

Laboratorio Integrato 4

Lezione n.2

Dosaggio delle proteine

Dott.ssa Francesca Zazzeroni

METODI PER EFFETTUARE UN DOSAGGIO PROTEICO

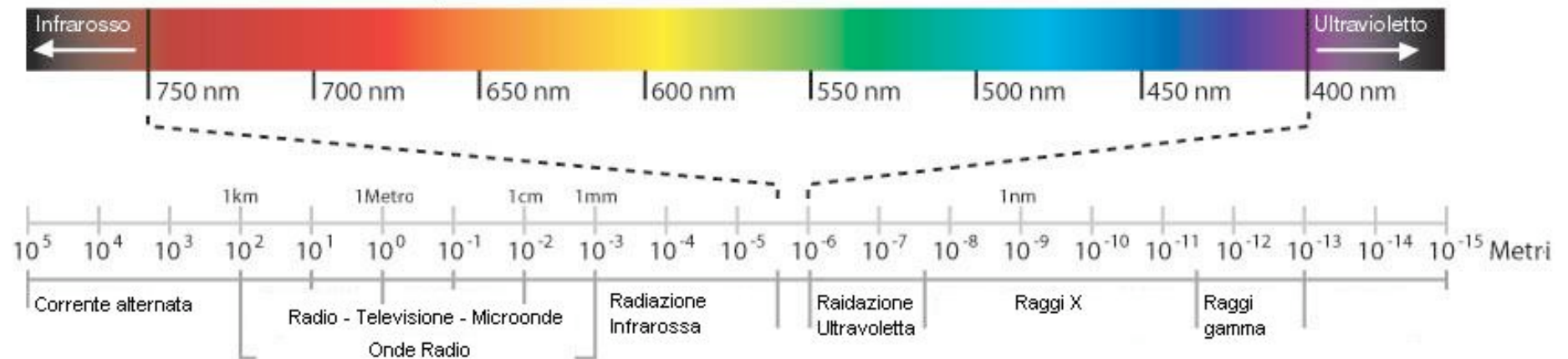
1-**Metodo del Biureto** - il reattivo del biureto consiste in una soluzione alcalina di solfato di rame contenente tartato di sodio e potassio. Gli ioni rameici formano un complesso di coordinazione con 4 gruppi NH ed ha un picco di assorbimento a 540 nm.

2-**Metodo di Lowry** (Folin-Ciocalteu) - il reattivo di Folin consiste in una soluzione di Sali di sodio degli acidi tungstico, molibdico e fosforico, che reagisce con I gruppi fenolici delle tirosine e produce, in presenza di ioni rameici, una colorazione blu/porpora che ha un picco di assorbimento a 660 nm.

3-**Assorbanza a 280 nm** (banda aromatica) op a 205-220 nm (banda peptidica)

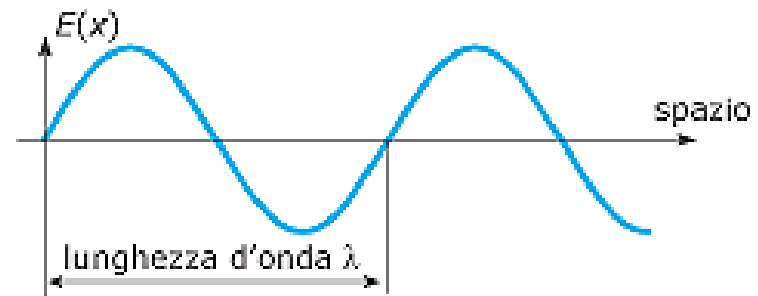
4-**Legame a coloranti** (blu comassie) - il blu di comassie è uno dei tanti coloranti che sono capaci di legarsi alle proteine. Esso produce un complesso colorato che assorbe la luce a 595 nm.

Spettro di luce visibile all'occhio umano



CARATTERISTICHE DELLE ONDE ELETTRROMAGNETICHE

LUNGHEZZA D'ONDA: la distanza percorsa dall'onda durante un ciclo completo di oscillazione (nanometri)



FREQUENZA: numero di cicli completi di oscillazione che avvengono nell'unita' di tempo (Hertz = 1 ciclo/secondo)



Le sostanze che appaiono colorate sono quelle che, illuminate con luce bianca (luce policromatica che contiene tutti i colori dello spettro visibile), assorbono parte dello spettro visibile. **Il colore visibile è quella parte di luce non assorbita.**

Ad es., una soluzione rossa ci appare tale se, illuminata con una luce bianca assorbe tutte le radiazioni ad eccezione di quelle del rosso.

Una soluzione ci appare trasparente se non assorbe alcuna radiazione visibile.

Un corpo bianco, invece, e' tale se riflette tutte le radiazioni.

CROMOFORI

Si intende per cromoforo un raggruppamento chimico insaturo che risulta responsabile di un assorbimento caratteristico situato nella regione di lunghezza d'onda compresa tra 180 e 1000 nm.

I cromofori piu' semplici sono costituiti da gruppi organici quali l'etilenico, l'acetilenico, il carbonilico, il carbossilico, l'azoico, il nitrico, il nitroso, il solfossido etc.

CROMOFORI

I cromofori possono avere degli spostamenti dello spettro verso:

- lunghezze d'onda maggiori, e in questo caso si parla di effetto batocromo o red shift;

- Lunghezze d'onda minori, e in questo caso si parla di effetto ipsocromo o blue shift.

Oppure, si possono avere:

- aumento dell'intensita', e in questo caso si parla di effetto ipercromico;

- diminuzione dell'intensita', e in questo caso si parla di effetto ipocromico.

SPETTROFOTOMETRO

I componenti essenziali sono:

- a) Sorgente di luce policromatica (tungsteno per il visibile, deuterio per l'UV)
- b) Fessura d'ingresso-lente (per minimizzare la luce diffusa e rendere paralleli i raggi della sorgente)
- c) Filtro o monocromatore (per selezionare una banda di λ definita, ossia monocromatica)
- d) Fessura d'uscita
- e) Cella o cuvetta
- f) fotomoltiplicatori

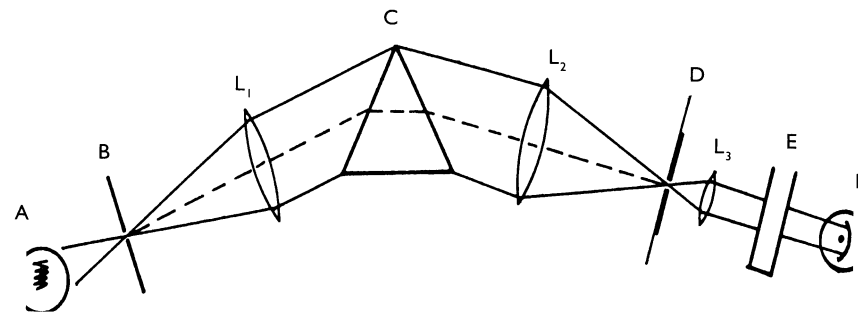
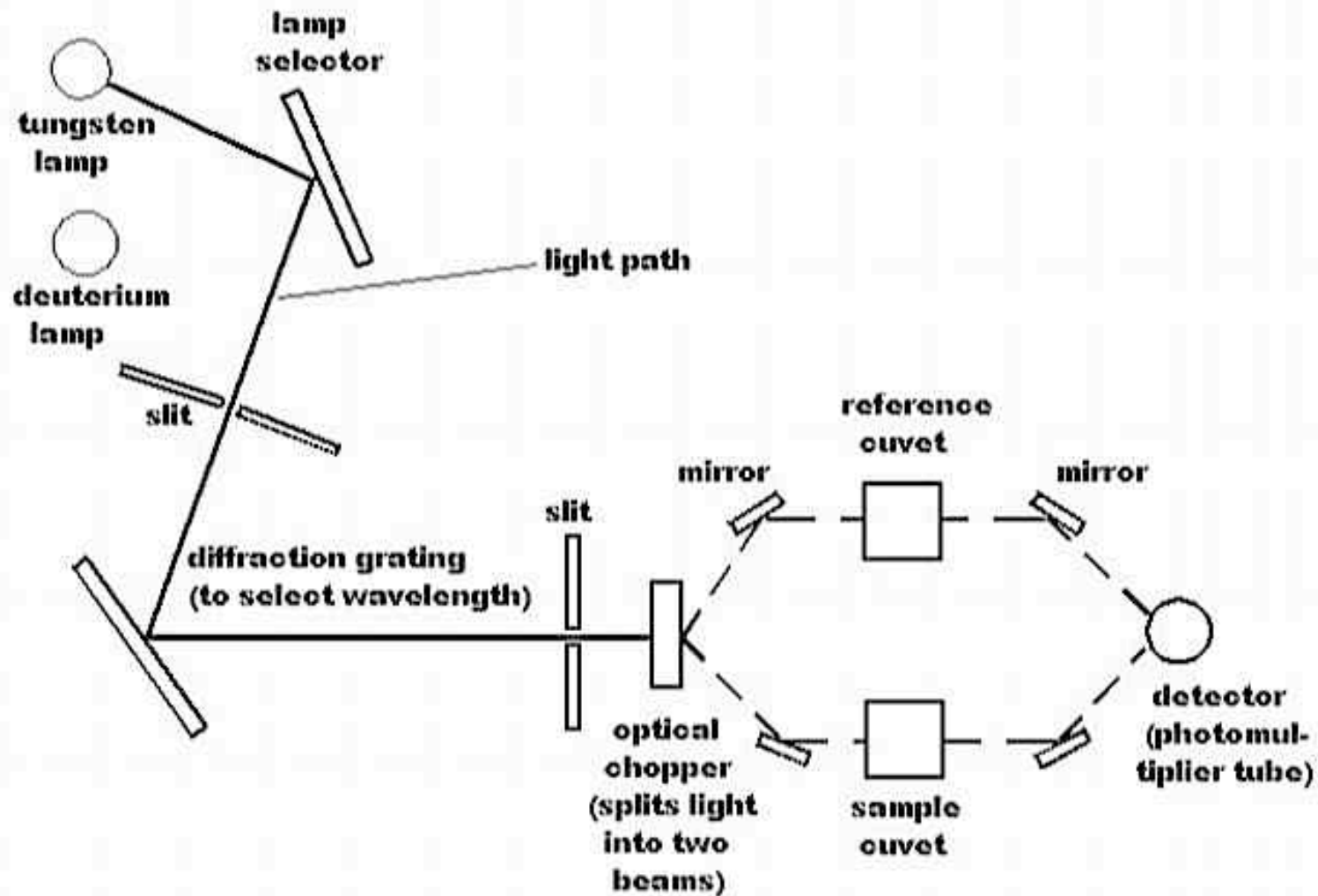
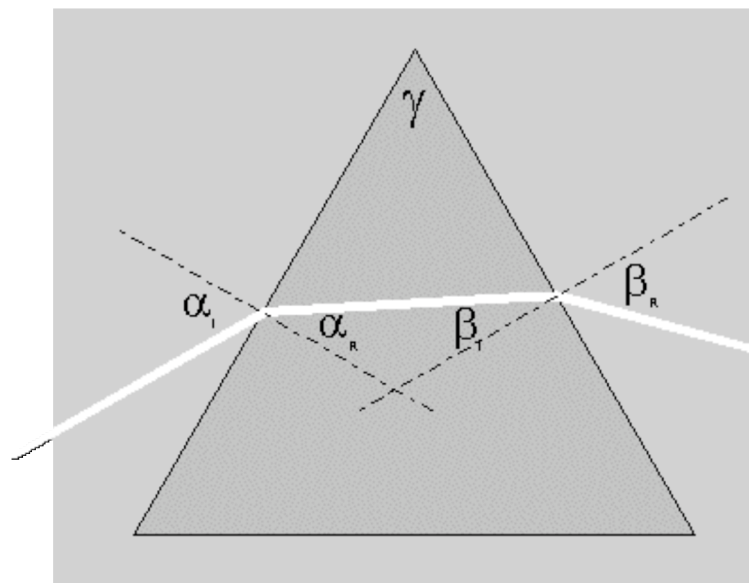


Figura 7.6. - Schema di un fotometro. A = sorgente luminosa; B = fessura di ingresso; C = monocromatore; D = fessura di uscita; E = cella di lettura; F = fotorivelatore con amplificatore; L₁, L₂ e L₃ = lenti.

Spettrofotometro a doppio raggio



PRISMA DI VETRO OTTICO



Il prisma opera una doppia rifrazione della luce

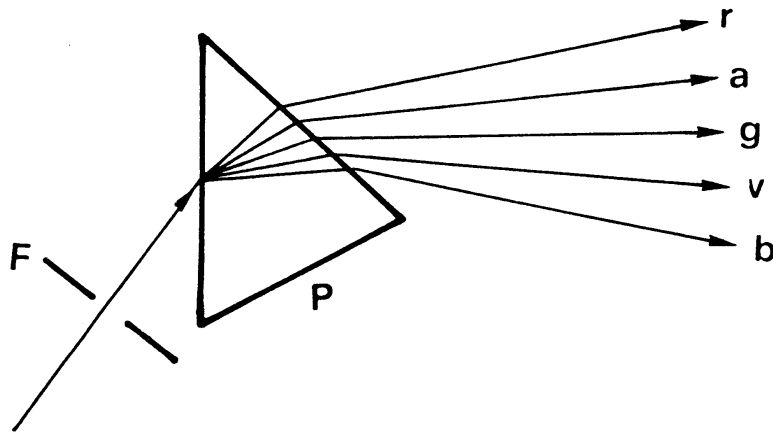


Figura 7.9. - Rappresentazione schematica del prisma (P). Viene indicato il doppio fenomeno di rifrazione della luce in corrispondenza della faccia di entrata e di uscita e la conseguente dispersione; r = luce rosa, a = luce arancione; g = luce gialla; v = luce verde; b = luce blu; F = fenditura di ingresso.

L'indice di rifrazione del mezzo trasparente che costituisce il prisma cresce con il diminuire della lunghezza d'onda della luce, e questo permette di ottenere una separazione delle componenti monocromatiche.

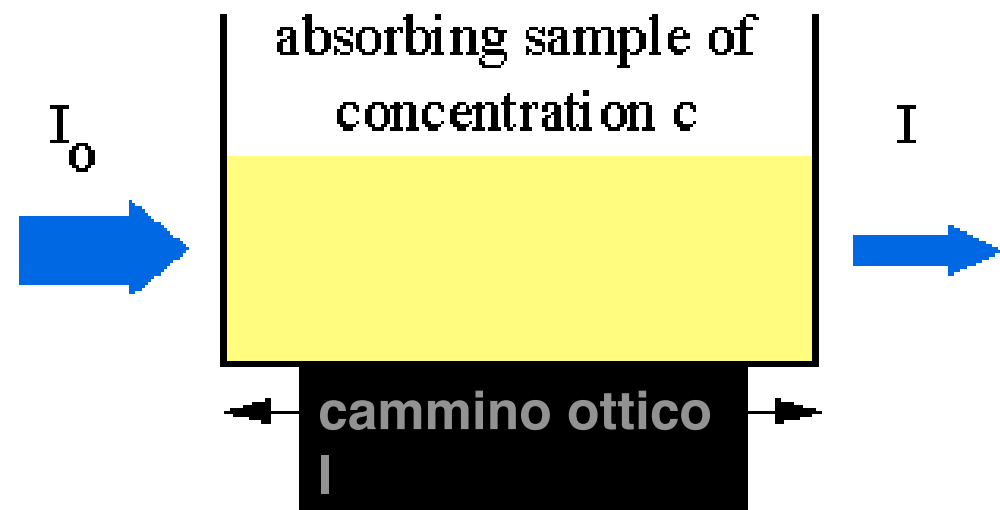
Legge di Lambert-Beer

$$A = \log_{10} (I_0/I) = e c l$$

e coefficiente di estinzione (dipende da λ)

c concentrazione

l cammino ottico



Deviazioni dalla legge di Lambert-Beer

La legge di Lambert-Beer e' valida solo quando si usano radiazioni monocromatiche e per soluzioni diluite o che comunque siano entro ambiti adatti di concentrazione.

Le cause di non osservanza della legge possono essere sia di tipo chimico che di tipo strumentale.

Deviazioni dalla legge di Lambert-Beer

- Effetti chimici

- Modificazioni delle proprietà di assorbimento per cambiamenti della struttura molecolare della sostanza assorbente (formazione di complessi, polimerizzazione, etc)
- Cambiamento dell'indice di rifrazione della soluzione con la concentrazione
- Modificazione dell'associazione della sostanza assorbente per alterazione del pH
- Assorbimento di luce da parte di altre sostanze presenti in soluzione
- Effettuazione della misura a valori di concentrazione troppo elevati

- Effetti fotometrici (strumentali)

- Radiazioni non monocromatiche impiegate per la misura
- Linearità degli strumenti

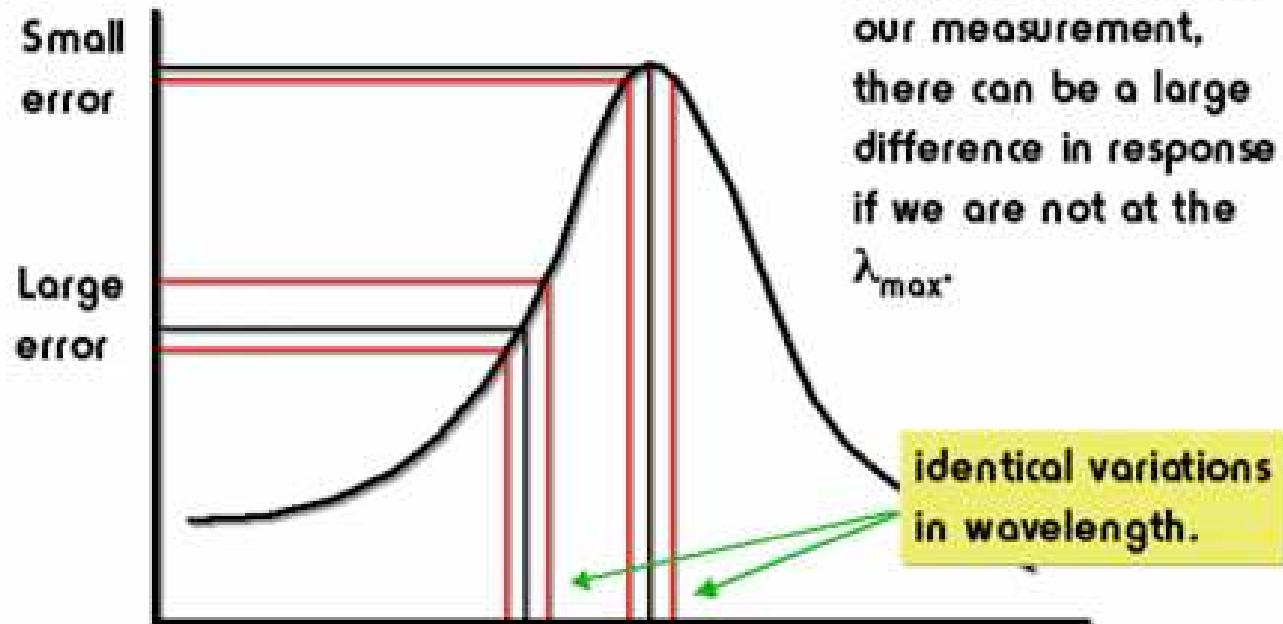
Legge di Lambert-Beer

La legge di Lambert-Beer è valida quindi se la luce incidente è monocromatica, se l'assorbimento del solvente è trascurabile, se la concentrazione del campione è contenuta entro limiti adatti, se non si verificano reazioni chimiche delle molecole del campione fra loro o con il solvente.

Costruzione di curve di taratura

- La **sensibilità** è massima al picco di estinzione del cromoforo
- A volte si preferisce un picco più "specifico"
- Il "bianco" deve contenere tutti i reagenti, tranne la sostanza da determinare
- Occorrono possibilmente cinque punti, misurati in doppio
- Non si deve estrapolare la curva oltre il valore più alto determinato

Perché si misura al picco di assorbimento



Criteri di scelta di un metodo colorimetrico

- Specificità della reazione
- Campo di proporzionalità $A/[C]$
- Stabilità del colore
- Riproducibilità
- Limpidità della soluzione
- Sensibilità
- Convenienza (tempo/costo)

METODI PER EFFETTUARE UN DOSAGGIO PROTEICO

1-**Metodo del Biureto** - il reattivo del biureto consiste in una soluzione alcalina di solfato di rame contenente tartato di sodio e potassio. Gli ioni rameici formano un complesso di coordinazione con 4 gruppi NH ed ha un picco di assorbimento a 540 nm.

2-**Metodo di Lowry** (Folin-Ciocalteu) - il reattivo di Folin consiste in una soluzione di Sali di sodio degli acidi tungstico, molibdico e fosforico, che reagisce con I gruppi fenolici delle tirosine e produce, in presenza di ioni rameici, una colorazione blu/porpora che ha un picco di assorbimento a 660 nm.

3-**Assorbanza a 280 nm** (banda aromatica) op a 205-220 nm (banda peptidica)

4-**Legame a coloranti** (blu comassie) - il blu di comassie è uno dei tanti coloranti che sono capaci di legarsi alle proteine. Esso produce un complesso colorato che assorbe la luce a 595 nm.

Assorbimento a 280 nm (metodo di Warburg e Christian)

Questo metodo puo' essere utilizzato per quantizzare estratti proteici con concentrazione tra 20 e 3000 $\mu\text{g/ml}$

Come standard si utilizza la BSA, e si prepara una curva di taratura (20, 50, 100, 250, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g/ml}$)

Come riferimento, una soluzione di 3 mg/ml BSA deve avere una A_{280} di 1,98

Assorbimento a 280 nm (metodo di Warburg e Christian)

- Dipende dal contenuto in amminoacidi aromatici (Trp, Tyr, Phe)
- Esistono equazioni empiriche (applicabili a miscele binarie) per sottrarre il contributo di acidi nucleici : ad esempio,

$$[\text{prot}] (\text{mg/ml}) = 1.45 A_{280} - 0.70 A_{260}$$

- Metodo rapido, non distruttivo; accuratezza molto variabile

Metodo del biureto



- In soluzione alcalina sostanze contenenti almeno due legami peptidici formano complessi blu-porpora (540 nm) con il rame
- Metodo selettivo, poco sensibile (ottimo per campioni ad alta concentrazione: proteine del siero, negli alimenti)

BCA PROTEIN ASSAY KIT

E' un kit che contiene 2 soluzioni, BCA Reagent A e BCA reagent B, che vanno mescolati prima dell'uso in un rapporto 1:50

Si può utilizzare una piastra a 96 pz, si aggiungono 200 μ l di BCA mix, ed generalmente 1 μ l di estratto proteico. Si incuba 30 min a 37° e si effettua una lettura a 562 nm

A. Interfering substances

Certain substances are known to interfere with the BCA™ Assay including those with reducing potential, chelating agents, and strong acids or bases. Because they are known to interfere with protein estimation at even minute concentrations, avoid the following substances as components of the sample buffer:

Ascorbic Acid
Catecholamines
Creatinine
Cysteine

EGTA
Impure Glycerol
Hydrogen Peroxide
Hydrazides

Iron
Lipids
Melibiose
Phenol Red

Impure Sucrose
Tryptophan
Tyrosine
Uric Acid

Table 2. Compatible Substance Concentrations in the BCA™ Protein Assay (see text for details).

Substance	Compatible Concentration	Substance	Compatible Concentration
Salts/Buffers		Detergents**	
ACES, pH 7.8	25 mM	Brij™-35	5.0%
Ammonium sulfate	1.5 M	Brij™-56, Brij™-58	1.0%
Asparagine	1 mM	CHAPS, CHAPSO	5.0%
Bicine, pH 8.4	20 mM	Deoxycholic acid	5.0%
Bis-Tris, pH 6.5	33 mM	Octyl β-glucoside	5.0%
Borate (50 mM), pH 8.5 (# 28384)	undiluted	Nonidet P-40 (NP-40)	5.0%
B-PER™ Reagent (#78248)	undiluted	Octyl β-thioglucoopyranoside	5.0%
Calcium chloride in TBS, pH 7.2	10 mM	SDS	5.0%
Na-Carbonate/Na-Bicarbonate (0.2 M), pH 9.4 (#28382)	undiluted	Span™ 20	1.0%
Cesium bicarbonate	100 mM	Triton™ X-100	5.0%
CHES, pH 9.0	100 mM	Triton™ X-114, X-305, X-405	1.0%
Na-Citrate (0.6 M), Na-Carbonate (0.1 M), pH 9.0 (#28388)	1:8 dilution*	Tween™-20, Tween™-60, Tween™-80	5.0%
Na-Citrate (0.6 M), MOPS (0.1 M), pH 7.5 (#28386)	1:8 dilution*	Zwittergent™ 3-14	1.0%
Cobalt chloride in TBS, pH 7.2	0.8 mM	Chelating agents	
EPPS, pH 8.0	100 mM	EDTA	10 mM
Ferric chloride in TBS, pH 7.2	10 mM	EGTA	-----
Glycine-HCl, pH 2.8	100 mM	Sodium citrate	200 mM
Guanidine-HCl	4 M	Reducing & Thiol-Containing Agents	
HEPES, pH 7.5	100 mM	N-acetylglucosamine in PBS, pH 7.2	10 mM
Imidazole, pH 7.0	50 mM	Ascorbic acid	-----
MES, pH 6.1	100 mM	Cysteine	-----
MES (0.1 M), NaCl (0.9%), pH 4.7 (#28390)	undiluted	Dithioerythritol (DTE)	1 mM
MOPS, pH 7.2	100 mM	Dithiothreitol (DTT)	1 mM
Modified Dulbecco's PBS, pH 7.4 (#28374)	undiluted	Glucose	10 mM
Nickel chloride in TBS, pH 7.2	10 mM	Melibiose	-----
PBS; Phosphate (0.1 M), NaCl (0.15 M), pH 7.2 (#28372)	undiluted	2-Mercaptoethanol	0.01%
PIPES, pH 6.8	100 mM	Potassium thiocyanate	3.0 M
RIPA lysis buffer: 50mM Tris, 150mM NaCl, 0.5% DOC, 1% NP-40, 0.1% SDS, pH 8.0	undiluted	Thimerosal	0.01%
Sodium acetate, pH 4.8	200 mM	Misc. Reagents & Solvents	
Sodium azide	0.2%	Acetone	10%
Sodium bicarbonate	100 mM	Acetonitrile	10%
Sodium chloride	1 M	Aprotinin	10 mg/L
Sodium citrate, pH 4.8 or pH 6.4	200 mM	DMF, DMSO	10%
Sodium phosphate	100 mM	DMSO	10%
Tricine, pH 8.0	25 mM	Ethanol	10%
Triethanolamine, pH 7.8	25 mM	Glycerol (Fresh)	10%
Tris	250 mM	Hydrazides	-----
TBS; Tris (25 mM), NaCl (0.15 M), pH 7.6 (#28376)	undiluted	Hydrides (Na ₂ BH ₄ or NaCNBH ₃)	-----
Tris (25 mM), Glycine (192 mM), pH 8.0 (#28380)	1:3 dilution*	Hydrochloric Acid	100 mM
Tris (25 mM), Glycine (192 mM), SDS (0.1%), pH 8.3 (#28378)	undiluted	Leupeptin	10 mg/L
Zinc chloride in TBS, pH 7.2	10 mM	Methanol	10%
		Phenol Red	-----
		PMSF	1 mM
		Sodium Hydroxide	100 mM
		Sucrose	40%
		TLCK	0.1 mg/L
		TPCK	0.1 mg/L
		Urea	3 M
		o-Vanadate (sodium salt), in PBS, pH 7.2	1 mM

* Diluted with ultrapure water; ** Detergents were tested using Pierce high-purity Surfact-Amps™ Products, which have low peroxide content;

-- Dashed-line entry indicates that the material is incompatible with the assay.

Metodo di Lowry (1951)

- Il rame in cond. alcaline si complessa alle proteine (vedi "biureto")
- Il reattivo di Folin reagisce con gruppi fenolici (tirosine)
- Sensibile; subisce molte interferenze

Metodo di Bradford (1976)

- Utilizza il colorante Coomassie Blue
- Sensibile; subisce poche interferenze (detergenti)
- Variabilità da proteina a proteina

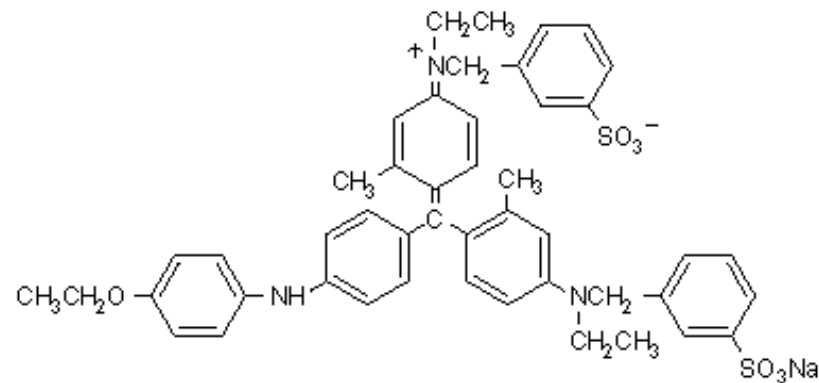


Table 1. Reagents Compatible with the Bio-Rad Protein Assay When Using the Standard Procedure.*

Acetate, 0.6 M	KCl, 1.0 M
Acetone	Malic acid, 0.2 M
Adenosine, 1 mM	MgCl ₂ , 1.0 M
Amino Acids	Mercaptoethanol, 1.0 M
Ammonium sulfate, 1.0 M	MES, 0.7 M
Ampholytes, 0.5%	Methanol
Acid pH	MOPS, 0.2 M
ATP, 1 mM	NaCl, 5 M
Barbital	NAD, 1 mM
BES, 2.5 M	NaSCN, 3 M
Boric acid	Peptones
Cacodylate-Tris, 0.1 M	Phenol, 5%
CDTA, 0.05 M	Phosphate, 1.0 M
Citrate, 0.05 M	PIPES, 0.5 M
Deoxycholate, 0.1%	Polyadenylic acid, 1 mM
Dithiothreitol, 1 M	Polypeptides (MW<3000)
DNA, 1 mg/ml	Pyrophosphate, 0.2 M
EDTA, 0.1 M	rRNA, 0.25 mg/ml
EGTA, 0.05 M	tRNA, 0.4 mg/ml
Ethanol	total RNA, 0.30 mg/ml
Eagle's MEM	SDS, 0.1%
Earle's salt solution	Sodium phosphate
Formic acid, 1.0 M	Streptomycin sulfate, 20%
Fructose	Triton X-100, 0.1%
Glucose	Tricine
Glutathione	Tyrosine, 1 mM
Glycerol, 99%	Thymidine, 1 mM
Glycine, 0.1 M	Tris, 2.0 M
Guanidine-HCl	Urea, 6 M
Hank's salt solution	Vitamins
HEPES buffer, 0.1 M	

* Interference may be caused by chemical-protein and/or chemical-dye interactions. Table 1 lists those chemical reagents not directly affecting the development of dye color. Since every protein-chemical reagent combination has not been assayed, it is possible that some of the listed reagents produce interference in combination with certain proteins. However, with respect to proteins such as bovine albumin and globulin, the above listed reagents show little or no interference.

Standard Procedure for Microtiter Plates

1. Prepare dye reagent by diluting 1 part Dye Reagent Concentrate with 4 parts DDI water. Filter through a Whatman #1 filter (or equivalent) to remove particulates. This diluted reagent may be used for about 2 weeks when kept at room temperature.
2. Prepare three to five dilutions of a protein standard, which is representative of the protein solution to be tested. The linear range of this microtiter plate assay is 0.05 mg/ml to approximately 0.5 mg/ml.
3. Pipet 10 μ l of each standard and sample solution into separate microtiter plate wells.
4. Add 200 μ l of diluted dye reagent to each well. Mix the sample and reagent thoroughly using a microplate mixer. Alternatively, use a multi-channel pipet to dispense the reagent. Depress the plunger repeatedly to mix the sample and reagent in the well. Replace with clean tips and add reagent to the next set of wells.
5. Incubate at room temperature for at least 5 minutes. Absorbance will increase over time; samples should incubate at room temperature for no more than 1 hour.
6. Measure absorbance at 595 nm.

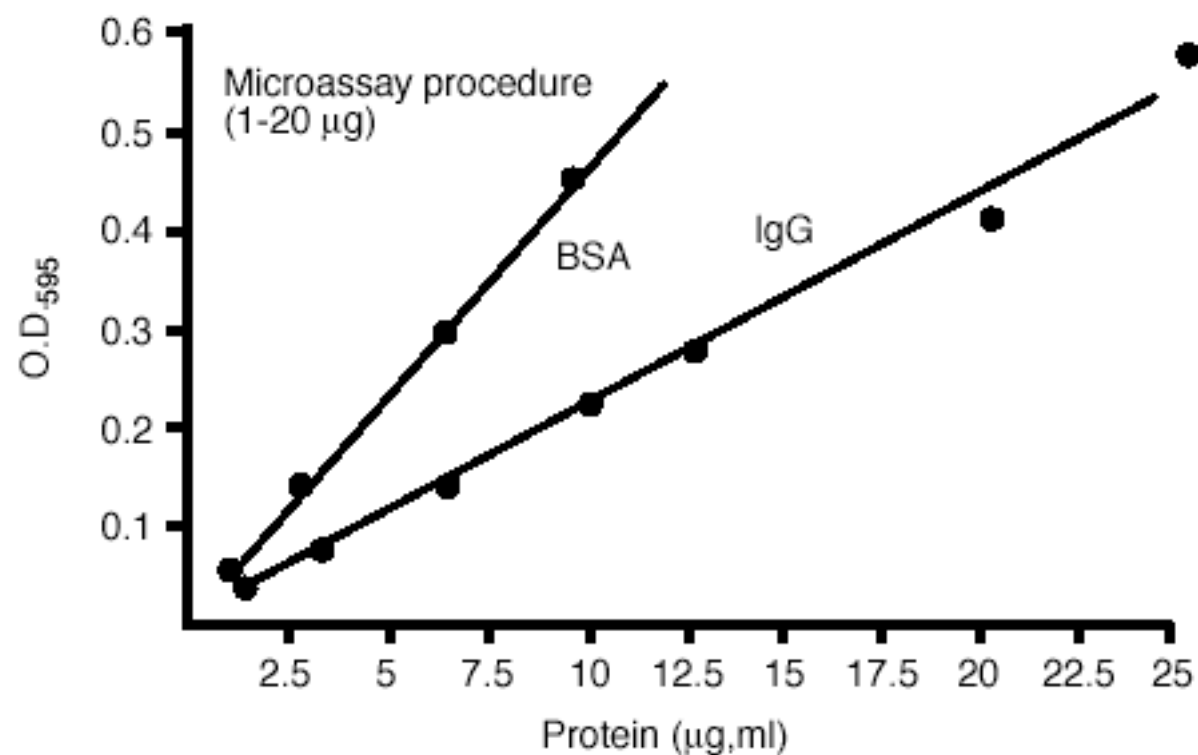


Fig. 2. Typical standard curve for the Bio-Rad Protein Microassay (1-20 µg/ml), bovine gamma globulin (standard I), bovine serum albumin (standard II).

O.D. ₅₉₅ corrected for blank. 1.25-25 µg/ml x 0.8 ml = 1-20 µg protein.

RIPA BUFFER

1x Phosphate buffered saline

1% Nonidet P-40 (NP-40) oppure

Igepal CA-630

0.5% sodium deoxycholate

0.1% SDS

10 mg/ml PMSF

50 KIU/ml Aprotinin

100 mM sodium orthovanadate