



Prof Barbara Manconi
Corso di Laurea in Biologia
Lezioni di

Principi di Purificazione e Analisi delle
Proteine .

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)

Metodologie Biochimiche
Bonaccorsi di Patti–Contestabile-Salvo.
(Casa ed. Ambrosiana/ Zanichelli)

MECCANISMI MOLECOLARI DI FUNZIONI VITALI IN RISPOSTA A FARMACI

Principi di Purificazione e Analisi delle Proteine - BIO10 (2+1CFU)

Ruolo dei recettori nella regolazione delle funzioni vitali – BIO09 (2CFU)

Le proteine come bersagli dell'azione dei farmaci BIO 14 (2CFU)

https://web.unica.it/unica/it/crs_60_57.page

ANNO	INSEGNAMENTO	PROPEDEUTICITÀ
1°	CHIMICA ORGANICA	CHIMICA GENERALE ED INORGANICA (modulo)
2°	BIOCHIMICA (modulo)	CHIMICA ORGANICA
2°	FISIOLOGIA VEGETALE	BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE - BOTANICA
2°	ANATOMIA UMANA E COMPARATA	CITOLOGIA E ISTOLOGIA ANIMALE
2°	BOTANICA EVOLUTIVA	BOTANICA
2°	VARIABILITÀ DEL GENOMA	BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE
2°	BIOLOGIA MOLECOLARE (modulo)	CHIMICA ORGANICA
3°	MECCANISMI MOLECOLARI DI FUNZIONI VITALI IN RISPOSTA A FARMACI	BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE
3°	FISIOLOGIA GENERALE	ANATOMIA UMANA (modulo)
3°	MICROBIOLOGIA GENERALE	BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE
3°	FARMACOLOGIA GENERALE	FISIOLOGIA GENERALE
3°	EVOLUZIONE DEL COMPORTAMENTO ANIMALE ZOOLOGIA	
3°	ECOLOGIA APPLICATA	ECOLOGIA
3°	IMMUNOLOGIA E PATOLOGIA	FISIOLOGIA GENERALE

MECCANISMI MOLECOLARI DI FUNZIONI VITALI IN RISPOSTA A FARMACI

Principi di Purificazione e Analisi delle Proteine - BIO10 (2+1CFU)

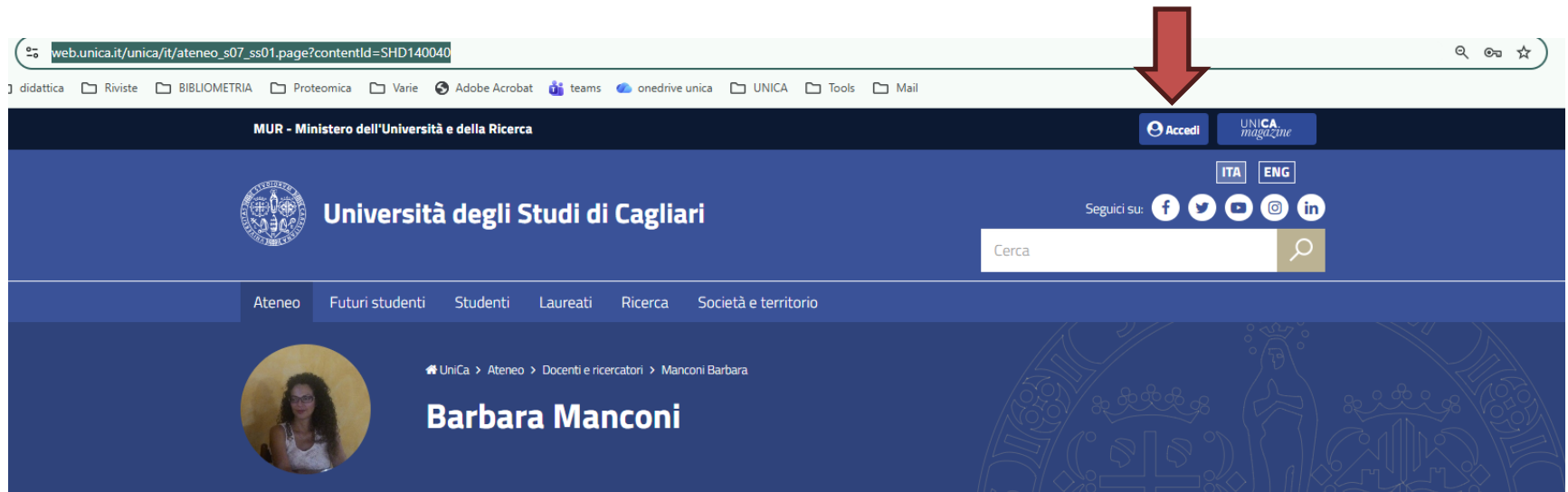
- Strategie per la purificazione delle proteine. Preparazione di soluzioni tampone per la purificazione di biomolecole. Salting out. Dialisi, centrifugazione (4h).
- Tecniche cromatografiche: Matrici, fasi stazionarie e fasi mobili nei diversi tipi di cromatografia. Sistemi cromatografici a bassa pressione su colonna: cromatografia ad esclusione molecolare (6h).
- Tecniche elettroforetiche: gel di poliacrilammide in condizioni native e in presenza di sodio-dodecil-solfato (SDS-PAGE) (4h).
- Spettrofotometria UV-VIS: Legge di Lambert-Beer. Spettro di Assorbimento. Determinazione della concentrazione di proteine in miscela (2h).
- Dispositivi di Protezione Individuali (DPI). (2h)

Laboratorio (1CFU): Breve introduzione sulle basi relative alle norme di sicurezza in laboratorio di Biochimica. Preparazione di soluzioni tampone, calcolo di concentrazione e di diluizione (4 ore). Analisi di proteine (8h)

I contenuti delle lezioni frontali e delle esercitazioni effettuate in laboratorio saranno forniti in formato PDF e caricati sulla pagina Unica del Docente.

https://web.unica.it/unica/it/ateneo_s07_ss01.page?contentId=SHD140040

1: Inserisci le tue credenziali di ESSE3



The screenshot shows the website of the University of Cagliari. At the top, there is a navigation bar with the MUR logo and the text "MUR - Ministero dell'Università e della Ricerca". Below this, the university's name "Università degli Studi di Cagliari" is displayed. A search bar is visible on the right. The main content area shows the profile of Barbara Manconi, a professor in the Department of Life and Environmental Sciences. A red arrow points to the "Accedi" (Login) button in the top right corner of the website.

Dipartimento di Scienze della vita e dell'ambiente

Ruolo	Professore associato
Area scientifico disciplinare	Scienze biologiche
Settore scientifico disciplinare	BIO/10 BIOCHIMICA
Email	bmanconi@unica.it
Telefono	0706754508
Indirizzo	Cittadella Universitaria di Monserrato
Orario di ricevimento	Previo appuntamento: Martedì e Giovedì dalle 12 alle 13



- Curriculum
- Insegnamenti
- Materiale didattico
- Altre Attività
- Tesi
- Ricerca
- Avvisi
- Agenda

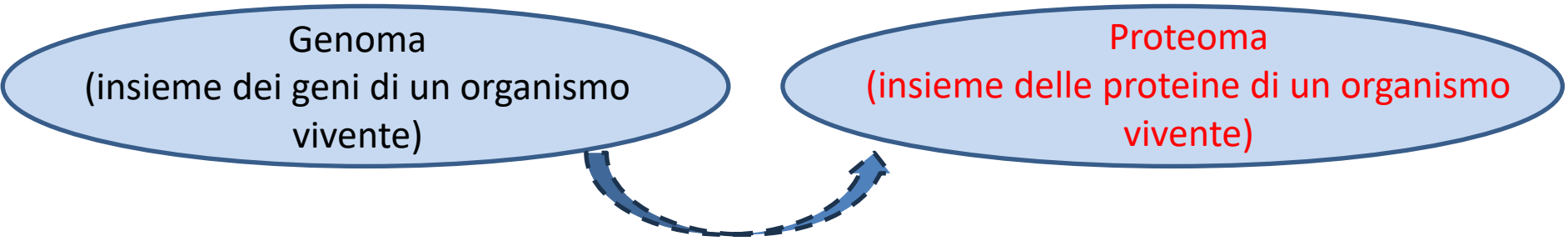
2: vai su
materiale
didattico

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.

L'apprendimento delle competenze acquisite dallo studente verrà verificato tramite un colloquio orale.

Il voto sarà attribuito in base alla valutazione dell'apprendimento acquisito dallo studente da parte del docente titolare del corso.

Il voto finale sarà calcolato come media pesata dei voti ottenuti nei singoli insegnamenti



Genoma
(insieme dei geni di un organismo
vivente)

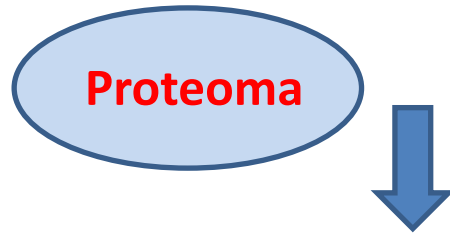
Proteoma
(insieme delle proteine di un organismo
vivente)

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



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

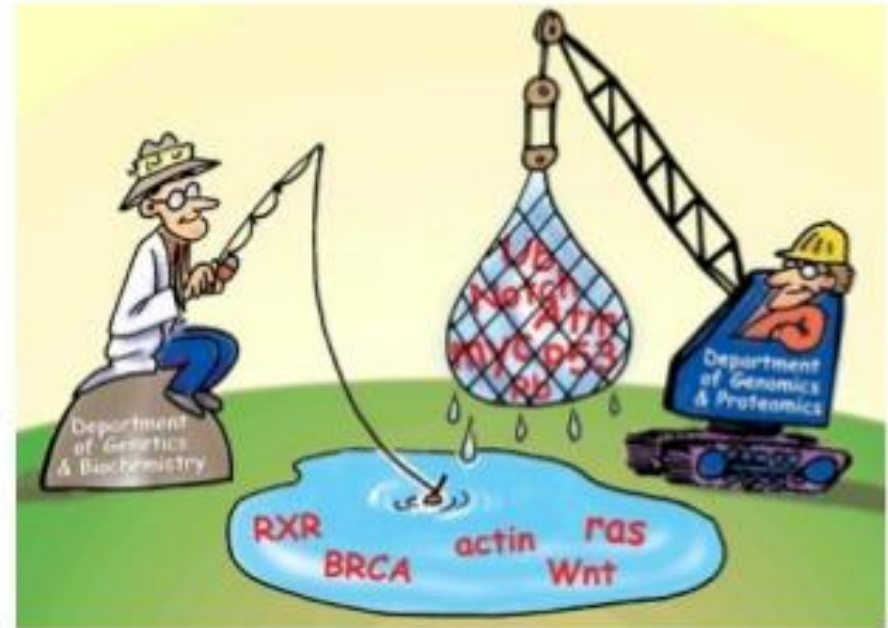
?

- 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

WHAT IS PROTEOMICS?

The analysis of complete complements of proteins: identification and quantification; modifications; interactions; and activities. FUNCTION.

AND HOW DO THESE CHANGE DURING A BIOLOGICAL RESPONSE?

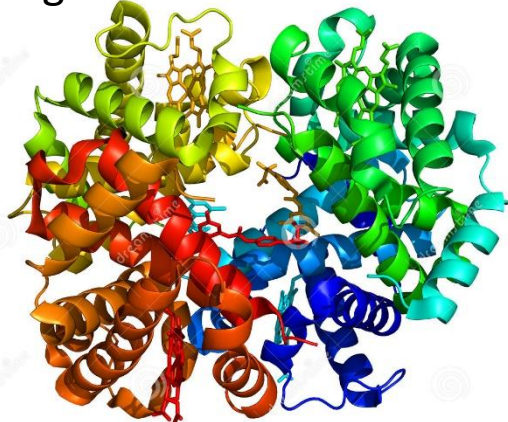


Science 291 (2001) 1221.

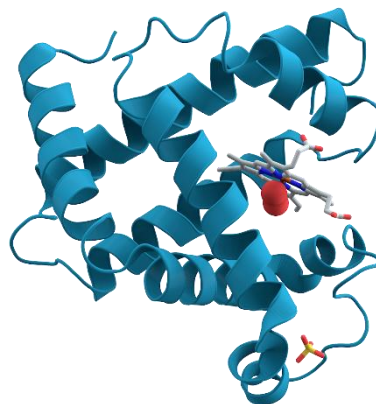
> la proteomica si avvale ampiamente di tecniche biochimiche di base per la preparazione, la separazione e l'analisi dei campioni proteici, integrando questi metodi tradizionali con tecnologie avanzate come la spettrometria di massa

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

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

Ciascuna proteina è un caso a sé

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

Ricerca bibliografica

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

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

Strategia di purificazione di una Proteina

■ Tipo di studio



Studi enzimatici

(non è necessaria una purezza del 100%)

Studi strutturali

(elevato grado di purezza)

■ Quantità



-Analitica

-Preparativa

Le **tecniche analitiche** servono per identificare e quantificare i componenti di un campione, mentre quelle **preparative** mirano a isolare e purificare quantità significative di sostanze per usi successivi

Localizzazione

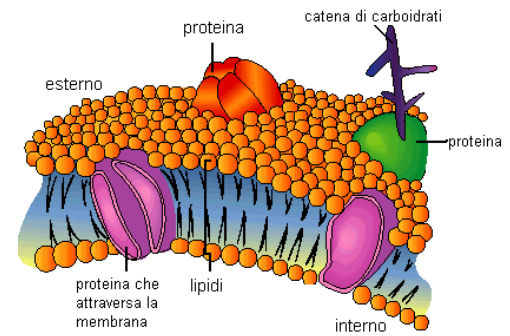


■ Extracellulare

■ Intracellulare

■ Proteina di membrana :
- **periferica**
- **Integrale**

Strategia di purificazione di una Proteina in base alla sua LOCALIZZAZIONE



■ Extracellulare

- circolanti nel siero
- brodo di coltura



■ Centrifugazione



■ Filtrazione

Intracellulare



- Rottura delle cellule (Tipo di cellula)

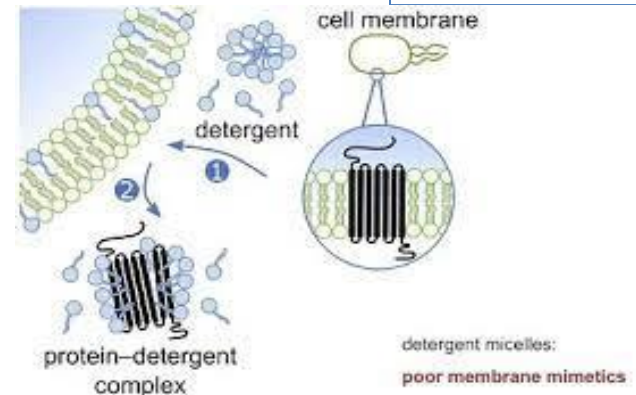
Proteina di membrana :



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

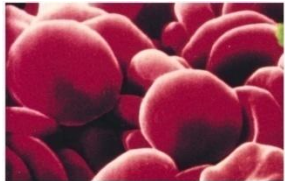


Integrale
(interazioni
idrofobiche)
**Detergenti che
contengono
catene lipofile
(Triton X-100)**



ESTRAZIONE DELLE PROTEINE intracellulari DALLE CELLULE

Eritrociti



(b)



- **Schock termico o osmotico**
- **Proteasi**
- **Toluene**

▪ Rottura delle cellule: LISI
(Tipo di cellula)

Cellula vegetale



- **Cellulasi**
- **Pectinasi**

pectina

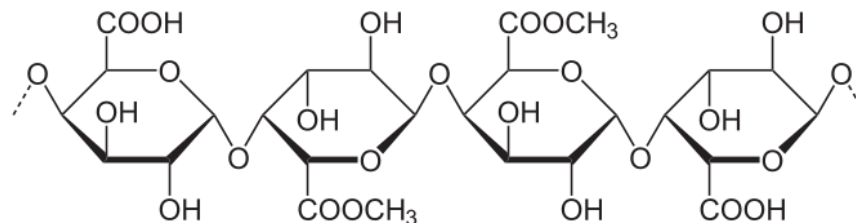
Batteri



Lisozima per Gram+

- Enzimi
- Schock osmotico
- EDTA (rimuove il calcio)+ lisozima per Gram-

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



acido galatturonico con legami di tipo α -(1-4)

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.

ROTTURA DELLE CELLULE E Omogenizzazione DEL Tessuto

l'omogeneizzazione consiste in azione meccanica mediante la quale un tessuto o cellule vengono resi omogenei.

Condizioni sperimentali ottimali per l'omogeneizzazione di tessuti e cellule:

- Si opera in ghiaccio, a circa 4°C e si usano inibitori di proteasi.
- A basse temperature si bloccano le attività enzimatiche proteolitiche e digestive che si trovano nei lisosomi e nei perossisomi e che si possono liberare durante la lisi.
- uso di tamponi ipotonici a pH fisiologico (7.4) e di detergenti, per solubilizzare proteine.

I **LISOSOMI** sono vescicole formate da un doppio strato lipidico, contenenti enzimi che funzionano a pH acido, dette idrolasi acide, per la digestione intracellulare di macromolecole (ottenute dalle cellule che fagocitano al proprio interno piccole particelle della macromolecola); presenti solo nelle cellule eucariote.

Nei **PEROSSISOMI** si svolgono importanti funzioni metaboliche come lo smaltimento delle tossine, l'accorciamento degli acidi grassi a lunga catena e altre. Le reazioni chimiche avvengono servendosi di ossigeno molecolare, O₂, che reagendo con i substrati produce perossido di idrogeno, una specie chimica molto reattiva che viene subito convertita in acqua e ossigeno all'interno del perossisoma proteggendo la cellula da potenziali danni.

ROTTURA DELLE CELLULE E Omogenizzazione DEL Tessuto

Scelta del tampone

Caratteristiche dei tamponi usati per l'estrazione delle proteine:

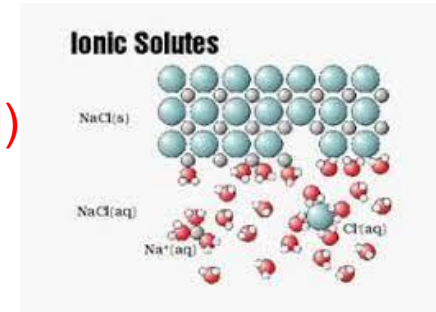
- Elevata solubilità (TRIS; Fosfato) (mantiene il pH fisiologico)
- Non penetrare attraverso le membrane
- Non assorbire la luce nella regione del visibile
- Non essere tossico

Omogenizzazione (Tessuto)

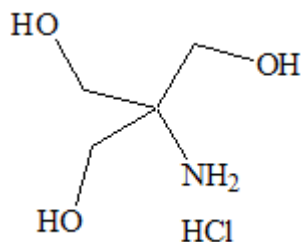
Tampone di diluizione

Deve contenere:

- Ioni per mantenere la pressione osmotica della soluzione tampone simile a quella intracellulare
 - KCl/ NaCl
 - Saccarosio (impedire la lisi osmotica di mitocondri o lisosomi)
 - Magnesio (per mantenere l'integrità della membrana)
- Chelanti degli ioni metallici che legato i gruppi tiolici
 - EDTA (acido etilendiaminotetracetico (rimuove ioni)
 - EGTA (etilenebis-ossietilenenitrilo-tetracetico rimuove ioni ma non chela il Mg^{++})
- Inibitori delle proteasi : PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro)
- Composti tiolici antiossidanti
 - 2-mercaptoetanol,
 - DTT (ditiotreitolo)
- Triton X-100 (detergente non ionico) impedisce l'aggregazione di proteine idrofobiche



	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 piperazinodietansulfonico	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)	

• Come preparare le soluzioni tampone? Procedura tipica

• La preparazione delle soluzioni tampone consiste in diverse fasi: Calcolo dei componenti (concentrazioni e quantità) in base all'uso richiesto e al volume target, pesatura dei componenti, dissoluzione dei componenti, regolazione del pH, riempimento fino al volume finale, etichettatura, documentazione dei risultati e utilizzo diretto o conservazione per un uso successivo.

- Seleziona la ricetta dal database
- Ricalcola le quantità della ricetta in base al volume di standard richiesto
- Pesa i composti nel recipiente
- Sciogli i composti in un solvente adatto (tipicamente acqua)
- Controlla e regola il valore del pH utilizzando un pHmetro
- Rabbocca la soluzione al volume richiesto
- Trasferisci in un flacone di conservazione ed etichettare
- Documenta i risultati

