

* **Introduzione alle metodologie
biochimiche e biomolecolari**

INDAGINE BIOCHIMICA E BIOMOLECOLARE

Applicazione di tecniche analitiche separative

- Determinare la Natura (struttura) e interazioni (funzione) tra macromolecole biologiche (metaboliti, enzimi e recettori) coinvolti in processi fisiologici e patologici;
- Identificare nuovi marcatori molecolari da impiegare nella diagnosi clinica;
- Disegnare nuovi farmaci efficaci e specifici per il bersaglio molecolare di interesse;
- Migliorare le conoscenze sui meccanismi alla base della regolazione genica
- Comprendere le cause di malattie genetiche e metaboliche.

Come si progetta un esperimento di tipo biologico-molecolare?

METODO SCIENTIFICO

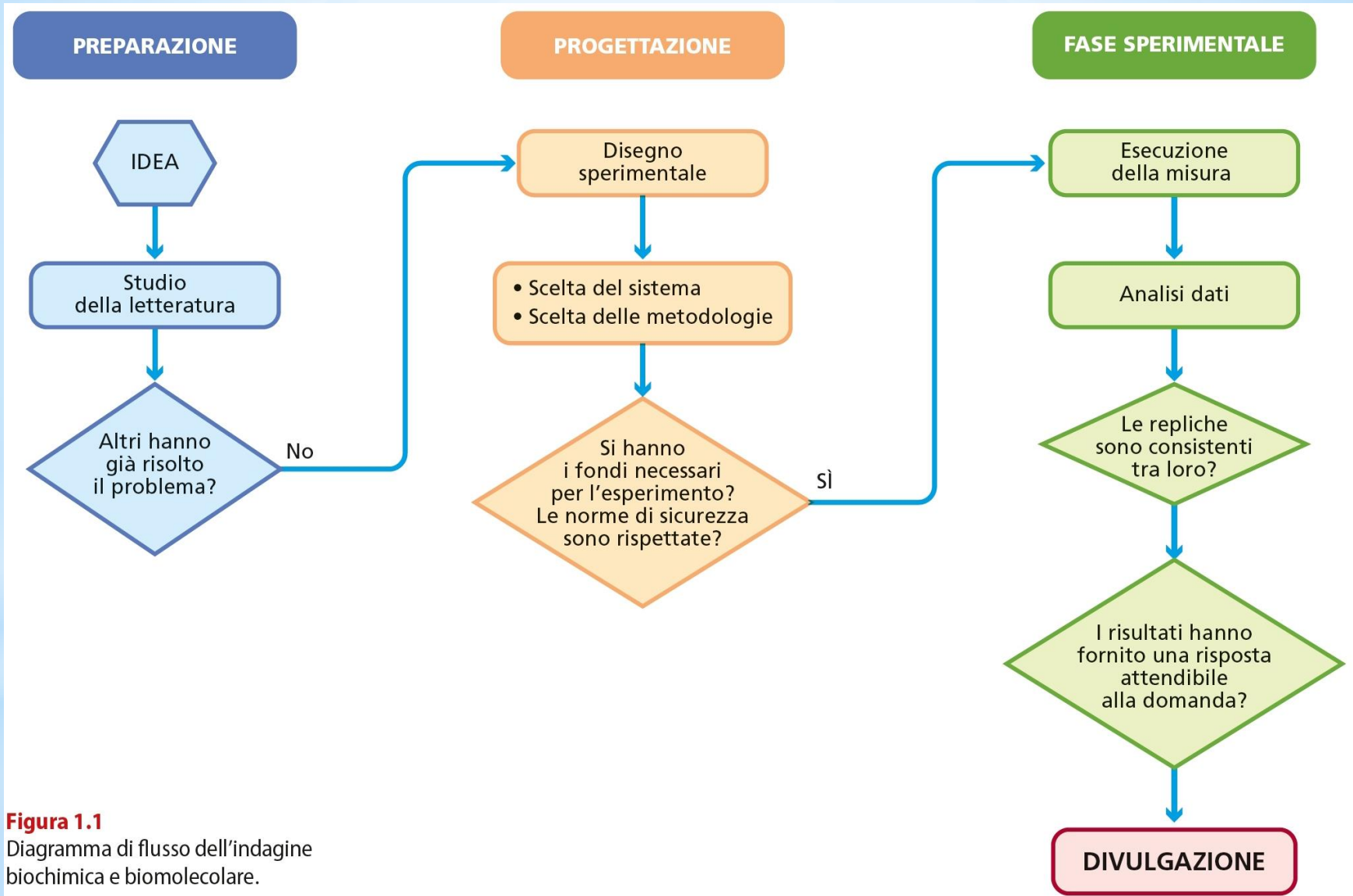


Figura 1.1
Diagramma di flusso dell'indagine biochimica e biomolecolare.

LE MISURE E LA NOTAZIONE SCIENTIFICA

UNITA' DI MISURA FONDAMENTALI DEL SISTEMA INTERNAZIONALE (SI)

Tabella 1.1 Unità di misura fondamentali del Sistema Internazionale (SI).

Grandezza	Unità di misura	Simbolo
Lunghezza	metro	m
Massa	kilogrammo	kg
Tempo	secondo	s
Intensità di corrente elettrica	ampère	A
Temperatura termodinamica	kelvin	K
Quantità di materia	mole	mol
Intensità luminosa	candela	cd

UNITA' SUPPLEMENTARI per la definizione dell'angolo piano (gradi) e solido (steradiani);

UNITA' DI MISURA DERIVATE indicate come prodotti di potenze delle unità SI supplementari, con un fattore numerico pari a 1 [es. la frequenza in hertz (Hz) dove $1 \text{ Hz} = 1 \text{ s}^{-1}$];

MULTIPLI e SOTTOMULTIPLI DECIMALI prevedono un prefisso davanti all'unità di misura e hanno un proprio simbolo [es. un nanometro (1 nm) è pari a $1 \cdot 10^{-9} \text{ m}$: ordine di grandezza della dimensione di un legame peptidico].

Tabella 1.2 Multipli e sottomultipli delle unità di misura.

Multiplo	Prefisso	Simbolo	Sottomultiplo	Prefisso	Simbolo
10^{24}	yotta	Y	10^{-1}	deci	d
10^{21}	zetta	Z	10^{-2}	centi	c
10^{18}	exa	E	10^{-3}	milli	m
10^{15}	peta	P	10^{-6}	micro	μ
10^{12}	tera	T	10^{-9}	nano	n
10^9	giga	G	10^{-12}	pico	p
10^6	mega	M	10^{-15}	femto	f
10^3	kilo	k	10^{-18}	atto	a
10^2	etto	h	10^{-21}	zepto	z
10^1	deca	da	10^{-24}	yocto	y

LA CAPACITA'

La capacità di un liquido viene misurata mediante multipli e sottomultipli del **litro (L)**. Capacità e volume vengono utilizzate per indicare la stessa cosa in quanto 1 litro corrisponde alla capacità di 1 decimetro cubo:

$$1\text{L} = 1\text{ dm}^3$$

La capacità di un millilitro corrisponde a un volume di 1 centimetro cubo:

$$1\text{ mL} = 1 \cdot 10^{-3}\text{L} = 10^{-3}\text{ dm}^3 = 1\text{ cm}^3$$

L'ERRORE

Differenza tra il valore ottenuto e il valore «vero» (assoluto) della grandezza;

I risultati di misure ripetute vengono riportate come *valore \pm errore* oltre all'unità di misura.

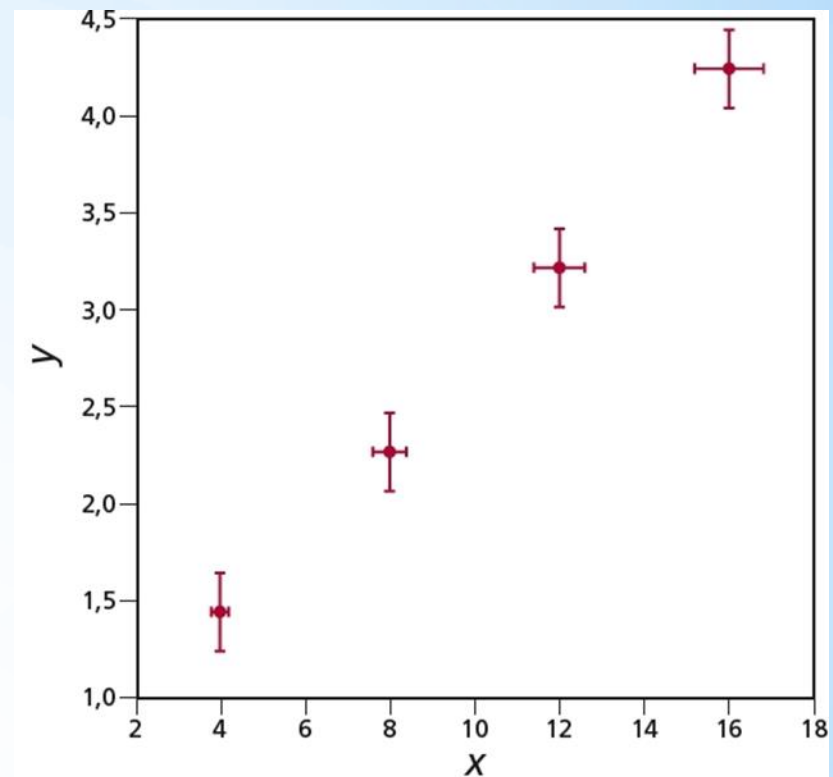


Figura 1.2

Grafico che riporta i valori di misure effettuate. Le incertezze sono riportate come barre di errore, sia nella determinazione della variabile in ascissa (errore percentuale) sia di quella in ordinata.

Esistono due tipologie di errore:

errore casuale ed errore sistematico.

- Gli errori casuali variano in modo imprevedibile e sono dovuti a piccole variazioni nelle manipolazioni implicate in ogni misura sperimentale.
- Gli errori sistematici possono essere facilmente identificati, eliminati o ridotti in quanto dipendono dalle **condizioni al contorno** (la temperatura dell'ambiente, l'altitudine, il grado di umidità) e dall'operatore stesso. Inoltre, tra gli errori sistematici vi è l'**errore strumentale**, che ci ricorda che nessuno strumento permette di effettuare una misura priva di errore, perché dovrebbe essere "infinitamente preciso".
- Ogni strumento ha un'**incertezza intrinseca** associata alla misura.

SENSIBILITÀ E INCERTEZZA INTRINSECA

- **Sensibilità:** il più piccolo valore che lo strumento è in grado di distinguere;
- **l'incertezza** di uno strumento di misura è data dal 50% della sua sensibilità.

Esempio: il righello: *qual è l'errore associato ad una misura effettuata con tale strumento.*

Se l'osserviamo con occhio scientifico, vediamo che la sensibilità (la più piccola divisione del righello) è di 1 mm (1×10^{-3} m), dunque l'errore associato allo strumento è della metà, 0,5 mm ($0,5 \times 10^{-3}$ m = 5×10^{-4} m).

PRECISIONE E ACCURATEZZA

- ✓ Maggiore è la sensibilità di uno strumento, maggiore è la **precisione** della misura che esso ci permette di effettuare; ovvero, i valori della misura ripetuta più volte saranno tutti **consistenti** (vicini tra di loro).
- ✓ Ma uno strumento preciso non è necessariamente accurato, vale a dire che i valori ottenuti potrebbero non essere corretti se non sono centrati intorno al valore atteso (o **valore vero**).
- ✓ l'incertezza di una misura si può diminuire:
 - a) ripetendo le prove più volte (prove ripetute);
 - b) migliorando il controllo sulle condizioni sperimentali;
 - c) verificando l'accuratezza degli strumenti mediante calibrazione periodica.

L'esempio classico per illustrare la differenza tra **accuratezza** e **precisione** è quello dei tiri ad un bersaglio. Un arciere preciso ma non accurato lancerà frecce tutte vicine tra loro ma lontane dal centro. Un arciere accurato ma non preciso lancerà frecce lontane tra loro ma intorno al centro. Un arciere accurato e preciso colpirà sempre vicino al centro: il Robin Hood della misura!

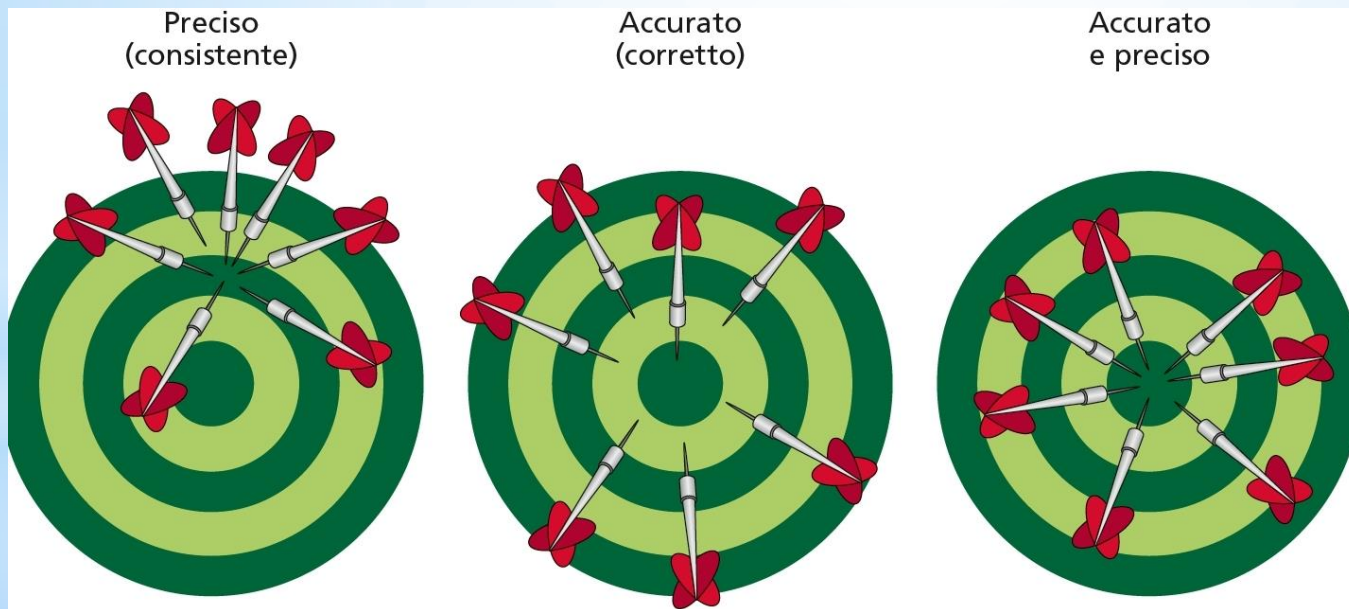


Figura 1.3

Esemplificazione della differenza tra precisione e accuratezza.

ANALISI STATISTICA

Per prove ripetute occorre saper fare l'analisi statistica dei dati ottenuti.

Media e deviazione standard

Per assicurare la veridicità e la riproducibilità di un risultato e diminuirne l'incertezza si deve eseguire un **triplicato** della misura:

valore medio calcolato (\bar{x}) o **media**:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{n}$$

i = numero di ciascuna prova

n = numero totale di prove eseguite

L'incertezza di ogni singola misura è data dalla **deviazione standard** (σ) del campione o della popolazione:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

La grandezza σ definisce l'**intervallo di confidenza** entro il quale una misura effettuata si avvicina al valore vero, mentre l'incertezza nella media o **deviazione standard della media** è data da:

$$\sigma_{\bar{x}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

il risultato della misura dovrà essere riportato come:

$$\bar{x} \pm \sigma \text{ (unità di misura)}$$

oppure

$$\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}} \text{ (unità di misura)}$$

Analisi inferenziale

Molto spesso nell'indagine biochimica un determinato parametro da misurare è funzione di un altro parametro, secondo una legge matematica ben precisa. In generale, per determinare il tipo di dipendenza tra le due variabili x ed y , si effettua la misura della variabile y in funzione di x in diversi punti (almeno 3) e, mediante un programma di analisi statistica, si interpolano i punti per ottenere l'equazione della curva che meglio si adatta ad essi.

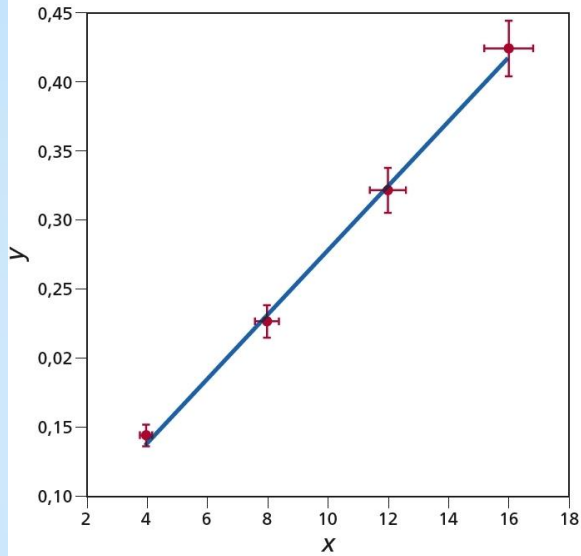
La **dipendenza lineare** regola la dipendenza tra due variabili:

$$y = ax + b$$

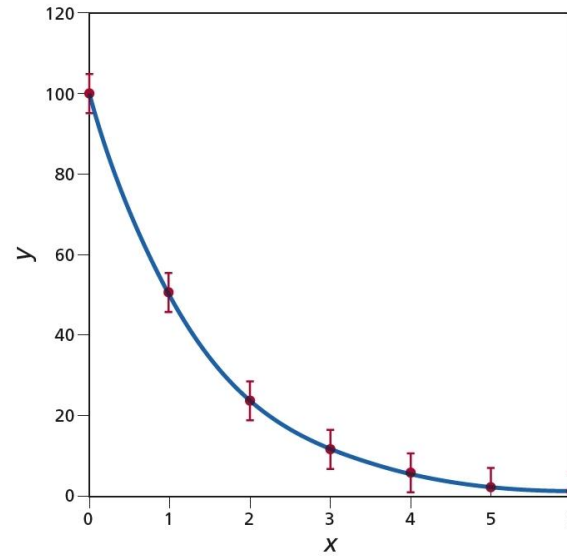
dove **a** è la pendenza della retta e **b** il valore di y per $x = 0$

Tale tipo di dipendenza regola variabili misurate in molte tecniche bio-molecolari, come ad esempio il tempo di ritenzione e il logaritmo delle dimensioni molecolari dell'analita in cromatografia per esclusione molecolare, oppure il logaritmo del peso molecolare di una proteina e la sua mobilità relativa in SDS-PAGE

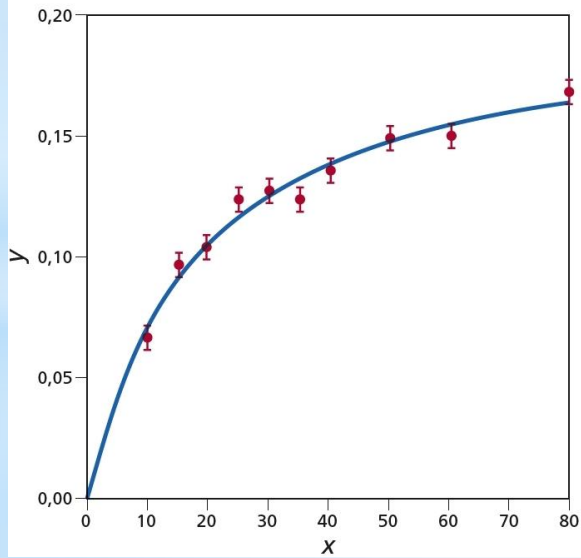
(a) Dipendenza di tipo lineare
($R = 0,99886$)



(b) Dipendenza di tipo esponenziale
($\chi^2 = 2,35$)



(c) Andamento iperbolico
($\chi^2 = 0,0002$)



(d) Andamento sigmoideale
($\chi^2 = 0,07438$)

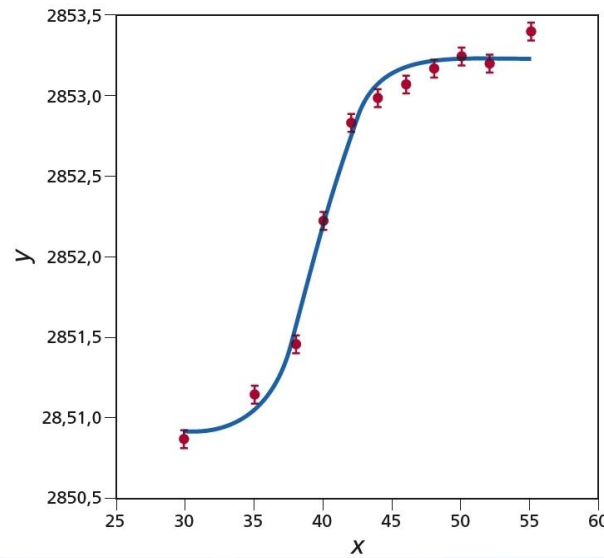


Figura 1.4
Tipi di dipendenza tra le variabili.

ESEMPI:

dipendenze di tipo quadratico:

- **legge di decadimento radioattivo** regolata da un andamento di tipo **esponenziale**:

$$y = y_0 e^{-ax}$$

y_0 = valore di y per $x = 0$

e = numero di Eulero

a = costante di decadimento

- **cinetica enzimatica**: la formazione di un prodotto segue un andamento di tipo **iperbolico** regolato dalla legge di Michaelis-Menten:

$$y = \frac{ax}{b+x}$$

a = valore massimo di y (y_{\max})

b = valore di x nel punto $y = y_{\max}/2$.

- **studio di interazioni molecolari di tipo competitivo**: andamento di tipo **sigmoideale**, modello logistico tipico della crescita delle popolazioni, con equazioni del tipo:

$$y = a + \frac{b}{1+10^{(c-x)d}}$$

a = valore minimo di y

b = differenza tra il valore massimo e minimo

c = valore di x per cui y si trova a metà della curva

d = pendenza della curva nella regione di crescita lineare.

TEST DI ADATTAMENTO

Per verificare se i dati sperimentali siano approssimati correttamente da una data curva teorica, vengono applicati test di adattamento.

il coefficiente di correlazione lineare R, o indice di Pearson, consente di verificare l'adattamento dei punti ad una retta:

- se $R = 1$, le variabili x ed y sono direttamente correlate;
- se $R = 0$, non vi è alcuna correlazione tra le variabili;
- se $R = -1$, le due variabili sono legate da una correlazione inversa.

Per le curve quadratiche si applica il test chi quadro (χ^2):

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (o_i - a_i)^2}{a_i}$$

dove, avendo misurato n punti, per ogni punto i osservato (o_i), a_i è il valore atteso secondo l'equazione applicata.

Minore è il valore di chi quadro, migliore è l'adattamento dei punti sperimentali alla curva applicata.