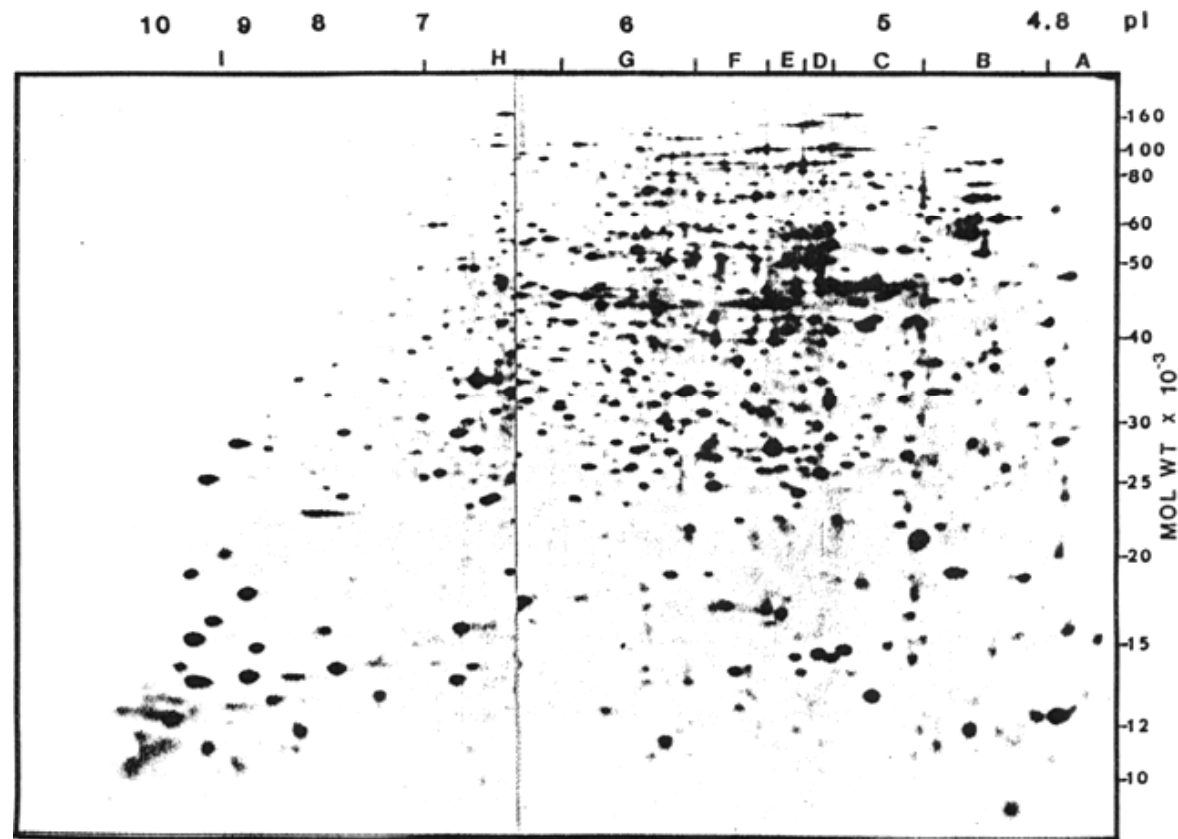


Strategie per la purificazione delle proteine

Attenzione!

C'è differenza tra **separazione** per alcuni scopi analitici (Gel-electrophoresis, IEF, 2D-gels) e **purificazione**



In una cellula ci possono essere molte proteine (ad esempio, ci sono circa 4300 geni in *E. coli*)

Una singola proteina può rappresentare una frazione compresa tra lo 0.001-30% delle proteine totali

Inoltre ci sono altri componenti:

Acidi nucleici, carboidrati, lipidi, piccole molecole

Le proteine possono essere trovate in diversi stati ed in diverse localizzazioni:

solubili, insolubili (native o aggregate – inclusion bodies), integrate o associate alle membrane oppure in associazione con il DNA

Nei batteri possono trovarsi nel citoplasma o nel periplasma.

Negli eucarioti i compartimenti sono più abbondanti (organelli, RE, nucleo)

Principi per la purificazione delle proteine

- Definire gli obiettivi
 - Purezza, attività e quantità di prodotto finale richiesto
- Definire le proprietà della proteina di interesse ed eventualmente delle impurezze critiche
- Sviluppare saggi analitici
 - È necessario identificare la proteina nel corso della purificazione
- Rimuovere rapidamente i contaminanti capaci di danneggiare la proteina (proteasi)

La purificazione delle proteine

Domande iniziali

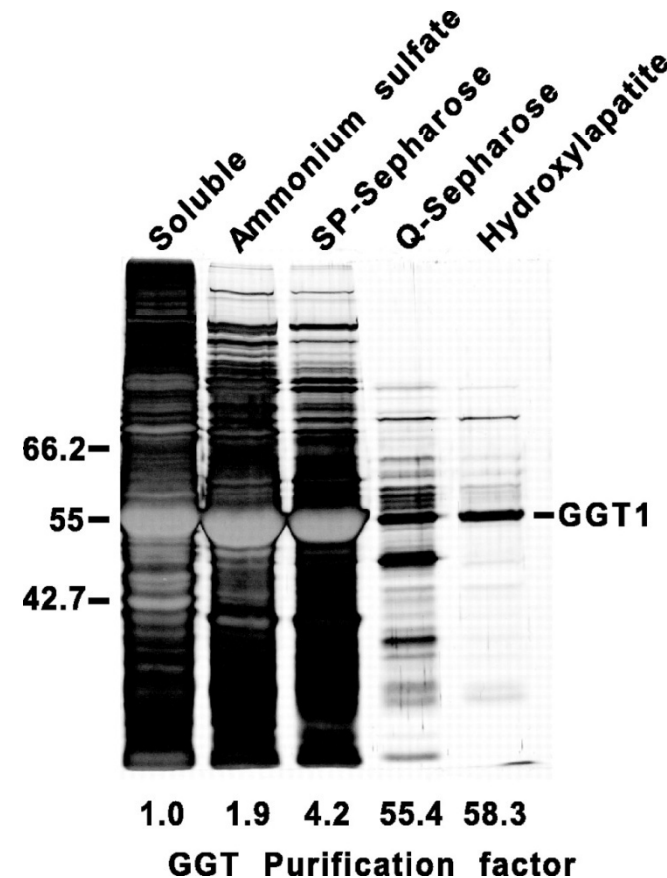
- **Quanta e quanto pura?**
 - applicazione
 - sorgente
 - fattibilità
- **Configurazione nativa?**
 - Studi struttura/funzione(si)
 - microsequenza (no)
 - anticorpi (può darsi)
- **Metodi di identificazione?**
 - Saggi funzionali (ad esempio enzimatici)
 - Saggi immunologici
 - SDS-PAGE

Perchè purificare una proteina?

- Studi strutturali e/o funzionali
- Applicazioni industriali o farmacologiche
- Per produrre anticorpi
- Sequenza parziale

Principi generali per la purificazione delle proteine

- Usare una tecnica diverse in ciascun passaggio
 - Per avvantaggiarsi delle diverse proprietà della proteina (dimensione, carica, idrofobicità, eventuale specificità per ligandi)
- Minimizzare la manipolazione del campione ad ogni stadio
- Minimizzare l'uso di additivi
- Minimizzare il numero di passaggi



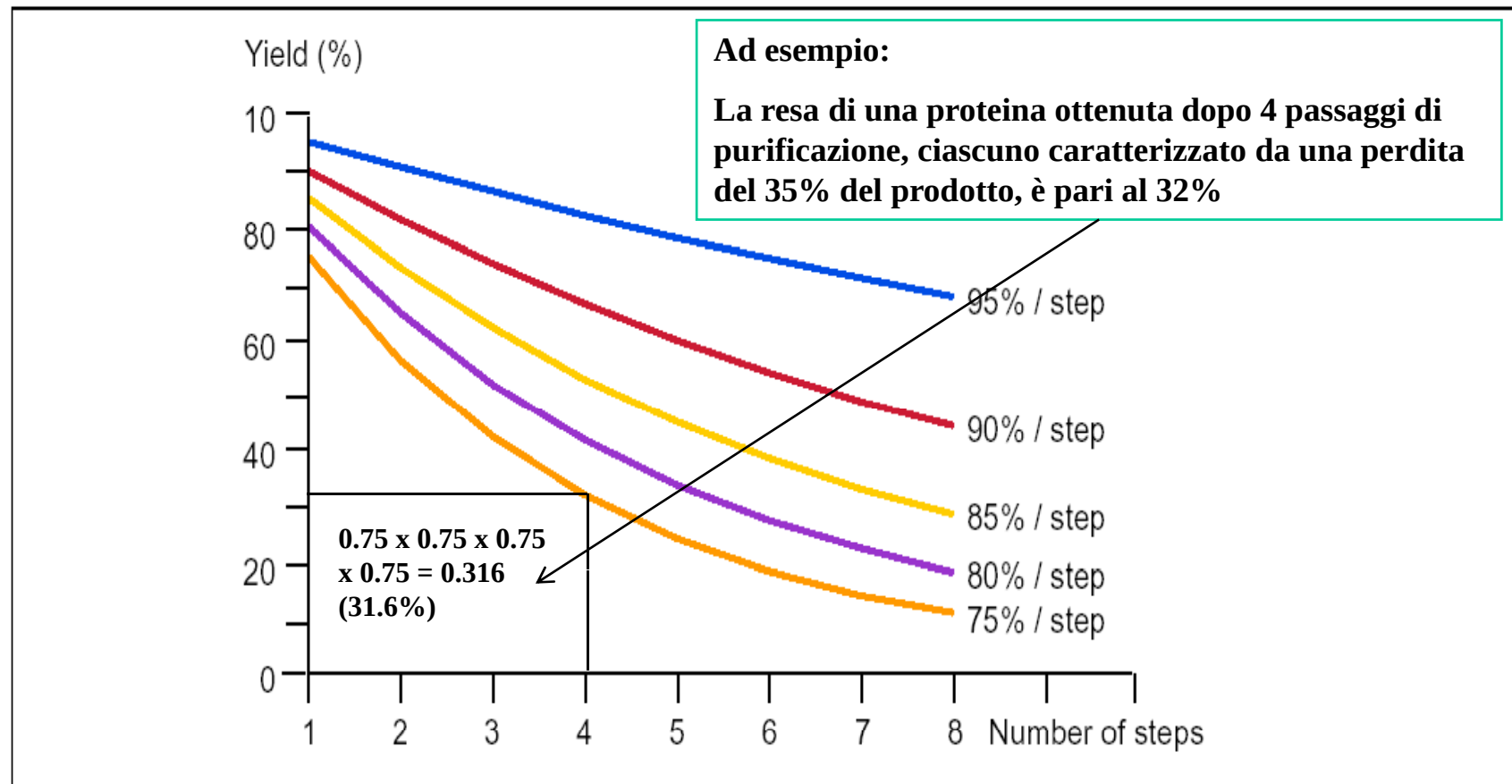
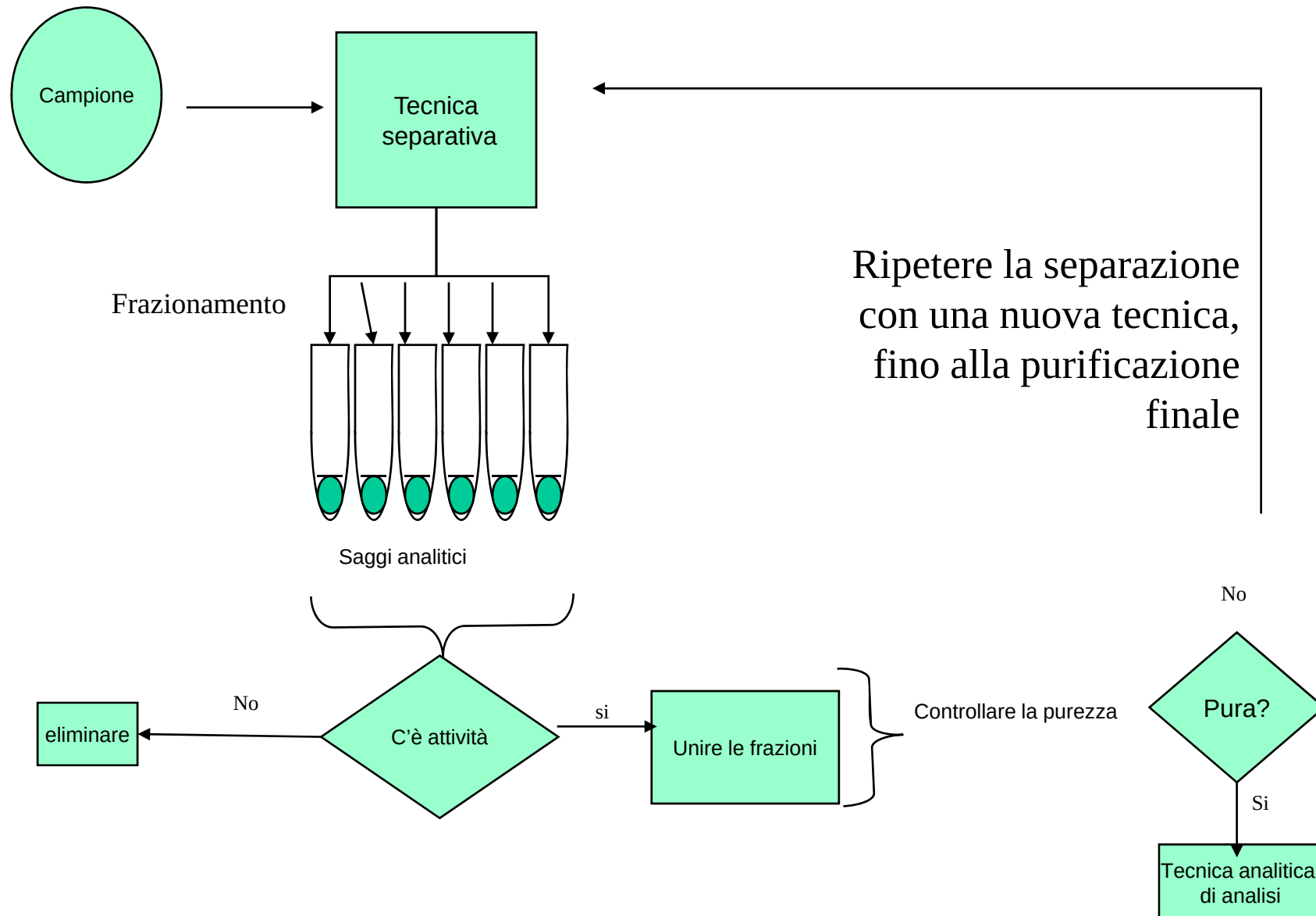


Fig.1. Yields from multi-step purifications.

Sviluppare uno schema per la purificazione

- **Condurre esperimenti su scala pilota per valutare l'efficacia di varie tecniche di separazione**
- **Iniziare con tecniche rapide ad alta capacità (generalmente a bassa risoluzione), e proseguire con tecniche ad alta risoluzione e bassa capacità**

La purificazione delle proteine è un processo complesso che generalmente richiede diversi passaggi



Distruzione delle cellule e produzione di estratti grezzi iniziali

Distruzione del tessuto ===== > rilascio proteine

Tampone di estrazione

Di norma 0.1-0.2 M forza ionica e pH da 7.0 a 8.0 (comunemente Tris o fosfa

1. **Riducenti:** DTT, beta-ME, glutathione ridotto. L'interno della cellula è un ambiente riducente.

2. **Inibitori di enzimi:** rilascio di enzimi proteolitici (dai lisosomi ad es.)

Per rallentare la proteolisi : a) 4°C
b) inibitori di proteasi

serin proteasi: PMSF (fenil metil sulfonil fluoruro)

tiolo proteasi: iodoacetato e cistatina

asparticoproteasi: pepstatina

metalloproteasi: EDTA e 1,10 - fenantrolina

esopeptidasi: amastatina e bestatina

3. **Substrati enzimatici e cofattori:** il substrato e/o i cofattori possono stabilizzare l'enzima.

4. **EDTA** per rimuovere ioni metallici che possono reagire con gruppi tiolici



5. **Sodio azide:** agente batteriostatico

Metodi di distruzione delle cellule

frullatori : sono utilizzati per sospensioni di cellule vegetali o animali, non possono essere utilizzati per microorganismi



omogenizzatori : il tessuto viene messo in un provettone di vetro all'interno del quale agisce un pestello di vetro o di metallo (Potter) che può essere azionato a mano o mediante un motore elettrico

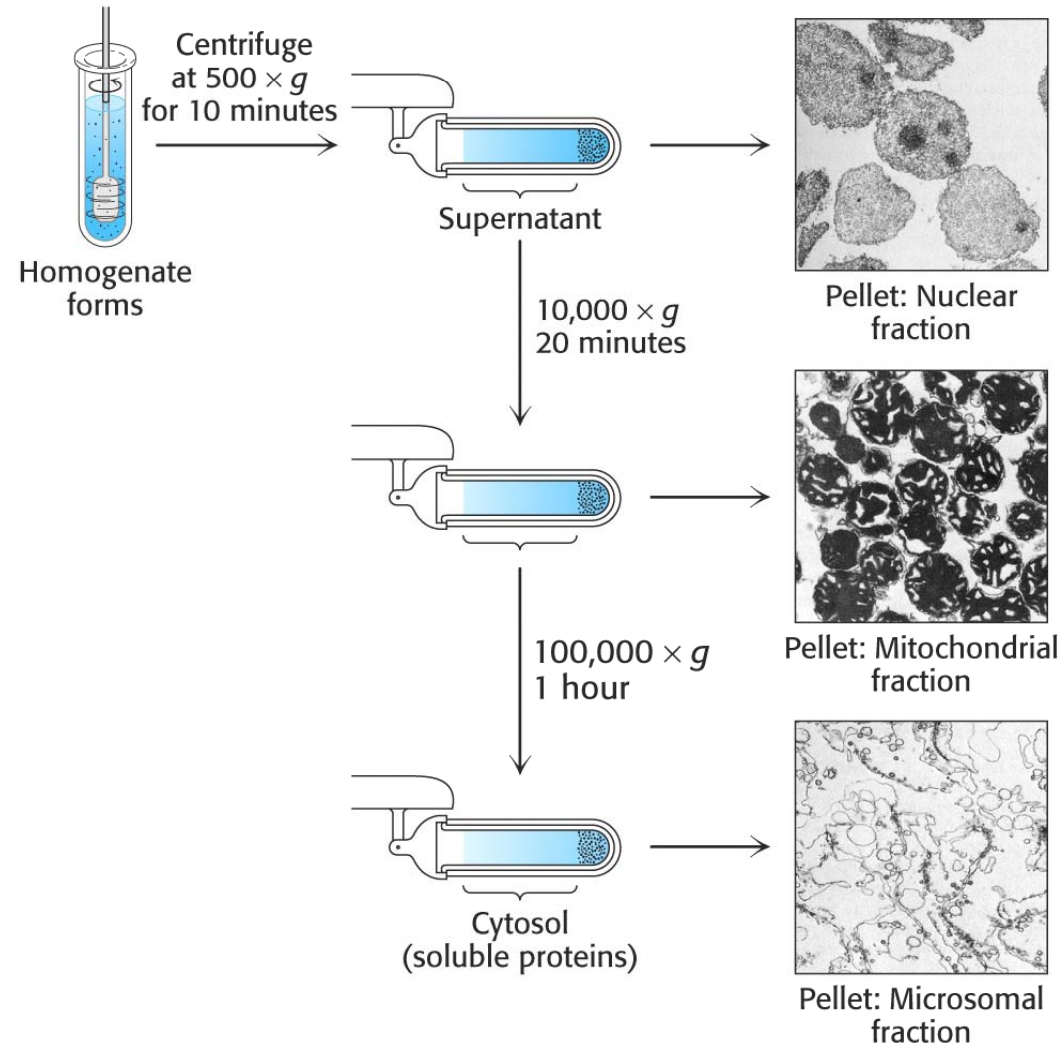
Presse: French press (per cellule microbiche) sospensione cellulare >>>> attraverso piccolo orifizio da una pompa ad alte pressioni. La variazione di pressione (prima vengono compresse e poi si espandono) le fa scoppiare.

Sonicazione: ideale per sospensioni cellulari, onde sonore ad alta frequenza ($> 20\text{KHz}$) $\times 30'' - 60'' > >$ distruzione cellule per forze taglienti e cavitazionali (compressione e rarefazione dovuta a formazione e scoppio bolle). Per volumi "piccoli" (inferiori ai 50 ml), in ghiaccio (sviluppa calore).



Metodi enzimatici: lisozima (taglia i peptidoglicani dei gram +) per i gram - con EDTA $>>>$ (destabilizza il LPS esterno togliendo il Ca^{++}) e detergente non ionico per membrana cellulare. Se in un mezzo isotonico, le proteine dello spazio periplasmico vengono rilasciate selettivamente. Lieviti con zimolasi e liticasi (β -1,3 gluconasica e proteolitica). Metodi enzimatici $>>>$ solo in laboratorio (costi troppo elevati per l'industria).

Frazionamenti cellulari



Proteine di membrana

Richiedono speciali condizioni di estrazione

Proteine estrinseche: sulla superficie esterna legate da interazioni elettrostatiche e legami idrogeno

>> forza ionica e/o variando il pH

Dopo l'estrazione sono purificate con tecniche convenzionali

Proteine intrinseche: immerse nella membrana, regione/i con aa idrofobici
mantenere la solubilità tamponi con detergenti

detergenti ionici: SDS, CTAB, CHAPS, sodio desossicolato

detergenti non-ionici: TritonX-100, Nonidet P-40

Dopo l'estrazione sono purificate con tecniche convenzionali (mantenendo sempre un po' di detergente)

Passaggi preliminari di purificazione

Estratto iniziale

- Omogenato contiene materiale insolubile che generalmente viene eliminato per centrifugazione.
- Talvolta la soluzione mostra torbidità (dovuta alla presenza di organuli, frammenti membrane, etc.) che vengono eliminati per ultracentrifugazione o trattamento con agenti capaci di causarne la precipitazione
- L'estratto oltre alle proteine contiene DNA, RNA, carboidrati e lipidi (e metaboliti a basso peso molecolare)
Può essere utile utilizzare DNasi I, RNasi A o agenti capaci di causare la precipitazione selettiva degli acidi nucleici (ad es. protamina solfato).

Prima di iniziare la purificazione è opportuno definire un saggio di identificazione della proteina

- a) Enzimatico. Poiché il controllo può essere ripetuto molte volte sarebbe utile disporre di un saggio semplice ed economico. Generalmente un'attività enzimatica può essere controllata tramite cambiamenti in assorbanza che possono essere misurati con uno spettrofotometro.
- b) Immunologico. Attraverso l'uso di anticorpi specifici
- c) Peso molecolare. Tramite SDS-PAGE.
- d) Spettrofotometrico. Se la proteina possiede particolari cromofori

Capacità vs. Risoluzione

Metodo	capacità decrescente	risoluzione aumenta	tempo e sforzo aumenta
Solubilità differenziale Scambio ionico Proprietà idrofobiche Elettroforesi			
Gel filtrazione Affinità HPLC/FPLC	bassa capacità e bassa risoluzione dipende dai ligandi alta risoluzione, bassa capacità		

Sviluppare uno schema per la purificazione

- 1) Condurre esperimenti su scala pilota per valutare l'efficacia di varie tecniche di separazione**
- 2) Iniziare con tecniche rapide ad alta capacità (generalmente a bassa risoluzione), e proseguire con tecniche ad alta risoluzione e bassa capacità**
- 3) Minimizzare il tempo e il numero di manipolazioni ogniqualevolta sia possibile**
- 4) Adattare i metodi per minimizzare i cambiamenti di tampone, a parità di altri fattori**
- 5) Valutare eventuali proprietà uniche**

Metodi di frazionamento preliminare a bassa risoluzione

Frazionamento con Sali (Salting out).

il genere si usa solfato di ammonio. Fa precipitare le proteine senza denaturarle.

L'aggiunta di sale rimuove le molecole d'acqua sulla superficie della proteina, permettendone l'aggregazione e quindi la precipitazione. Le proteine molto idrofobiche precipitano a bassa concentrazione, quelle meno idrofobiche precipitano ad alta concentrazione di sale.

Tutti i passaggi sono generalmente condotti a 4°C.

Ogni data proteina precipita (effetto salting out) in un ristretto intervallo di solfato di ammonio.

Values calculated according to Protein Purification, R. K. Scopes (Springer-Verlag, New York), Third Edition, p. 346, 1993.

[illegible]

Metodi di frazionamento preliminare a bassa risoluzione

- **Precipitazione al calore.** Il calore denatura le proteine che perdono la loro struttura terziaria, esponendo residui idrofobici sepolti nello stato nativo nel core proteico e causando la formazione di aggregati.
- Si stabilisce su un piccolo campione la temperatura a cui la proteina di interesse denatura.
- Si scalda la miscela ad una temperatura 5-10°C inferiore a quella critica per un tempo adeguato (15-30 minuti).
- Le proteine denaturate sono rimosse per centrifugazione.

Metodi di frazionamento preliminare a bassa risoluzione

Precipitazioni con solventi organici

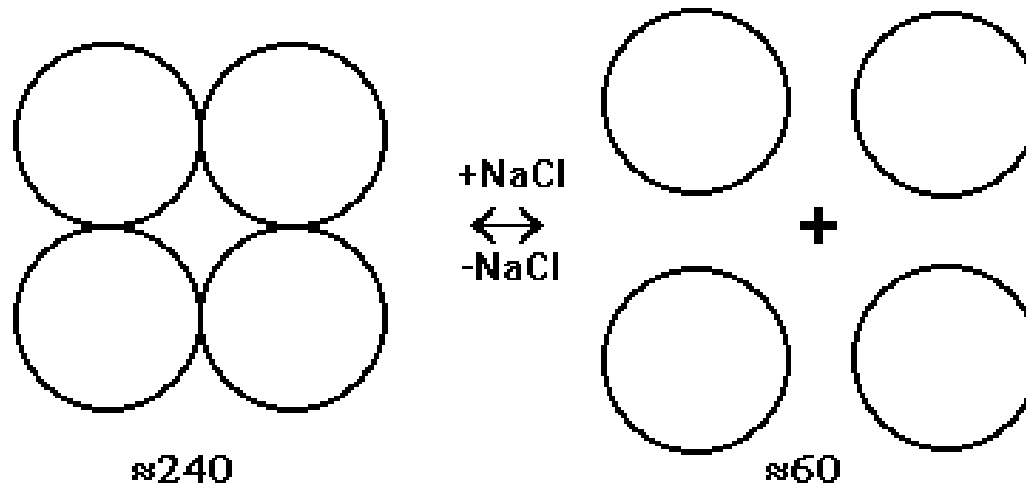
si basa sulla diversa solubilità delle diverse proteine in soluzioni acquose di solventi organici (soprattutto alcoli). Il processo è spesso condotto a -20°C per evitare la denaturazione.

Precipitazione al punto isoelettrico.

Le proteine possono essere cariche positivamente o negativamente e possono essere neutre per una eguaglianza di cariche; quando la carica netta è nulla le proteine si trovano nelle condizioni migliori per formare aggregati fra loro.

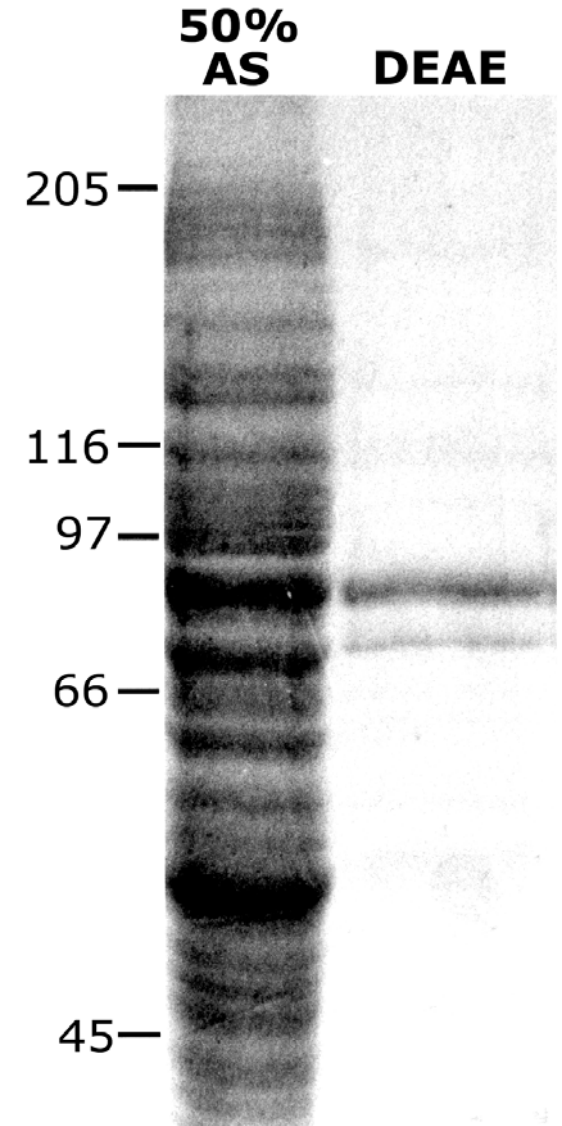
Proprietà uniche

- Cromatografia di affinità
- Subunità o complesso (gel filtrazione)



Come valutare la procedura di purificazione

- quantitativo
 - recupero (resa %)
 - Livello di purificazione



$$\text{Attività specifica} = \frac{\text{unità totali di enzima}}{\text{Quantità di proteine totali}}$$

$$\text{Livello di purificazione} = \frac{\text{attività spec. recuperata/mg}}{\text{Attività spec. iniziale/mg}}$$

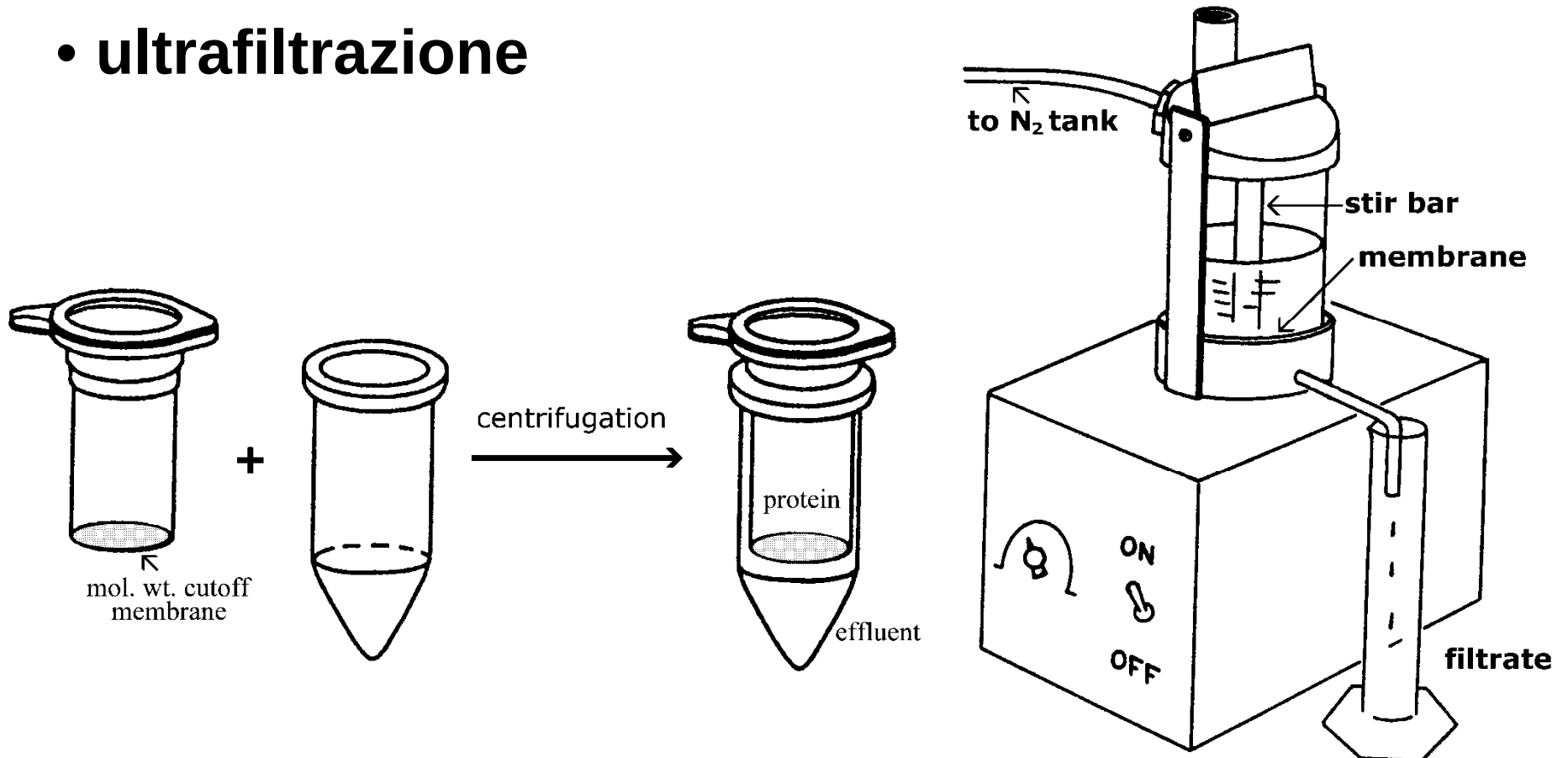
$$\text{Resa \%} = \frac{\text{quantità di proteina purificata}}{\text{Quantità di proteina presente nell'estratto iniziale}}$$

TABLE 4.1 Quantification of a purification protocol for a fictitious protein

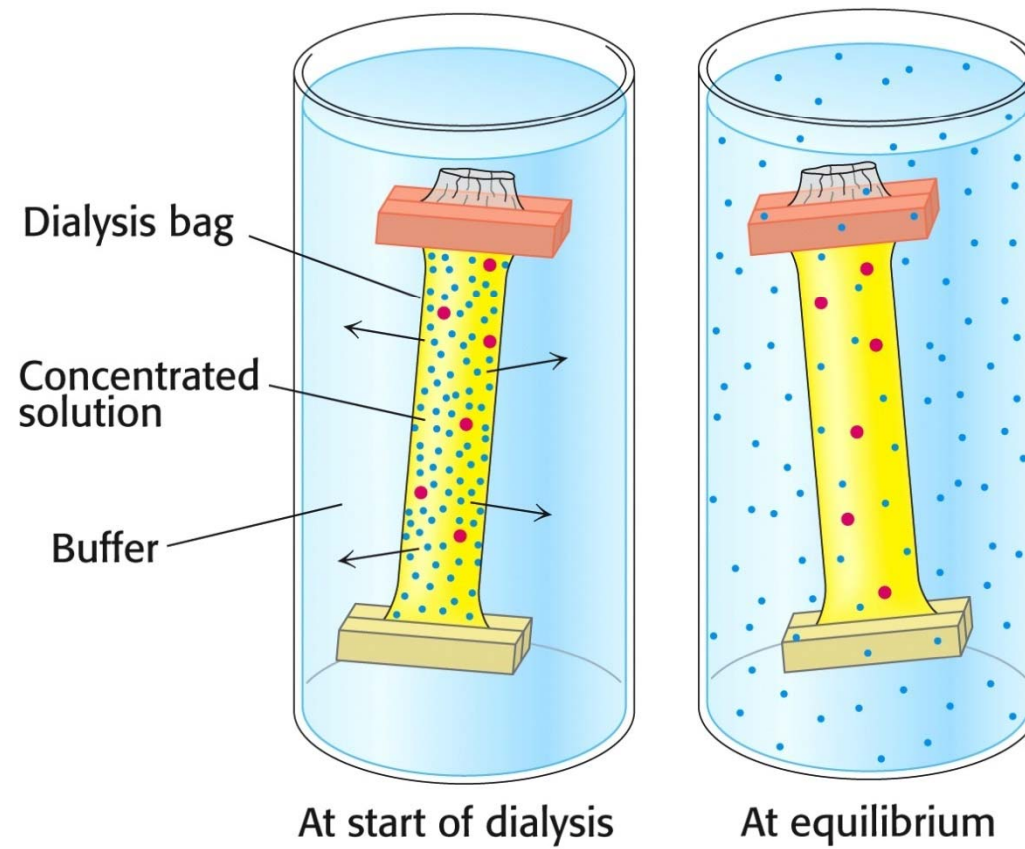
Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity, (units mg ⁻¹)	Yield (%)	Purification level
Homogenization	15,000	150,000	10	100	1
Salt fractionation	4,600	138,000	30	92	3
Ion-exchange chromatography	1,278	115,500	90	77	9
Molecular exclusion chromatography	68.8	75,000	1,100	50	110
Affinity chromatography	1.75	52,500	30,000	35	3,000

Metodi per la concentrazione

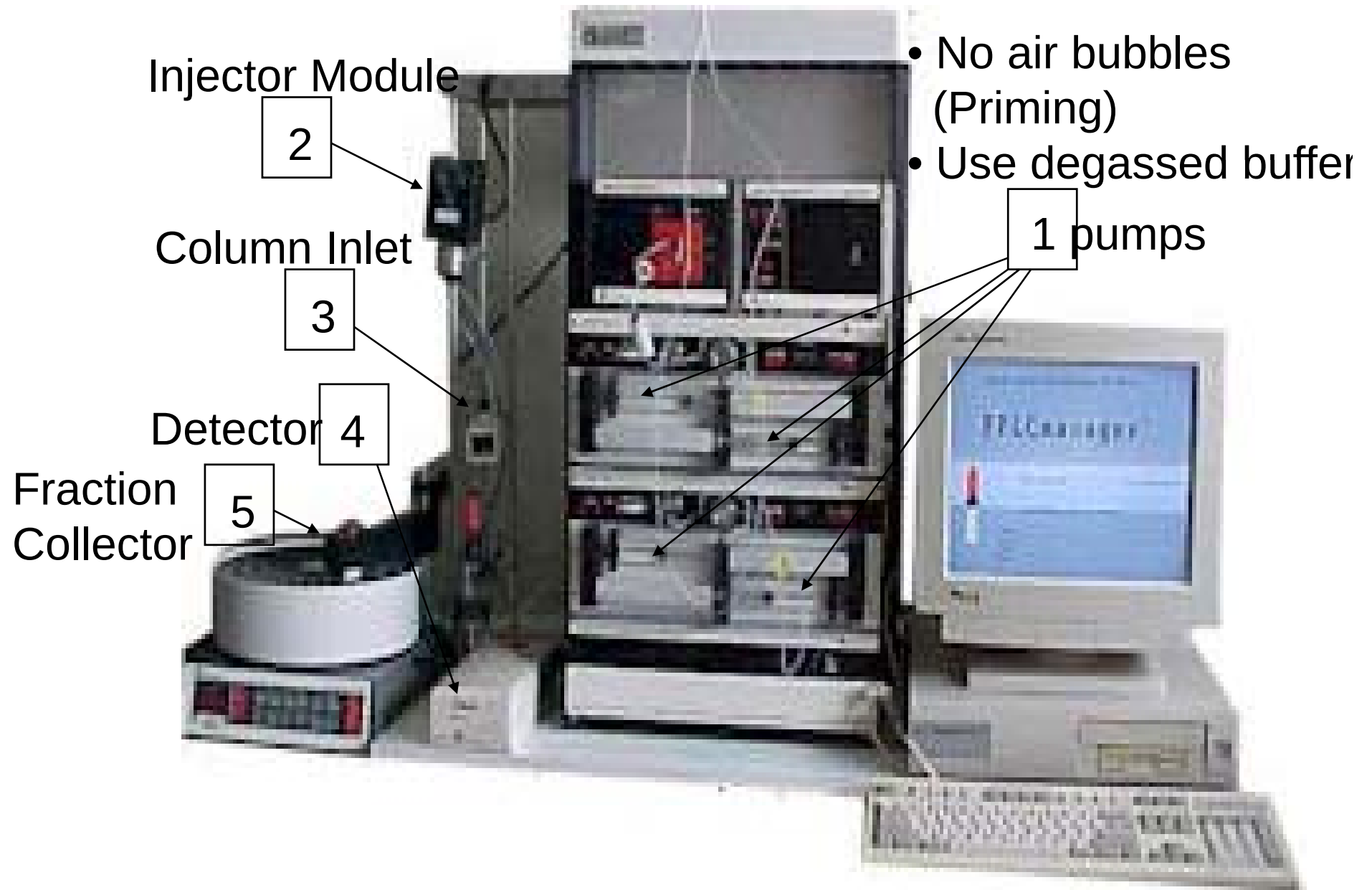
- precipitazione $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Dialisi contro 50% glicerolo
- Dialisi contro PEG
- ultrafiltrazione



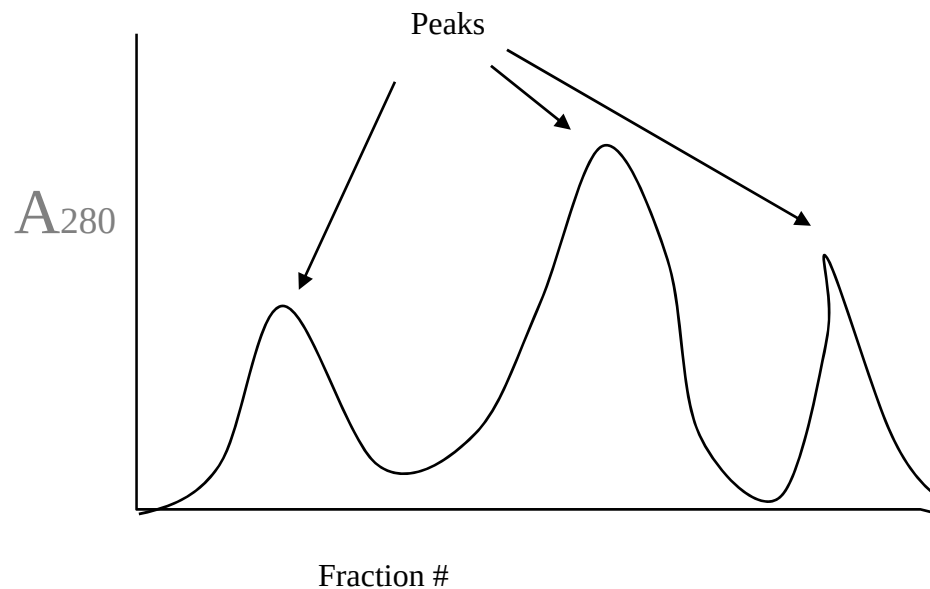
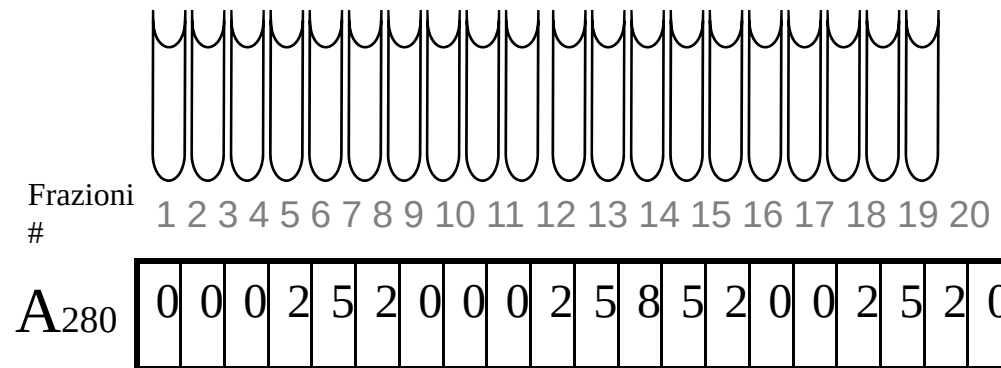
Dialisi



Fast Protein Liquid Chromatograph (FPLC)

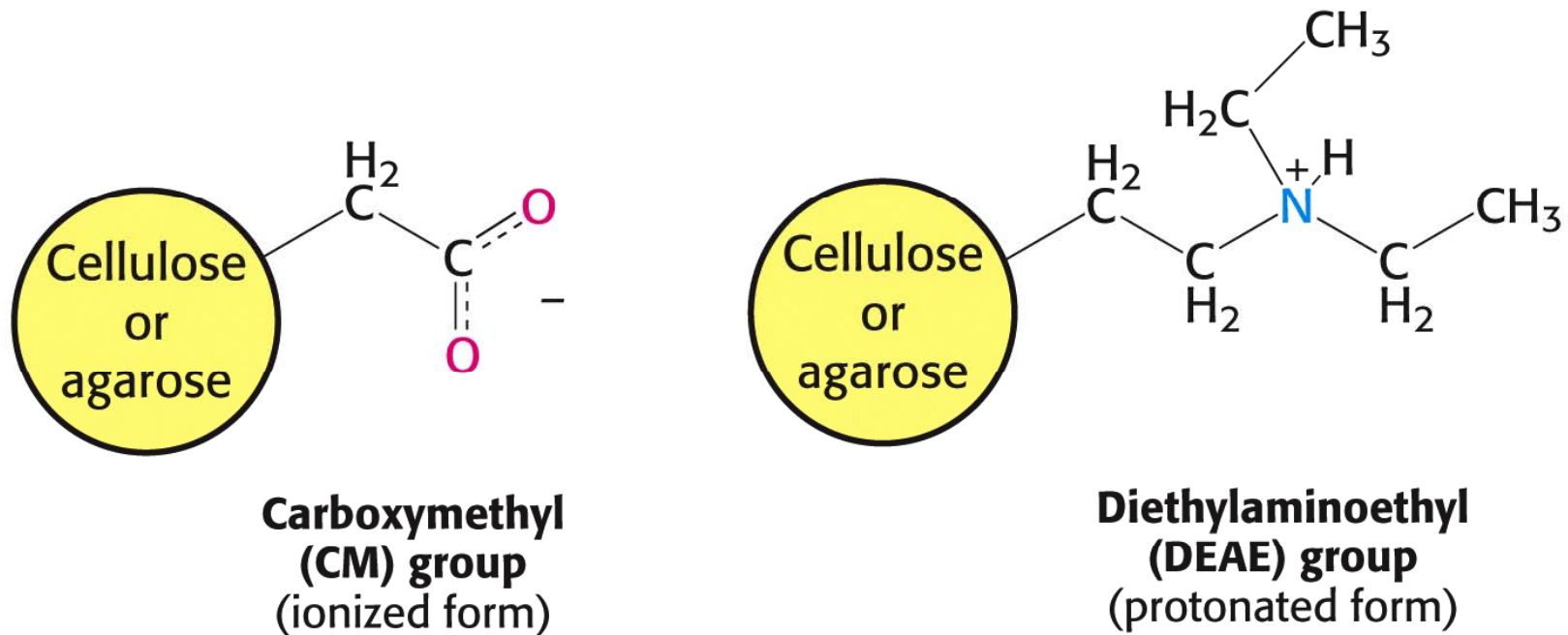


Come identifichiamo le frazioni che contengono proteine?

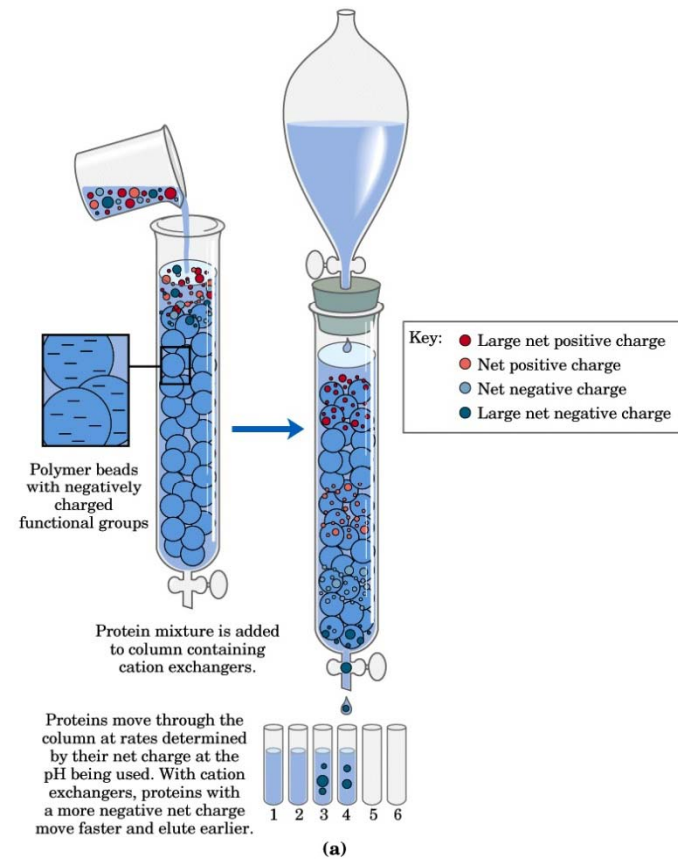
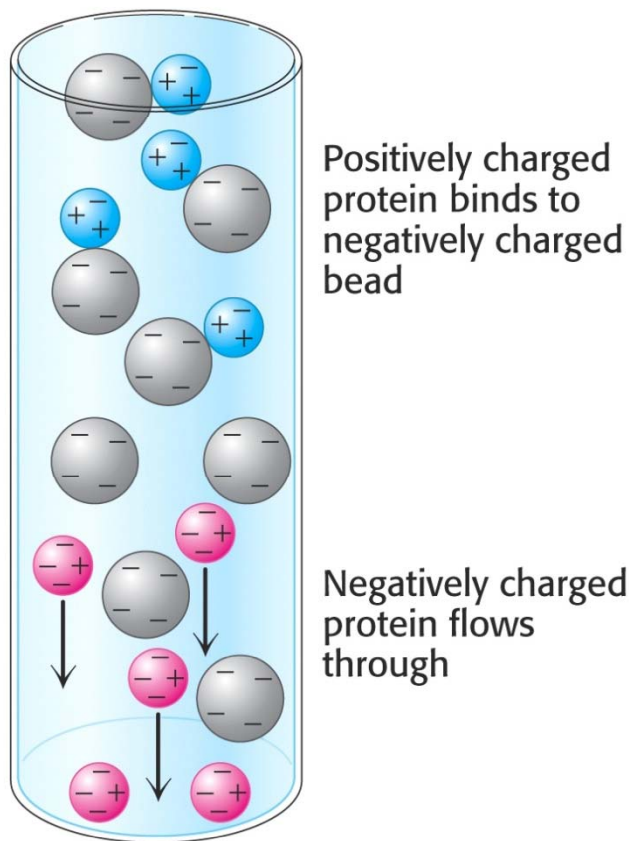


- Le proteine totali vengono stimate registrando l'assorbanza a 280 nm con uno spettrofotometro.
- I valori ottenuti possono essere utilizzati per costruire un grafico che è chiamato **profilo di eluizione**.

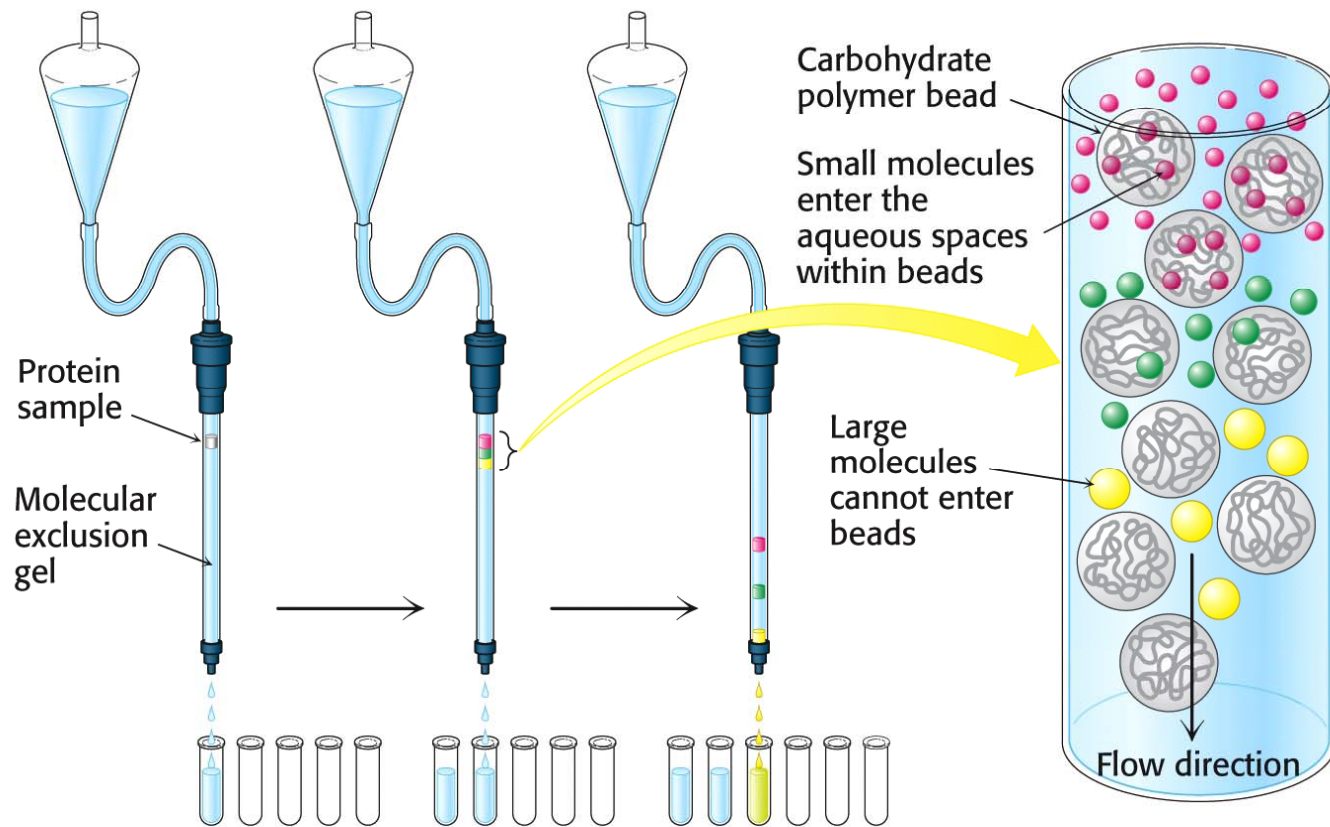
Cromatografia a scambio ionico

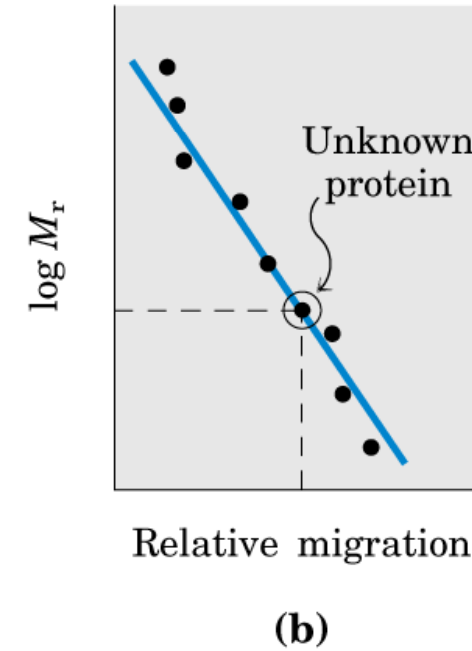
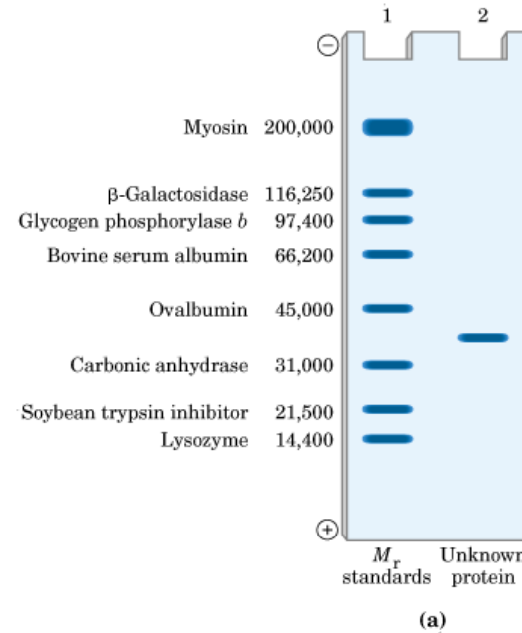


Cromatografia a scambio ionico



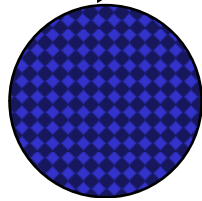
Gel filtrazione



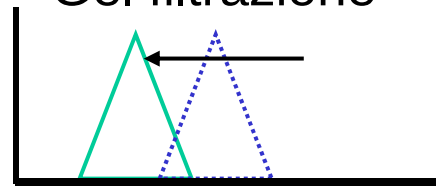


• Forma

globulare (sferica)
(fibrosa)



Gel filtrazione



asimmetrica



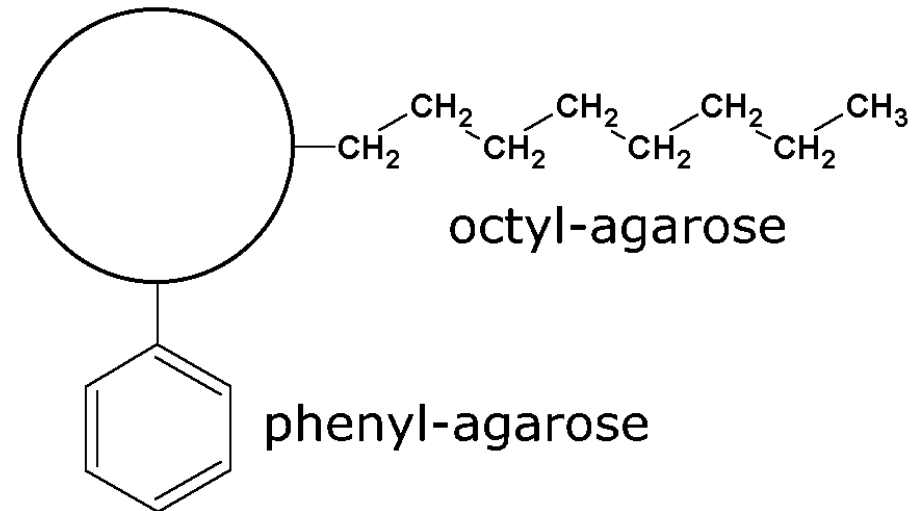
Eluisce prima
Sembra più grande

Cromatografia ad interazione idrofobica

**Separa le proteine sulla base di differenze
nella loro idrofobicità**

**Alte concentrazioni saline
Favoriscono le interazioni
idrofobiche**

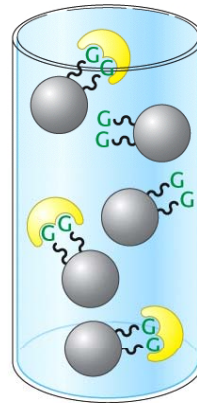
- i.e. 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



← aumento nel salting out
anions: PO_4 , SO_4 , Cl , Br , NO_3 , ClO_4 , I , SCN
/

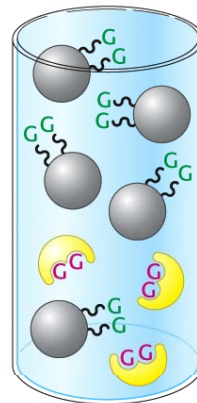
affinità

Glucose-binding protein attaches to glucose residues (G) on beads



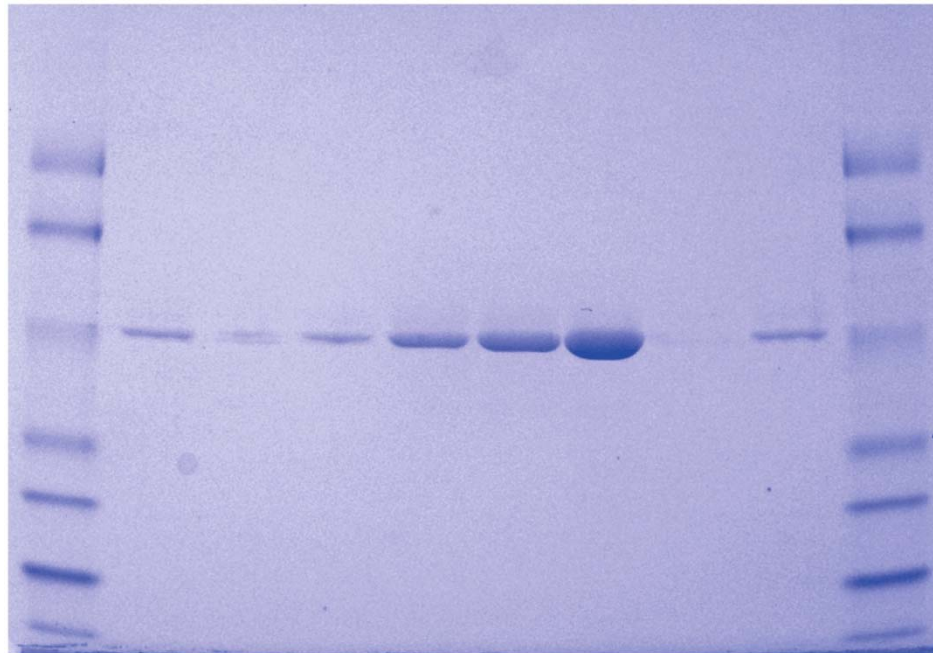
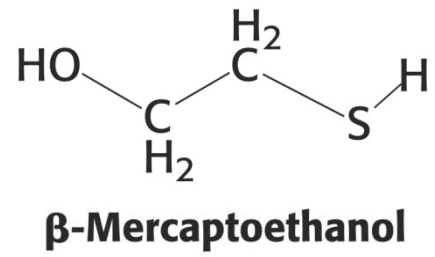
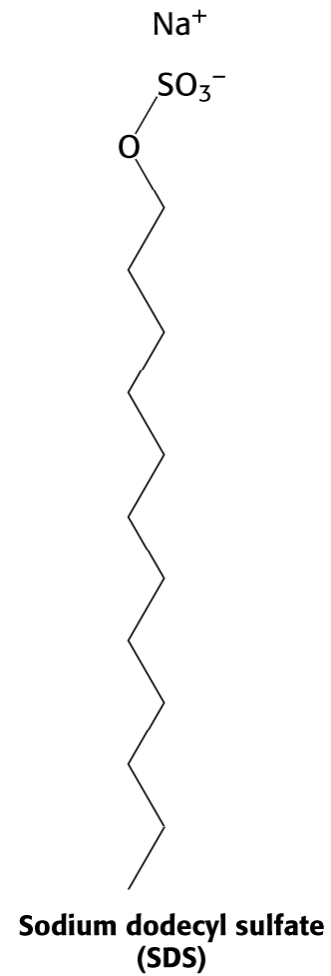
Addition of glucose (G)

Glucose-binding proteins are released on addition of glucose



- Il primo passaggio di purificazione cromatografica deve rimuovere la maggior parte dei contaminanti (scambio ionico?)
- I passaggi intermedi sfruttano proprietà differenti (le tecniche di assorbimento consentono di recuperare il campione in piccoli volumi)
- Il passaggio finale deve rimuovere gli ultimi contaminanti
- La proteina viene infine dializzata e concentrata

SDS-PAGE



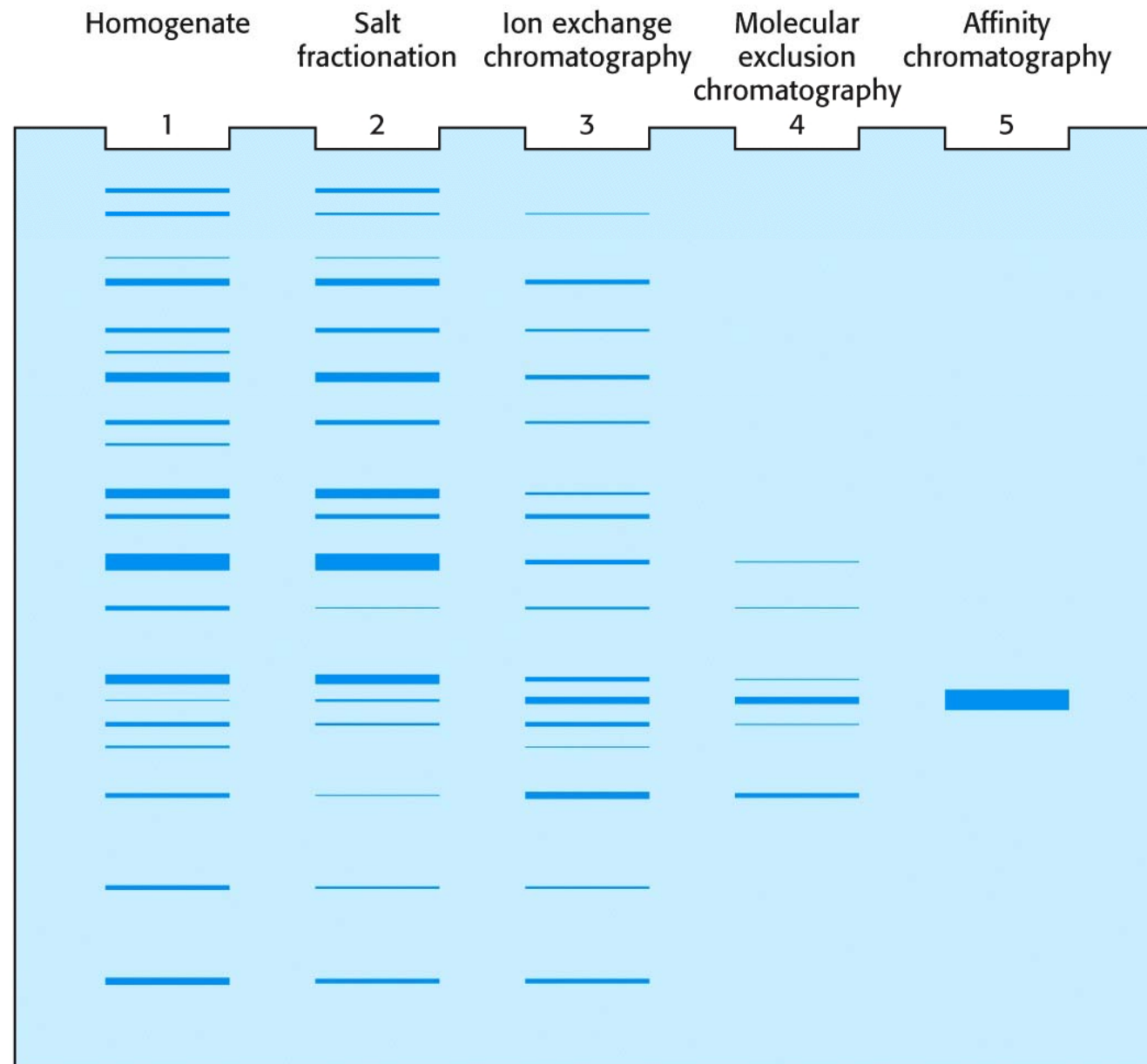


TABLE 4.1 Quantification of a purification protocol for a fictitious protein

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity, (units mg ⁻¹)	Yield (%)	Purification level
Homogenization	15,000	150,000	10	100	1
Salt fractionation	4,600	138,000	30	92	3
Ion-exchange chromatography	1,278	115,500	90	77	9
Molecular exclusion chromatography	68.8	75,000	1,100	50	110
Affinity chromatography	1.75	52,500	30,000	35	3,000

- Quale/i delle seguenti tecniche si potrebbero utilizzare per purificare le proteine contenute nella seguente miscela :
 - Mioglobina di cavallo (PM 16.9 kD; pI 7.0) + citocromo c (PM 11.7 kD; pI 10.6) + Albumina (PM 68 kD; pI 4.9)
 - Spiegare perché e quale tecnica ha maggiore probabilità di successo.
-
- Colorazione secondo il metodo di Lowry
 - SDS-PAGE + colorazione secondo Coomassie
 - Isoelectrofocusing
 - Cromatografia in scambio ionico
 - Cromatografia in gel filtrazione
 - Immunoprecipitazione

Procedura	Proteine totali (mg)	Attività (unità)	Attività specifica	Resa	Livello di purificazione
Estratto grezzo	20000	4.000.000		100 %	1
Precipitazione con sali	5000	3.000.000			
Cromatografia a scambio ionico	400	1.600.000			
Cromatografia per affinità	100	1.500.000			
Cromatografia per esclusione molecolare	90	1.350.000			