

Estrazione di proteine da matrici alimentari, determinazione ed analisi

Laboratorio di Biochimica Generale (Responsabile attività: Prof. Rocco Rossano, Tutor: Dr.ssa Marilena Larocca)

1. Omogeneizzazione della matrice (kiwi) in *waringblendor*

- 1.1 Rimuovere la buccia del kiwi e tagliare la polpa in cubetti di 2-3 cm.
- 1.2 Pesare all'interno di un beker 40 g di campione cubettato e trasferirlo con l'ausilio di una spatola a cucchiaino nell'omogeneizzatore (*waringblendor*).
- 1.3 Dopo aver chiuso il bicchiere dell'omogeneizzatore con l'apposito tappo in teflon, omogeneizzare per 1 minuto alla massima velocità (4 step da 15 secondi).

2. Recupero della frazione proteica solubile mediante centrifugazione

- 2.1 Recuperare tutto l'omogenato e ripartirlo in quantità uguali in 2 tubi da centrifuga, avendo cura di pesare accuratamente fino alla seconda cifra decimale.
- 2.2 Trasferire i tubi in centrifuga avendo cura di alloggiarli in diagonale. Dopo aver avvitato il coperchio del rotore e chiuso lo sportello della centrifuga, impostare i seguenti parametri (premere *enter* dopo ogni settaggio): rotor: 20; speed: 15000 rpm; time: 20 min; T: 4 °C.

3. Filtrazione del supernatante

- 3.1 A fine centrifugazione recuperare i due tubi ed alloggiarli nell'apposito porta-campioni (giallo) avendo cura di non scuoterli.
- 3.2 Recuperare il surnatante con una pipetta Pasteur e trasferirlo in cilindro da 50 mL.
- 3.3 Preparare un filtro di carta piegando in quattro il dischetto Whatman, posizionarlo all'interno di un beker da 100mL e raccogliere il filtrato.

4. Dosaggio delle proteine con il metodo Bradford

- 4.1 Per l'esecuzione del dosaggio utilizzare provette da 10 ml ed aggiungere nell'ordine (in triplicato):
 - 800 µL di acqua deionizzata (utilizzare l'apposito dispensatore)
 - 20 µL di campione (utilizzare una micropipetta P20)
 - 200 µL del reattivo Bradford (utilizzare l'apposito dispensatore),

per la preparazione del bianco (riferimento) aggiungere acqua al posto del campione.

- 4.2 Agitare su vortex e trasferire il contenuto in cuvettesemimicro di plastica.
- 4.3 Effettuare le letture di assorbanza allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm dopo 5 min di incubazione con il reattivo (il colore blu è stabile per circa 45 min).
- 4.4 Leggere prima l'assorbanza del bianco (riferimento), quindi azzerare lo spettrofotometro (Set Ref) e procedere con le letture del campione (Run).
- 4.5 Per il calcolo della concentrazione proteica utilizzare l'equazione indicata, corrispondente alla retta di taratura ottenuta con una proteina di riferimento.

5. Separazione delle proteine mediante SDS-PAGE(Sodio DodecilSolfato-PoliAcrilammide Gel Elettroforesi)

5.1 Preparazione del gel

- Assemblare all'interno dell'apposito supporto il sistema per la gelificazione (*slab*), costituito dalle due lastrine separate lateralmente dagli spaziatori da 1 mm e in basso chiuso da una striscia di gomma.
- Versare all'interno dello spazio tra i due vetrini, la soluzione di acrilammide per il gel di separazione inferiore (*running gel*), avendo cura di lasciarne 1- 2 mL in una provetta per controllare l'avvenuta polimerizzazione.
- A polimerizzazione completata versare la soluzione per il gel di impaccamento superiore (*stacking gel*) al di sopra del gel di separazione.
- Inserisce il pettine nel gel superiore per la formazione dei pozzetti per il caricamento dei campioni proteici.
- Terminata la polimerizzazione rimuovere lo *slab* dal supporto ed inserirlo nella camera di elettroforesi, rimuovere il pettine ed aggiunge il tampone di corsa.

5.2 Preparazione del campione

In una provetta del tipo Eppendorf aggiungere 10 μL di campione e 20 μL di tampone di lisi, dopo aver agitato su vortex incubare in acqua bollente per 5 min.

5.3 Caricamento su gel

Prelevare il campione con una micropipetta e caricarlo all'interno di un pozzetto del gel.

5.4 Caricare 7.5 μL di proteine standard (LowRange, Bio-Rad; 97-14 kDa).

5.5 Avvio della corsa elettroforetica

- Chiudere la camera elettroforetica avendo cura di far combaciare gli elettrodi in base allo stesso colore
- Collegare la camera all'alimentatore, avviare la corsa impostando 150 V.
- Bloccare la corsa quando il tracciante blu (bromofenolo) avrà raggiunto la fine del gel.

5.5 Colorazione del gel

Immergere il gel nella soluzione colorante, incubare per 15 min.
Recuperare la soluzione colorante ed aggiungere la soluzione decolorante, lasciare in agitazione tutta la notte.

6 Acquisizione ed analisi dell'immagine

6.4 Acquisire l'immagine del gel allo scanner, avendo cura di seguire le istruzioni indicate.

6.5 Effettuare l'analisi d'immagine computerizzata con il programma Image Master 1D (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) seguendo le istruzioni riportate.

7 Discussione dei risultati

Soluzioni per la preparazione del gel

- 1) Soluzione di acrilammide/bisacrilammide 30 / 08%.
- 2) Tampone per il gel inferiore: 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.4% SDS.
- 3) Tampone per il gel superiore: 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.4% SDS.
- 4) Tampone di corsa: 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina, 0.1% SDS, pH 8.3.
- 5) Tampone di lisi per i campioni: 4% SDS, 20% glicerolo, 10% 2-mercaptoetanol, 0.004% bromofenol blu, 0.125 M TrisHCl, pH 6.8.
- 6) Soluzione per la colorazione del gel: 0,26% Coomassie Blue R-250, 10% acido acetico glaciale, 25% metanolo, 65 % H₂O.
- 7) Soluzione per la decolorazione del gel: 10% acido acetico glaciale, 25% metanolo, 65 % H₂O.

Elettroforesi

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, essendo dei polielettroliti anfoteri, migrano in un campo elettrico in funzione della loro carica, la quale a sua volta dipende dai pK e dal pH del mezzo. Per definizione al pH isoelettrico (pI) le proteine hanno carica netta uguale a zero; a valori di pH inferiori al pI prevalgono le cariche positive, cioè le proteine sono in forma cationica e migrano verso il catodo; a valori di pH maggiori del pI prevalgono le cariche negative, le proteine quindi sono in forma anionica e migrano verso l'anodo. Quindi il comportamento elettroforetico di una molecola non è funzione del valore assoluto del pH del mezzo ma è funzione del rapporto tra pH del mezzo e pI. La velocità di migrazione dipende, in definitiva, da una serie di parametri come campo elettrico, carica, temperatura, che aumentano la velocità di migrazione, dimensioni, viscosità del mezzo e forza ionica, che ostacolano la separazione e diminuiscono quindi la velocità di migrazione.

Possiamo distinguere due tipi fondamentali di elettroforesi: l'elettroforesi in fase libera e l'elettroforesi zonale. Quest'ultima si distingue dalla prima per la presenza di un supporto solido inerte e poroso attraverso il quale sono costrette a migrare le particelle. L'elettroforesi zonale garantisce una risoluzione maggiore rispetto all'elettroforesi in fase libera, perchè consente una separazione netta di una specie proteica in una zona ben distinta rispetto ad un'altra specie. Il supporto ha la funzione stabilizzante, evita il verificarsi di fenomeni convettivi durante l'elettroforesi e impedisce la diffusione dei soluti. Esso deve avere delle caratteristiche particolari: non disciogliersi nel tampone usato, essere formato da particelle di forma e distribuzione uniformi e non adsorbire soluti.

Elettroforesi su gel di poliacrilamide in sodio dodecil- solfato(SDS-PAGE)

In questo tipo di elettroforesi si usa il gel di poliacrilamide che ha delle caratteristiche particolari quali trasparenza, termostabilità, porosità variabile entro ampi limiti. Il gel è ottenuto dalla copolimerizzazione della acrilamide con N-N-metilenbisacrilamide.

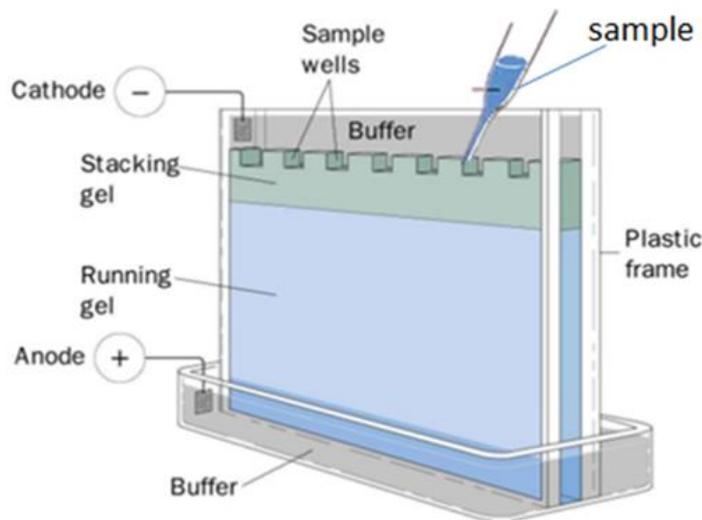
Nel processo di polimerizzazione intervengono un iniziatore che è l'ammonio persolfato, ed un catalizzatore che è la tetrametiletildiamina (TEMED). Nel primo stadio di questa reazione si ha l'attivazione del TEMED ad opera dell'ammonio persolfato il quale agisce determinando la formazione di radicali. In seguito a questa attivazione il TEMED presenta un elettrone spaiato che viene trasferito ad una molecola di acrilamide o bisacrilamide. 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 determina la formazione di un vero e proprio reticolo a maglie. La grandezza di queste maglie e quindi la porosità del gel, dipende dal rapporto acrilamide/bisacrilamide. Il tempo di polimerizzazione del gel è di circa 30 minuti. Il gel funge da setaccio molecolare, per cui la mobilità elettroforetica sarà funzione non solo della carica, ma anche delle dimensioni delle macromolecole. Questa tecnica consente pertanto di separare le proteine sulla base dei loro differenti pesi molecolari. Molto interessante si è rivelata la possibilità di utilizzare in questa tecnica elettroforetica il sodio dodecil-solfato (SDS), un detergente anionico. Esso agisce legandosi alle proteine con legami idrofobici di tipo cooperativo che ne determinano la denaturazione in seguito allo svolgimento delle catene polipeptidiche. L'aggiunta di β -mercaptoetanolo 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 in cui le catene idrocarburiche dell'SDS legate alle porzioni idrofobiche del polipeptide sono rivolte verso l'interno, mentre i gruppi idrofilici SO_4^- sono esposti all'esterno, verso il mezzo acquoso circostante. In questo modo le proteine risultano essere cariche negativamente. 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. L'uso di gels piatti (slab-gel), offre la possibilità di esaminare contemporaneamente più campioni e di confrontarli con i markers.

Procedura

Si pipetta la soluzione per il gel inferiore nell'intercapedine, creata da due spaziatori tra due lastrine di vetro. Dopo la polimerizzazione, si pipetta la soluzione per il gel superiore e si inserisce un pettine a 10 denti. Si lascia polimerizzare. La presenza del pettine determina la formazione di 10 pozzetti.

Avvenuta la polimerizzazione del gel superiore, si sfilava il pettine e si lava il gel con H_2O distillata. La quantità di campione da applicare per ogni pozzetto è generalmente molto piccola; nell'ordine dei μg . Le due lastrine che racchiudono il gel vengono inserite nella camera elettroforetica. In seguito si provvede con l'aggiunta del tampone di corsa.



L'elevata quantità di tampone utilizzato impedisce che si abbia una variazione di pH prima che la corsa sia finita evitando così il viraggio del gel; inoltre la corsa elettroforetica ha una durata inferiore in quanto il potere tampone è più elevato.

Prima dell'applicazione sul gel i campioni proteici vengono solubilizzati in un medium contenente SDS, β -mercaptoetanolo, tampone e colorante a pH 6.8; poi per mezzo di una microsiringa o micropipetta vengono iniettati nei pozzetti del gel i campioni da analizzare. La cameretta viene chiusa con un coperchio che presenta due elettrodi i quali vengono collegati ad un generatore di corrente. La corsa elettroforetica viene fatta avvenire applicando a voltaggio o amperaggio costante. Essa viene seguita considerando la migrazione del Bromofenolo Blu presente nel medium solubilizzante. In genere la durata della corsa è di circa 60-90 minuti. Terminata l'elettroforesi, il gel viene rimosso dalle due lastre e immerso in una vaschetta contenente una soluzione colorante contenente Coomassie Brilliant Blue. Infine il gel viene decolorato con una soluzione costituita da acido acetico-metanolo- H_2O . La decolorazione risulta più efficace se effettuata sotto agitazione. Dopo la decolorazione l'immagine del gel viene acquisita, quindi si procede all'analisi dell'immagine mediante densitometria. Il gel può essere conservato oppure utilizzato per il prelievo di spot dalle bande proteiche per studi di proteomica.