



uniss
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI



Piano Lauree Scientifiche in Biologia e Biotecnologie

Purificazione, dosaggio ed elettroforesi delle proteine

Docenti:

Prof.ssa Marilena Formato, formato@uniss.it Dr. Antonio J. Lepedda, ajlepedda@uniss.it Dr. Gabriele Nieddu, ganiemdu@uniss.it
--

Dipartimento di Scienze Biomediche

Referente Progetto PLS-Sassari: Prof. Marilena Formato
Dipartimento di Scienze Biomediche
E-mail: formato@uniss.it

Estrazione di proteine da tessuti

Dopo l'acqua, le proteine sono le sostanze più abbondanti nelle cellule e sono coinvolte nella maggior parte dei processi biologici che si svolgono in esse.

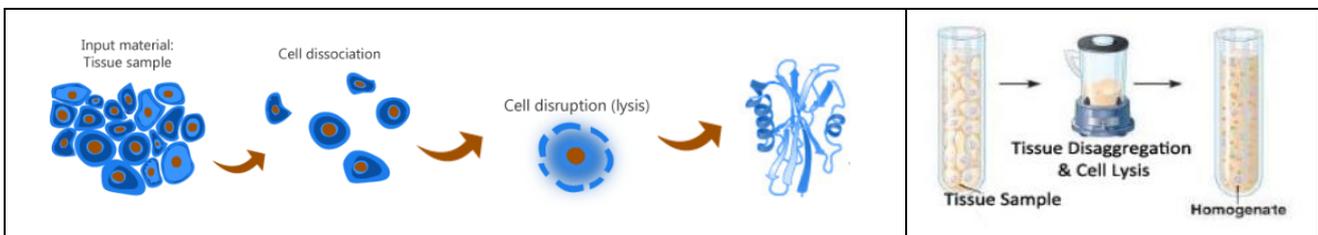
Nell'organismo umano si trovano più di 100000 tipi di proteine diverse. Grazie alla loro varietà, le proteine svolgono molte funzioni, tra cui:

- facilitano le reazioni chimiche che avvengono nelle cellule (enzimi);
- regolano l'entrata e l'uscita di alcune sostanze dalle cellule (proteine di membrana);
- servono come sostegno e sono coinvolte nel movimento cellulare (proteine strutturali).

Alcune proteine formano strutture visibili a occhio nudo, come le ragnatele e i capelli. Le macromolecole proteiche sono polimeri lineari di amminoacidi.

La prima tappa nell'isolamento delle proteine prevede l'estrazione dalla cellula. Tale processo avviene mediante un'omogeneizzazione che distrugge il tessuto e rilascia i componenti intracellulari in sospensione. L'omogeneizzazione viene anche usata come fase preliminare per la purificazione parziale di organuli cellulari per gli studi sulla compartimentazione metabolica. Per il successo della omogeneizzazione sono molto importanti:

- la scelta del tessuto di partenza
- le proprietà fisiche e chimiche della soluzione fisiologica adoperata
- il metodo impiegato per la distruzione delle cellule



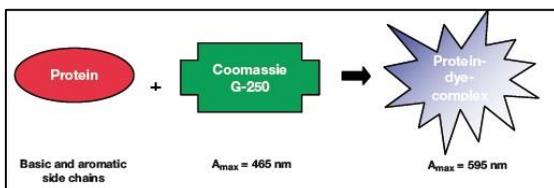
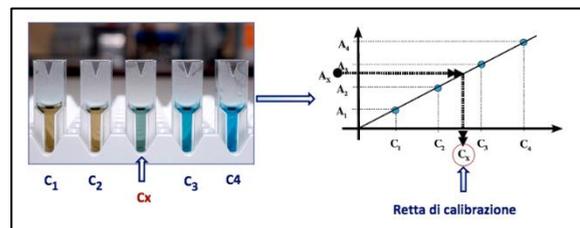
Le procedure di omogeneizzazione per la purificazione delle proteine implicano necessariamente una fase di distruzione cellulare con metodi che possono essere meccanici, chimici ed enzimatici. La scelta del metodo dipende dalla natura della parete/membrana cellulare.

Il contenuto proteico può successivamente essere quantificato utilizzando metodi colorimetrici come il dosaggio mediante saggio Bradford, e le proteine successivamente purificate mediante procedure di frazionamento basate sulle proprietà chimico-fisiche della proteina di interesse. Pur perdendo in parte la proteina desiderata si mira ad eliminare in maniera selettiva le altre componenti dalla miscela.

Caratteristica della proteina	Procedura di purificazione
Solubilità	Salting out
Carica ionica	Cromatografia a scambio ionico Elettroforesi Focalizzazione isoelettrica
Polarità	Cromatografia idrofobica
Dimensioni	Cromatografia per filtrazione su gel SDS-PAGE Ultracentrifugazione
Specificità di legame	Cromatografia per affinità

Quantificazione delle proteine

Reagenti specifici vengono incubati con quantità NOTE di una proteina standard (es. Albumina da siero bovina-BSA) e si ottiene una retta di calibrazione. Poi si fa reagire con lo stesso colorante un volume noto di miscela di proteine e si relaziona l'assorbanza con la quantità sulla retta di calibrazione.



Dosaggio mediante Metodo di Bradford (legame con coloranti). Il legame del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 alle proteine (mediante formazione di complessi non covalenti con gli amminoacidi basici) provoca uno spostamento del massimo di assorbimento del colorante da 465nm (rosso) a 595 nm (blu) in soluzioni acide (50% acido fosforico).

Elettroforesi SDS-PAGE (PolyAcrylamide-Gel Electrophoresis).

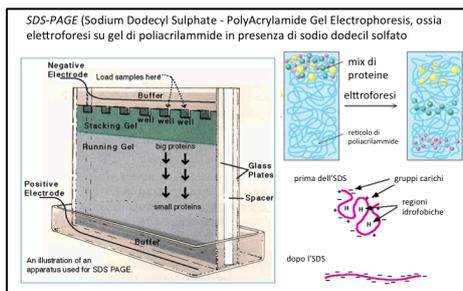
Le proteine hanno una carica totale positiva o negativa che dipende dallo stato di ionizzazione delle catene laterali degli aminoacidi costituenti. L'elettroforesi è la tecnica che si basa sulla diversa migrazione, attraverso un mezzo fluido e sotto l'influsso di un campo elettrico, di particelle cariche, siano esse ioni o polielettroliti macromolecolari. Le proteine sono dei polielettroliti anfoteri e migrano in un campo elettrico in funzione del rapporto carica/massa. La carica, a sua volta dipende dai pK dei gruppi ionizzabili presenti nelle catene laterali degli aminoacidi costituenti e dal pH del mezzo.

Alla metà degli anni 1960 è stata sviluppata una versione perfezionata di elettroforesi, comunemente nota come SDS-PAGE (PolyAcrylamide-Gel Electrophoresis), basata sull'utilizzo di un supporto inerte costituito da un gel di poliaccrilamide e del sodio dodecil-solfato (SDS), un detergente anionico. Esso agisce legandosi alle proteine con legami idrofobici che ne determinano la denaturazione in seguito allo svolgimento delle catene polipeptidiche. L'aggiunta di un agente riducente completa la denaturazione determinando la rottura dei ponti disolfuro intra ed inter-molecolari. Il complesso polipeptide-SDS così formato, assume la forma di un bastoncino con uniforme carica negativa. Sottoposte all'azione di un campo elettrico migreranno tutte verso il polo positivo (anodo). La loro separazione avverrà solo in funzione dei diversi pesi molecolari, dato che il rapporto SDS/proteina, fatta eccezione per alcune proteine, è costante.

Il gel è ottenuto dalla copolimerizzazione della acrilamide con N-N-metilenbisacrilamide. Nel processo di polimerizzazione intervengono un iniziatore che è l'ammonio persolfato, ed un catalizzatore che è la tetrametiletildiammina (TEMED). L'acrilamide così attivata reagisce con un'altra molecola di acrilamide innescando una serie di reazioni a catena che continueranno fino a quando non si saranno esaurite le molecole di acrilamide. La presenza della bisacrilamide, che crea dei ponti tra i polimeri lineari di acrilamide,

determina la formazione di un vero e proprio reticolo a maglie. La grandezza di queste maglie e quindi la porosità del gel, dipende dalla concentrazione del copolimero (generalmente tra il 7% e il 15%) e dal rapporto acrilamide/bisacrilamide.

Grazie alla presenza di SDS le proteine migrano dal polo negativo al polo positivo sulla base della massa molecolare (il gel funge da setaccio molecolare). Esse infatti hanno la stessa forma, poiché denaturate, hanno tutte carica negativa e uno stesso rapporto carica/massa.



PROTOCOLLO SPERIMENTALE SDS-PAGE

PREPARAZIONE DEL GEL:

Stacking gel (5%T, 3%C)

H ₂ O	2.1 ml
Acrilamide/Bis acrilamide (30% T, 3%C)	0.5 ml (→ 5%T, 3%C)
Tris 1 M pH 6.8	0.38 ml (→ 125mM)
SDS 10%	30 µl (→ 0.1%)
TEMED	3 µl
APS 10%	30 µl

Running gel (10%T, 3%C)

H ₂ O	4.0 ml
Acrilamide/Bis acrilamide (30% T, 3%C)	3.3 ml (→ 10%T, 3%C)
Tris 1.5M pH 8.8	2.5 ml (→ 375mM)
SDS 10%	100 µl (→ 0.1%)
TEMED	4 µl
APS 10%	100 µl

Colare il running gel tra i due vetrini precedentemente sgrassati con l'etanolo e montati in maniera opportuna. Stratificare sopra il gel appena colato l'isopropanolo e lasciare polimerizzare per circa 20-30 minuti. In seguito, bisogna lavare via molto bene l'isopropanolo, colare lo stacking gel e inserire gli appositi pettini. Lasciare polimerizzare per circa 15-20 minuti.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI (NB: dopo averli preparati, incubare i campioni a 100°C per 5 minuti)

Campione n° 1: plasma ridotto (10 µl plasma 60 mg/mL + 440 µl PBS + 150 µl **buffer A**)

Campione n° 2: plasma non ridotto (10 µl plasma 60 mg/mL + 440 µl PBS + 150 µl **buffer B**)

Campione n° 3: albumina serica bovina (BSA) ridotta (60 µl BSA 2 mg/mL + 30 µl PBS + 30 µl **buffer A**)

Campione n° 4: albumina serica bovina (BSA) non ridotta (60 µl BSA 2 mg/mL + 30 µl PBS + 30 µl **buffer B**)

Campione n° 5: VLDL (20 µL LDL (160 µg) + 100 µL PBS + 40 µL **buffer B**)

Campione n° 6: LDL (10 µL LDL (80 µg) + 50 µL PBS + 20 µL **buffer B**)

Campione n° 7: HDL (10 µL HDL (120 µg) + 80 µL PBS + 30 µL **buffer A**)

SAMPLE BUFFER (LAEMMLI 4X) (*buffer A*):

Tris 250 mM, pH 6.8

SDS 8 %

Glicerolo 40 %

Ditiotreitolo 8 %

Blu di bromofenolo (BBF) 0.0016 %

SAMPLE BUFFER (LAEMMLI 4X) (*buffer B*):

Tris 250 mM, pH 6.8

SDS 8 %

Glicerolo 40 %

Blu di bromofenolo (BBF) 0.0016 %

STANDARD DI PESO MOLECOLARE**Precision Plus protein standards**

Gli standard di peso molecolare sono delle miscele di proteine a peso molecolare noto (nel nostro caso 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, e 250 kDa). Le proteine sono state precedentemente legate covalentemente con un colorante blu così da poter monitorare la corsa elettroforetica.

CORSA ELETTROFORETICA:**Caricamento nel gel**

LANE	CAMPIONE	Carico (μg)	Carico (μl)
1	Standards		7
2	Campione n° 1	10	
3	Campione n° 2	10	
4	Campione n° 3	10	
5	Campione n° 4	10	
6	Campione n° 5	10	
7	Campione n° 6	10	
8	Campione n° 7	10	
9	Standards		7

RUNNING BUFFER:

Tris 25 mM

Glicina 192 mM

SDS 0.1 %

pH 8.6

CONDIZIONI DI CORSA:

- 50 V costanti per 15 minuti (i campioni si compattano attraversando lo stacking gel)
- 150 V costanti fino a che il tracciante (BBF) non raggiunge il limite inferiore del gel (circa 1 ora 15')

RIVELAZIONE DELLE PROTEINE:**Coomassie Brilliant Blue G-250 staining****Fixing solution (50 ml per gel)**CH₃CH₂OH 30%H₃PO₄ 2%**1h in agitazione****Washing (50 ml per gel)**H₃PO₄ 2%**2 step da 10 minuti - in agitazione****Equilibrating solution (50 ml per gel)**CH₃CH₂OH 18%(NH₄)₂SO₄ 15%H₃PO₄ 2%**30 minuti in agitazione****Staining**

Aggiungere alla equilibrating solution 500 μl di una soluzione di Blue coomassie G-250 al 2% (1:100 v/v) in H₂O. La colorazione del gel viene effettuata per 24-72 ore.

Norme generali di sicurezza in laboratorio

Qui di seguito sono elencate alcune norme elementari di sicurezza, che devono essere tassativamente rispettate.

- Entrando in laboratorio, individuare le vie di fuga, indicate dalla segnaletica verde.
- In laboratorio indossare sempre il camice. Il camice deve essere chiuso sul davanti, con maniche lunghe e polsini ad elastico. Al termine delle attività, prima di lasciare il laboratorio, togliersi il camice. In ogni caso, non uscire dal laboratorio, per recarsi in altre aree (biblioteca, uffici, bar, ecc.), senza aver prima tolto il camice.
- Non introdurre in laboratorio borse, zaini o altro materiale non necessario.
- Indossare guanti monouso durante la manipolazione di sangue o di materiale da esso derivato non fissato. I guanti devono essere rimossi con attenzione e sostituiti quando sono visibilmente contaminati. I guanti si sfilano rovesciandoli e vanno gettati negli appositi contenitori.
- Gli studenti che presentano dermatiti o altre lesioni sulle mani, devono indossare guanti protettivi in tutte le fasi di lavoro.
- I guanti vanno tolti, quando si usino strumenti di qualsiasi natura (telefono, tastiera, strumenti scientifici, maniglie, ecc.). I guanti usati non vanno riutilizzati.
- Lavare le mani routinariamente, immediatamente dopo la manipolazione di materiali contaminati e, in ogni caso, dopo la fine delle attività, anche quando sono stati indossati i guanti. Lavare sempre le mani prima di lasciare il laboratorio.
- In laboratorio è vietato mangiare, bere, fumare, portare oggetti alla bocca ed applicare cosmetici.
- Non pipettare mai con la bocca, ma utilizzare le apposite pipette.
- Non appoggiare recipienti contenenti liquidi biologici vicino al bordo del banco di lavoro.
- Tutto il materiale biologico di origine umana (sangue, ecc.) deve essere considerato come potenzialmente infetto e pertanto trattato con le necessarie precauzioni.
- Segnalare immediatamente al personale docente ogni spargimento di materiale biologico (ad es. schizzi di sangue) sul piano di lavoro, affinché si provveda alla decontaminazione con un germicida chimico appropriato (candeggina, ecc.).
- Decontaminare e pulire sempre, al termine del loro utilizzo, le apparecchiature scientifiche e, al termine della attività, i piani di lavoro.
- Seguire scrupolosamente le indicazioni di sicurezza riportate nei protocolli di esperimento.
- Raccogliere tutti i liquidi biologici (sangue, terreni di coltura venuti a contatto con le cellule, cellule, ecc.) in speciali contenitori per rifiuti, che verranno successivamente eliminati previo trattamento con candeggina al 15%.
- Mettere il materiale monouso (pipette, fiasche ecc.) venuto a contatto con materiale biologico in un sacco apposito, che verrà smaltito mediante incenerimento.
- Stante i costi elevati dello smaltimento, ridurre il più possibile l'uso del materiale monouso.
- Segnalare immediatamente al personale docente qualsiasi incidente o la mancanza di materiale di protezione

Utilizzo della centrifuga

- chiudere accuratamente il tappo delle provette, per evitare la fuoriuscita di liquido e la formazione di aerosol
- assicurarsi che il rotore sia bilanciato: provette di ugual peso devono essere inserite negli alloggiamenti diametralmente opposti
- chiudere il coperchio della centrifuga prima di avviarla
- non cercare di aprire il coperchio prima del completo arresto del rotore
- in caso di fuoriuscita di liquido dalle provette, avvertire il personale docente

Utilizzo dell'apparecchiatura per elettroforesi

- assicurarsi che l'alimentatore sia spento, prima di collegare i morsetti
- assicurarsi che il coperchio della vaschetta sia correttamente posizionato, prima di collegare i morsetti
- alla fine della corsa, prima di rimuovere il coperchio della cella elettroforetica, spegnere l'alimentatore e staccare i morsetti