

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](mailto: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.

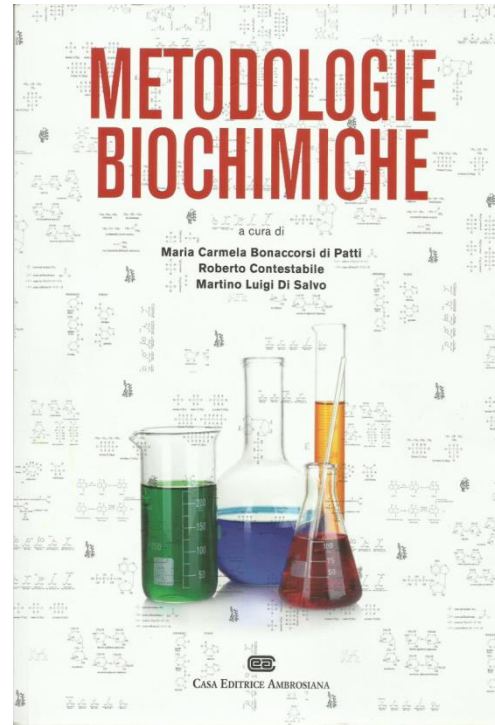
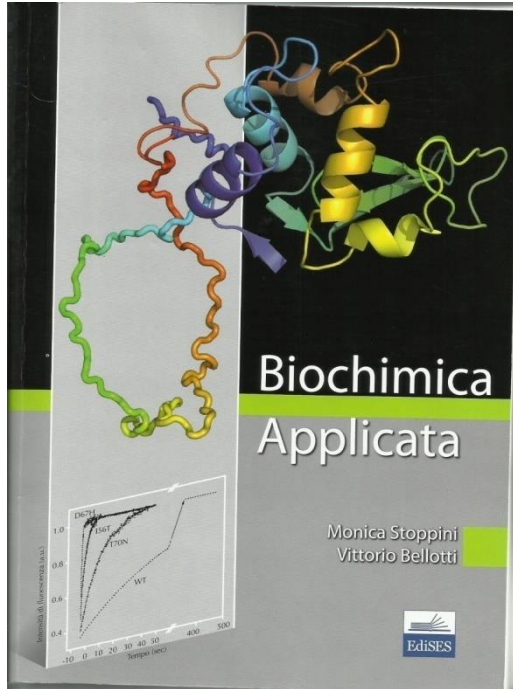
E' inoltre vietata la redistribuzione e la pubblicazione dei contenuti e immagini non autorizzate espressamente dall'autore.

**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

# Metodi di lisi cellulare

Tecnica	Applicazione
<b>Metodi non meccanici</b>	
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
<b>Metodi meccanici</b>	
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

# 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:

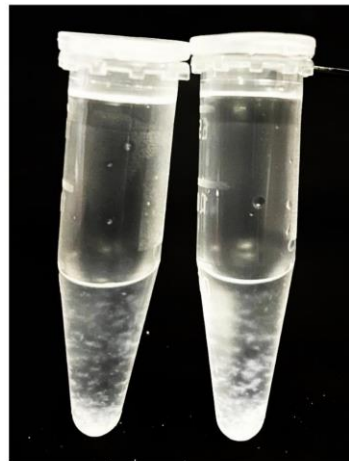
- **SOLUBILITA'**
- MASSA MOLECOLARE
- CARICA ELETTRICA
- PROPRIETA' di ADSORBIMENTO
- AFFINITA' di LEGAME ad altre biomolecole

Le proteine  
possono essere  
frazionate sulla  
base della loro  
**solubilità** in  
diverse  
condizioni  
sperimentali

## 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

A)



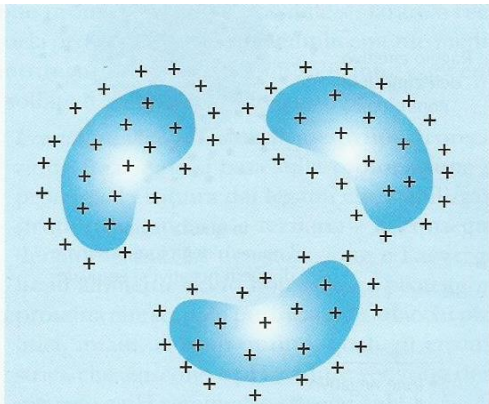
B)



# FRAZIONAMENTO IN BASE AL PUNTO ISOELETTRICO

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

**carica netta (+)**



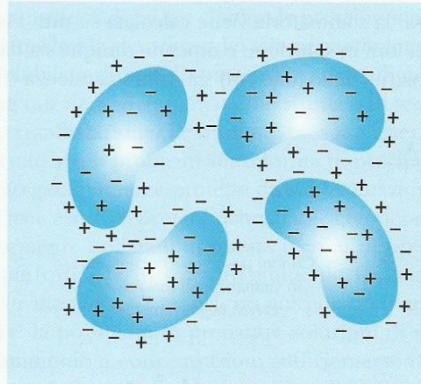
C A valori di pH inferiori al pI, le catene polipeptidiche sono protonate, quindi posseggono cariche positive che si respingono. La proteina rimane in soluzione.

## PRECIPITAZIONE

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

La proteina è carica ?

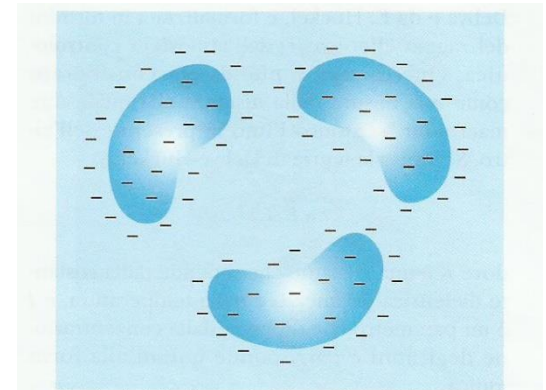
**carica netta (0)**



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
$\gamma$ -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

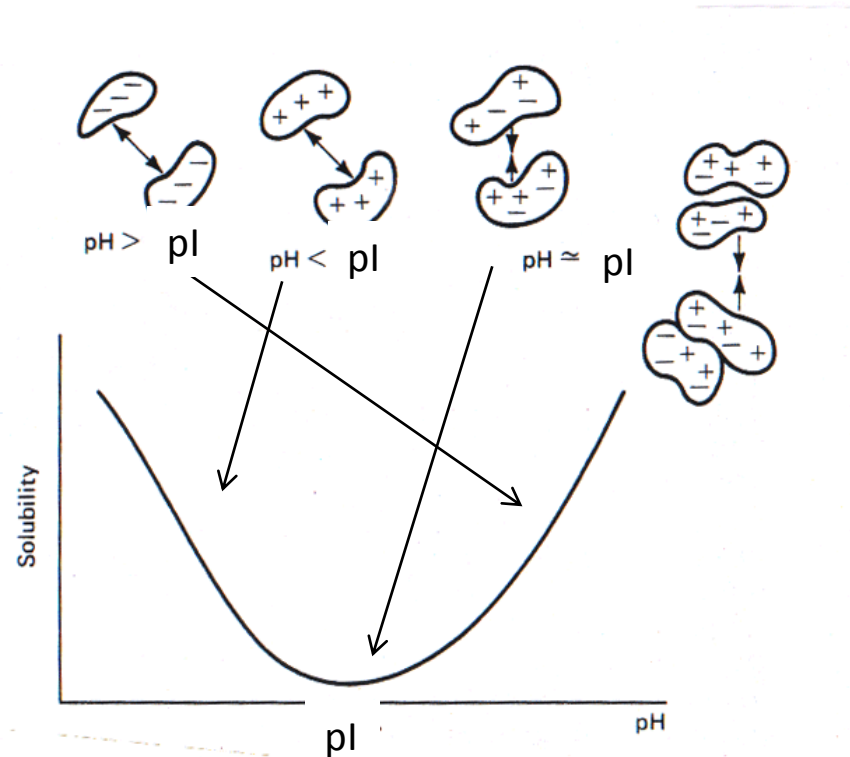


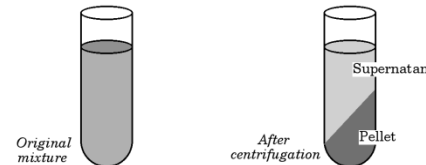
Figure 4.3. Solubility of a globulin-type protein close to its isoelectric point

# 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**

## Frazionamento con solventi organici.

- Sfrutta la **differente solubilità** delle proteine in soluzione miste acqua-solventi organici

Metanolo

Etanolo

Acetone

Butanolo

-tutti alcoli solubili in acqua

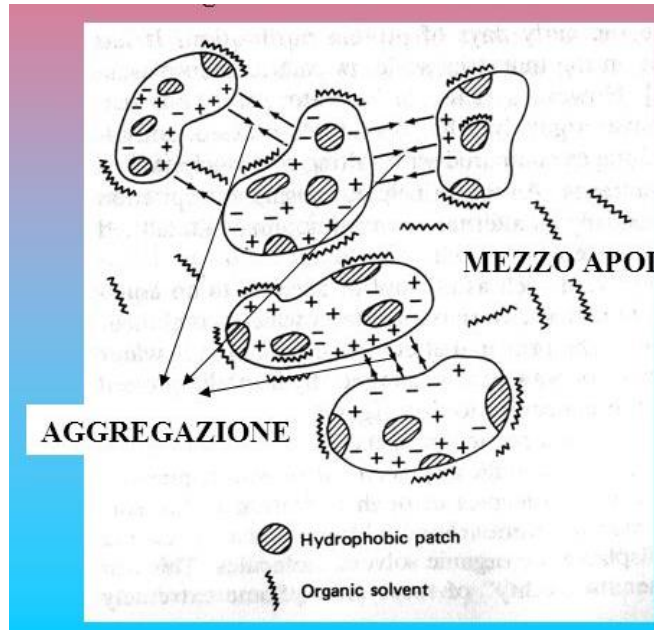
## Frazionamento con solventi organici.

- Il solvente organico altera il processo di solvatazione delle proteine.

- Compete con la proteina per il legame con l'acqua.

Favorisce le interazioni elettrostatiche proteina-proteina a discapito di quella proteina-acqua.

# Frazionamento con solventi organici.



Solventi organici:

- L'acqua di solvatazione viene rimossa dai gruppi carichi e polari sulla superficie delle proteine e quindi le proteine precipitano.

**Aumenta l'interazione tra AA che posseggono carica opposta e che si trovano sulla superficie della molecola, favorendo l'aggregazione e la precipitazione.**

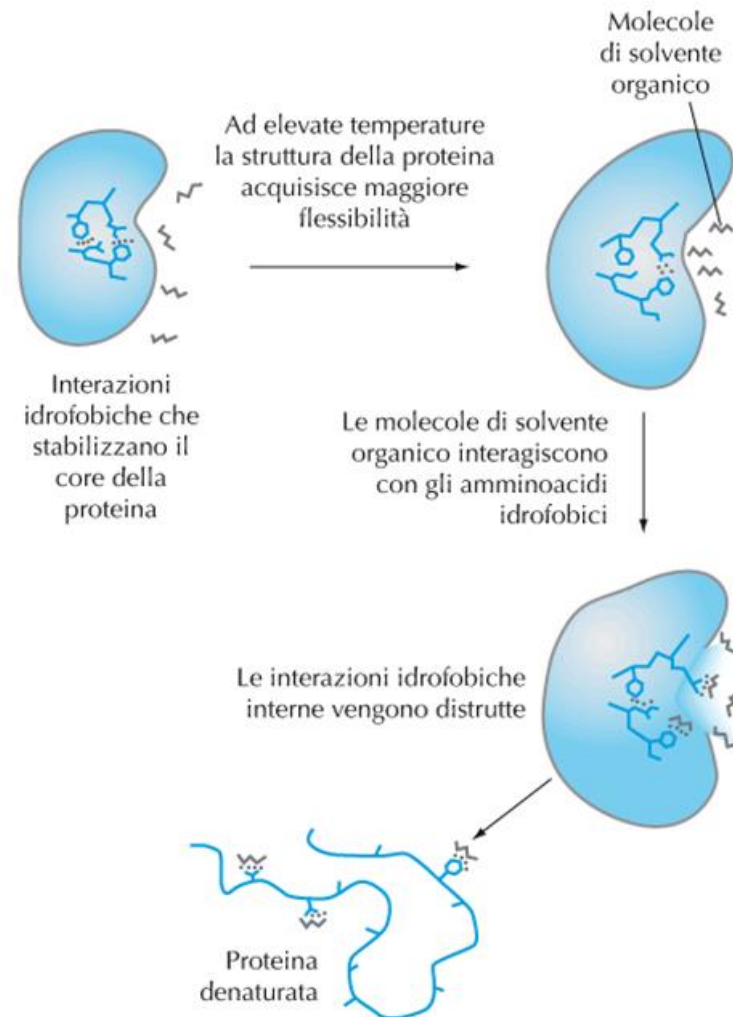
## Concentrazione del solvente organico

Proteine di **grandi dimensioni** precipitano a **basse** concentrazioni di solvente organico

Proteine di **piccole dimensioni** precipitano ad **alte concentrazioni** di solvente organico

In ordine crescente a seconda del n° di gruppi carichi presenti sulla loro superficie mentre aumenta la concentrazione di solvente organico.

Il problema con l'uso dei solventi organici è che si ha in genere un certo grado di **denaturazione proteica** (maggiore a temperature più alte)



**Figura 3.10** Denaturazione di una proteina ad opera di un solvente organico.

# Precipitazione frazionata con i sali

I Sali influenzano la solubilità delle proteine

Interagiscono con i residui carichi sulla superficie delle proteine

Basse concentrazioni di Sali



Aumentano la solubilità della proteina

(salting in)

gli ioni del sale mascherano i gruppi carichi della proteina e diminuisce l'attrazione tra molecole;

Promuovono le interazioni proteina-solvente

Alte concentrazioni di Sali

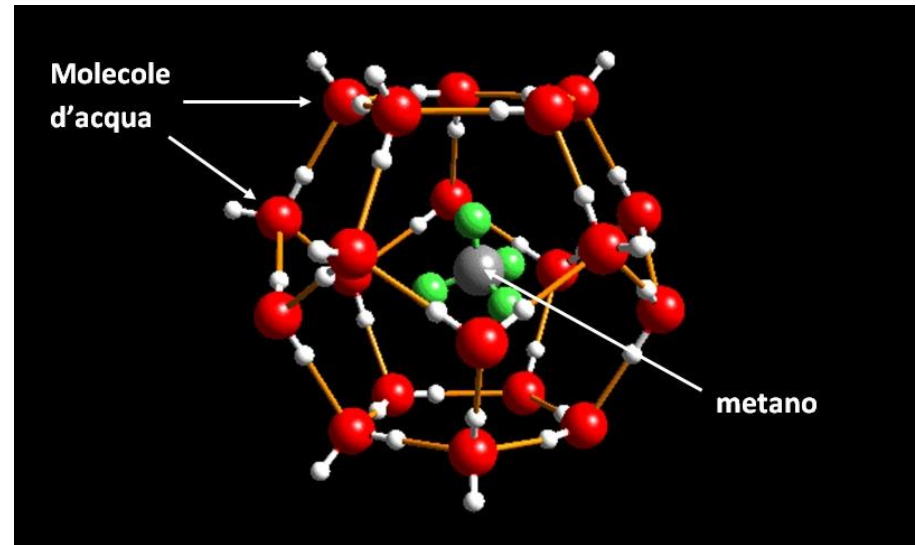
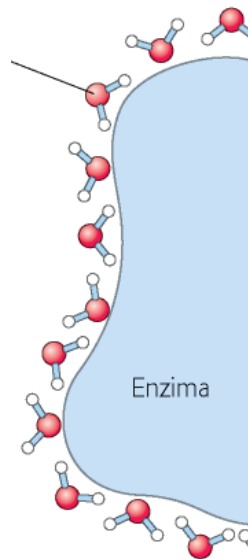


Diminuiscono la solubilità della proteina

(salting out)

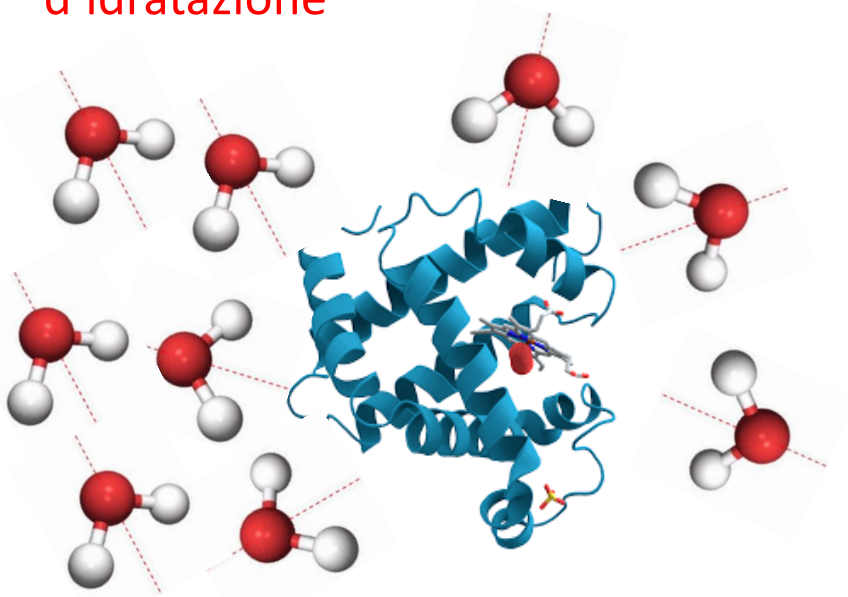
Competizione per le molecole d'acqua di idratazione tra il sale e le proteine

L'acqua interagisce con i **gruppi idrofilici** delle proteine mediante legami idrogeno



L'acqua vicino ai **gruppi idrofobici** forma strutture molto ordinate chiamate «clatrati»: strutture poliedriche di molecole d'acqua, legate tra di loro da legami idrogeno, con una cavità centrale che racchiude la molecola apolare

→ le reg. idrofobiche sono le prime a perdere le molecole d'acqua d'idratazione

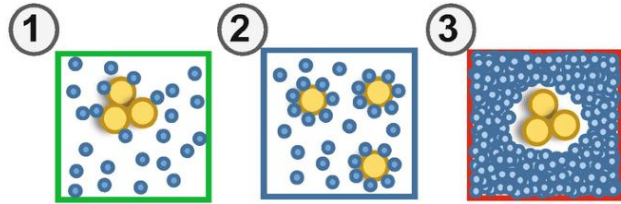


I gruppi idrofobici superficiali possono quindi interagire tra loro → fenomeni di **aggregazione e precipitazione delle proteine**

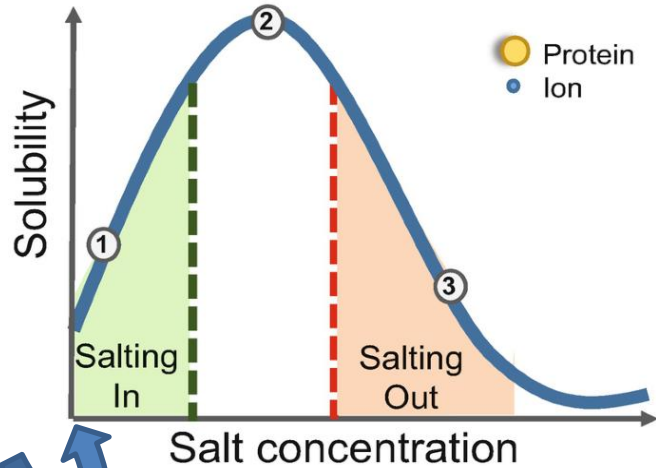
Le proteine **molto idrofobiche** precipitano a bassa concentrazione di sali

Le proteine **meno idrofobiche** precipitano ad alte concentrazione di sali

# Precipitazione frazionata con i sali



Competizione tra gli ioni del sale aggiunti e le proteine per le molecole **d'acqua d'idratazione**



**Salting out:** ad elevate forze ioniche la solubilità delle proteine diminuisce all'aumentare della forza ionica,

**forza ionica**  $I = 1/2 \sum M \cdot z^2$

## **Salting in:**

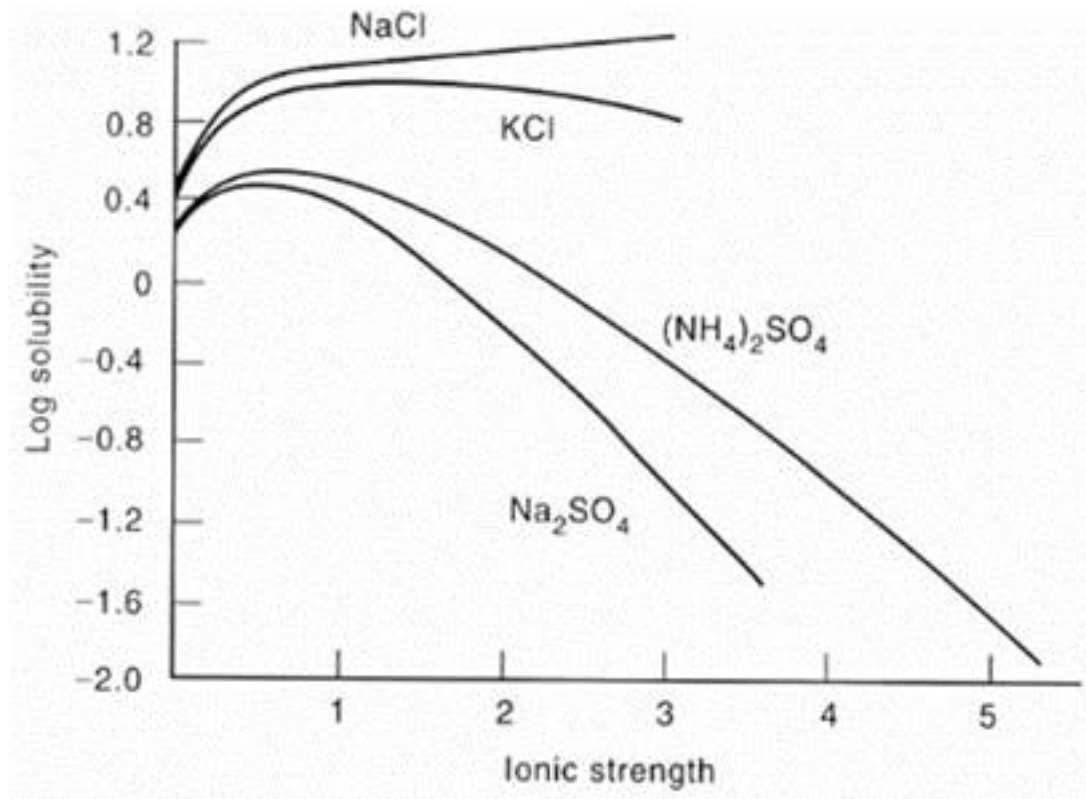
a bassa forza ionica **L'AGGIUNTA DEL SALE** provoca un aumento di **SOLUBILITA'**

gli ioni del sale mascherano i gruppi carichi della proteina e impediscono la formazione di aggregati proteici

-ioni monovalenti (NaCl) la concentrazione coincide con la forza ionica

-ioni multivalenti (Mg<sup>2+</sup>):  $I > M$

## Precipitazione frazionata con i sali

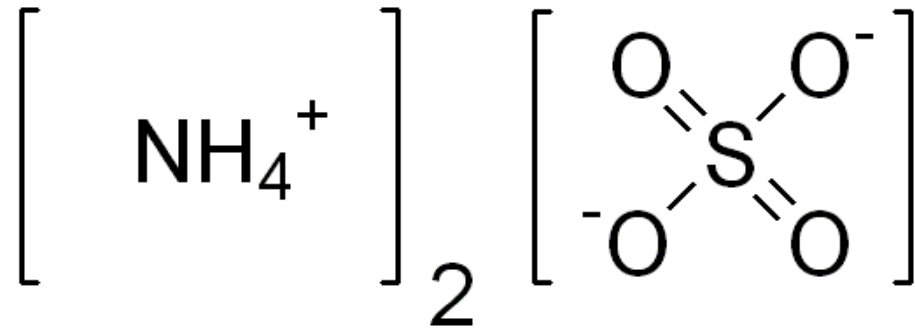
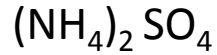


Solubilità della proteina nella soluzione salina

L'effetto del sale dipende dal tipo di sale, dalla concentrazione del sale ( forza ionica)

# Precipitazione frazionata con solfato d'ammonio

SOLFATO di AMMONIO



- È molto solubile (3.9M) → elevate forze ioniche **forza ionica**  $I = 1/2 \sum c \cdot z^2$
- È disponibile ad elevato grado di purezza
- Non altera la struttura delle proteine
- **Precipitazione reversibile**
- **Economicamente conveniente**
- **Batteriostatica**

Esempio: - Precipitazione al 25% :

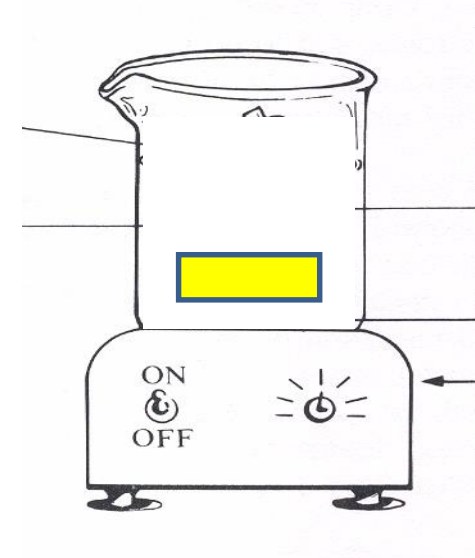
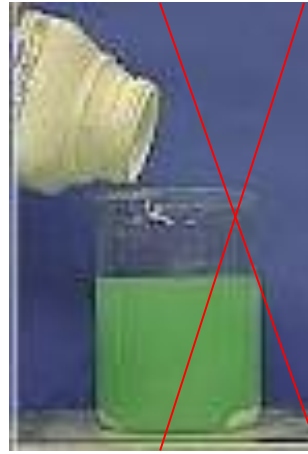
		Saturazione percentuale finale da ottenere																
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
Saturazione percentuale di partenza		Quantità di ammonio solfato da aggiungere (grammi) per litro di soluzione a 20° C																
0	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761	
5	85	115	146	179	212	246	282	319	358	397	439	481	526	572	621	671	723	
10	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685	
15	28	58	88	119	151	185	219	255	293	331	371	413	456	501	548	596	647	
20	0	29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609	
25		0	29	60	91	123	157	191	228	265	304	344	386	429	475	522	571	
30			0	30	61	92	125	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533	
35				0	30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495	
40					0	31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457	
45						0	31	64	98	132	169	206	245	286	329	373	419	
50							0	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381	
55								0	33	66	101	138	175	215	256	298	343	
60									0	33	67	103	140	179	219	261	305	
65										0	34	69	105	143	183	224	267	
70											0	34	70	107	146	186	228	
75												0	35	72	110	149	190	
80													0	36	73	112	152	
85														0	37	75	114	
90															0	37	76	
95																0	38	

144 grammi/L

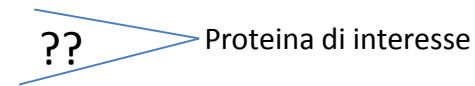
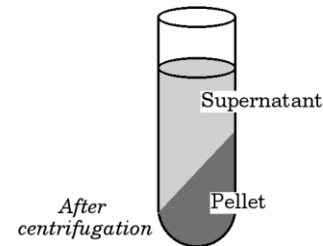
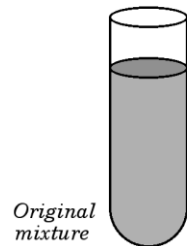
Esempio: - Precipitazione al 60%:

		Saturazione percentuale finale da ottenere																
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
Saturazione percentuale di partenza		Quantità di ammonio solfato da aggiungere (grammi) per litro di soluzione a 20° C																
0		113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5		85	115	146	179	212	246	282	319	358	397	439	481	526	572	621	671	723
10		57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15		28	58	88	119	151	185	219	255	293	331	371	413	456	501	548	596	647
20		0	29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25			0	29	60	91	123	157	191	228	265	304	344	386	429	475	522	571
30				0	30	61	92	125	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35					0	30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40						0	31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45							0	31	64	98	132	169	206	245	286	329	373	419
50								0	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55									0	33	66	101	138	175	215	256	298	343
60										0	33	67	103	140	179	219	261	305
65											0	34	69	105	143	183	224	267
70												0	34	70	107	146	186	228
75													0	35	72	110	149	190
80														0	36	73	112	152
85															0	37	75	114
90																0	37	76
95																	0	38

228 grammi/L



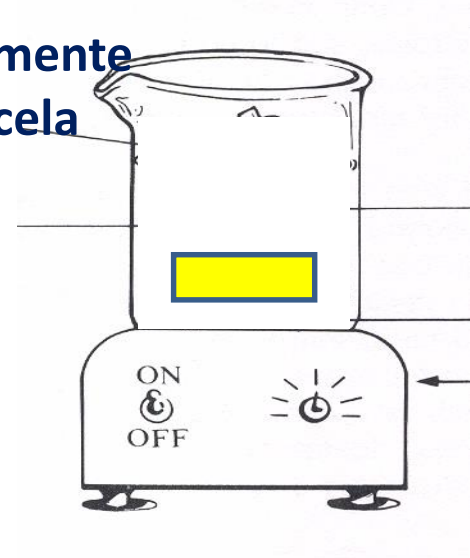
1. Si aggiunge il sale alla soluzione proteica **in agitazione** sino a raggiungere la **saturation** desiderata
2. Si centrifuga il campione



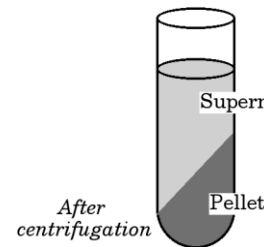
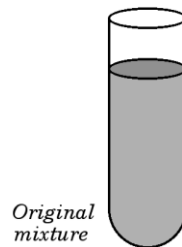
3. Si utilizza una tecnica analitica per verificare localizzazione della proteina di interesse nel precipitato o nel supernatante
  - A) proteina nel pellet: si recupera e si procede con un altro step
  - B) proteina nel supernatante: si recupera e si aumenta la % di Solfato d'ammonio



**Precipitazione frazionata:** si aumenta la forza ionica (I) gradualmente per precipitare in tempi diversi le diverse proteine della miscela



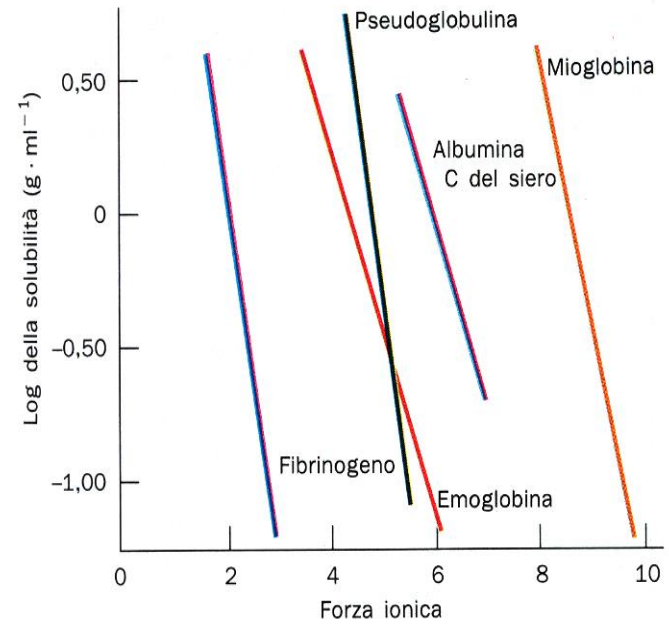
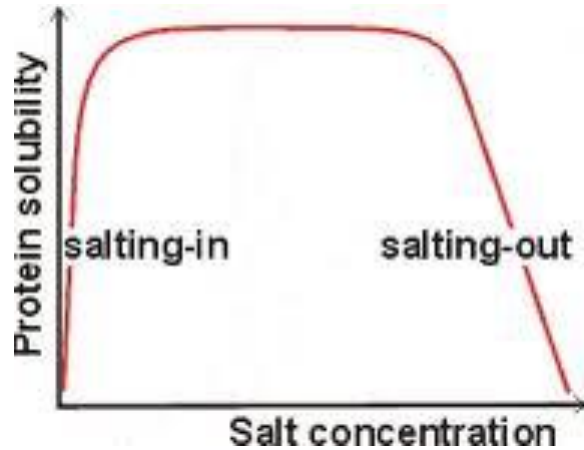
1. Si aggiunge il sale alla soluzione proteica **in agitazione** sino a raggiungere la  **saturazione**  desiderata
2. Si centrifuga il campione



??

Proteina di interesse

3. Si utilizza una tecnica analitica per verificare localizzazione della proteina di interesse nel precipitato o nel supernatante



**Figura 5.2** Solubilità di alcune proteine in soluzioni di ammonio solfato. (Fonte: COHN, E.J. e EDSALL, J.T., *Proteins, amino acids and peptides*, p. 602, Academic Press, 1943.)

Una proteina con un maggior numero di regioni idrofobiche superficiali precipita a forza ionica più bassa

# Frazionamento con i Sali

## Vantaggi:

- Tecnica di separazione adatta ai **passaggi preliminari** del protocollo di purificazione (alta capacità: lavora con grossi volumi di campione)
- Riduzione di volume (**in caso di utilizzo del pellet**)
- Allontanamento di **Contaminanti** con  $\neq$  solubilità
- Ha attività batteriostatica

## Svantaggi:

- **Bassa Risoluzione:** non è possibile purificare una proteina utilizzando esclusivamente questa tecnica

## IMPORTANTE

### ELIMINARE IL SOLFATO D'AMMONIO

(una alta forza ionica «impedisce» una corretta purificazione con le tecniche cromatografiche)

- 1) DIALISI (per grossi volumi di campione)
- 2) ULTRAFILTRAZIONE: Amicon o Centricon (per piccoli volumi)

# Dialisi

- Sfrutta le grandi dimensioni delle proteine
- Si utilizza un sacchetto o tubo da dialisi (membrana semipermeabile)

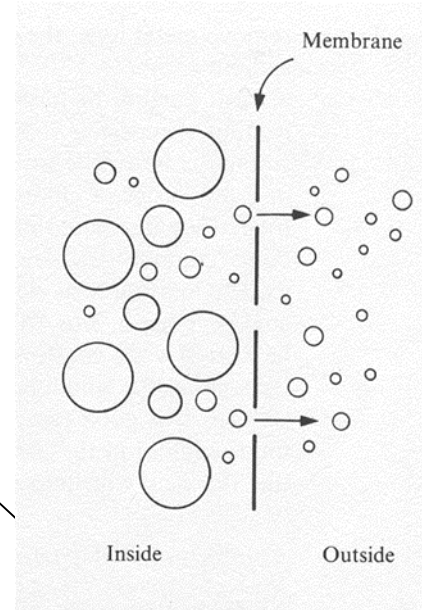
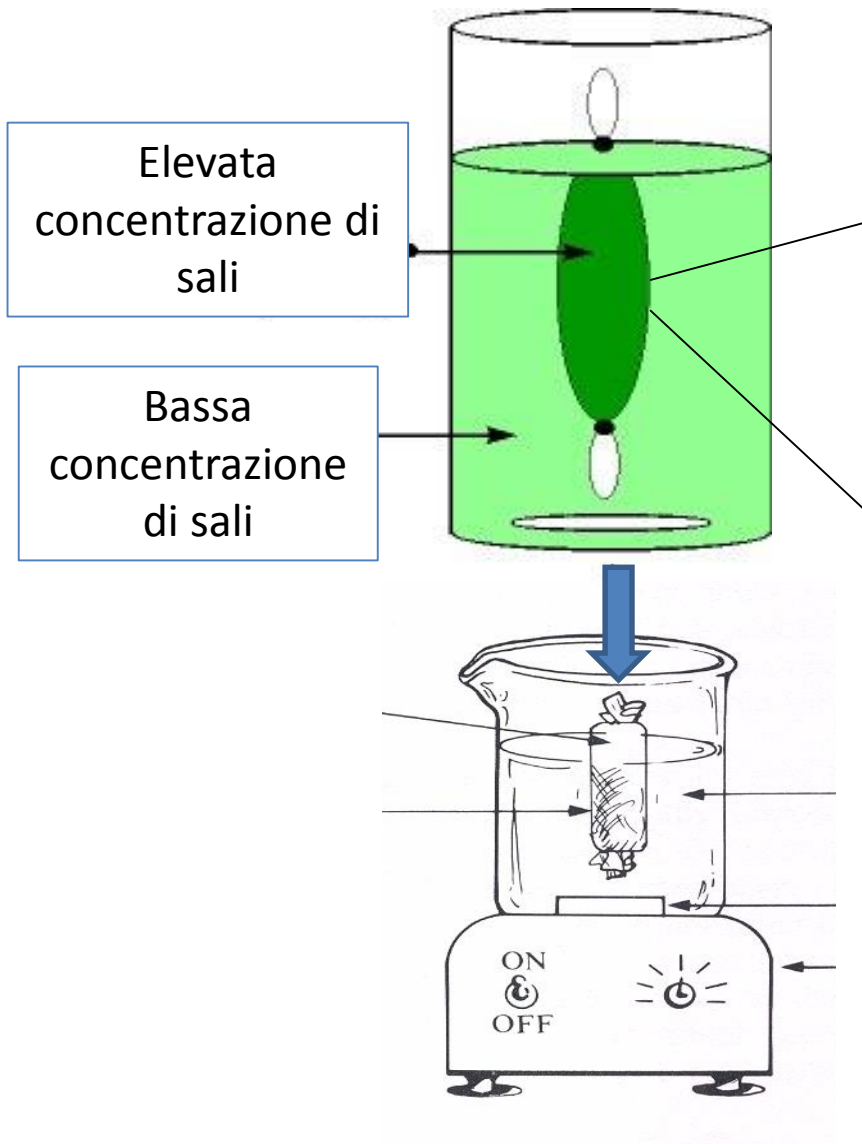


**Tampone (forza ionica appropriata)**

**Permette di rimuovere soluti a basso PM (sali, ad es.)**

**Viene utilizzata ad esempio per rimuovere il solfato d'ammonio dalla soluzione**

# Dialisi



## Accorgimenti:

- Scelta della membrana con opportuno Cut- Off
- Bollire e sciacquare la membrana (condizionamento)
- Non riempire troppo la membrana
- Utilizzare grossi volumi di solvente
- Mantenere in agitazione
- Cambiare più volte il solvente

<https://www.youtube.com/shorts/lo0Ykuw696k?feature=share>

# ULTRAFILTRAZIONE

Filtrazione sotto pressione attraverso una permeabile (piatta o conica). È una tecnica di su differenza di dimensioni e di peso molecolare: **membrana con opportuno Cut- Off**

Ad una soluzione adiacente ad una membrana applicata una pressione maggiore e opposta alla osmotica. RITENUTO PERMEATO (FILTRATO)

## Microcon 0.5 ml



## Centricon 15 ml

## Centriprep 50 ml

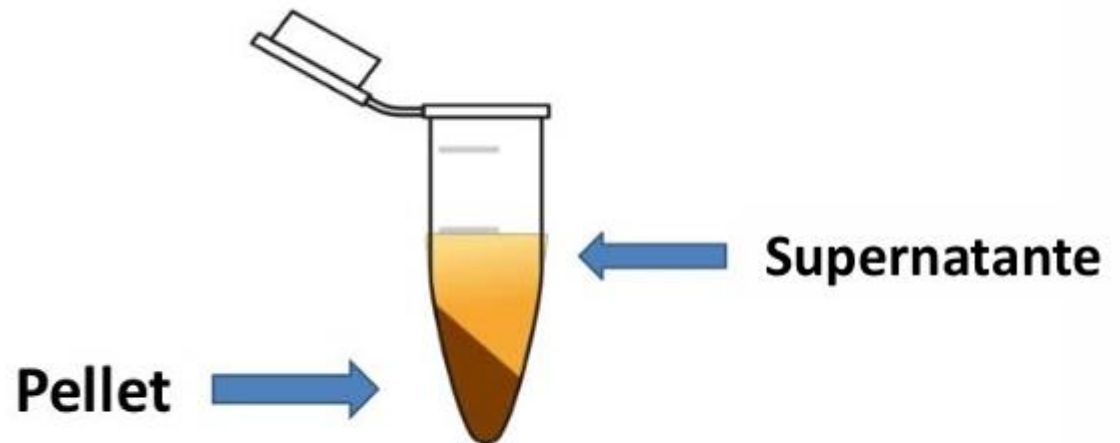


# PRINCIPI DELLA CENTRIFUGAZIONE

Una particella sottoposta ad un campo centrifugo tende a sedimentare

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

1. sedimento (pellet)
2. supernatante (supernatante)



# LO SCOPO DELLE TECNICHE CENTRIFUGATIVE

ESERCITARE SULLE PARTICELLE UNA **FORZA MAGGIORE  
RISPETTO** A QUELLA ESERCITATA DAL CAMPO  
GRAVITAZIONALE TERRESTRE

AUMENTARE LA LORO VELOCITÀ DI SEDIMENTAZIONE.

# La velocità di sedimentazione dipende dal campo centrifugo (G) applicato

$$G = \omega^2 r$$

$\omega$  = velocità angolare del rotore (angoli radianti al secondo rad/sec)

$r$  = distanza della particella dall'asse di rotazione

Numero di giri o rivoluzioni per minuto (rpm)

**RCF (g)**  **RPM**



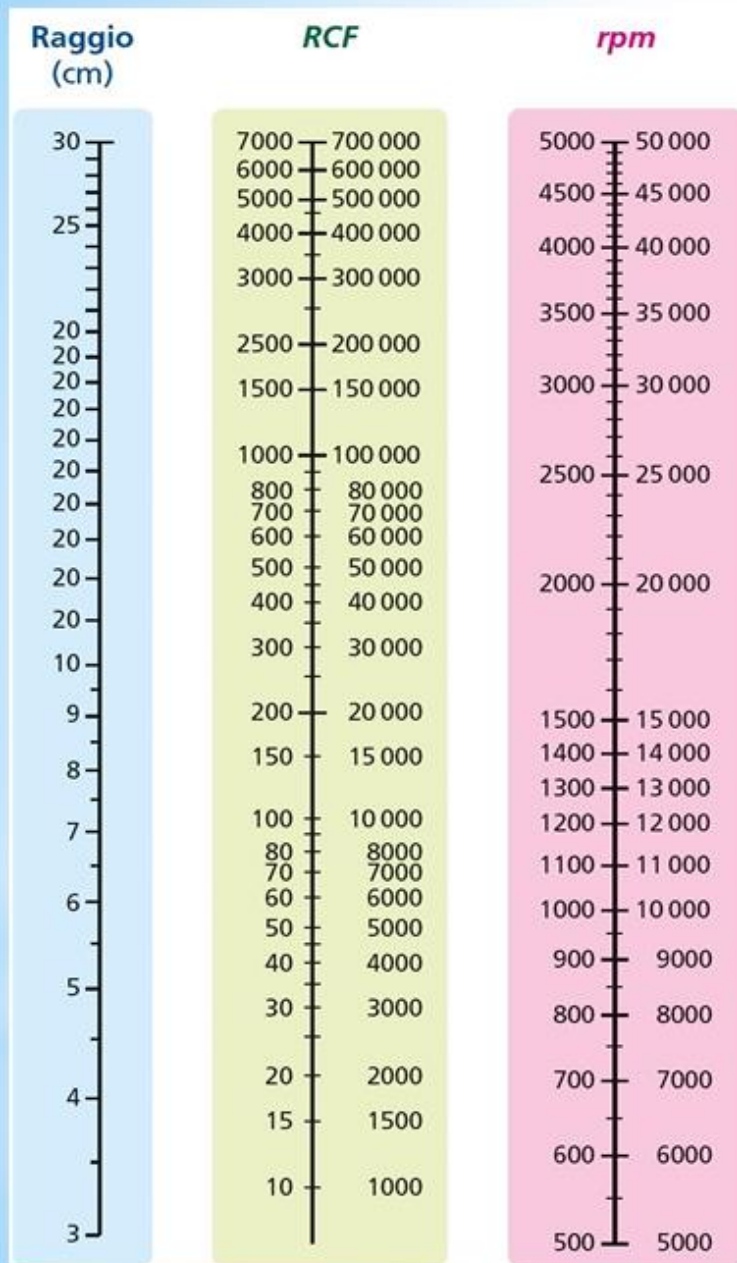
La forza di sedimentazione sviluppata artificialmente dalla centrifuga viene chiamata **RCF** (**Relative Centrifugal Force**) e viene indicata con un numero che rappresenta un multiplo della forza di gravità terrestre "x g".

Il rapporto esistente tra la RCF , le **rotazioni per minuto (rpm)** sviluppate dalla macchina ed il raggio del rotore (**r**), è descritto dalla seguente equazione:



The image shows a yellow rectangular box containing a mathematical equation. The equation is 
$$\sqrt{\frac{RCF}{1.118 \times 10^{-6} (\text{Radius in mm})}} = \text{RPM}$$
 An upward-pointing black arrow is positioned below the denominator of the fraction, pointing to the text "Equazione di conversione" which is written in bold black font below the arrow.

Le ditte costruttrici forniscono opportuni normogrammi di riferimento dai quali è possibile dedurre per ogni rotore ed in modo rapido e diretto, la conversione tra rpm ed RCF .



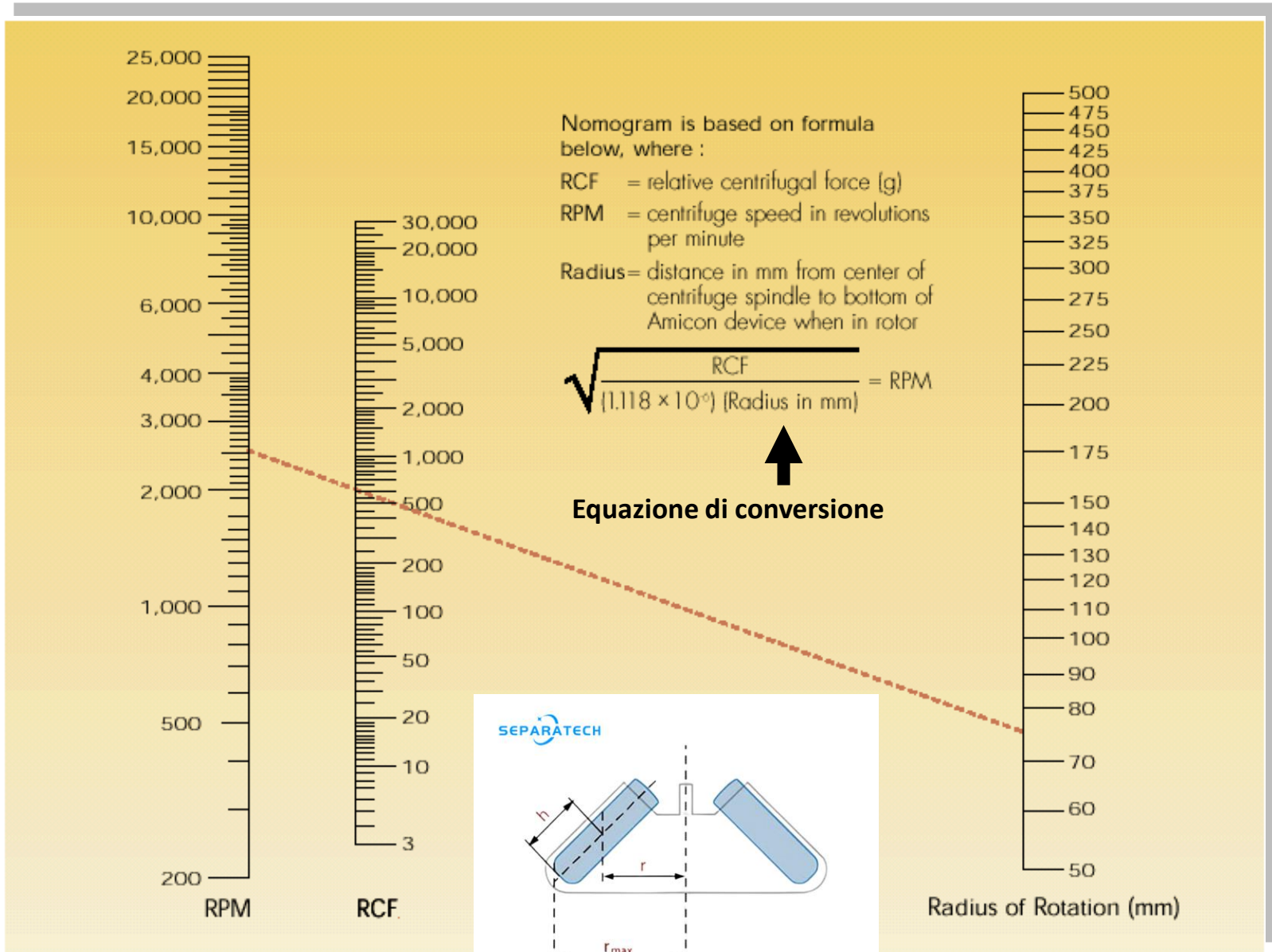
**Figura 5.1**

Nomogramma. Si noti che unendo con una retta un valore del raggio del rotore con uno degli *rpm*, viene individuato un solo valore di *RCF*.

- ❖ Il campo centrifugo relativo è una misura di quante volte il campo centrifugo è superiore al campo gravitazionale.
- ❖ Maggiore è la forza centrifuga, minore è il tempo di separazione.

# NOMOGRAMMA:

## Relazione tra RCF (campo centrifugo relativo:g) e RPM (rivoluzioni per minuto)



Le tecniche centrifugative sono utilizzate per la separazione di tutti i tipi di particelle sulla base delle loro proprietà di sedimentazione (dimensioni, densità e forma delle particelle)

Le tecniche centrifugative possono suddividersi in:

### Preparative e Analitiche:

1. La centrifugazione **preparativa** permette di separare e purificare
  - cellule intere
  - organuli subcellulari, virus, membrane
  - macromolecole biologiche, come acidi nucleici o proteine;
2. La centrifugazione **analitica** permette invece di studiare le caratteristiche di sedimentazione del campione e di determinarne il grado di purezza o la massa molecolare

# CENTRIFUGA

Motore a velocità variabile

Rotore con alloggiamenti  
per le provette

Termostataato



# TIPI DI CENTRIFUGHE

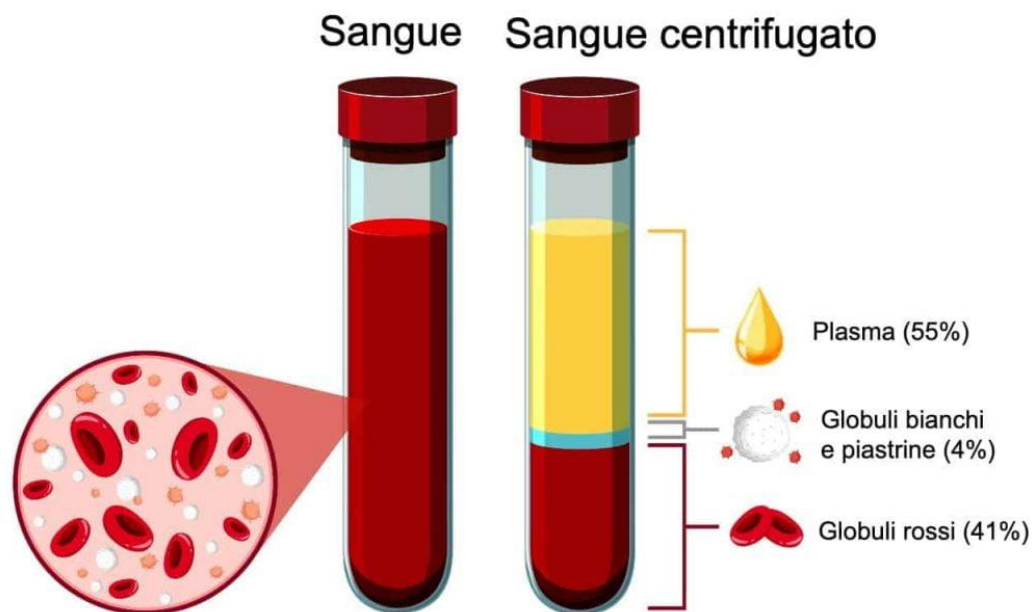
1. Centrifughe piccole da banco o microcentrifughe
  2. Centrifughe refrigerate a grande capacità
  3. Centrifughe refrigerate ad alta velocità
1. Ultracentrifughe (preparative e analitiche)



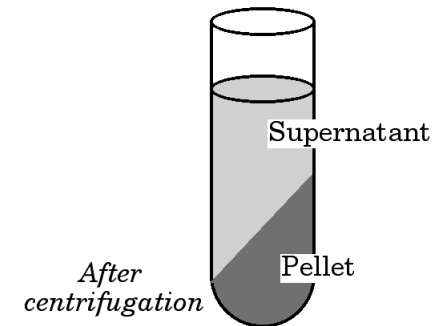
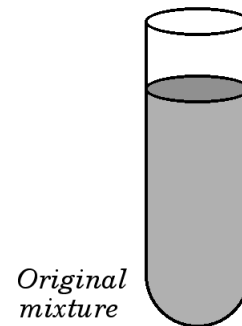
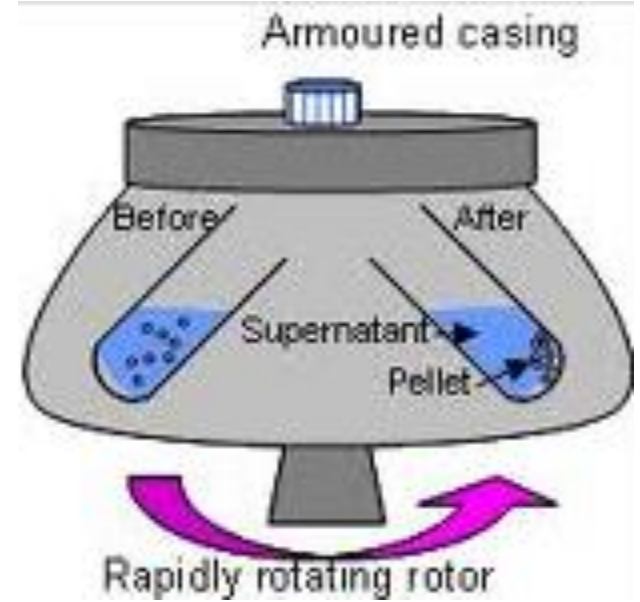
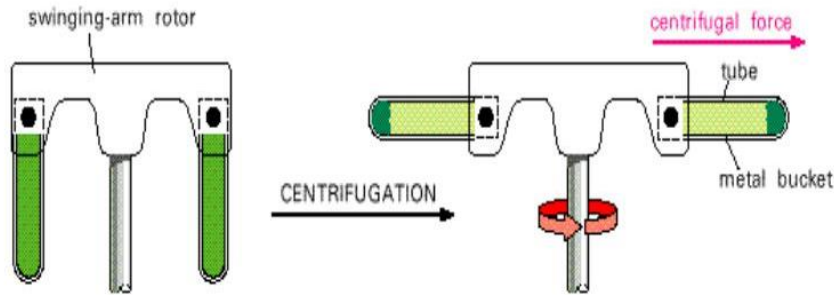
**Rotori ad angolo fisso** - hanno gli alloggiamenti per i tubi disposti circolarmente attorno all'asse di rotazione ad un certo angolo prefissato che varia in genere tra 20° e 40°. Quando le particelle sono proiettate contro le pareti, scivolano verso il fondo con la formazione del pellet.



## COMPOSIZIONE DEL SANGUE



# Rotori oscillanti:

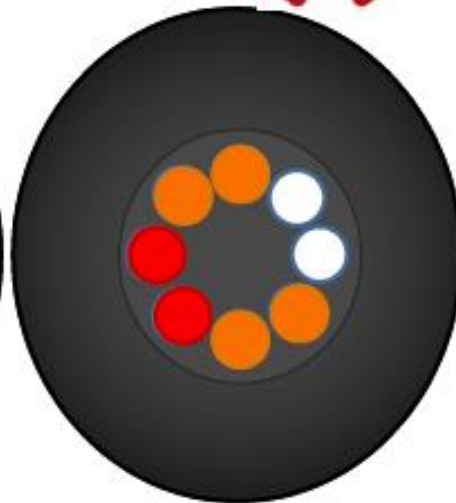


# RIEMPIMENTO DEI ROTORI

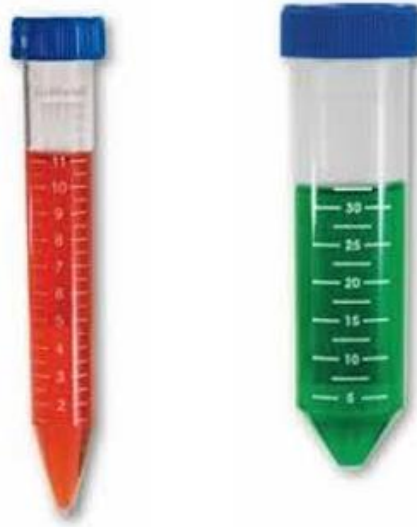
Bisogna sempre “bilanciare le provette”, cioè il peso di due campioni in posizione diametralmente opposta devono essere identici.



Se devo caricare 2 o più campioni?



# PROVETTE



# STRUMENTAZIONE UTILIZZATA NELLE TECNICHE CENTRIFUGATIVE

Le centrifughe possono essere classificate in quattro categorie principali:

1. **Piccole centrifughe da banco: MICROCENTRIFUGHE**  
(Vmax 4000/6000 rpm, RCF = 3000-7000 g)
2. **Centrifughe refrigerate a grande capacità**  
(100 mL; Vmax 6000 rpm, 6500 g)
3. **Centrifughe refrigerate ad alta velocità**  
(Vmax 25000 rpm, RCF = 60000 g)
4. **Ultracentrifughe: ultracentrifughe preparative**  
(in condizioni sottovuoto e refrigerate, Vmax 80000 rpm, 600000 g) e **ultracentrifughe analitiche.**

## (PREPARATIVA)

Le tecniche centrifugative per la separazione di particelle si dividono in:

**1. Centrifugazione differenziale**

**2. Centrifugazione in gradiente di densità**

suddivisa in:

***Centrifugazione zonale***

***Centrifugazione isopicnica.***

# CENTRIFUGAZIONE PREPARATIVA

## 1. Centrifugazione differenziale

Sfrutta la differente velocità di sedimentazione delle particelle

Organelli subcellulari-→ diversa densità e dimensioni

**Nucleo**

**Mitocondrio**

**Lisosoma**

**Ribosoma**

## Frazionamento sub-cellulare e centrifugazione

<b>Organello</b>	<b>Diametro (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Densità (<math>\text{g}/\text{cm}^3</math>)</b>
------------------	--	--

<b>Nucleo</b>		5-10	1.40
---------------	---	------	------



<b>Mitocondrio</b>		1-2	1.18
--------------------	---	-----	------

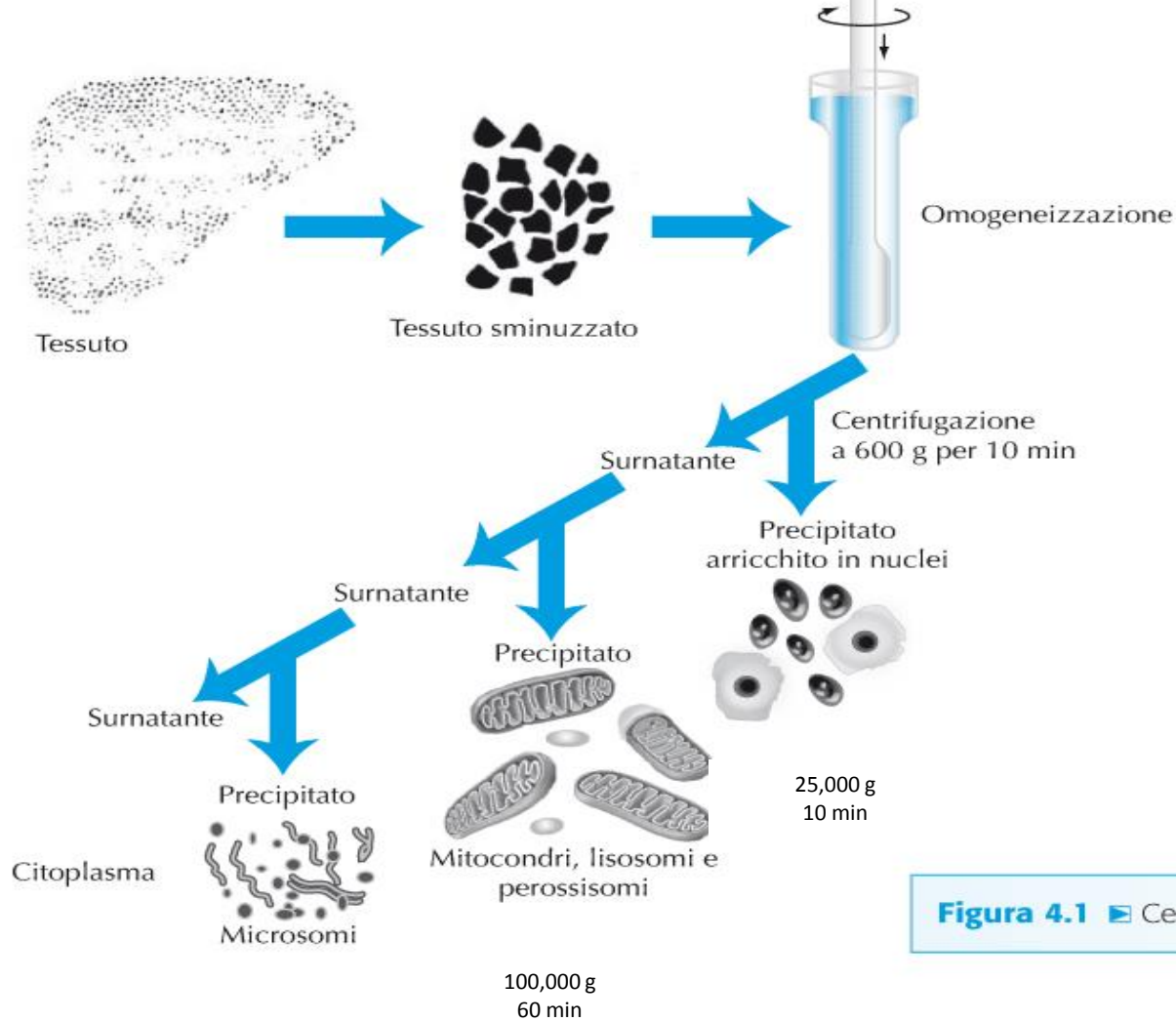


<b>Lisosoma</b>		1-2	1.13
-----------------	---	-----	------



<b>Ribosoma</b>		0.02	1.61
-----------------	---	------	------



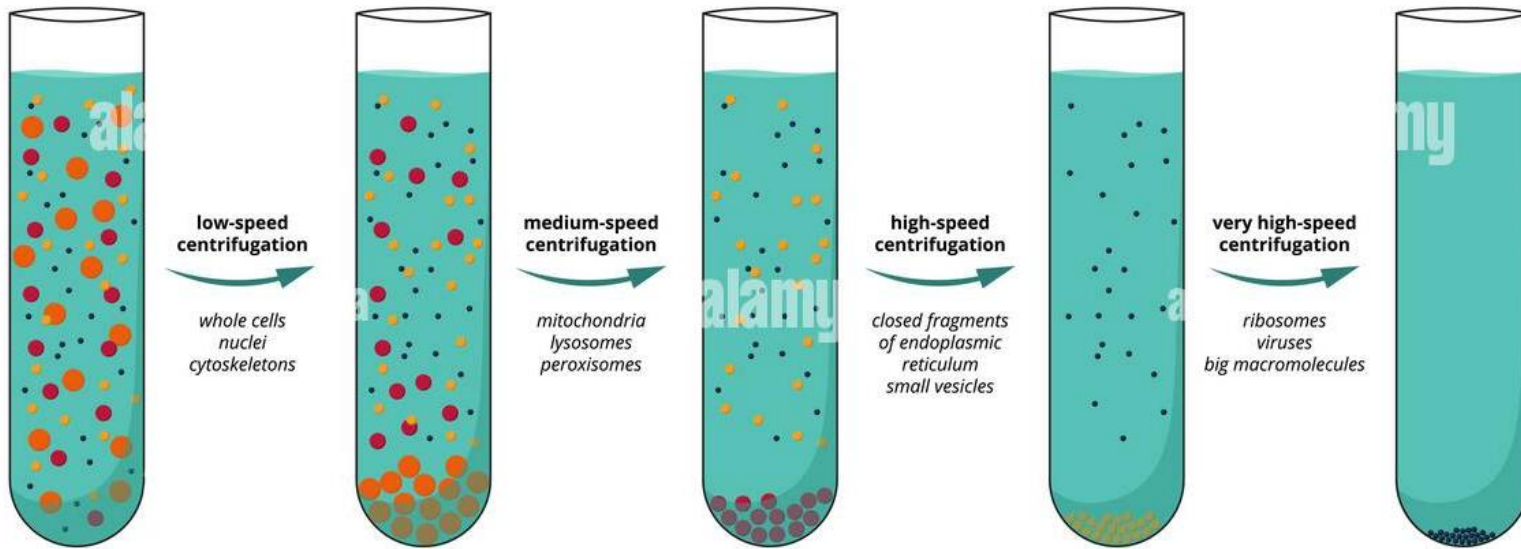


Sedimentano per prime quelle con dimensioni maggiori

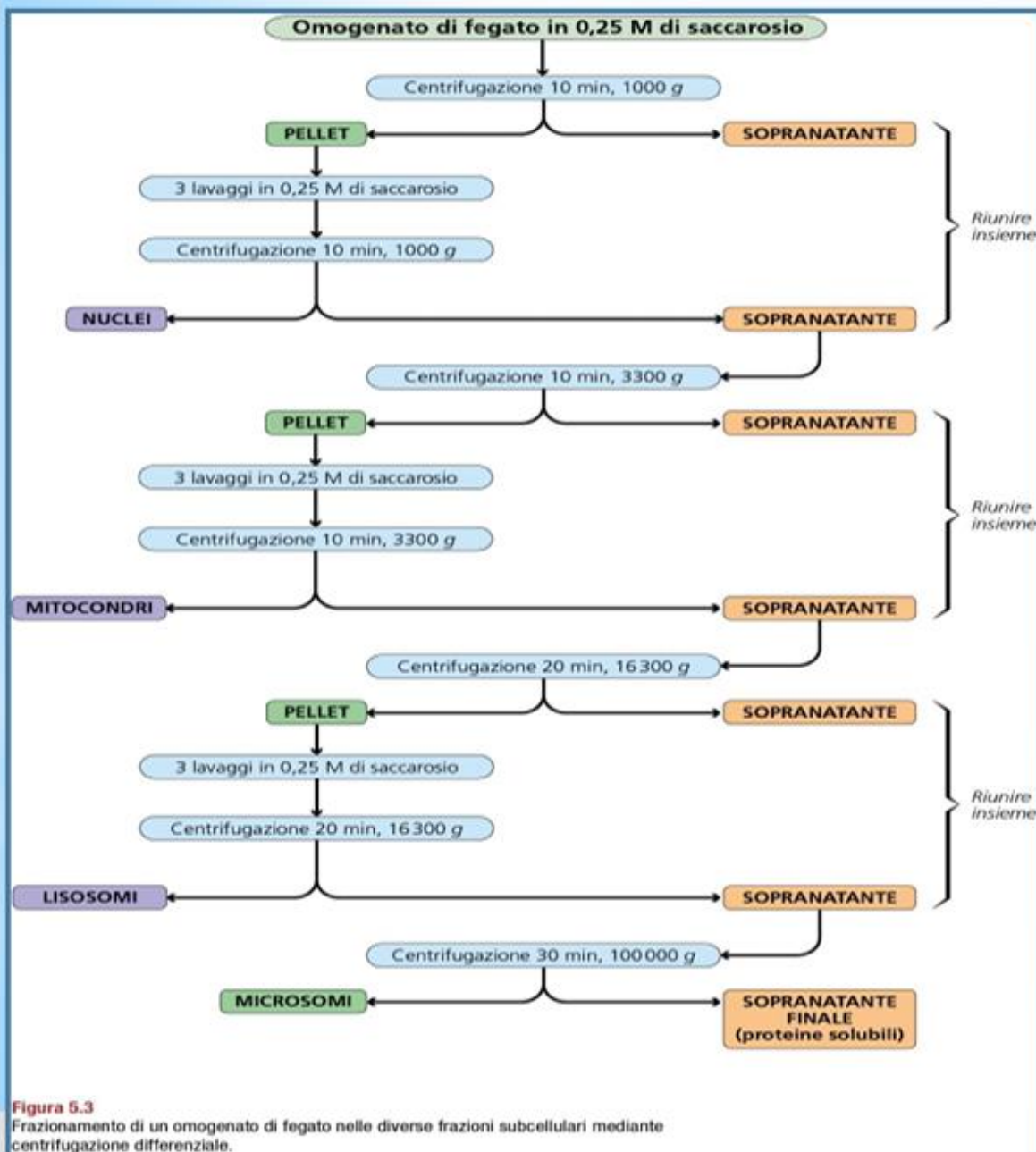
A parità di massa sedimentano prima quelle con densità maggiore

Figura 4.1 ► Cent

**centrifugazioni ripetute:** con una serie di centrifugazioni opportune si possono ottenere le principali frazioni sub-cellulari; con le metodiche in gradiente di densità le frazioni possono essere ottenute con un solo passaggio.



## Differential centrifugation



da MC Bonnaccorsi di Patti, R Contestabile, ML Di Salvo, *Metodologie Biochimiche*, seconda ed.

# Centrifugazione differenziale

tecnica più usata per il **frazionamento cellulare** centrifugando un omogenato cellulare per tempi relativamente brevi ed a velocità modeste sarà possibile ottenere la sedimentazione dei nuclei ma non degli altri organelli, che hanno densità e/o dimensioni minori e che rimarranno nel surnatante. Il surnatante può essere ulteriormente processato per ottenere altri tipi di particelle

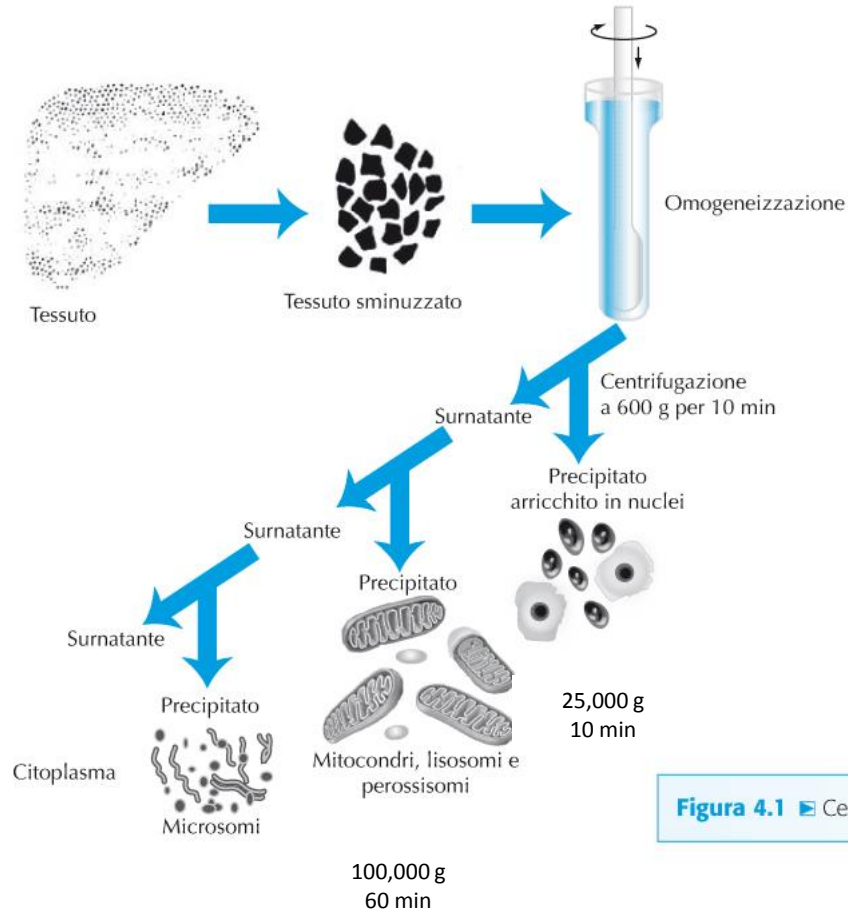
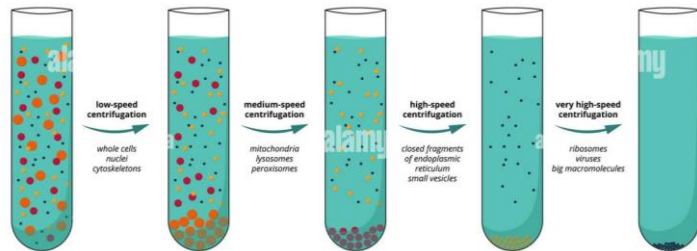


Figura 4.1 ▶ Cent



Stoppini, Bellotti  
Biochimica applicata  
EDISES

**centrifugazioni ripetute:** con una serie di centrifugazioni opportune si possono ottenere le principali frazioni sub-cellulari; con le metodiche in gradiente di densità le frazioni possono essere ottenute con un solo passaggio.

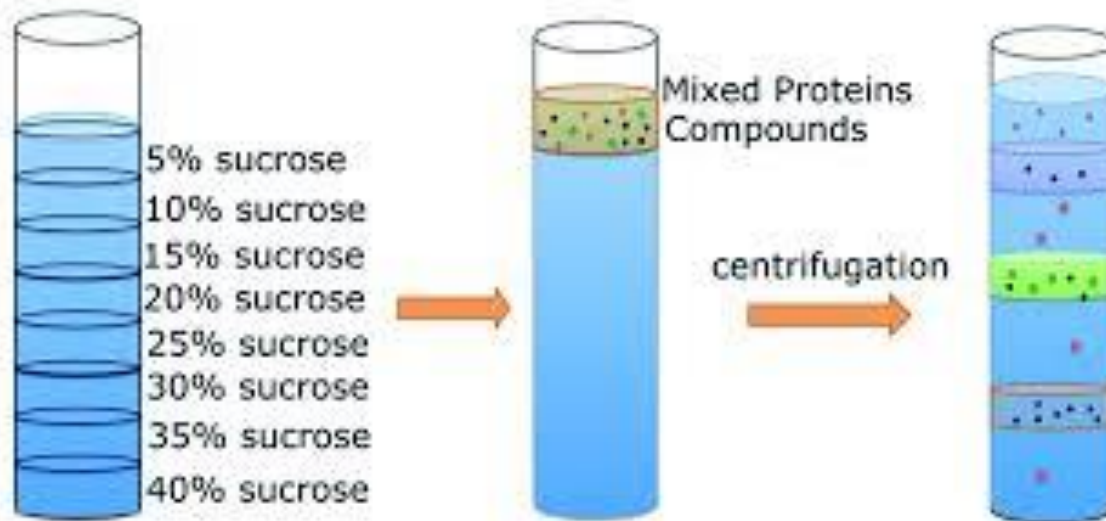
# CENTRIFUGAZIONE IN GRADIENTE DI DENSITÀ

## Purificare gli organelli subcellulari e le macromolecole

- I gradienti di densità possono essere generati posizionando uno strato dopo l'altro di un materiale, come il saccarosio, in un tubo con lo strato più pesante nella parte inferiore e il più leggero nella parte superiore in una modalità discontinua (per esempio dal 20% al 70%);
- La frazione cellulare da separare viene posta sopra lo strato superiore e quindi sottoposta a centrifugazione;
- La separazione in gradiente di densità viene classificata in due categorie: **separazione zonale** (per dimensione) e **separazione isopicnica** (per densità).

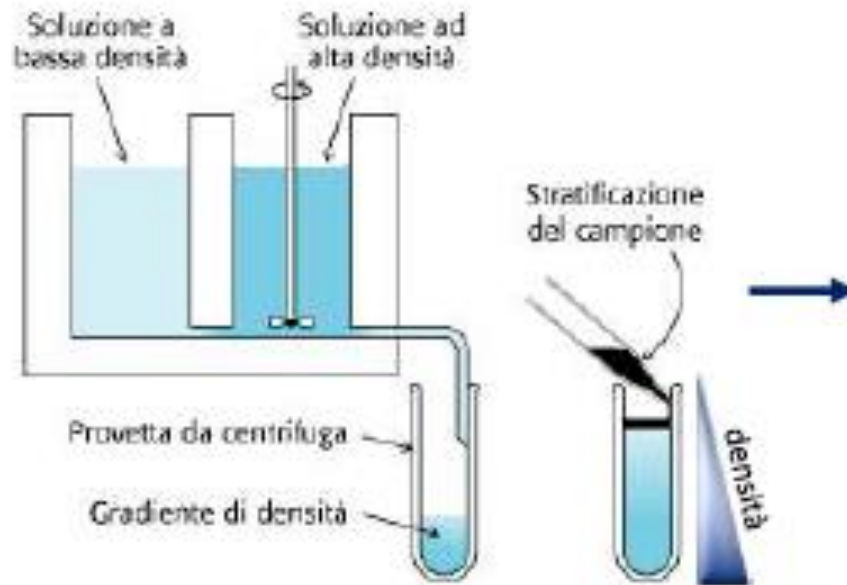
# CENTRIFUGAZIONE IN GRADIENTE DI DENSITÀ

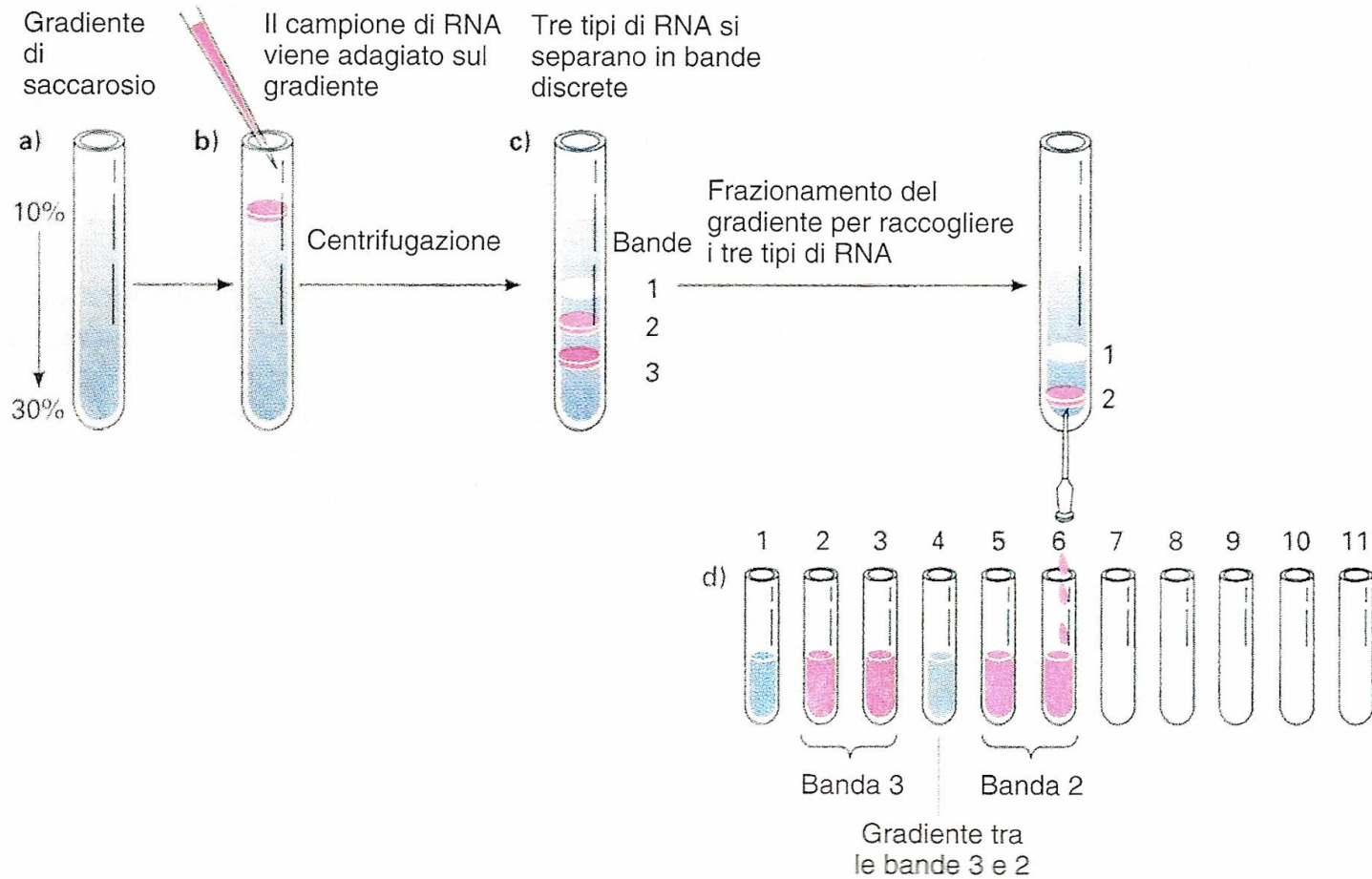
- 1) Costruire il gradiente in provetta (in basso densità maggiore ed in alto densità minore)
- 2) Caricare il campione in alto
- 3) Centrifugare: al termine le particelle si separano in zone (o bande) che rispecchiano la loro dimensione



**LIMITE** : la zona di carico, normalmente ristretta, limita il volume del campione (tipicamente al 10% del totale)

# Gradiente continuo





Per recuperare i tre tipi di RNA sarà ora sufficiente praticare un foro sul fondo della provetta e distribuire in contenitori diversi le gocce che ne escono.

# SEPARAZIONE ISOPICNICA

Separazione unicamente in base alla loro **densità**;

➤ La dimensione delle particelle influisce solo sulla velocità con cui le particelle si muovono fino a quando la loro densità non è uguale a quella del terreno del gradiente circostante;

➤ La densità del mezzo deve essere maggiore della densità delle particelle da separare.

Con questo metodo, le particelle non si depositano mai sul fondo del tubo, indipendentemente dalla durata del tempo di centrifugazione

Si fermano nel loro punto isopicnico.

# Centrifugazione isopicnica

## Gradiente di cloruro di cesio (CsCl)

Separare e purificare gli acidi nucleici in base alla loro **densità**.

DNA densità = 1,7 g/mL,

RNA d = 1,9 g/mL).

RNA **precipitare sul fondo** (pellet)

DNA forma una banda sospesa

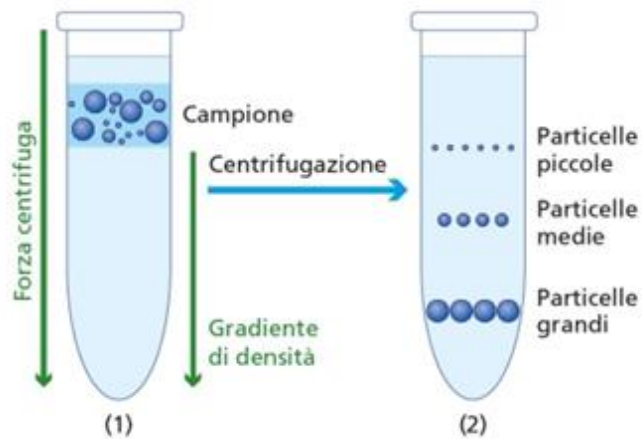
•**Separazione dal DNA**: Questa differenza di densità viene sfruttata per purificare il DNA da contaminazioni di RNA o viceversa.

### Applicazioni

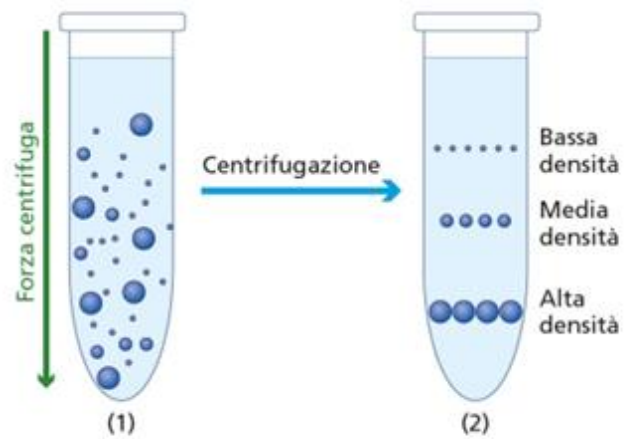
**1.Isolamento di RNA totale**: Per separare l'RNA genomico dalle proteine e dal DNA in estratti cellulari complessi.

**2.Purificazione di RNA virale**: Utilizzato per isolare genomi virali a RNA ad alta purezza.

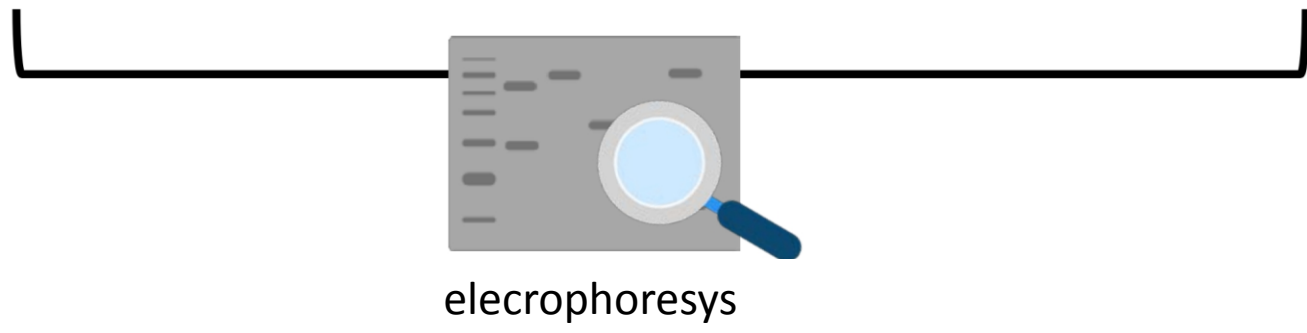
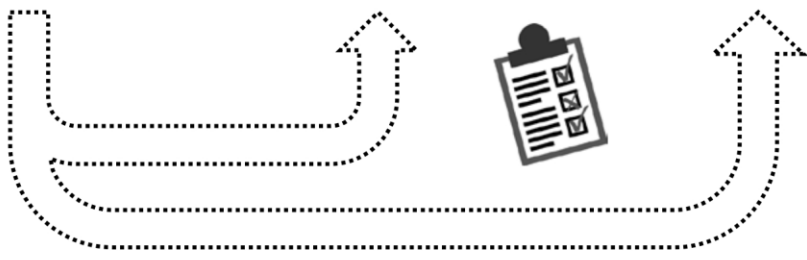
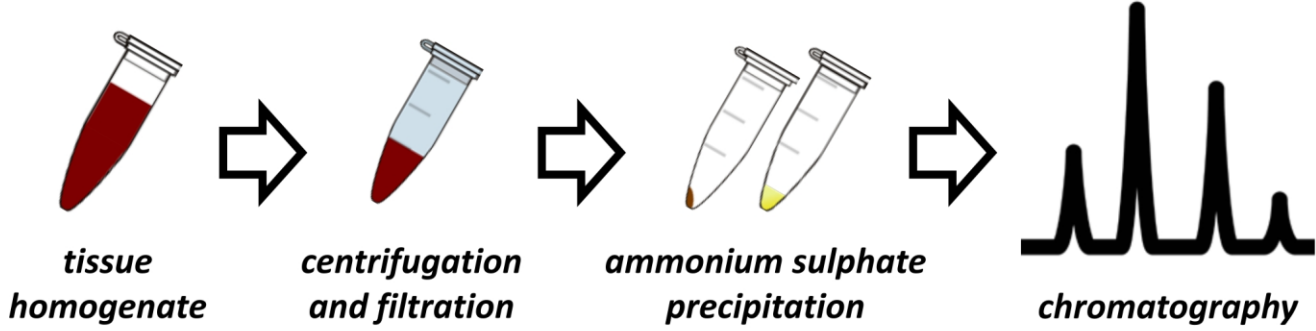
(a) Separazione zonale



(b) Separazione isopicnica



**Figura 5.3**  
Centrifugazione in gradiente di densità con (a) separazione zonale e (b) isopicnica.



## CENTRIFUGAZIONE NELLA SEPARAZIONE DI PROTEINE

### Coefficienti di sedimentazione

**S** (unità Svedberg,  $10^{-13}$  s) dipende da caratteristiche della **particella** e della **soluzione**

- densità
- PM
- forma
- densità soluzione
- viscosità soluzione

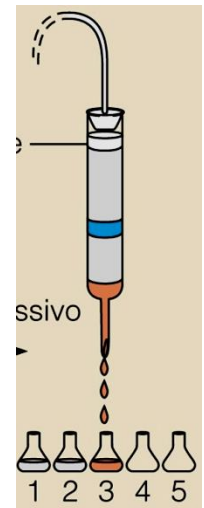
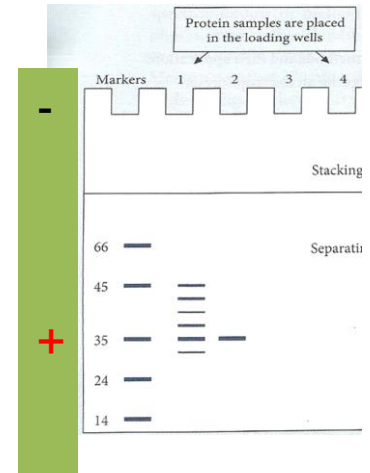
## PROTOCOLLO di PURIFICAZIONE:

???

Insieme di **tecniche di separazione** che sfruttano principi diversi e vengono effettuate secondo un preciso ordine al fine di purificare una proteina a partire da una miscela complessa

Nelle **tecniche di separazione di tipo analitico** l'obiettivo è l'identificazione e la quantificazione di piccole quantità di un dato analita. Gli analiti non vengono recuperati dopo la separazione: p.e. **tecniche elettroforetiche**

Nelle **tecniche di separazione di tipo preparativo** lo scopo principale è l'isolamento e il recupero con un alto grado di purezza di quantità (più grandi possibili) di un dato analita per studiarne successivamente le proprietà chimiche e/o biologiche: p.e. **tecniche cromatografiche**



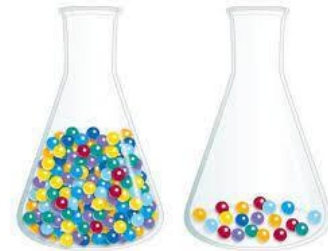
Ad ogni step di purificazione bisogna monitorare l'efficienza del passaggio di purificazione:

- Riduzione della quantità totale di proteine
- Aumento del rapporto: Q proteina da purificare/Q tot

**RESA:** Unità enzimatiche nella frazione purificata/Unità enzimatiche nella miscela iniziale

-Unità Internazionali di Enzima (U): quantità di enzima che è in grado di convertire 1 umole di substrato in 1 min in condizioni definite di pH e T.

**ATTIVITA' SPECIFICA:** unità TOT di enzima nella frazione /quantità totali di proteine nella frazione



**TABELLA 3.5** Tabella di purificazione di un ipotetico enzima

Procedimento e tappa	Volume della frazione eluita (mL)	Proteine totali (mg)	Attività (unità)	Attività specifica (unità/mg)
1. Estratto cellulare grezzo	1400	10000	100000	10
2. Precipitazione con ammonio solfato	280	3000	96000	32
3. Cromatografia a scambio ionico	90	400	80000	200
4. Cromatografia per esclusione molecolare	80	100	60000	600
5. Cromatografia per affinità	6	3	45000	15000

Nota: tutti i dati rappresentano lo stato del campione dopo che la tappa indicata nella prima colonna è stata effettuata. I termini "attività" e "attività specifica" sono definiti a p. 91.