

CDL BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE (BCM)

Corso di Biochimica Applicata (6 CFU)

Prof.ssa **Alessandra Olianas**

Lezioni : **Martedì 11-13**

Giovedì 9-11





Prof.ssa Alessandra Olianas

Dip. Scienze della Vita e dell'Ambiente

Sezione Biomedica (laboratorio di Biochimica)

Tel. 0706754507 (studio)

Ricevimento studenti: **si riceve per appuntamento**

olianas@unica.it



Prof Barbara Manconi
Corso di Laurea in CTF
Lezioni di Biochimica Applicata.

E' vietata la copia e la riproduzione dei contenuti e immagini in qualsiasi forma.

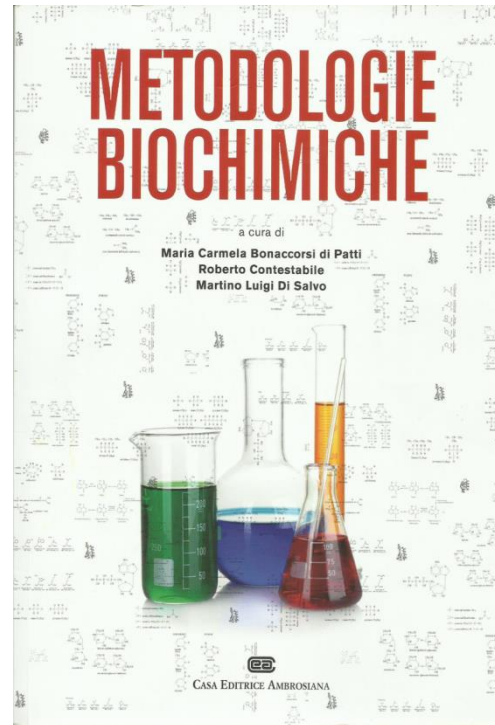
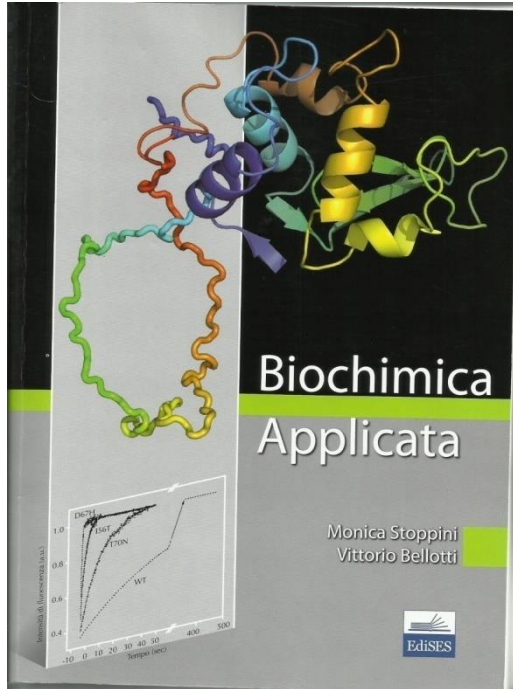
E' inoltre vietata la redistribuzione e la pubblicazione dei contenuti e immagini non autorizzate espressamente dall'autore.

Di seguito titolo, autore e editore delle fonti da cui sono state prese le immagini e i video mostrati durante le lezioni di Biochimica applicata come supporto didattico e utili per la preparazione dell'esame:

Biochimica applicata
(Stoppini- Bellotti, Ed. EdiSES)

Principi di Metodologie Biochimiche
(De Marco –Cini. Ed Piccin)

Testi consigliati:



Materiali didattici del docente

Corso da 6 CFU

4 CFU (32 ore) lezioni frontali



• **Biochimica Applicata**

2 CFU (24 ore) Laboratorio



**Esercitazioni di laboratorio sulle
principali metodologie di
Biochimica Applicata**

PROGRAMMA DI BIOCHIMICA APPLICATA (6 CFU)

Passaggi iniziali di purificazione: precipitazioni isoelettrica, salina, con solventi organici, con variazioni di temperatura e pH.

Dialisi, ultradialisi, liofilizzazione. Metodi per concentrare le proteine.

Cromatografia: Principi generali e sistemi cromatografici a bassa pressione su colonna. Cromatografia di ripartizione. Cromatografia di adsorbimento.

Cromatografia a scambio ionico.

Cromatografia ad esclusione molecolare e determinazione del PM

Cromatografia per interazioni idrofobiche. Cromatografia per affinità.

Cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC).

Elettroforesi: principi generali e apparecchi per l'elettroforesi zonale.

Elettroforesi zonale su carta. Elettroforesi zonale su gel (agarosio e poliacrilammide)

Elettroforesi discontinua su gel di poliacrilammide. Elettroforesi in SDS e determinazione del peso molecolare. Isoelettro-focalizzazione.

Elettroforesi bidimensionale.

Fotometria e Spettrofotometria UV/VIS:

Principi di funzionamento del fotometro e dello spettrofotometro.

Definizione di assorbanza e trasmittanza.

Determinazione qualitativa e quantitativa.

Metodi di determinazione della concentrazione delle proteine.

Purificazione delle proteine: considerazioni generali e analisi di specifici protocolli.

Utilizzo di un software didattico di simulazione della purificazione di proteine.

lab.informatico

Spettrometria di massa: Principi di funzionamento dello spettrometro di massa

Analisi degli spettri di massa

Esercitazioni di laboratorio sulle principali metodologie di Biochimica Applicata

(LAB DIDATTICO DI BIOLOGIA)

24 h

- 1. Omogenizzazione di un tessuto- Precipitazione con solfato d'ammonio. Dialisi**
- 2. Cromatografia a scambio ionico**
- 3. Spettrofotometria: spettri di assorbimento. Concentrazione delle soluzioni.**
- 4. Elettroforesi**
- 5. Analisi dei risultati e calcolo del peso molecolare delle proteine**

Genoma
(insieme dei geni di un organismo vivente)

Proteoma
(insieme delle proteine di un organismo vivente)

Ma solo teoricamente possiamo ipotizzare quali proteine dovrebbero essere presenti

a partire dal genoma **non** possiamo stabilire:

- quali siano realmente espresse in ogni specifico tessuto
- se subiscono modificazioni post-traduzionali (fosforilazione, glicosilazione)
- quale sia la loro funzione

Solo con l'analisi del contenuto proteico di una cellula o di un tessuto possiamo ottenere tali informazioni

Obiettivi dell'Analisi del Proteoma



Il complesso delle proteine espresse da un organismo, un tessuto, una cellula o un singolo organello.

Il termine **Proteomica** introdotto per la prima volta nel 1994 da Marc Wilkins e collaboratori,

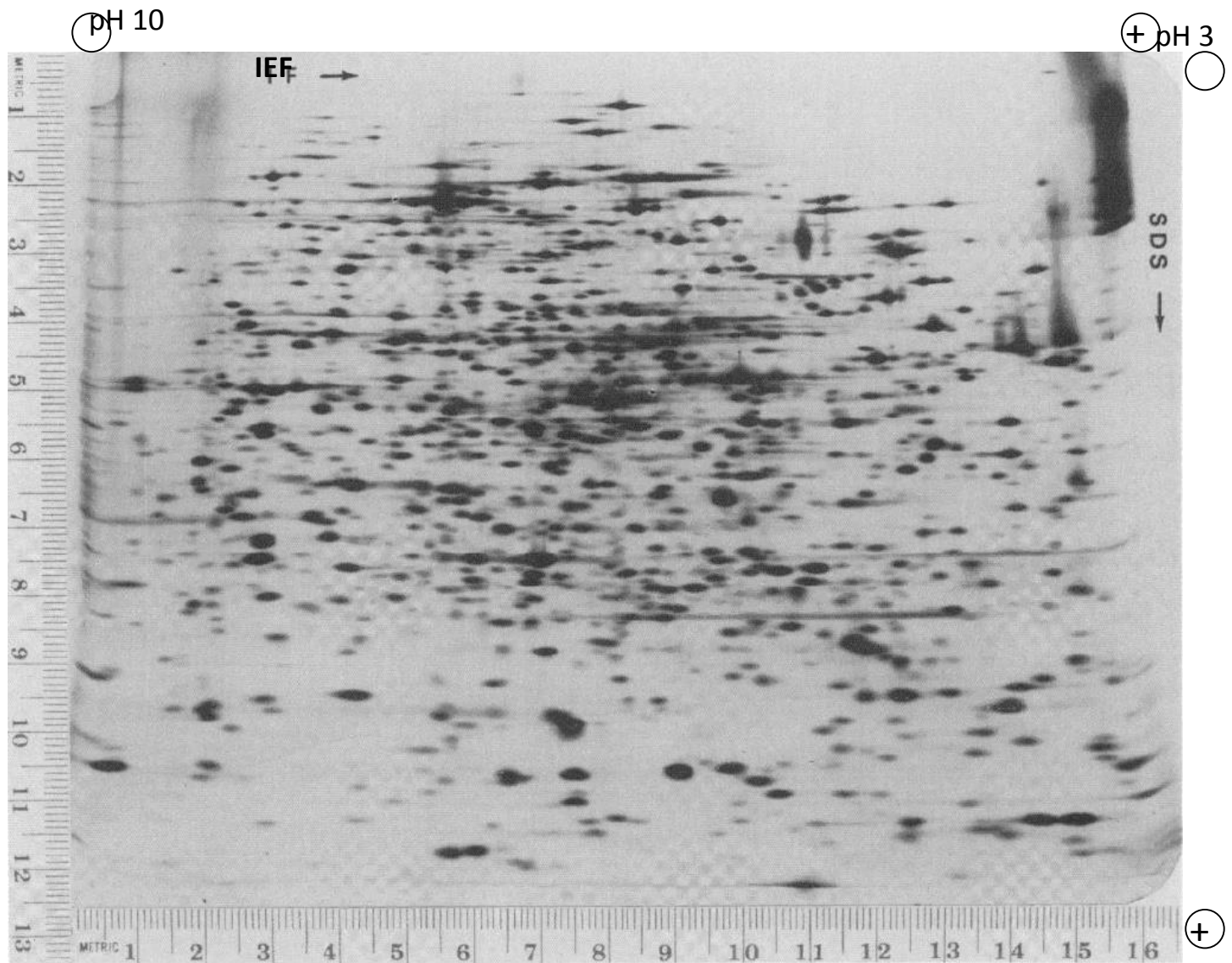
rappresenta

Insieme delle tecniche molecolari applicabili allo studio delle proteine espresse da un genoma in un sistema biologico che può essere rappresentato da un organismo, un tessuto, una cellula o un singolo organello.

Quali tipi di studi ci permette di fare la proteomica

?

- Identificazione nuove proteine o nuove funzioni
- Studio degli effetti di un farmaco
- Confronto tessuto normale con uno malato
- Cambiamenti durante i diversi stadi del ciclo cellulare



2D-PAGE di un lisato di cellule di *E. coli* 10 μ g di proteine \rightarrow 1000 macchie
1 $^{\circ}$ elettroforesi bidimensionale pubblicata nel 1975

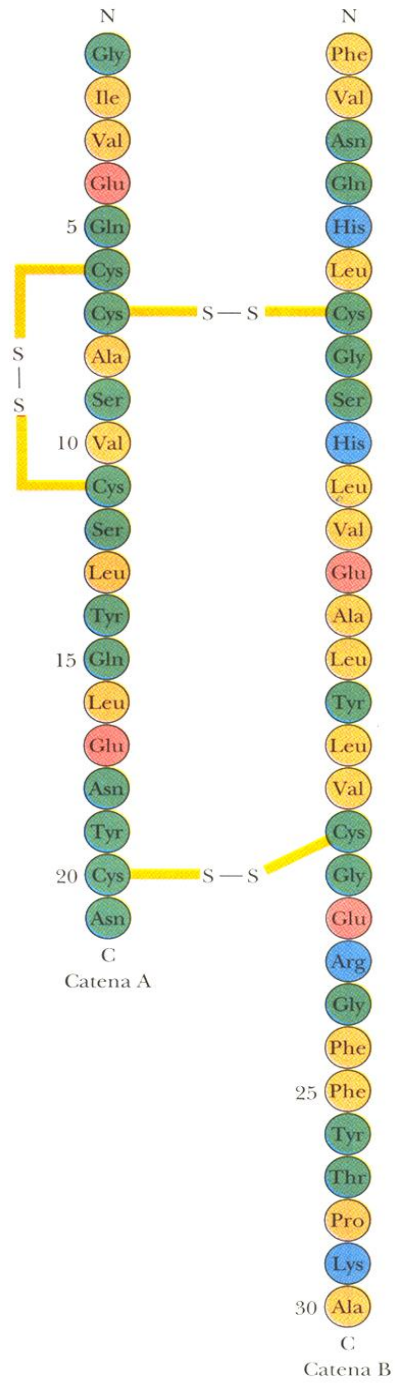
1953 Frederick Sanger determina la struttura primaria dell'insulina

51 aa

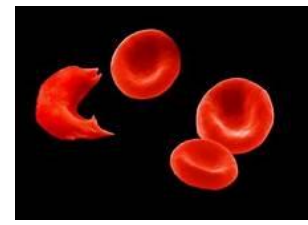
Proteina = polimero di aa con sequenza precisamente definita

- Struttura primaria
- Struttura secondaria
- Struttura terziaria
- Struttura quaternaria

Alterazioni struttura primaria
patologie molecolari
(HbS) β 6 Glu \rightarrow Val

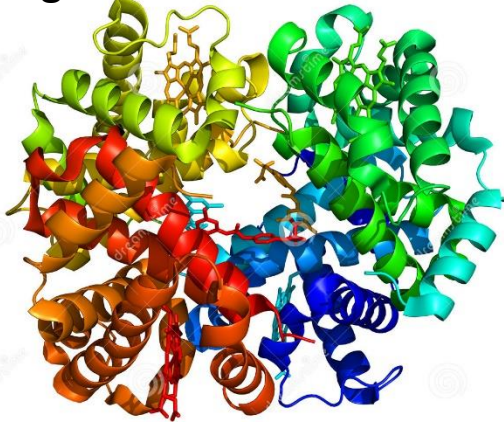


Anemia falciforme

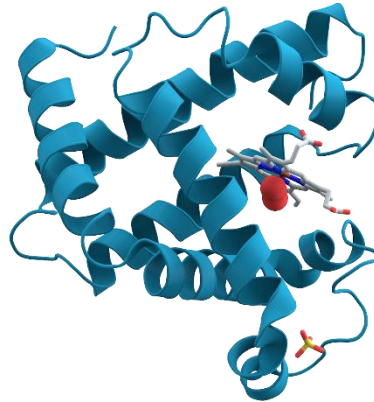


Oggi è nota la sequenza di più di **10.000** proteine:

emoglobina



Catene alfa 141 aminoacidi
Catene beta 146 aminoacidi



mioglobina

153 aminoacidi

Per la maggior parte degli studi di caratterizzazione delle proteine è necessario **che la proteina di interesse sia stata purificata**

E' difficile purificare una proteina?

Una proteina è in genere presente in **piccole quantità**
nel materiale di partenza 0.001-10%

E' necessario scegliere opportunamente la fonte biologica

Rimozione della proteina dal suo ambiente naturale
aumenta la probabilità di denaturazione

IIMPORTANTE: Aggiungere agenti antiossidanti e operare a 4°C

Ciascuna proteina è un caso a sé

Il protocollo di purificazione deve essere messo a punto sperimentalmente
x ciascuna proteina

Ricerca bibliografica

- Moltissimo (quasi tutto) è disponibile nella bibliografia specifica.
- Bibliografia: <http://www.pubmed.org>
- Struttura proteine: <http://www.rcsb.org>

Strategia di purificazione di una Proteina

▪ **Tipo di studio** → **Studi enzimatici**
(non è necessaria una purezza del 100%)
Studi strutturali
(elevato grado di purezza)

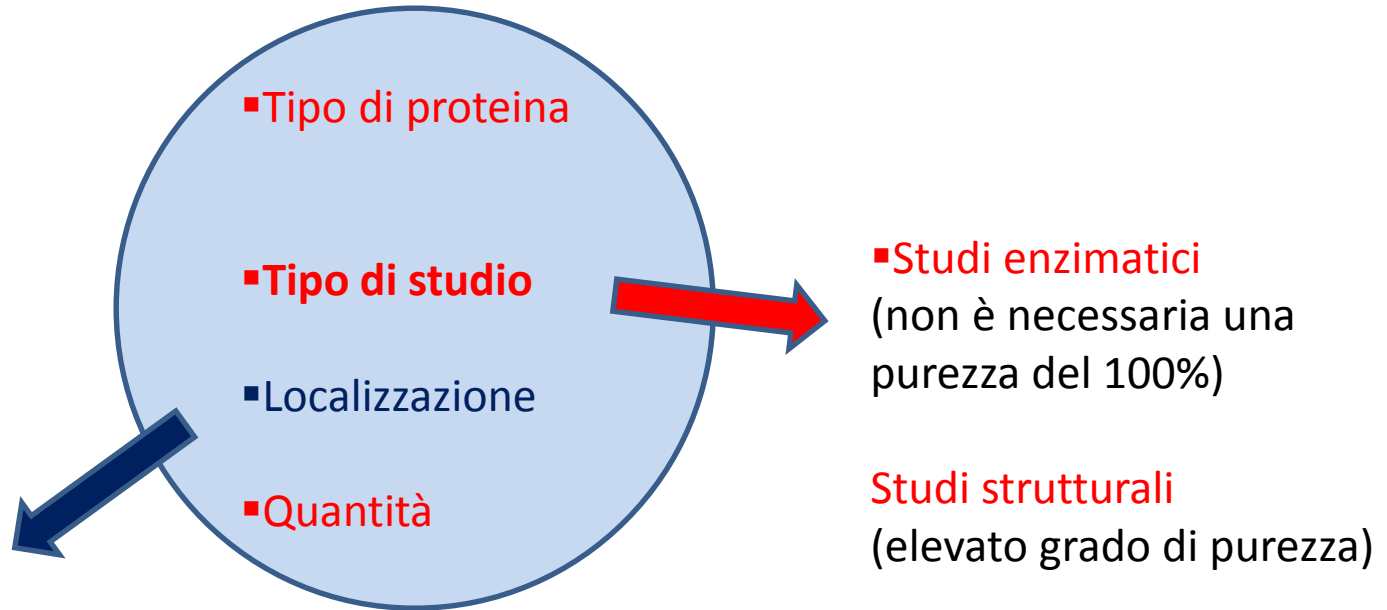
▪ **Localizzazione** →

- Extracellulare
- Intracellulare
- Proteina di membrana :
 - periferica
 - Integrale

▪ **Quantità** →

- Analitica
- Preparativa

Strategia di purificazione di una Proteina



▪ Tipo di proteina

▪ Tipo di studio

▪ Localizzazione

▪ Quantità

▪ Studi enzimatici
(non è necessaria una
purezza del 100%)

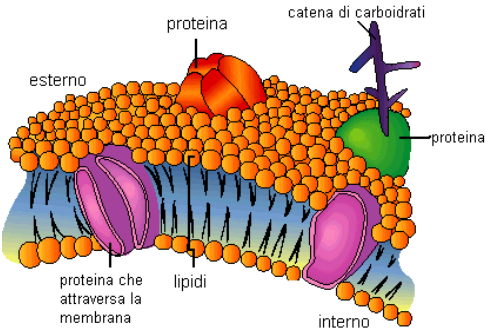
Studi strutturali
(elevato grado di purezza)

▪ Extracellulare

▪ Intracellulare

▪ Proteina di membrana :
- periferica
- Integrale

Proteina : localizzazione



▪ Extracellulare

- secreta nel siero o brodo di coltura

▪ Centrifugazione



▪ Filtrazione

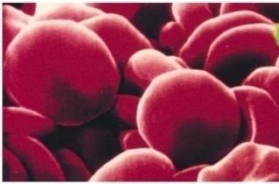
Intracellulare



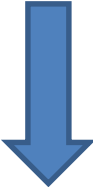
- Rottura delle cellule (Tipo di cellula)



Eritrociti



(b)



Cellula vegetale



Batteri



Proteina di membrana :

Periferica (legami H e attrazioni elettrostatiche)
Variazione del pH o della forza ionica

Integrale (interazioni idrofobiche)
Detergenti che contengono catene lipofile (Triton X-100)



Eritrociti

▪ Rottura delle cellule (Tipo di cellula)

acido N-acetilmuramico (NAM)
legame β 1-4 glicosidico
N-acetilglucosamina (NAG)

Cellula vegetale

Batteri

Lisozima

▪ **Schock termico o osmotico**

▪ **Proteasi**

▪ **Toluene**

▪ **Cellulasi**

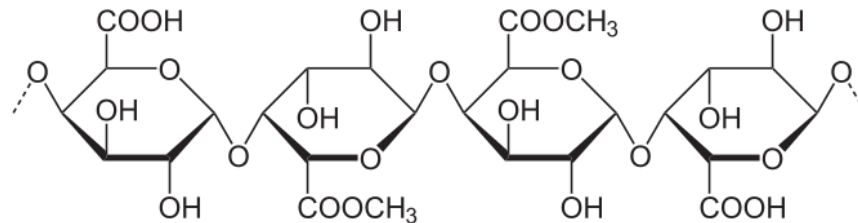
▪ **Pectinasi**

▪ Enzimi

▪ Schock osmotico

▪ EDTA (rimuove il calcio)

pectina

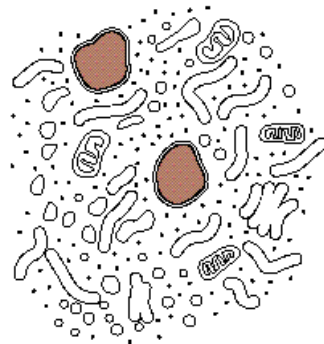
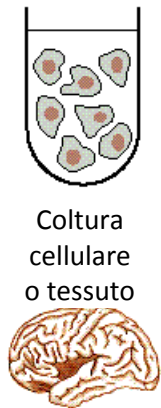


La degradazione delle membrane operata da solventi organici (ad es., 0.5% toluene, etile acetato)

Il rilascio di enzimi idrolitici endocellulari completa la degradazione delle membrane.

Materiale di partenza

- Organismo, organo o tessuto con abbondante proteina
- Iperespressione in un sistema opportuno
 - Batteri (*Escherichia coli*...)
 - Lieviti



- 1) Rottura delle cellule (**estratto grezzo**)
(Omogenizzazione)
- 2) Centrifugazione frazionata
Frazioni subcellulari o specifici organelli
- 3) Frazionamento (solubilità, pH, temperatura..etc..)

: Omogenizzazione (Tessuto)

Scelta del tampone

Caratteristiche dei tamponi usati per l'estrazione delle proteine:

- Elevata solubilità (TRIS; Fosfato) (mantiene il pH fisiologico)
- Non penetrare attraverso le membrane
- Non assorbire la luce nella regione del visibile
- Non essere tossico

Omogenizzazione (Tessuto)

tampone

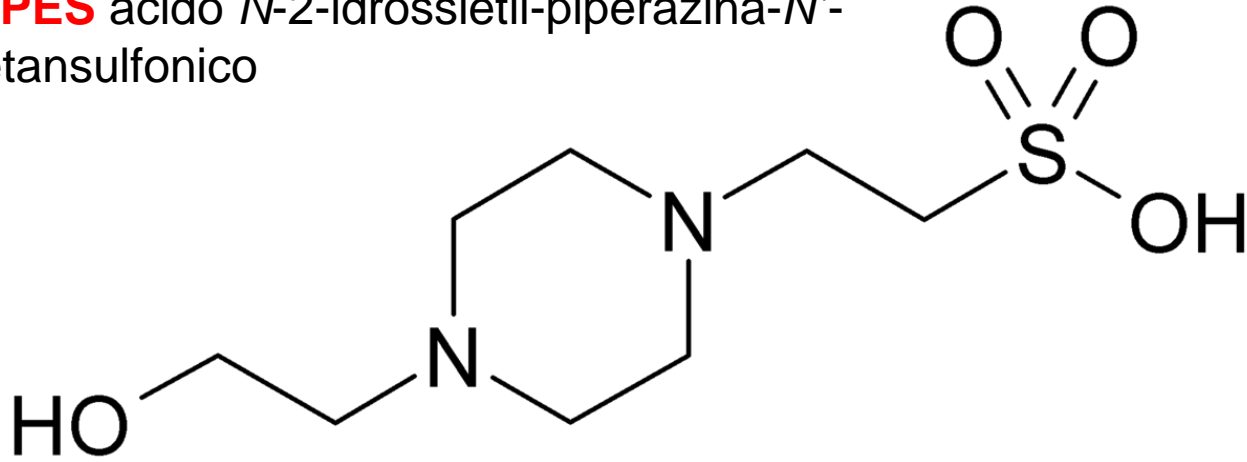
Deve contenere:

- Ioni per mantenere la pressione osmotica della soluzione tampone simile a quella intracellulare
 - KCl/ NaCl
 - Saccarosio (impedire la lisi di mitocondri o lisosomi)
- Magnesio (per mantenere l'integrità della membrana)
- Chelanti degli ioni metallici
 - EDTA (acido etilendiamino tetraacetico (rimuove ioni)
 - EGTA (rimuove ioni ma non chela il Mg⁺⁺)
- Inibitori delle proteasi : PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro)
- Composti tiolici antiossidanti
 - 2-mercaptoetanololo,
 - DTT (ditiotreitolo)
- Triton X-100 (detergente non ionico)

	pKa (a 25°C)	Note
MES acido 2-(<i>N</i> -morfolino)- etansulfonico	6.1	È uno dei cosiddetti 'Good buffers' (dal nome di chi ne ha esplorato l'uso in biochimica e biologia cellulare), come anche Bicina, PIPES, HEPES ed altri. Poco tossico per le cellule.
HEPES acido <i>N</i> -2- idrossietil-piperazina- <i>N'</i> -2- etansulfonico	7.5	Vedi PIPES.
PIPES acido 1,4 piperazindietansulfonico	6.8	Relativamente costoso, ma valido. Interagisce pochissimo con i metalli divalenti (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺). Può interferire con il metodo di Lowry per la determinazione della concentrazione proteica.
Tris Tris (idrossimetil)aminometano	8.1	Poco costoso e molto usato. Tuttavia può dare effetti inibitori con molti sistemi enzimatici ed interagire fortemente con i metalli di transizione. Il suo pKa varia sensibilmente con la temperatura

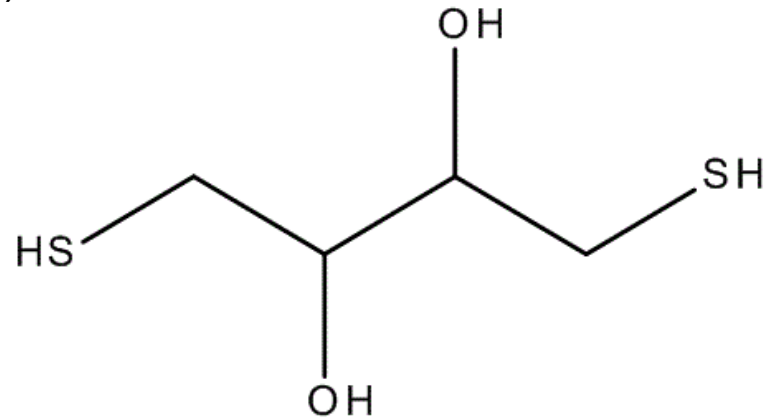
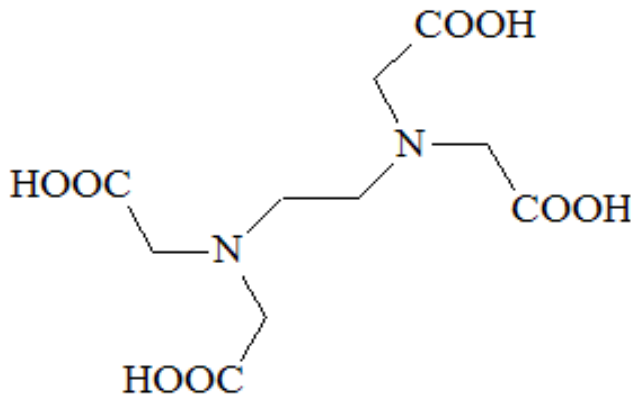
Acido o base	pKa (a 25°C)	Note
Acido acetico	4.75	È efficace come tampone solo a pH acidi (4-5.5).
Acido citrico	4.76 (pKa2) 6.4 (pKa3)	È efficace come tampone a pH <7. Tende a chelare gli ioni polivalenti.
Acido fosforico	7.2 (pKa2) 12.3 (pKa3)	Poco costoso. È spesso metabolita o inibitore di sistemi enzimatici. Tende a precipitare i cationi polivalenti.
Acido borico	9.2	Forma complessi con gli acidi nucleici.
Imidazolo	7.0	
Bicina <i>N,N'</i> -bis-(2-idrossietil) glicina	8.35	
Glicina	9.8 (pKa2)	

HEPES acido *N*-2-idrossietil-piperazina-*N'*-2-etansulfonico



-DTT (ditiotreitolo)

-EDTA (acido etilendiamino tetraacetico)




Metodi di lisi cellulare

Tecnica	Applicazione
Metodi non meccanici	
Shock osmotico	Tessuti animali molli, alcune cellule vegetali
Congelamento/scongelamento	Tessuti animali molli, alcuni batteri
Enzimi litici	Cellule animali e vegetali
Detergenti (NP40, SDS)	Cellule in coltura, batteri
Metodi meccanici	
Pestello e mortaio	Tessuti resistenti
Sfere di vetro	Batteri e funghi
Omogenizzatore a motore	Tessuti vegetali e animali
Omogenizzatore a mano	Tessuti molli delicati
Estrusione solida (Hughes press)	Materiale vegetale resistente
Estrusione liquida (French press)	Microorganismi
Ultrasonificazione	Microorganismi

Disintegrazione cellulare

Metodi non meccanici:

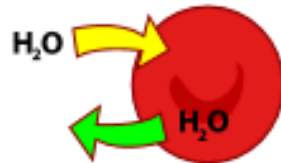
- Shock osmotico (globuli rossi in acqua),
- Congelamento/scongelamento, 
- Digestione chimica o enzimatica della parete cellulare,
- Solubilizzazione chimica,
- Metodi meccanici
 - Omogeneizzazione
 - French press (cavitazione)
 - Sonicazione (cavitazione)

si danneggia la parete cellulare o la membrana cellulare in seguito alla formazione di cristalli di ghiaccio

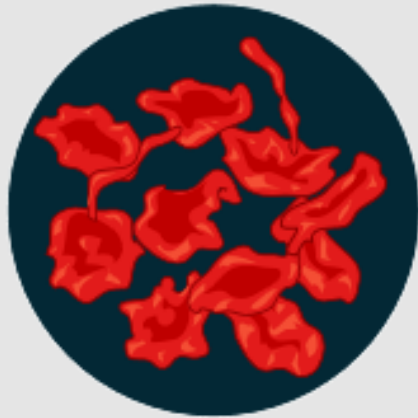
Disintegrazione cellulare

Metodi non meccanici:

- Shock osmotico (globuli rossi in acqua),



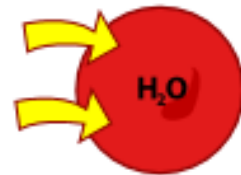
ipertonica

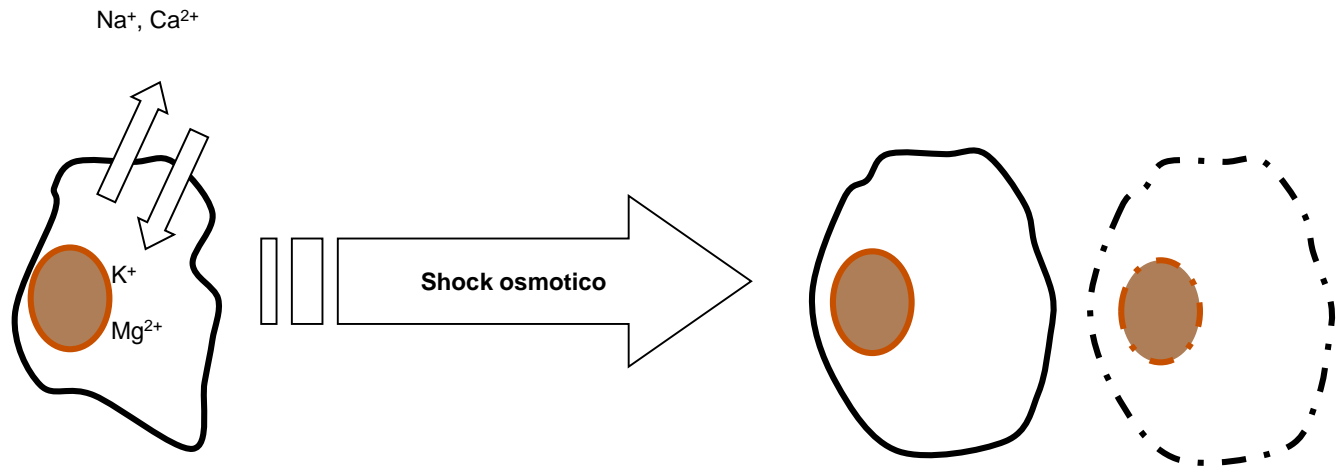


isotonica



ipotonica





Le cellule animali riescono a mantenere costante la concentrazione intracellulare di soluti scambiando attivamente (consumo di ATP) ioni con l'esterno.

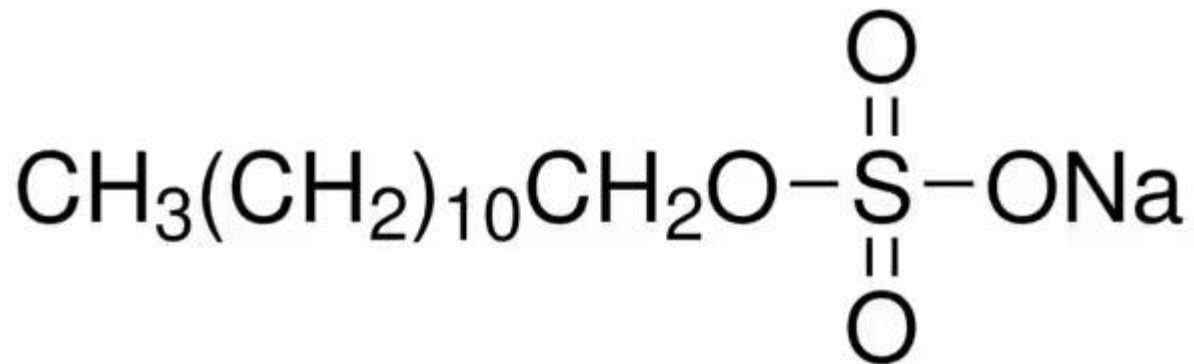
Un abbassamento drastico della pressione osmotica esterna (immersione in acqua distillata) provoca un rigonfiamento delle cellule ed una 'esplosione' delle membrane.

SDS: sodio dodecilsolfato

Detergente anionico

denaturare le proteine

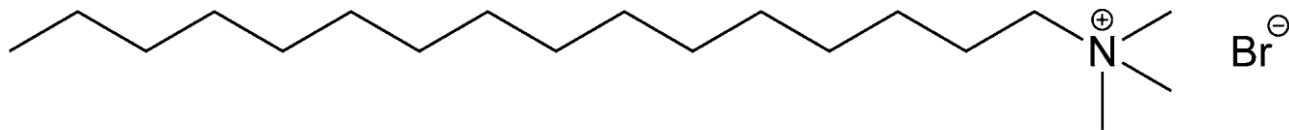
conferire loro una carica negativa uniforme



CTAB: Bromuro di esadeciltrimetilammonio
(Bromuro di cetiltrimetilammonio)

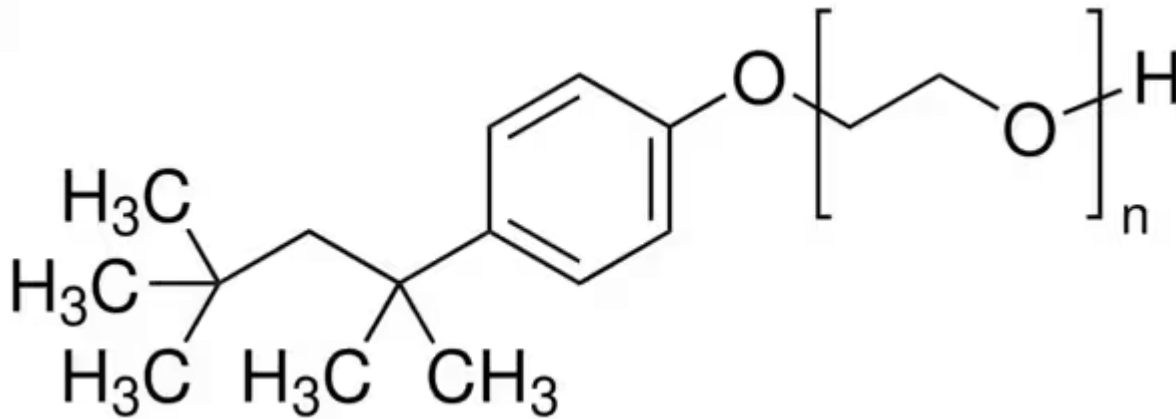
Detergente cationico comunemente utilizzato in biologia molecolare per degradare le pareti e le membrane cellulari, facilitando l'isolamento degli acidi nucleici.

In acqua forma micelle per via della sua natura anfipatica e provoca la lisi cellulare catturando i lipidi delle membrane, rilasciando così il contenuto intracellulare in soluzione.



(a) hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)

TRITON X100: detergente non ionico



4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicole

Disintegrazione cellulare

Metodi non meccanici:

- Shock osmotico (globuli rossi in acqua),
- Congelamento/scongelamento,
- Digestione chimica o enzimatica della parete cellulare,
- Solubilizzazione chimica,

Metodi meccanici :

- Omogeneizzazione
- French press (cavitazione)
- Sonicazione (cavitazione)



Omogenizzatore

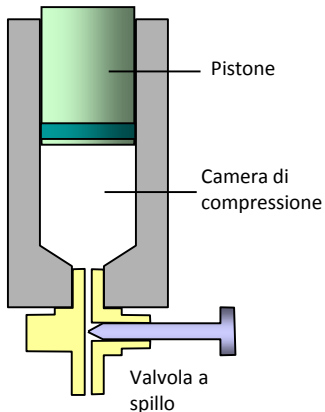


White
Model KSB3WH

Potter-Elvehjem



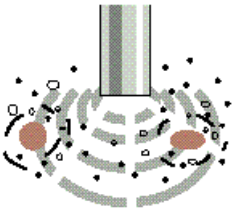
French press



La **sospensione** di cellule è inserita in una camera di compressione di acciaio inox, dotata di pistone e chiusa da una valvola a spillo. Si rimuove tutta l'aria dalla camera (così che rimanga solo la sospensione di cellule) e mediante il pistone vengono applicate pressioni idrauliche elevatissime (fino a 10^5 kPa, cioè 1000 atmosfere).

•Le cellule subiscono una compressione notevole.

SONICAZIONE (ultrasuoni)

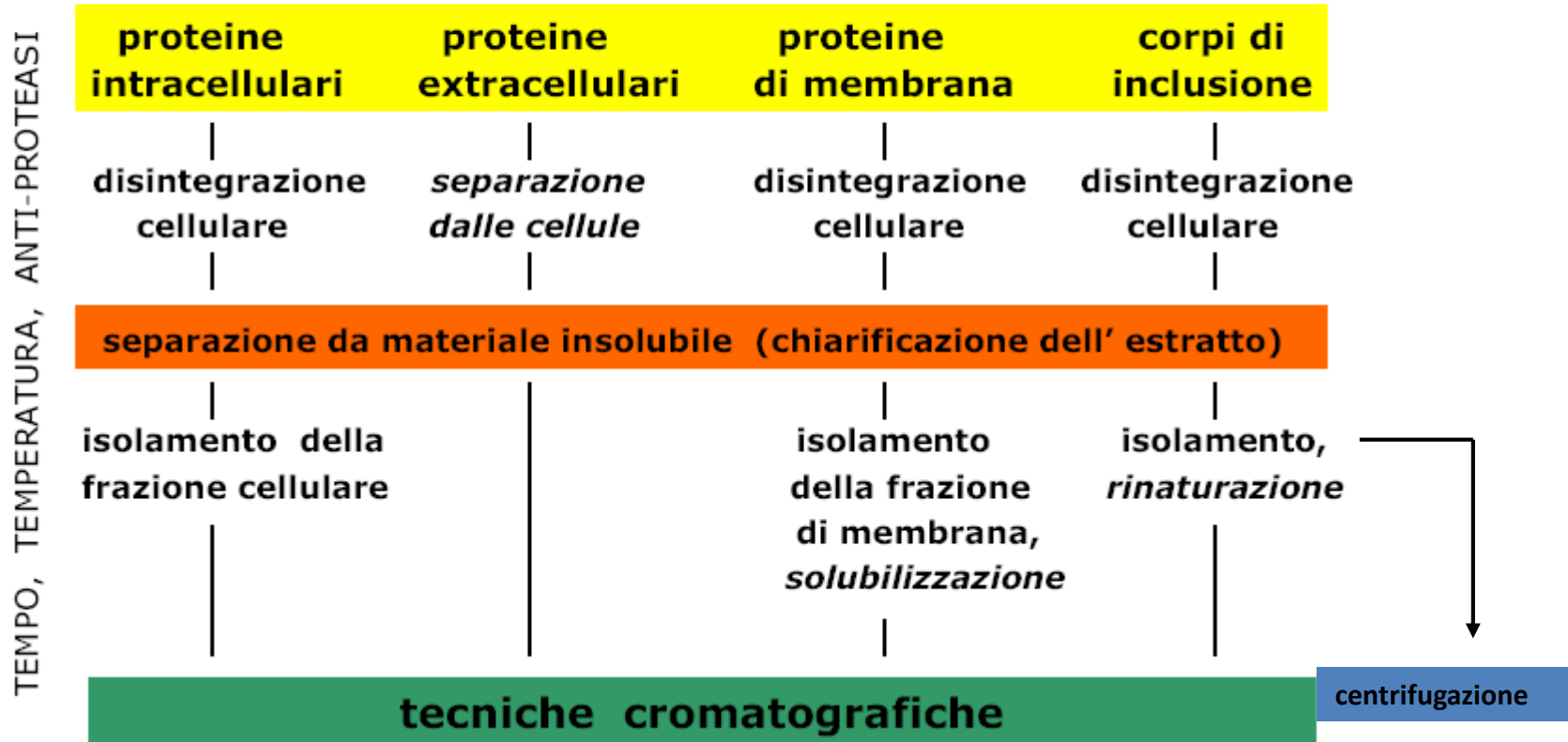


Sonicazione Nella sospensione viene immersa la sonda metallica di un sonicatore, che vibrando è in grado di emettere onde sonore ad altissima frequenza.

Le cellule vengono rotte dalle elevate pressioni locali indotte da queste onde.

Svantaggi: sviluppo di calore (si rimedia lavorando con le soluzioni in bagno di ghiaccio e programmando il funzionamento 'pulsato', cioè intermittente, della sonda), pericolo di danni per l'udito dell'operatore (è necessario usare cuffie).

Solubilizzazione della proteina e sviluppo dei passaggi di purificazione



Chiarificazione dell'estratto

- L'estratto grezzo deve essere “pulito” prima di procedere al frazionamento
- Allontanare subito gli acidi nucleici, ribosomi mediante precipitazione (**protamina solfato** determina la precipitazione selettiva degli acidi nucleici)
- Nel caso contenga molto materiale insolubile si può centrifugare

PROTOCOLLO di PURIFICAZIONE

Proprietà chimico-fisiche delle proteine che vengono sfruttate nelle tecniche
di
FRAZIONAMENTO

Le diverse tecniche sfruttano diverse caratteristiche:

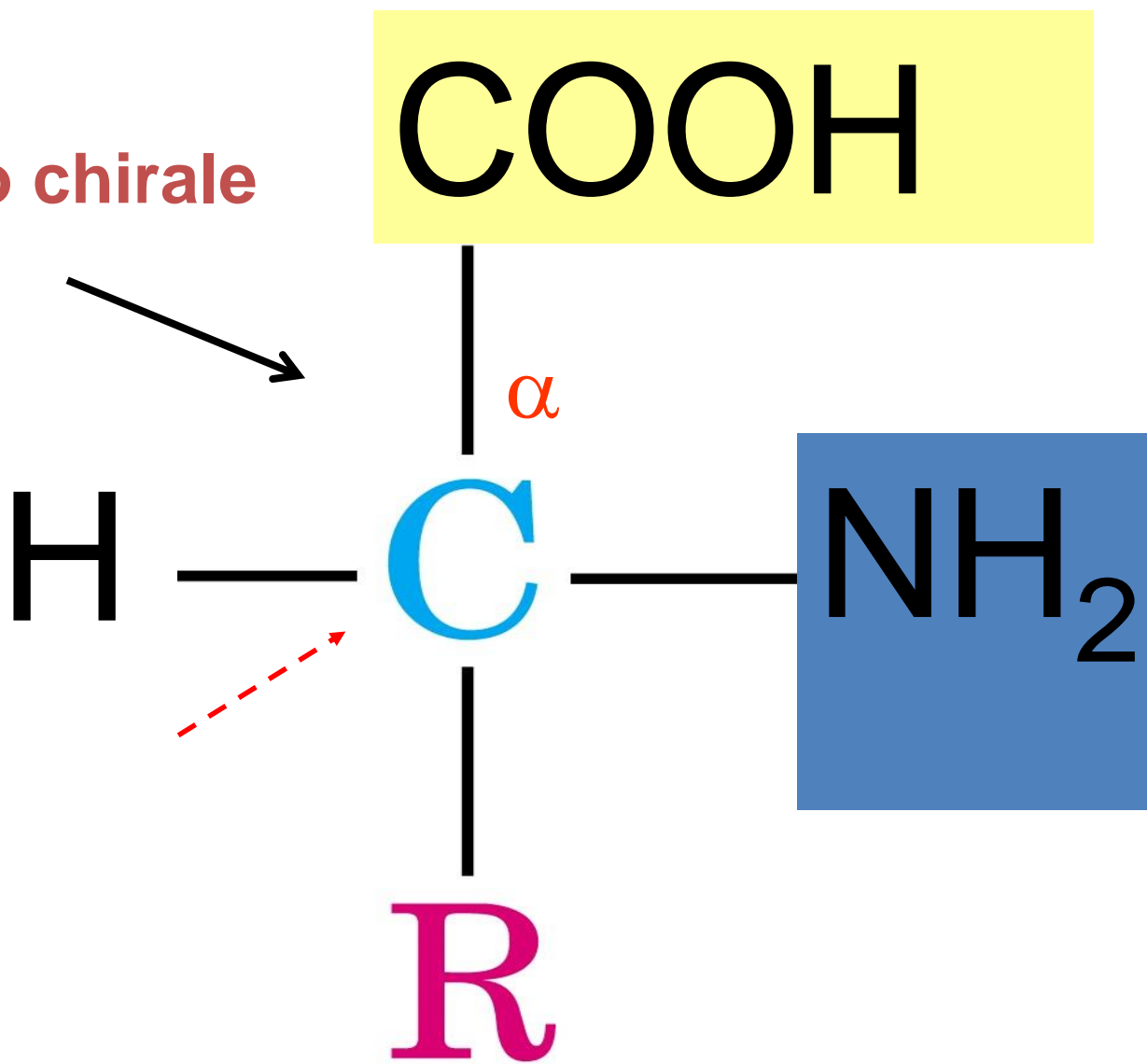
- **SOLUBILITA'**
- MASSA MOLECOLARE
- CARICA ELETTRICA
- PROPRIETA' di ADSORBIMENTO
- AFFINITA' di LEGAME ad altre biomolecole

Le proteine possono essere frazionate sulla base della loro solubilità

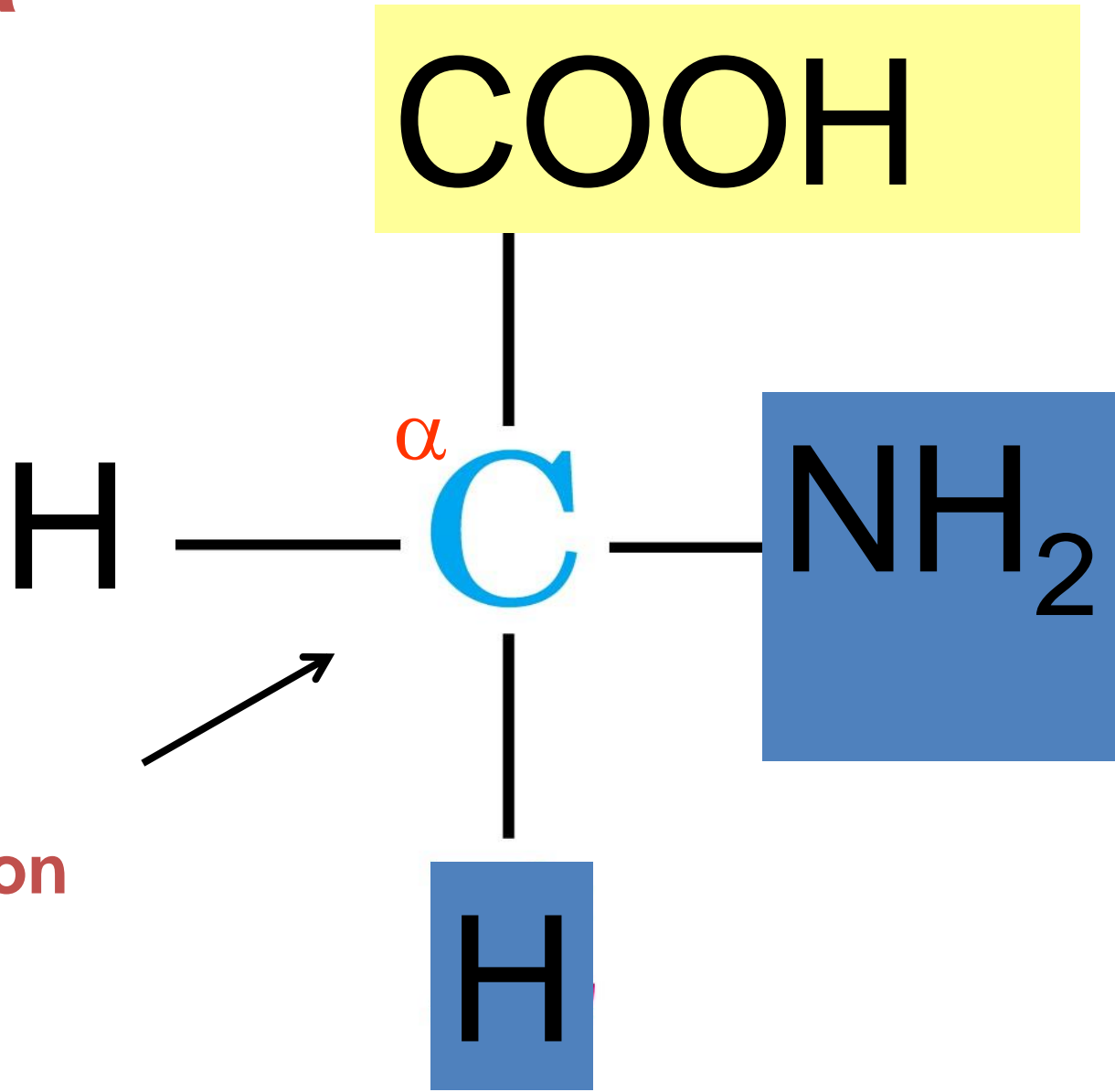
PRECIPITAZIONE

- **al variare del pH = precipitazione al punto isoelettrico**
- **al variare della temperatura = precipitazione per denaturazione al calore**
- **In presenza di solventi organici= precipitazione con solventi organici**
- **al variare della forza ionica= precipitazione frazionata con sali**

Carbonio chirale

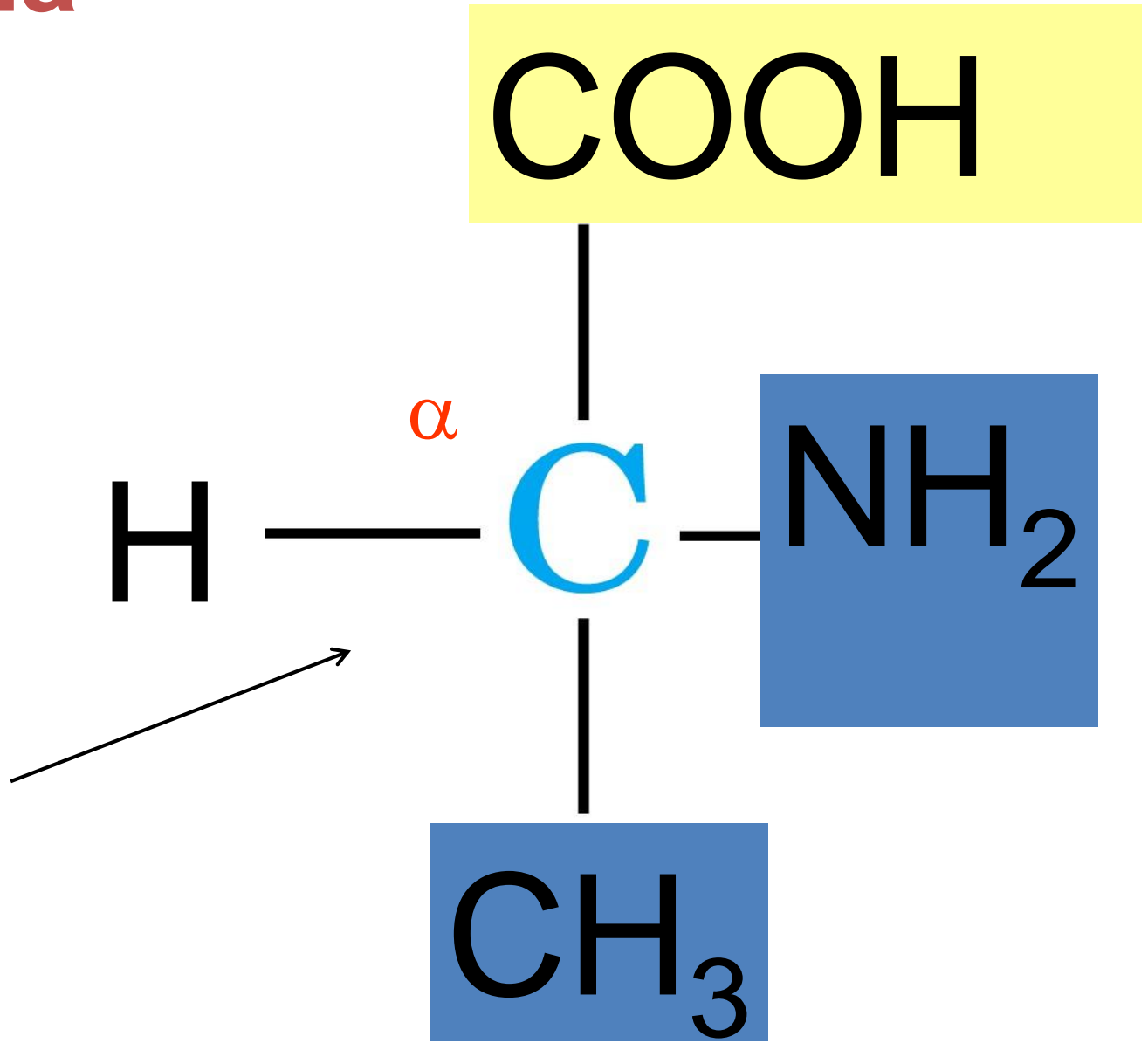


Glicina



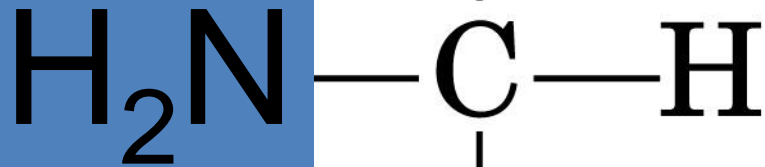
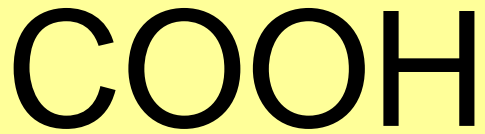
Carbonio non
chirale

Alanina

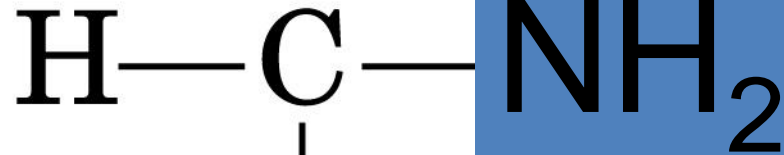
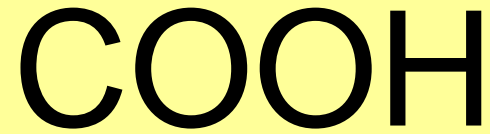


Carbonio
chirale

enantiomeri



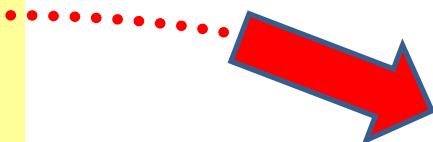
L-Alanine



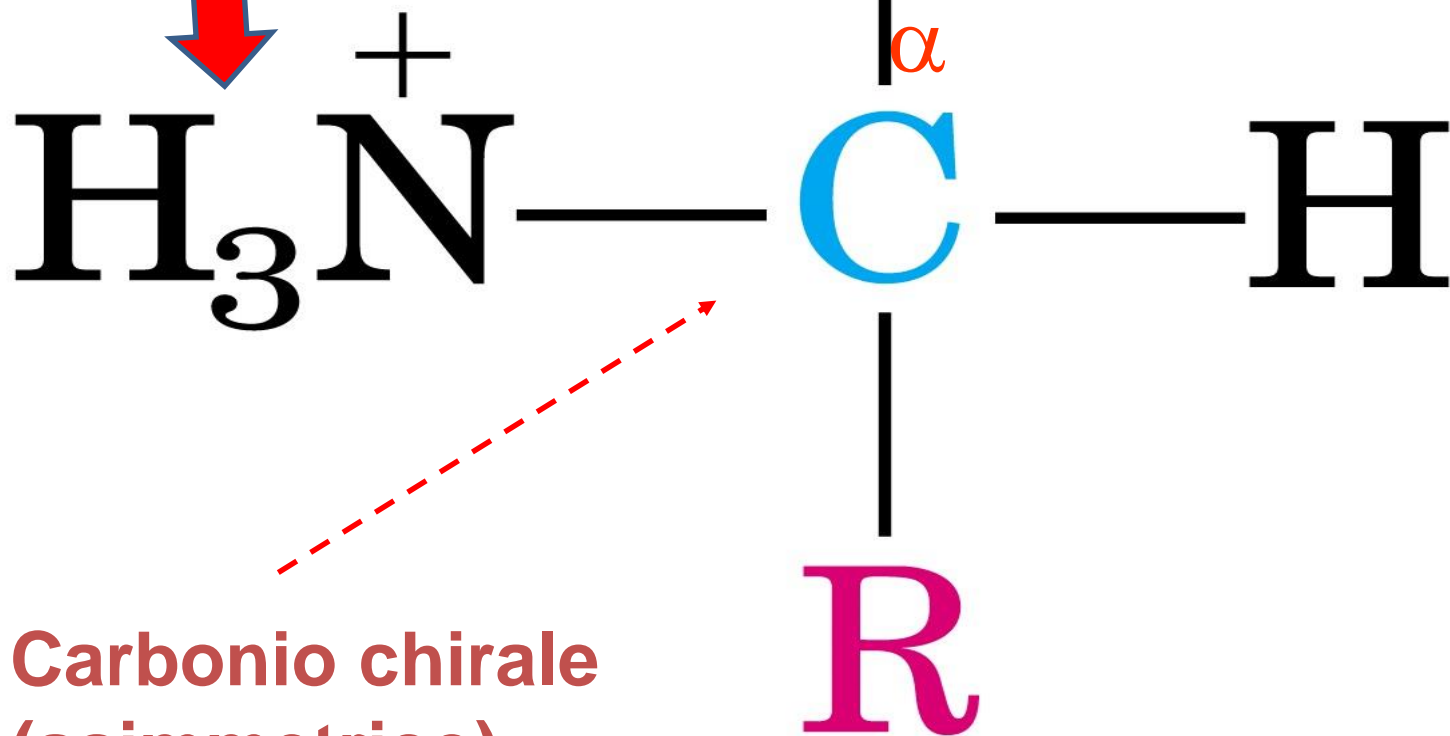
D-Alanine

(c)

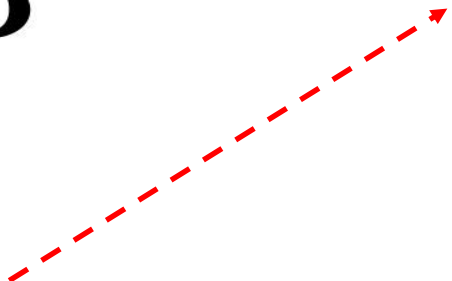
-COOH

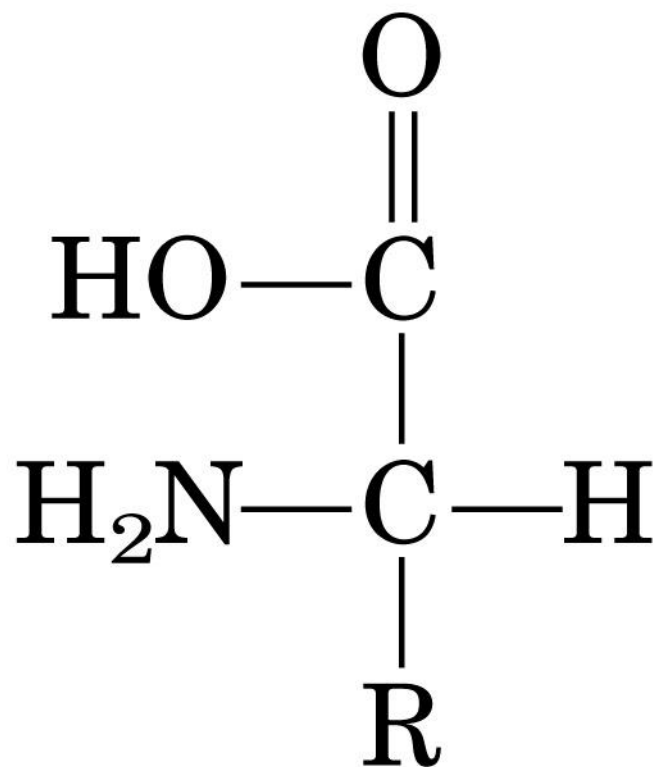


-NH₂

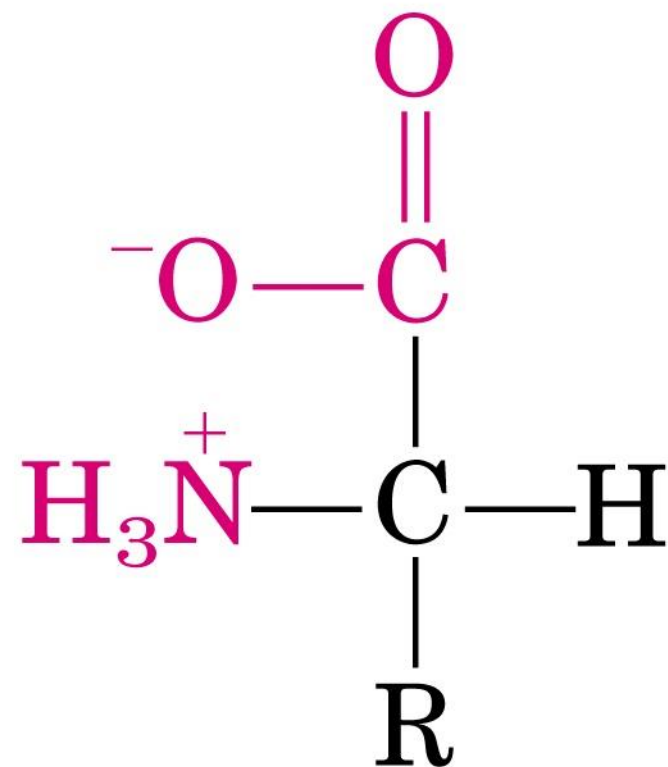


**Carbonio chirale
(asimmetrico)**



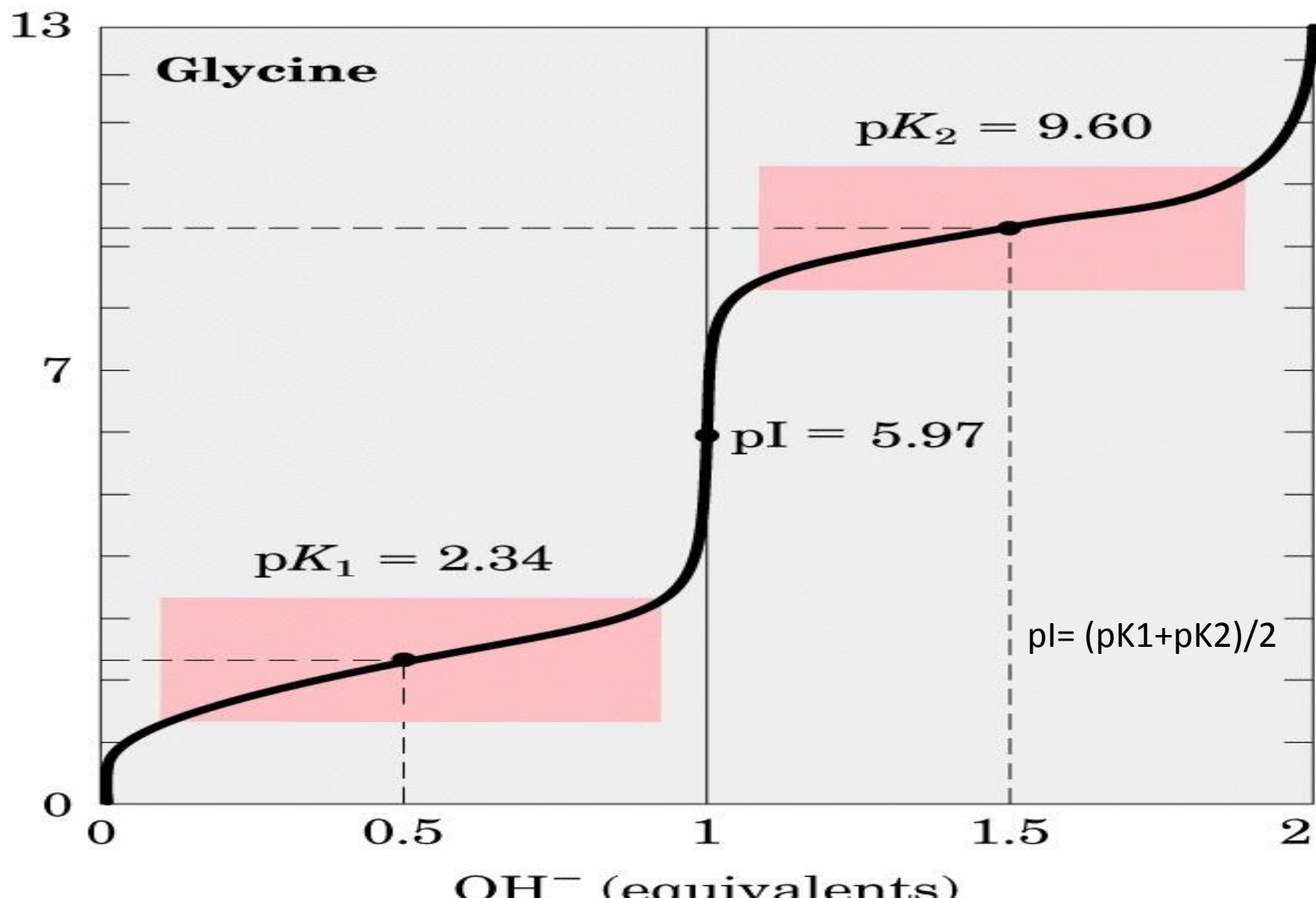
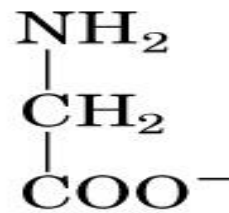
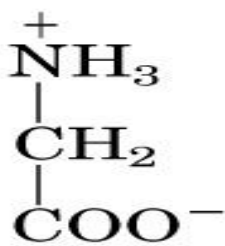
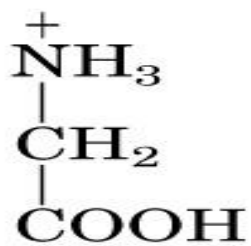


Nonionic
form



Zwitterionic
form

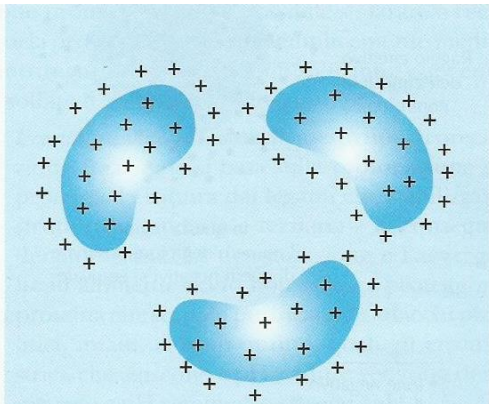
	pK _a α-COOH	pK _a α-NH ₃ ⁺	pK _a catena lat.	massa (dalton)
Alanina	2.3	9.7	-	71
Arginina	2.2	9.0	12.5	156
Asparagina	2.0	8.8	-	114
Acido aspartico	2.1	9.8	3.9	115
Cisteina	1.8	10.8	8.3	103
Glutamina	2.2	9.1	-	128
Acido glutammico	2.2	9.7	4.2	129
Glicina	2.3	9.6	-	57
Istidina	1.8	9.2	6.0	137
Isoleucina	2.4	9.7	-	113
Leucina	2.4	9.6	-	113
Lisina	2.2	9.0	10.0	128
Metionina	2.3	9.2	-	131
Fenilalanina	1.8	9.1	-	147
Prolina	2.0	10.6	-	97
Serina	2.2	9.2	-	87
Treonina	2.6	10.4	-	101
Triptofano	2.4	9.4	-	186
Tirosina	2.2	9.1	10.1	163
Valina	2.3	9.6	-	99



FRAZIONAMENTO IN BASE AL PUNTO ISOELETTRICO

Se il pH è minore
del punto isoelettrico (pI)
La proteina è carica ?

carica netta (+)



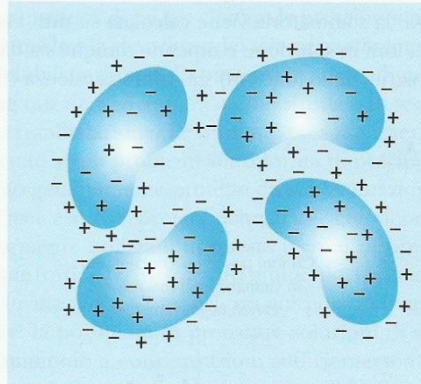
C A valori di pH inferiori al pI, le catene polipeptidiche sono protonate, quindi posseggono cariche positive che si respingono. La proteina rimane in soluzione.

PRECIPITAZIONE

$$\text{pH} = (\text{pI})$$

La proteina è carica ?

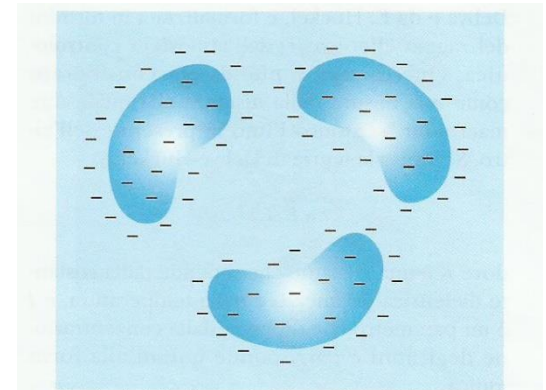
carica netta (0)



B In corrispondenza del pI, le catene polipeptidiche interagiscono tra loro e si aggregano.

Se il pH è maggiore del
punto isoelettrico (pI)
La proteina è carica ?

carica netta (-)



A A valori di pH superiori al punto isoelettrico (pI), le catene polipeptidiche sono deprotonate, quindi posseggono cariche negative che si respingono. La proteina rimane in soluzione.

Si basa sulla minore solubilità delle molecole proteiche a valori di pH pari al loro punto isoelettrico

A tale valore di pH una proteina possiede un numero uguale di cariche positive e negative, per cui risultano minimi gli effetti repulsivi e massime le interazioni intermolecolari, le quali determinano la formazioni di **aggregati insolubili**

FRAZIONAMENTO IN BASE AL PUNTO ISOELETTTRICO

- ❖ **SVANTAGGIO:** la proteina precipitata spesso subisce denaturazione
- ❖ Tale metodica dovrebbe essere usata per precipitare (e quindi) rimuovere le proteine contaminanti, e non la proteina in esame
- ❖ Può essere utilizzata con buoni risultati se la proteina di interesse possiede un pI molto diverso da quello della maggior parte delle proteine cellulari

Se non si conosce il pH della proteina di interesse è necessario determinarlo in un esperimento pilota su piccola scala

Tabella 5.1 Punti isoeletrici di alcune proteine comuni

<i>Proteina</i>	<i>pH isoeletrico</i>
Pepsina	< 1,0
Ovalbumina (pollo)	4,6
Albumina del siero (umano)	4,9
Tropomiosina	5,1
Insulina (bovina)	5,4
Fibrinogeno (umano)	5,8
γ -globulina (umana)	6,6
Collagene	6,6
Mioglobina (cavallo)	7,0
Emoglobina (umana)	7,1
Ribonucleasi A (bovina)	7,8
Citocromo c (cavallo)	10,6
Istone (bovino)	10,8
Lisozima (pollo)	11,0
Salmina (salmone)	12,1

FRAZIONAMENTO IN BASE AL PUNTO ISOELETTRICO

Si basa sulla minore solubilità delle molecole proteiche a valori di pH pari al loro punto isoelettrico

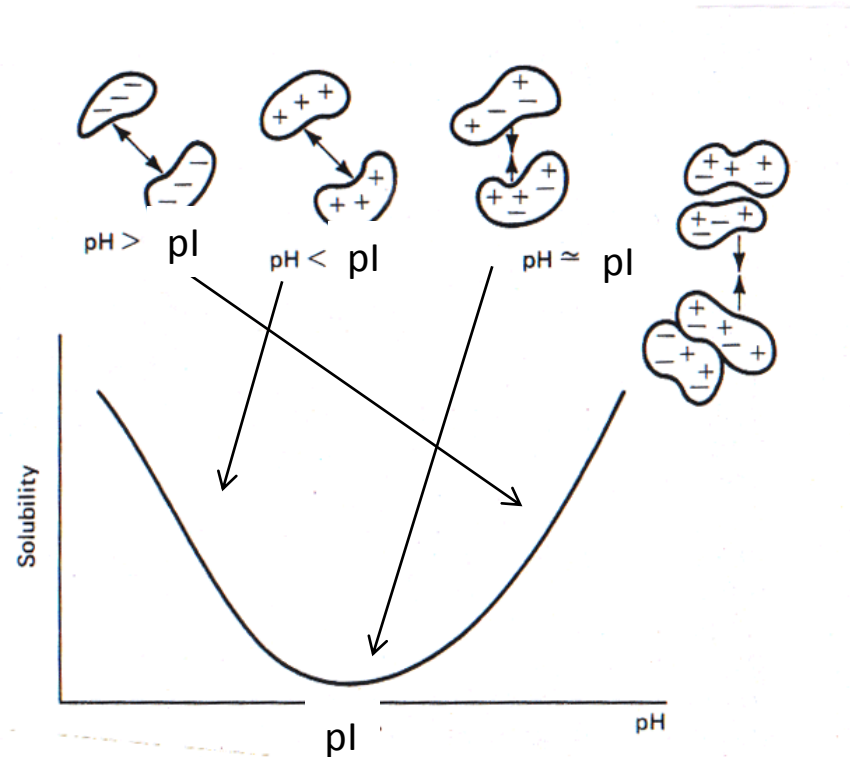


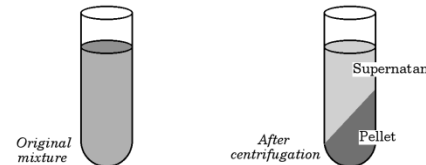
Figure 4.3. Solubility of a globulin-type protein close to its isoelectric point

FRAZIONAMENTO PER PRECIPITAZIONE al calore

- ❖ Si basa sulla differente sensibilità alla temperatura delle proteine
- ❖ Il calore denatura le proteine che perdono la loro struttura terziaria, esponendo residui idrofobici che nello stato nativo sono nel core proteico e causa la formazione di aggregati
- ❖ La temperatura alla quale una data proteina va incontro a precipitazione (**temperatura critica**) è determinata in un esperimento pilota su piccola scala
- ❖ Una volta determinata la temperatura critica, le proteine contaminanti termolabili sono allontanate scaldando la miscela ad una temperatura di 5-10°C al di sotto della temperatura critica, per 30-60 minuti

❖ Le proteine denaturate con questo processo sono rimosse per centrifugazione

Precipitazione
IRREVERSIBILE



Metodica analitica x localizzare la proteina