CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA GENERALE E APPLICATA
Anno Accademico 2017/2018

Laboratorio di Chimica Biologica

- **Cromatografia a scambio ionico**

- **determinazione colorimetrica della concentrazione di una miscela proteica**

- **Determinazione spettrofotometrica della concentrazione di una proteina pura**

- **Determinazione spettrofotometrica dell'attività enzimatica**

- **Calcolo dell'attività specifica**

Studente:……..

Matricola:…….

1. Cromatografia a scambio ionico

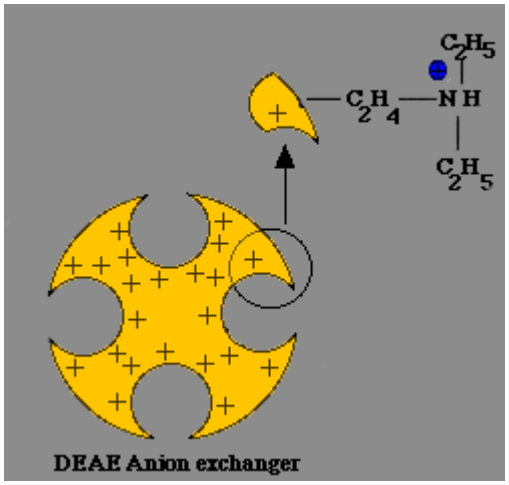
In questo tipo di cromatografia, l'adsorbimento delle particelle sulla fase stazionaria è determinato da interazioni di tipo elettrostatico (gruppi con cariche di segno opposto). Le proteine, che possiedono gruppi ionizzabili, possano portare una carica netta positiva o negativa, utilizzabile per il loro isolamento dalle miscele che le contengono. La carica netta che le proteine presentano dipende dal loro pK e dal pH della soluzione secondo l'equazione di Henderson-Hasselbalch.

Le separazioni a scambio ionico sono condotte in colonne impaccate con una resina scambiatrice di ioni. Si tratta cioè di una resina in cui una matrice solida di supporto, in forma di sferule porose, che presenta gruppi funzionali carichi ad essa covalentemente legati.

Negli scambiatori anionici la resina espone gruppi carichi positivamente (in generale, gruppi basici) che attraggono molecole cariche negativamente, e ne favoriscono l'adsorbimento sulla fase solida, mentre le molecole neutre o cariche positivamente vengono eluite precocemente dalla colonna.

Negli scambiatori cationici la situazione è invertita poiché la resina espone gruppi carichi negativamente (in generale, gruppi acidi) che attraggono molecole cariche positivamente.

La resina DEAE Sepharose, utilizzata in questa esperienza di laboratorio, è costituita da una matrice di agarosio a cui è covalentemente legato il gruppo dietilamminoetile (pK~ 8.5) ed è equilibrata in tampone sodio-fosfato 10 mM, pH 8.0.



Il campione da analizzare mediante cromatografia a scambio ionico è rappresentato da una miscela proteica costituita dalle seguenti proteine: pepsina, ribonucleasi A e alcool deidrogenasi.

La pepsina è un enzima, appartenente alla classe delle idrolasi ed alla sottoclasse EC 3.4.23. Esso è contenuto nel succo gastrico ed ha la proprietà di scindere le proteine in grossi frammenti peptidici. La pepsina viene prodotta dalle cellule parietali dello stomaco sotto forma di pepsinogeno, pro-enzima inattivo con peso molecolare pari a 45.000 ca., che si trasforma in pepsina in seguito a un processo catalizzato dalla pepsina stessa provocato dal pH acido del compartimento gastrico. L'enzima maturo ha un peso molecolare di 36 kDa e un punto isolelettrico pari a 2,2.

La ribonucleasi pancreatica bovina (RNasi A) è un enzima di 124 residui, la cui stabilità è conferita da legami idrogeno intracatena e da quattro ponti disolfurici tra gli otto residui cisteinici. Ha una struttura compatta e molto stabile ed è in grado di scindere l'RNA mediante una reazione di transesterificazione seguita dall'idrolisi di un legame fosfodiesterico. Ha un peso molecolare pari a circa 14 kDa e un punto isoelettrico di 8,64. Il suo coefficiente di estinzione molare è 0,71 per una soluzione 1 mg/ml a 278 nm.

L'alcool deidrogenasi (ADH) (*o anche NAD-dipendente alcool deidrogenasi; NADH-Aldeide deidrogenasi; ecc.*) è un enzima che catalizza preferenzialmente la conversione di alcool primari non ramificati nella loro corrispondente aldeide (*EC 1.1.1.1 → ossidoreduttasi; riconosce gruppi-OH; NAD o NADP dipendente; primo membro del gruppo*). L'enzima nativo da lievito ha un peso molecolare di circa 140 kDa, costituito da 4 subunità di 35 kDa ognuna. Il suo punto isoelettrico è pari a 5,45.

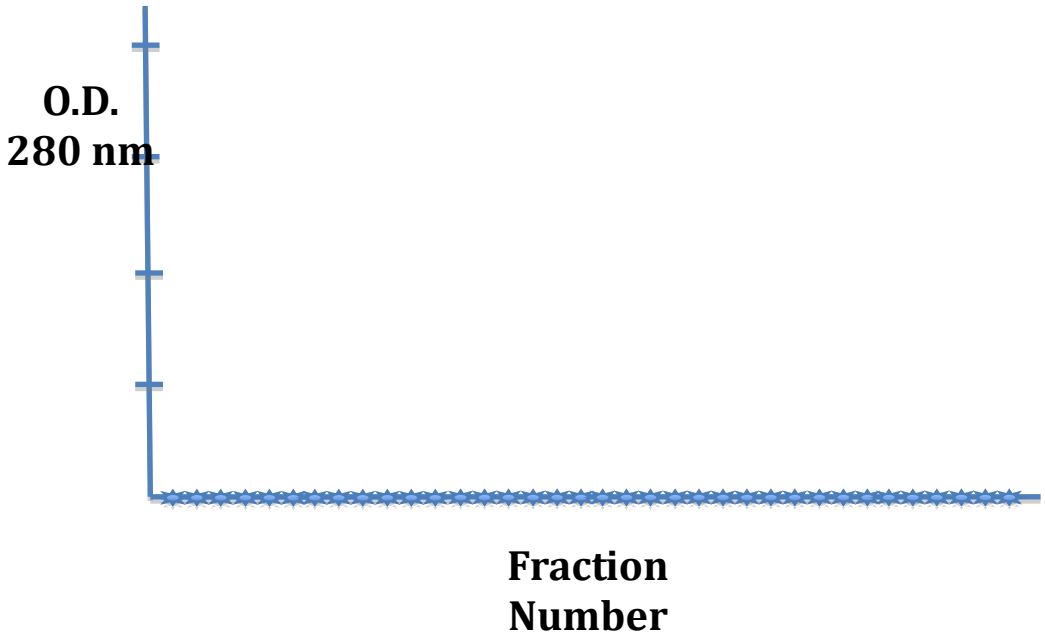
In seguito alla separazione cromatografica delle tre proteine descritte *bisognerà identificarle in base alla posizione di eluizione di ognuna di esse.*

METODICA

- **dopo avere rimosso il tampone presente sulla resina, *caricare* 1 ml di miscela proteica*;***
- ***lavare* la resina con 10 ml di tampone sodio-fosfato 10 mM, pH 7,0;**
- ***eluire* con un *gradiente salino* di NaCl : da 0 M a 0,3 M in tampone 10 mM sodio-fosfato pH 7,0 (30 ml di tampone sodio-fosfato 10 mM, pH 7,0 e 30 ml di tampone sodio-fosfato 10 mM pH 7,0 contenente 0.3 M NaCl);**
- ***Lavare* con 20 ml di tampone sodio-fosfato 10 mM pH 7,0 contenente 1 M NaCl**
- ***leggere* i valori di assorbanza a 280 nm delle singole frazioni eluite dalla colonna e riportare in grafico i dati ottenuti.**

Frazioni	Abs 280 nm	Frazioni	Abs 280 nm
1		21	
2		22	
3		23	
4		24	
5		25	
6		26	
7		27	
8		28	
9		29	
10		30	
11		31	
12		32	
13		33	
14		34	
15		35	
16		36	
17		37	
18		38	
19		39	
20		40	

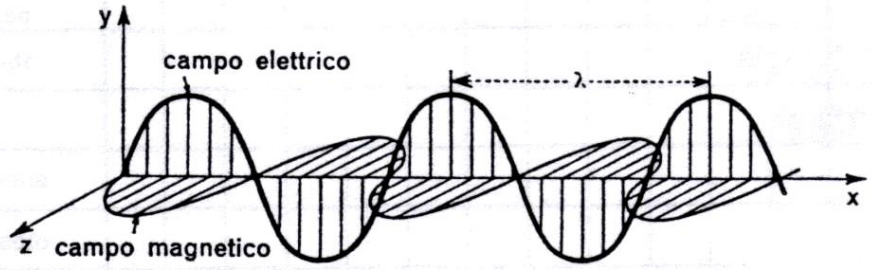
Su un foglio di carta millimetrata costruire il cromatogramma mettendo in grafico con i valori di assorbanza (espressi come Optical Density = O.D.) ottenuti. Per convenzione si riportano in ordinata i valori di assorbanza misurati (O.D.280_{nm}) e in ascissa il volume espresso come numero di frazione.



Osservare i picchi ottenuti ed identificare quello corrispondente alla ADH Collezionare tutto il contenuto delle frazioni con ADH in un'unica provetta, chiuderla con parafilm e conservarla in frigorifero.

2. **Determinazione spettrofotometrica della concentrazione proteica di: una proteina pura (metodo diretto) e di una miscela proteica (metodo colorimetrico indiretto)**

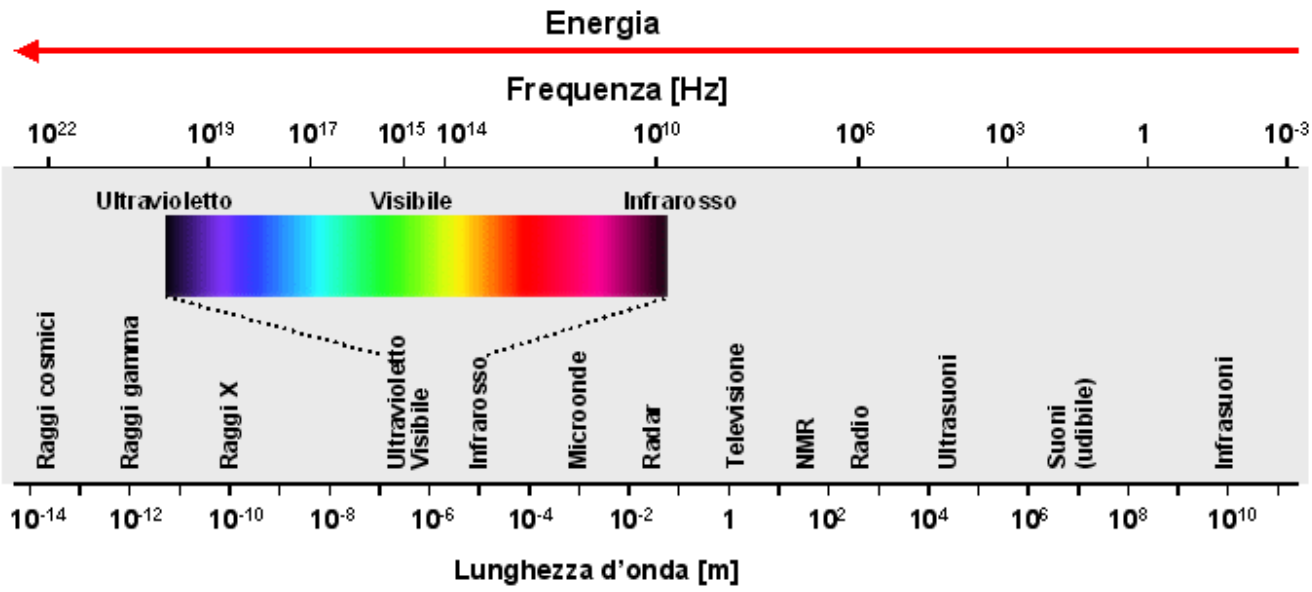
Le tecniche Spettroscopiche o Spettrofotometriche si basano sull'interazione, cioè *lo scambio di energia*, della radiazione elettromagnetica con la materia. Tale energia radiante può essere rappresentata come 1) un'onda elettromagnetica fatta di un insieme fluttuante di campi elettrici e magnetici che si propagano nello spazio in modo periodico o 2) come una serie di pacchetti discreti d'energia, i fotoni.



— Rappresentazione di un'onda elettromagnetica propagantesi nella direzione *x*.

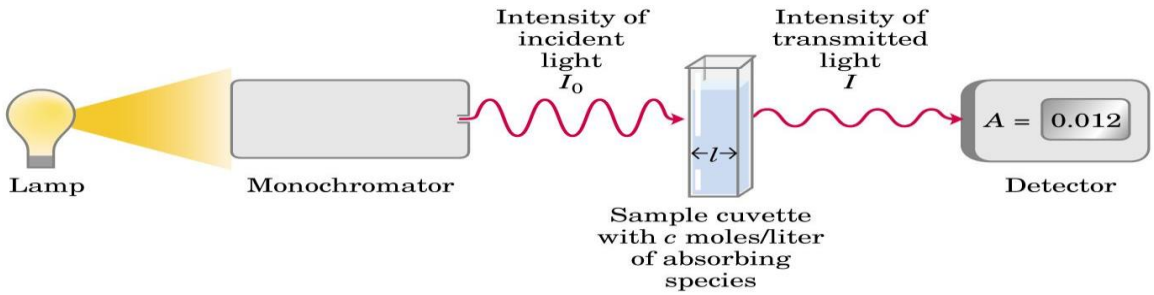
La lunghezza d'onda (λ) è definita come la distanza tra due punti dell'onda aventi la stessa fase. L'energia di questa onda elettromagnetica varia in funzione delle differenti lunghezze d'onda.

Lo spettro elettromagnetico rappresenta l'insieme delle radiazioni ed è costituito da una serie di fotoni o d'onde elettromagnetiche d'energia crescente. Esso viene diviso in regioni caratteristiche corrispondenti a campi ben definiti di energia.



Spettroscopia UV/Visibile

La regione dello spettro maggiormente usata per rilevare proteine in soluzione riguarda lunghezze d'onda che vanno approssimativamente tra i 120~400 nm per l'ultravioletto (anche se la zona utilizzata è più ristretta) e i 400~800 nm per il visibile.



L'interazione dell'energia radiante a determinate lunghezze d'onda con la materia viene rivelata da un apposito strumento, lo spettrofotometro. Ogni sostanza avrà una propria caratteristica lunghezza d'onda a cui assorbirà la luce incidente e la misura di tale assorbimento in funzione della lunghezza d'onda costituisce una sorta di "impronta digitale" della sostanza.

Dalla misura dell'assorbanza di una soluzione proteica si possono ricavare due tipi di informazioni differenti a seconda del campione

- **una informazione qualitativa, cioè verificare se nella soluzione sono presenti questo tipo di molecole**
- **Una informazione di concentrazione se trattasi di specie pura.**

Per la misurazione della concentrazione di una specie pura in soluzione, esiste un'equazione che permette di calcolare la concentrazione di una sostanza in soluzione ed è la *legge di Lambert-Beer,* la quale può essere enunciata come segue: l*a quantità di luce assorbita da una soluzione è funzione della concentrazione della sostanza assorbente e della lunghezza del cammino ottico.* L'equazione risulta essere:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

A = *Assorbanza* misurate come densità ottiche (OD), cioè il valore che si legge sullo spettrofotometro;

ε = *Coeficiente di estinzione* (Molare o mg/ml), cioè corrisponde all'assorbanza misurata alla lunghezza d'onda a cui la sostanza mostra il massimo di assorbimento, quando il campione è in concentrazione di 1M o 1 mg/ml e il cammino ottico è di 1 cm.

l = *cammino ottico*, cioè lo spessore del campione, ovvero la distanza percorsa dallla luce nell'attraversare il campione.

La proteina di riferimento più usata è l'albumina serica bovina il cui coefficiente di estinzione in mg/ml è di 0,67 OD_{280nm}.

Determinazione della concentrazione proteica di una miscela (proteica): metodo indiretto

Quando la soluzione è una miscela di proteine diverse, non è possibile applicare la spettrofotometria diretta per determinarne la concentrazione. Le varie specie proteiche avranno, infatti, ciascuna coefficienti di estinzione diversi. In questo caso si procede per via indiretta tramite metodo colorimetrico descritto in seguito. In questa procedura, la BSA rappresenta la proteina di riferimento in quanto è possibile determinarne la concentrazione esatta per via spettrofotometrica. La soluzione che vi sarà fornita è ad una concentrazione di 0,5 mg/ml.

Reazione Colorimetrica di Bradford

In soluzione acida, il colorante triarilmetano (Coomassie Blu) si lega alle proteine sviluppando una colorazione misurabile mediante uno spettrofotometro. Il massimo valore di assorbanza presentato dal colorante in soluzione è di 465 nm (λ max del colorante) ma quello del complesso colorante–proteina (blu) subisce uno spostamento a 595 nm (λ max del complesso). Lo sviluppo di colore quindi si accompagna ad un aumento dell'assorbanza del campione a 595 nm che è proporzionale alla quantità di proteine totali presenti nel campione.

Per conoscere i valori di assorbanza a 595 nm dei complessi colorante-proteine (funzione della concentrazione proteica poiché il colorante è in largo eccesso) è necessario procedere alla costruzione della cosidetta "retta di taratura" del saggio. Essa si costruisce facendo reagire il reattivo di Bradford (Coomassie Blu in soluzione acida) con quantità *note* e crescenti (1- 2 - 4 – 8 –μg) di una soluzione di BSA di cui si è determinata la concentrazione con il metodo diretto.

Preparare 600 μl di soluzione contenente proteine (vedere schema) ed aggiungere 400 μl del reattivo di Bradford. Mescolare e leggere l'assorbanza della soluzione a 595 nm

Tubo	Campione	H_2O	Reattivo	OD 595nm	µg
1	Bianco	600 µl	400 µl	0	0
2	BSA 1 µg = 2 µl	598 µl	400 µl		1
3	BSA 2 µg = 4 µl	596 µl	400 µl		2
4	BSA 4 µg = 8 µl	592 µl	400 µl		4
5	BSA 8 µg = 16 µl	584 µl	400 µl		8
6	Miscela di carico 2 µl	598 µl	400 µl		
7	Miscela di carico 5 µl	595 µl	400 µl		

- **leggere contro bianco o sottrarre a ogni lettura (tubi 2-7) l'assorbanza del bianco;**
- **Costruire la retta di taratura ponendo in grafico su carta millimetrata i valori di assorbanza (ordinate) registrati contro i relativi µg di BSA (ascisse);**
- **Determinare la quantità di proteine presenti nella miscela (tubi 6 - 7), calcolando sulla retta di taratura a quanti µg di proteina corrispondono le letture ottenute:**

… µg proteine/2 µl miscela = … mg/ml

… µg proteine/5 µl miscela = … mg/ml

La concentrazione proteica in mg/ml sarà una media aritmetica dei valori ottenuti

La quantità di proteine totali si calcola moltiplicando il valore della concentrazione espressa in mg/ml per il volume del campione

Dosaggio spettrofotometrico della concentrazione della ADH eluita da colonna (metodo diretto)

Poiché l'ADH eluito da colonna cromatografica è omogeneo, la determinazione della sua concentrazione può essere effettuata direttamente per via spettrofotometrica servendoci del suo coefficiente di estinzione E1% = 14.6 (280 nm in acqua).

1. Dosaggio di attivita' enzimatica

Lo scopo di questa parte della esercitazione è quella di calcolare le unità enzimatiche di ADH attraverso un saggio di attività spettrofotometrico. Verrà dunque descritta la procedura: i) per la messa a punto di una miscela di saggio in cui l'enzima ADH esplichi la sua attività catalitica e ii) per il calcolo delle unità enzimatiche.

L'ADH catalizza l'ossidazione di alcoli primari in presenza del coenzima NAD^+, ad un pH ottimale di 8.0; durante la reazione inversa le aldeidi sono ridotte in presenza di NADH ad un pH ottimale intorno alla neutralità. La variazione di assorbanza a 340 nm (variazione del rapporto forma ossidata e ridotta NAD^+/NADH) per unità di tempo è misura dell'attività enzimatica.

$$\xrightarrow{\text{ADH}}$$

$$CH_3\text{-}CH_2\text{-}OH + NAD^+ \Leftrightarrow O{=}CH\text{-}CH_3 + NADH + H^+$$

Una unità enzimatica (U) è definita come la quantità di enzima richiesta per convertire 1 µmol di substrato in prodotto in 1 min in condizioni di temperatura definite (generalmente 25 o 30 °C) e ad un valore di forza ionica e pH ottimale.

Attraverso il saggio spettrofotomentrico si dovrà determinare la quantità (espressa in micromoli) di NADH che si forma in un minuto.

- ***Saggio di attività dell'alcool deidrogenasi:***

1. **miscela di reazione: 2 mM NAD^+, 20 mM Etanolo in tampone sodio-fosfato 0.025 M, pH 8.** Mescolare 2.5 ml di tampone sodio-fosfato 0.1 M, pH 8, 0.4 ml di NAD^+ 0.05 M, 2 ml di etanolo 0.1 M e portare a 10 ml con H_2O;
2. **allestire i saggi di attività mescolando in una cuvetta 1 ml di miscela di reazione e:**

…… µl di miscela proteica pari a circa …….µg;

……µl di ADH purificata pari a circa …….µg;

…… µl di ADH (controllo positivo) pari a circa …….µg

registrare l'incremento di assorbanza a 340 nm in funzione del tempo;

3. **calcolare le µmoli di NADH formate in 1 ml di miscela di reazione:** dividere l'incremento di assorbanza per minuto (ΔA/min) per il coefficiente di estinzione millimolare (µmoli/ml) del NADH ***(OD a 340 nm ≅6. 22);***
4. **calcolare le unità di attività enzimatica/ml di soluzione saggiata, tenendo conto dei µl delle frazioni utilizzati per il saggio.** (Una unità enzimatica è la quantità di enzima che converte in prodotto una µmole di substrato per minuto nelle condizioni ottimali di pH e temperatura per il saggio).

$$U/ml = \frac{\mu moli\ NADH/ml \times V\ finale\ (1000\ \mu l)}{\mu l\ utilizzati\ nel\ saggio}$$

Campione	Volume finale della miscela di reazione	Δ_{340nm} 1 min	U misurate	U/ml	Unità totali
5 µl ADH (controllo positivo)	1 ml				
2 µl Miscela di carico	1 ml				
5 µl Miscela di carico	1 ml				
… µl ADH da colonna	1 ml				
… µl ADH da colonna	1 ml				

Trascrivere i valori della quantità di proteine totali e unità enzimatiche totali ottenuti per ogni campione

Calcolare l'attività specifica dei singoli campioni

Calcolare la resa (%) del processo di purificazione (Resa= Unità dopo cromatografia diviso unità iniziali)

Calcolare il fattore di purificazione

Campione	Proteine totali	U totali	Attività specifica (attività/proteine)	Resa	Fattore di purificazione
ADH Controllo positivo)					
Miscela di carico					
ADH da colonna					