

**Modulo di Biochimica Applicata (6 CFU)**  
**del CI di Biochimica Applicata e Metabolica**  
(4 CFU lezioni + 2 CFU laboratorio)

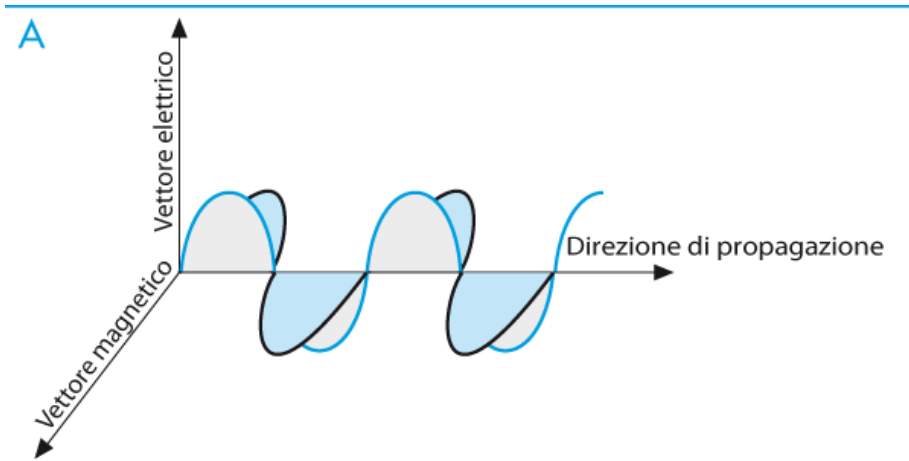


Prof.ssa **Alessandra Olianas**

Dip. Scienze della Vita e dell'Ambiente  
Sezione Biomedica

Ricevimento studenti: **si riceve per appuntamento**  
**[olianas@unica.it](mailto:olianas@unica.it)**

Le **tecniche spettroscopiche** sfruttano le interazioni tra radiazioni elettromagnetiche e materia



La radiazione elettromagnetica è un'onda composta da **un vettore elettrico** e un **vettore magnetico** che oscillano su piani perpendicolari l'uno all'altro e perpendicolarmente alla direzione di propagazione della radiazione

Mediante le **tecniche spettroscopiche** si studiano le interazioni delle **proteine** con le radiazioni elettromagnetiche di diversa lunghezza d'onda

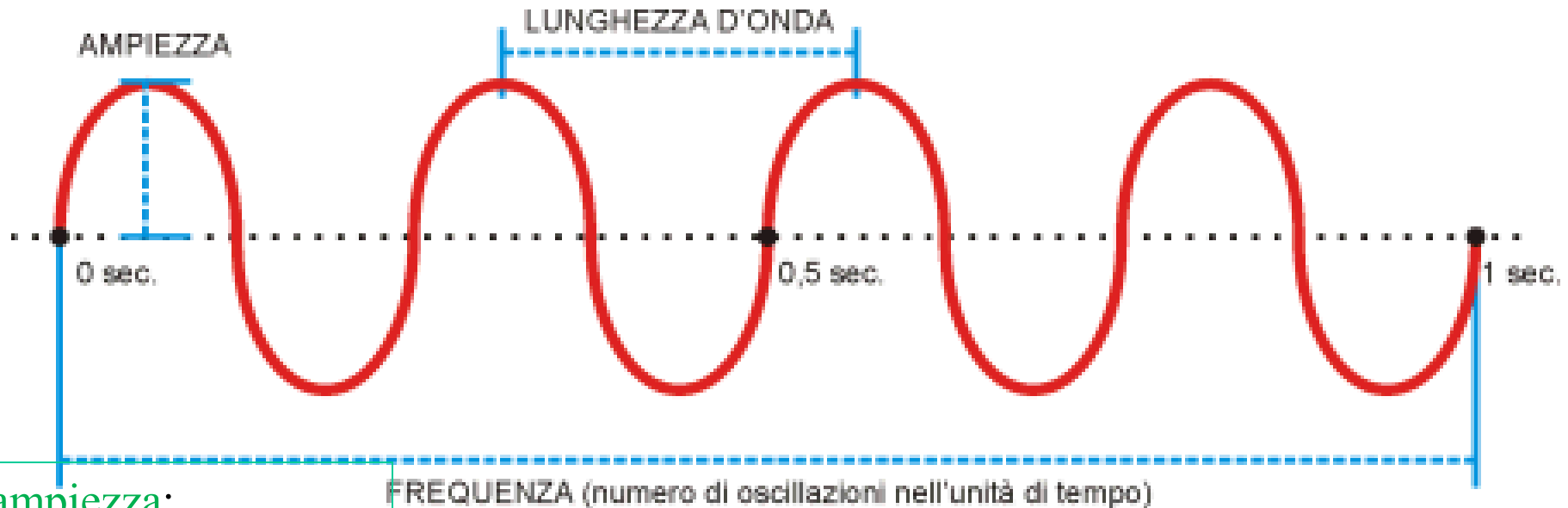
Considerando la **natura ondulatoria** delle radiazioni elettromagnetiche i parametri che le caratterizzano sono:

**lunghezza d'onda ( $\lambda$ )**

distanza tra due punti in cui l'onda raggiunge una massimo di intensità  
(m e sottomultipli del metro (nm=  $10^{-9}$  m )

**frequenza ( $\nu$ ) (Hertz)**

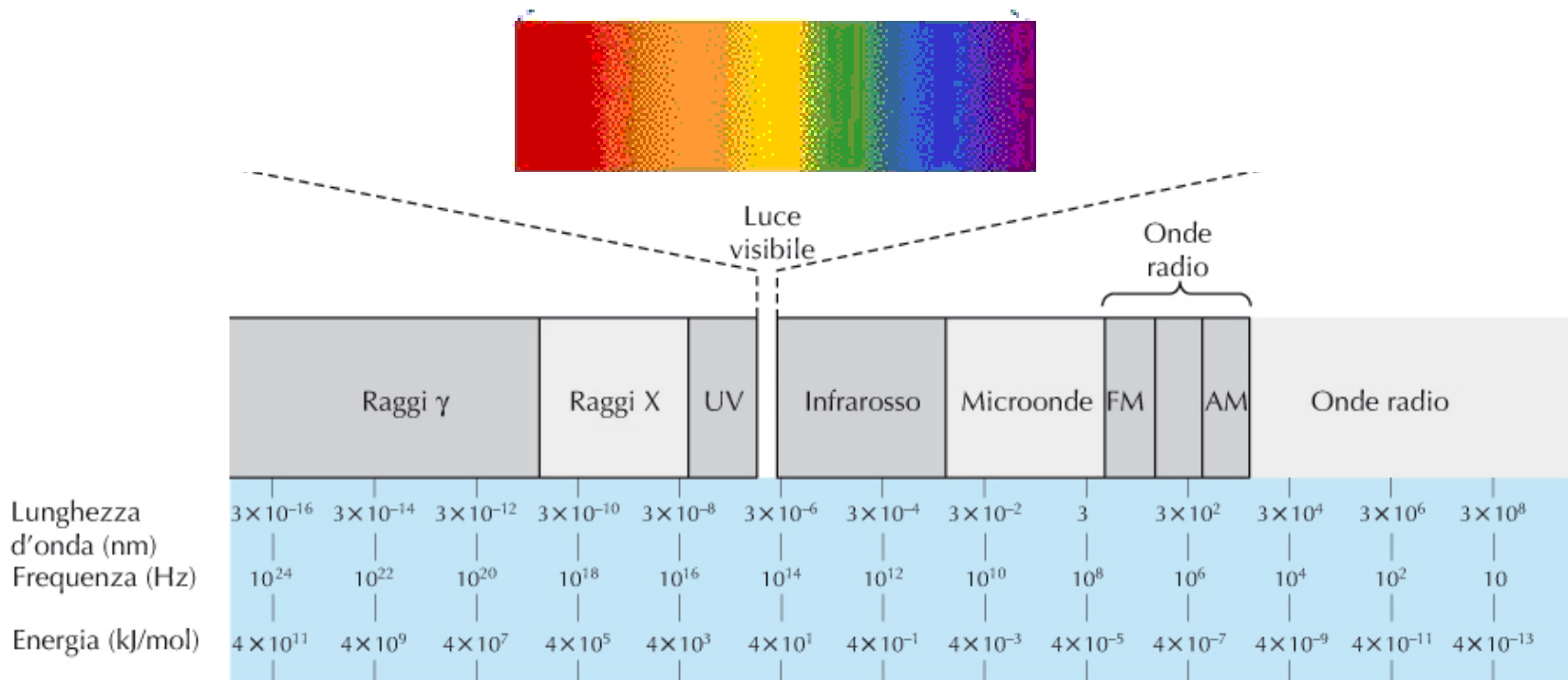
= numero di oscillazioni dell'onda nell'unità di tempo (sec)



**ampiezza:**  
massimo valore  
raggiunto dall'onda

$$\lambda = c / \nu$$

**c = velocità di propagazione della luce nel vuoto = 300 000 km/sec**



**Figura 10.1** ► Lo spettro elettromagnetico.

Raggi X            fino a 7 nm  
 UV                180-340 nm  
 VIS                340-800 nm  
 IR                  $10^3$ - $10^5$  nm  
 Onde radio        $10^6$ - $10^{10}$  nm

$$\lambda = c / \nu$$

Le radiazioni elettromagnetiche hanno una doppia natura: **ondulatoria** e **corpuscolare**

Considerando la **natura corpuscolare** delle radiazioni elettromagnetiche (**FOTONI**) possiamo associare a ciascuna radiazione un pacchetto d'energia (quanto) direttamente proporzionale alla sua frequenza

$$\mathbf{E = h \cdot \nu} \quad \mathbf{h = costante di Planck = 6.63 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}}$$

$$\lambda = c / \nu \longrightarrow \nu = c / \lambda$$

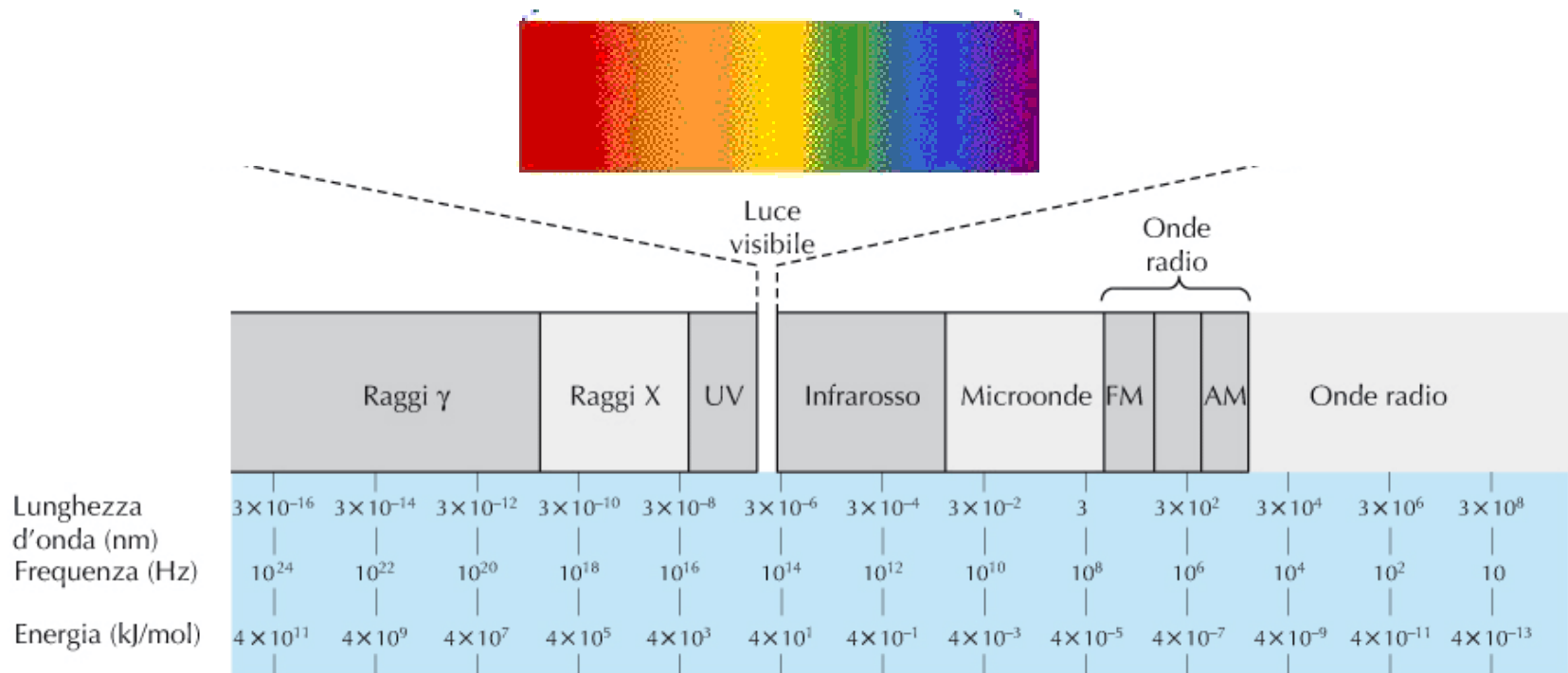
Sostituendo...  $\mathbf{E = h \ c / \lambda}$

L'energia di una radiazione aumenta se diminuisce la lunghezza d'onda

UV: 200-400 nm (minore  $\lambda = > \mathbf{E}$ )

VIS: 400-800 nm (maggiore  $\lambda = < \mathbf{E}$ )

Quando un fotone incontra una molecola si può avere il trasferimento della sua energia determinando un passaggio dallo stato fondamentale a quello eccitato



**Figura 10.1** Lo spettro elettromagnetico.

Raggi X      fino a 7 nm  
 UV          180-340 nm  
 VIS         340-800 nm  
 IR           $10^3$ - $10^5$  nm  
 Onde radio    $10^6$ - $10^{10}$  nm

$$\lambda = c / \nu$$

$$\nu = c / \lambda$$

$$E = h \cdot \nu$$

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

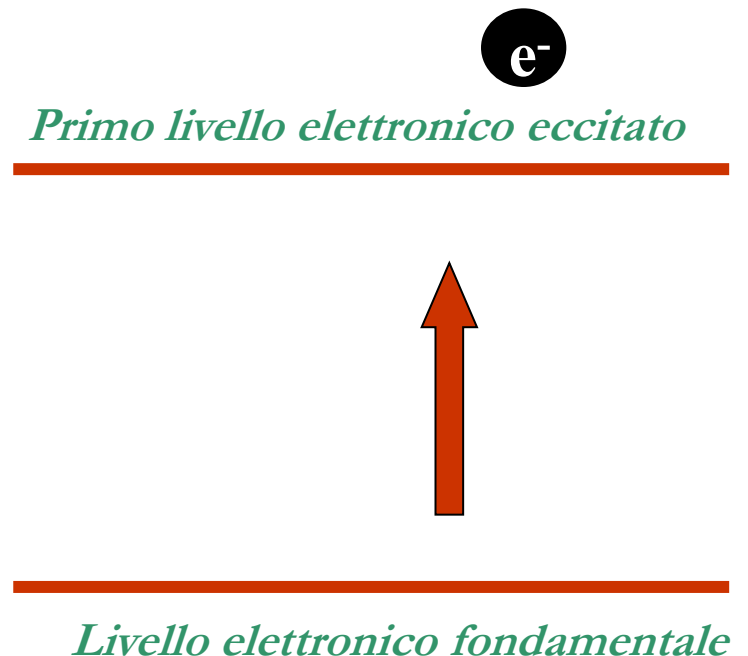
Quando una radiazione elettromagnetica entra in contatto con la materia si possono manifestare diversi fenomeni:

- 1) **Processi di diffusione** (scattering) : il percorso dell'onda viene deviato in modi diversi dalla materia
- 2) **Processi di assorbimento** : l'energia della radiazione viene trasferita alla materia

# Spettroscopia UV-visibile

La **Spettroscopia Uv-visibile** studia gli spettri di assorbimento di molecole nella regione compresa tra circa **200 e 700 nm**.

Le radiazioni della regione del visibile e dell'ultravioletto possiedono energia sufficiente a promuovere **un salto degli elettroni nello stato fondamentale** verso orbitali ad energia più alta in uno stato eccitato.

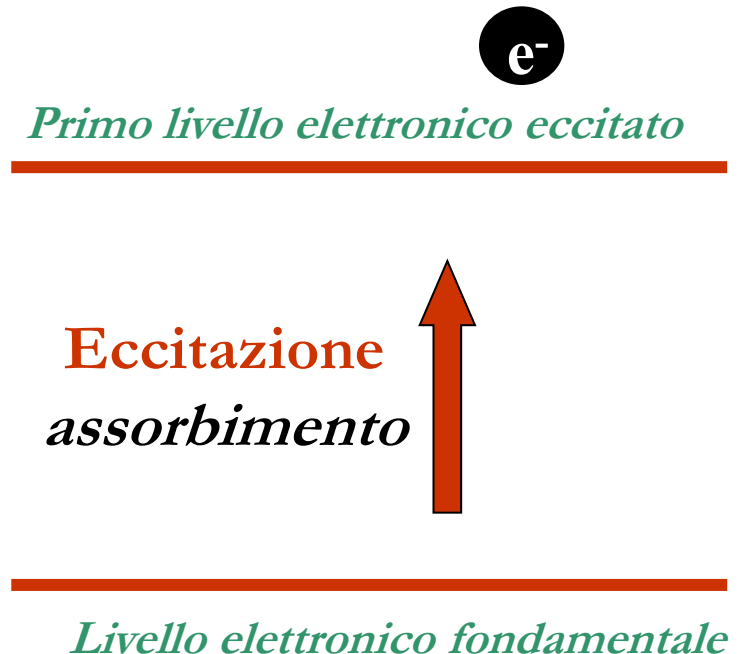


Essendo coinvolti elettroni di legame, l'energia della radiazione assorbita può essere correlata con i tipi di legame presenti nella specie in esame.

# Spettroscopia UV-visibile

La **Spettroscopia Uv-visibile** studia gli spettri di assorbimento di molecole nella regione compresa tra circa **200 e 700 nm**.

Le radiazioni della regione del visibile e dell'ultravioletto possiedono energia sufficiente a promuovere **un salto degli elettroni nello stato fondamentale** verso orbitali ad energia più alta in uno stato eccitato.



Essendo coinvolti elettroni di legame, l'energia della radiazione assorbita può essere correlata con i tipi di legame presenti nella specie in esame.

# Che cosa succede dopo l'assorbimento di una radiazione UV-vis?

Lo stato eccitato ritorna allo stato elettronico fondamentale sia:

- per produzione di calore
- per emissione di una radiazione con energia uguale o minore a quella della radiazione assorbita\*.

*Primo livello elettronico eccitato*

---

**Rilassamento**  
*emissione*



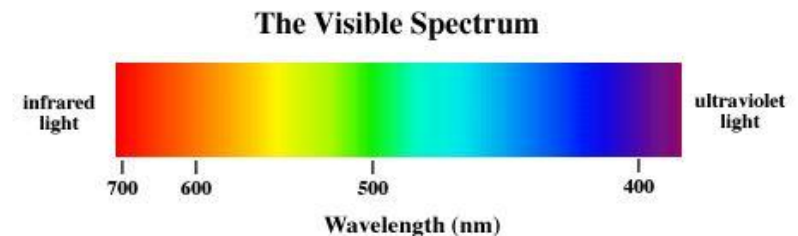
---

*Livello elettronico fondamentale*

\* Quest'ultimo processo è noto con il nome di *fluorescenza*.

**Regione dell'ultravioletto:** copre una zona che comprende lunghezze d'onda che vanno da 200 a 400 nm fino a confinare con il violetto.

**Regione del visibile:** la radiazione della luce visibile con  $\lambda$  compresa tra circa 400 e 700 nm, rappresenta una porzione molto piccola dello spettro elettromagnetico. All'interno di tale regione dello spettro ci sono tutti i colori che si vedono quando una luce bianca attraversa un prisma e che in ordine decrescente di lunghezza d'onda sono: rosso, arancione, giallo, verde, celeste, indaco, violetto.



Quando una radiazione elettromagnetica colpisce una sostanza essa viene in parte riflessa, trasmessa e assorbita.

Se la sostanza è in soluzione, la luce riflessa è minima.

Esiste una relazione tra luce incidente ( $I_0$ ) e luce trasmessa ( $I$ ) dopo il passaggio attraverso la sostanza.

$$\text{Trasmittanza (T)} = \frac{I}{I_0}$$

$I$  = intensità della luce trasmessa dal campione  
 $I_0$  = Intensità della luce incidente

Frazione di luce in grado di attraversare il campione senza essere assorbita

$T$  = parametro adimensionale

# Spettroscopia di Assorbimento UV/VIS

$$\text{Trasmittanza (T)} = \frac{I}{I_0}$$

↓

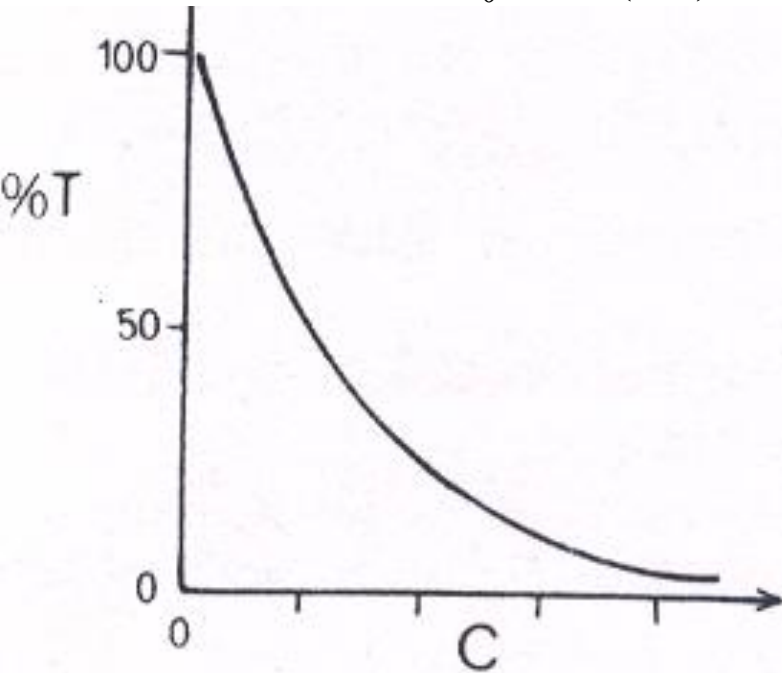
$I$  = intensità della luce trasmessa dal campione  
 $I_0$  = Intensità della luce incidente

Frazione di luce in grado di attraversare il campione senza essere assorbita

$T$  = parametro adimensionale

$T$  può assumere valori compresi tra 0 e 1 oppure viene espressa in % e può assumere valori compresi tra 0% e 100% .

- se  $I = I_0 \rightarrow T = I/I_0 = 1$  (100%) soluzione completamente trasparente (**non assorbe la luce**)
- se  $I = 0 \rightarrow T = I/I_0 = 0$  (0%) soluzione completamente opaca



$$T = 10^{-\epsilon \cdot l \cdot c}$$

$l$  = cammino ottico, generalmente = 1 cm

$\epsilon$  = coefficiente di estinzione

$c$  = concentrazione dell'analita

## Assorbimento (A)

$$A = -\log_{10} T$$

Si preferisce utilizzare  
il parametro Assorbimento

$$\text{Trasmittanza (T)} = \frac{I}{I_0}$$

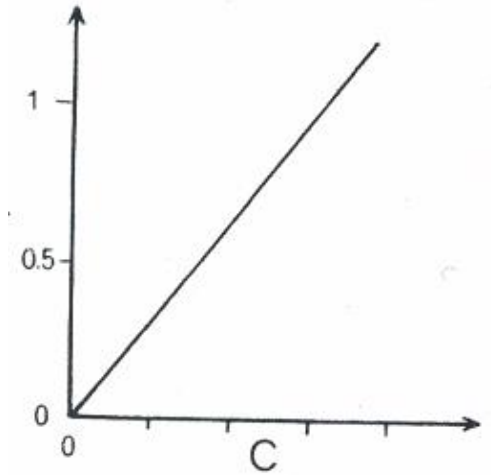
$$A = \log_{10} I_0/I$$

$$A = \log_{10} I_0/I$$

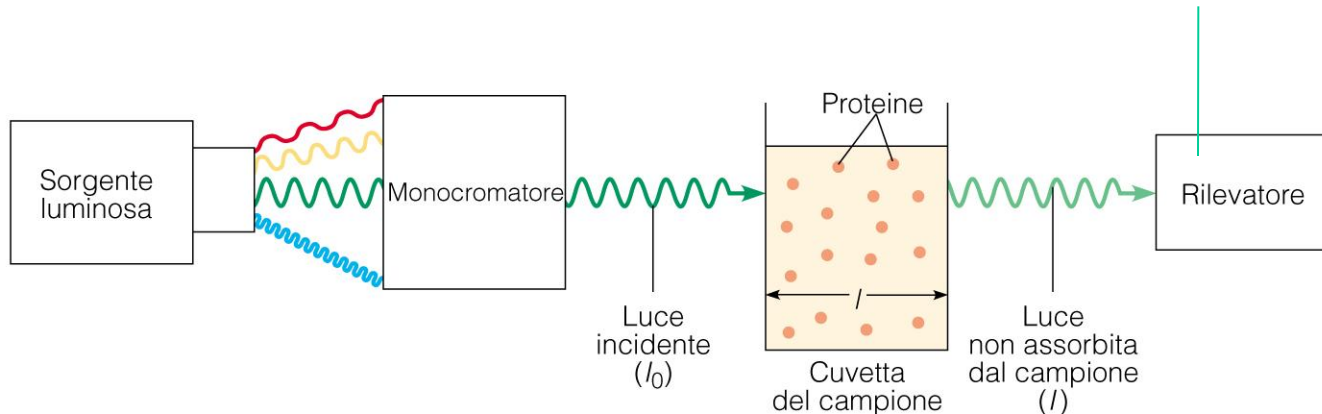
$$\text{se } I_0 = I \quad A = \log I_0/I = \log 1 = 0$$

$$\text{se } I < I_0 \quad I_0/I > 1 \quad A = \log I_0/I > 0$$

A



I = intensità luce trasmessa dal campione



I = intensità della luce trasmessa dal campione

I<sub>0</sub> = Intensità della luce incidente

$$T = 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot c}$$

$l$  = cammino ottico, generalmente = 1 cm

$\varepsilon$  = coefficiente di estinzione

$c$  = concentrazione dell'analita

$$A = -\log_{10} T$$

$$A = \log_{10} 1/T$$

$$A = -\log_{10} 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot c}$$

**legge di Lambert-Beer**

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

## legge di Lambert-Beer

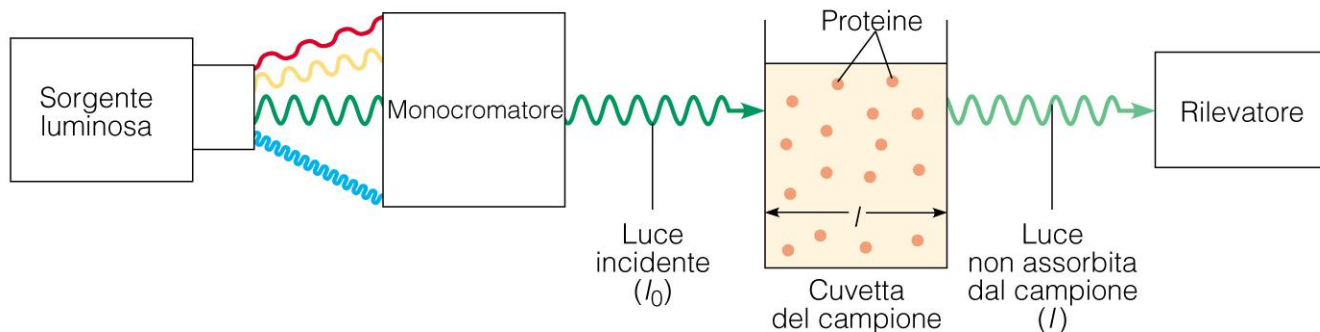
$$A = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$$

$l$  = cammino ottico, generalmente = 1 cm

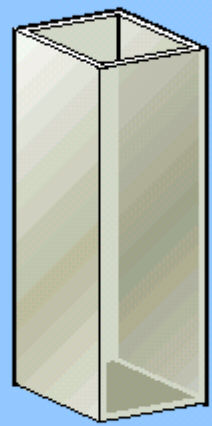
$\epsilon_{\lambda}$  = coefficiente di estinzione molare

$c$  = concentrazione del campione

Cammino percorso dalla luce attraverso il campione cioè lo spessore della cella (**cammino ottico**)



**Cuvetta:**  
- contenitore della soluzione da analizzare



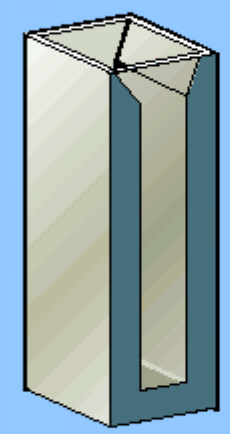
(a)

**Cammino ottico (l)** = distanza tra le due facce attraversate dalla radiazione

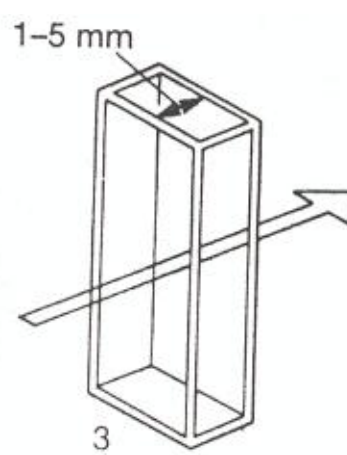
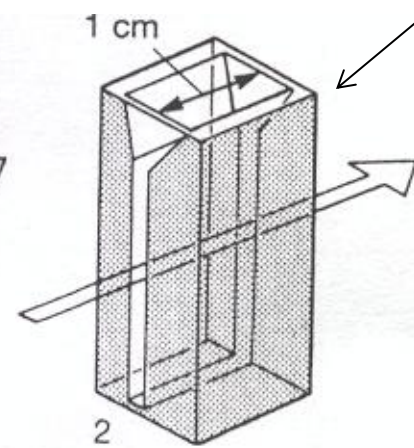
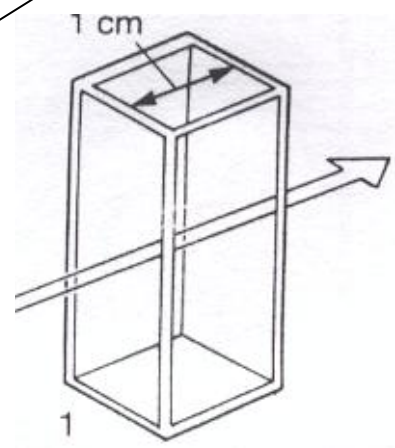
Parallelepipedo (facce laterali piane e parallele)

- vetro o plastica (VIS)
- quarzo (UV)

4 facce ottiche **oppure** 2 facce ottiche + 2 facce zigrinate



(b)



legge di Lambert-Beer

$$A = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$$

# legge di Lambert-Beer $A = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$

$l$  = cammino ottico, generalmente = 1 cm

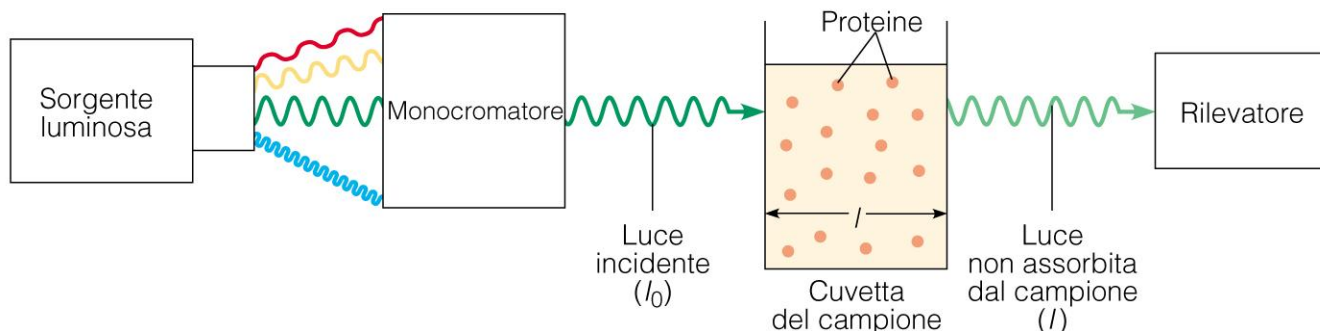
$\epsilon_{\lambda}$  = coefficiente di estinzione molare [ $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]

$c$  = concentrazione del campione

Assorbimento di una soluzione 1 M del campione posto in una cella di 1 cm di spessore

Si può esprimere anche come  $\epsilon_{\lambda}^{1\%}$

1% (p/v)



# legge di Lambert-Beer

$$A = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$$

$$\text{Trasmittanza (T)} = \frac{I}{I_0}$$

In quale intervallo di concentrazioni è consigliato effettuare misure di Assorbimento?

La soluzione non deve essere:

- Troppo concentrata

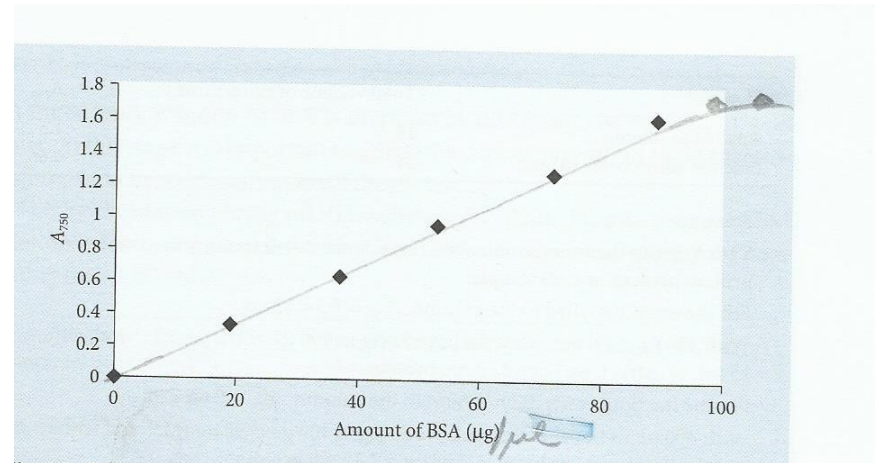
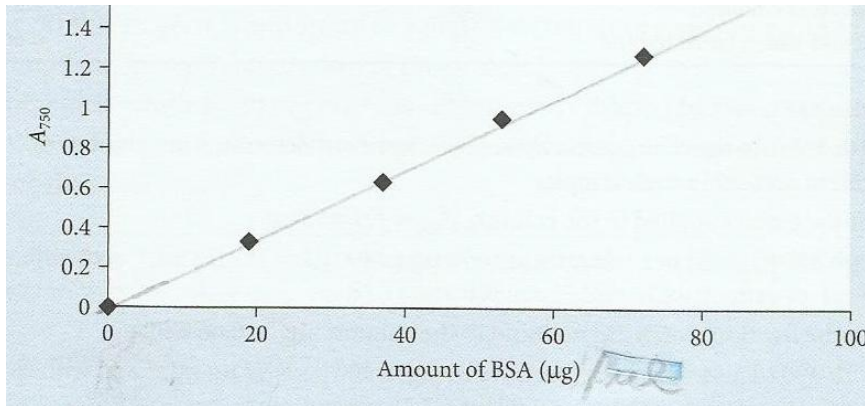
I (intensità luce trasmessa dal campione) ha un valore troppo elevato

- Troppo diluita

I (intensità luce trasmessa dal campione) ha un valore troppo piccolo

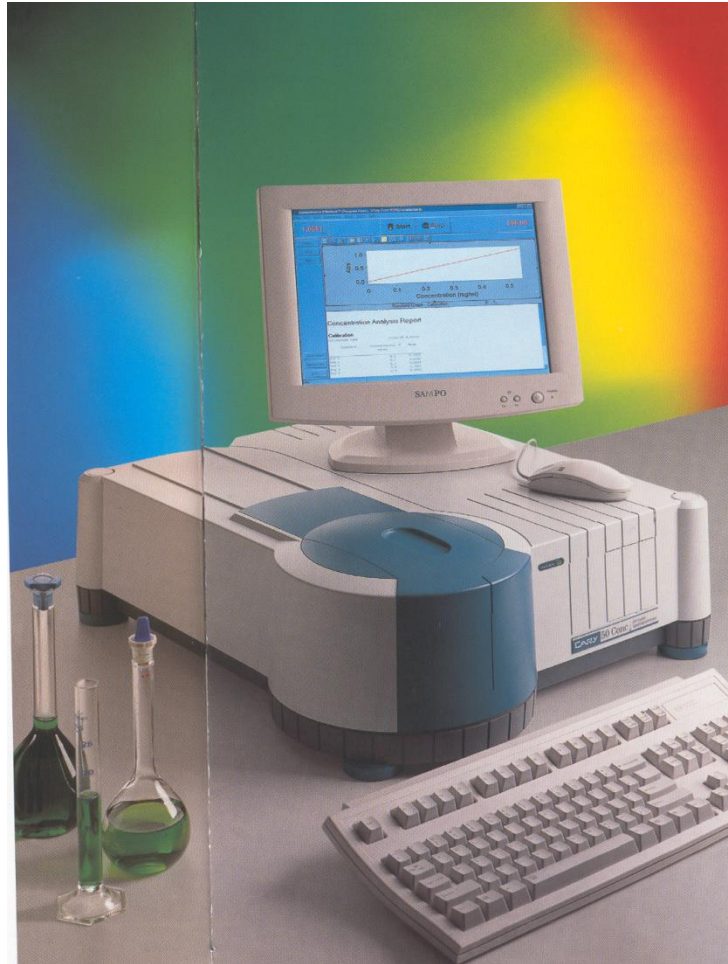
Determinazioni accurate della concentrazione si possono fare per range di assorbimento comprese tra 0.1 e 1.5

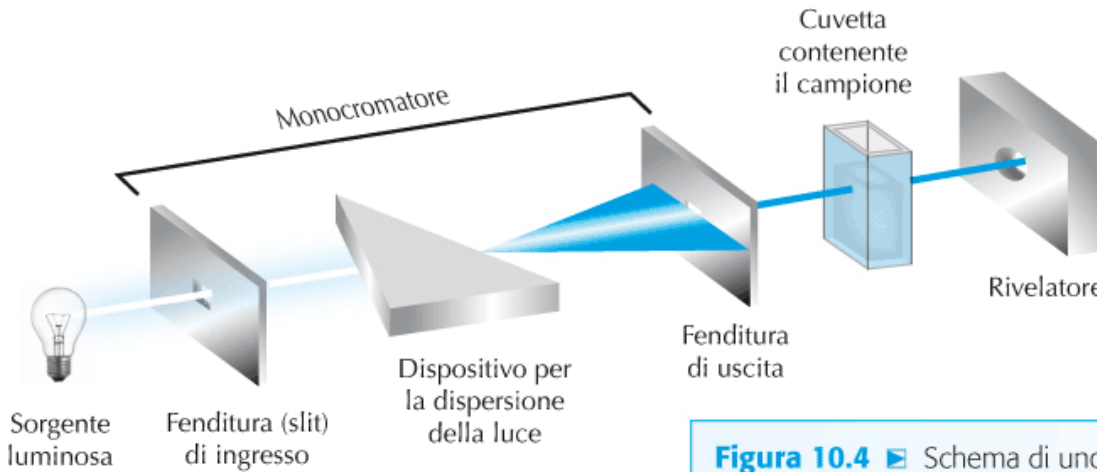
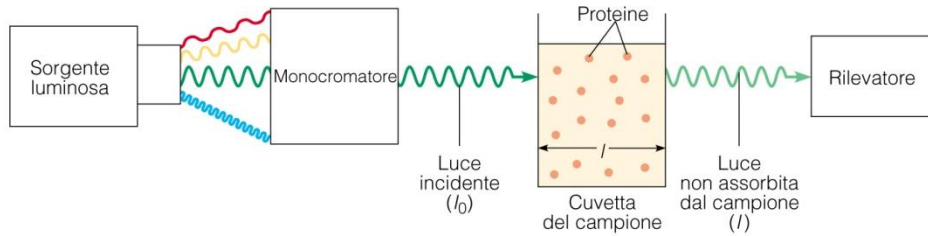
Regola generale: non bisogna superare i valori di  $A > 1.5$



Limite strumentale: a concentrazioni maggiori a relazione tra A e c non è più lineare

# Strumenti per analisi di spettroscopia UV/VIS





**Figura 10.4** ▶ Schema di uno spettrofotometro a singolo raggio.

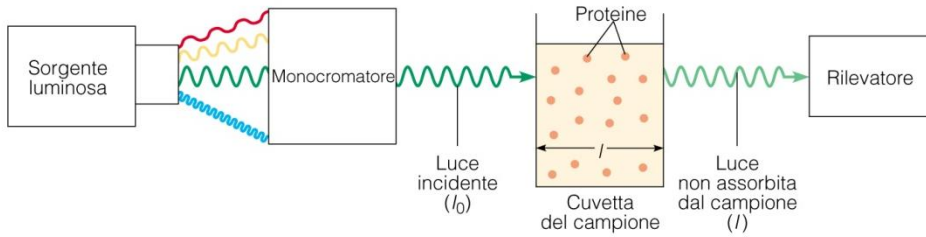
**Sorgente luminosa** : dipende dalla regione spettrale esaminata

**VIS: lampada al tungsteno (340 – 800 nm)**

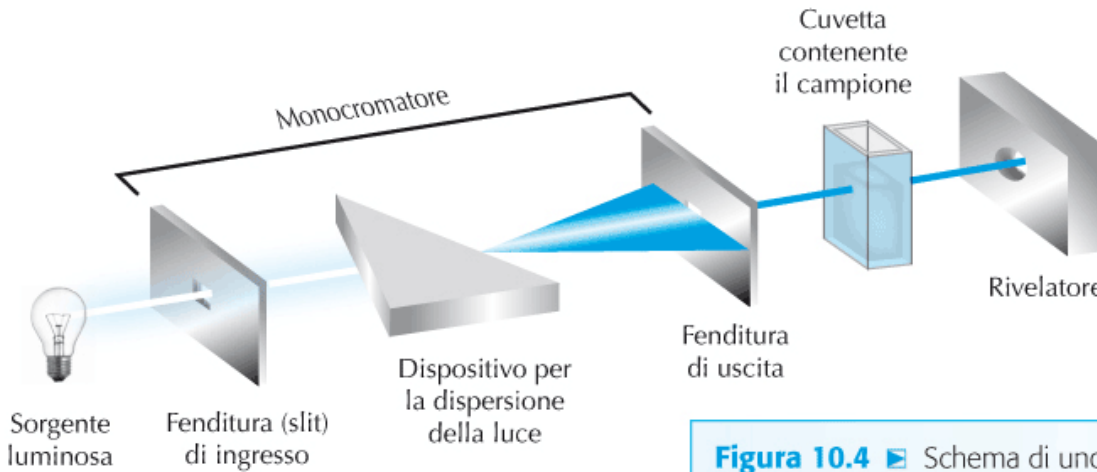
Filamento che riscaldato produce uno spettro continuo di radiazioni

**UV: lampada al deuterio o a idrogeno (200 – 340 nm)**

Ampolla di quarzo che contiene il gas nella quale viene prodotta una scarica elettrica.  
La scarica elettrica determina la dissociazione del gas e l'emissione di radiazioni UV



La luce emessa dalla sorgente deve essere scomposta nelle diverse componenti .



**Figura 10.4** ▶ Schema di uno spettrofotometro a singolo raggio.

## MONOCROMATORE

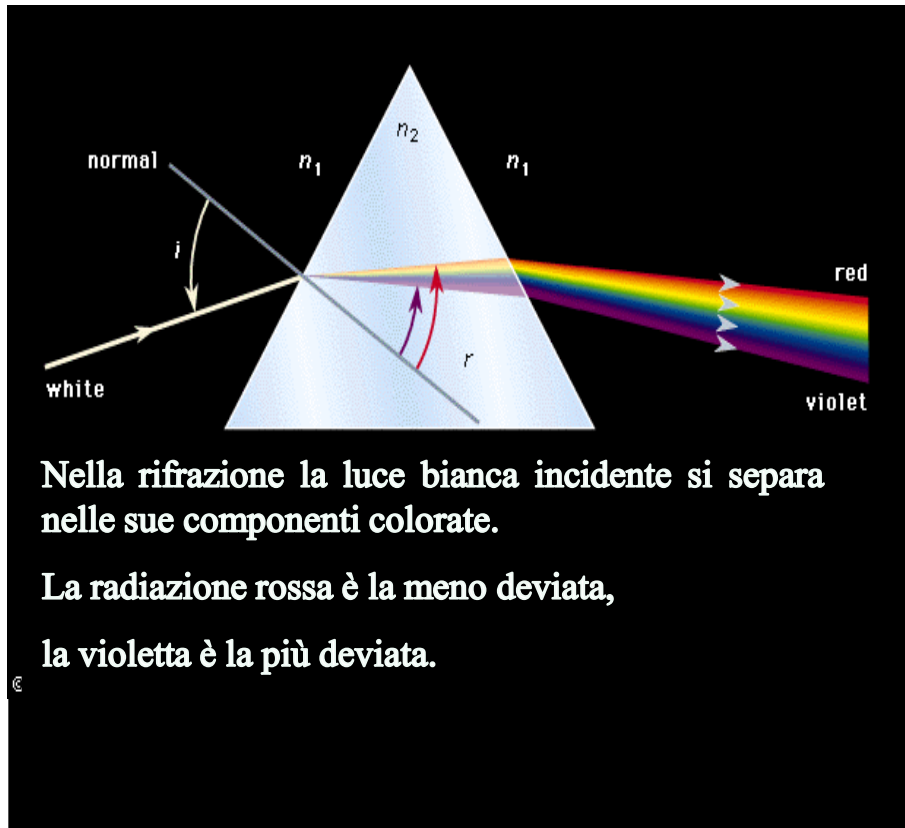
Selezionatore di radiazioni monocromatiche UV-VIS e permette di selezionare le  $\lambda$  desiderate

Vetro ottico nel VIS

Quarzo nell'UV

# PRISMI si basano sul fenomeno della rifrazione

Sono costituiti da vetro ottico nella regione del visibile o da quarzo nella regione dell'UV



Il raggio di luce bianca su un mezzo trasparente a densità maggiore



Viene deviato e la deviazione è proporzionale

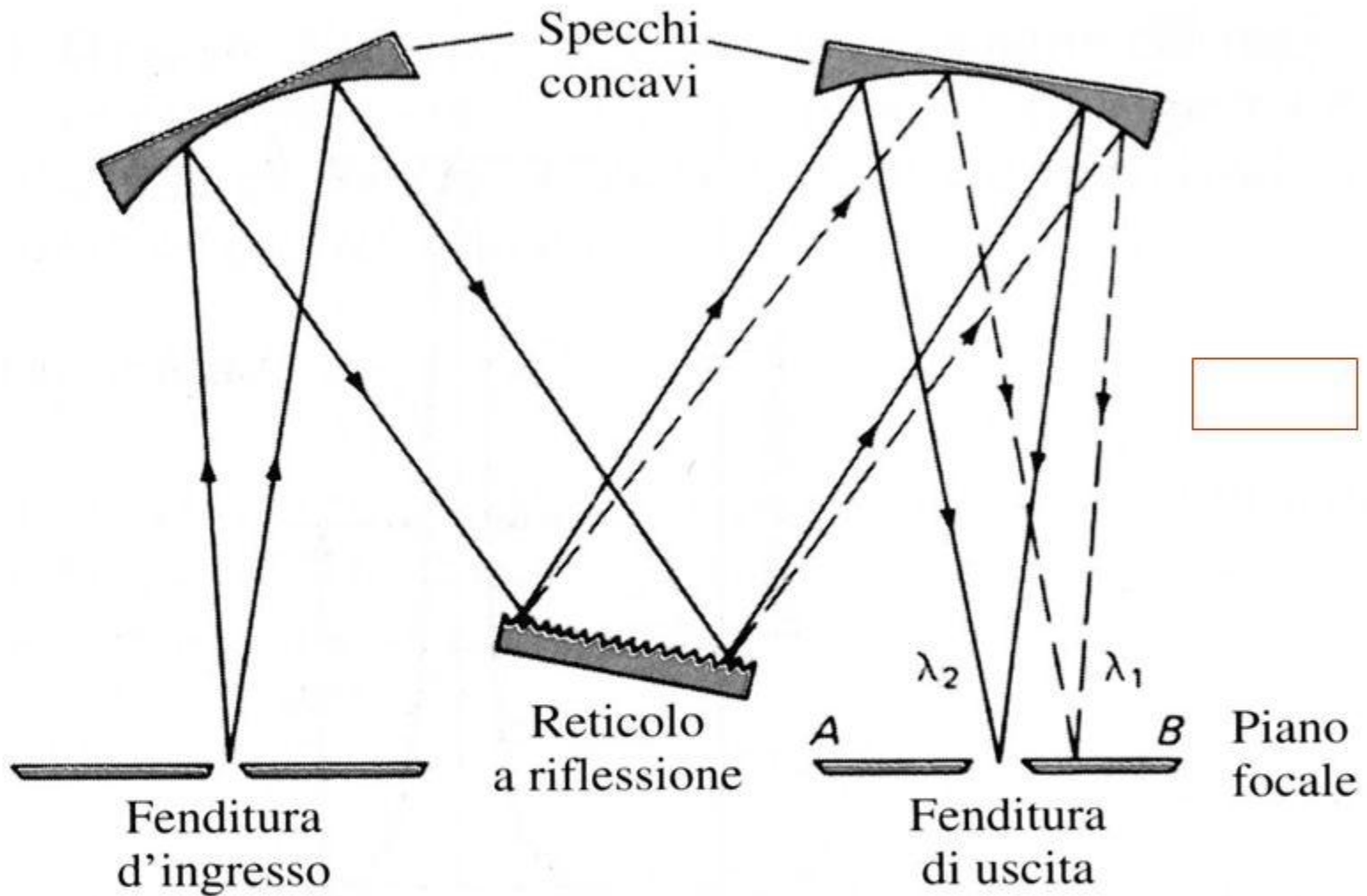


Angolo di Incidenza

Indice di rifrazione del mezzo

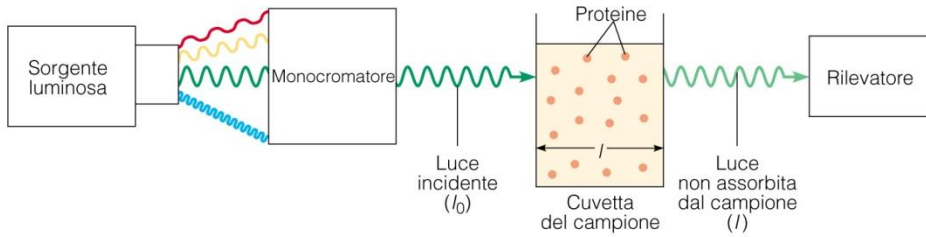
Indice di rifrazione è in funzione della lunghezza d'onda

**Ruotando il prisma si può selezionare e indirizzare verso la fenditura la radiazione ad un determinata lunghezza d'onda**



Monocromatore a reticolo di riflessione.

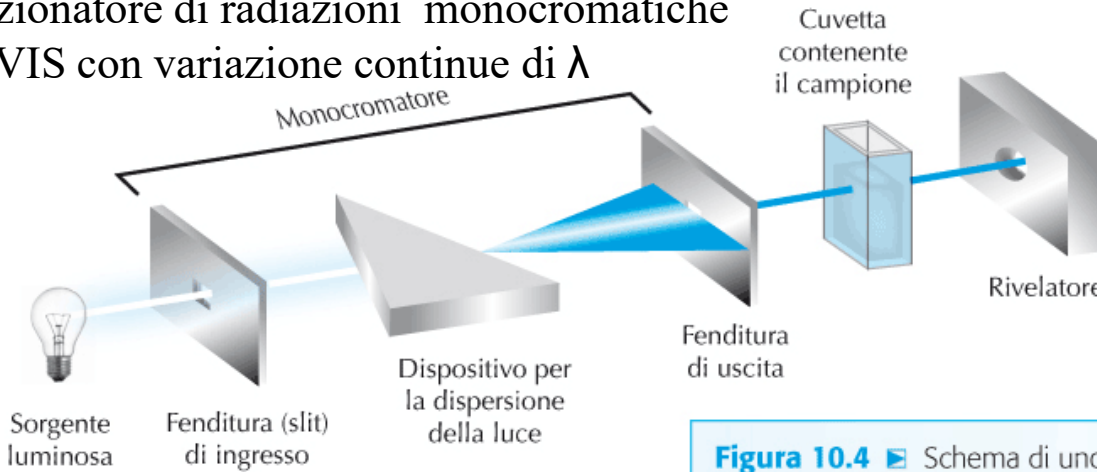
Si basa sul fenomeno della diffrazione che avviene su una superficie riflettente (reticolo)



$$A = \log_{10} I_0/I$$

I = Intensità della luce trasmessa dal campione

## Selezionatore di radiazioni monocromatiche UV-VIS con variazione continua di $\lambda$

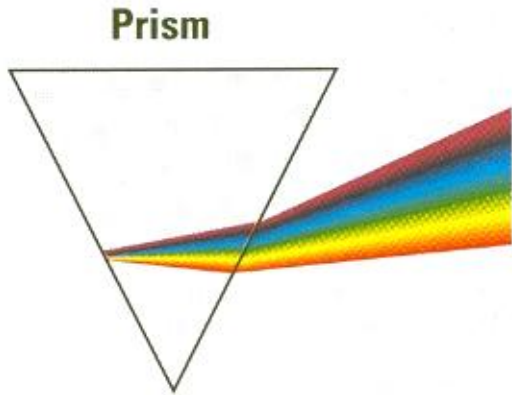


**Figura 10.4** ▶ Schema di uno spettrofotometro a singolo raggio.

### Rivelatore o fotocella

(superficie sensibile ai fotoni che genera una corrente elettrica proporzionale all'intensità di luce che la colpisce)

(a)



**Rifrazione:** le radiazioni elettromagnetiche a diversa  $\lambda$  della luce bianca  $\neq$  velocità e  $\neq$  direzione di propagazione nel vetro o nel quarzo rispetto all'aria  
Maggiormente deviate radiazioni  $\lambda <$

Reticolo di diffrazione



**Diffrazione:** avviene x riflessione su una superficie metallica che presenta incise una serie di sottili linee con distanza dello stesso ordine di grandezza di  $\lambda$  della radiazione incidente.

**Dispositivi per la dispersione della luce**

## RIVELATORE

PRODUCE UN SEGNALE ELETTRICO PROPORZIONALE ALL'ENERGIA DELLA RADIAZIONE DA CUI VIENE COLPITO:

-CELLE FOTOVOLTAICHE E FOTOCONDUTTIVE

-- FOTOTUBI E FOTOMOLTIPLICATORI

-FOTODIODI

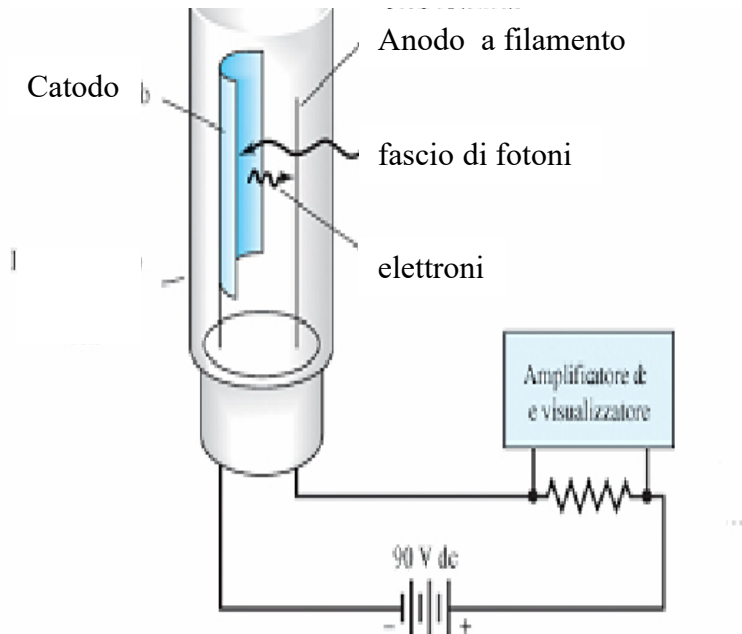
# Fototubo

Tubo di vetro o quarzo (sotto vuoto)

Anodo a filamento

Catodo semicilindrico

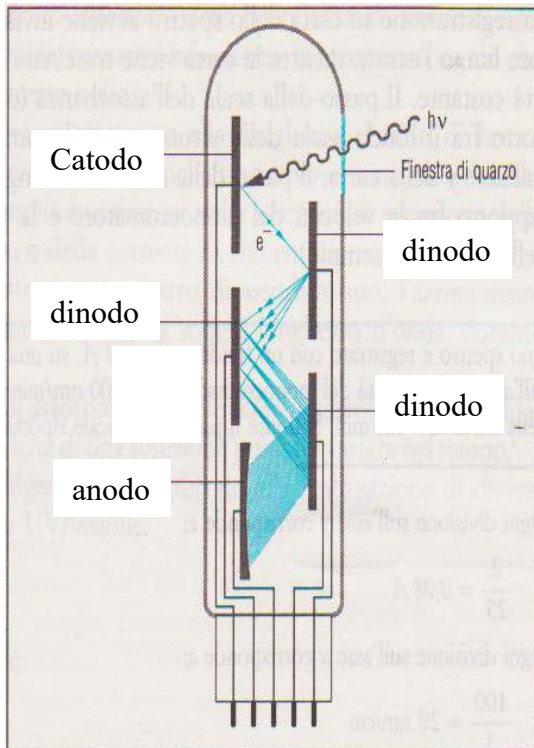
Il fascio di fotoni  $\rightarrow$  catodo (che emette elettroni che vengono attratti dall'anodo)



190-1000nm

# FOTOMOLTIPLICATORE

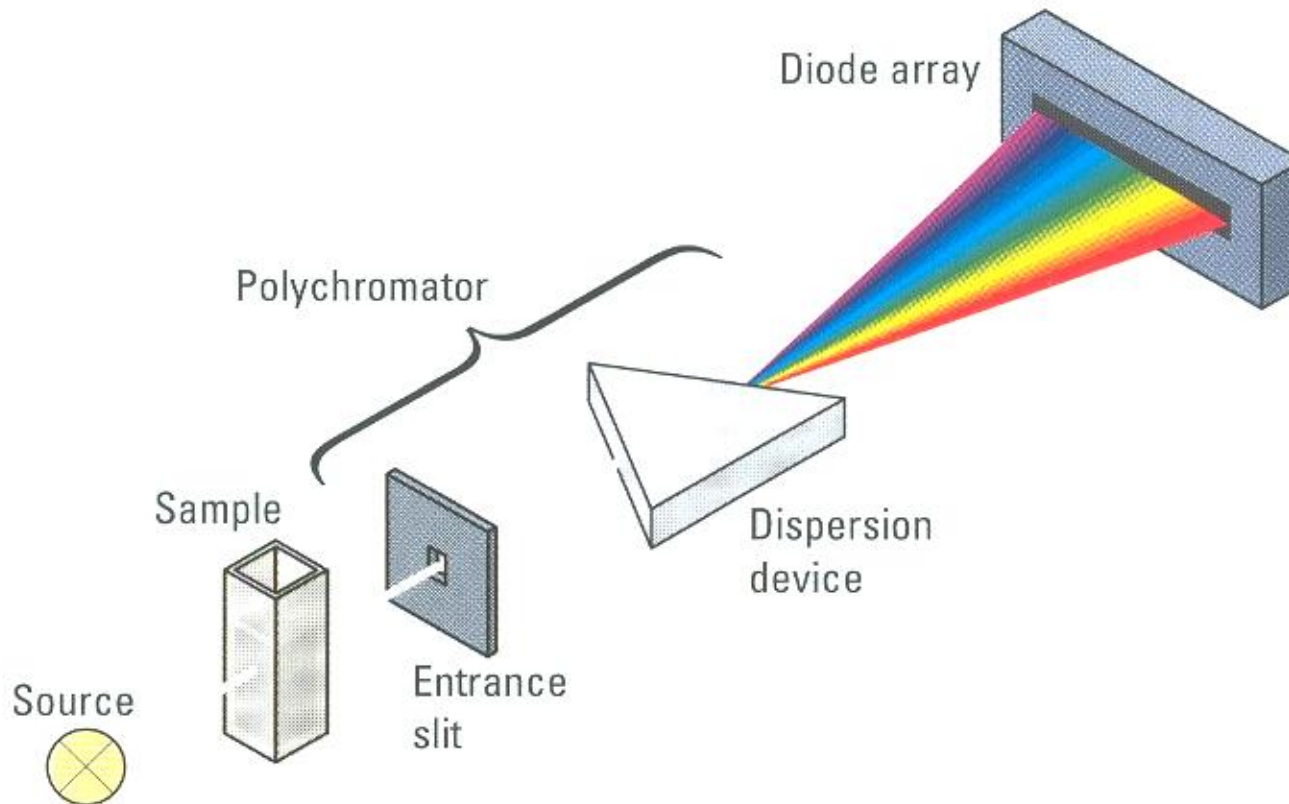
- Il fascio di fotoni  $\rightarrow$  catodo (vengono accelerati verso il primo dinodo)
- Dal primo dinodo altri elettroni vengono accelerati verso il secondo dinodo etc..
- Il segnale viene amplificato dalla cascata di dinodi.



Al posto dell'anodo a singolo filamento (fototubi) sono presenti dei dinodi

# Fotodiodi

**Rivelatore è composto da 500-1000 elementi allineati in serie (fotodiodi) -  
Permette un'acquisizione molto rapida da 190 a 820 nm in 100 msec.**



**spettrofotometro a Fotodiodi** – ottica invertita

# CLASSIFICAZIONE SPETTROFOTOMETRI

Esistono diversi tipi di spettrofotometro, a seconda di come sono organizzate le varie componenti:

## ♥ SPETTROFOTOMETRI MONORAGGIO

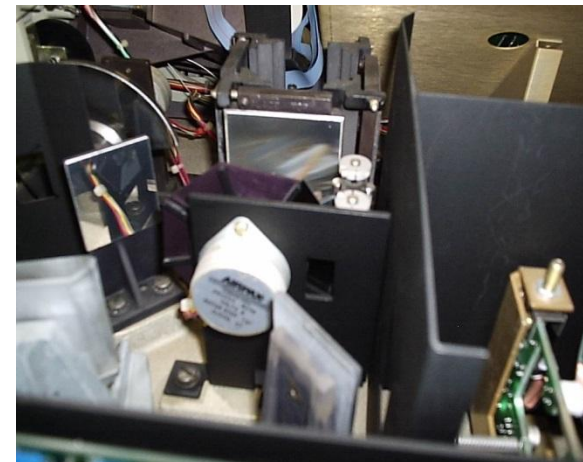
## ♥ SPETTROFOTOMETRI A DOPPIO RAGGIO

### Gli SPETTROMETRI MONORAGGIO

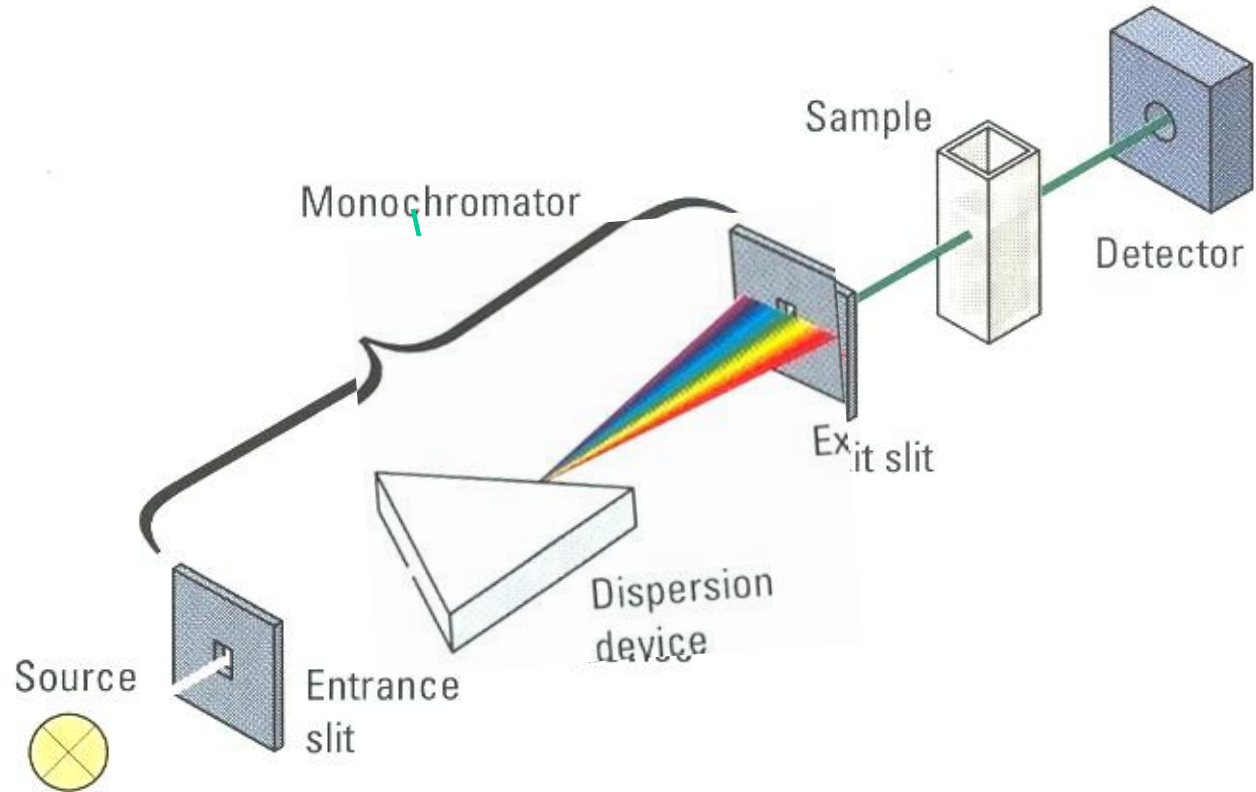
Per ogni misura è necessario misurare l'assorbimento del bianco e poi sottrarlo al campione.

### SPETTROFOTOMETRI A DOPPIO RAGGIO

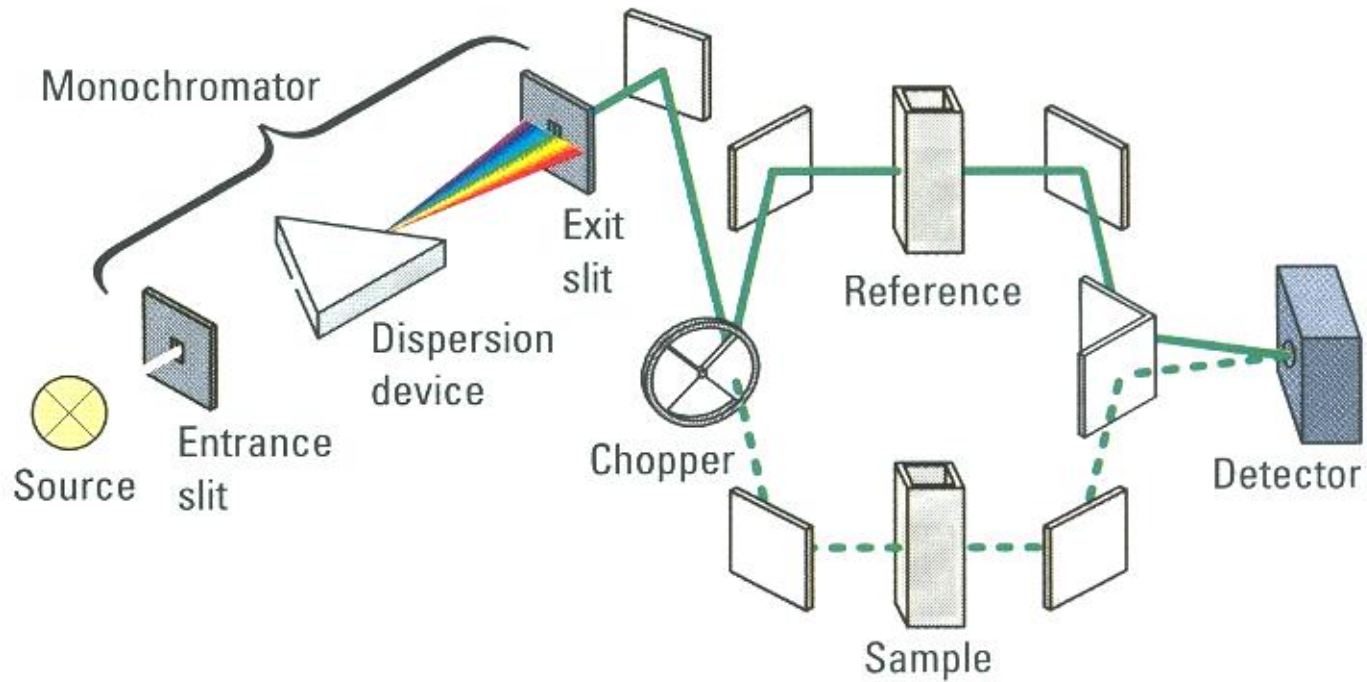
Vengono inviati due raggi, uno al campione e uno al bianco contemporaneamente



# spettrofotometro MONORAGGIO



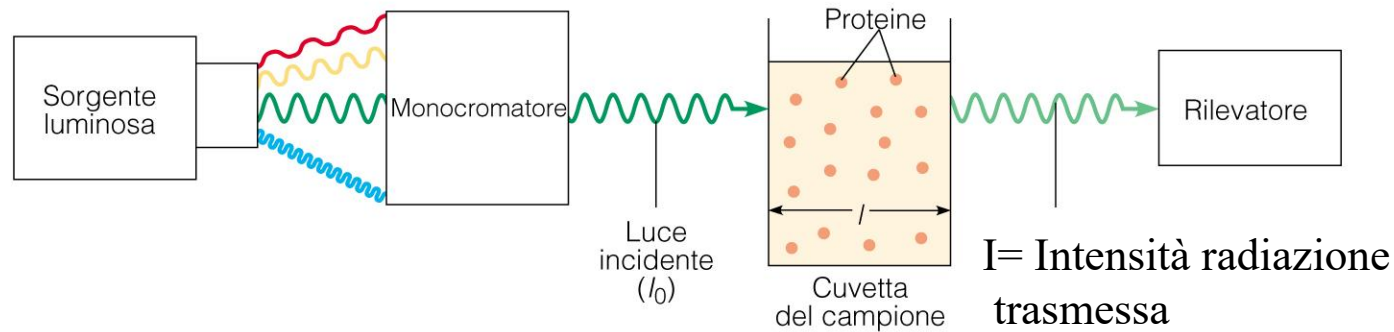
## spettrofotometro a doppio raggio



Azzeramento bianco contro bianco  
Lettura campione contro bianco

Si riducono gli errori di misurazione causati da fluttuazioni di  $I_0$  (sorgente luminosa) o da cambiamenti della sensibilità del sistema di rivelazione

# STRUMENTAZIONE x analisi in spettroscopia UV/VIS



1) Monocromatore seleziona singole  $\lambda$  → **fotometro UV/VIS\***

2) Monocromatore seleziona  $\lambda$  UV/VIS con variazione continua  
prisma o reticolo di diffrazione      **spettrofotometro UV/VIS**

\*Se monocromatore = filtro colorato → **colorimetro - solo VIS**

## Analisi in Spettroscopia UV-VIS:

Misure di **Assorbimento a lunghezza d'onda fissa**

Fotometro



Analisi quantitative

Misure di **Assorbimento in funzione della lunghezza d'onda**

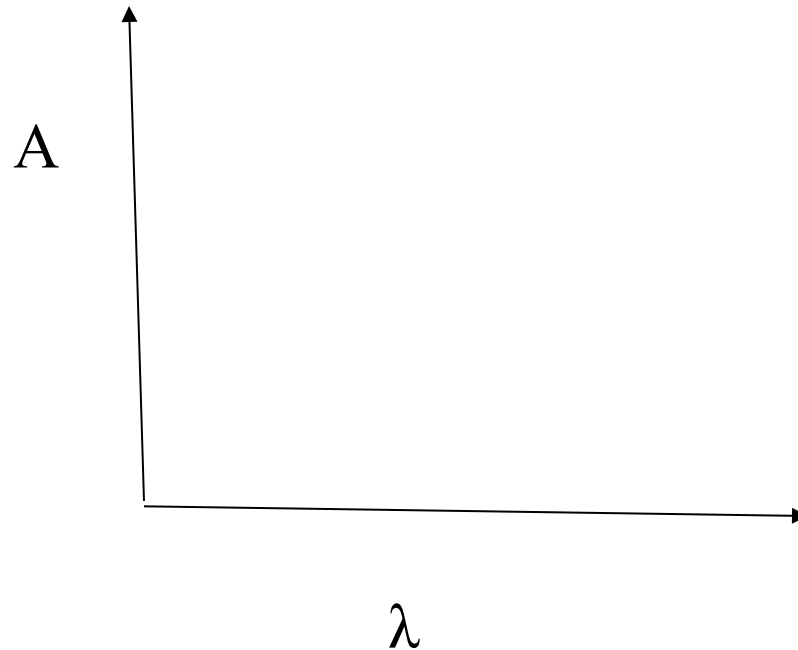
Spettrofotometro



Analisi qualitative e quantitative  
(spettro di Assorbimento)

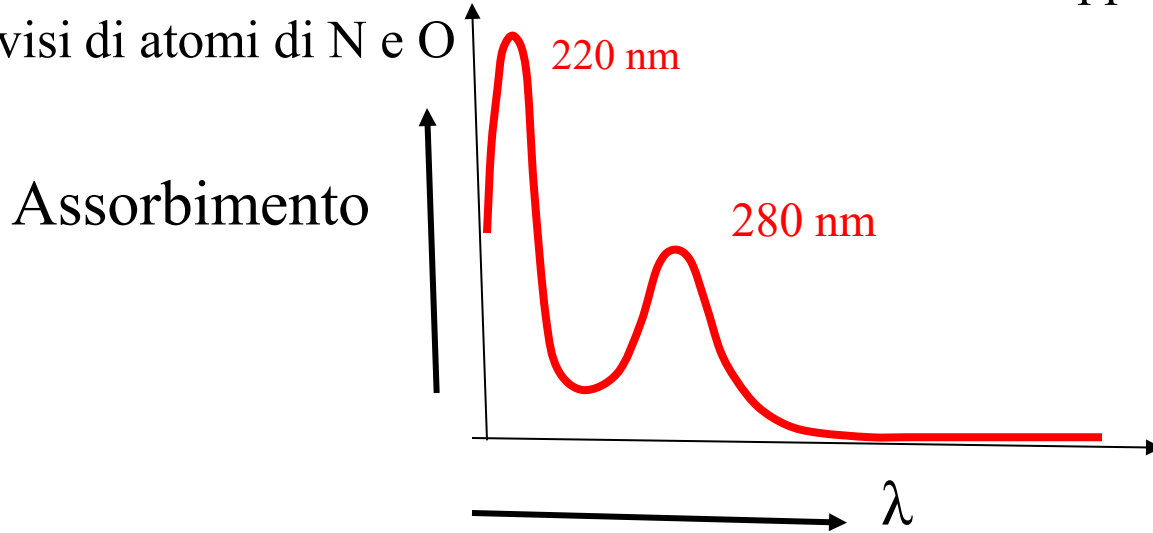
**ANALISI QUALITATIVE:** **spettro di assorbimento** = grafico che riporta i valori di  $A$  di una soluzione di un dato analita in funzione della lunghezza d'onda della radiazione elettromagnetica incidente.

Viene utilizzato per riconoscere gli analiti presenti in soluzione



## ANALISI QUALITATIVE: spettro di assorbimento =

Spettri di assorbimento UV/VIS derivano da transizioni degli elettroni più esterni, generalmente da elettroni delocalizzati  $\pi$  di C=C e da doppietti elettronici non condivisi di atomi di N e O



### LEGAME PEPTIDICO:

- Transizione elettroni di legame  $\pi \rightarrow$  assorbimento di radiazioni con  $\lambda = 190 \text{ nm}$
- Doppietti elettronici non di legame su O, N, S  $\rightarrow$  assorbimento di radiazioni con  $\lambda = 210\text{-}220 \text{ nm}$

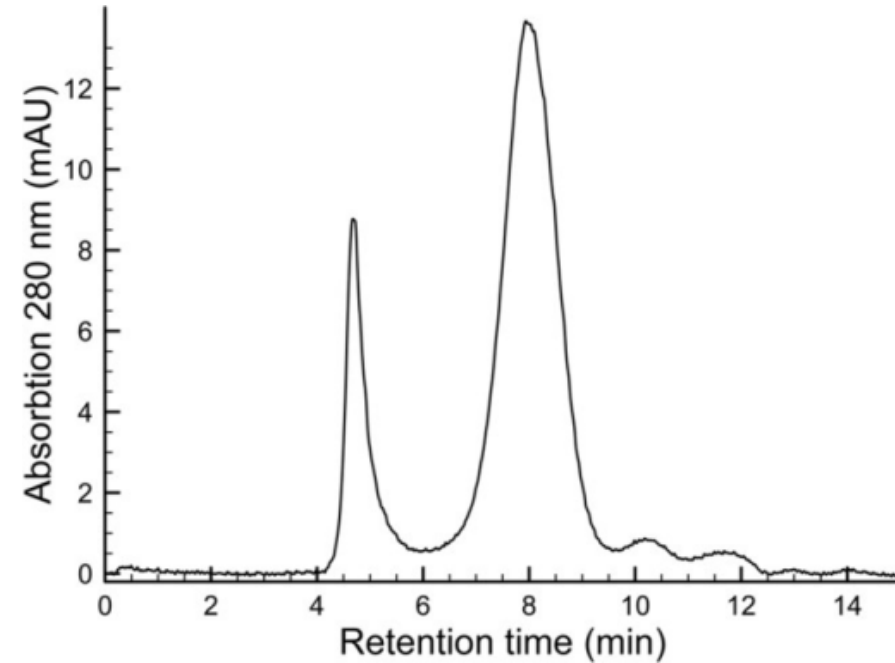
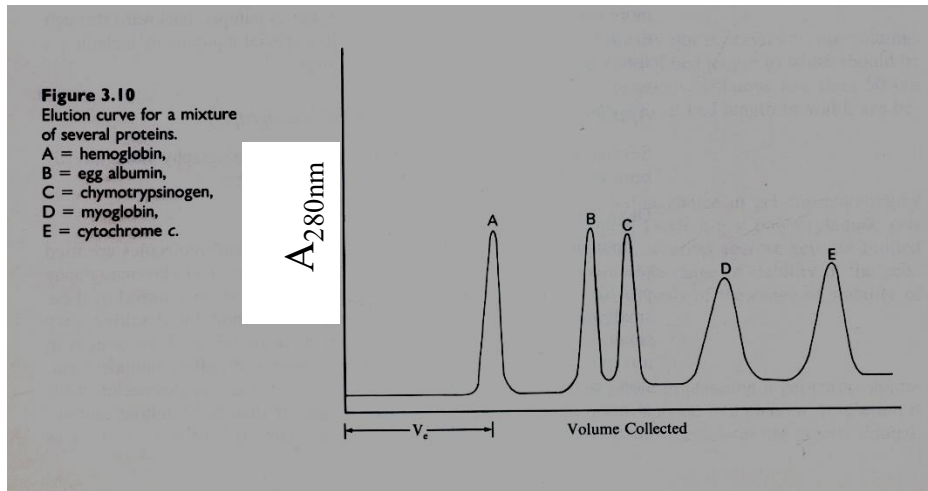
### AA AROMATICI:

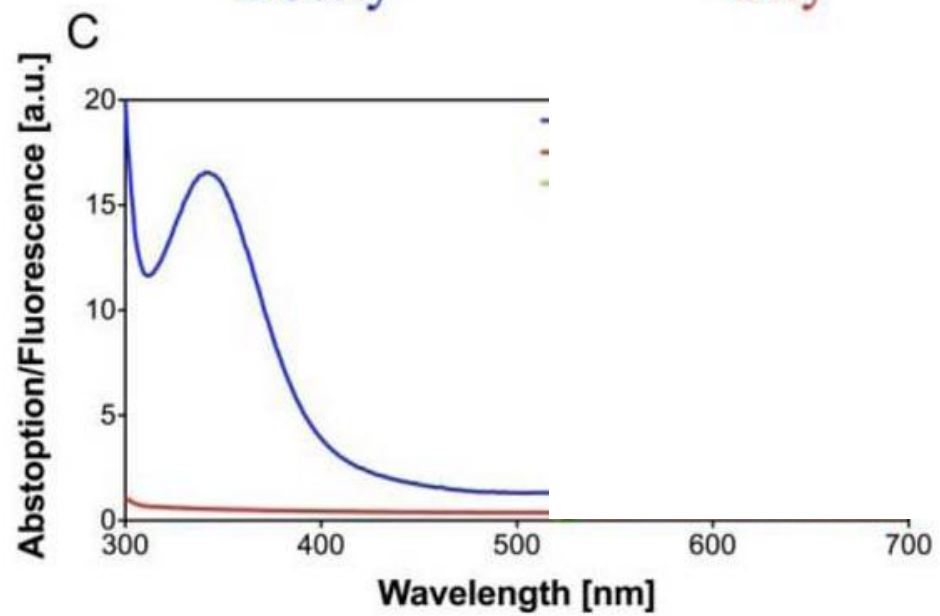
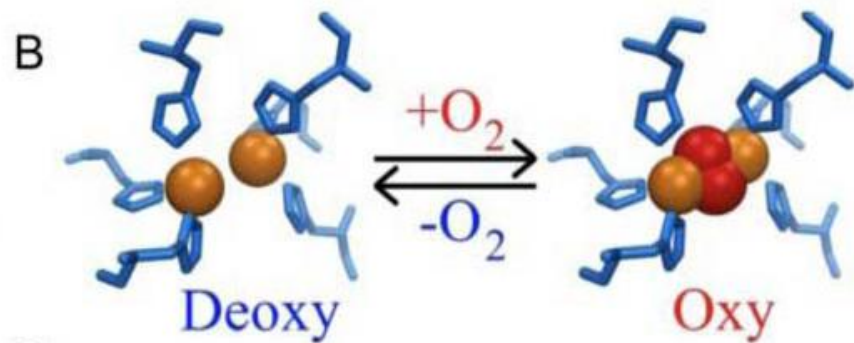
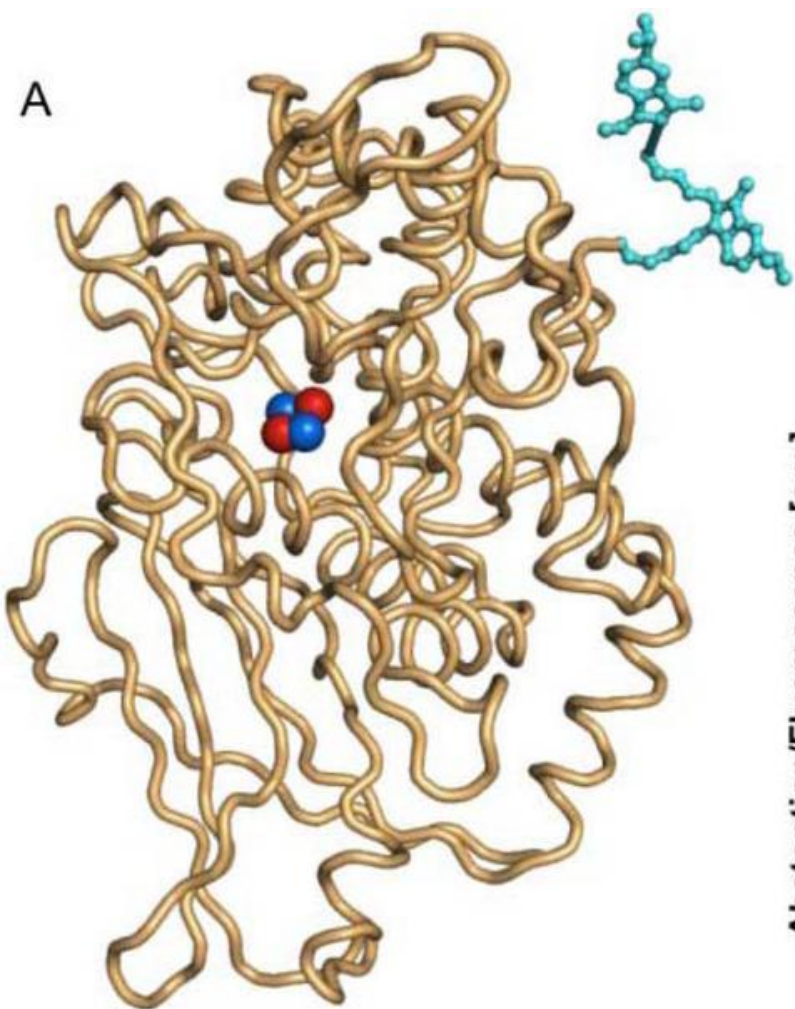
- Phe, Tyr, Trp assorbono a  $\lambda > 230 \text{ nm}$  p.es 260 nm, 280 nm

Nei diversi tipi di cromatografia il grafico di eluizione ottenuto riportava:

ascissa : volume, n° provette

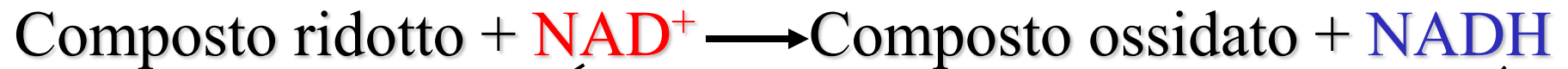
ordinata : assorbimento a 280 nm



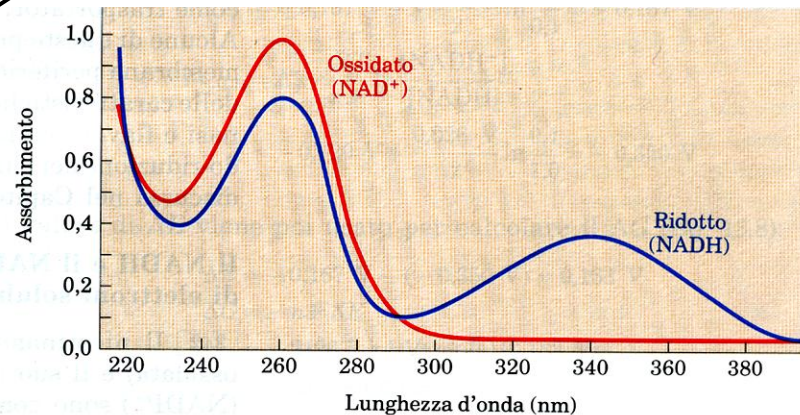


Le reazioni che richiedono nucleotidi piridinici sono molto usate nei metodi enzimatici di analisi.

Tali coenzimi (NAD, NADH, NADP, NADPH) sono ideali perché sono usati stechiometricamente in un gran numero di reazioni di ossido-riduzione.

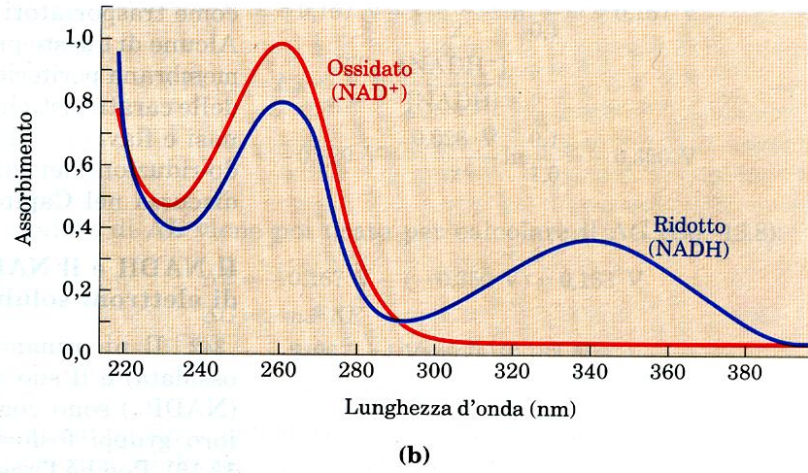
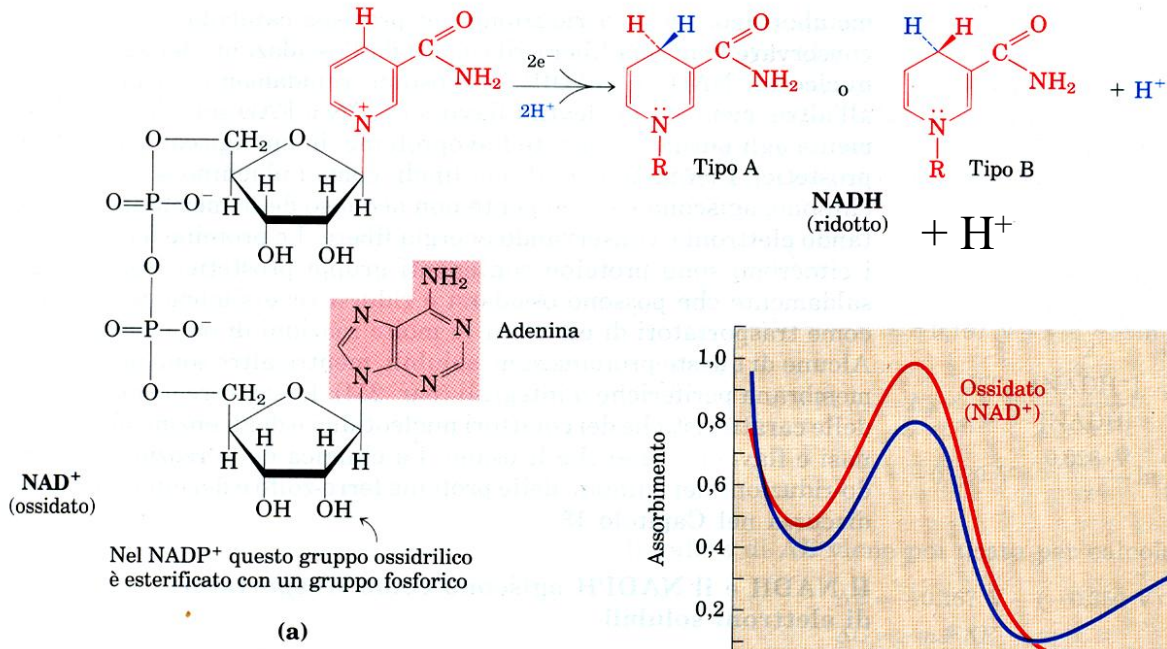


**NAD<sup>+</sup>**  
(non assorbe a 340 nm)



**NADH**  
(assorbe a 340 nm)

Saggio enzimatico non specifico, dal momento che evidenzia tutti gli enzimi che usano come coenzima il NAD<sup>+</sup>.



## Analisi in Spettroscopia UV-VIS:

Misure di **Assorbimento a lunghezza d'onda fissa**

Fotometro



Analisi quantitative

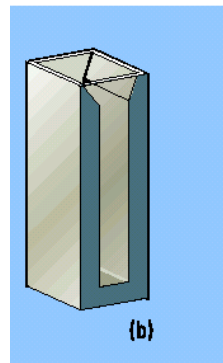


Misure di **Assorbimento in funzione della lunghezza d'onda**

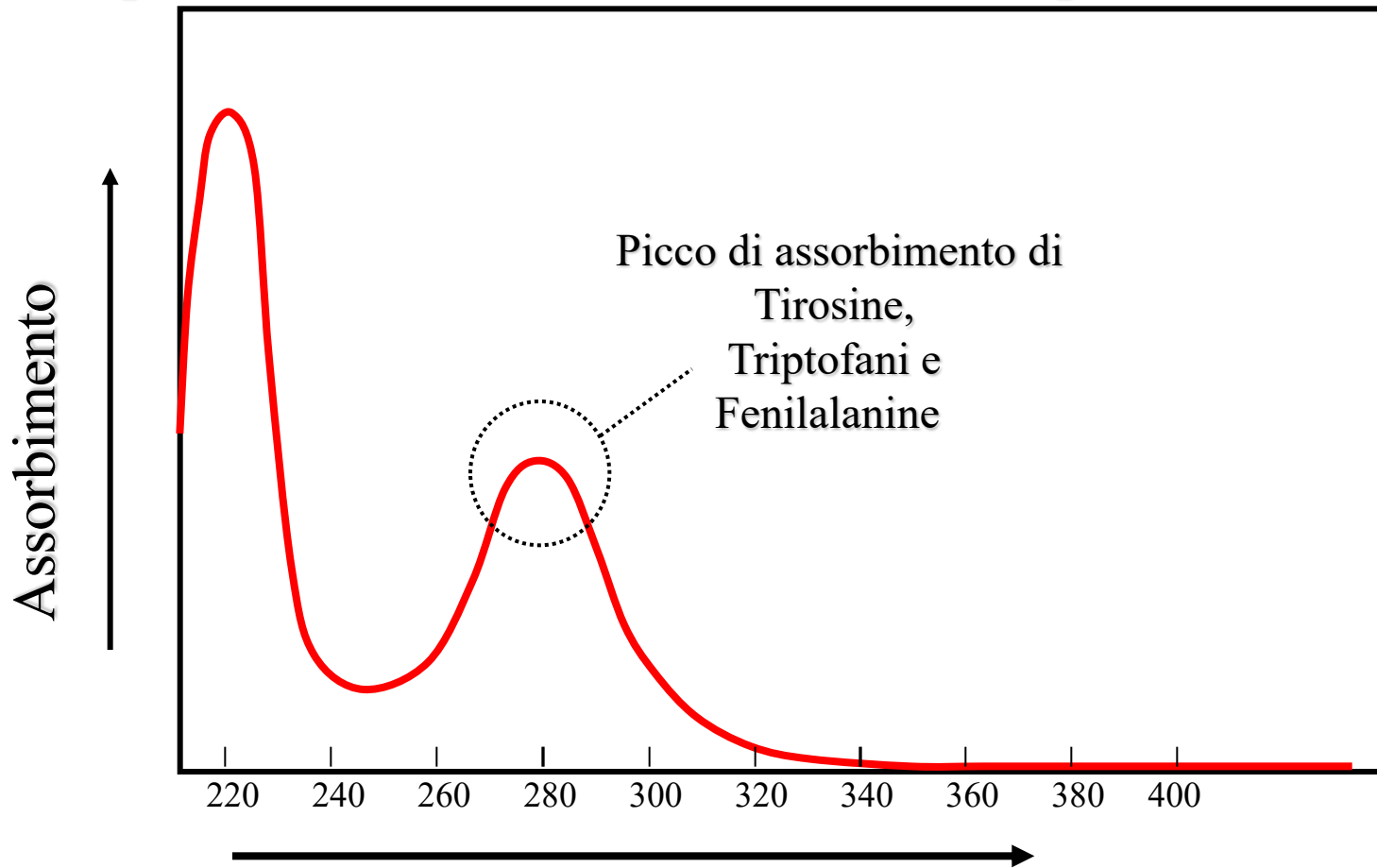
Spettrofotometro



Analisi qualitative e quantitative  
(spettro di Assorbimento)



## Spettro di assorbimento UV-VIS di una proteina

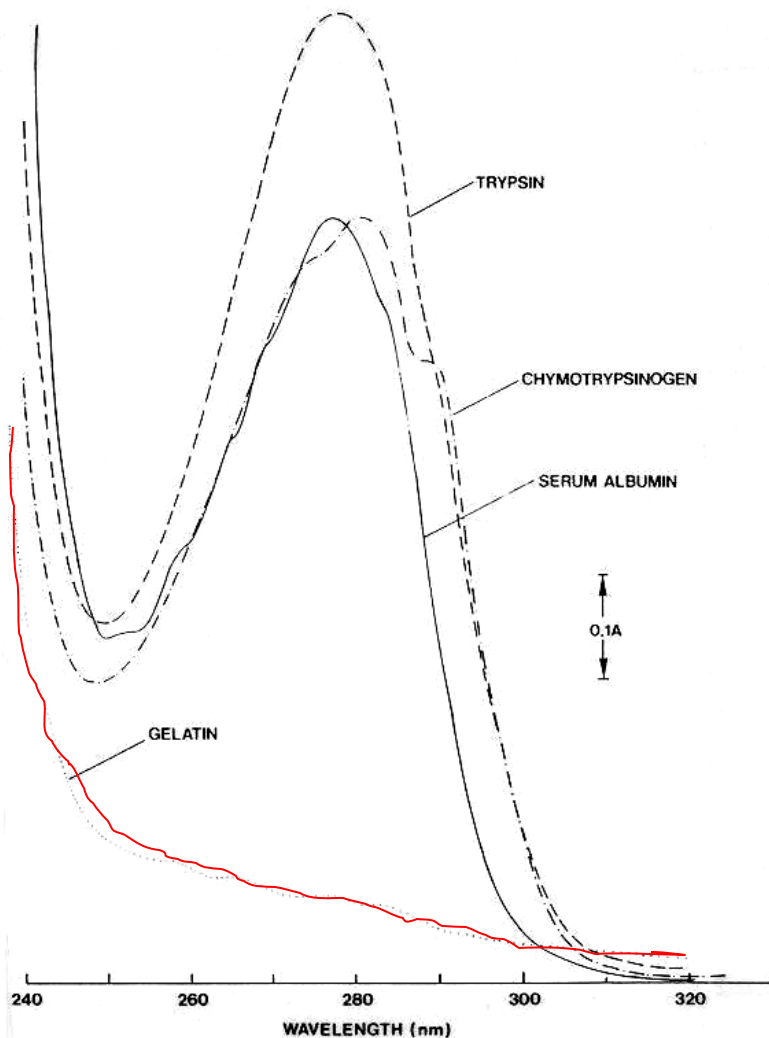


Lunghezza d'onda "λ" (nm)

UV = 200 nm – 350 nm

**Maggiore è il numero dei doppi legami coniugati, maggiore è la λ di assorbimento ->VIS**

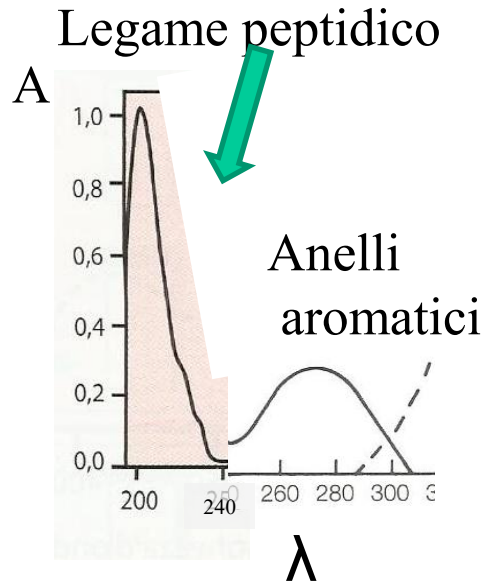
# Spettro Ultravioletto delle proteine



Spettro di assorbimento di quattro proteine:

- La **tripsina** ha un alto contenuto in tirosina,
- l' **albumina** ha un alto contenuto in fenilalanina,
- il **chimotripsinogeno** ha un alto contenuto in triptofano
- la gelatina (**collagene**) ha un basso contenuto in tutti e tre questi aminoacidi.

- UV
- Legami peptidici della catena polipeptidica: 180-230 nm, normalmente si utilizza A<sub>214</sub> o A<sub>220</sub> nm
  - Catene laterali di aa aromatici: A = 276 nm, normalmente si usa A = 280 nm



UV

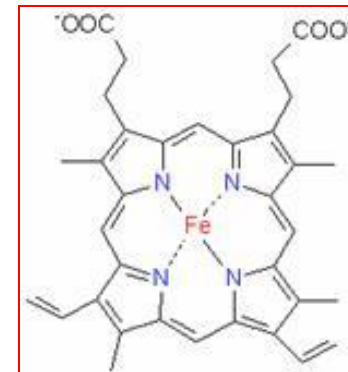
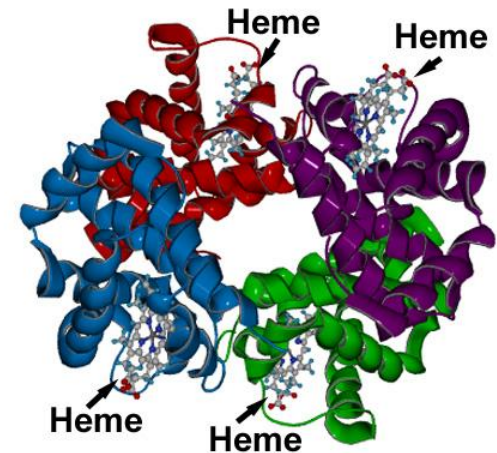
# Emoglobina

L'**emoglobina** è una proteina:

1. **globulare** presente nei globuli rossi ed ha la funzione di trasportare l'ossigeno nel sangue.

2. **tetramerica** costituita da quattro catene polipetidiche (**subunità**).

Nella molecola di **emoglobina** ciascuna subunità lega un **gruppo eme**

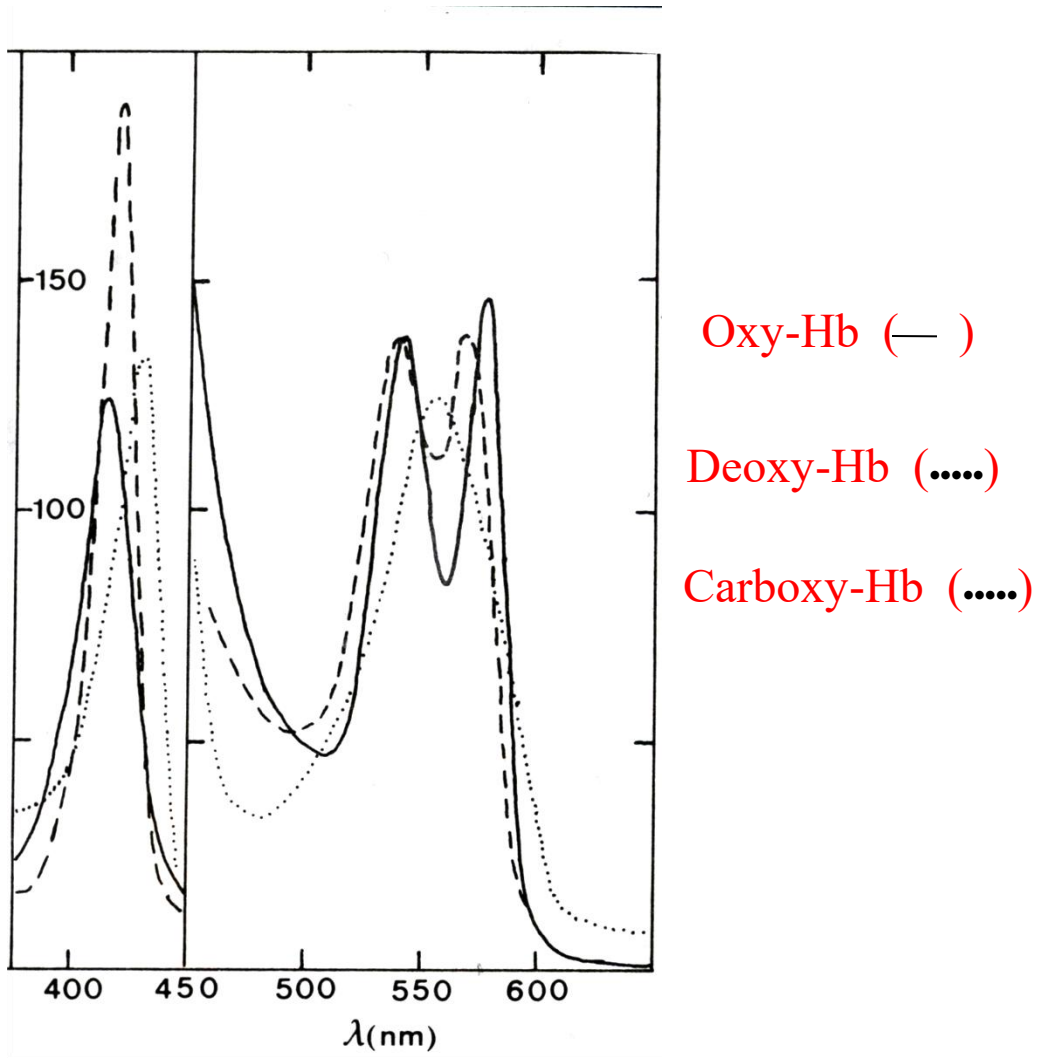
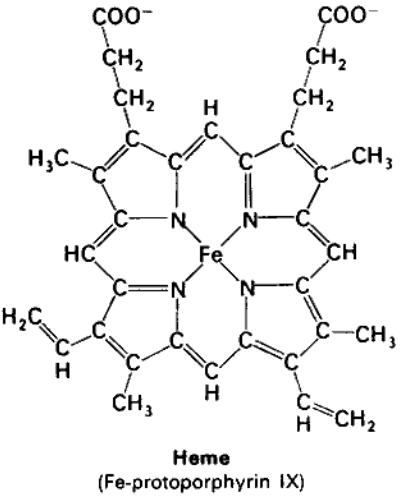


Eme: gr. cromoforo

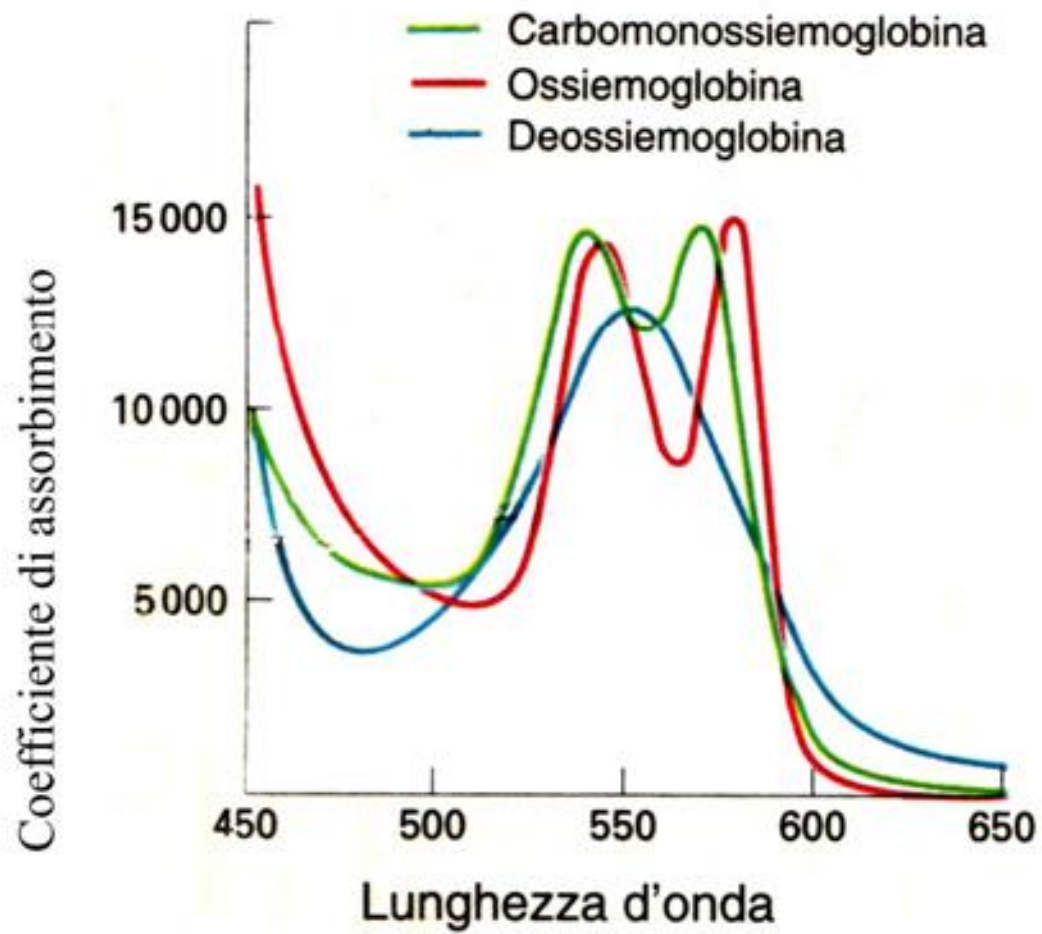
**Gruppi cromofori:** porzioni delle molecole che hanno la capacità di assorbire radiazioni UV/VIS

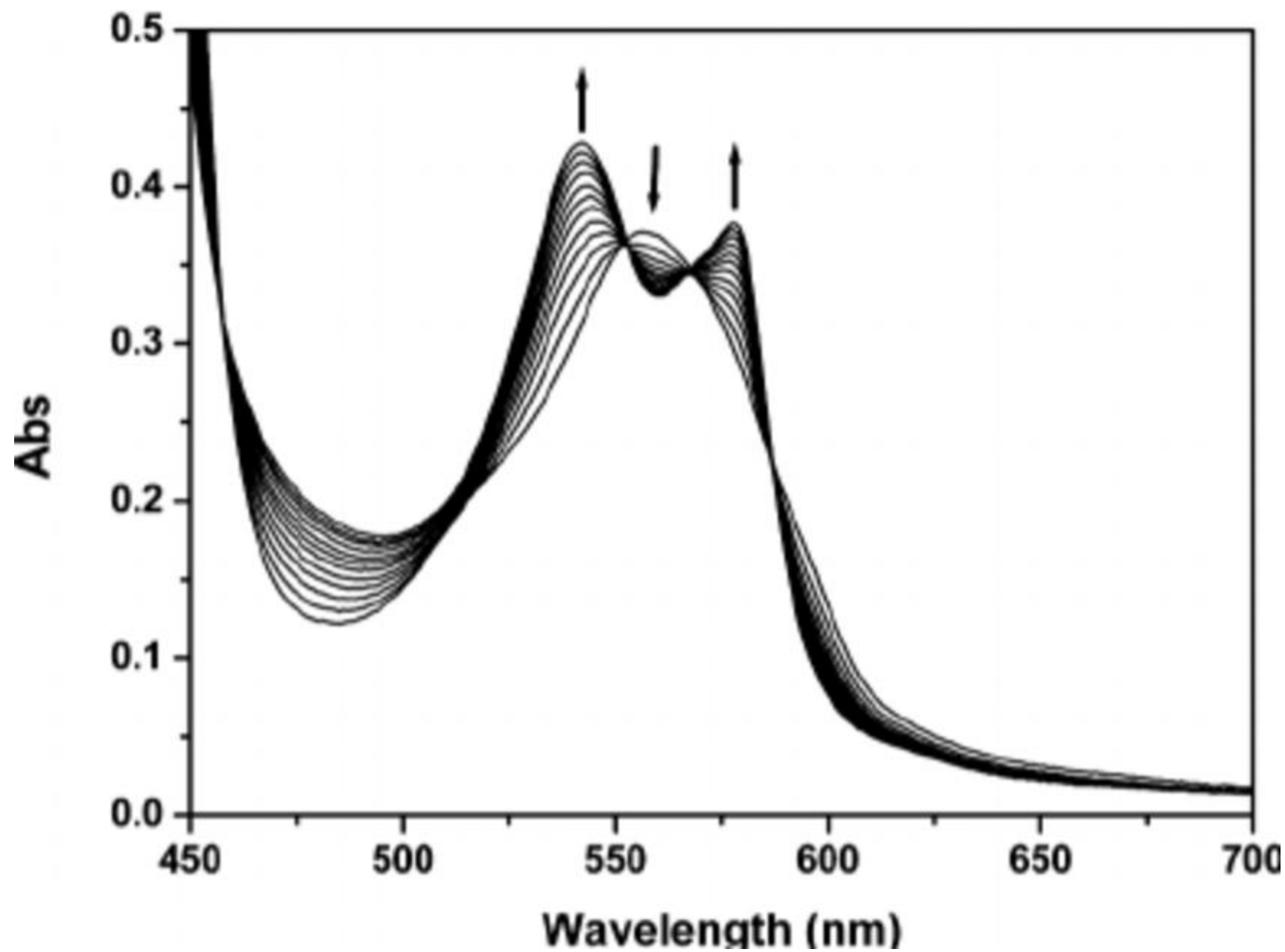
**VIS** •Gruppi prostetici (proteine coniugate): p.es gruppo eme 410-415 nm, 500-600 nm

### Proteina coniugata: Hb



**Maggiore è il numero dei doppi legami coniugati, maggiore è la λ di assorbimento - >VIS**

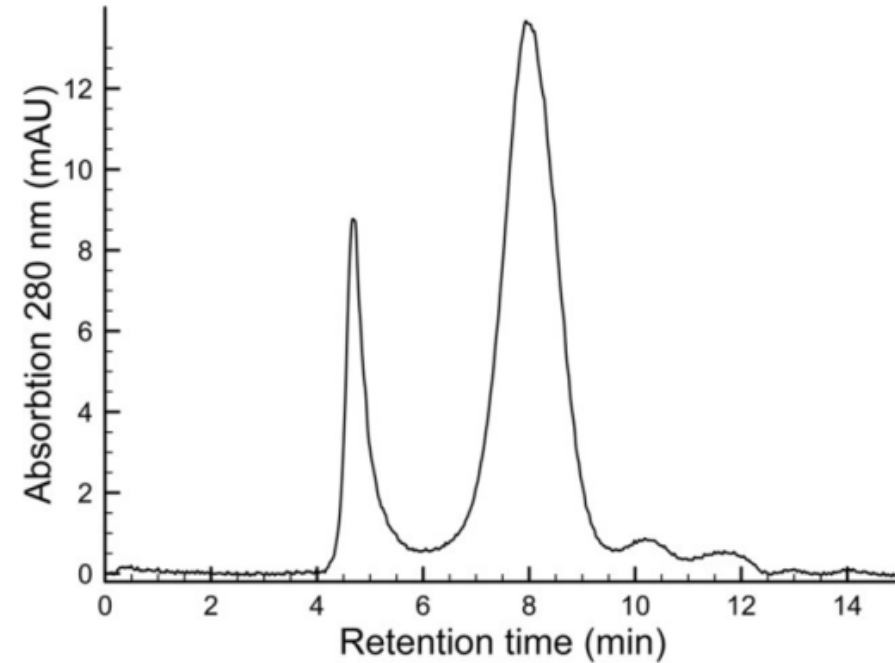
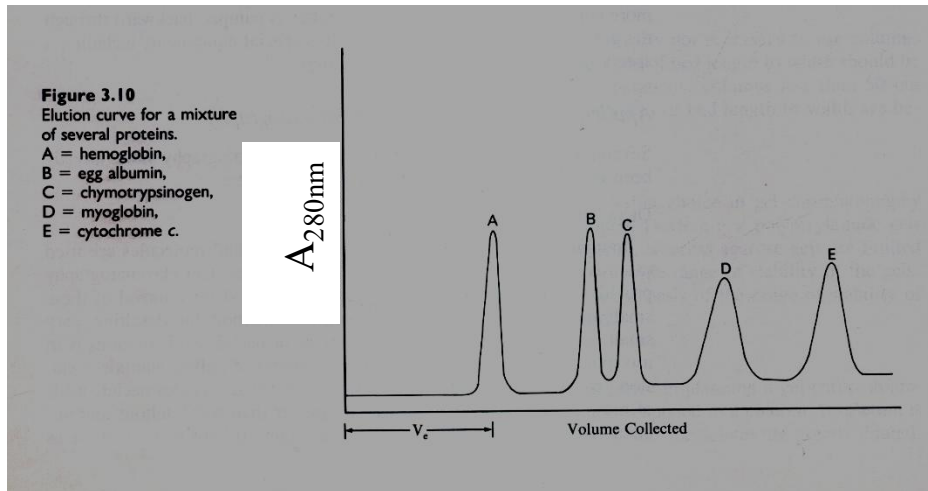




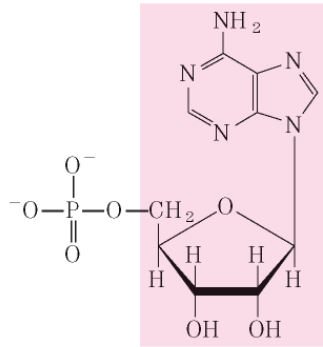
Nei diversi tipi di cromatografia il grafico di eluizione ottenuto riportava:

ascissa : volume, n° provette

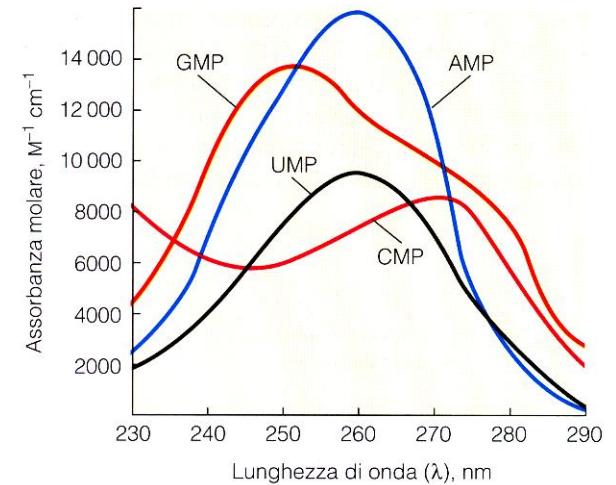
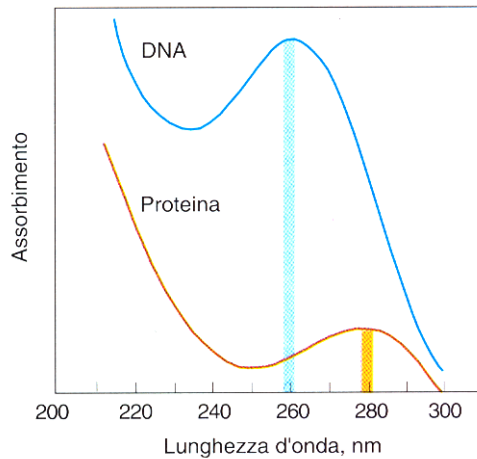
ordinata : assorbimento a 280 nm



# Spettri di assorbimento degli acidi nucleici



**Nucleotide:** Adenilato (adenosina 5'-monofosfato)  
**Simboli:** A, AMP  
**Nucleoside:** Adenosina



$A_{260 \text{ nm}}$   
 ----- = 1.8 – 2.0      soluzioni di DNA pure o con buona purezza

$A_{280 \text{ nm}}$

$A_{260 \text{ nm}}$   
 ----- < 1.6      soluzioni di DNA contaminate da proteine

$A_{280 \text{ nm}}$

# ANALISI QUANTITATIVE

1) Determinazione della concentrazione di una soluzione di un analita puro se si conosce il valore di  $\epsilon$  dell'analita

**Legge di Lambert-Beer**

$$A = \underline{\epsilon} \cdot l \cdot \underline{c}$$

2) Determinazione della concentrazione di una soluzione di un analita puro se non si conosce il valore di  $\epsilon$  dell'analita

# 1) Determinazione della concentrazione di una soluzione di un analita puro se si conosce il valore di $\epsilon$ dell'analita

Se  $\epsilon_\lambda$  è noto ????

$\epsilon_\lambda$  = coefficiente di estinzione molare [ $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]

$$\epsilon_{540}^{\text{mM}} \text{HbO}_2 = 13.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

risulta che  $A_{540} = 13.5$

Assorbimento di una soluzione  
1mM di HbO<sub>2</sub> e cammino ottico 1cm

Calcolare la concentrazione e i mg/mL di una soluzione di Hb con un  $A_{540} = 0.135$

**legge di Lambert-Beer**      **$A = \epsilon \cdot l \cdot c$**

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot l}$$

**Se  $l = 1 \text{ cm}$**

$$c = \frac{A}{\epsilon}$$

**$A_{540} = 0,0135$**

$$c = \frac{0.135}{13.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}} = 0.01 \text{ mM}$$

Il coefficiente di estinzione può essere espresso come:

- coefficiente di estinzione molare
- coefficiente di estinzione millimolare
- coefficiente di estinzione %  $\rightarrow 1\% = 1\text{g}/100\text{ mL}$



$$\epsilon_{540}^{\text{mM}} \text{HbO}_2 = 13.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\bullet \epsilon_{540}^{\text{mg/ mL}} = 0,868$$

$$\epsilon_{540}^{\text{mM}} \text{HbO}_2 = 13.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$\text{Hb con un } A_{540} = 0.135$

$$c = \frac{A}{\epsilon}$$

$$c = \frac{0.135}{13.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}} = 0.01 \text{ mM}$$

$\epsilon$  (eme)

$\text{PM}_{\text{Hb}} = 64000$

$\text{PM}_{\text{Hb (eme)}} = 16000$

$$[\text{mg/mL}] = 0.01 \times 16.0 = 0.16 \text{ mg/mL} = 0.16 \text{ g/L}$$

Utilizzando l'estinzione in mg/mL

$$\epsilon_{540}^{\text{mg/mL}} = 0,868 \quad c = \frac{0.135}{0.868} = 0.16 \text{ mg/mL}$$

$$[\text{mM}] = \frac{0.16}{16} = 0.01 \text{ mM [eme]}$$

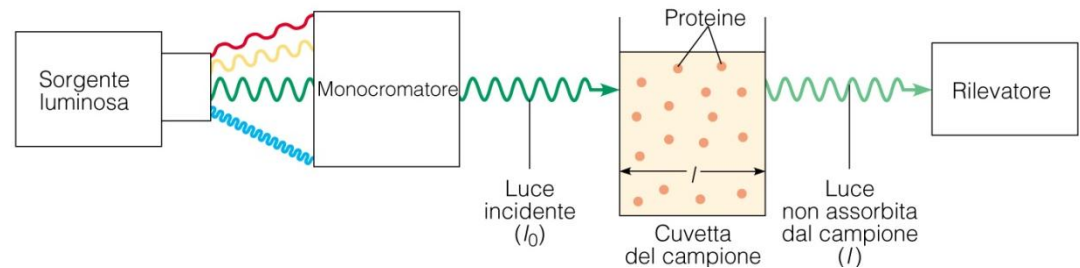


$$[\text{Hb}] = 0.0025 \text{ mM}$$

2) Determinazione della concentrazione di una soluzione di un analita puro se non si conosce il valore di  $\epsilon$  dell'analita

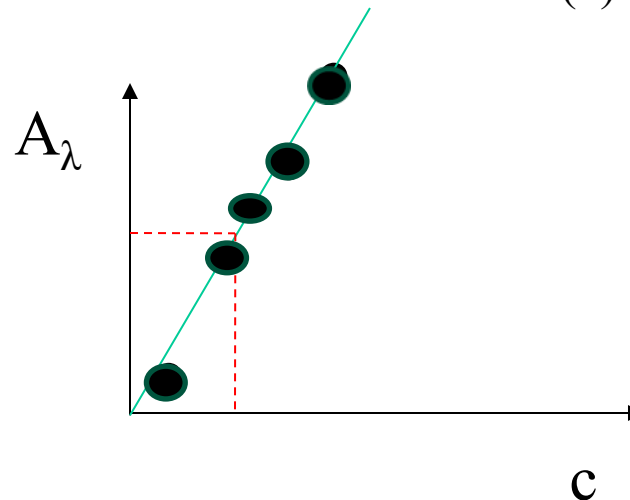
## Legge di Lambert-Beer

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

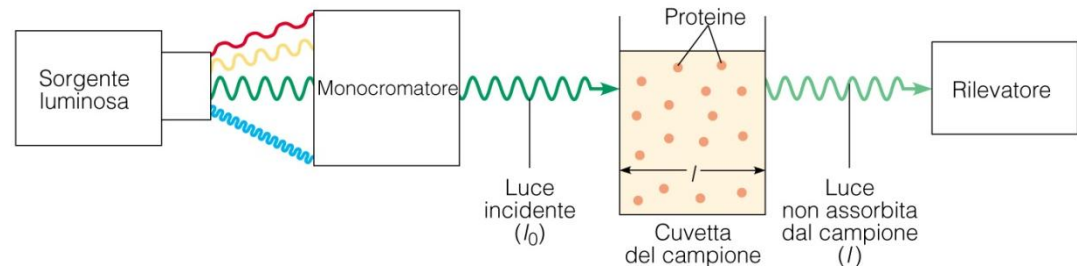


Per determinare la concentrazione incognita: costruisco una retta di calibrazione riportando i valori di  $A_\lambda$  di soluzioni di **quella proteina a concentrazioni note** (y) in funzione dei valori di concentrazione (x)

Retta standard

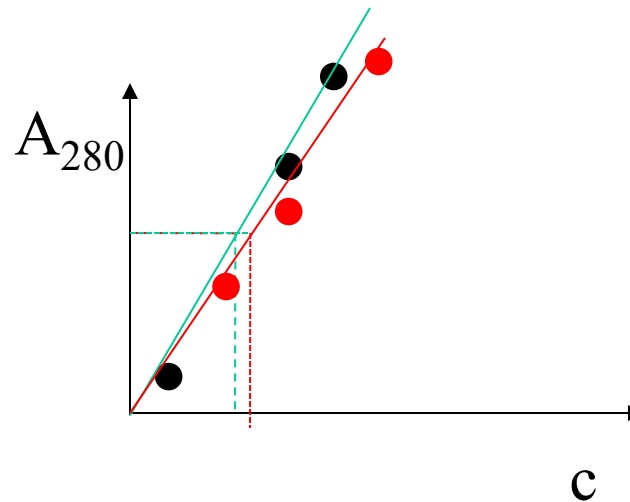


Può essere difficile disporre della proteina oggetto di studio pura e in polvere



Se non disponiamo dell'analita puro (**standard assoluto**)  
 dobbiamo scegliere un analita che abbia un comportamento  
 simile al nostro analita (**standard relativo**)

Retta standard



# Calcolo delle concentrazioni millimolari di $\text{NAD}^+$ e $\text{NADH}$

Una soluzione contenente una miscela di  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADH}$  presenta  $A_{340} = 0.207$  e  $A_{260} = 0.9$

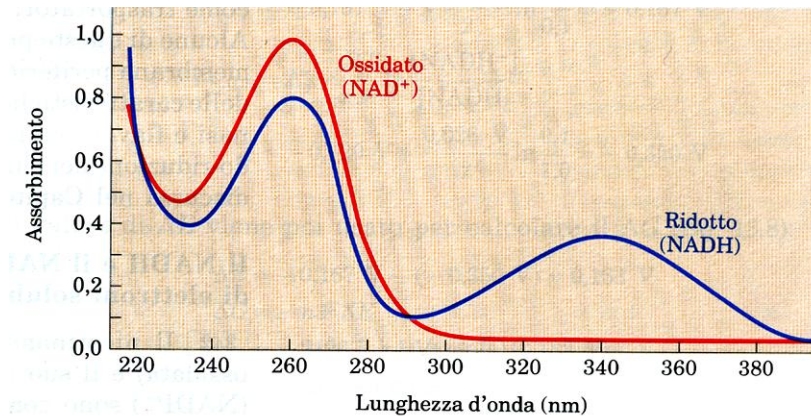
Conoscendo i coefficienti di estinzione:

$$\epsilon_{340}^{\text{mM}} \text{NADH} = 6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{260}^{\text{mM}} \text{NADH} = 18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{260}^{\text{mM}} \text{NAD}^+ = 18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Calcolare le concentrazioni millimolari della forma ossidata e ridotta



(b)

$$A_{340} = 0.207$$

$$\epsilon_{340}^{\text{mM}} \text{ NADH} = 6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$A_{260} = 0.9$$

$$\epsilon_{260}^{\text{mM}} \text{ NADH} = 18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{260}^{\text{mM}} \text{ NAD}^+ = 18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$[\text{NADH}] = \frac{A_{340}}{\epsilon_{340} \cdot l} = \frac{0.207}{6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}} = 0.0333 \text{ mM}$$

$$[\text{NAD}^+] + [\text{NADH}] = \frac{A_{260}}{\epsilon_{260} \times l} = \frac{0.9}{18 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}} = 0.05 \text{ mM}$$

$$[\text{NAD}^+] = 0.05 \text{ mM} - 0.0333 \text{ mM} = 0.0167 \text{ mM}$$

$$A_{\text{NADH } 260} = \epsilon_{260} \times l \times c = 18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 1 \text{ cm} \times 0.0333 \text{ mM} = 0.59$$

$$A_{\text{NAD}^+ 260} = 0.9 - 0.59 = 0.31$$

$$c_{\text{NAD}^+} = \frac{A_{\text{NAD } 260}}{\epsilon_{260} \times l} = \frac{0.31}{18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}} = 0.0167 \text{ mM}$$

# ANALISI QUANTITATIVE

Determinazione concentrazione totale di **proteine in miscela** : ???????

~~legge di Lambert-Beer?  $A = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$~~

coefficiente di estinzione ?????

Esistono diversi metodi per la determinazione della concentrazione delle proteine totali .

Noi utilizzeremo il **metodo di Bradford e altri**

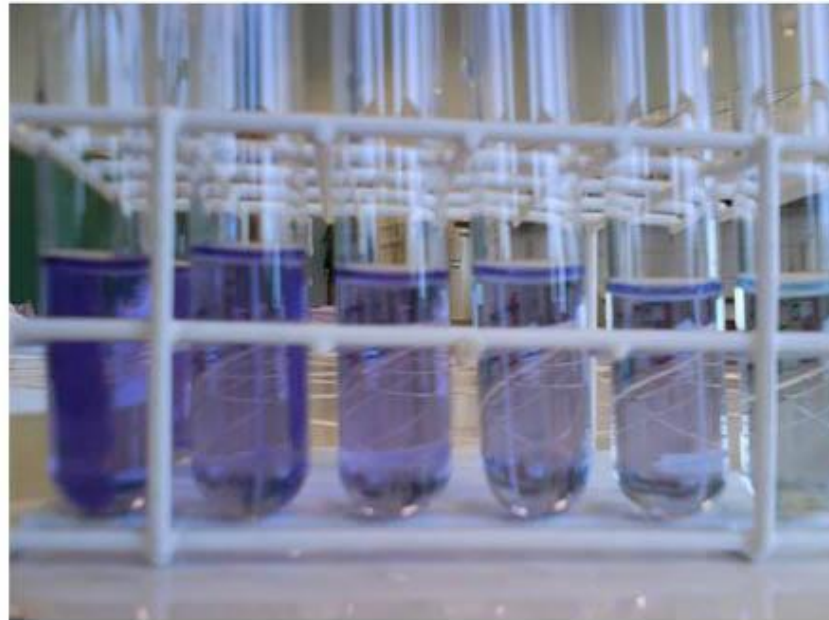
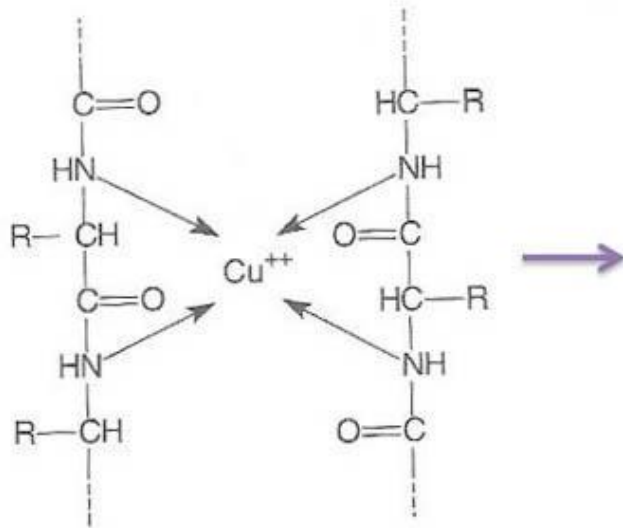
**Analisi quantitativa:** Determinazione della concentrazione delle proteine totali

- Metodo del **Biuret**
- Metodo di **Lowry**
- Metodo di **Bradford**
- Metodo dell'acido bicinconinico (**BCA**)
- Metodo del **2D-Quant**

# Analisi quantitativa: Determinazione della concentrazione delle proteine totali

## •Metodo del Biureto

- Il reattivo del biureto è costituito da una soluzione di **solfo di rame** alcalino contenente **potassio tartrato di sodio**



- In condizioni alcaline gli ioni rameici  $\text{Cu}^{2+}$  formano un complesso di coordinazione con quattro gruppi  $-\text{NH}$  presenti in altrettanti legami peptidici
- In seguito al legame il rame viene ridotto a  $\text{Cu}^+$
- Il complesso che si forma assorbe luce nel visibile, con un picco a 540 nm

# VANTAGGI

Metodo riproducibile

# SVANTAGGI

- Scarsa sensibilità: per concentrazioni inferiori ad 1 mg/ml
- Interferenza da parte di Sali

Non utilizzabile per campioni proteici ottenuti per precipitazione con solfato d'ammonio

## **Analisi quantitativa:** Determinazione della concentrazione delle proteine totali

### •Metodo di **Lowry**

- Consiste nella reazione del biureto, seguita dalla riduzione in condizioni alcaline del reagente di **Folin-Ciocalteu** (acidi misti di **fosfomolibdotungstato**)

**Reagisce con i gruppi fenolici della** tirosina, triptofano ed amminoacidi polari

- Il prodotto della reazione, eteropolimolibdeno, ha una forte colorazione blu, con un massimo di assorbimento a circa 660 nm

# **VANTAGGI DEL METODO**

- Poco costoso
- Di facile esecuzione
- Altamente riproducibile
- Molto sensibile: è possibile determinare concentrazioni fino a 10  $\mu\text{g/ml}$

## **SVANTAGGI**

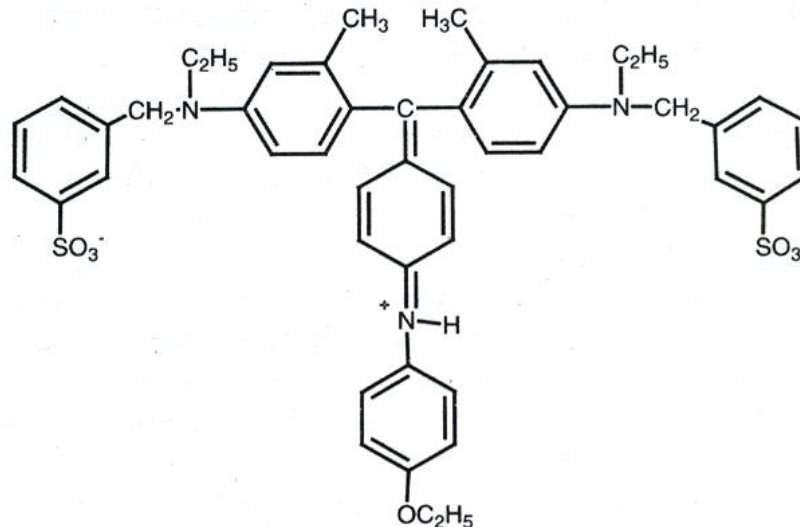
- E' soggetto ad interferenze da parte di una varietà di sostanze, quali Tris, HEPES ed EDTA
- Le curve *standard* sono lineari solo a basse concentrazioni proteiche
- Sono necessari tempi di incubazione precisi per ottenere dati riproducibili
- La reazione dipende dal pH ed è necessario avere un pH compreso tra 10 e 10.5

## •Metodo di Bradford

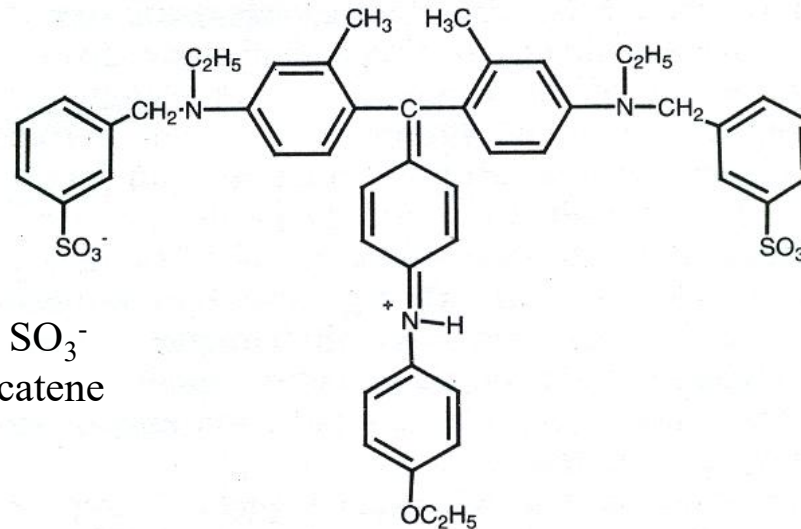
Descritto per la prima volta da Marion M. Bradford (1976).

(Range: 1–50 mg)

❖ Il saggio Bradford è basato sull'utilizzo del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250



- Il meccanismo di base del test è il legame del colorante a pH acido con i residui basici di arginina, istidina, fenilalanina, triptofano e tirosina.

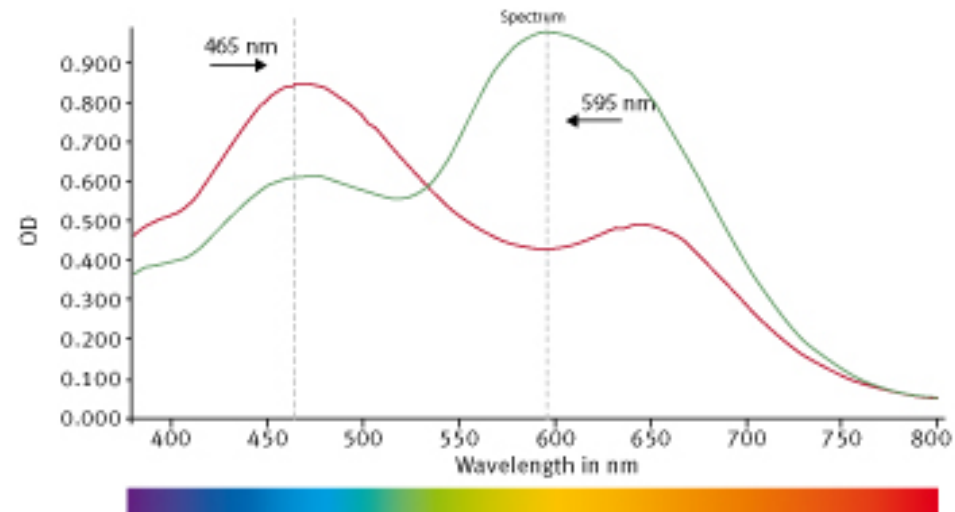


▪ Interazioni elettrostatiche tra SO<sub>3</sub><sup>-</sup> Gruppi amminici terminali e catene laterali di His, Arg, Lys)

▪ Interazioni idrofobiche con Tyr Trp Phe

Il colorante libero (**forma cationica**) presenta un massimo di assorbimento a 465 nm **e un colore rosso**, dopo il legame con le proteine, si osserva uno spostamento del massimo di assorbimento a 595 nm a causa della stabilizzazione della forma anionica del colorante che presenterà un colore blu.

La colorazione avrà una intensità direttamente proporzionale alla contenuto proteico del campione in esame.



## •Metodo di Bradford

si sfrutta la variazione nello spettro di assorbimento tra:

- soluzione in ambiente acido di Coomassie Brilliant Blue (rosso)
- soluzione in ambiente acido di Coomassie Brill Blue + proteine (blu)

A

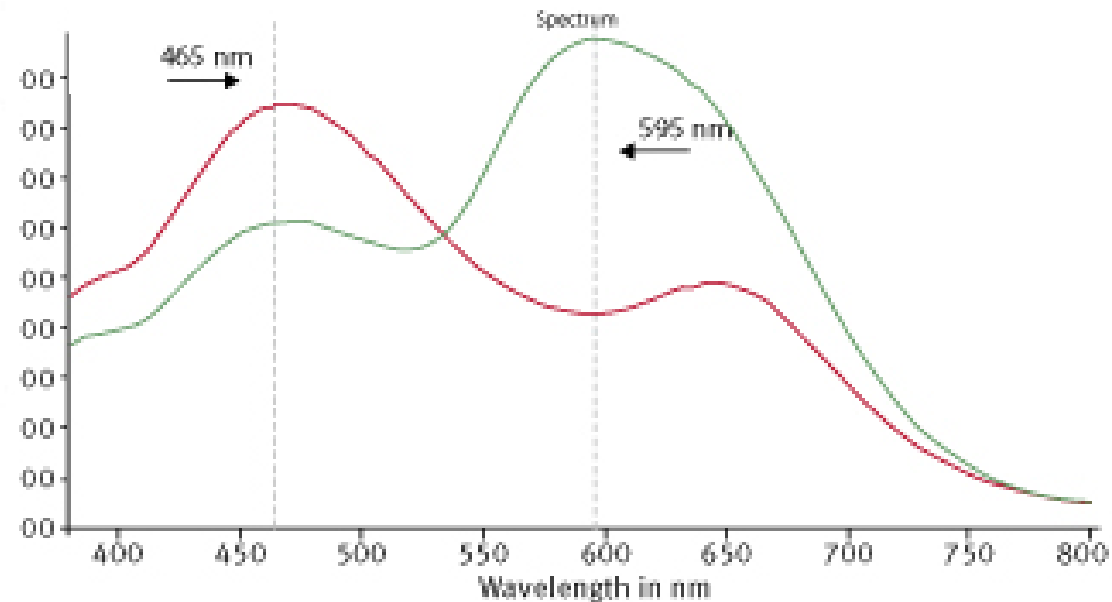
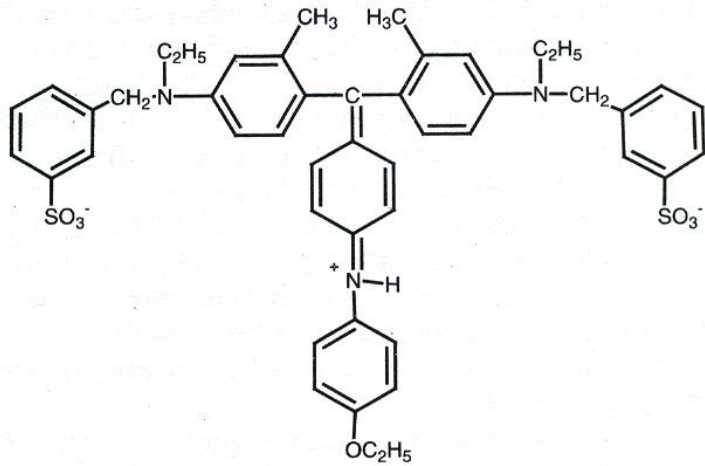
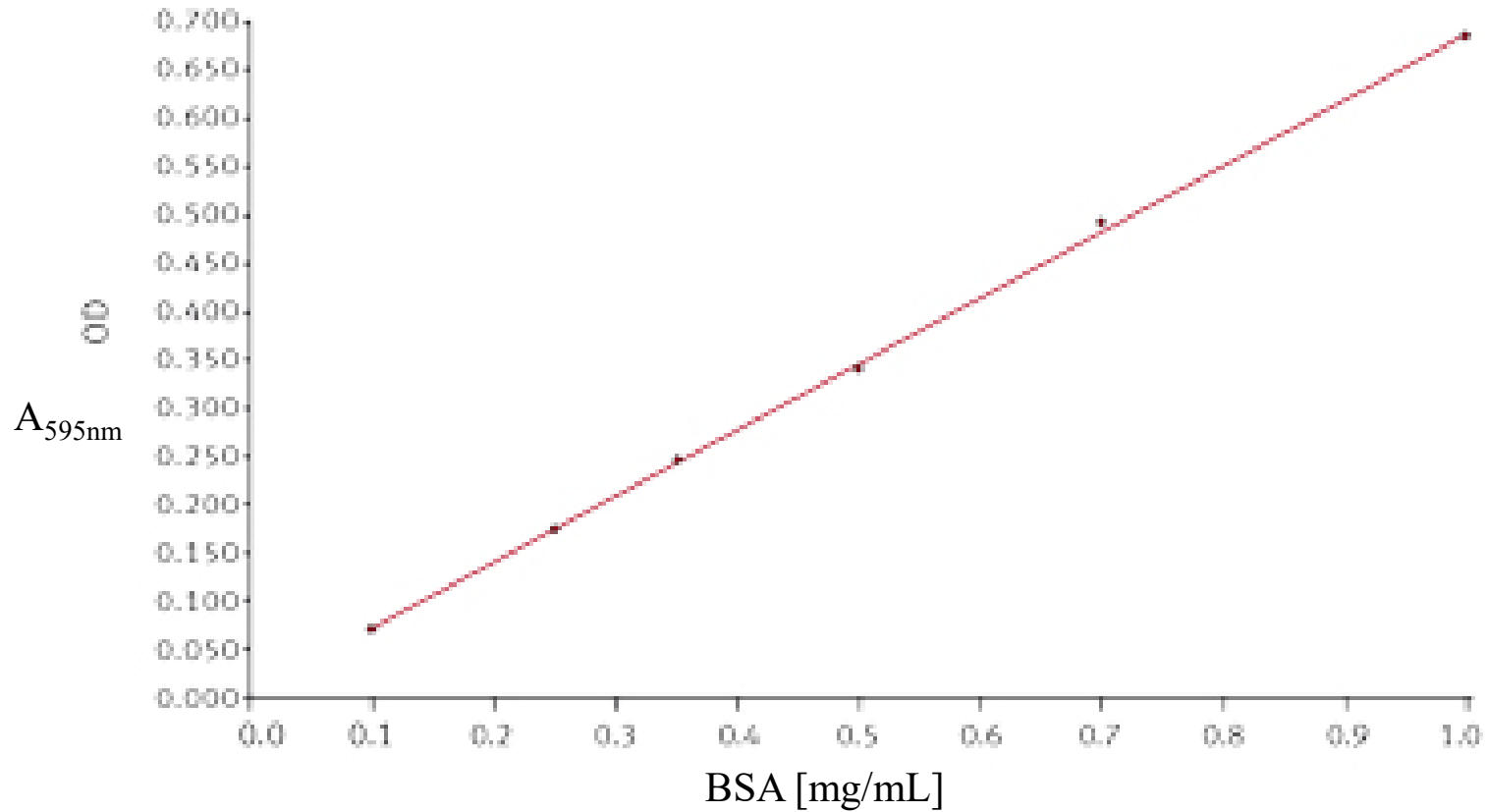


Figura 3.3 Coomassie® Brilliant Blue G-250.

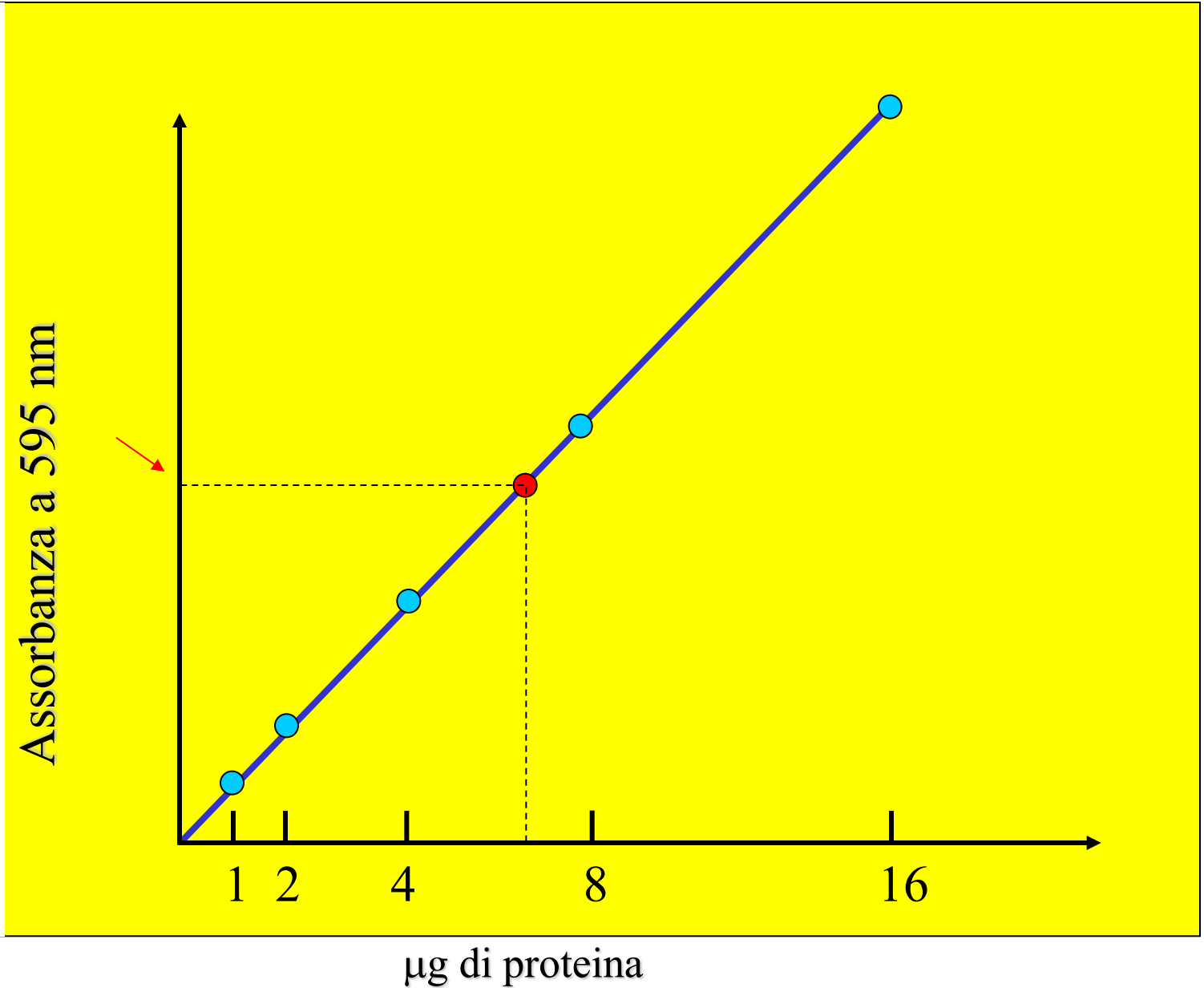
## •Metodo di **Bradford**

Retta di taratura con standard relativo  
BSA : Albumina serica bovina



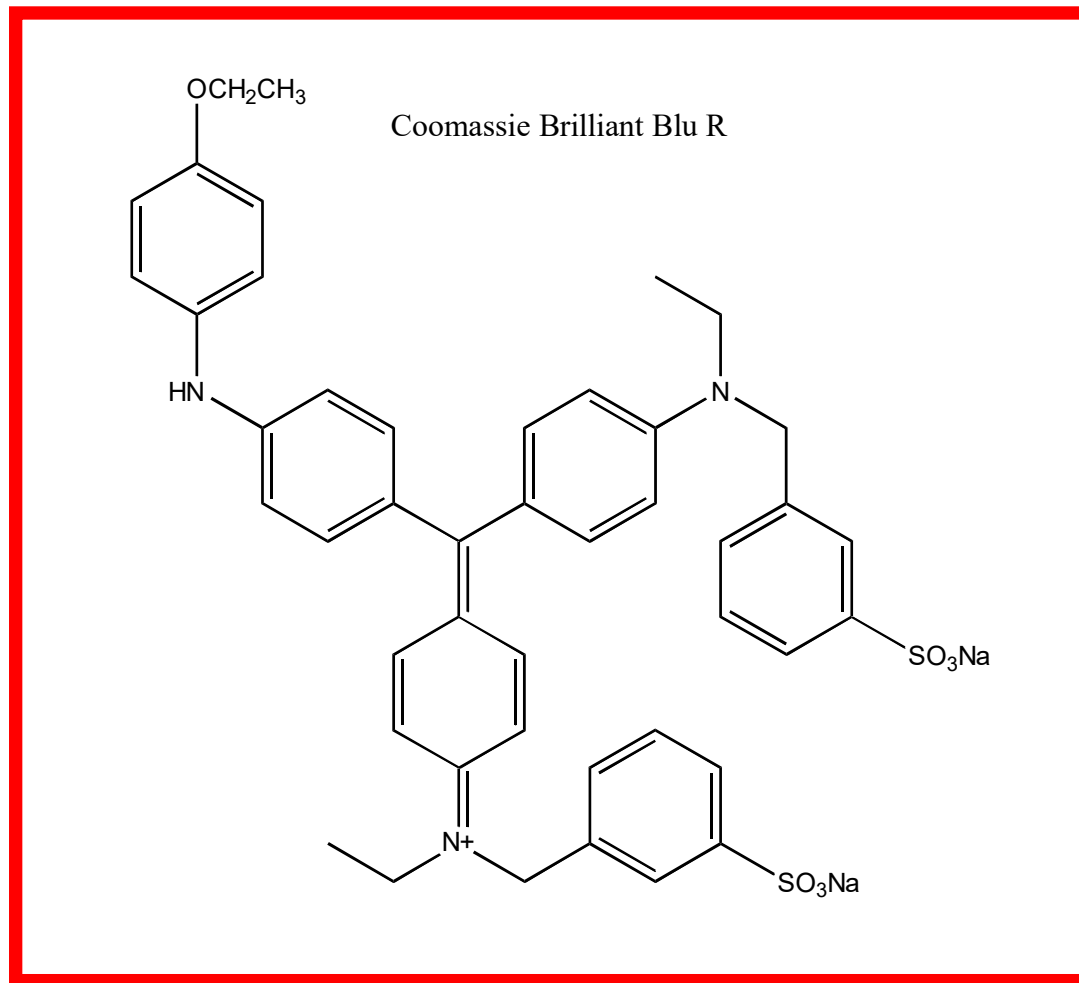
•Metodo di **Bradford**

BSA : Albumina serica bovina



# **METODO DI BRADFORD**

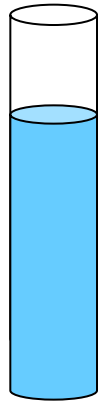
- Il legame del colorante *Coomassie Brilliant Blue G-250* alle proteine determina uno spostamento del massimo di assorbimento del colorante da 465 nm (rosso) a 595 nm (blu) in soluzioni acide (Bradford, 1976)
- Il metodo è un semplice procedimento costituito da un unico passaggio in cui il colorante è aggiunto ai campioni e si determina l'assorbanza a 595 nm



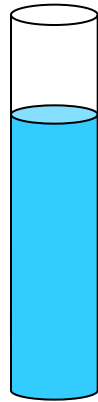
La quantità di colorante che si lega è proporzionale alla quantità di proteina presente in soluzione.

Pertanto l'intensità del colore blu (e dunque l'assorbimento) è proporzionale alla concentrazione proteica.

Poiché l'intensità della colorazione non è lineare in una vasta gamma di concentrazioni di proteine, si raccomanda fortemente di preparare una curva *standard* per ogni saggio.



1 mg/ml



2 mg/ml



4 mg/ml



8 mg/ml



16 mg/ml



X mg/ml

# VANTAGGI DEL METODO

- ❑ Semplicità di preparazione del reattivo
- ❑ Sviluppo del colore immediato
- ❑ Stabilità del complesso
- ❑ Elevata sensibilità (fino a 22  $\mu\text{g/ml}$ )
- ❑ Il saggio è compatibile con la maggior parte dei tamponi comuni, degli agenti denaturanti come guanidina·HCl 6M e urea 8 M e dei preservanti come sodio azide

# SVANTAGGI

- ❑ Il reagente colora le cuvette ed è piuttosto difficile da rimuovere
- ❑ La quantità di colorante che si lega alla proteina dipende dal contenuto in aminoacidi basici → ciò rende difficile la scelta di uno *standard*
- ❑ Molte proteine non sono solubili nella miscela di reazione acida

## Protocollo:

- 1) Utilizzando una soluzione a concentrazione nota di Albumina bovina (**2 mg/ml**)
- 2) preparare una serie di diluizioni a concentrazione nota
- 3) Miscelare Albumina bovina e Coomassie Brilliant Blue
- 4) Vorticare
- 5) Incubare a temperatura ambiente per 5 min
- 6) Misurare il valore di  $A_{595 \text{ nm}}$  delle soluzioni a concentrazione nota e della soluzione a concentrazione incognita

Riportare in un grafico i dati ottenuti per calcolare il valore di concentrazione incognito

## Albumina bovina (2 mg/ml)

Preparare una serie di diluizioni a concentrazione nota

Volume di 50  $\mu$  L (per ogni soluzione)

- 0.2 mg/mL  $M_1 V_1 = M_2 V_2$   $2 \text{ mg/mL} \times V_1 = 0,2 \text{ mg/mL} \times 50 \mu\text{L}$   
 $V_1 = 5 \mu\text{L}$
- 0,4 ml/mL
- 0.5 mg/mL
- 0,8 mg/mL
- 1.0 mg/ml
- 1,2 mg/mL
- 1.4 mg/ml

<b>BSA concentrazione finale</b>	<b>Vol BSA 2mg/ml</b>	<b>Vol acqua o buffer</b>
0		
0.2		
0.4		
0,5		
0,8		
1,0		
1,2		
1,4		

<b>sample</b>	<b>Vol sample</b>	<b>Vol acqua o buffer</b>
1:10		
1:5		

<b>BSA concentrazione finale</b>	<b>Abs 595nm</b>	<b>Vol acqua o buffer</b>
0		
0.2		
0.4		
0,5		
0,8		
1,0		
1,2		
1,4		

<b>sample</b>	<b>Abs 595nm (dil)</b>	<b>Abs 595nm (conc )</b>
1:10		
1:5		

# Metodo di Bradford

- Il metodo è basato sulla formazione di un complesso tra il colorante (**Coomassie Blu**) e le proteine, il Comassie si lega a residui di aminoacidi basici presenti nelle proteine.

- Si utilizza uno standard a concentrazione nota (solitamente si utilizza come proteina standard la siero albumina bovina o **BSA**) allestendo una retta di taratura

- **Allestimento di una retta di taratura**

Prelevare **20 ml** di reattivo di Bradford e portarlo a temperatura ambiente

- operativamente si parte da una soluzione a concentrazione **2mg /ml di BSA** e si preparano alcune diluizioni
- 0.25 mg/ml - 0.5 mg/ml - 1.0 mg/ml - 1.4 mg/ml

- Allestire una tabella con uno schema della quantità in  $\mu\text{l}$  di soluzione di BSA concentrata e di diluente (Tris/HCl) per ciascuna diluizione.

Utilizzare la formula  $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

$$C_1 = 2 \text{ mg/ml}$$

$$V_1 = x \text{ } \mu\text{l} \text{ di soluzione di BSA } 2 \text{ mg/ml da prelevare}$$

$$C_2 = \text{la concentrazione finale}$$

$$V_2 = 200 \text{ } \mu\text{l}$$

- per ogni diluizione trasferire 50  $\mu\text{l}$  in una nuova eppendorf e siglare opportunamente

- **Preparazione del campione**

- diluire in Tris/HCl i campioni (eppendorf **50  $\mu\text{l}$**  di soluzione finale)

diluire 1:10 (1 parte di campione da diluire in 10 parti totali)

Diluire 1 : 5 (1 parte di campione da diluire in 5 totali)

<b>BSA concentrazione finale</b>	<b>Vol BSA 2mg/ml</b>	<b>Vol T ris/HCl</b>
0	0	50
0.25	6,25 $\mu$ L	43,75 $\mu$ L
0.5	12,5 $\mu$ L	37,5 $\mu$ L
1	25 $\mu$ L	25 $\mu$ L
1.4	35 $\mu$ L	15 $\mu$ L

<b>sample</b>	<b>Vol sample</b>	<b>Vol T ris/HCl</b>
1:10	5 $\mu$ L	45 $\mu$ L
1:5	10 $\mu$ L	40 $\mu$ L

- Aggiungere 1.5 mL di Coomassie e leggere i campioni allo spettrofotometro
- Letture dell'assorbimento a 595 nm

<b>BSA concentrazione finale</b>	<b>Abs 595nm</b>
0	
0.25	
0.5	
1	
1.4	

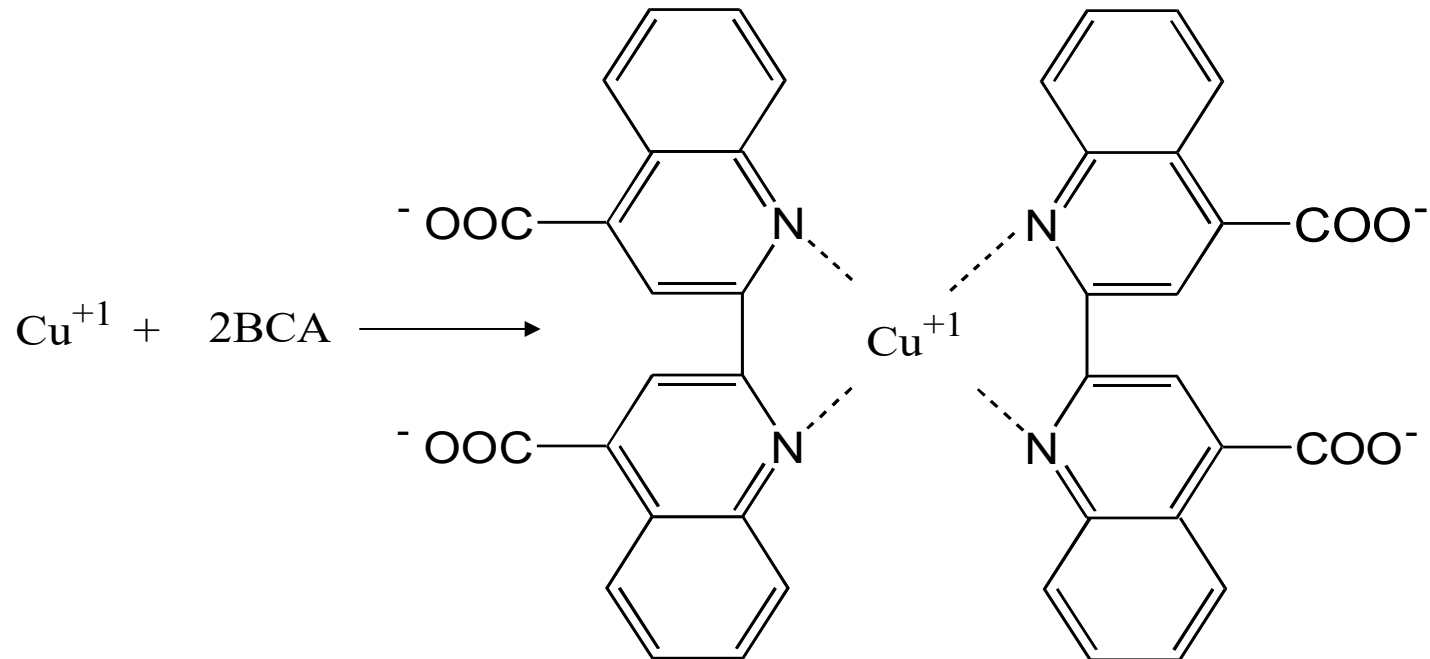
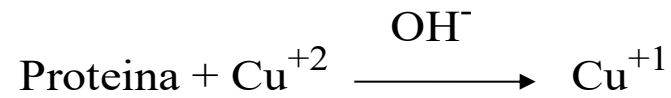
<b>sample</b>	<b>Abs 595 nm (sol. Diluita)</b>	<b>Abs 595 nm (sol. concentrata)</b>
1:10		
1:5		

**Analisi quantitativa:** Determinazione della concentrazione delle proteine totali

## •Metodo dell'acido bicinoninico (BCA)

- La reazione del BCA (acido bicinoninico) è simile a quella del reattivo di Lowry
- $\text{Cu}^{+2}$  è ridotto a  $\text{Cu}^{+1}$  dalle molecole proteiche in soluzione alcalina
- Due molecole di BCA chelano uno ione rameoso ( $\text{Cu}^{+1}$ )
- Tale evento determina la formazione di un intenso colore violetto con un massimo di assorbimento a 562 nm

# REAZIONE BCA

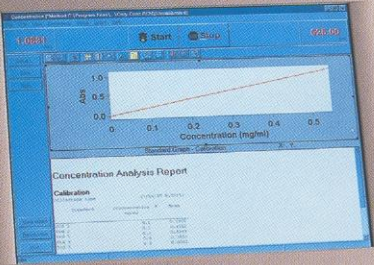
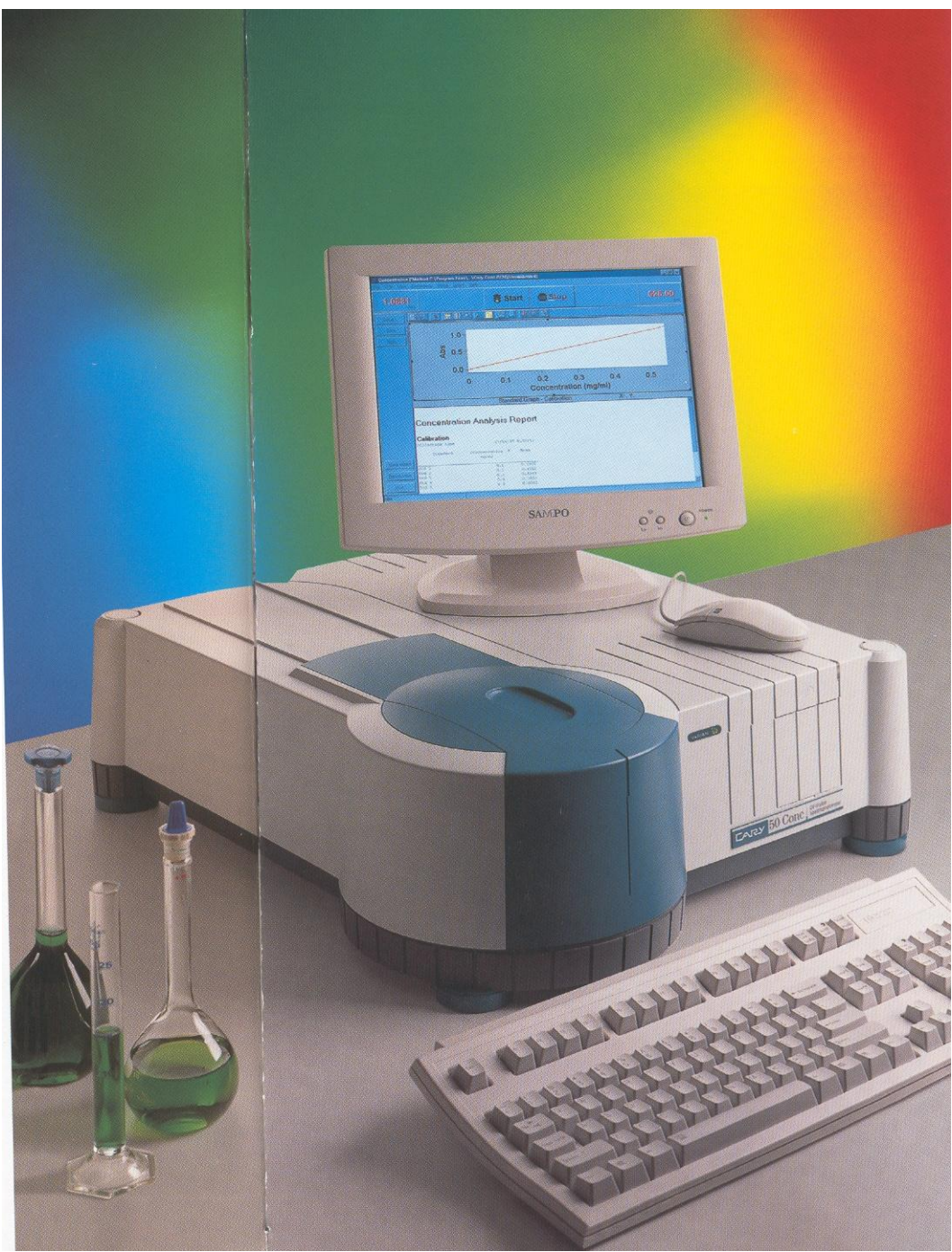


# **VANTAGGI DEL METODO**

- Simile a quella del metodo di Lowry
- Sensibilità (0,5  $\mu\text{g/ml}$ )
- Ridotta suscettibilità alla presenza di detergenti
- Dopo un'incubazione di 30 minuti a 37°C il colore è sufficientemente stabile per misurazioni attendibili

# **SVANTAGGI**

- Il colore continua a svilupparsi lentamente nel tempo
- Interferenza da parte di carboidrati
- Alcune sostanze interferiscono con il BCA: catecolamine, triptofano, lipidi, rosso fenolo, cisteina, tirosina, saccarosio, glicerolo non puro,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , acido urico e ferro.



CARV 50 Cone