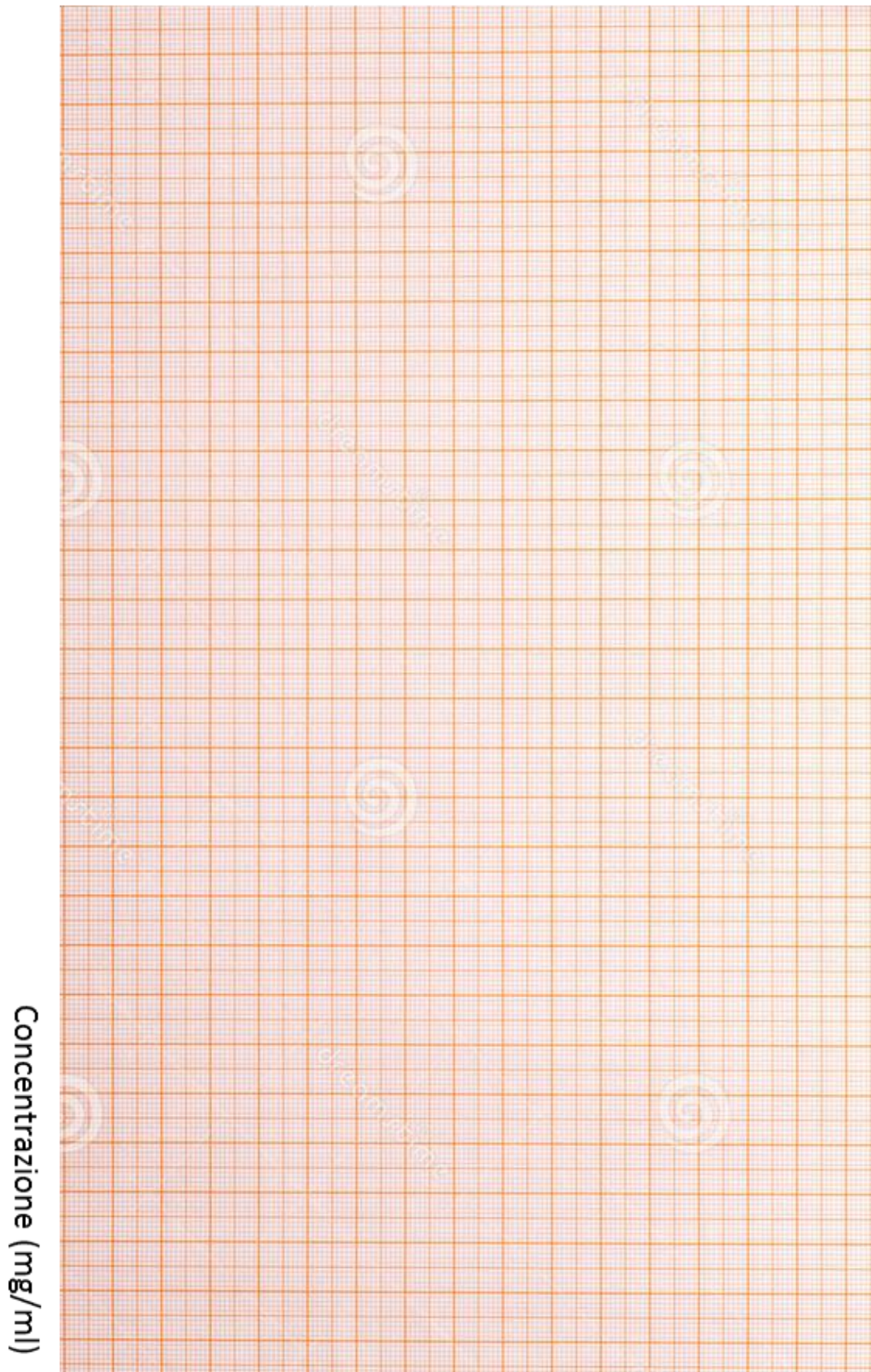
STANDARD	Assorbanza (595 nm)	
0,2 mg/ml		
0,4 mg/ml		
0,6 mg/ml		
0,8 mg/ml		
1 mg/ml		
Campione A		
Campione B		
Campione C		

Riportare in grafico i valori ottenuti per gli standard

Costruire la retta di taratura

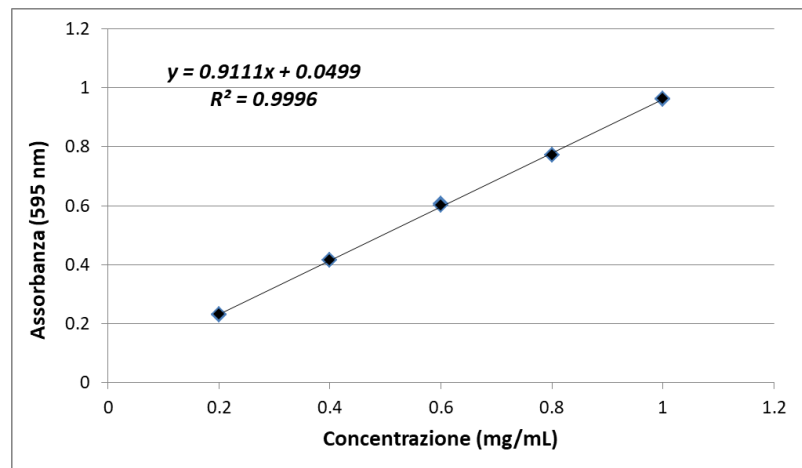
Calcolare le concentrazioni dei campioni A, B, C

Assorbanza



Esempio di retta di taratura ottenuta mediante un foglio di calcolo Excel

mg/ml	Assorbanza (595 nm)
0,2	0,228
0,2	0,232
0,4	0,414
0,4	0,416
0,6	0,606
0,6	0,601
0,8	0,773
0,8	0,771
1	0,962
1	0,963



Nella tabella e nel grafico in alto sono riportati i valori ottenuti in un precedente esperimento. Inserite nel foglio di lavoro excel i dati ottenuti dal vostro gruppo di lavoro sulle soluzioni di proteina standard, fate la regressione lineare e calcolate per interpolazione le concentrazioni dei campioni A, B, e C.

Elettroforesi SDS-PAGE (PolyAcrilamide-Gel Electrophoresis).

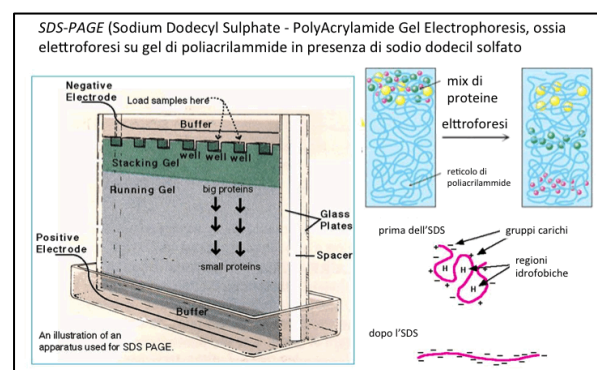
Le proteine hanno una carica totale positiva o negativa che dipende dallo stato di ionizzazione delle catene laterali degli aminoacidi costituenti. L'elettroforesi è la tecnica che si basa sulla diversa migrazione, attraverso un mezzo fluido e sotto l'influsso di un campo elettrico, di particelle cariche, siano esse ioni o polielettroliti macromolecolari. Le proteine sono dei polielettroliti anfoteri e migrano in un campo elettrico in funzione del rapporto carica/massa. La carica, a sua volta dipende dai pK dei gruppi ionizzabili presenti nelle catene laterali degli aminoacidi costituenti e dal pH del mezzo.

Alla metà degli anni 1960 è stata sviluppata una versione perfezionata di elettroforesi, comunemente nota come SDS-PAGE (PolyAcrilamide-Gel Electrophoresis), basata sull'utilizzo di un supporto inerte costituito da un gel di poliacrilamide e del sodio dodecil-solfato (SDS), un detergente anionico. Esso agisce legandosi alle proteine con legami idrofobici che ne determinano la denaturazione in seguito allo svolgimento delle catene polipeptidiche. L'aggiunta di un agente riducente completa la denaturazione determinando la rottura dei ponti disolfuro intra ed inter-molecolari. Il complesso polipeptide-SDS così formato, assume la forma di un bastoncino con uniforme carica negativa. Sottoposte all'azione di un campo elettrico migreranno tutte verso il polo positivo (anodo). La loro separazione avverrà solo in funzione dei diversi pesi molecolari, dato che il rapporto SDS/proteina, fatta eccezione per alcune proteine, è costante.

Il gel è ottenuto dalla copolimerizzazione della acrilamide con N-N-metilbisacrilamide. Nel processo di polimerizzazione intervengono un iniziatore che è l'ammonio persolfato, ed un catalizzatore che è la tetrametiletildiamina (TEMED). L'acrilamide così attivata reagisce con un'altra molecola di acrilamide innescando una serie di reazioni a catena che continueranno fino a quando non si saranno esaurite le molecole di acrilamide. La presenza della bisacrilamide, che crea dei ponti tra i polimeri lineari di acrilamide, determina la formazione di

un vero e proprio reticolo a maglie. La grandezza di queste maglie e quindi la porosità del gel, dipende dalla concentrazione del copolimero (generalmente tra il 7% e il 15%) e dal rapporto acrilamide/bisacrilamide.

Grazie alla presenza di SDS le proteine migrano dal polo negativo al polo positivo sulla base della massa molecolare (il gel funge da setaccio molecolare). Esse infatti hanno la stessa forma, poiché denaturate, hanno tutte carica negativa e uno stesso rapporto carica/massa.



Norme generali di sicurezza in laboratorio

Qui di seguito sono elencate alcune norme elementari di sicurezza, che devono essere tassativamente rispettate.

- Entrando in laboratorio, individuare le vie di fuga, indicate dalla segnaletica verde.
- In laboratorio indossare sempre il camice. Il camice deve essere chiuso sul davanti, con maniche lunghe e polsini ad elastico. Al termine delle attività, prima di lasciare il laboratorio, togliersi il camice. In ogni caso, non uscire dal laboratorio, per recarsi in altre aree (biblioteca, uffici, bar, ecc.), senza aver prima tolto il camice.
- Non introdurre in laboratorio borse, zaini o altro materiale non necessario.
- Indossare guanti monouso durante la manipolazione di sangue o di materiale da esso derivato non fissato. I guanti devono essere rimossi con attenzione e sostituiti quando sono visibilmente contaminati. I guanti si sfilano rovesciandoli e vanno gettati negli appositi contenitori.
- Gli studenti che presentano dermatiti o altre lesioni sulle mani, devono indossare guanti protettivi in tutte le fasi di lavoro.
- I guanti vanno tolti, quando si usino strumenti di qualsiasi natura (telefono, tastiera, strumenti scientifici, maniglie, ecc.). I guanti usati non vanno riutilizzati.
- Lavare le mani routinariamente, immediatamente dopo la manipolazione di materiali contaminati e, in ogni caso, dopo la fine delle attività, anche quando sono stati indossati i guanti. Lavare sempre le mani prima di lasciare il laboratorio.
- In laboratorio è vietato mangiare, bere, fumare, portare oggetti alla bocca ed applicare cosmetici.
- Non pipettare mai con la bocca, ma utilizzare le apposite pipette.
- Non appoggiare recipienti contenenti liquidi biologici vicino al bordo del banco di lavoro.
- Tutto il materiale biologico d'origine umana (sangue, ecc.) deve essere considerato come potenzialmente infetto e pertanto trattato con le necessarie precauzioni.
- Segnalare immediatamente al personale docente ogni spargimento di materiale biologico (ad es. schizzi di sangue) sul piano di lavoro, affinché si provveda alla decontaminazione con un germicida chimico appropriato (candeggina, ecc.).
- Decontaminare e pulire sempre, al termine del loro utilizzo, le apparecchiature scientifiche e, al termine della attività, i piani di lavoro.
- Seguire scrupolosamente le indicazioni di sicurezza riportate nei protocolli di esperimento.
- Raccogliere tutti i liquidi biologici (sangue, terreni di coltura venuti a contatto con le cellule, cellule, ecc.) in speciali contenitori per rifiuti, che verranno successivamente eliminati previo trattamento con candeggina al 15%.
- Mettere il materiale monouso (pipette, fiasche ecc.) venuto a contatto con materiale biologico in un sacco apposito, che verrà smaltito mediante incenerimento.
- Stante i costi elevati dello smaltimento, ridurre il più possibile l'uso del materiale monouso.
- Segnalare immediatamente al personale docente qualsiasi incidente o la mancanza di materiale di protezione

Utilizzo della centrifuga

- chiudere accuratamente il tappo delle provette, per evitare la fuoriuscita di liquido e la formazione di aerosol
- assicurarsi che il rotore sia bilanciato: provette di ugual peso devono essere inserite negli alloggiamenti diametralmente opposti
- chiudere il coperchio della centrifuga prima di avviarla
- non cercare di aprire il coperchio prima del completo arresto del rotore
- in caso di fuoriuscita di liquido dalle provette, avvertire il personale docente

Utilizzo dell'apparecchiatura per elettroforesi

- assicurarsi che l'alimentatore sia spento, prima di collegare i morsetti
- assicurarsi che il coperchio della vaschetta sia correttamente posizionato, prima di collegare i morsetti
- alla fine della corsa, prima di rimuovere il coperchio della cella elettroforetica, spegnere l'alimentatore e staccare i morsetti