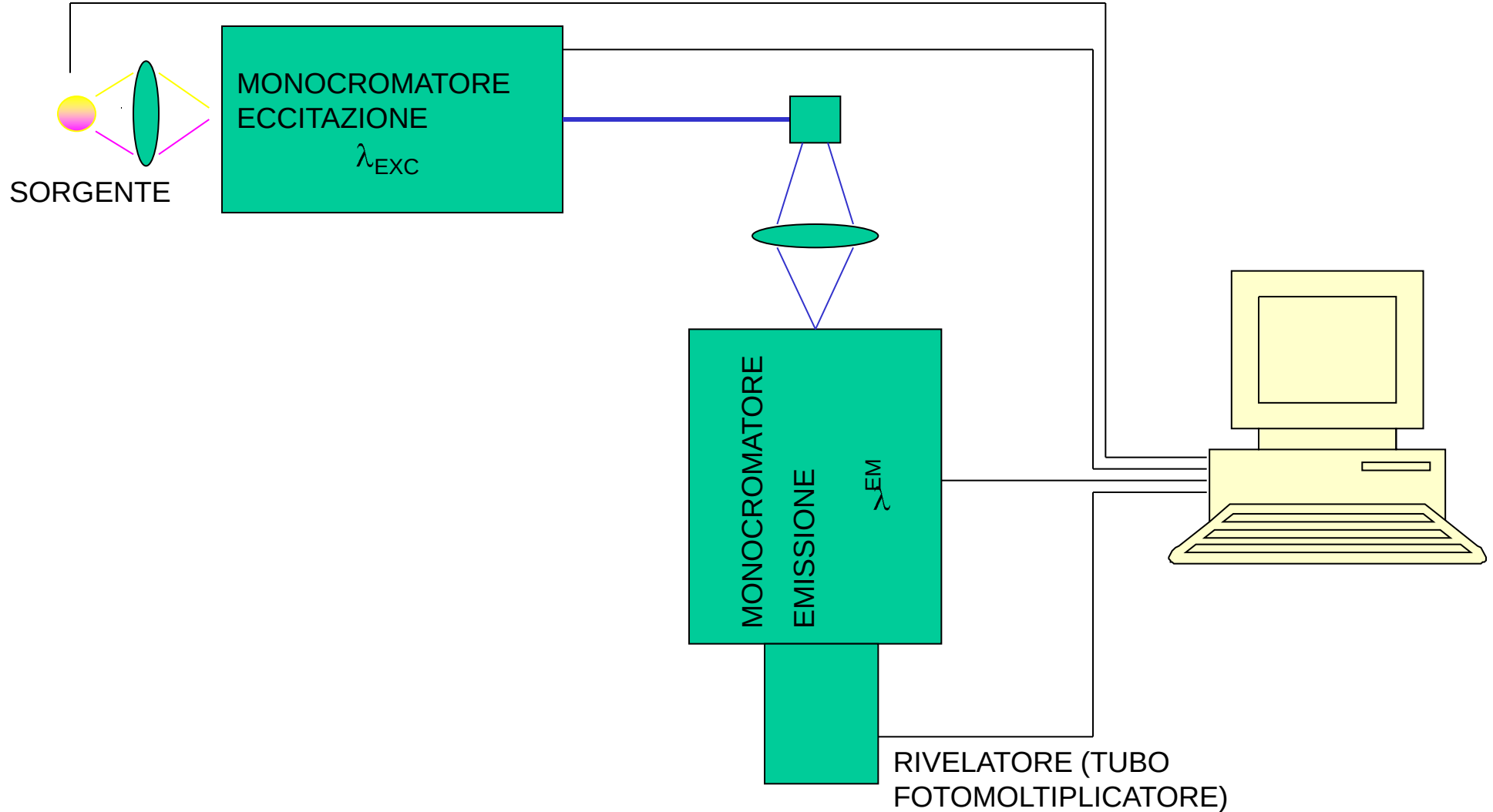


Schema a blocchi di uno spettrofluorimetro



Anche il DNA assorbe nell'UV

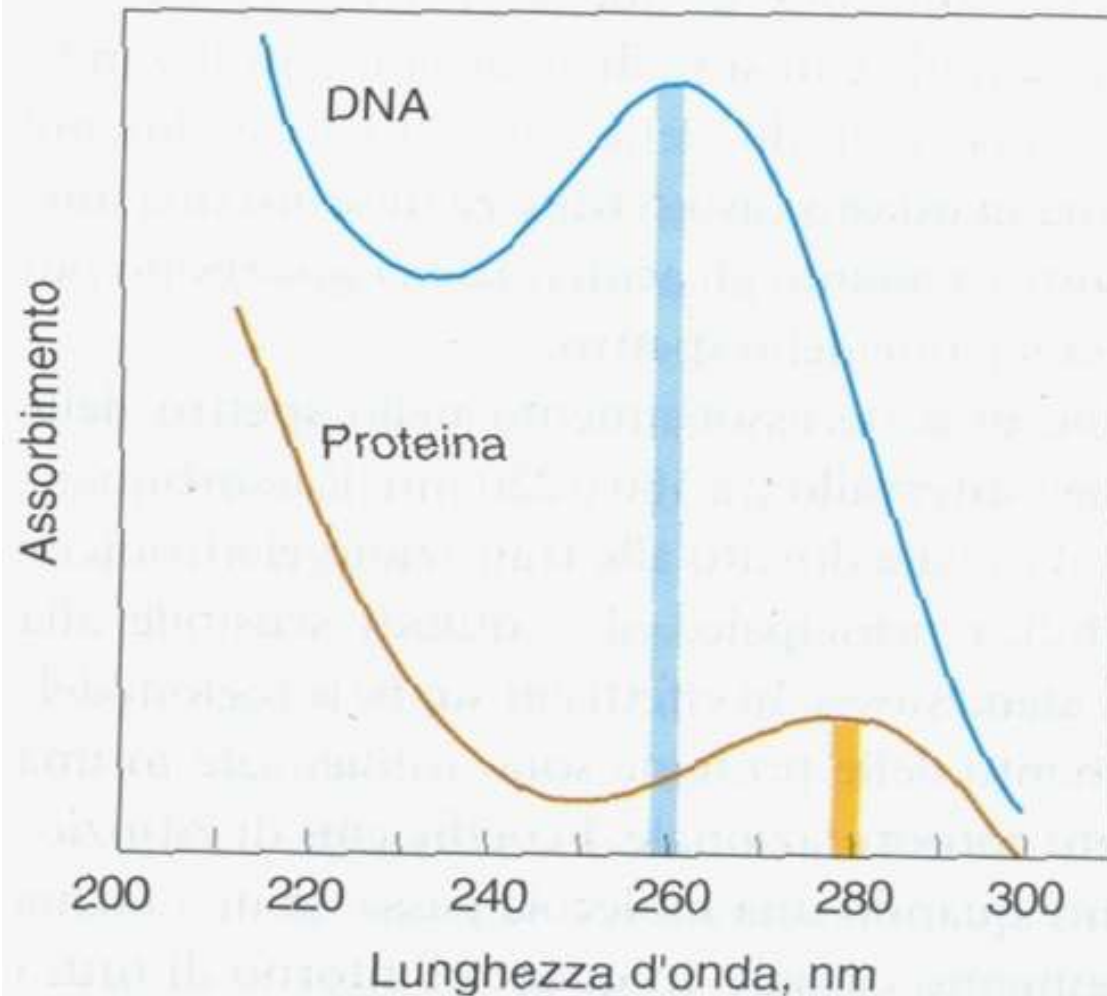


FIGURA 6A.2

Spettri di assorbimento nel vicino ultravioletto di una proteina e un DNA tipici. L'assorbimento a 280 nm è usato comunemente per determinare la concentrazione di una proteina.

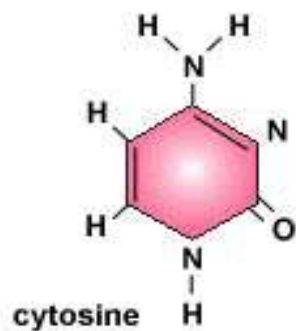
adenine



guanine



purines

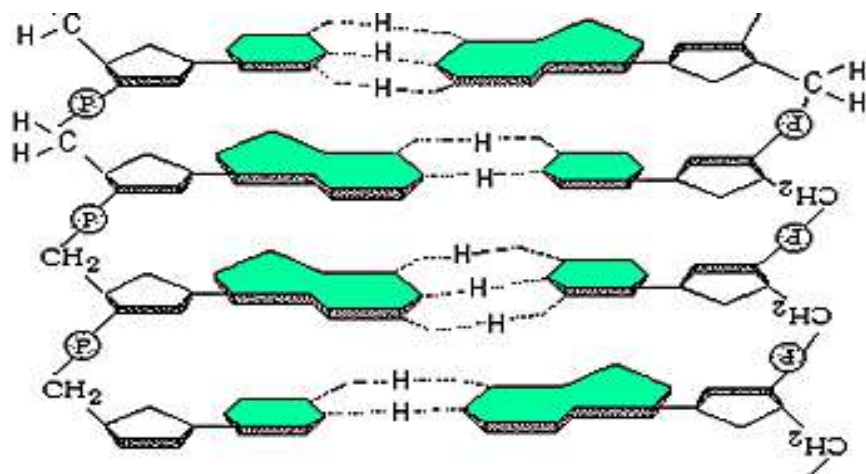


cytosine

pyrimidines



thymine



Cosa determina l'assorbanza di un cromoforo?

- I cromofori sono di solito caratterizzati da doppi legami e sistemi di risonanza
- Lo spettro di assorbimento di un cromoforo è solo parzialmente determinato dalla sua natura chimica
- L'ambiente del cromoforo influenza le proprietà dello spettro
 - pH
 - polarità del solvente
 - effetti di orientamento

Effetti di orientamento derivano da molecole di cromofori vicini.
Ad es. hyperchromicity degli acidi nucleici.

“Melting” del DNA:
Assorbanza relativa a 260 nm

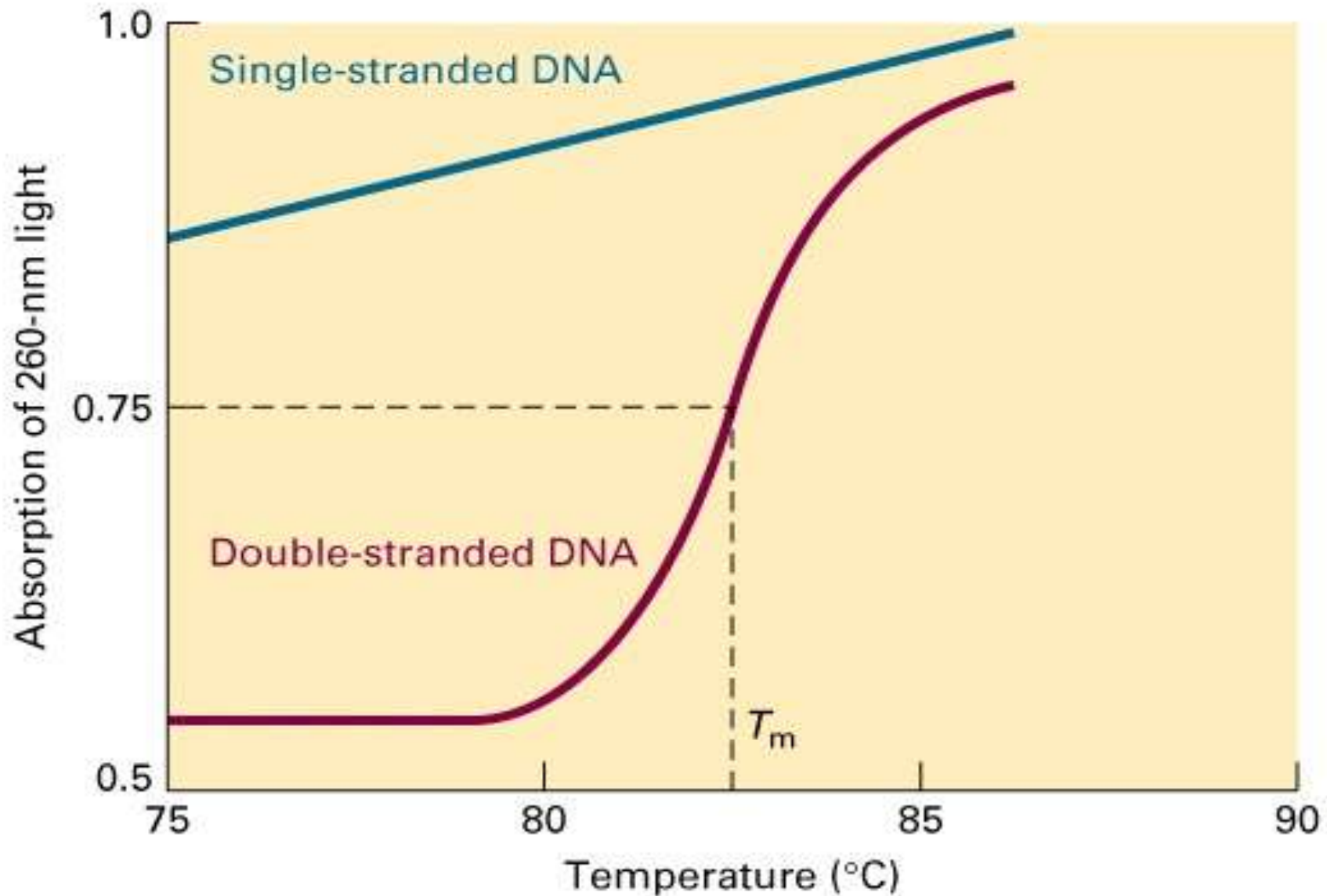
- | | |
|-------------------------|------|
| • DNA doppio filamento | 1.00 |
| • DNA singolo filamento | 1.37 |
| • Basi libere | 1.67 |

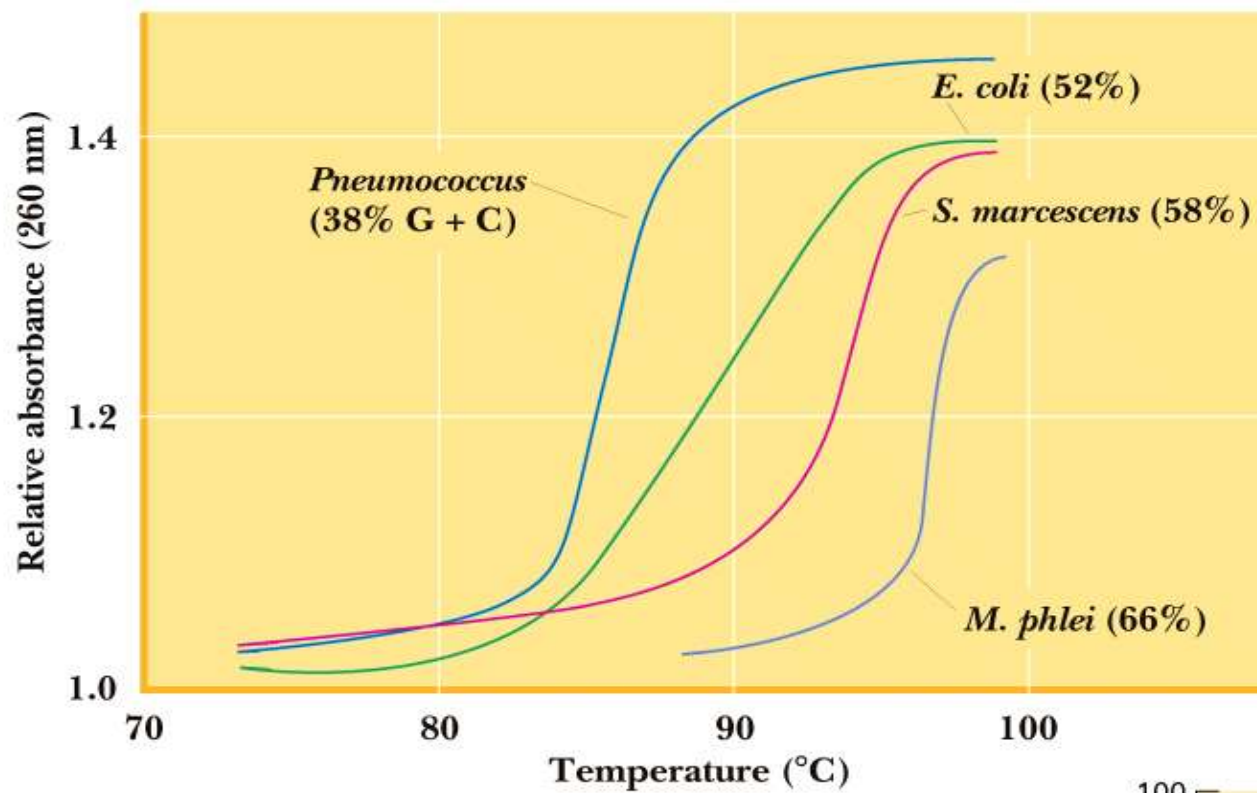
Denaturazione del DNA

- È possibile seguire la denaturazione del DNA a 260 nm.
- Basi accoppiate ed impilate assorbono meno nell'UV di quelle "separate" - **effetto ipercromico**.
- La temperatura corrispondente a metà dell'aumento osservato nell' A_{260} è definita come "**temperatura di *melting***", T_m o temperatura di fusione del DNA.
- **Il valore di T_m varia con il rapporto GC/AT** - un maggior contenuto di GC conduce ad una T_m più alta.
- Una maggior forza ionica fa aumentare T_m , limitando la repulsione elettrostatica tra fosfati

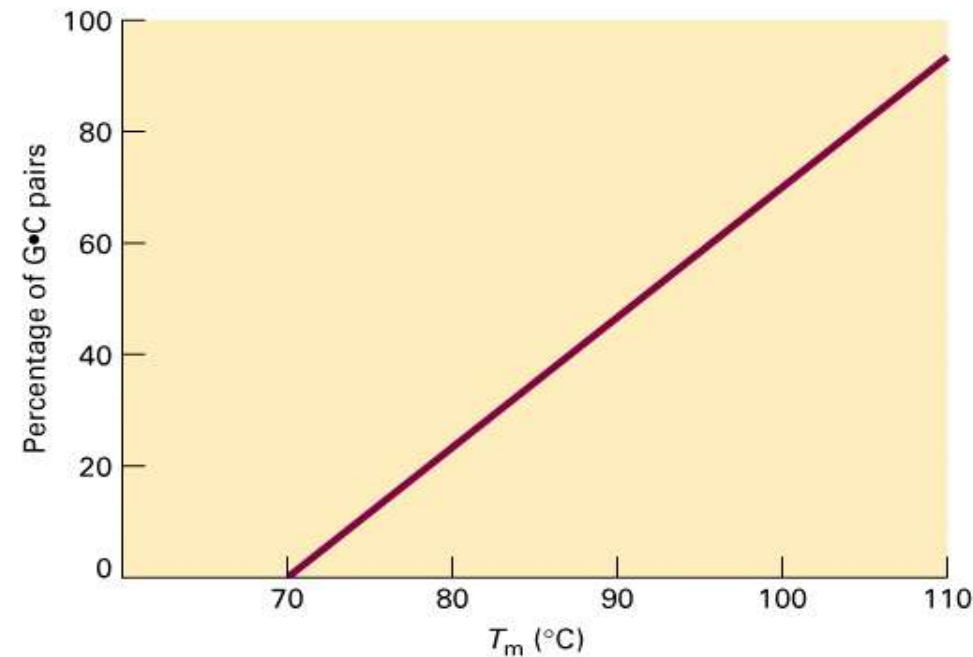
Denaturazione del DNA

(a)





T_m : dipendenza
dalla
composizione



Sommario

Spettroscopia di assorbimento nel U.V/visibile : absorption 210 – 900 nm.

L'energia luminosa promuove il trasferimento di elettroni dallo stato basale ad uno eccitato. Questo avviene grazie a gruppi detti cromofori

- I cromofori delle proteine includono gli aminoacidi aromatici (Phe, Tyr, Trp), il legame peptidico, gruppi prostetici o cofattori (metalli). I cromofori sono caratterizzati da elettroni delocalizzati.
- Le frequenze a cui la luce è assorbita sono influenzate dalla struttura e dall'ambiente del cromoforo.
- La spettroscopia di assorbimento ha diverse applicazioni

Caratteristiche dei metodi analitici

- **Intervallo analitico**: campo in cui il metodo è applicabile senza modifiche
- **Sensibilità**: capacità del metodo di determinare piccole quantità
- **Limite di rivelabilità**: minima osservazione distinguibile statisticamente
- **Specificità (o selettività)**: capacità di determinare solamente il componente da misurare.
E' legata alla accuratezza

- **Interferenza:** effetto di un componente (che può non produrre lettura) sulla accuratezza di misura dell'analita
- **Precisione:** concordanza tra misure ripetute; esprime la dispersione delle misure attorno alla media; è correlata alla deviazione standard
- **Accuratezza:** concordanza tra il valore trovato e il valore “vero”; dipende da errori sistematici

Determinazione della quantità di proteina:

La legge di Lambert e Beer

$$A = \varepsilon_{\lambda} c l$$

A = assorbanza alla lunghezza d'onda λ

ε_{λ} = coeff. di estinzione molare

c = concentrazione molare

l = lunghezza del cammino ottico (1 cm)

(spesso usato per proteine purificate)

Determinazione della quantità di proteina:

1. Assorbimento alla luce ultravioletta

Principio: gli aminoacidi aromatici (tirosina e triptofano) hanno un massimo di assorbimento a $\lambda = 280 \text{ nm}$

Svantaggi: Interferenze con acidi nucleici ($\sim 10 \times$ aa.) --> approssimatività

Vantaggi : rapidità, possibilità di correzione
$$\text{Proteine (mg/ml)} = 1.55 A_{280} - 0.76 A_{260}$$

(spesso usato per una miscela di proteine)

Determinazione della quantità di proteina: 2. Metodo di Bradford

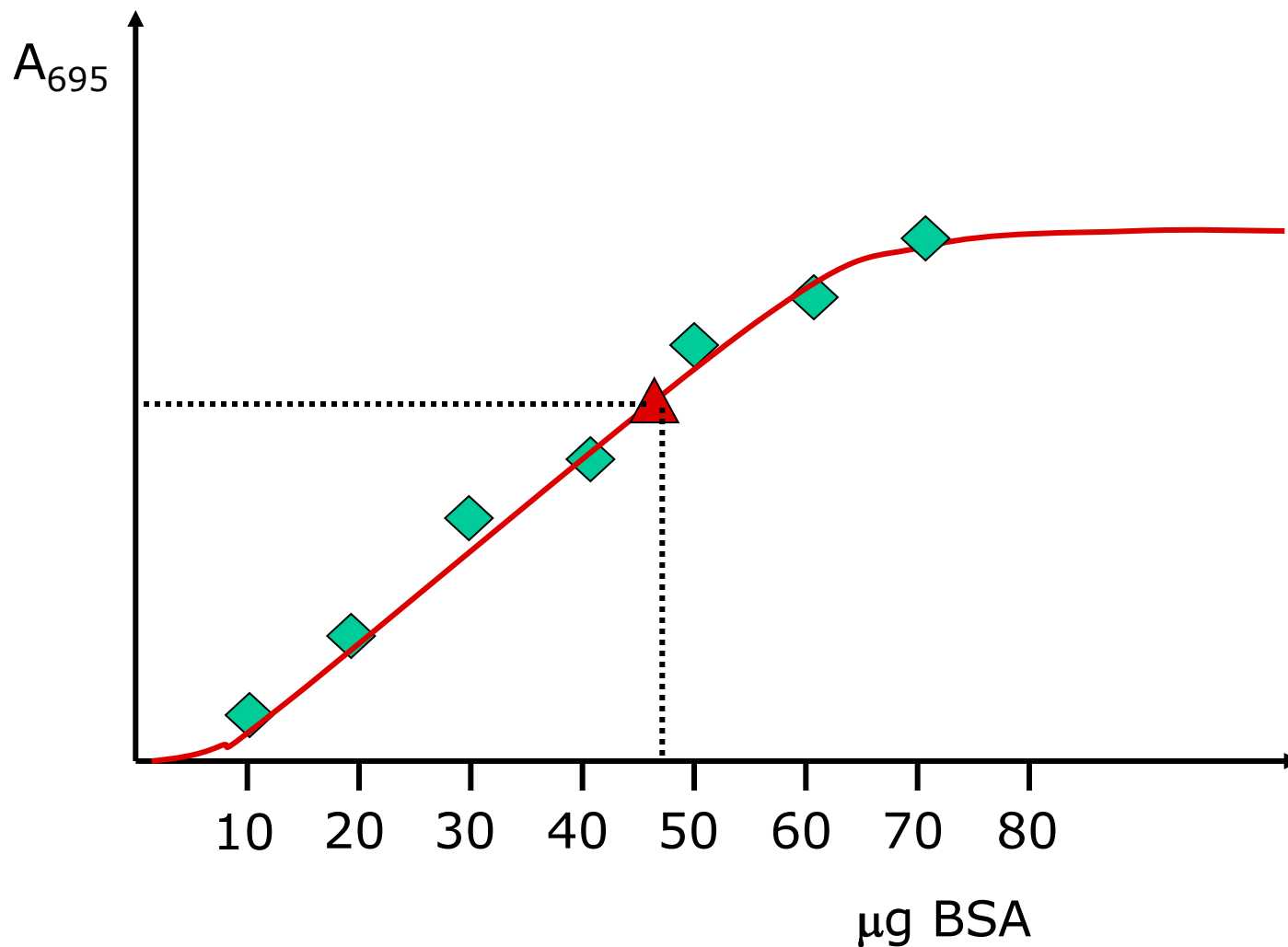
Principio: colorazione con Coomassie Brilliant Blue dei gruppi -SH, A_{595}

Svantaggi : dipende dal contenuto di a.a. della singola proteina - difficoltà di standardizzazione

Vantaggi : rapidità di esecuzione

(spesso usato per una miscela di proteine)

Determinazione per **interpolazione grafica**
rispetto ad una **curva standard**



Costruzione di curve di taratura

- La **sensibilità** è massima al picco di estinzione del cromoforo
- A volte si preferisce un picco più “specifico”
- Il “bianco” deve contenere tutti i reagenti, tranne la sostanza da determinare
- Occorrono possibilmente cinque punti, misurati in doppio
- Non si deve estrapolare la curva oltre il valore più alto determinato

Determinazione della quantità di proteina: 3. Metodo di Lowry

Principio: formazione di complessi colorati con i reagenti (rame in condizioni basiche)

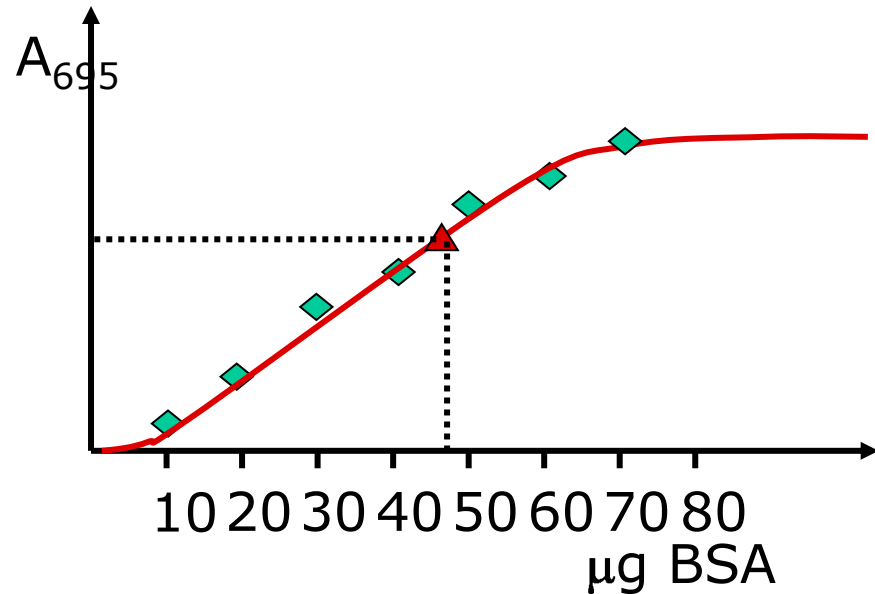
Svantaggi : Interferenze con tamponi comuni (TRIS, HEPES, PIPES) e detergenti

Vantaggi : riproducibilità rispetto allo standard

(spesso usato per una miscela di proteine)

Determinazione per **interpolazione grafica** rispetto ad una **curva standard**

Sulla base dei seguenti dati sperimentali, ottenuti in un saggio con il metodo di Lowry, calcolare il valore della concentrazione (in mg/ml) del campione X



	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	30 ml	40 ml	60 ml
BSA 1 mg/ml		0.093		0.157	0.250	0.298	0.413
Campione X diluito 1:2	0.120		0.354				