

Metodi di lisi cellulare

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

Metodi per rompere le cellule

- **-metodi blandi:**
 - lisi per osmosi
 - digestione enzimatica
 - solubilizzazione chimica
 - omogenizzatori
- **-metodi moderati**
 - omogenizzatori a lama
 - mortaio
- **-metodi vigorosi**
 - French press
 - Sonicazione
 - Macinazione con microsfere

Disintegrazione cellulare

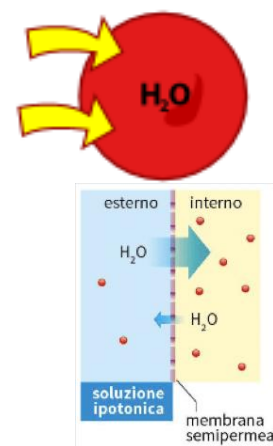
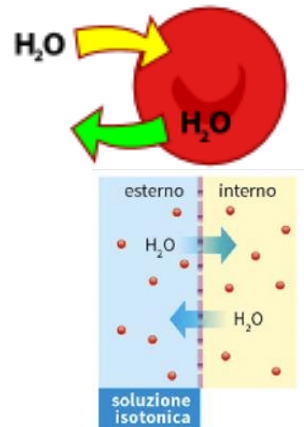
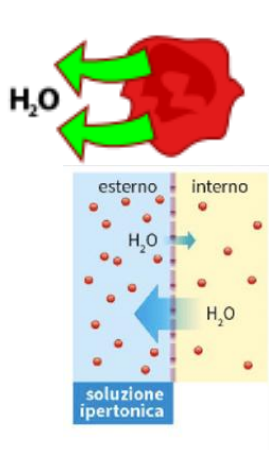
Metodi non meccanici blandi:

- Shock osmotico (globuli rossi in acqua),

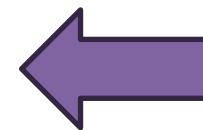
Iperotonico

Isotonico

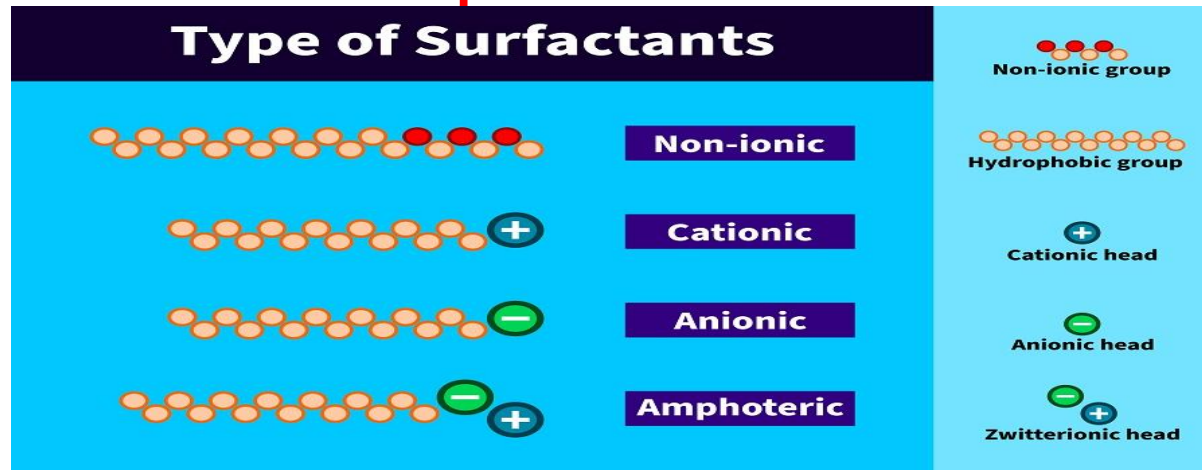
Ipotonico



L'osmosi è un processo fisico spontaneo in cui un solvente (solitamente acqua) attraversa una membrana semipermeabile, passando da una soluzione meno concentrata (ipotonica) a una più concentrata (ipertonica), fino a raggiungere l'equilibrio delle concentrazioni.



LISI dei Campioni : DETERGENTI



1. Detergenti Ionici (Forti)

Rompono sia la membrana plasmatica che quella nucleare, denaturando completamente le proteine. Sono ideali per l'estrazione di acidi nucleici (DNA/RNA) o per proteine da analizzare in elettroforesi (SDS-PAGE).

- **SDS (Sodio dodecil solfato):** Molto forte, denatura le proteine e conferisce loro una carica negativa.
- **Deossicolato di sodio:** Spesso usato nei tamponi di lisi per immunoprecipitazione (RIPA buffer).

2. Detergenti Non Ionici (Delicati)

Rompono la membrana plasmatica ma lasciano intatta la membrana nucleare. Non denaturano le proteine, preservando la loro struttura nativa e la loro attività enzimatica. Sono ideali per studi di interazione proteina-proteina.

- **Triton X-100:** Ampiamente utilizzato per isolare proteine citoplasmatiche e di membrana.
- **NP-40 (Nonidet P-40):** Simile al Triton X-100, ottimo per lisi delicate.

3. Detergenti Zwitterionici

Possiedono proprietà intermedie: sono più efficaci nel solubilizzare le proteine di membrana rispetto ai non ionici, ma sono meno denaturanti dei detergenti ionici.

- **CHAPS:** Molto usato per la solubilizzazione di proteine di membrana e per la focalizzazione isoelettrica (2D-PAGE).

Metodi di lisi cellulare

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



Homogeniser A cell suspension is forced under high pressure through a discharge valve and impinges on an impact ring. The discharge pressure is regulated by a spring loaded valve rod.

Pestello e mortaio



frullatore



White
Model KSB3WH

OMOGENIZZATORE Potter-Elvehjem

b- omogenizzatori, con
pestelli mossi a mano
o elettricamente:
Dounce:
Potter: teflon vetro

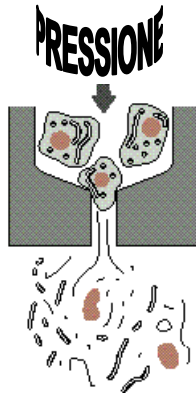
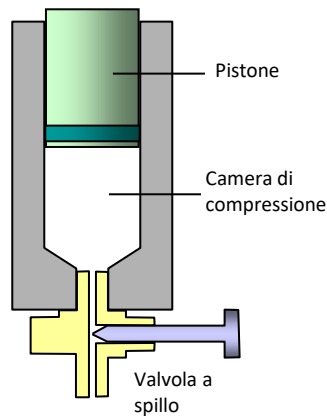


Mortaio in vetro borosilicato, pestello
in PTFE con asta in acciaio.



Sono costituiti da una provetta in vetro borosilicato e da un pistone in PTFE (Teflon); l' interstizio fra provetta e pistone varia da 0,15 a 0,25 mm.

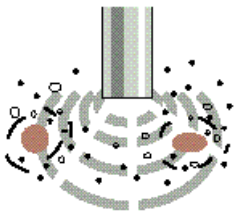
French press



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

- Le cellule subiscono una compressione notevole.

SONICAZIONE (ultrasuoni)



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

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

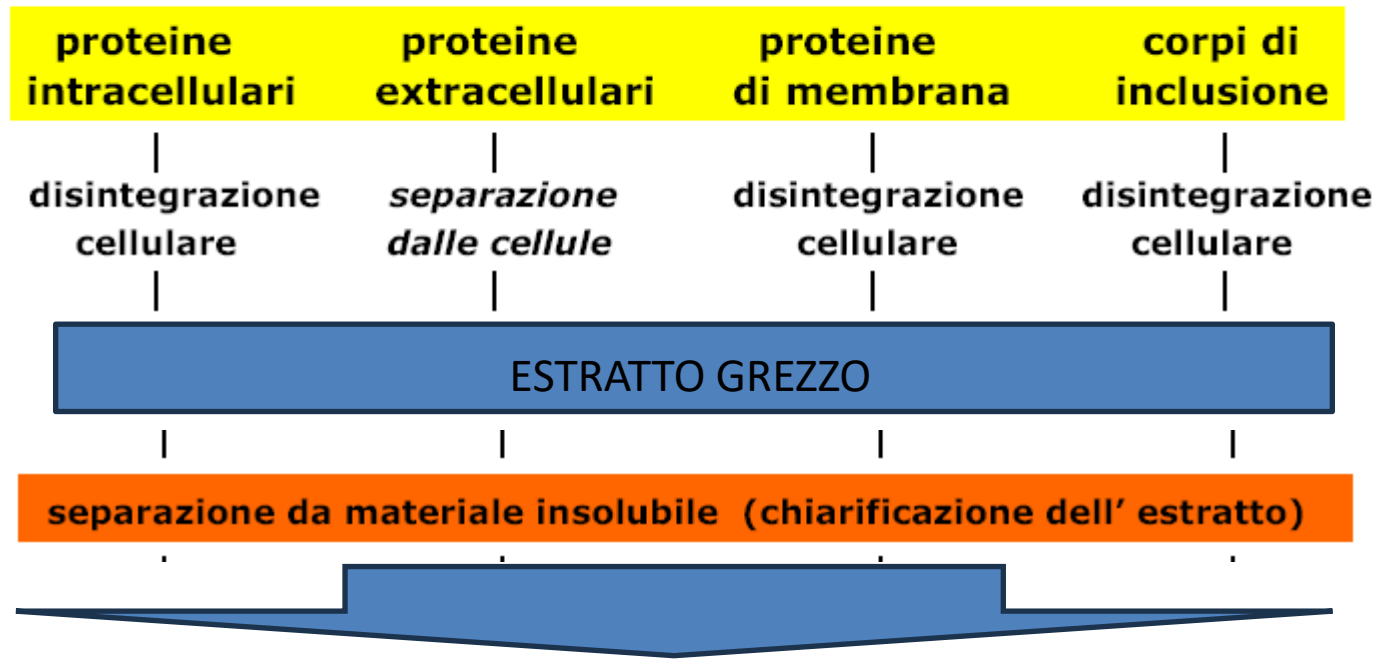
Svantaggi: sviluppo di calore (si rimedia lavorando con le soluzioni in bagno di ghiaccio e programmando il funzionamento 'pulsato', cioè intermittente, della sonda), pericolo di danni per l'udito dell'operatore (è necessario usare cuffie).

Rotori-Statore



Sono dotati di un rotore,
con lame di acciaio
inossidabile, inserito
all'interno di un cilindro
che funge da stativo

Solubilizzazione della proteina e sviluppo dei passaggi di purificazione



**Purificazione della proteina
che si vuole studiare**

L'estratto grezzo, ottenuto immediatamente dopo il processo di omogeneizzazione (rottura meccanica delle cellule), è una sospensione o miscela non purificata contenente i costituenti cellulari rilasciati, come proteine, lipidi, acidi nucleici e altri metaboliti. Questo materiale, spesso descritto come omogeneizzato o lisato, ha una consistenza uniforme ma richiede ulteriori passaggi di separazione e purificazione

Chiarificazione dell'estratto

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

PROTOCOLLO di PURIFICAZIONE

Le **tecniche di frazionamento** nella purificazione delle proteine servono a separare una proteina di interesse dal resto del lisato cellulare, sfruttando le sue proprietà chimico-fisiche uniche (come carica, dimensione, solubilità e affinità).

Il processo viene definito "**frazionamento**" perché la miscela iniziale viene divisa in diverse porzioni (frazioni), isolando progressivamente la proteina target.

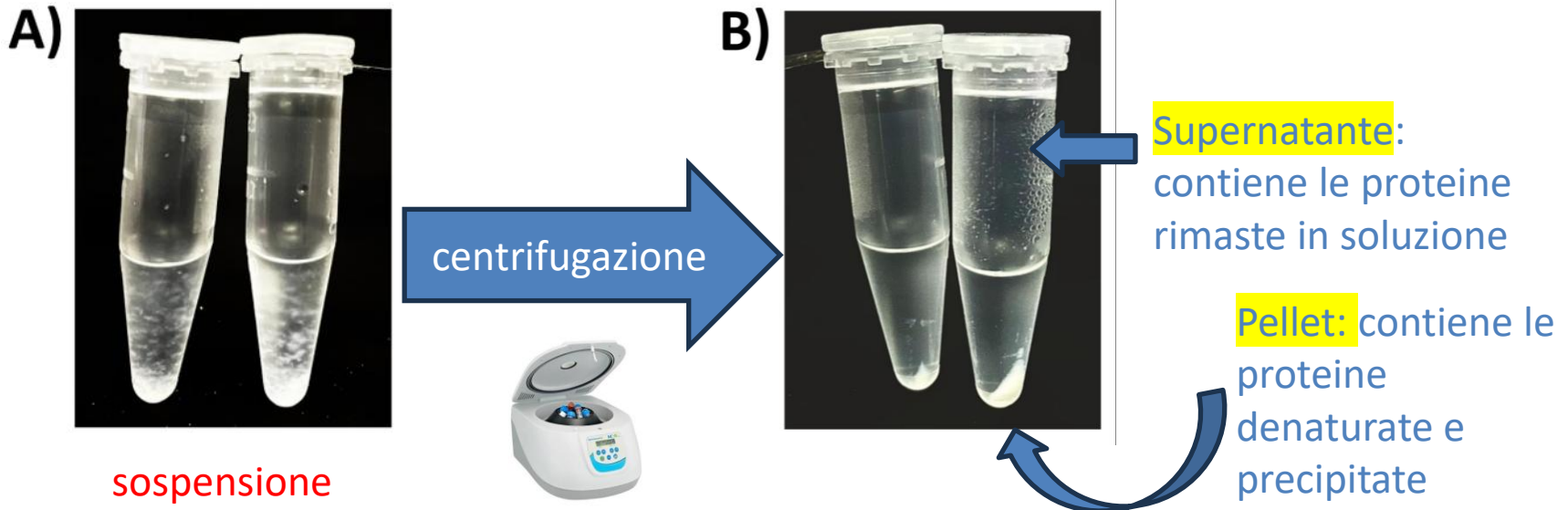
Le diverse tecniche sfruttano diverse caratteristiche, le principali sono:

- **SOLUBILITA'**
- MASSA MOLECOLARE
- CARICA ELETTRICA

Quando le proteine vengono frazionate sulla base della loro solubilità, in diverse condizioni sperimentali, si parla di

PRECIPITAZIONE

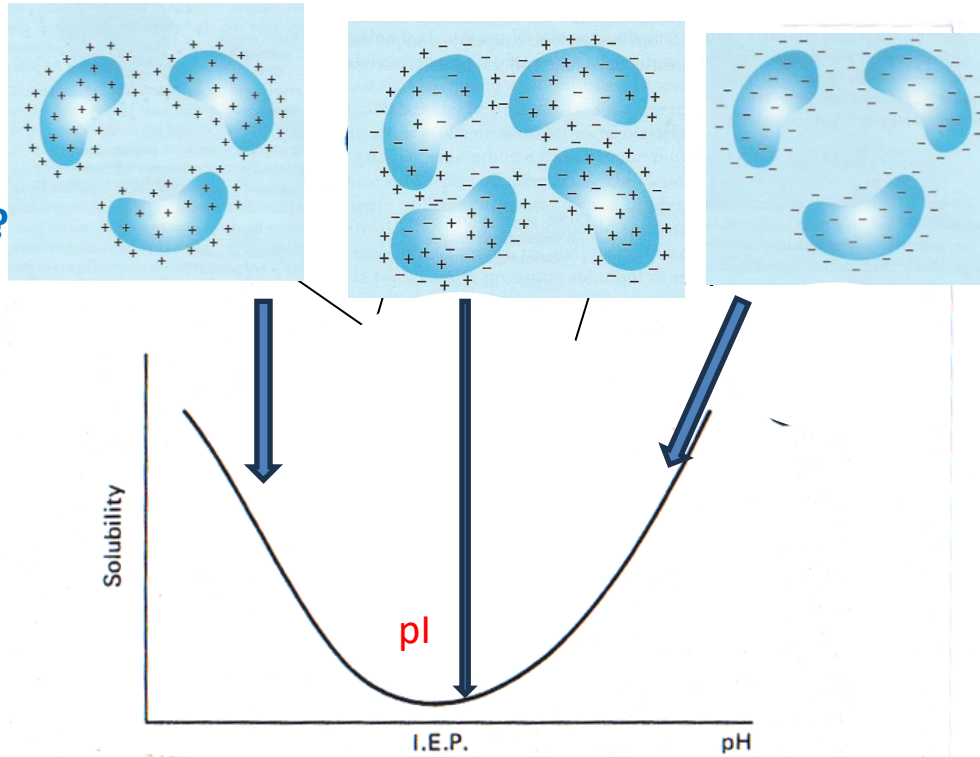
- al variare del pH = precipitazione al punto isoelettrico
- al variare della temperatura = precipitazione per denaturazione al calore
- In presenza di solventi organici= precipitazione con solventi organici
- al variare della forza ionica= precipitazione frazionata con sali



FRAZIONAMENTO IN BASE AL PUNTO ISOELETTRICO

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

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



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

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

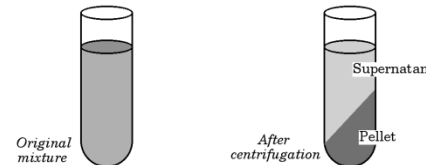
A tale valore di pH una proteina possiede un numero uguale di cariche positive e negative, per cui risultano minimi gli effetti repulsivi e massime le interazioni intermolecolari, le quali determinano la formazioni di **aggregati insolubili**

FRAZIONAMENTO 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

Precipitazione frazionata con i sali

I Sali influenzano la solubilità delle proteine

Interagiscono con i residui carichi sulla superficie delle proteine

Alte concentrazioni di Sali

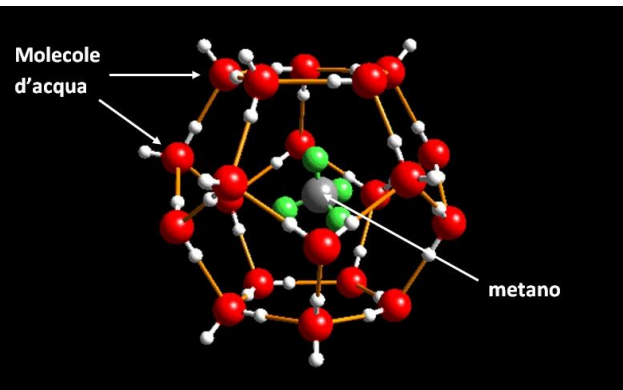
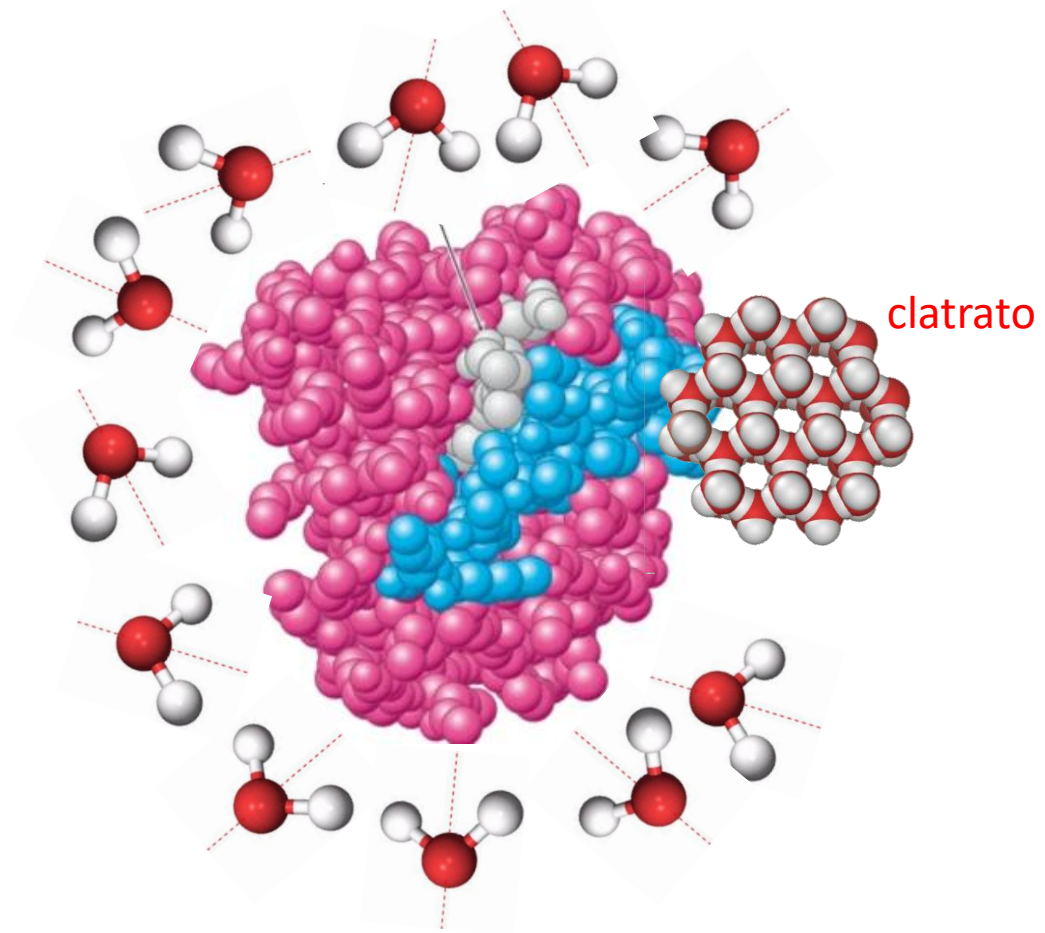


Diminuiscono la solubilità della proteina

(salting out)

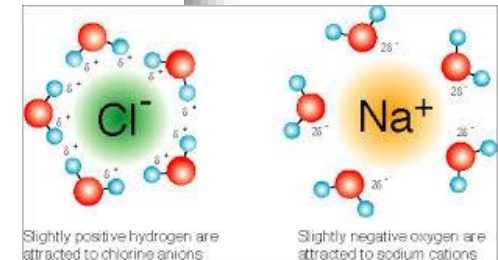
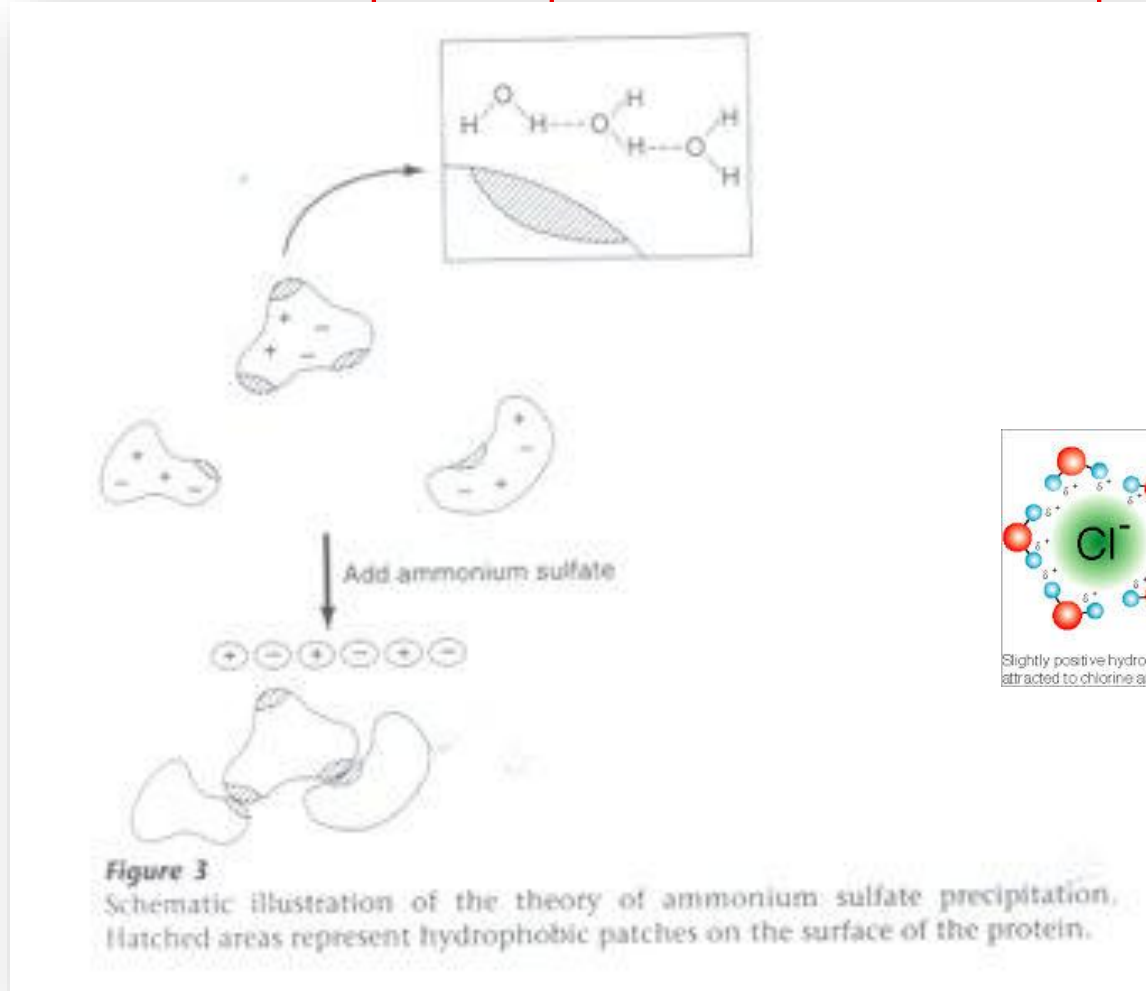
Competizione per le molecole d'acqua di idratazione tra il sale e le proteine

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

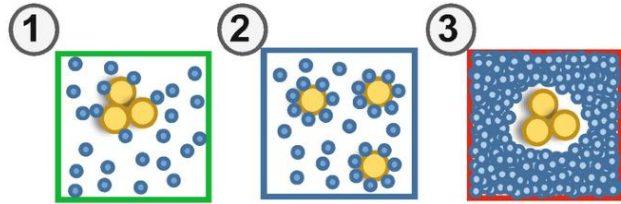


I gruppi idrofobici superficiali possono quindi interagire tra loro → fenomeni di **aggregazione e precipitazione delle proteine**

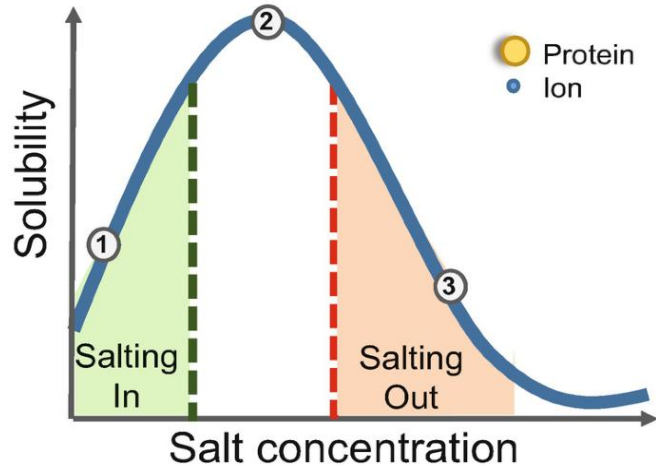
Le proteine **molto idrofobiche** precipitano a bassa concentrazione di sali

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 $I = 1/2 \sum c \cdot z^2$

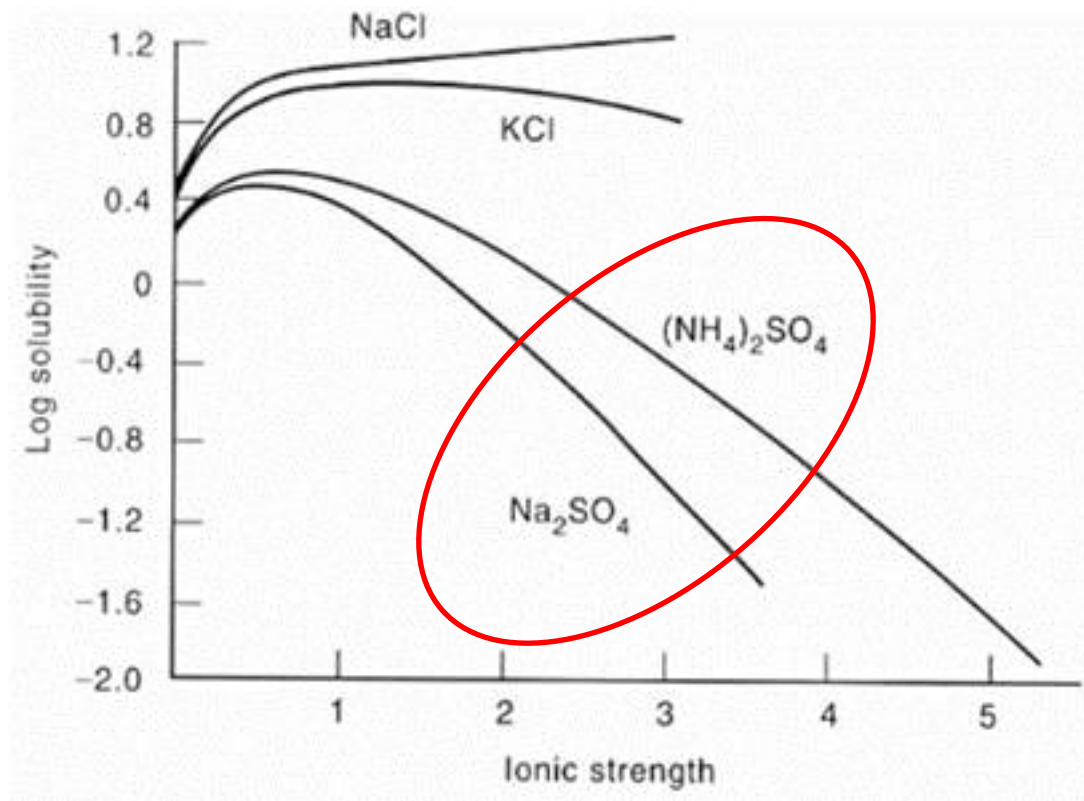
c = concentrazione Molare dello ione

z = carica dello ione

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

-ioni multivalenti (Mg^{2+}): $I > M$

Precipitazione frazionata con i sali

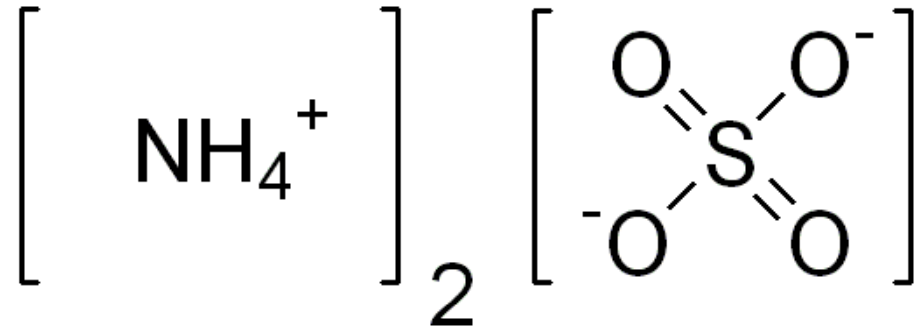
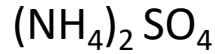


Solubilità della proteina nella soluzione salina

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

Precipitazione frazionata con solfato d'ammonio

SOLFATO di AMMONIO

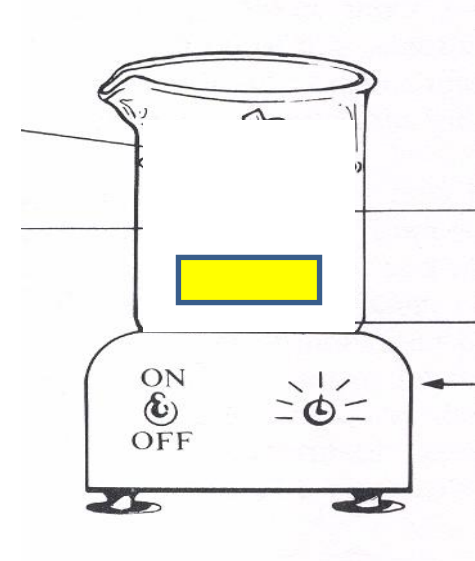
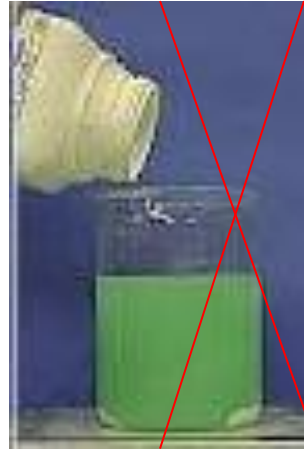


- È molto solubile (3.9M) → elevate forze ioniche **forza ionica** $I = 1/2 \sum c \cdot z^2$
- È disponibile ad elevato grado di purezza
- Non altera la struttura delle proteine
- **Precipitazione reversibile**
- **Economicamente conveniente**
- **Batteriostatica**

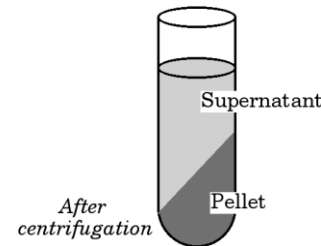
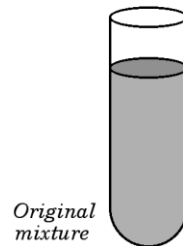
Esempio: - Precipitazione al 60%:

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

390 grammi/L



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

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

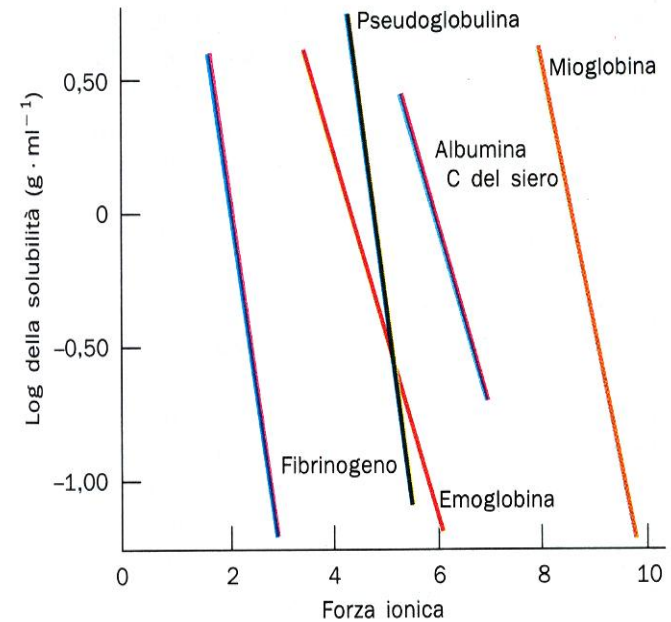
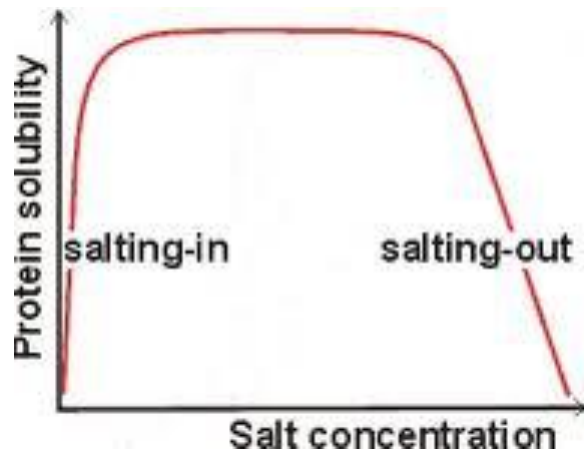


Figura 5.2 Solubilità di alcune proteine in soluzioni di ammonio solfato. (Fonte: COHN, E.J. e EDSALL, J.T., *Proteins, amino acids and peptides*, p. 602, Academic Press, 1943.)

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)

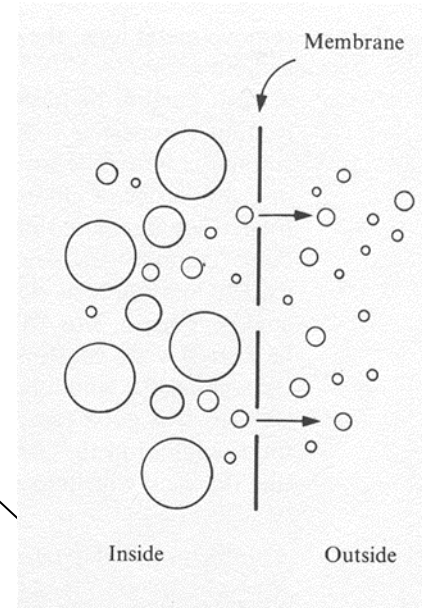
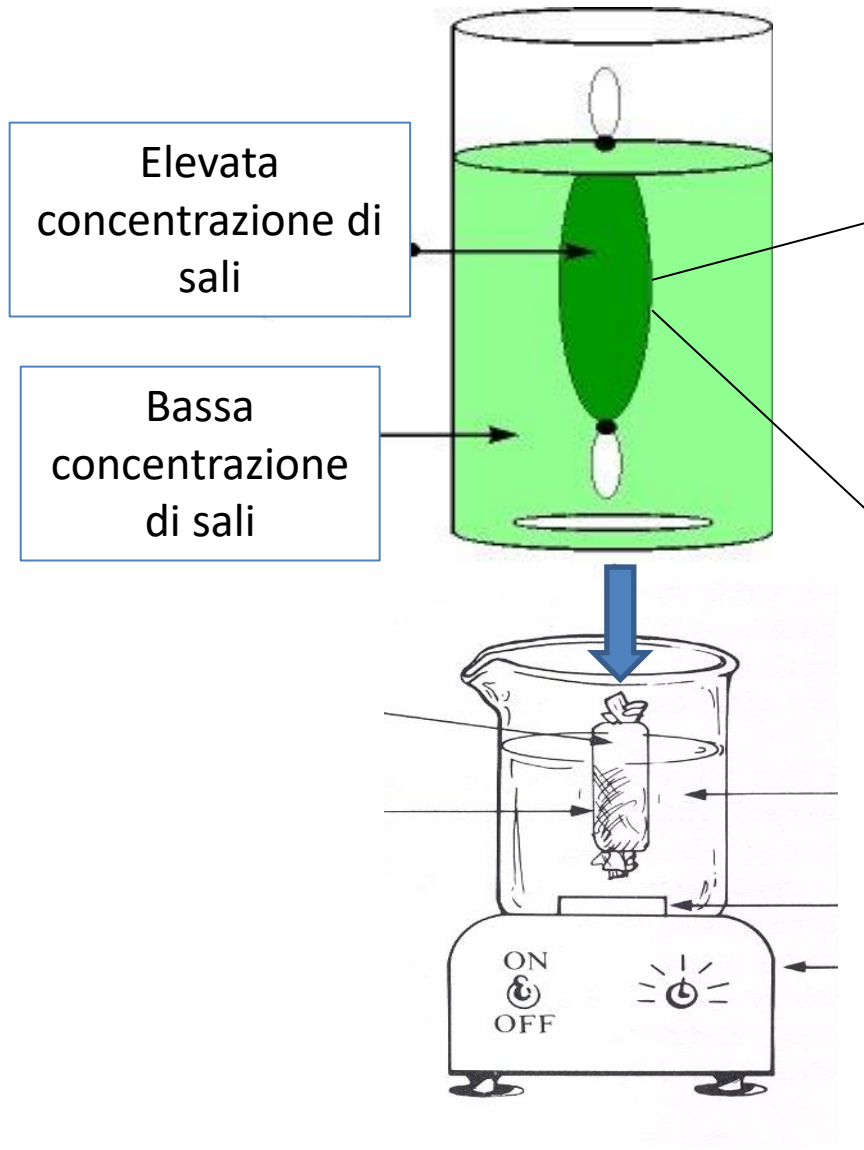


Tampone (forza ionica appropriata)

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