

# Metodi di studio delle proteine (o altre macromolecole)

Purificazione

**Separazione** da altri componenti cellulari;  
determinazione del **grado di purezza**

Studio

Determinazione della

- **struttura**
- **funzione**
- **regolazione**

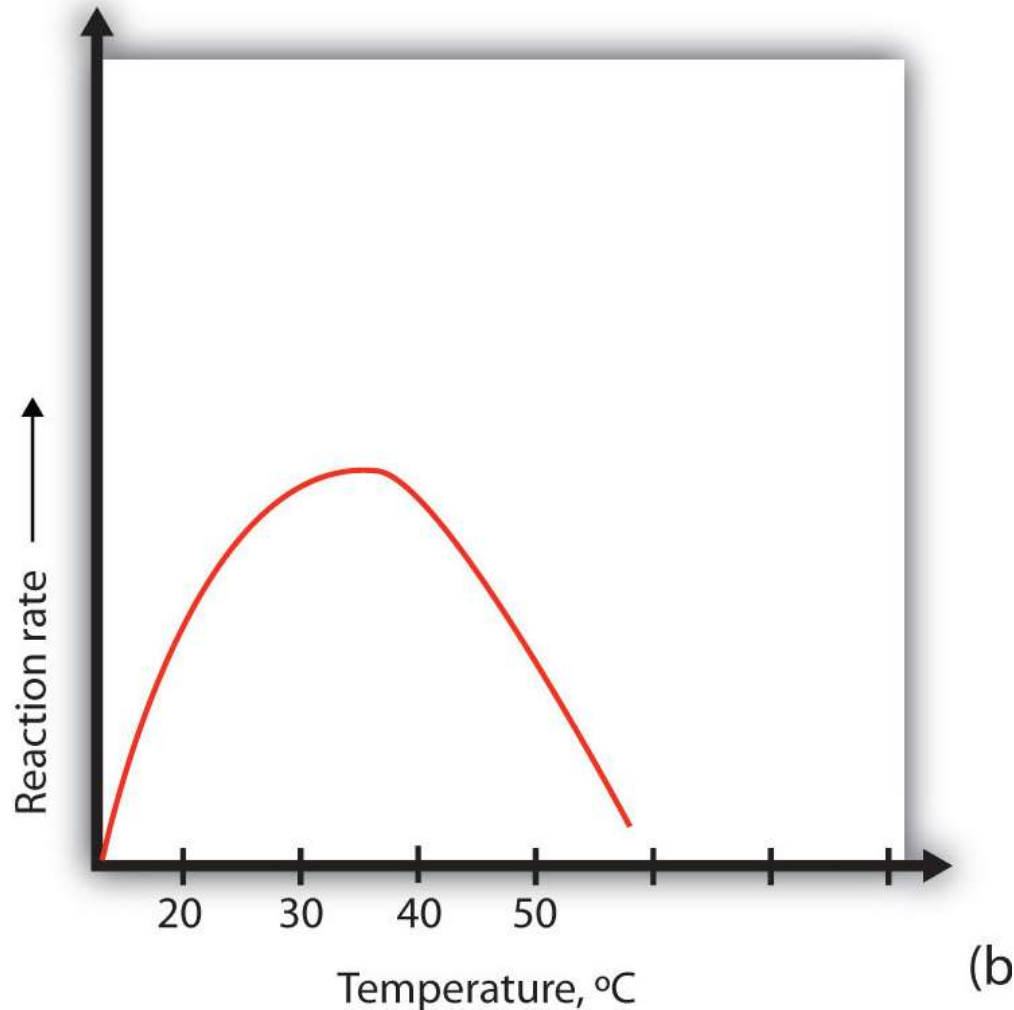
Analisi dei dati

Metodi **statistici**,  
**rappresentazione** grafica

Tutte le manipolazioni biochimiche  
(purificazioni) devono avvenire in  
**condizioni controllate di**

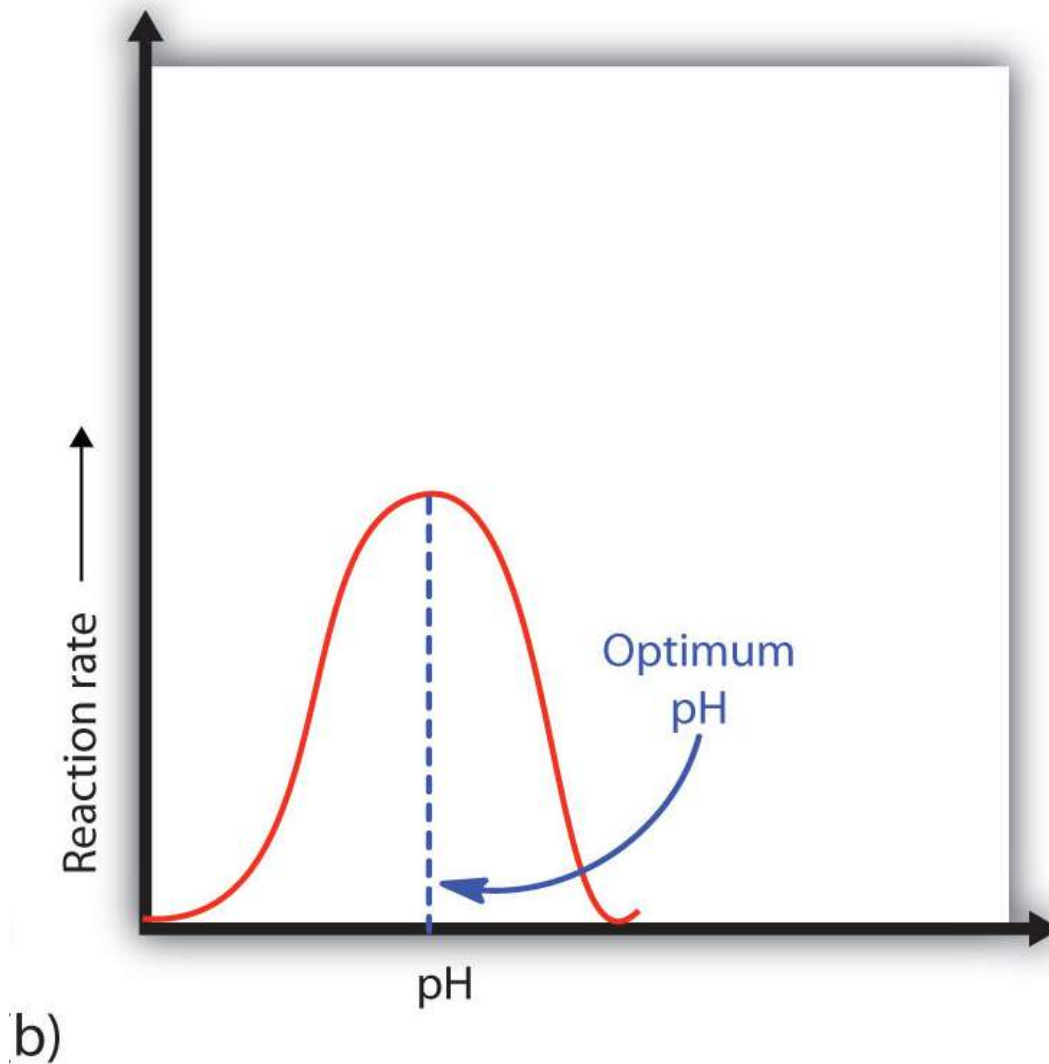
1. temperatura
2. pH
3. forza ionica

L'attività degli enzimi è fortemente influenzata dalla temperatura





L'attività degli enzimi è fortemente influenzata dal pH



## The twelve buffers selected by Good

| Buffer           | $pK_a$ at 20°C | $\Delta pK_a/^\circ C$ |
|------------------|----------------|------------------------|
| MES              | 6.15           | -0.011                 |
| ADA              | 6.6            | -0.011                 |
| PIPES            | 6.8            | -0.0085                |
| ACES             | 6.9            | -0.020                 |
| Choline chloride | 7.1            | -0.027                 |
| BES              | 7.15           | -0.016                 |
| TES              | 7.5            | -0.020                 |
| HEPES            | 7.55           | -0.014                 |
| Acetamidoglycine | 7.7            | -                      |
| Tricine          | 8.15           | -0.021                 |
| Glycinamide      | 8.2            | -0.029                 |
| Bicine           | 8.35           | -0.018                 |

## Equazione di Henderson-Hasselbalch

$$pH = pK_a + \log_{10} \left( \frac{[\text{base}]}{[\text{acido}]} \right) .$$

| <b>Tampone bicarbonato 0,1 mol/L (pH 9,1 – 9,9)</b> |                                         |           |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------|
| <b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 mol/L (ml)</b>  | <b>NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol/L (ml)</b> | <b>pH</b> |
| 1,1                                                 | 8,9                                     | 9,1       |
| 1,4                                                 | 8,6                                     | 9,2       |
| 2,2                                                 | 7,8                                     | 9,4       |
| 2,7                                                 | 7,3                                     | 9,5       |
| 3,9                                                 | 6,1                                     | 9,7       |
| 5,1                                                 | 4,9                                     | 9,9       |

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 mol/L : 10,6 g/L di soluzione acquosa

NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol/L : 8,40 g/L di soluzione acquosa



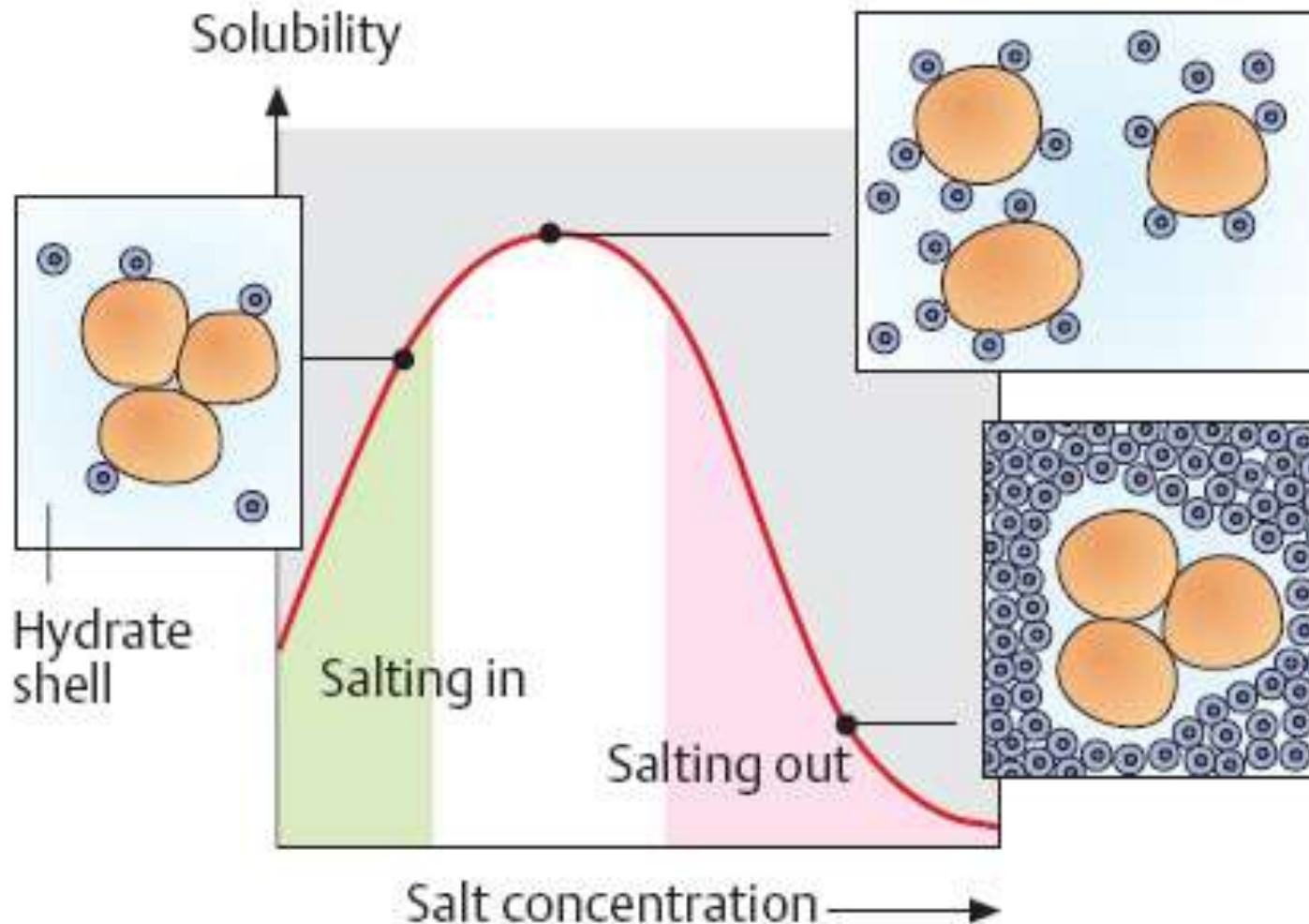
1, bulbo di vetro sensore; 2, elettrodo misuratore; 3, soluzione interna, di solito KCl 0,1 M a pH 7, 5. Elettrodo di riferimento, 6. Soluzione interna di riferimento, di solito anch'essa KCl, 8. Corpo dell'elettrodo, di vetro non conduttore o di plastica

L'elettrodo funziona come una cella elettrochimica che segue l'Equazione di Nernst per la forza elettromotrice

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left[ \frac{\prod \left( a_{i,\text{ox}}^{\nu_{\text{ox}}} \right)}{\prod \left( a_{i,\text{red}}^{\nu_{\text{red}}} \right)} \right]$$

- R è la costante universale dei gas, uguale a 8,314472 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>
- T è la temperatura assoluta in gradi Kelvin
- $a_{i,\text{red}}$  è l'attività chimica della specie i-esima in forma ridotta
- $a_{i,\text{ox}}$  è l'attività chimica della specie i-esima in forma ossidata
- $\nu_{\text{red}}$  e  $\nu_{\text{ox}}$  sono i loro coefficienti stechiometrici
- n è il numero di elettroni trasferiti nella semireazione
- F è la costante di Faraday, uguale a 96485,309 C mol<sup>-1</sup>.

# La solubilità delle proteine è fortemente influenzata dalla forza ionica



**Molarità** : numero di moli di soluto in un litro di solvente  
(mol/L<sup>-1</sup>)

1 **mole** di una sostanza è il numero di grammi di una sostanza uguale al suo peso molecolare ( = numero di Avogadro di molecole =  $6,022 \cdot 10^{23}$ )

Talvolta in laboratorio si usa anche esprimere la concentrazione in g/L o mg/mL o µg/µL  
oppure  
in % peso/volume o volume/volume

Esercizio:

Calcolare la molarità di una soluzione 20 g/L di una sostanza con  $PM = 100 \text{ Da}$

# PURIFICAZIONE DELLE PROTEINE

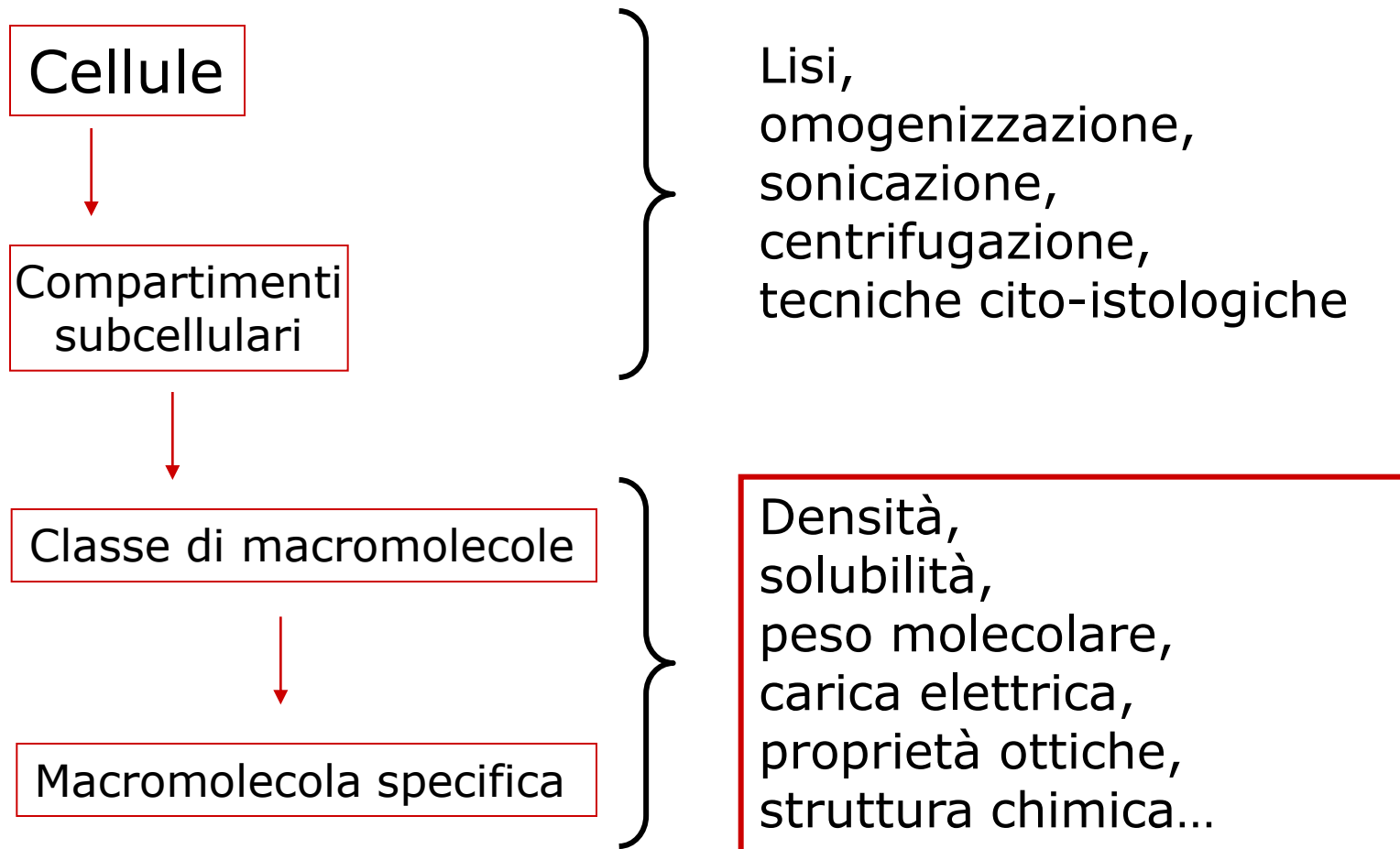
1 proteina da 10.000 - 20.000 proteine diverse (in una cellula, tessuto)

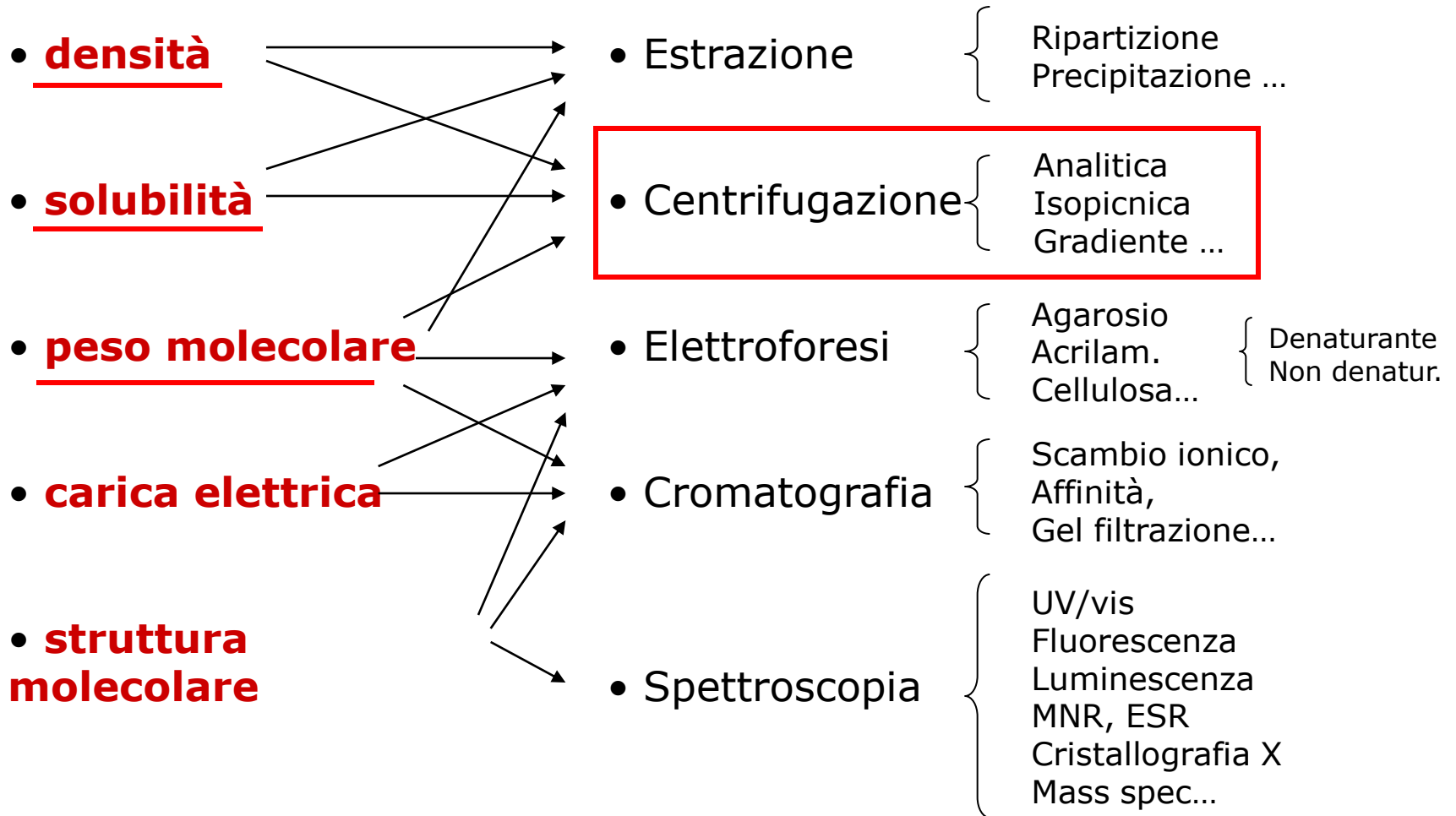
Il grado finale di purezza che si vuole raggiungere **dipende dagli scopi.**

Cosa si intende per “proteina pura” ??

E' praticamente impossibile raggiungere il 100%

Ad es. è sufficiente il 90% per determinare la seq. aminoacidica e anche solo il 50% per studiare la cinetica di un enzima (basta che non ci siano attività competitive)





# PRINCIPI DELLA CENTRIFUGAZIONE

Una particella sottoposta ad un campo centrifugo tende a sedimentare



La velocità di sedimentazione di una particella dipende dal **campo centrifugo**  $G$  applicato radialmente verso l'esterno, che è funzione del quadrato della **velocità angolare** ( $\omega$ , in  $\text{rad s}^{-1}$ ) e della **distanza**  $r$  dal centro di rotazione (cm)

$$G = \omega^2 r$$

1 rivoluzione =  $2\pi$  radianti

$$\omega = 2\pi \text{ rpm}/60$$

$$G = 4\pi^2 (\text{rpm})^2 r/3600$$

campo centrifugo relativo (RCF)

$$\text{RCF} = \frac{4\pi^2 (\text{rpm})^2 r}{3600 \times 980}$$

$$\text{RCF} = 1.118 \times 10^{-5} (\text{rpm})^2 r$$

esempio

$$r = 10 \text{ cm}$$

$$\text{rpm} = 10000$$

$$\text{RCF} \simeq 11200g$$



La velocità di sedimentazione di una  
particella in soluzione dipende da:

- ✓ massa della particella (volume e densità)
- ✓ densità e viscosità del mezzo
- ✓ forma

$$v = s \omega^2 r$$

$r_p$  = raggio particella

$\rho_p$  = densità particella

$\rho_m$  = densità mezzo

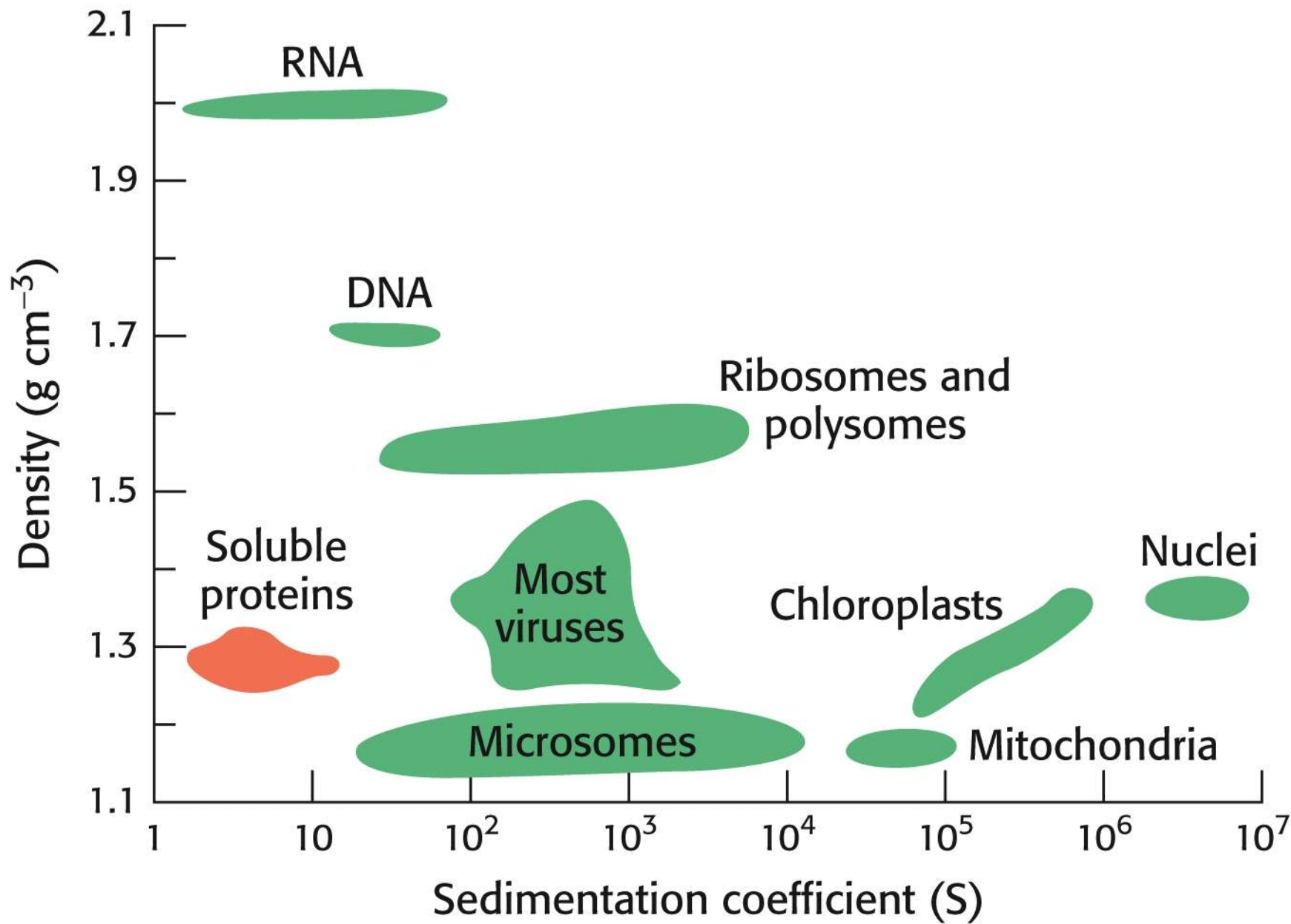
$\eta$  = viscosità mezzo

✓  
coefficiente di sedimentazione (s)

- Il coefficiente di sedimentazione (s) esprime la tendenza di una
- particella a sedimentare. Dipende da dimensione e forma della particella e dalle caratteristiche del mezzo (concentrazione, coeff. frizionale, etc.)

In condizioni standard ( $\text{H}_2\text{O}$  a  $20^\circ\text{C}$ ) il coefficiente di sedimentazione standard è espresso in  $S = \text{Svedberg}$

| Protein                      | S value<br>(Svedberg units) | Molecular<br>weight |
|------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| Pancreatic trypsin inhibitor | 1                           | 6,520               |
| Cytochrome c                 | 1.83                        | 12,310              |
| Ribonuclease A               | 1.78                        | 13,690              |
| Myoglobin                    | 1.97                        | 17,800              |
| Trypsin                      | 2.5                         | 23,200              |
| Carbonic anhydrase           | 3.23                        | 28,800              |
| Concanavlin A                | 3.8                         | 51,260              |
| Malate dehydrogenase         | 5.76                        | 74,900              |
| Lactate dehydrogenase        | 7.54                        | 146,200             |



Le tecniche centrifugative si possono suddividere in generale in: **preparative e analitiche**

La centrifugazione **preparativa** permette di separare e purificare cellule intere, organuli subcellulari e macromolecole biologiche, come acidi nucleici o proteine.

La centrifugazione **analitica** permette invece di studiare le caratteristiche di sedimentazione del campione e di determinarne il grado di purezza o la massa molecolare.

# Centrifughe



Centrifuga da banco



Ultracentrifuga

# CENTRIFUGHE

- ✓ da banco
- ✓ refrigerate ad alta velocità
- ✓ ultracentrifughe

| VELOCITA'             | BASSA | MEDIA  | ALTA   | ULTRA       |
|-----------------------|-------|--------|--------|-------------|
| <i>Velocità (rpm)</i> | 7.000 | 14.000 | 26.000 | 100-150.000 |
| <i>Gravità (x g)</i>  | 7.200 | 18.000 | 75.000 | 800-900.000 |
| <i>Raffreddamento</i> | no    | alcune | tutte  | tutte       |
| <i>Vuoto</i>          | no    | no     | alcune | tutte       |

# Diversi tipi di provette



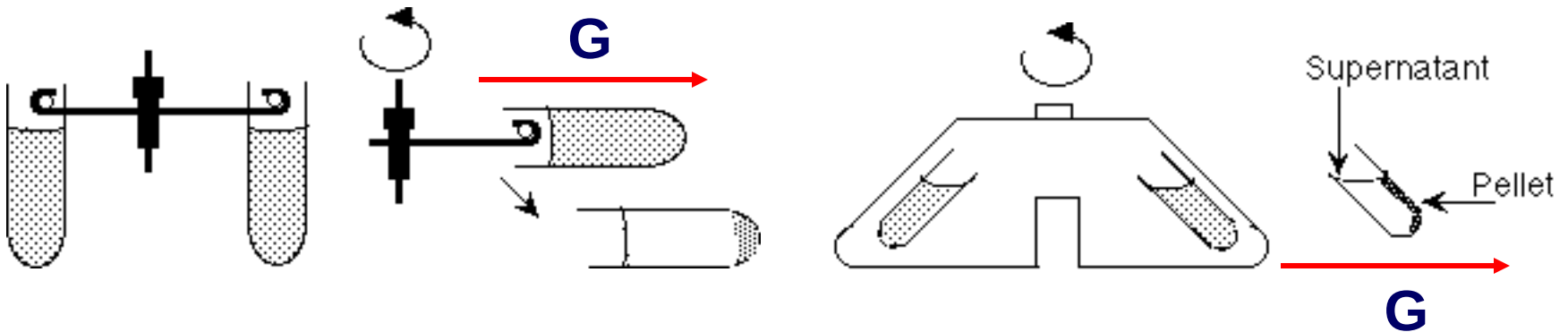
Bisogna sempre “bilanciare le provette”, cioè il peso di due campioni in posizione diametralmente opposta devono essere identici.



E' fondamentale “bilanciare le provette” !!!



# ROTORI

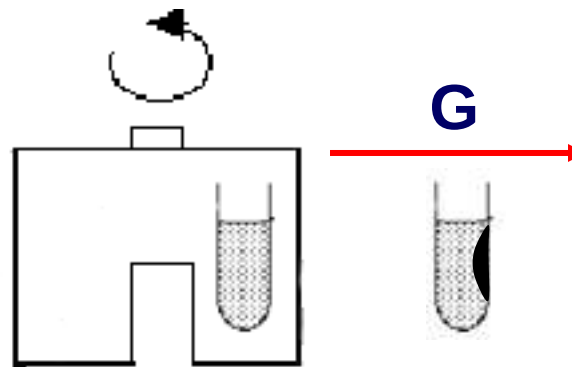


✓ rotore oscillante (swing out)

ideale per le separazioni  
isopicniche e zonali

✓ rotore ad angolo fisso

ideale per il pelleting



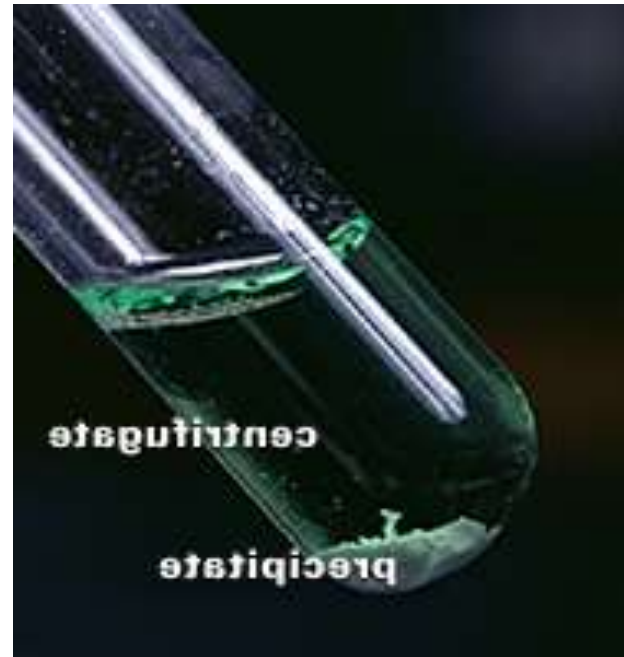
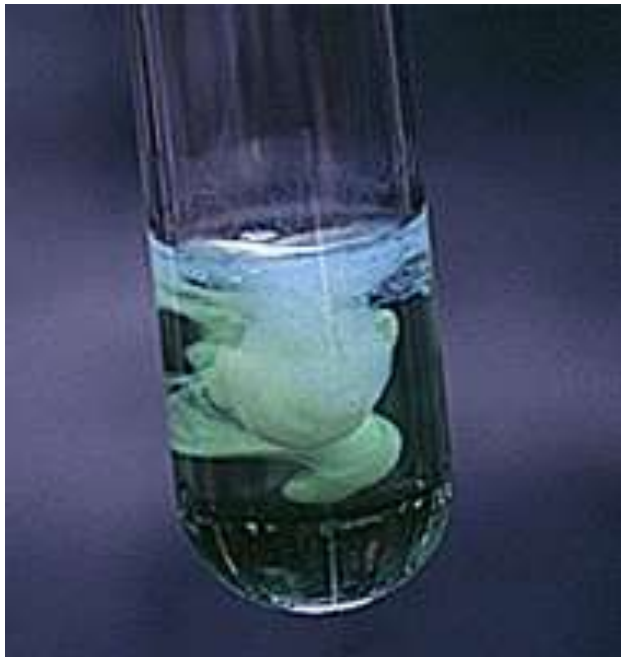
✓ rotore verticale

ideale per la centrifugazione  
isopicnica

## Separazione di una sospensione di particelle in un liquido in due distinte fasi:

- ✓ sedimento (pellet)
- ✓ supernatante (sup)

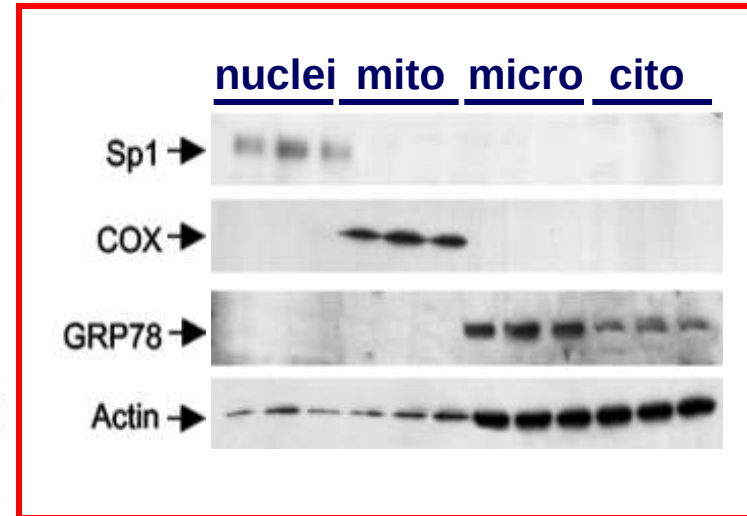
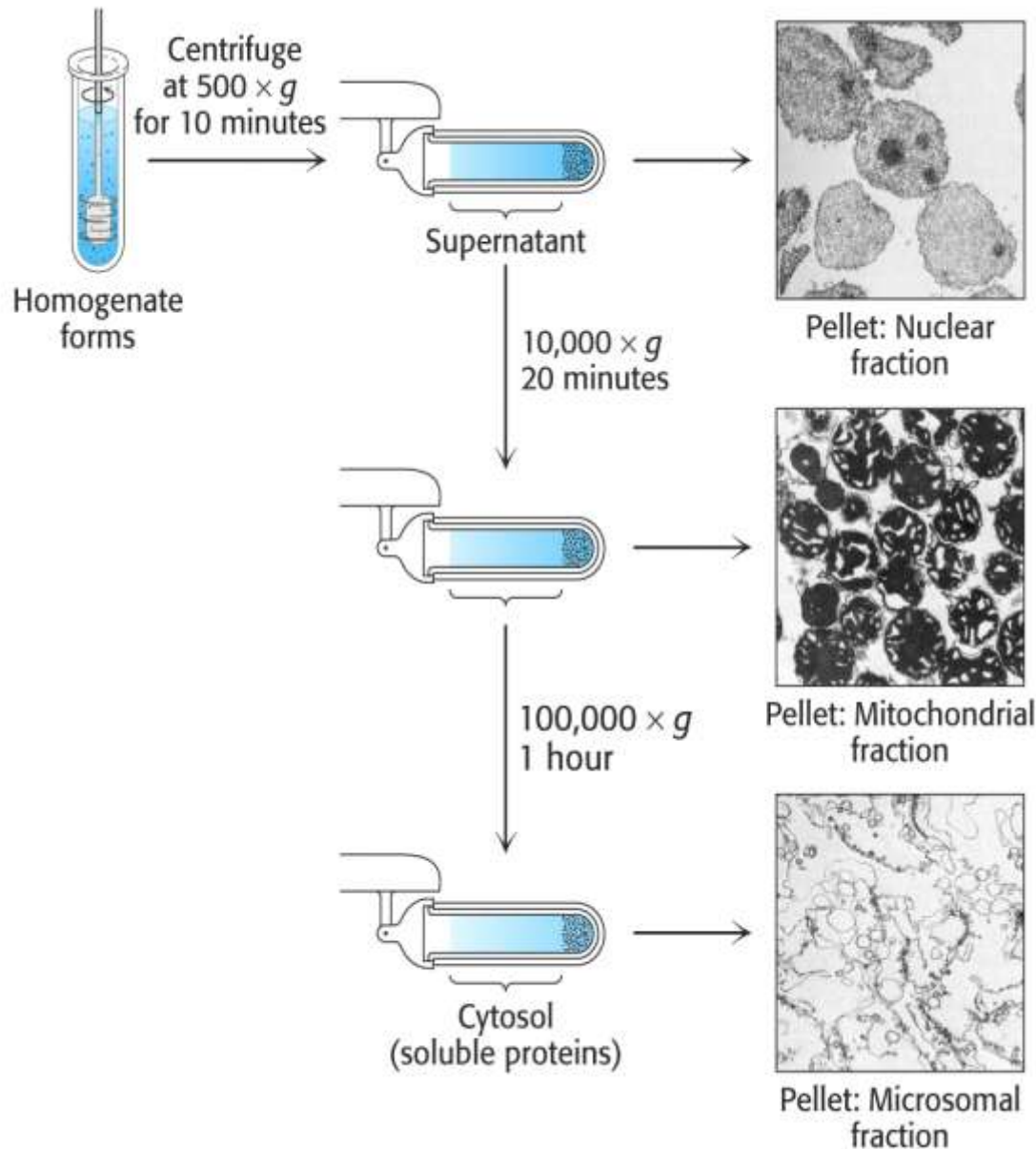
- la velocità di sedimentazione dipende dalle dimensioni e dalla densità della particella;
- l'efficienza del pelleting è proporzionale alla forza di gravità (RCF) applicata e al tempo di centrifugazione.



# Centrifugazione differenziale

La centrifugazione differenziale si basa sulla diversa velocità di sedimentazione di particelle tra loro diverse per densità e dimensioni; la centrifugazione porterà inizialmente alla sedimentazione delle particelle di maggiori dimensioni. Se le particelle hanno la stessa massa ma densità diversa, quelle con densità maggiore sedimenteranno più rapidamente di quelle meno dense.

# Centrifugazione differenziale



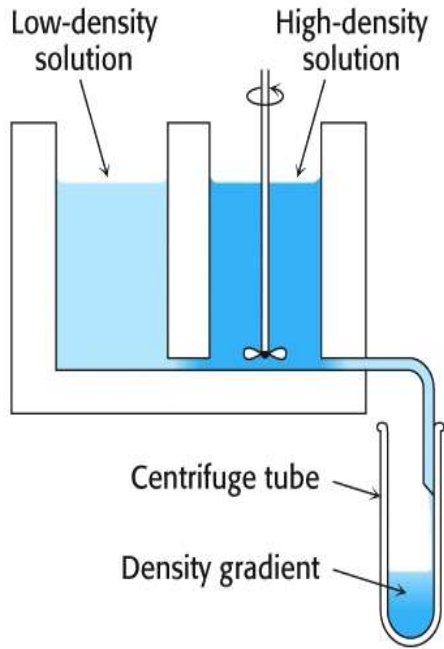
# Centrifugazione in gradiente di densità

Nella **centrifugazione zonale o a banda** si fa pre-formare un **gradiente di densità** in una provetta mediante il mescolamento in proporzioni diverse di una soluzione a bassa densità con una ad alta densità. Si stratifica il campione da centrifugare sopra la miscela e durante la centrifugazione le proteine si muoveranno attraverso il gradiente e si separeranno secondo i loro coefficienti di sedimentazione.

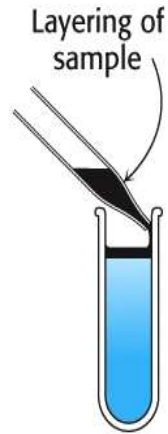
**Centrifugazione isopicnica**, è un metodo all'equilibrio in cui le particelle si separano formando bande alle loro rispettive densità di galleggiamento.

# Centrifugazione in gradiente di densità

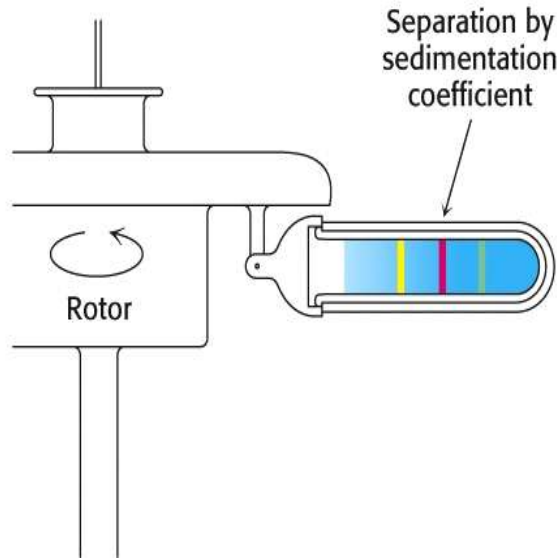
## formatore di gradienti



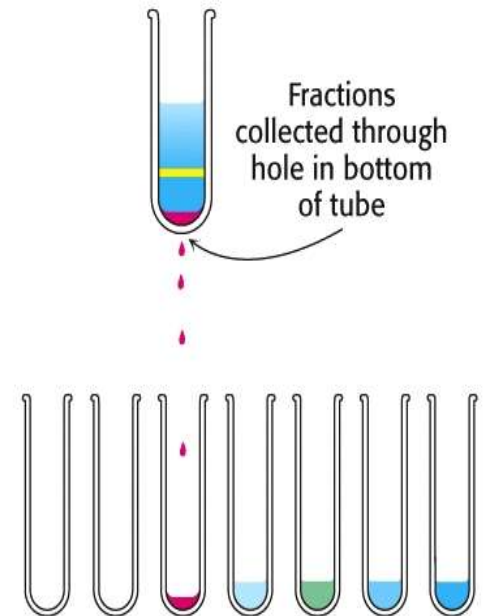
(A)



(B)

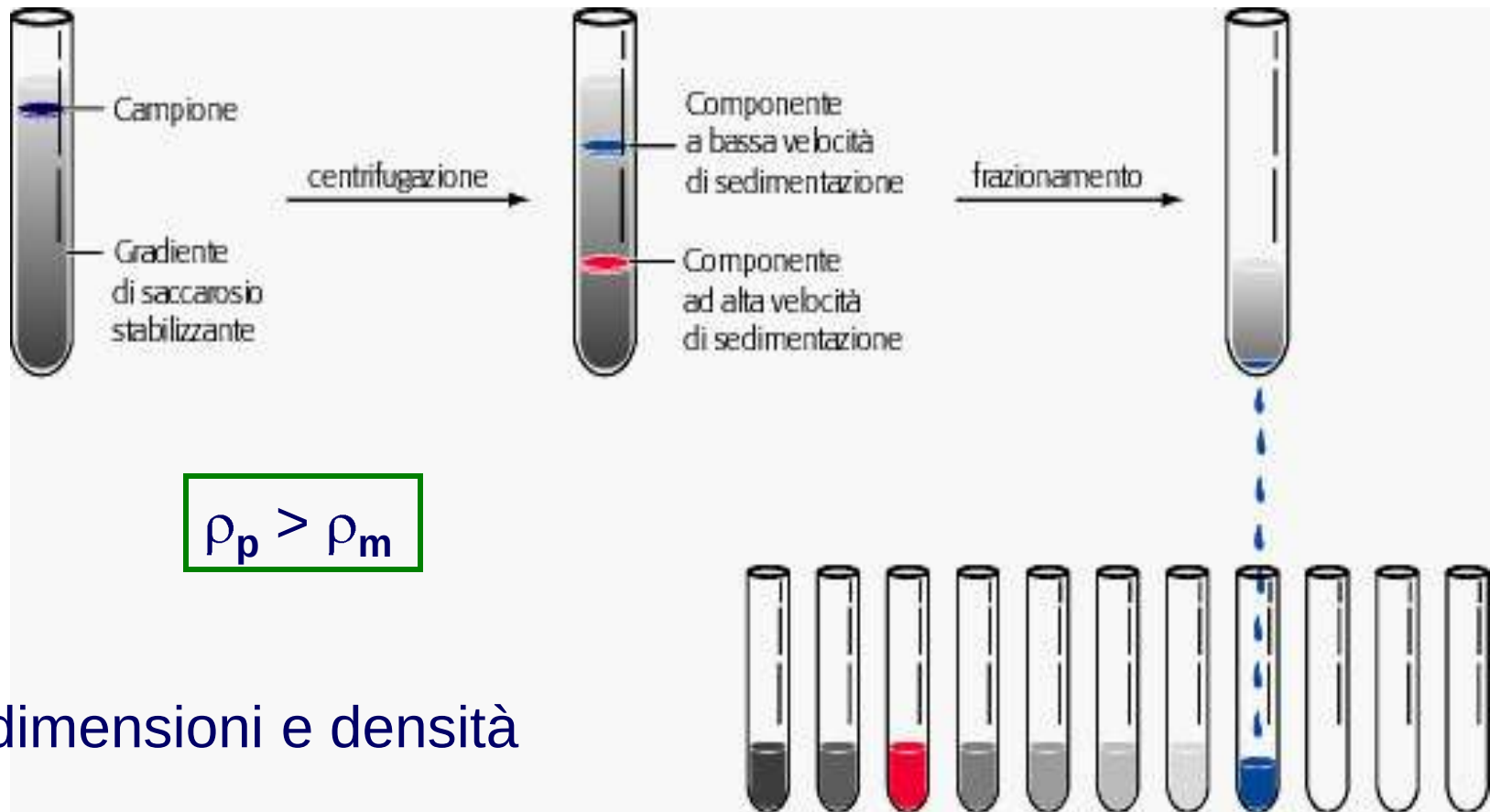


(C)

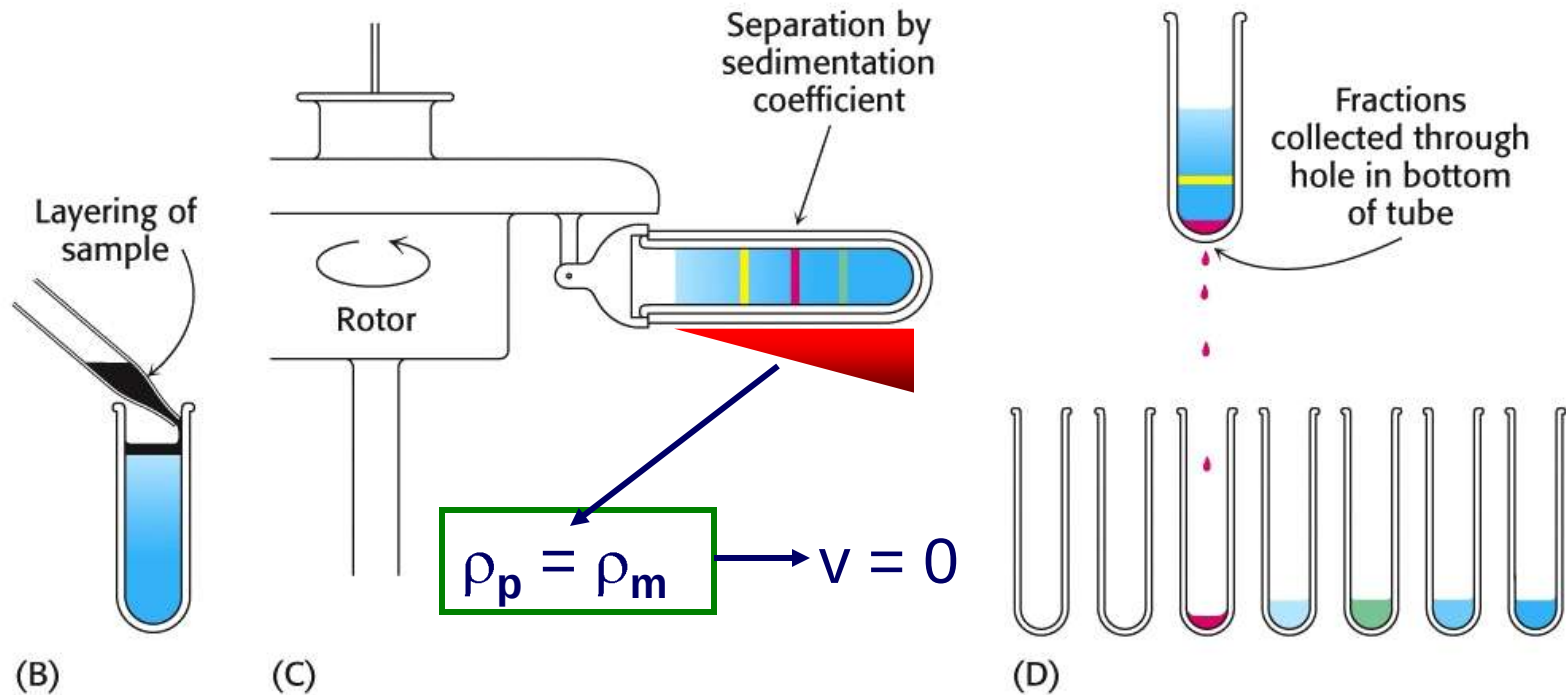


(D)

# Centrifugazione zonale di velocità

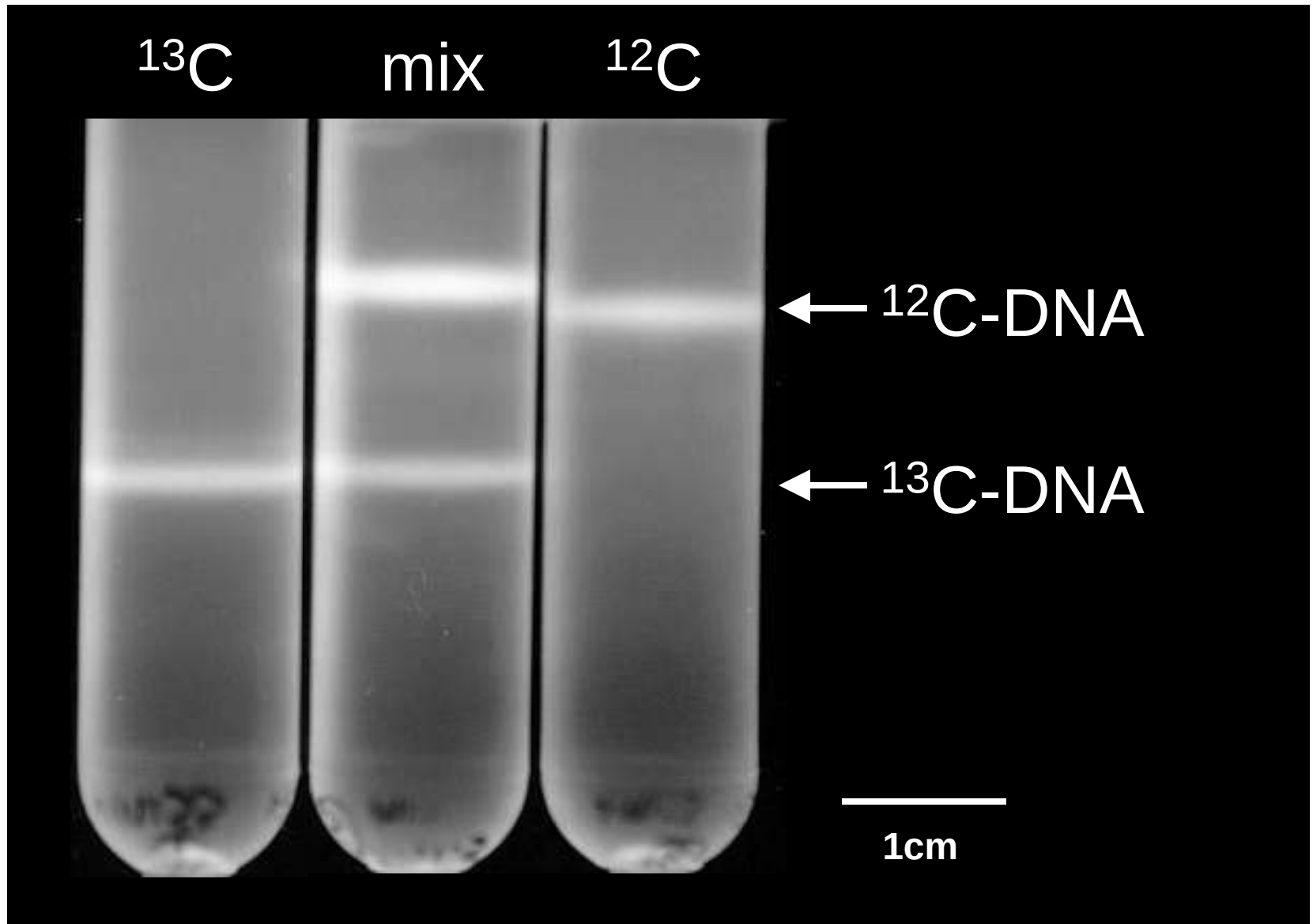


# Centrifugazione isopichnica (equilibrio di densità)



densità specifica

# DNA in gradiente CsCl-Etidio bromuro



DNA extracted and centrifuged  
to equilibrium in CsCl  
density gradient

(a)

Heavy  
DNA ( $^{15}\text{N}$ )



Original parent  
molecule

(b)

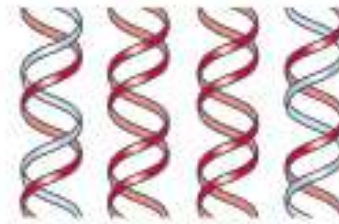
Hybrid DNA  
( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ )



First-generation  
daughter molecules

(c)

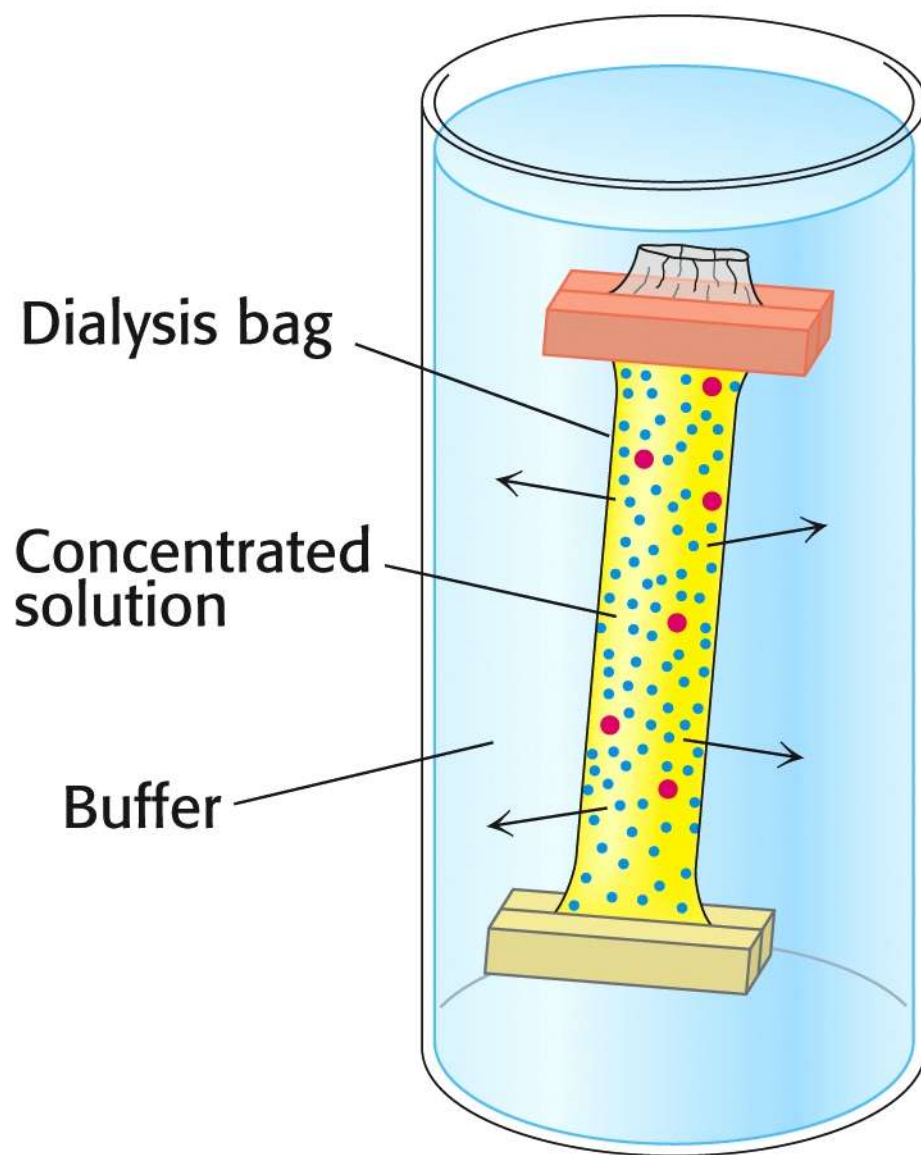
Light  
DNA ( $^{14}\text{N}$ )  
Hybrid DNA



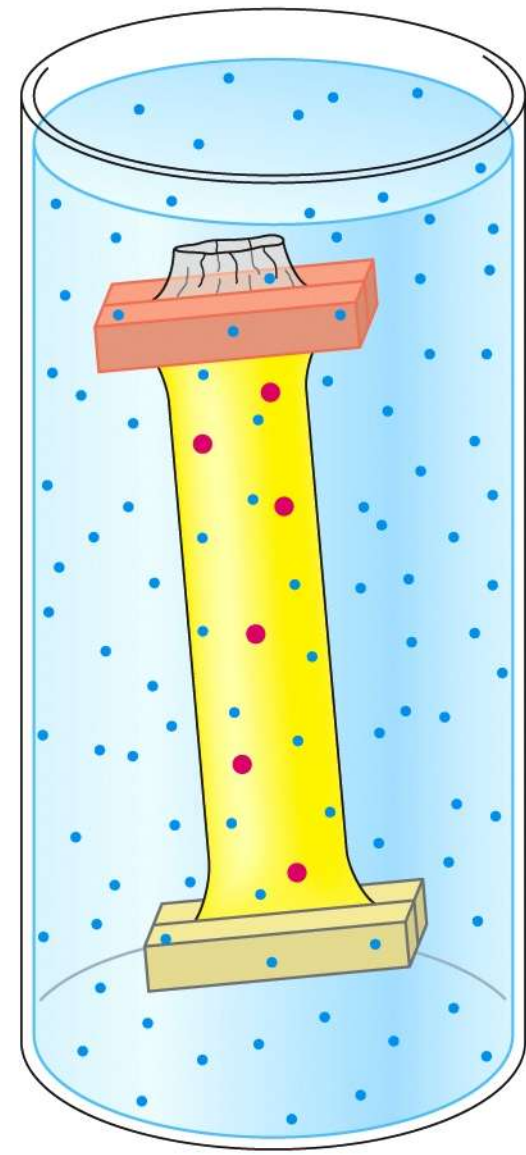
Second-generation  
daughter molecules

# DIALISI

La **dialisi** è un procedimento fisico con cui si separano una o più sostanze disciolte in un liquido, utilizzando una **membrana semipermeabile** che permette il passaggio di tali sostanze in una sola direzione. Il moto delle sostanze è dovuto essenzialmente alla **differenza di concentrazione** (*gradiente*) di tale sostanza tra i soluti nei due comparti diffusione e cessa una volta giunti all'equilibrio.

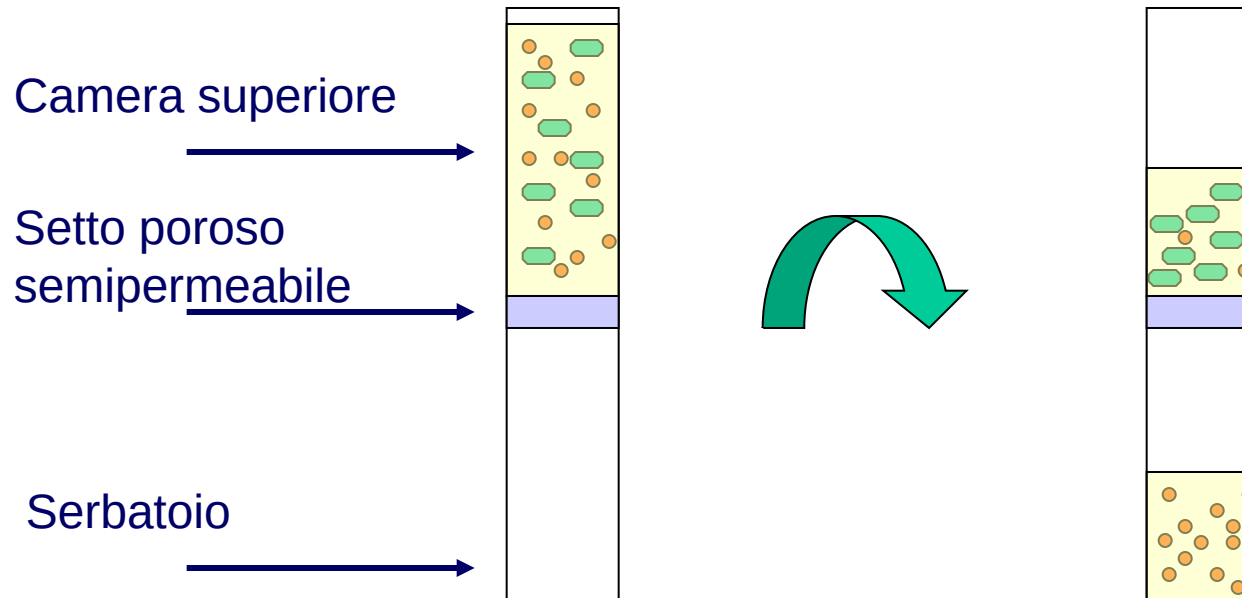


At start of dialysis



At equilibrium

Il principio della dialisi si può applicare anche mediante centrifugazione → tecniche di ultrafiltrazione

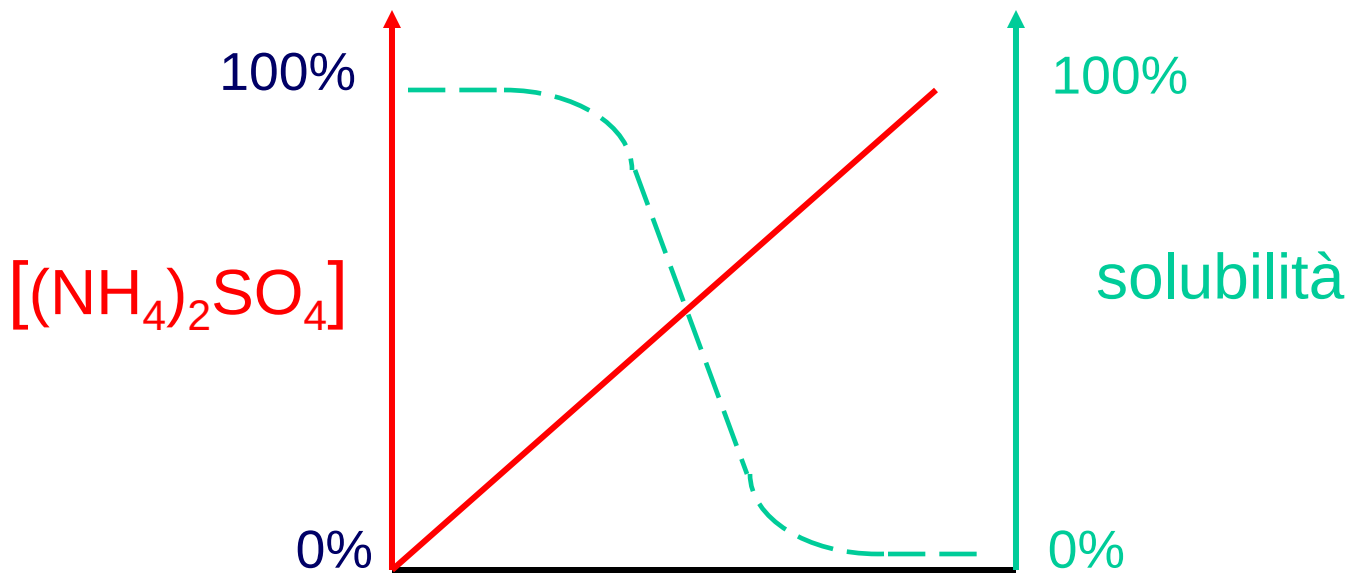


## Frazionamento di proteine per “salting out”

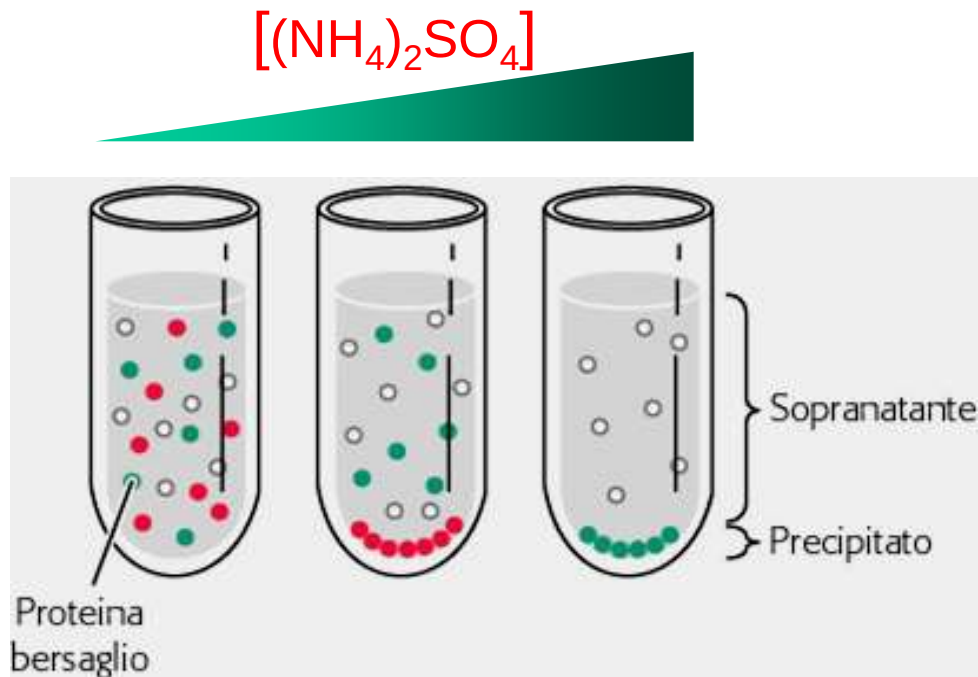
Ogni proteina, in dipendenza dalle sue caratteristiche strutturali, possiede una solubilità dipendente dal **solvente** utilizzato (acqua, solventi organici), dal **pH** e dalle condizioni di **forza ionica**.

## Principio del salting out :

1. gli ioni di sale aggiunto competono con gli ioni presenti nella soluzione per le molecole di solvente, facilitando l'aggregazione proteica;
2. Proteine diverse precipitano a diverse concentrazioni di sale.



## Frazionamento di proteine per “salting out”

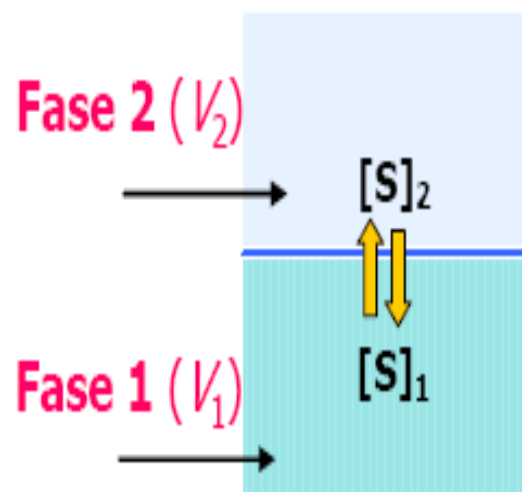
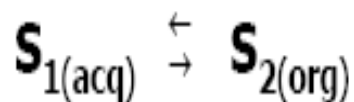


Ammonio solfato è il reagente comunemente usato per il salting out perchè :

- ha **elevata solubilità** in acqua, permettendo di ottenere soluzioni ad alta forza ionica;
- il **pH della soluzione può essere variato**, portandolo vicino al pI della proteina da purificare.

## Ripartizione per solubilità in solventi organici

Se un soluto **S** si ripartisce ad esempio tra acqua e solvente organico, si instaura l'equilibrio:

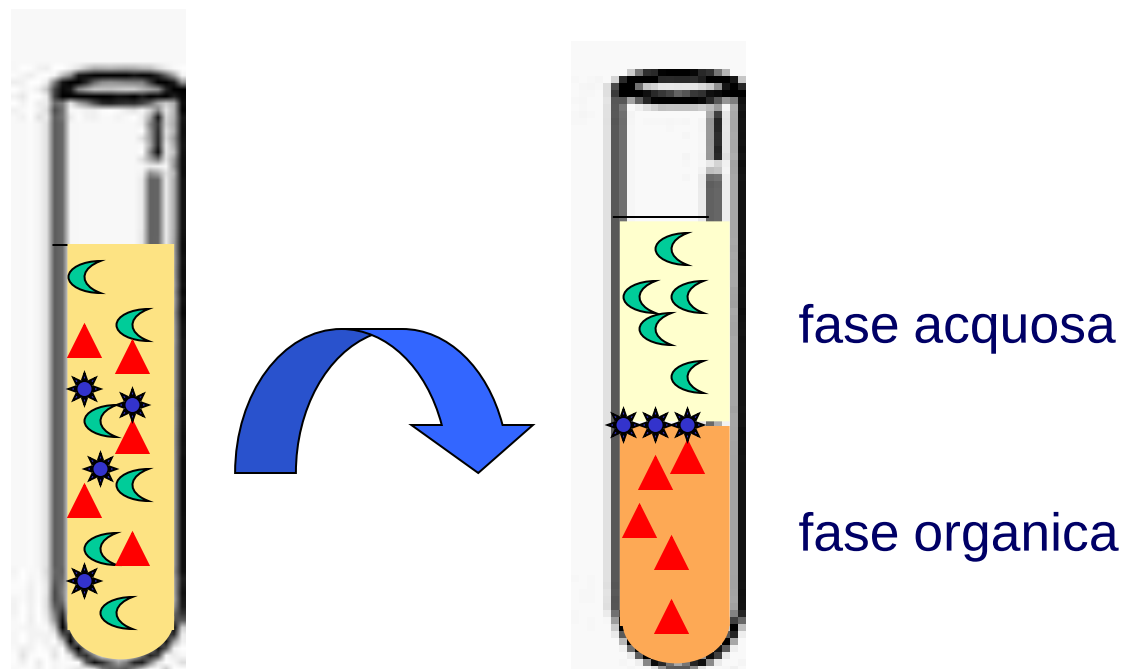


$$K_D = \frac{a_{S,2}}{a_{S,1}} \cong \frac{[S]_2}{[S]_1}$$

**Costante di ripartizione**  
(coefficiente di ripartizione)

## Ripartizione per solubilità in solventi organici

- ◐ acidi nucleici
- ✱ proteine
- ▲ lipidi



emulsione

Acqua : fenolo/cloroformio