

## Esercitazione 2

### Quantificazione delle proteine



➤ La quantificazione della concentrazione proteica in un campione in soluzione acquosa è un test importante nei laboratori di ricerca e sviluppo e in biochimica, per applicazioni che vanno dagli studi enzimatici alla fornitura di dati per il rilascio di lotti biofarmaceutici.

➤ I saggi di quantificazione delle proteine sono metodi che utilizzano la spettroscopia UV/visibile per determinare rapidamente la concentrazione di proteine, rispetto ad uno standard, o usando un coefficiente di estinzione assegnato.



## Assorbanza nell'ultravioletto a 280 nm

- ❖ Le proteine mostrano un caratteristico **spettro di assorbimento ultravioletto (UV) a circa 280 nm**, principalmente dato dagli amminoacidi aromatici tirosina e triptofano.
- ❖ Se la sequenza primaria non contiene nessuno o pochi di questi aminoacidi, allora questo metodo non risulterà adatto.



- Di routine, in questa misura diretta vengono utilizzate le **cuvette in cristallo di quarzo** per la misurazione, poiché i materiali plastici non sono trasparenti ai raggi UV.
- Se è noto il **coefficiente di estinzione molare della proteina**, può essere **utilizzata la legge di Lambert-Beer** per quantificare accuratamente la quantità di proteina mediante assorbanza UV, supponendo che la proteina sia pura e non contenga componenti non proteici che assorbono i raggi UV come cofattori nucleotidici legati, eme o centri ferro-zolfo.

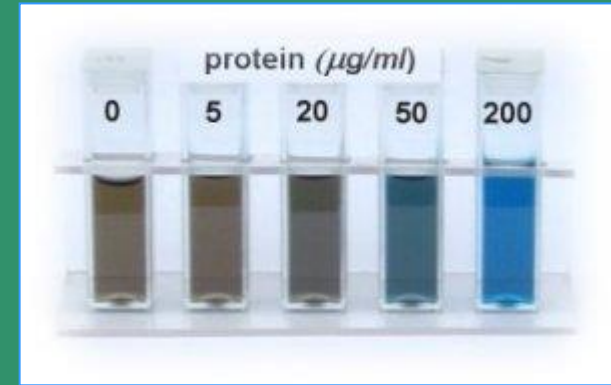
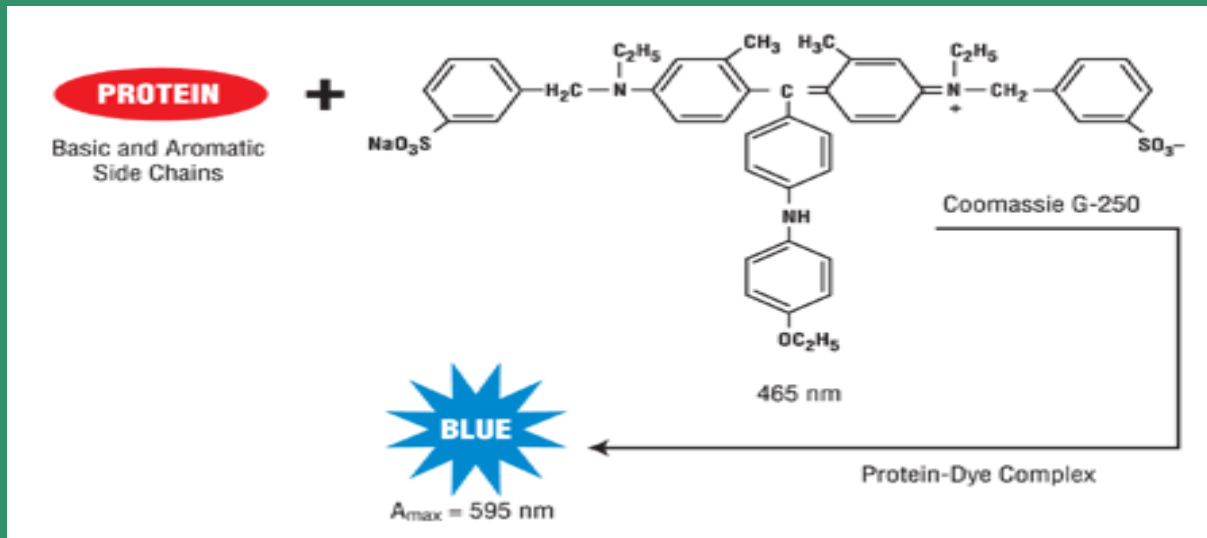
# Saggi colorimetrici

## 1. Saggio con Blue Coomassie (Bradford) (Range: 1–50 mg)

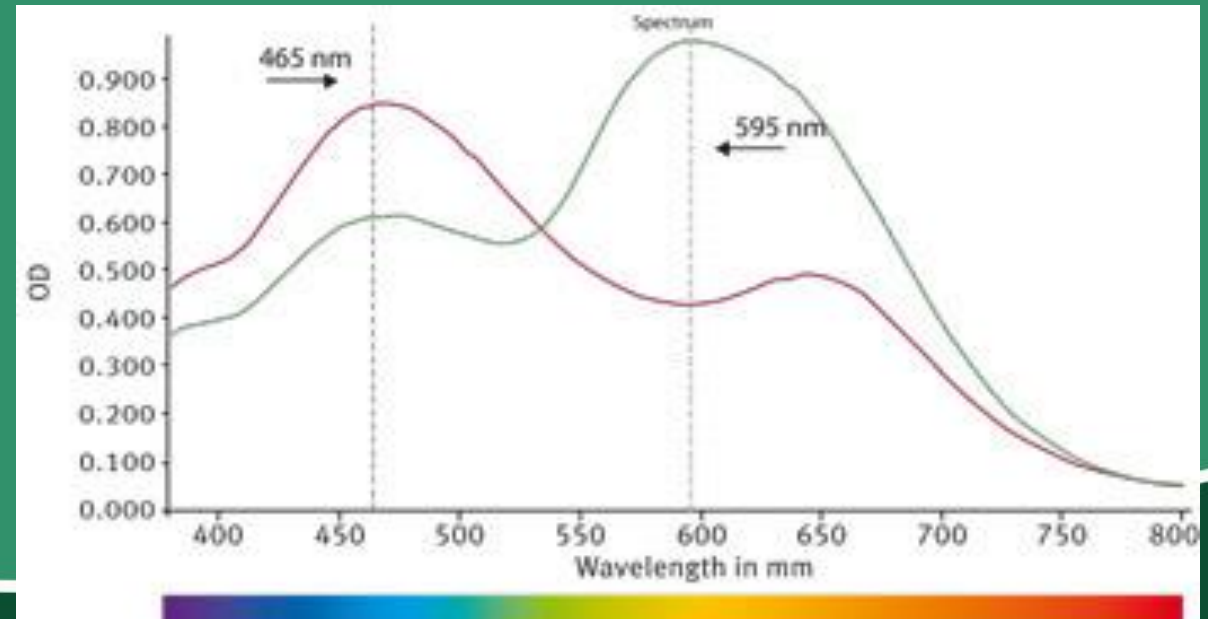
- ❖ Il saggio Bradford è basato sull'utilizzo del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 e descritto per la prima volta da Marion M. Bradford (1976). Il meccanismo di base del test è il legame del colorante a pH acido con i residui basici di arginina, istidina, fenilalanina, triptofano e tirosina.

- ❖ Il colorante libero (*forma cationica*) presenta un massimo di assorbimento a 465 nm e un colore rosso, dopo il legame con le proteine, si osserva uno spostamento del massimo di assorbimento a 595 nm a causa della stabilizzazione della *forma anionica* del colorante che presenterà un colore blu. La colorazione avrà una intensità direttamente proporzionale alla contenuto proteico del campione in esame.





Il colorante Blu di Coomassie legato alla proteina è blu se non è legato è marroncino.

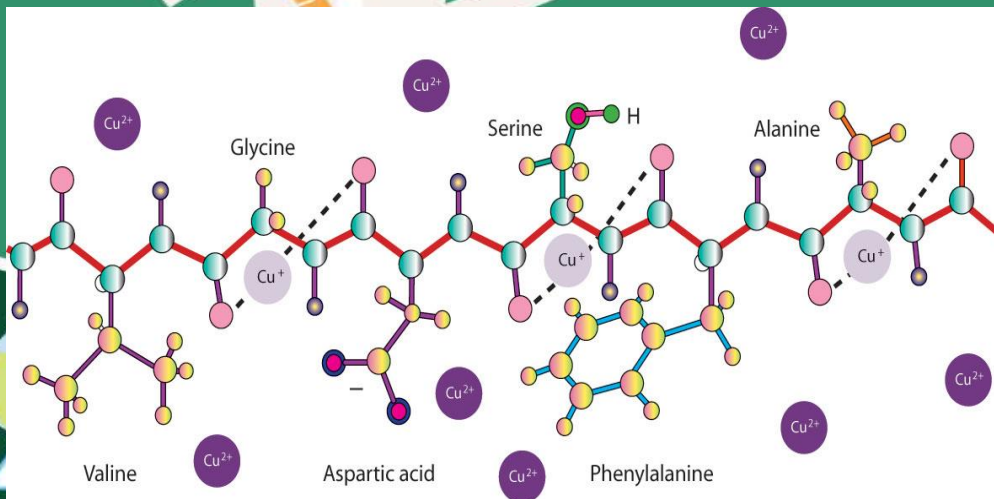


## 2. Metodo Lowry (Alkaline Copper Reduction Assays) (Range: 5–100 mg)

Il saggio di Lowry (Lowry *et al.*, 1951) si basa su una procedura di due fasi:

□ la reazione del biureto: aggiungendo alla soluzione proteica una **soluzione rameica** in ambiente basico, si ottiene una colorazione viola porpora con un assorbimento massimo a 540 nm.

□ Dopo aggiunta del **reattivo di Folin** (reattivo fosfomolibdico-fosfotungstico) che va a reagire con le tirosine ed i triptofani delle proteine, assume un colore blu (con massimo a 750nm) dato dalla formazione di blu di tungsteno e blu di molibdeno grazie alla riduzione operata dal complesso rame-proteina.



### 3. Metodo dell' acido bicinconinico (BCA) (Range: 0.2– 50 mg)

❖ Nel metodo BCA si sostituisce il reagente di Folin come descritto per il metodo Lowry con acido bicinconinico, proteine e peptidi riducono gli ioni rameici a rameosi in ambiente basico. Gli ioni rameosi reagiscono con l'acido bicinconinico per formare un complesso viola-porpora (1 ione rameoso chelato da 2 molecole di BCA). Il colore viene misurato alla lunghezza d'onda di 562nm.

❖ La reazione chimica dipende dalla temperatura con diversi gruppi funzionali che mostrano una diversa reattività a temperature elevate, a temperature elevate (60 ° C rispetto a 37 ° C), si osserva una maggiore formazione di colore a causa della maggiore reattività dei legami di triptofano, tirosina e peptidi.



# Confronto tra i diversi metodi:

## Bradford vs Lowry Protein Assay

More Information Online [WWW.DIFFERENCEBETWEEN.COM](http://WWW.DIFFERENCEBETWEEN.COM)

### Bradford Protein Assay

### Lowry Protein Assay

#### DEFINITION

Bradford protein assay is a rapid spectroscopic analytical procedure with high accuracy to measure the protein concentration in a solution

Lowry protein assay is a biochemical assay used to determine the total level of protein in a solution

#### SIGNIFICANCE

Based on the absorbance shift of the dye: Coomassie brilliant blue G-250

Based on the reaction of copper ions ( $\text{Cu}^+$ ) ions produced by the oxidation of peptide bonds, with Folin-Ciocalteu reagent

#### DYE

Coomassie brilliant blue G-250

$\text{Cu}^+$  and Folin-Ciocalteu reagent

#### TIME TAKEN FOR THE TEST

Results are ready after 15 minutes

It takes more than 40 – 60 minutes

#### DEPENDENCY ON AMINO ACID COMPOSITION

Dependent on the amino acid composition

Partially dependent on the amino acid composition

#### INTERFERENCES

Detergents (soap, SDS, Triton X-100)

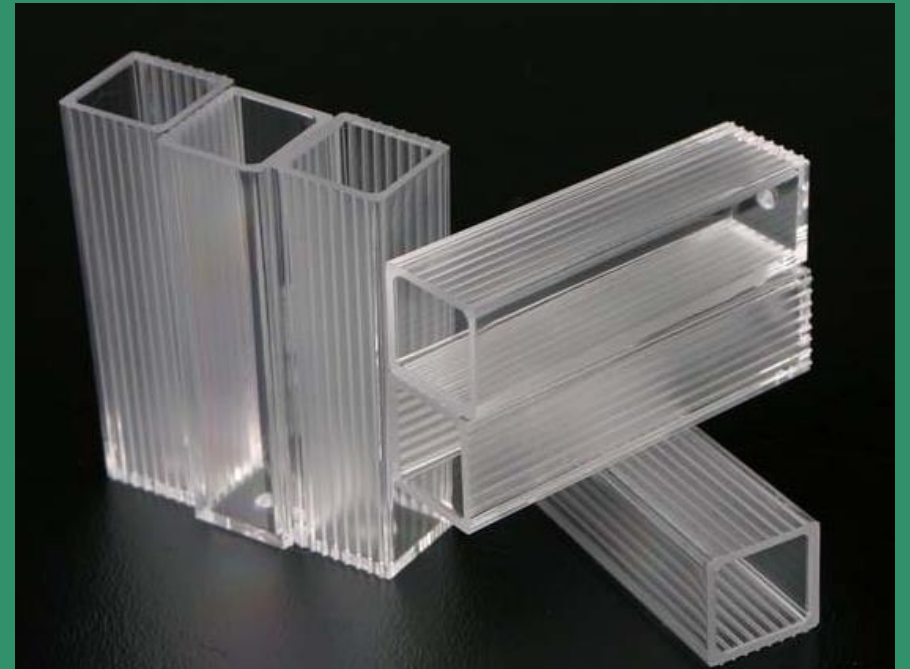
Acids, EDTA, DTT, phenol





# Cuvette e piastre:

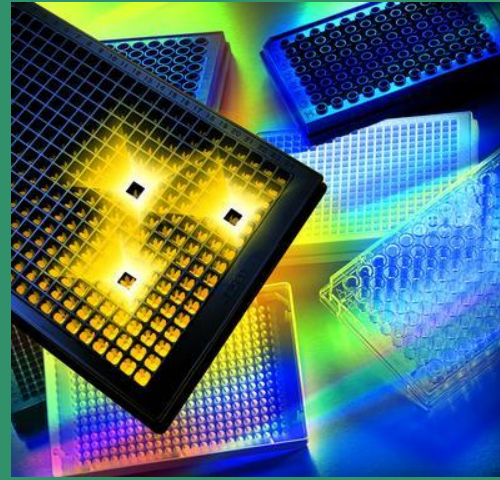
Plastica per luce visibile



# Vetro per luce visibile



# Quarzo per luce ultravioletto



# Retta di taratura

- Una retta di taratura nota anche come curva di calibrazione, è un tipo di grafico utilizzato per la determinazione della quantità incognita di un campione rispetto un campione di riferimento.
- La **curva standard** per la concentrazione proteica viene ottenuta utilizzando concentrazioni note di **albumina sierica bovina (BSA)**, una proteina sierica che trasporta gli acidi grassi ed importante nel mantenimento del pH del plasma. La BSA funge quindi da proteina di riferimento.
- La preparazione di una curva standard è necessaria per verificare se il metodo di dosaggio di una particolare sostanza rileva un aumento lineare con la sua concentrazione.

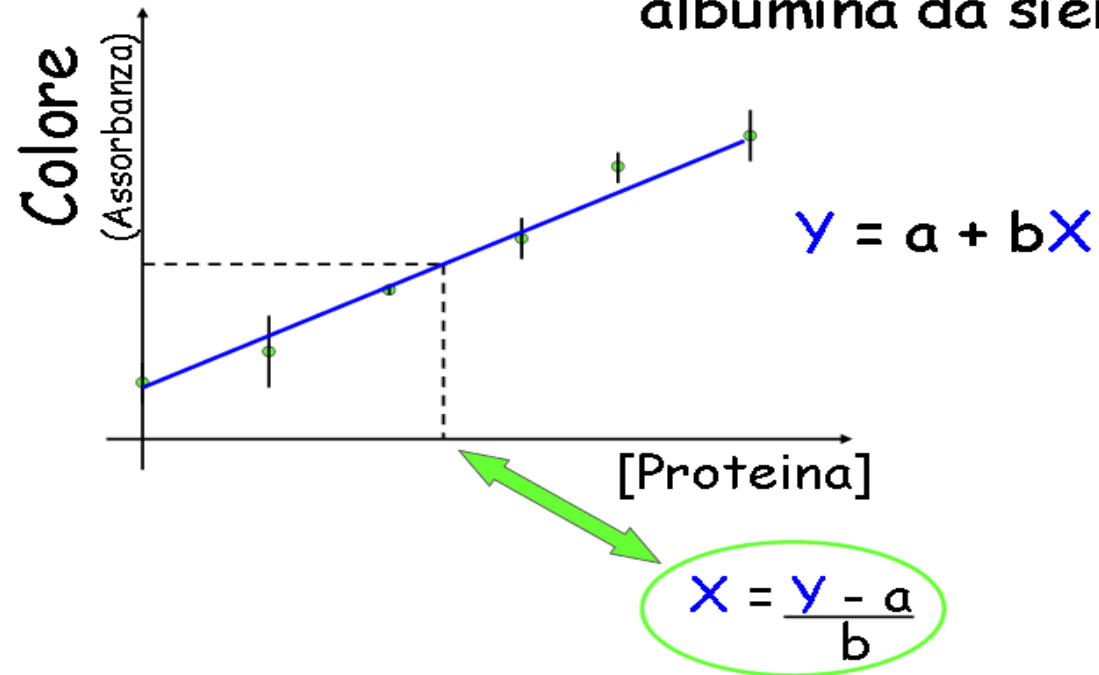


# Come costruire una retta di taratura

1. Si misura l'assorbanza a concentrazioni crescenti della nostra proteina di riferimento (BSA), e si misura il "bianco" cioè la soluzione senza proteina;
2. Si misura l'assorbanza dei nostri campioni incogniti;
3. Ai valori di assorbanza ottenuti eliminiamo il valore del bianco;
4. Costruiamo la retta di taratura mettendo i valori di assorbanza sull'asse delle Y e i valori crescenti di concentrazione di BSA sull'asse delle X.



## Curva di taratura (standard curve) di BSA: albumina da siero bovino



Usando l'equazione della retta ottenuta possiamo ricavare la concentrazione del nostro campione incognito



# Protocollo sperimentale

- Preparazione dello standard (albumina di siero bovino) e costruzione della retta di taratura.

- Preparazione del campione e calcolo della concentrazione proteica utilizzando la retta di taratura.



# Albumina di siero bovino (BSA)

Reviewed, UniProtKB/Swiss-Prot

ALBU BOVIN (P02769)

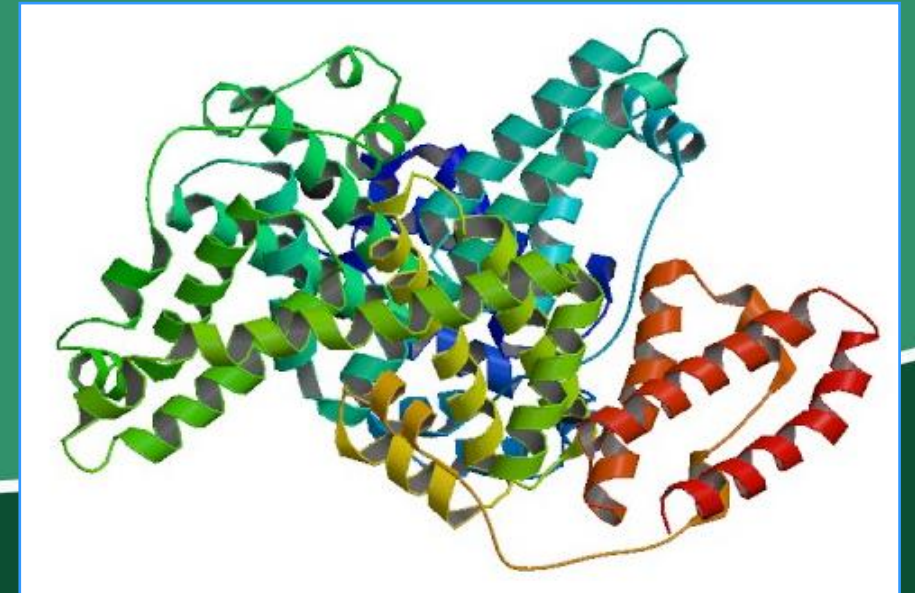
Serum albumin (BSA) *Bos taurus* (Bovine).

The computation has been carried out on the complete sequence (607 amino acids).

**Number of amino acids: 607**

**Molecular weight: 66.5 kDa.**

**Theoretical pI: 5.82**





# Retta di Taratura

Proteina standard:

Albumina di siero bovino (BSA) concentrata 0,1 mg/ml

Concentrazione di BSA nella piastra	$\mu\text{l}$ di BSA	$\mu\text{l}$ H <sub>2</sub> O	150 $\mu\text{l}$ di reagente
Bianco	-	100 $\mu\text{l}$	“
1 $\mu\text{g}$	10 $\mu\text{l}$	90 $\mu\text{l}$	“
2 $\mu\text{g}$	20 $\mu\text{l}$	80 $\mu\text{l}$	“
3 $\mu\text{g}$	30 $\mu\text{l}$	70 $\mu\text{l}$	“
4 $\mu\text{g}$	40 $\mu\text{l}$	60 $\mu\text{l}$	“
5 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	“
6 $\mu\text{g}$	60 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$	“

1. Incubare per 5 minuti

2. Leggere l'assorbanza a 595 nm

3. Costruire la retta di taratura



# Come allestire la curva de taratura in una piastra per il dosaggio Bradford

Si allestisce in triplicato nel seguente modo:

In **A1, A2, A3 (Bianco)** 100  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  + 150  $\mu\text{l}$  di reagente Bradford diluito 1:5

In **B1, B2, B3 (1  $\mu\text{g}$  di BSA)** 10  $\mu\text{l}$  di BSA (0.1 mg/mL) + 90  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  + 150  $\mu\text{l}$  di reagente Bradford diluito 1:5

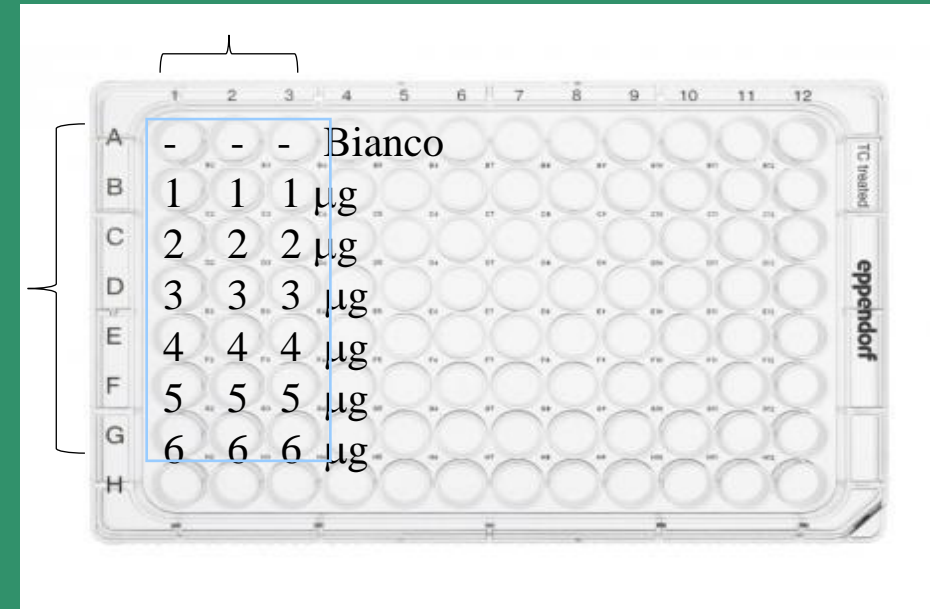
In **C1, C2, C3 (2  $\mu\text{g}$  di BSA)** 20  $\mu\text{l}$  di BSA (0.1 mg/mL) + 80  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  + 150  $\mu\text{l}$  di reagente Bradford diluito 1:5

In **D1, D2, D3 (3  $\mu\text{g}$  di BSA)** 30  $\mu\text{l}$  di BSA (0.1 mg/mL) + 70  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  + 150  $\mu\text{l}$  di reagente Bradford diluito 1:5

In **E1, E2, E3 (4  $\mu\text{g}$  di BSA)** 40  $\mu\text{l}$  di BSA (0.1 mg/mL) + 60  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  + 150  $\mu\text{l}$  di reagente Bradford diluito 1:5

In **F1, F2, F3 (5  $\mu\text{g}$  di BSA)** 50  $\mu\text{l}$  di BSA (0.1 mg/mL) + 50  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  + 150  $\mu\text{l}$  di reagente Bradford diluito 1:5

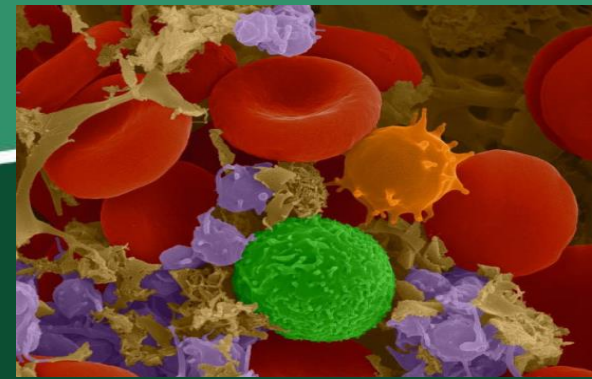
In **G1, G2, G3 (6  $\mu\text{g}$  di BSA)** 60  $\mu\text{l}$  di BSA (0.1 mg/mL) + 40  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  + 150  $\mu\text{l}$  di reagente Bradford diluito 1:5



# Campione da analizzare: siero di sangue bovino

Il siero è la parte non corpuscolata del sangue che si separa da questo dopo la coagulazione. È un liquido di colore variabile dal giallo pallido al giallo oro, la sua composizione proteica è simile al plasma privato dei fattori della coagulazione fondamentale fibrinogeno (che, trasformatosi in fibrina, passa a far parte del coagulo)

Il plasma consente alle cellule dell'organismo di disporre di acqua e di sostanze nutritive derivanti dagli alimenti. Esso contiene proteine, sostanze minerali ed ormoni essenziali per il normale sviluppo organico, inoltre trasporta i vari prodotti di degradazione al rene e al fegato perché vengano eliminati.



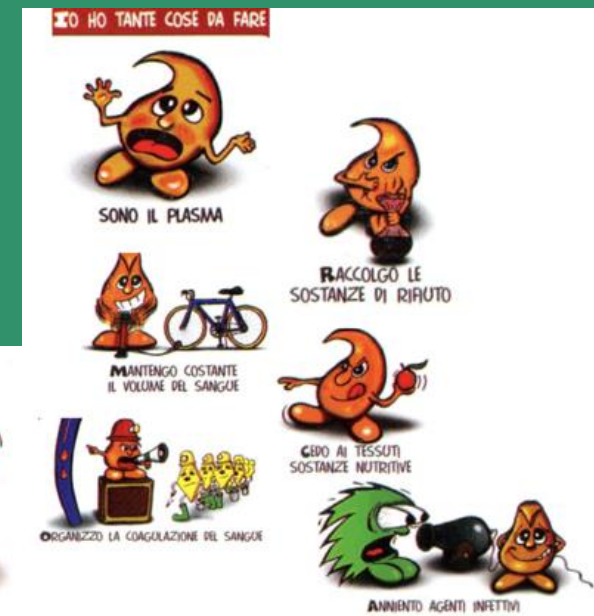
# Proteine del plasma

**Albumina** (costituisce da sola il 52% del totale) e **Globuline alfa e beta** prodotte dal fegato, pressione colloidale, funzione tampone del plasma, trasporto di ioni metallici, **proteine che legano i lipidi e vitamine liposolubili** mentre le **gamma Globuline** sono prodotte da plasmacellule, **anticorpi** della difesa immunitaria (trasporto e difesa).

**Proteine della coagulazione**, la protrombina e il fibrinogeno, prodotte dal fegato.

**Proteine del complemento**, C1-C9 prodotte dal fegato, difesa di microorganismi e risposta infiammatoria

**Lipoproteine plasmatiche**, colesterolo dal fegato alle cellule



# PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Diluire il siero 1: 200

<b>piastra</b>	<b>µl di siero</b>	<b>µl di H<sub>2</sub>O</b>	<b>150 µl di reagente</b>
Bianco	-	100 µl	“
	5 µl	95 µl	“
	10 µl	90 µl	“
	20 µl	80 µl	“

- Incubare per 5 minuti
- Leggere l'assorbanza a 595 nm
- Calcolare la concentrazione proteica



# Come allestire i campioni in una piastra per il dosaggio Bradford

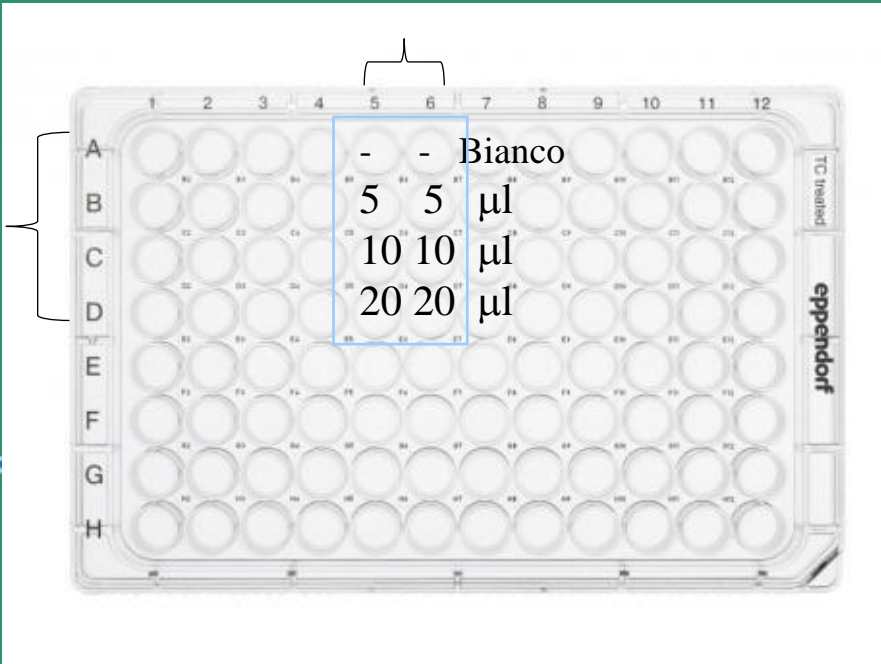
Si allestisce in doppio nel seguente modo:

In **A5, A6**, (Bianco) 100  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  + 150  $\mu\text{l}$  di reagente Bradford diluito 1:5

In **B5, B6**, 5  $\mu\text{l}$  di campione (diluito 1:200) + 95  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  + 150  $\mu\text{l}$  di reagente Bradford diluito 1:5

In **C5, C6**, 10  $\mu\text{l}$  di campione (diluito 1:200) + 90  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  + 150  $\mu\text{l}$  di reagente Bradford diluito 1:5

In **D5, D6**, 20  $\mu\text{l}$  di campione (diluito 1:200) + 80  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  + 150  $\mu\text{l}$  di reagente Bradford diluito 1:5



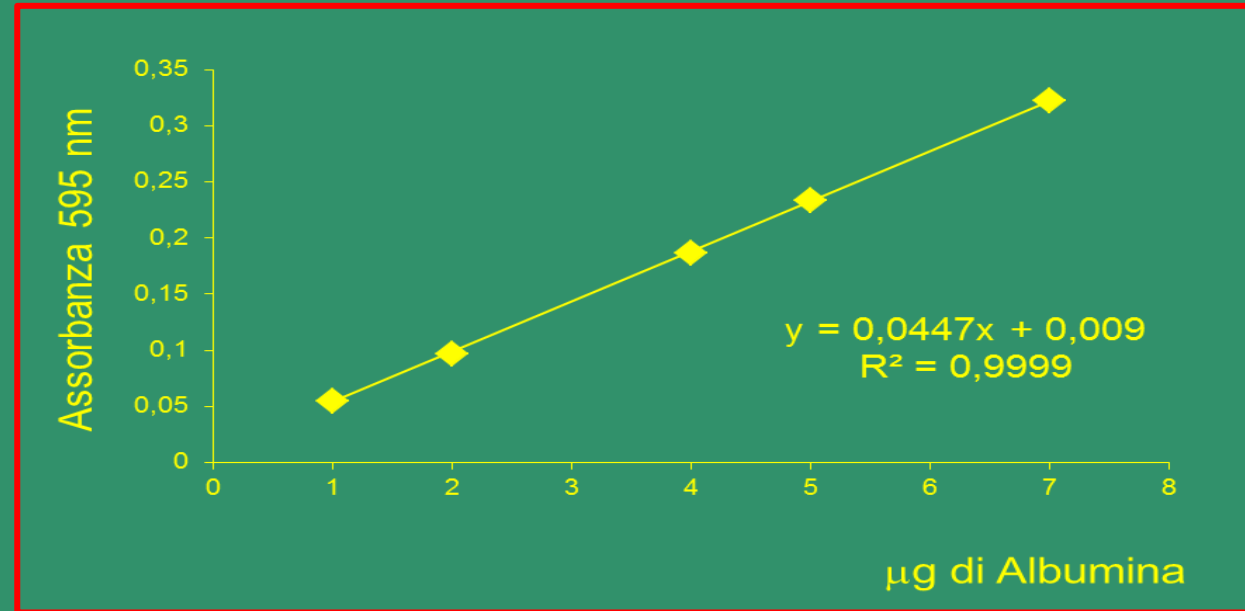
# Piastra dopo lettura in assorbanza 595 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.143	0.150	0.145	0.039	0.142	0.158	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.037
B	0.274	0.263	0.291	0.038	0.563	0.574	0.039	0.039	0.039	0.038	0.039	0.038
C	0.373	0.393	0.427	0.039	0.547	0.547	0.039	0.039	0.039	0.038	0.039	0.038
D	0.417	0.423	0.647	0.039	0.608	0.578	0.039	0.042	0.039	0.039	0.038	0.040
E	0.414	0.476	0.493	0.039	0.039	0.039	0.038	0.039	0.039	0.039	0.039	0.038
F	0.449	0.540	0.475	0.039	0.040	0.039	0.039	0.039	0.040	0.039	0.039	0.038
G	0.617	0.527	0.523	0.039	0.040	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.038	0.038
H	0.038	0.038	0.038	0.040	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038



# Protocollo sperimentale

Con i valori di assorbanza ottenuti dalla lettura a 595 nm, costruire la curva di taratura



Calcolare la concentrazione delle proteine del nostro campione utilizzando la retta di taratura ( $Y=m*x+q$ ) dove:

$X$  = la nostra incognita

$y$  = Assorbanza letta a 595 nm





## Vantaggi:



- semplicità di preparazione del reattivo;
- sviluppo immediato del colore;
- stabilità del complesso;
- sensibilità alta (1-2000  $\mu\text{g}$  proteina/mL)

## Svantaggi:



alcuni campioni sono poco solubili in ambiente acido

