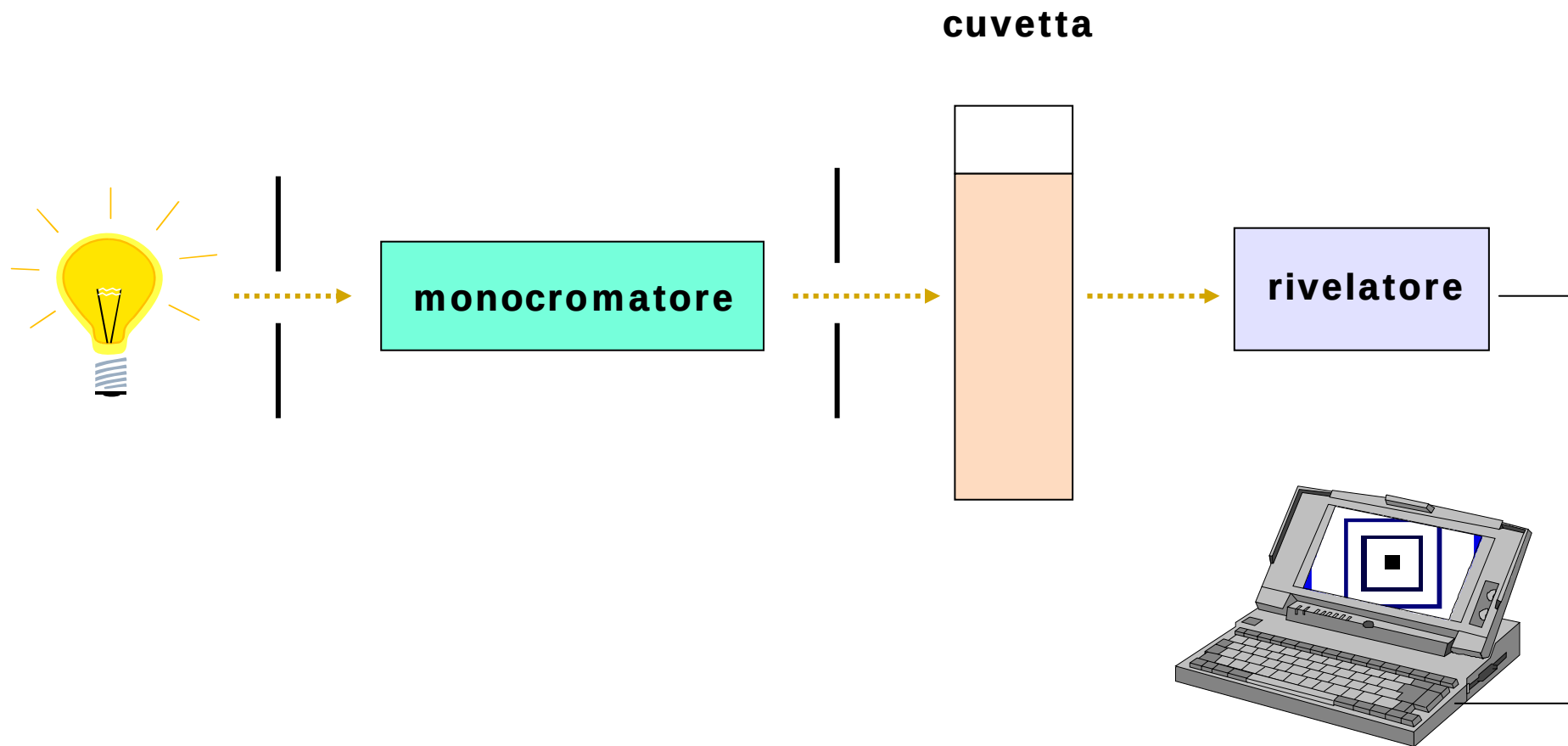


Metodi di studio delle proteine :

- determinazione della quantità
- determinazione della struttura primaria (sequenza a.a.)
- determinazione della struttura 3D

Spettrofotometro



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)

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: 2. Metodo di Bradford

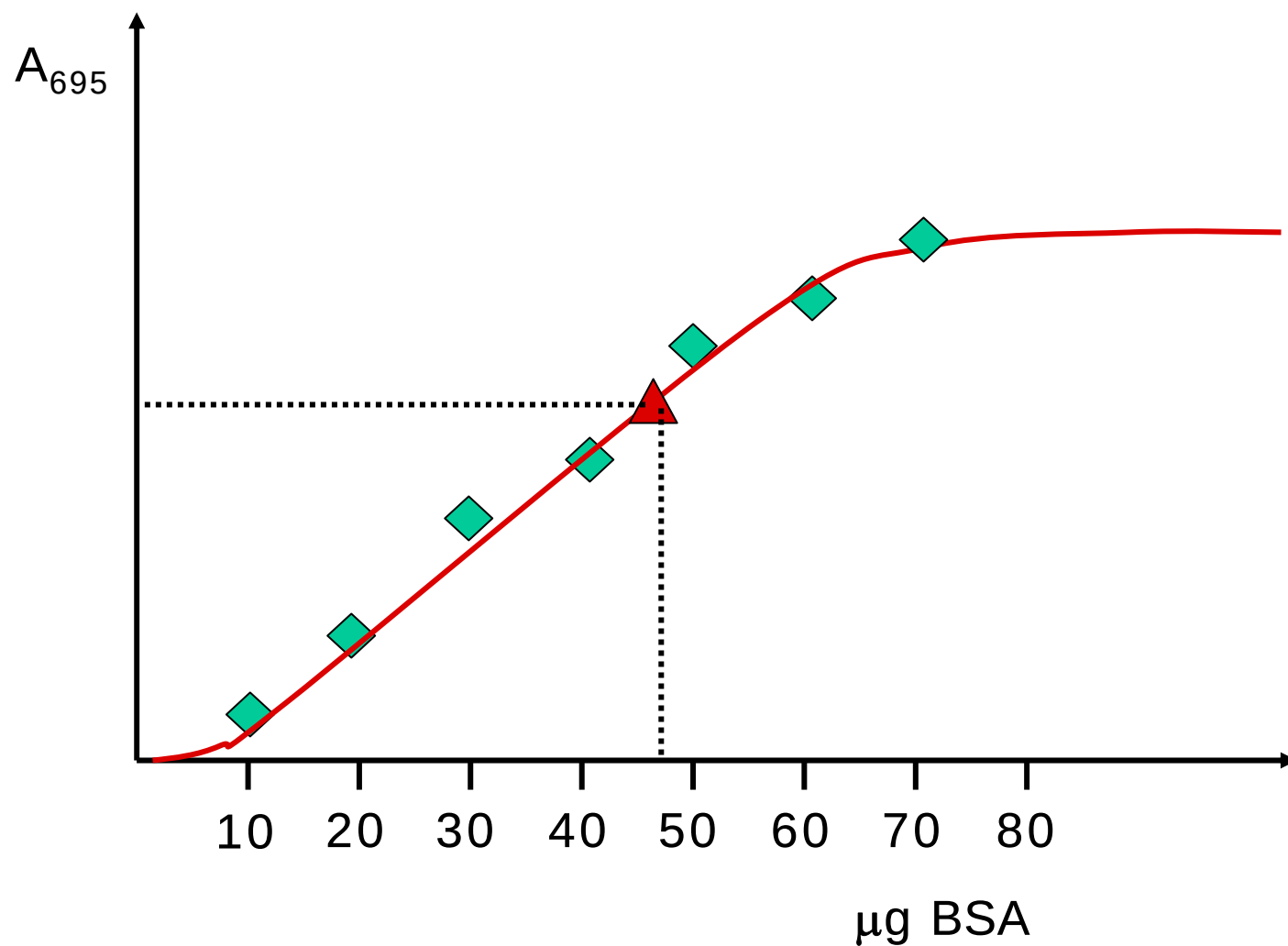
Principio: colorazione con Coomassie Brilliant Blue dei gruppi -SH, A_{595}

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**



Determinazione della quantità di proteina: 3. Metodo di Lowry

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

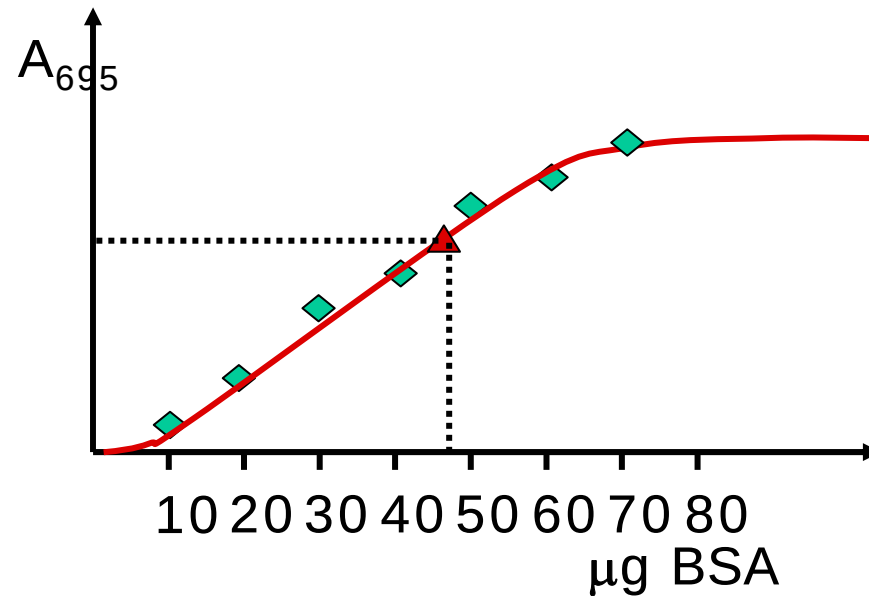
Svantaggi : Interferenze con tamponi comuni (TRIS, HEPES, PIPES) e detergenti

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				

Elettroforesi = migrazione in campo elettrico

Molte molecole di interesse biologico possiedono gruppi ionizzabili. In opportune condizioni di pH presentano una carica elettrica + o – e quindi sono in grado di migrare in un campo elettrico.

Se V = voltaggio applicato
e d = distanza tra gli elettrodi

→ $E = V/d$ gradiente di potenziale

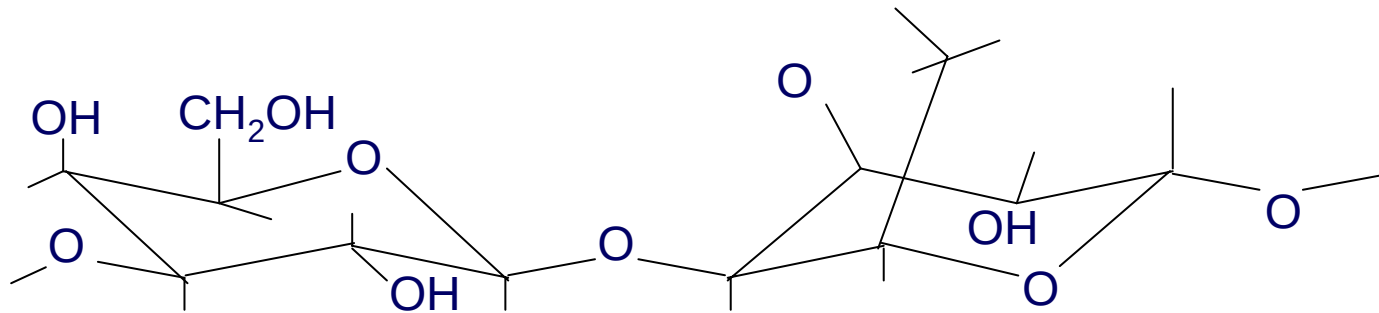
La molecola di carica q (coulomb) subisce una forza Eq (newton)
Se f = coefficiente frizionale, la velocità di migrazione v è data da :

$$v = \frac{Eq}{f}$$

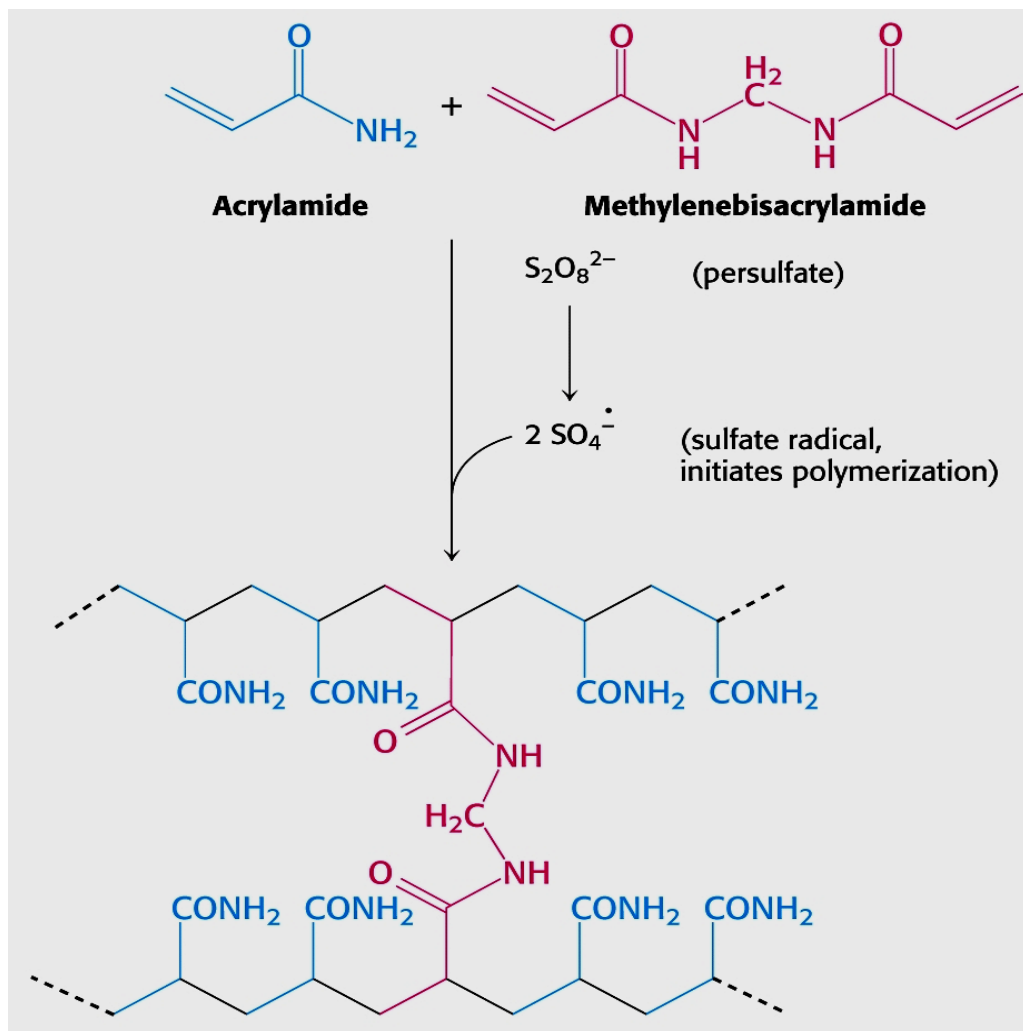
Supporti per l'elettroforesi

- Agarosio

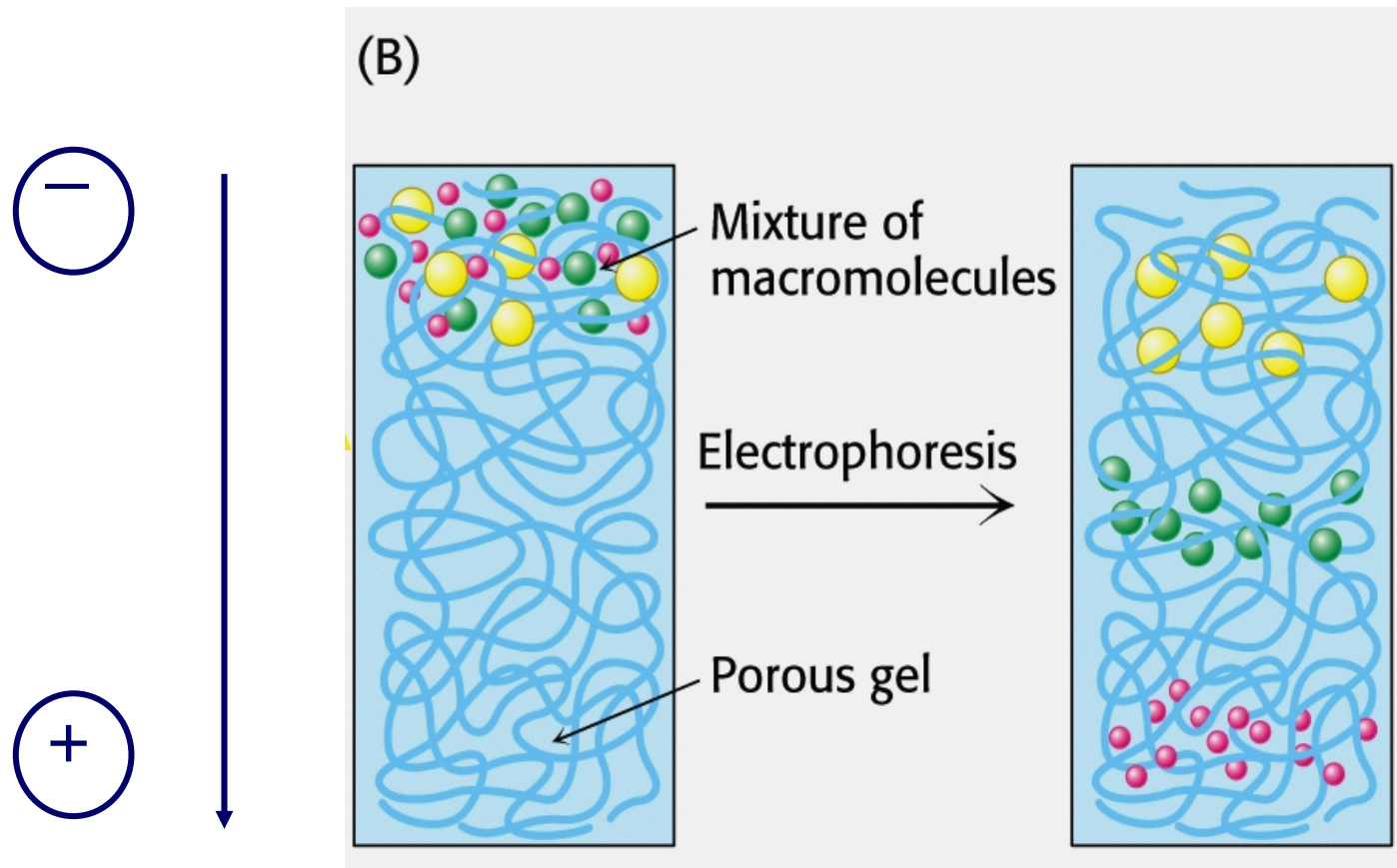
E' un polimero di agarobiosio (polisaccaride componente dell'agar).
Viene sciolto al calore in opportuno tampone, versato nella cella elettroforetica e lasciato raffreddare

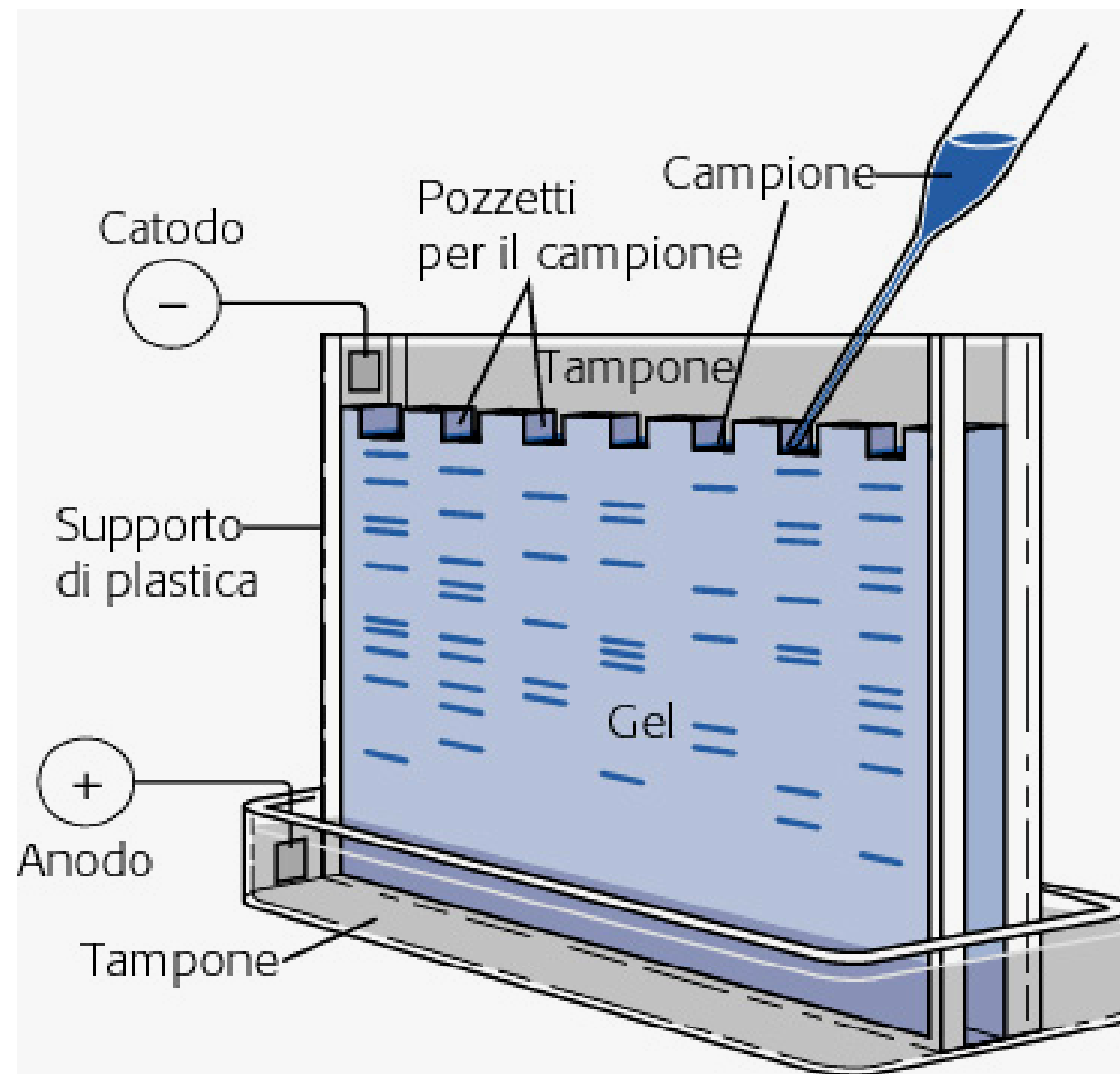


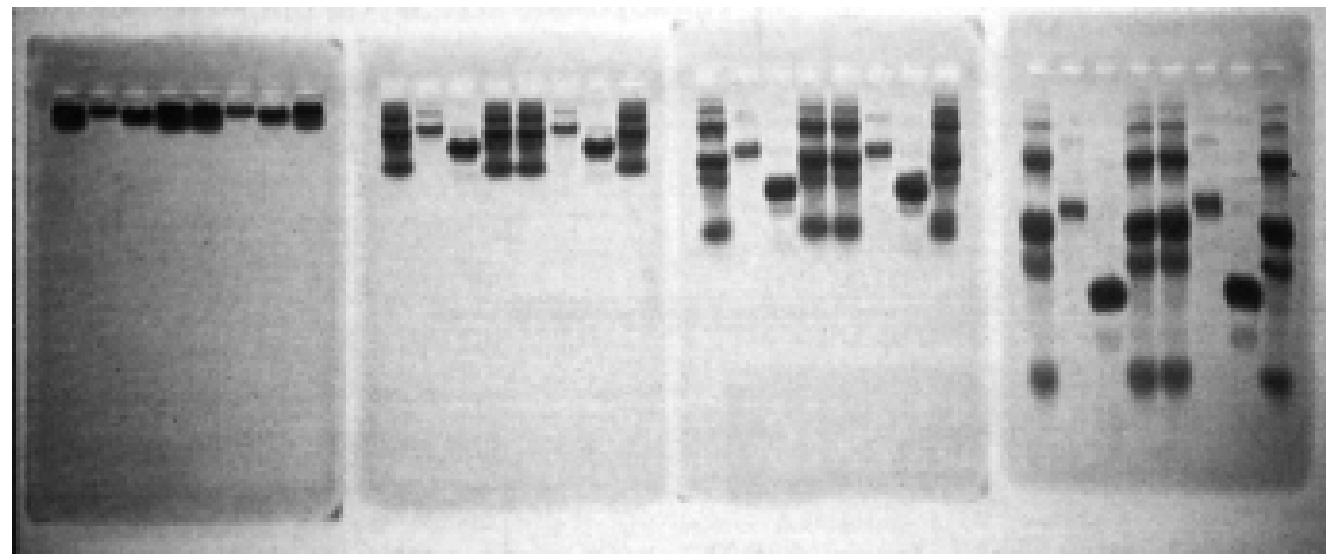
Supporti per l'elettroforesi



Il supporto agisce da setaccio molecolare







5

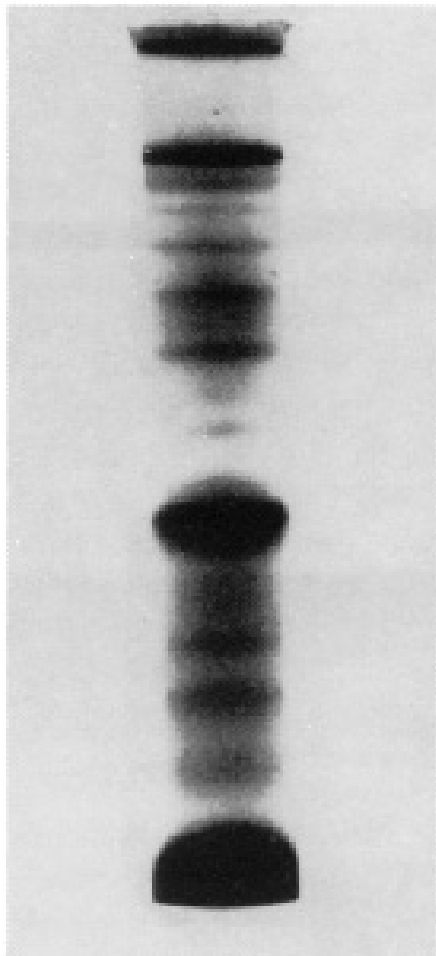
5

45

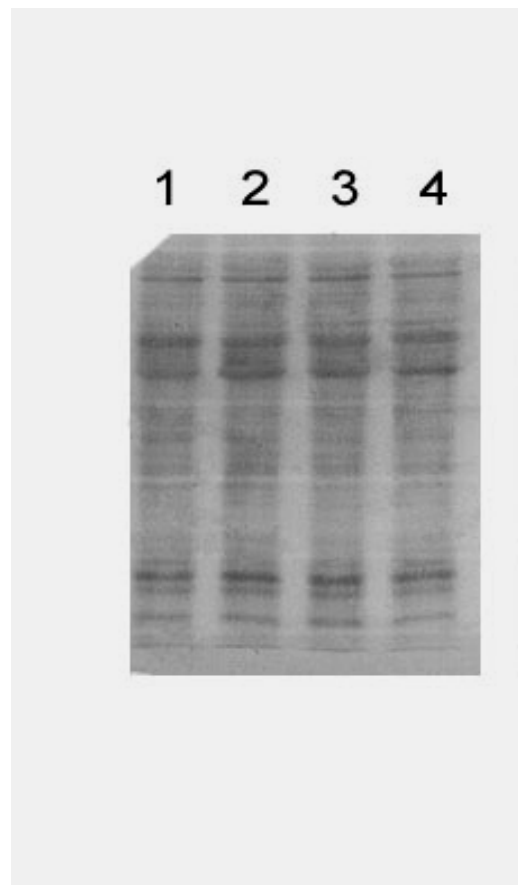
65

Electrophoresis Time (Minutes)

Colorazione delle bande di proteine.1

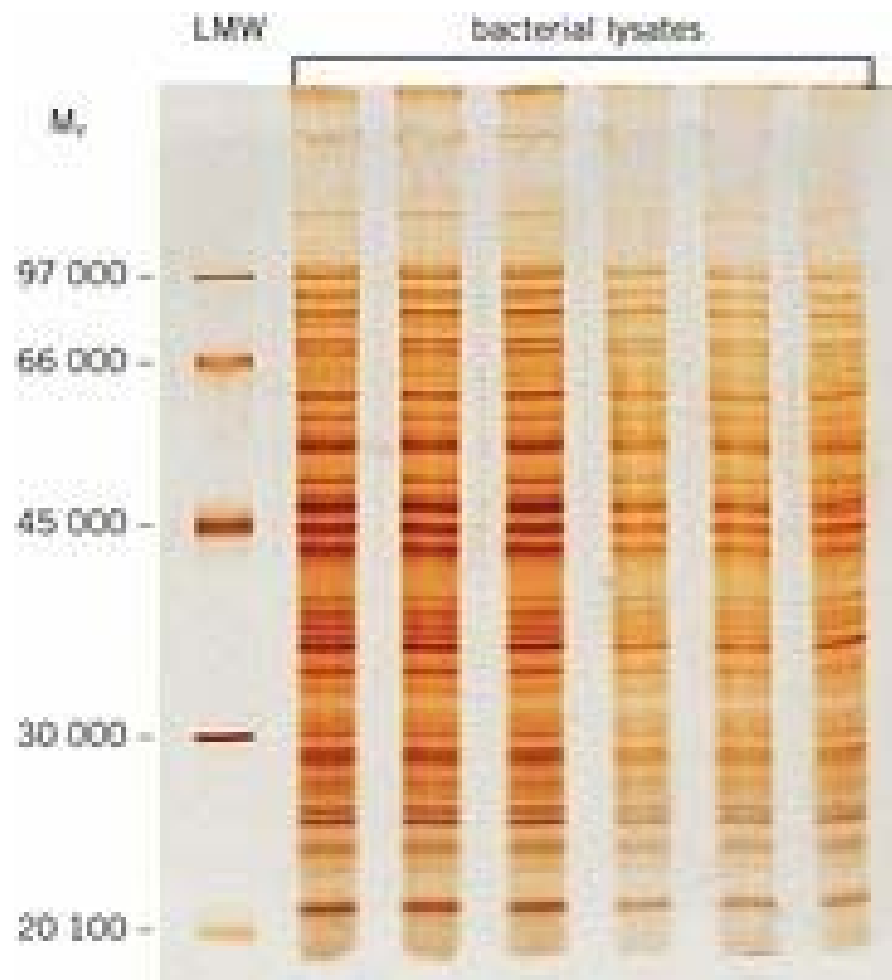


Blu di Coomassie



Rosso di Ponceau

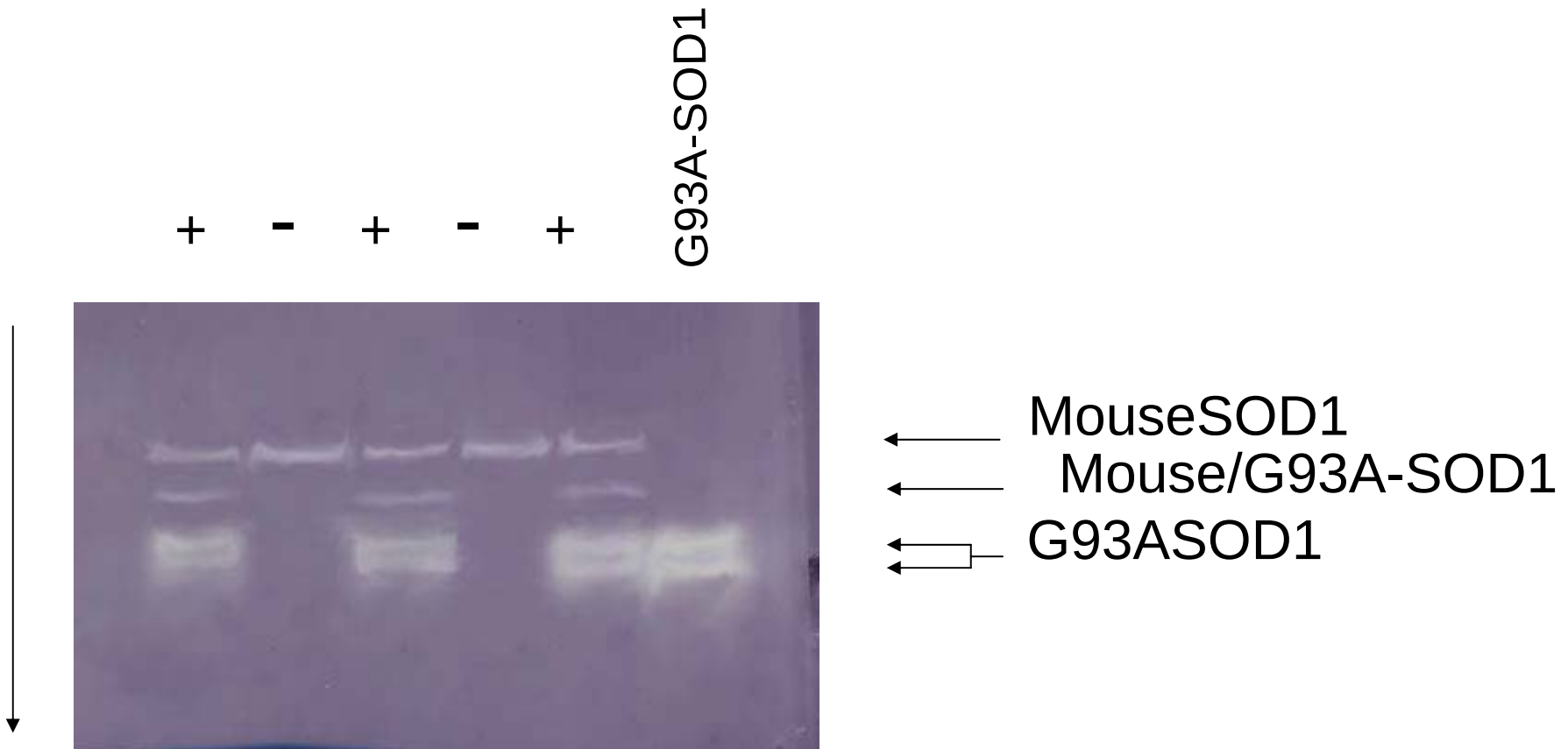
Colorazione delle bande di proteine.2



Silver staining

Colorazione delle bande di proteine.3

Individuazione di attività enzimatica mediante colorazione specifica

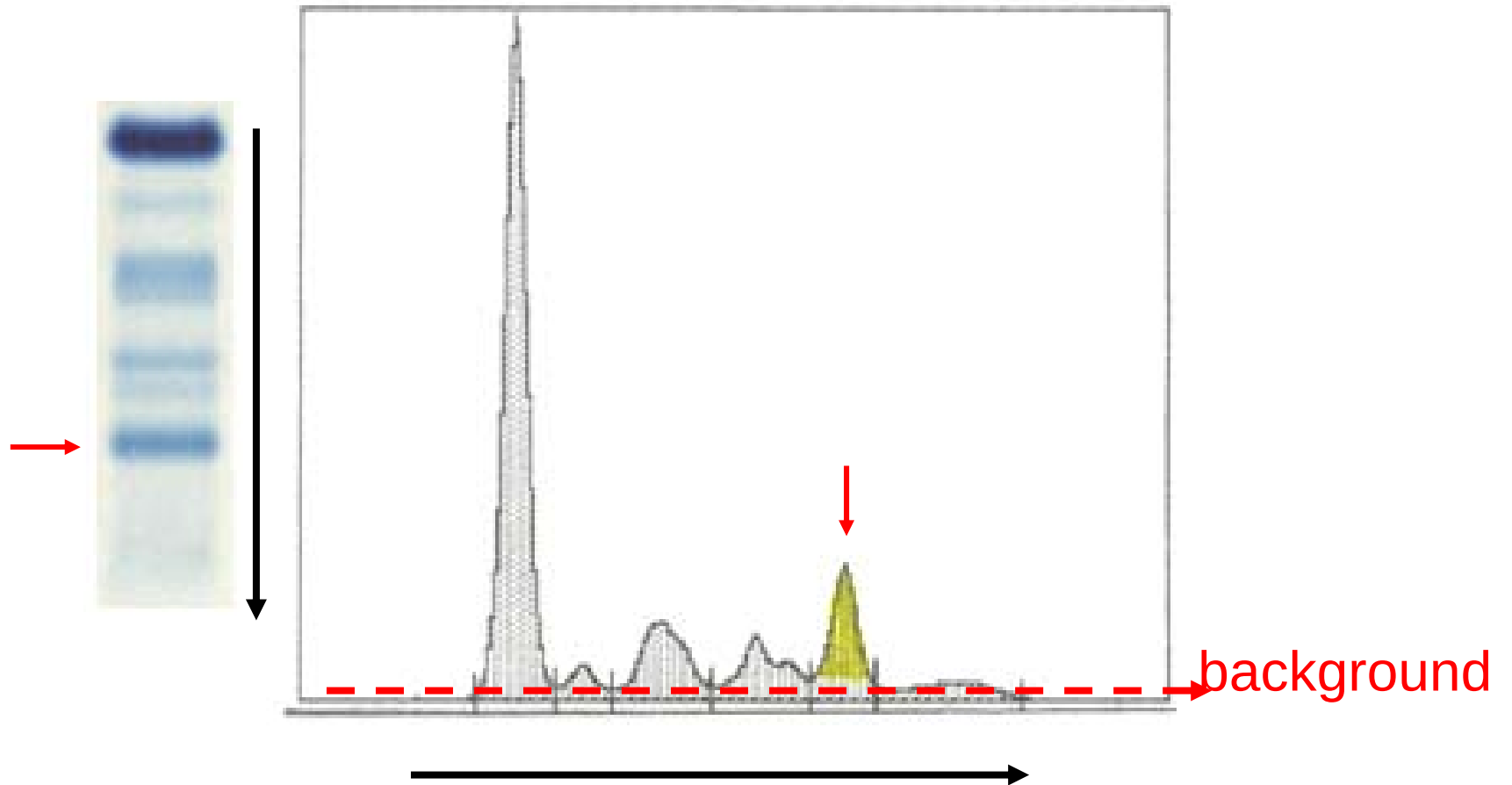


Detection

Detection is the step where you generate and acquire signal. The signal can be captured using **autoradiography films**, **storage phosphor screens** and **image acquisition systems**, depending upon your **labeling method** and the required levels of sensitivity and resolution

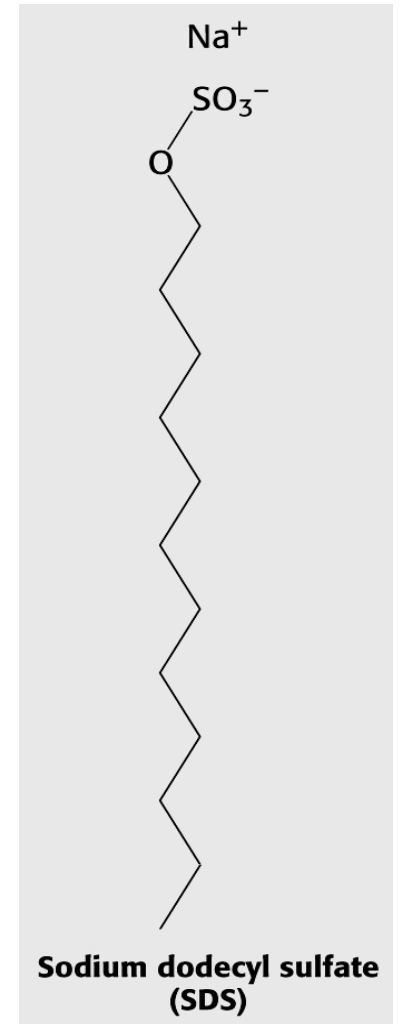
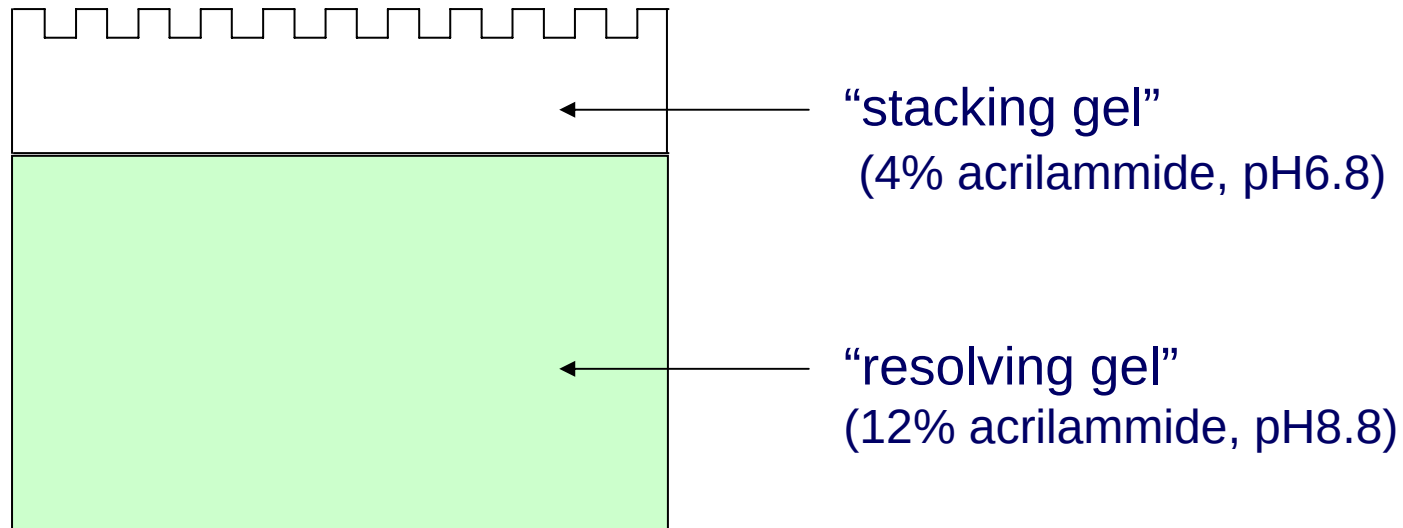


Quantitation

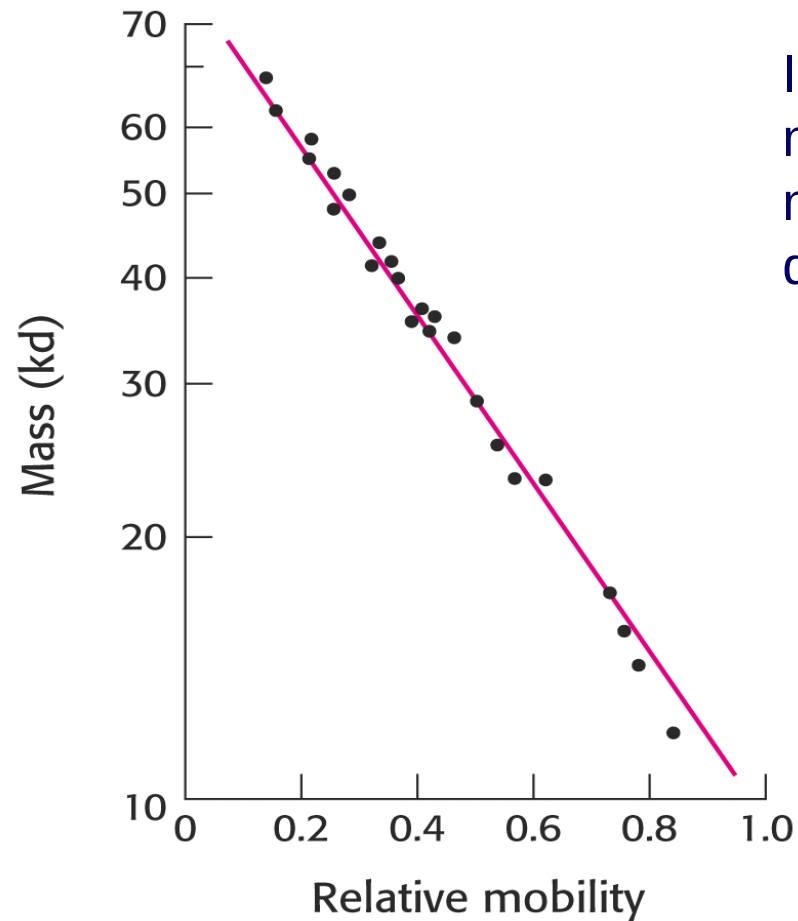


Discontinuous SDS-PAGE

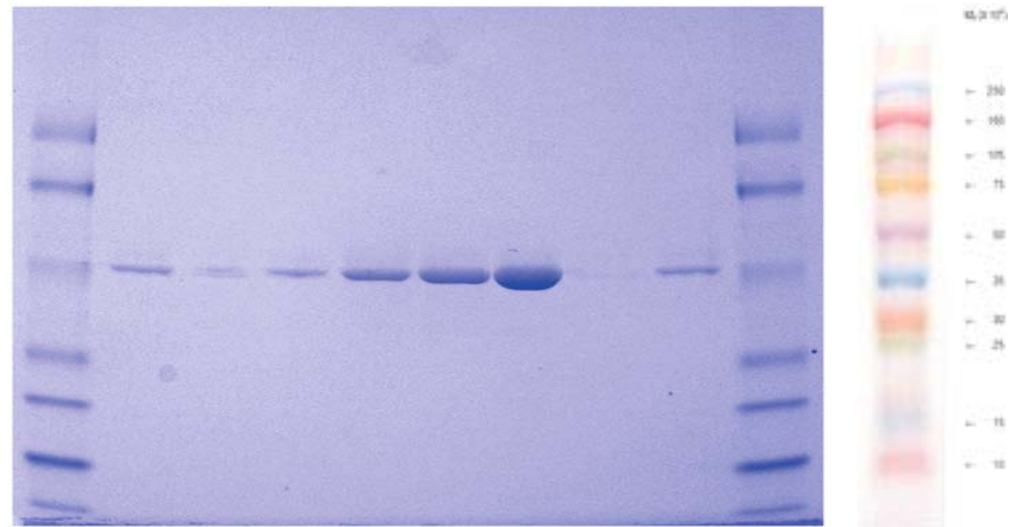
Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis in SDS



Determinazione del PM di una proteina mediante SDS-PAGE

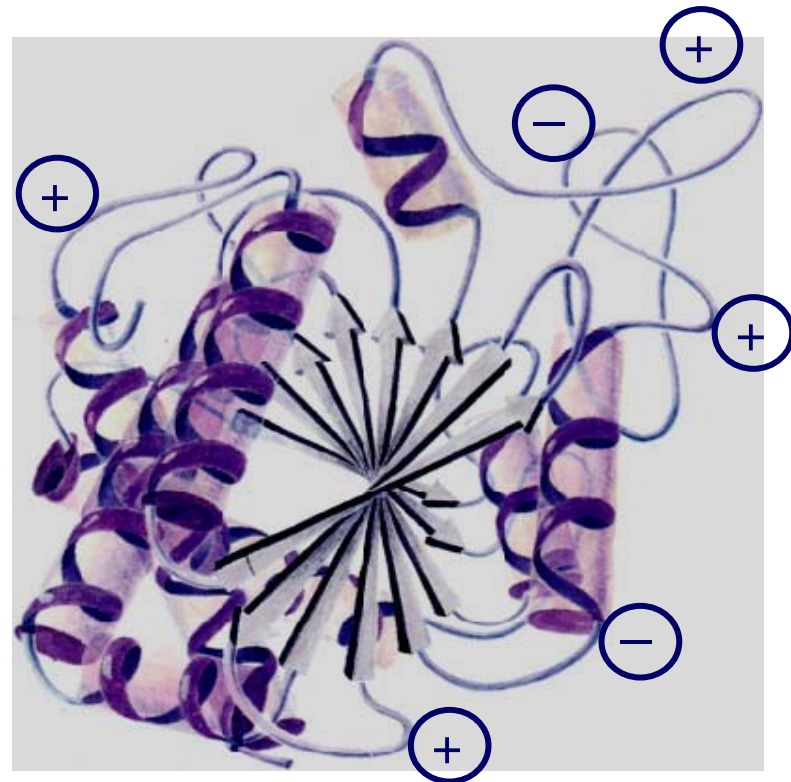
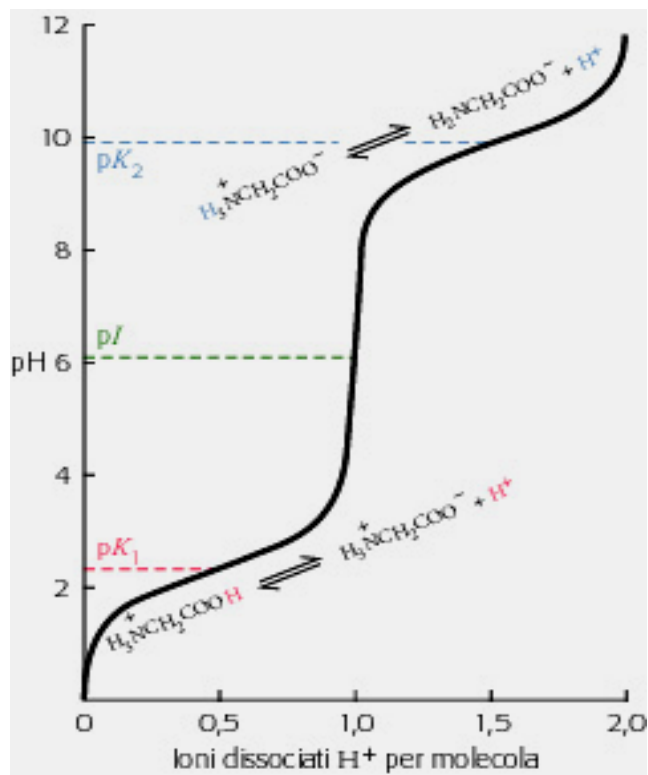


In un gel di acrilammide e SDS la mobilità relativa di una specie molecolare è proporzionale al log della massa molecolare.



La carica elettrica di una proteina dipende dai residui aa carichi (acidi o basici) esposti sulla superficie.

Le proteine hanno un PUNTO ISOELETTRICO (pI) che corrisponde al valore di pH a cui hanno carica nulla.

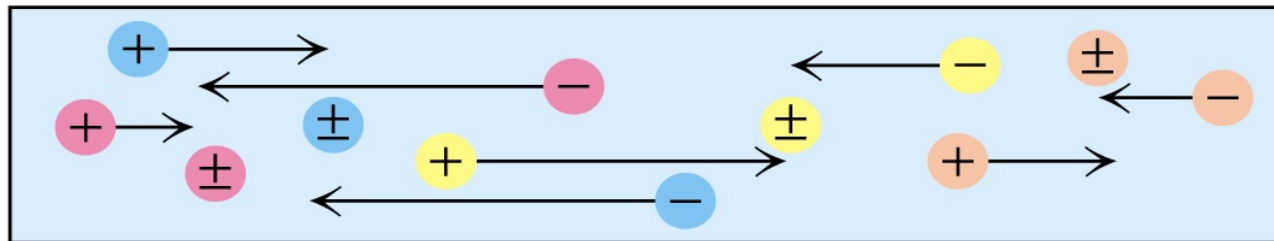


ISOELECTROFOCUSING

Le proteine si possono separare elettroforeticamente in base ai loro pI

(A)

Low pH
(-)



High pH
(+)

(B)

Low pH
(-)

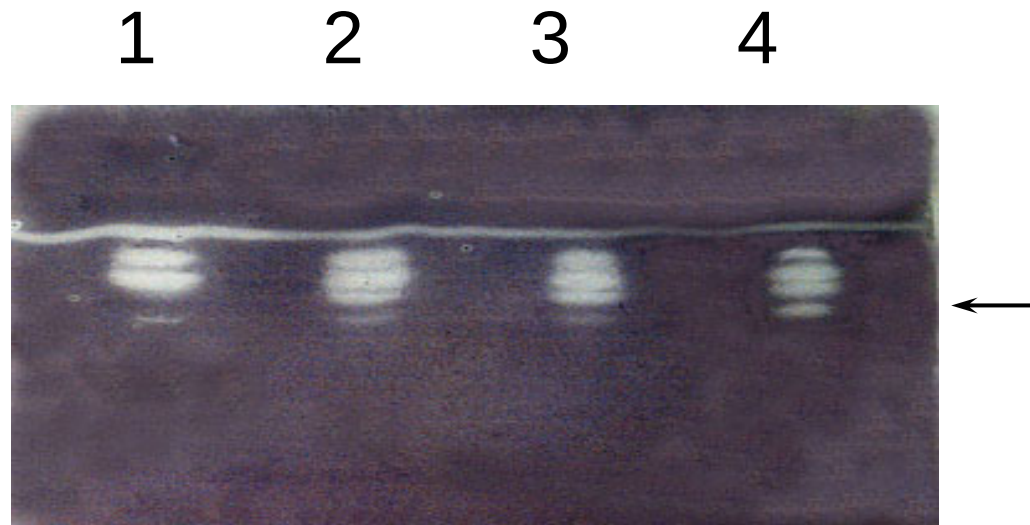


High pH
(+)

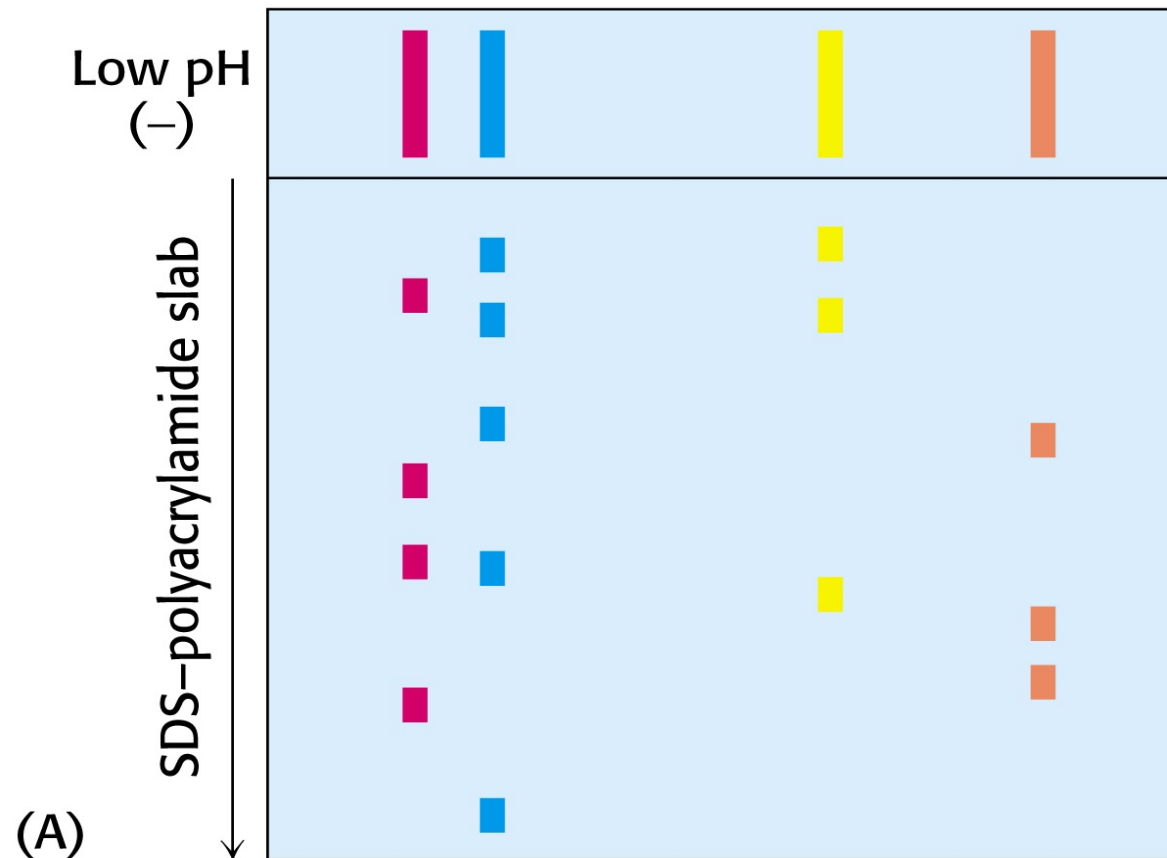
IEF = Iso-Electro-Focusing = focalizzazione isoelettrica

La corsa elettroforetica viene effettuata in un gel in cui è stato preformato un **gradiente di pH** utilizzando una miscela di polianfoliti.

Al punto isoelettrico (pI) la carica netta è = 0 e pertanto la mobilità elettroforetica è = 0.



Sfruttando **contemporaneamente** due diverse proprietà delle proteine si può ottenere una migliore separazione elettroforetica di miscele molto complesse (ad es. estratti citoplasmatici totali).



Elettroforesi bidimensionale

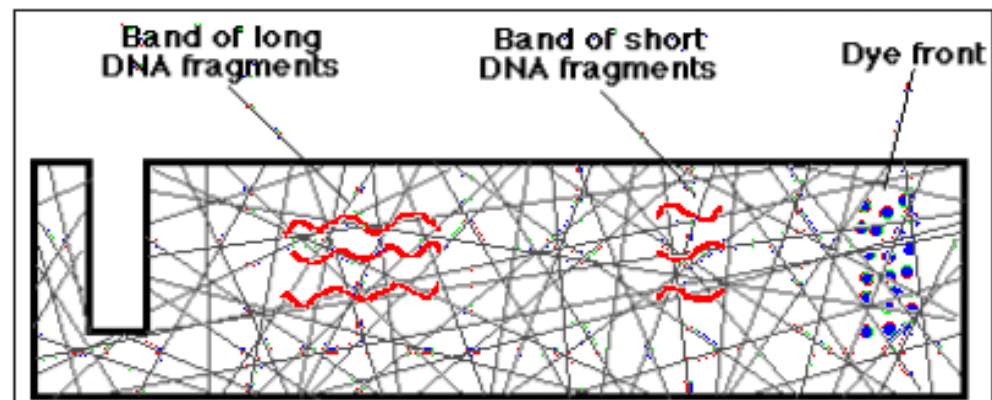
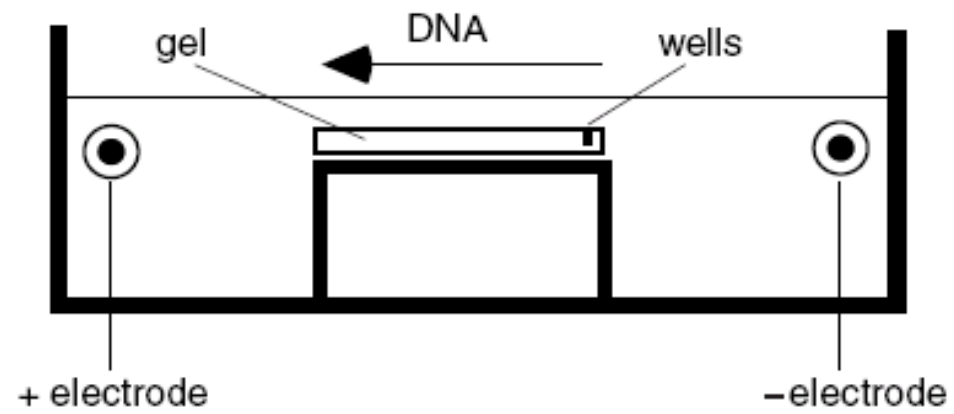
(B)

Isoelectric focusing

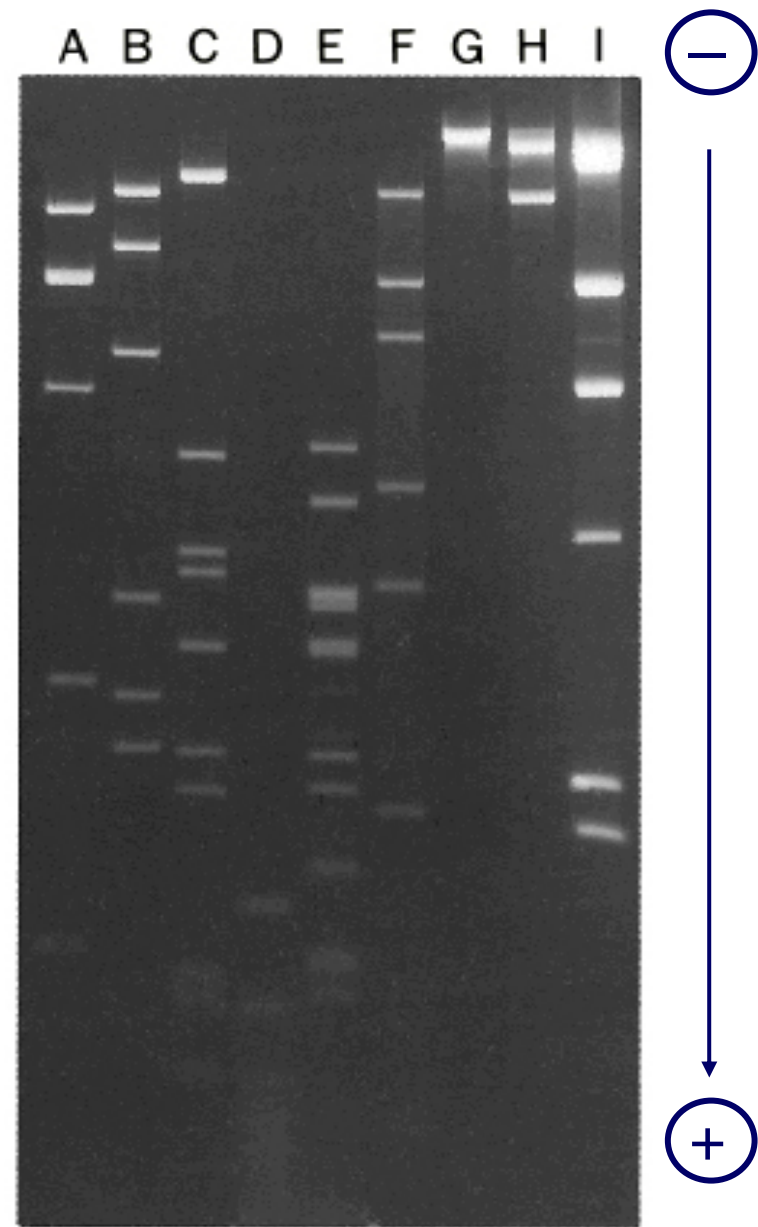
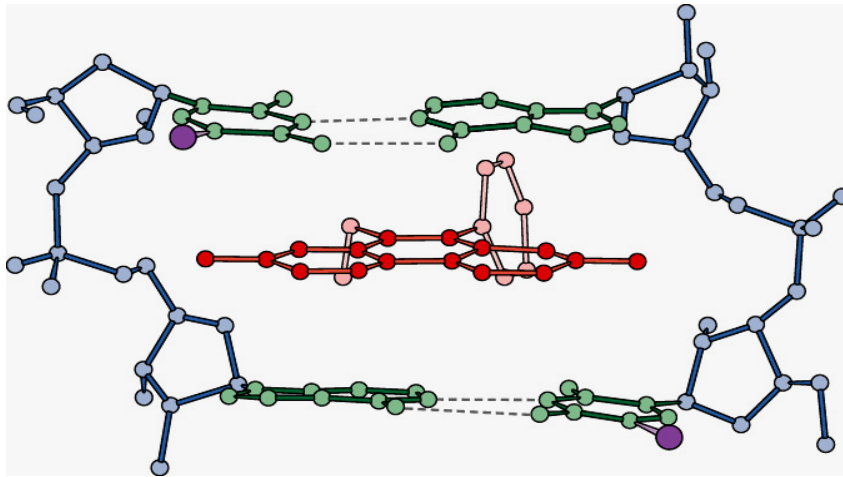
SDS-PAGE

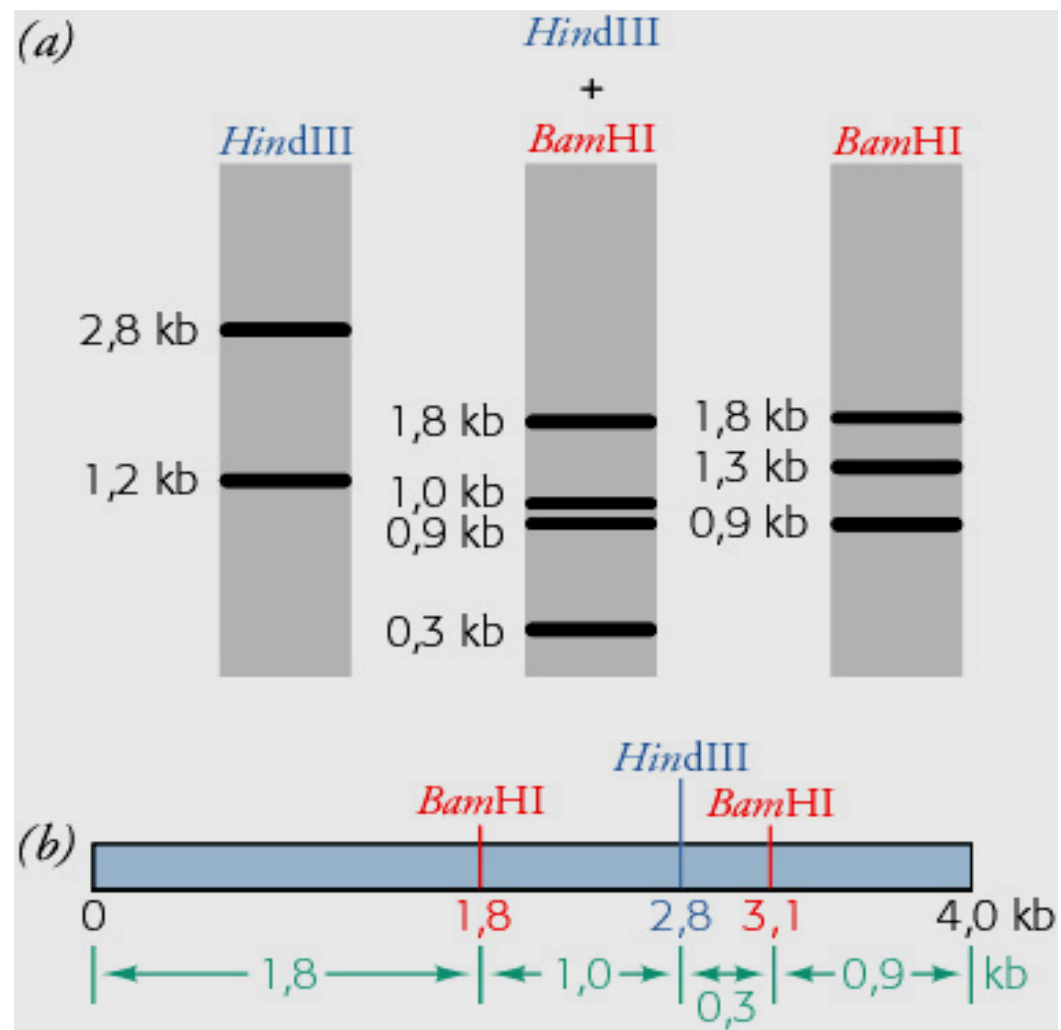


Elettroforesi di DNA

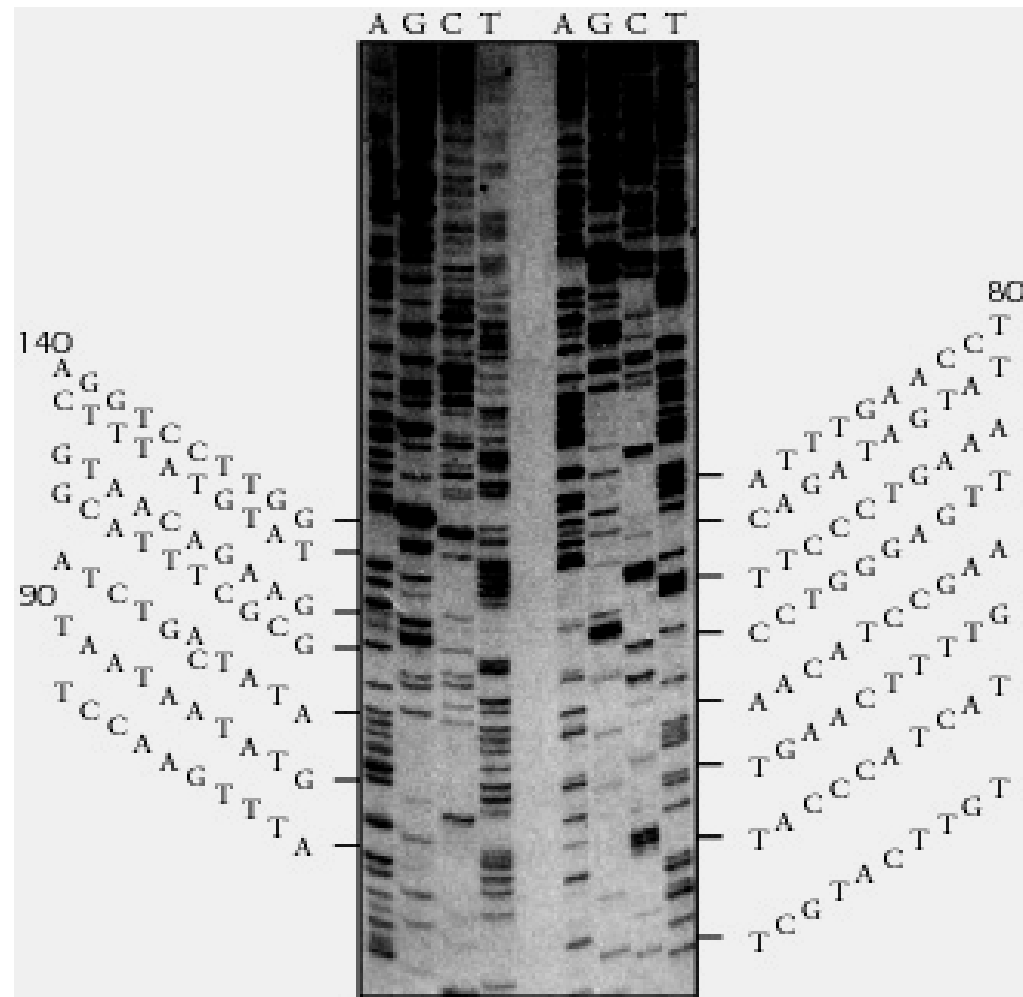


Separazione di frammenti di DNA
mediante elettroforesi su gel di
agarosio colorato con etidio
bromuro

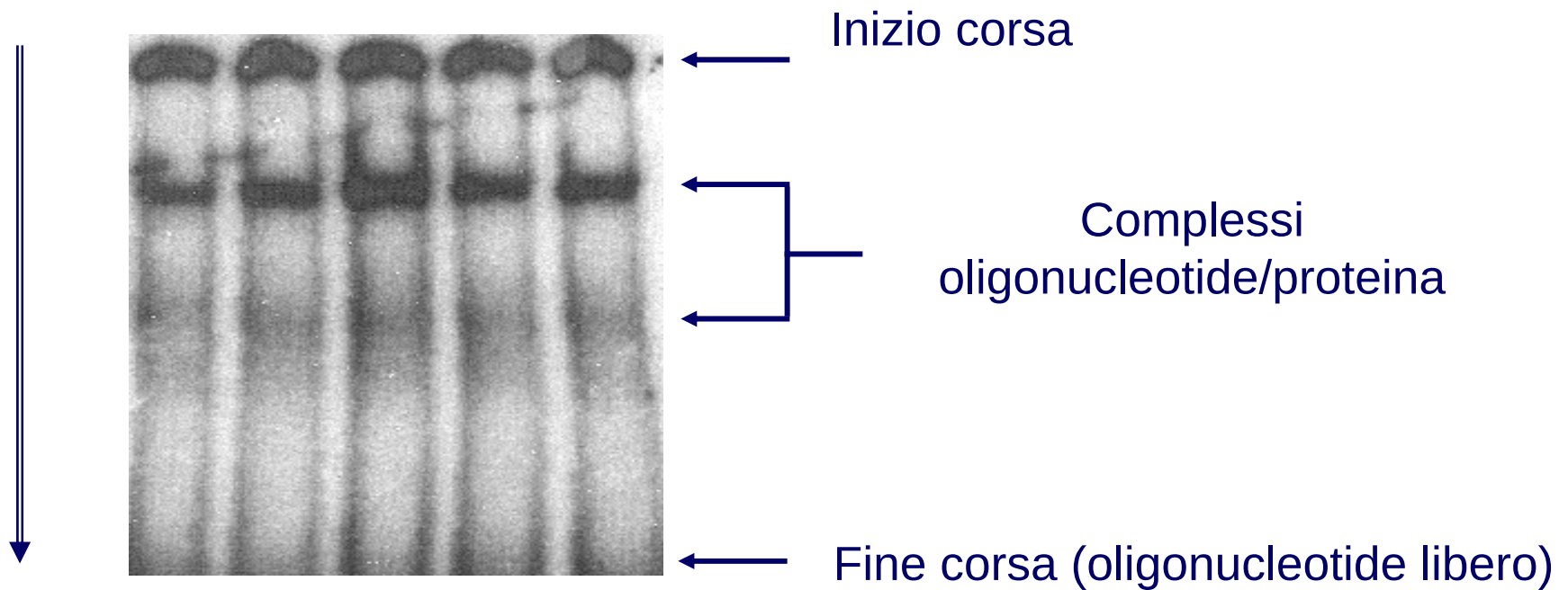




Si possono separare anche frammenti di DNA
che differiscono di un solo nucleotide



Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)



Problema:

Dai seguenti dati sperimentali ottenuti con il metodo di Lowry usando uno standard di BSA determinare la concentrazione molare di una proteina X di PM 10000 Da.

	5 μ l	10 μ l	20 μ l	40 μ l	60 μ l
BSA 1 mg/ml		0.072	0.143	0.268	0.395
Proteina X diluito 1:10	0.175	0.370			

Problema:

Rappresentare i seguenti dati sperimentali con un istogramma dei valori medi e deviazioni standard delle serie di misure.

	Misura 1	Misura 2	Misura 3	Misura 4
Controllo	1.31	1.47	1.20	0.95
Trattamento B	0.83	1.27	1.13	1.38
Trattamento C	1.52	1.48	1.04	1.35

Come potreste valutare se i tre trattamenti differiscono rispetto ai valori di controllo ?