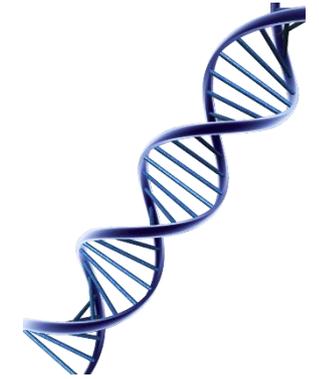
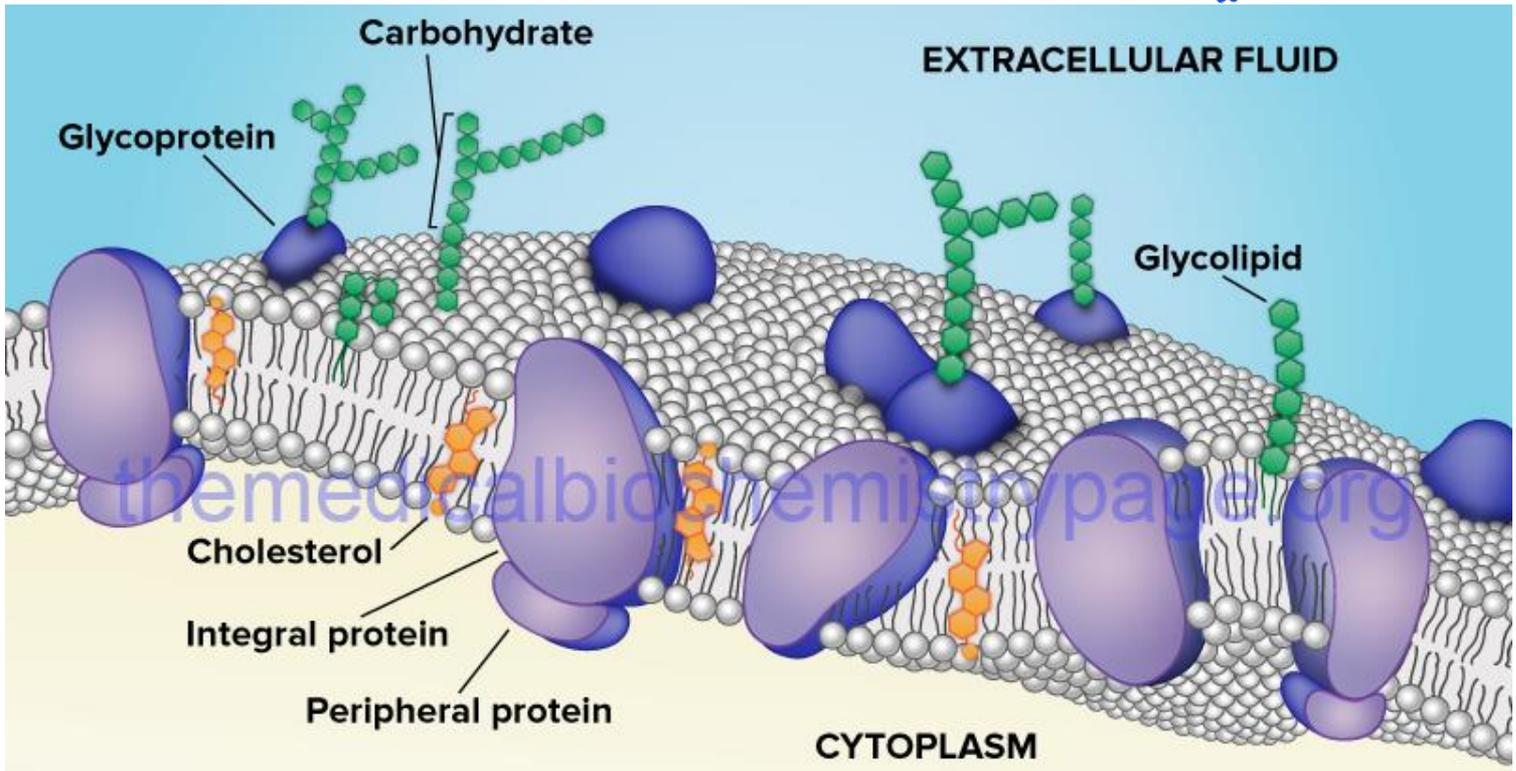
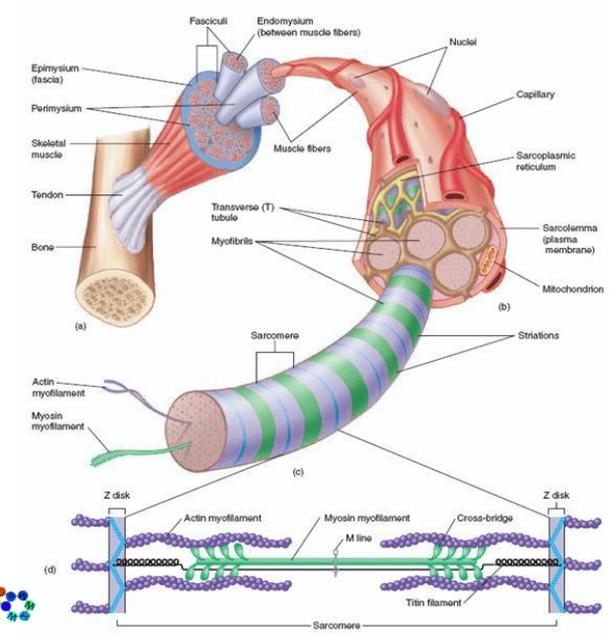
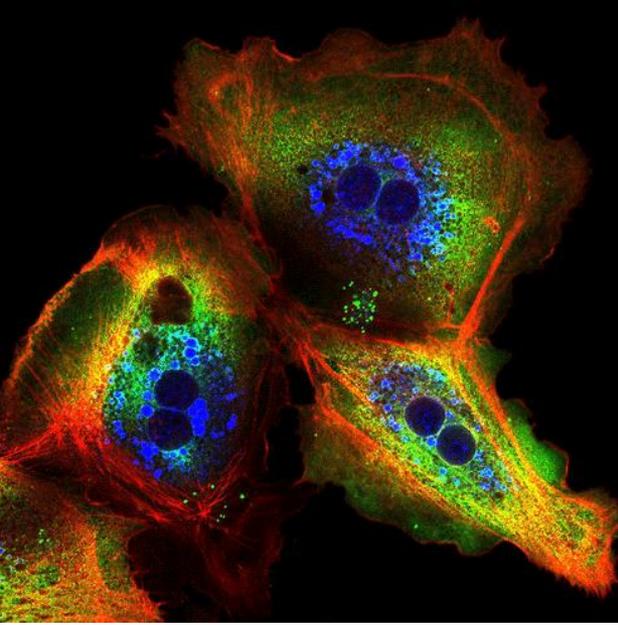
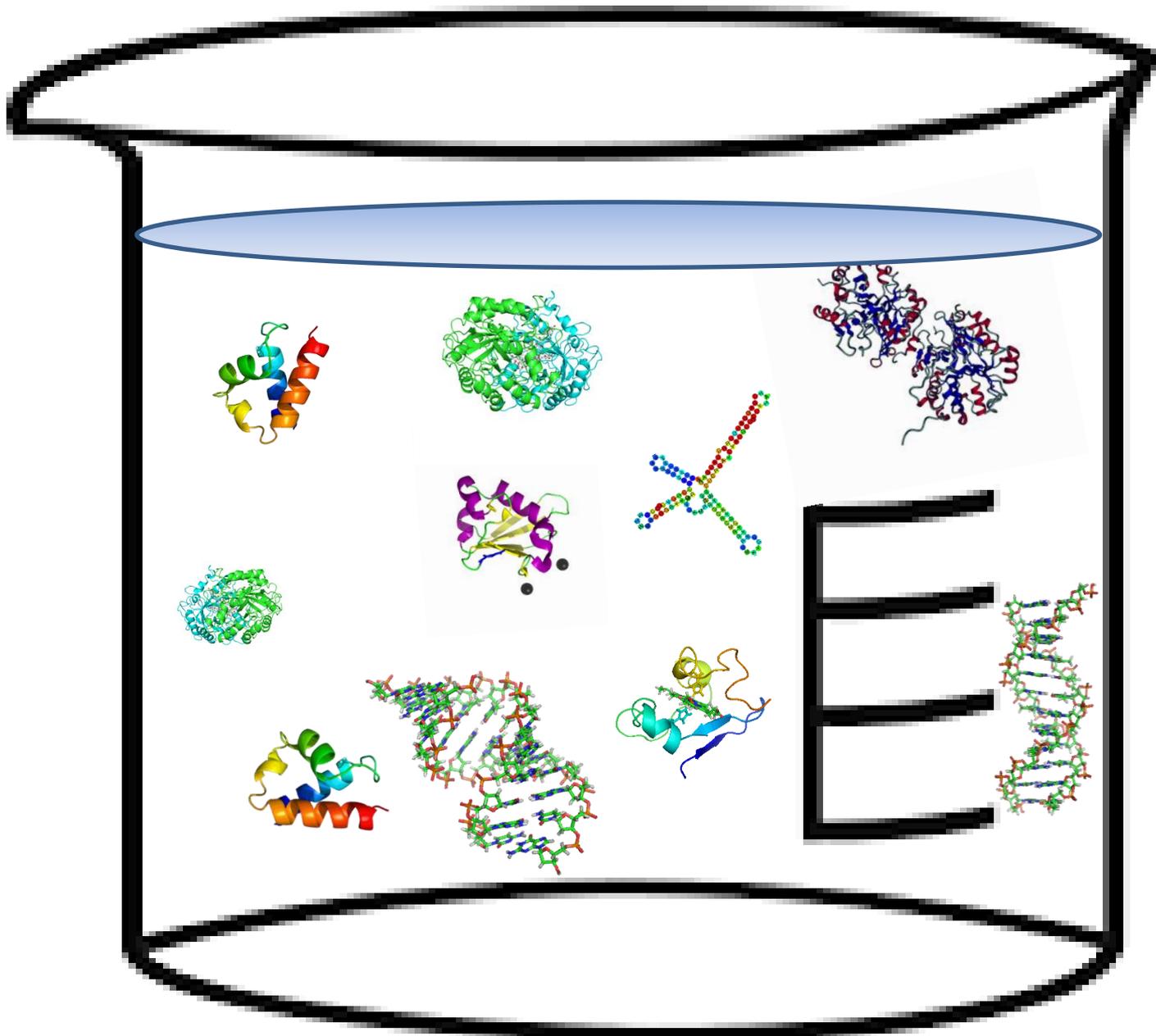


DNA, RNA E PROTEINE DA CAMPIONI BIOLOGICI



UNA VOLTA ESTRATTI VANNO QUANTIFICATI



QUANTIFICAZIONE DEI CAMPIONI

Vi sono numerosi metodi.

Alcuni forniscono **valori assoluti**, altri **relativi**; in tal caso lo standard esterno più comune è la **BSA**.



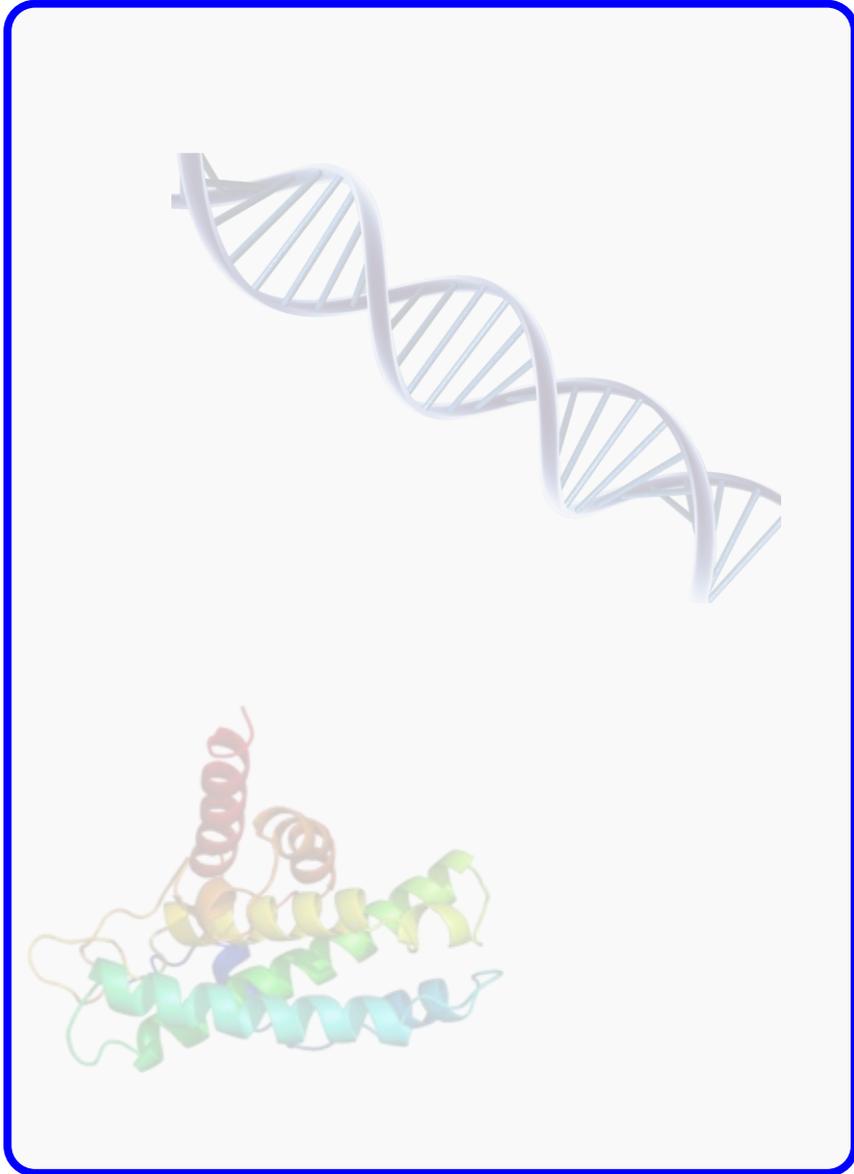
Determinazione
spettrofotometrica
diretta

VS

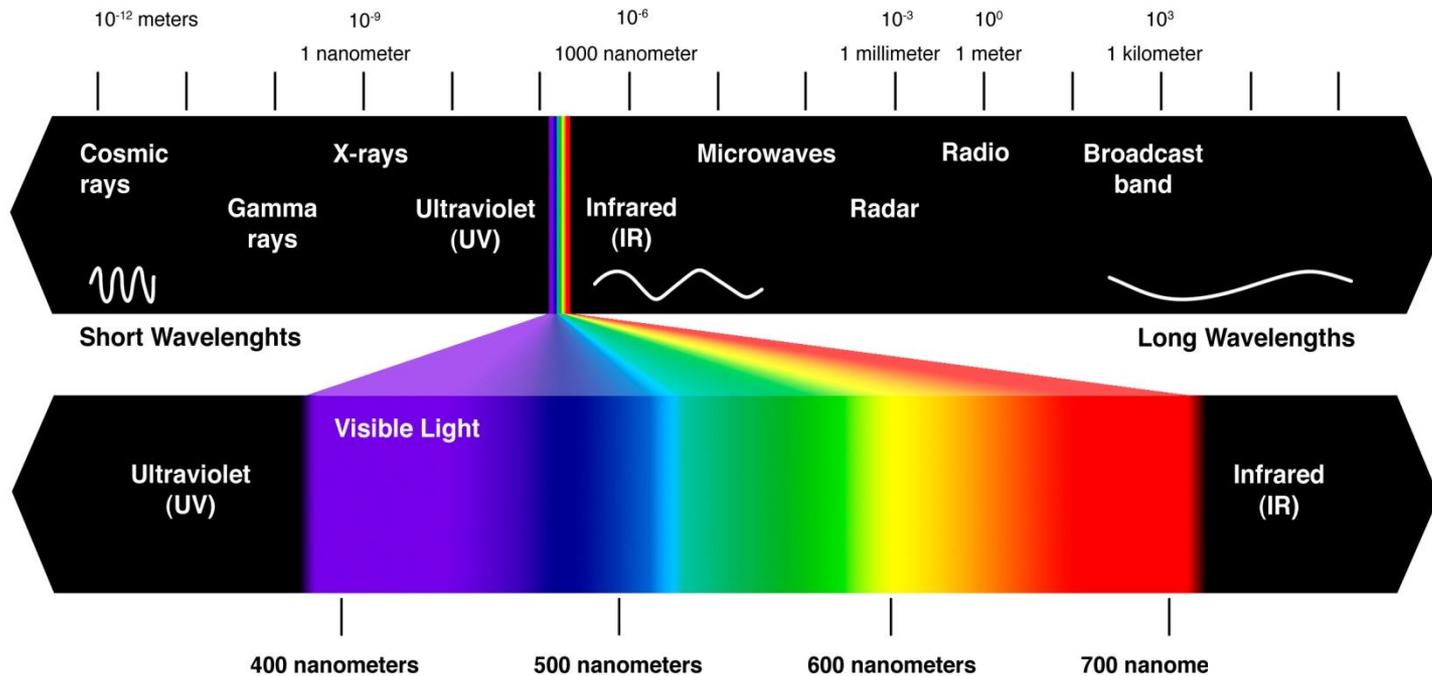


Metodi colorimetrici

DNA E PROTEINE NON ASSORBONO NEL VISIBILE



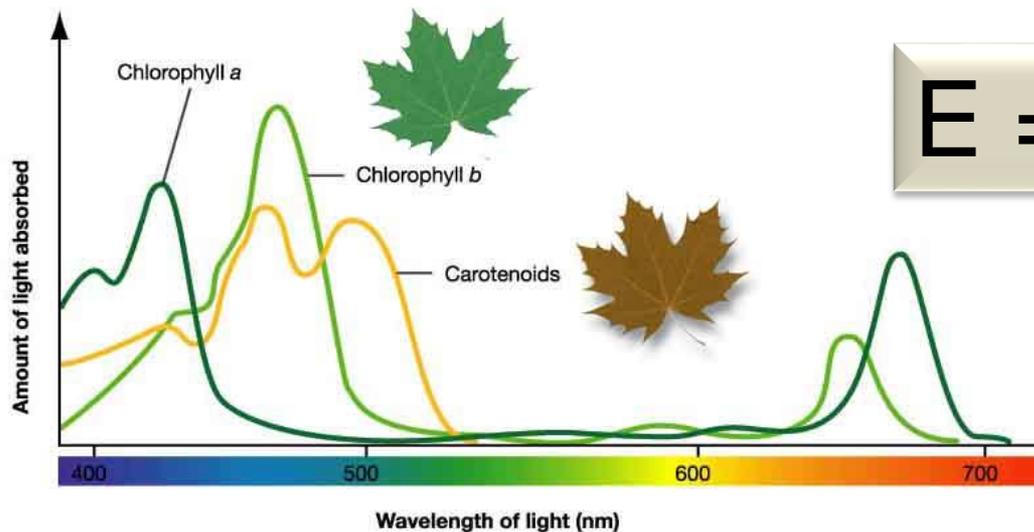
SPETTROFOTOMETRIA DI ASSORBIMENTO



SPETTROFOTOMETRIA DI ASSORBIMENTO

La spettrofotometria è il processo che determina la quantità di luce ($E - \nu - \lambda$) assorbita da composti disciolti **in soluzione**.

Ogni molecola ha precisi livelli energetici associati alla propria natura e legami chimici, perciò assorbirà la luce di λ (E) specifiche, fornendo spettri di assorbimento **unici**.

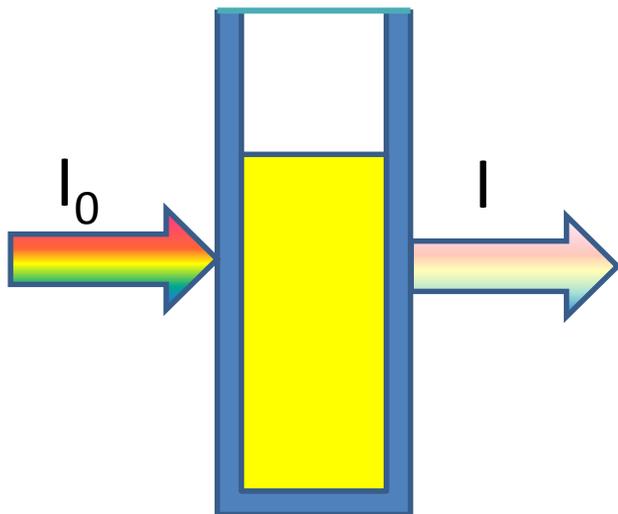


$$E = h \nu$$

$$\lambda = c / \nu$$

Tramite essa è possibile uno studio **qualitativo** e **quantitativo**.

L'ASSORBIMENTO DI UNA SOLUZIONE



$$\text{Trasmittanza (T)} = \frac{I}{I_0}$$

Frazione di luce incidente trasmessa dalla soluzione.

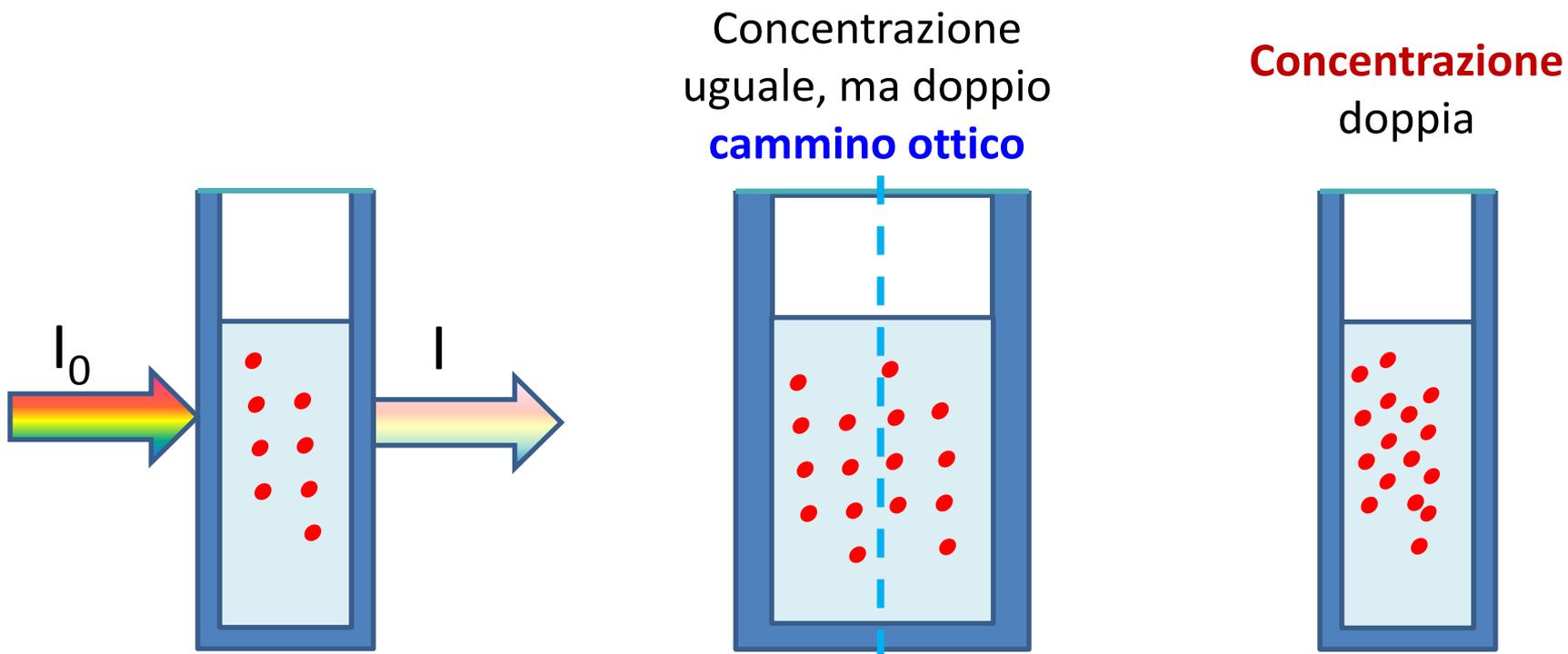
$$\text{Assorbanza (A)} = -\log T = \log \frac{I_0}{I}$$

L'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche è descritto dalla legge (sperimentale) di **Lambert-Beer**:

$$A = \epsilon l c$$

La radiazione assorbita dipende dalla **concentrazione** delle molecole che assorbono e dal **cammino ottico** nel quale avviene l'assorbimento.

DA COSA DIPENDE L'ASSORBIMENTO

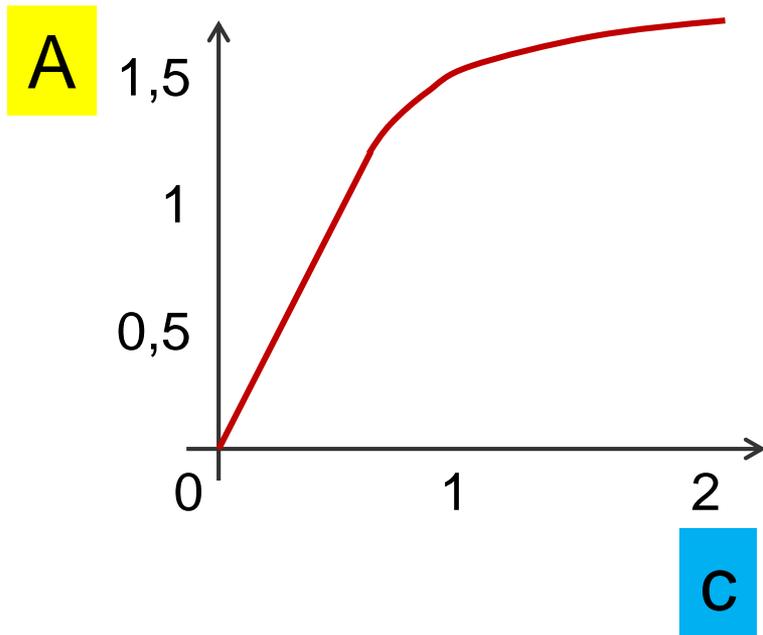
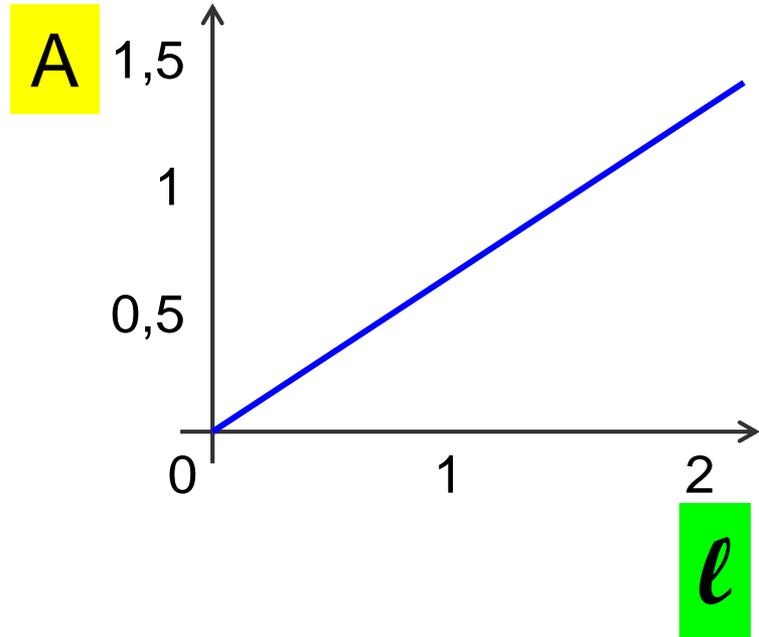


$$A = \epsilon l c$$

La radiazione assorbita dipende dal **cammino ottico** nel quale avviene l'assorbimento e dalla **concentrazione** delle molecole che assorbono.

L'ASSORBIMENTO IN FUNZIONE DEL CAMMINO OTTICO E DELLA CONCENTRAZIONE

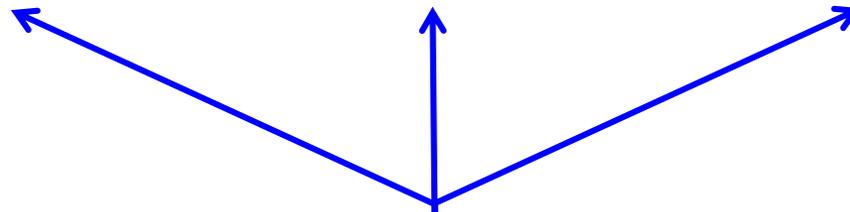
Se si riporta l'assorbanza in funzione della lunghezza del cammino ottico:



La risposta dell'assorbanza in funzione della concentrazione è **lineare** solo entro un determinato intervallo di valori.

IL COEFFICIENTE DI ESTINZIONE MOLARE

Natura chimica Lunghezza d'onda λ Temperatura e solvente



$$A = \epsilon_{\lambda} l c$$

La radiazione assorbita dipende dal **cammino ottico** nel quale avviene l'assorbimento, dalla **concentrazione** delle molecole che assorbono e dipende ovviamente da come assorbe ogni sostanza in esame e dalle condizioni in cui si trova.

UTILITA' DELLA MISURAZIONE DELL'ASSORBIMENTO DI UNA SOLUZIONE

Utilizzo pratico
della
Lambert-Beer:

$$A = \epsilon l c$$



$$c = \frac{A}{\epsilon l}$$

NELLA PRATICA COSA SIGNIFICA?

E. Coli (600 nm)

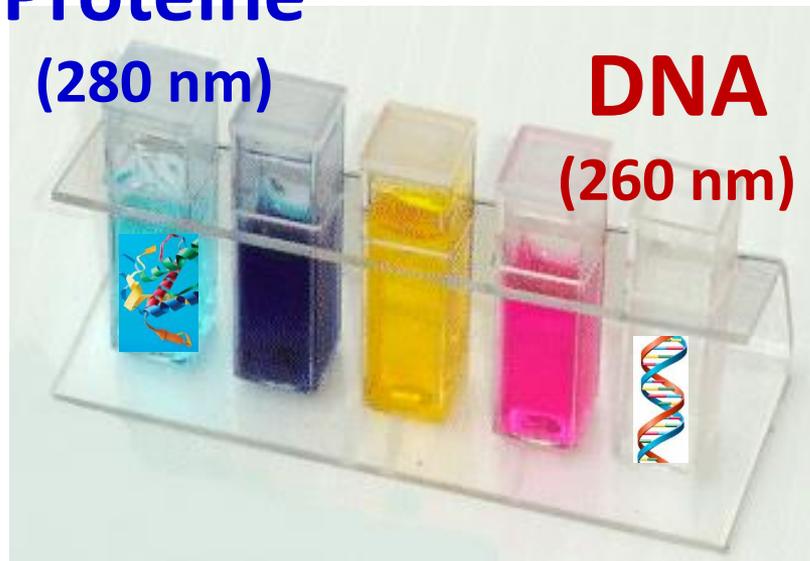


Proteine

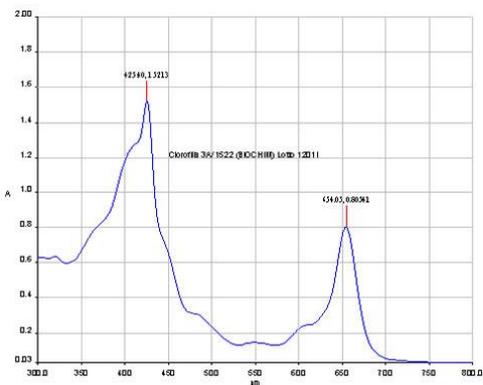
(280 nm)

DNA

(260 nm)



Identificare e descrivere sostanze

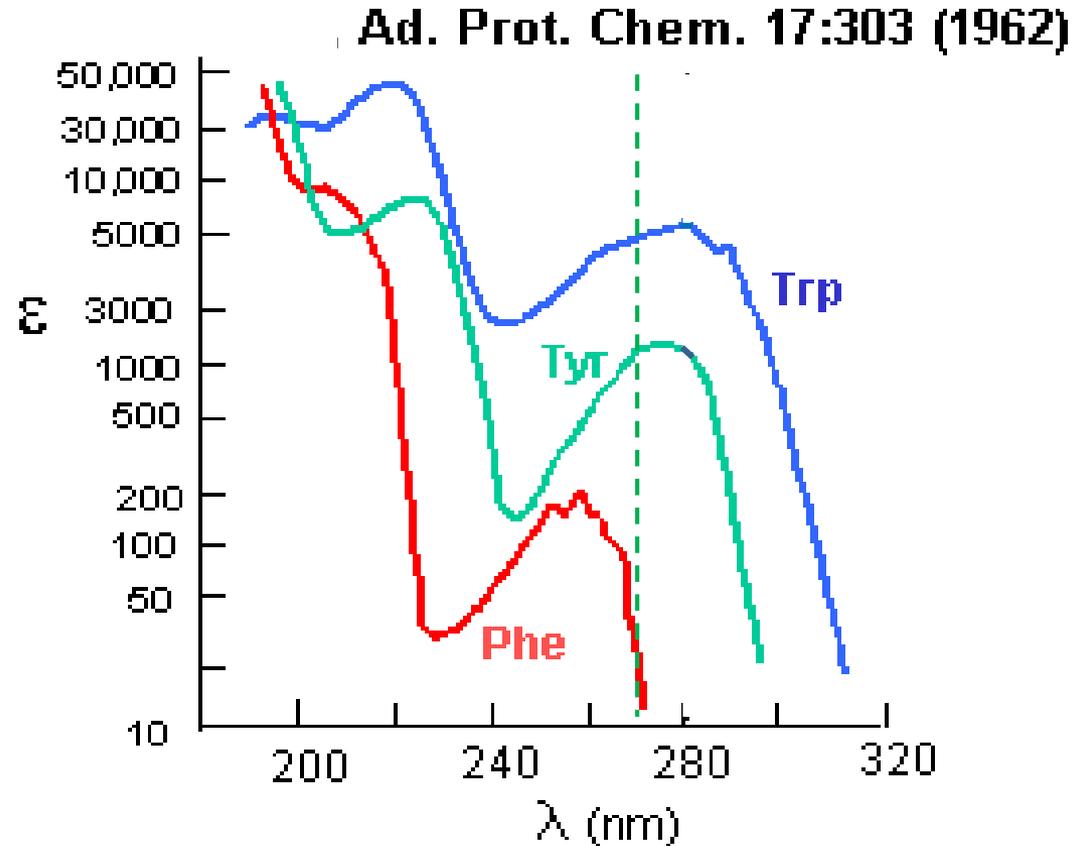
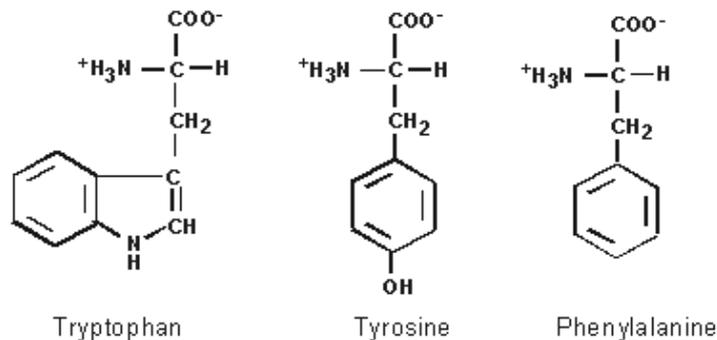


Molecole dannose in miscele complesse

DETERMINAZIONE DELLA QUANTITA' DI PROTEINE

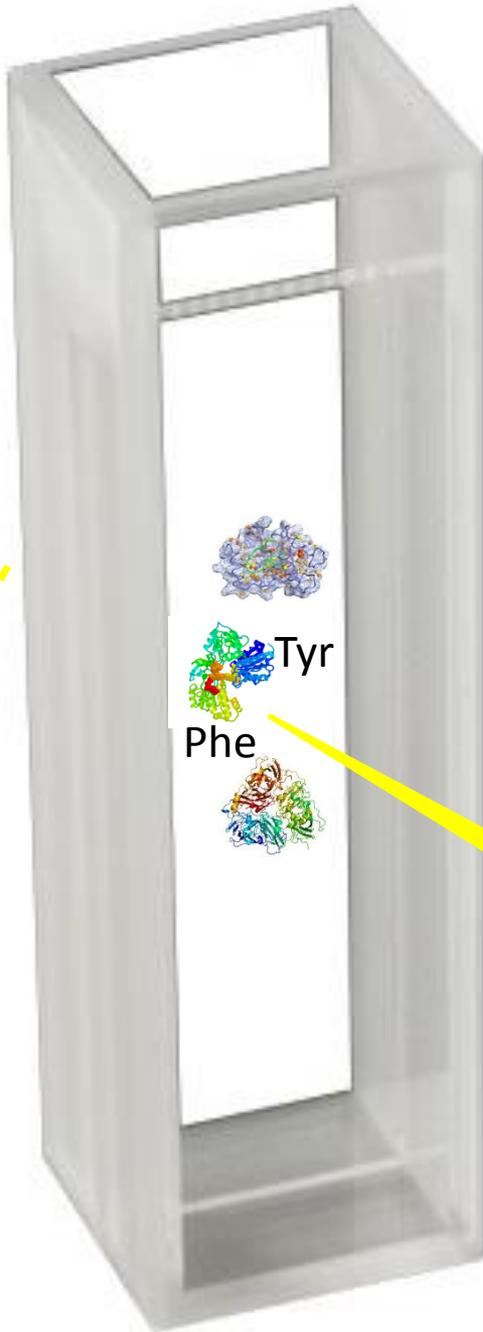
Alcuni residui aromatici
assorbono nel vicino UV
(**275-280 nm**)

Misura solamente le
proteine **totali**.



I residui assorbono **differentemente** e possono esser
presenti in **quantità diverse** da proteina a proteina.

COSA VEDE REALMENTE LO SPETTROFOTOMETRO?



Non è in grado di distinguere fra singoli amminoacidi, o fra singole proteine.

PROBLEMI NELLA QUANTIFICAZIONE SPETTROFOTOMETRICA DI PROTEINE

- Dipendenza dai residui di W, Y ed F.
- Possibile interferenza da parte di corpuscoli e solventi organici, eliminabile misurando l'assorbimento a **320 nm**.

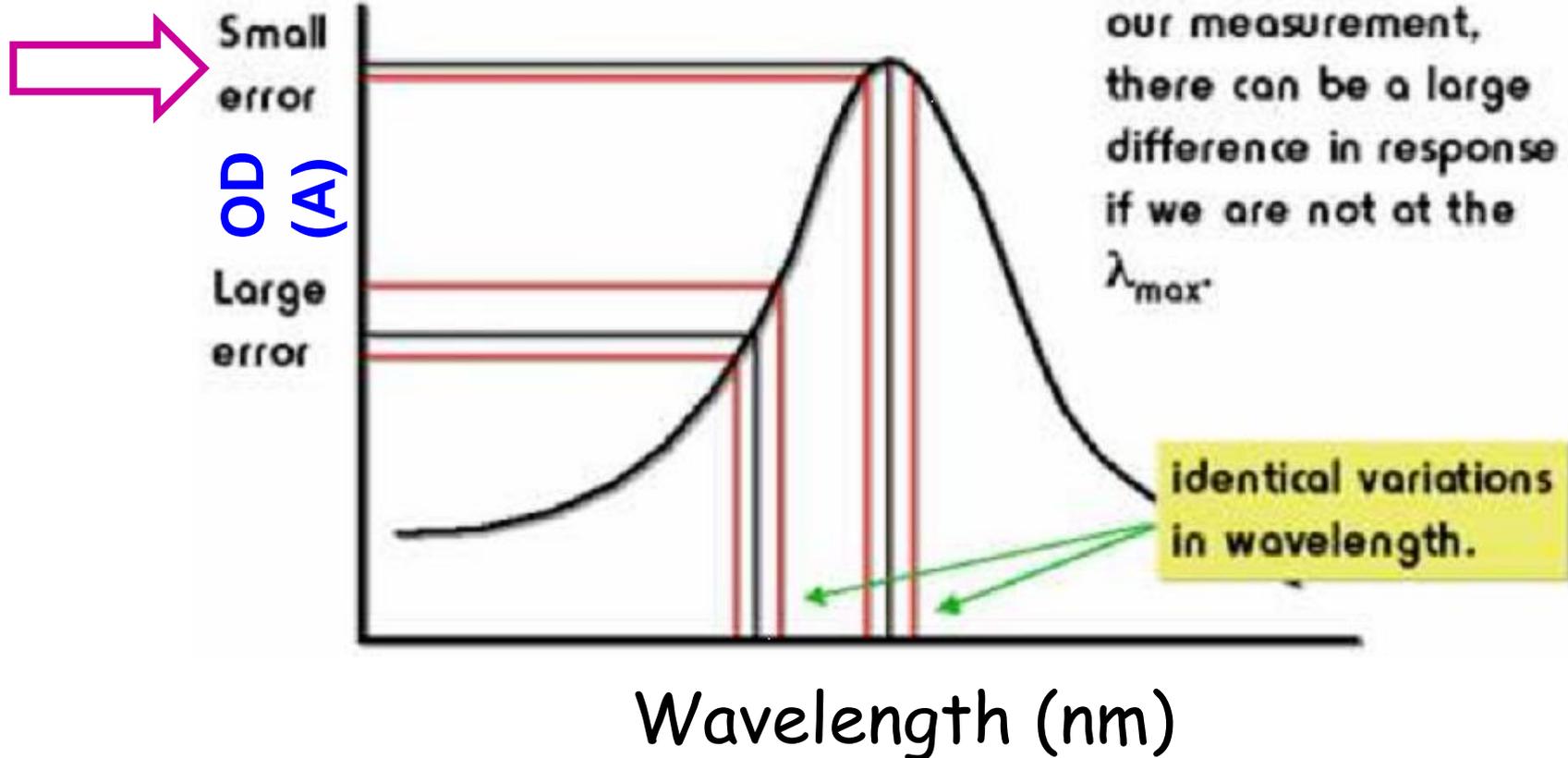
$$[c] = \frac{A_{280} - 1,7 A_{320}}{\epsilon l}$$

- Possibile interferenza da parte di **acidi nucleici**, eliminabile misurando il loro assorbimento a **260 nm**

~~$$\text{Protein (mg/mL)} = 1,55 A_{280} - 0,76 A_{260}$$~~

Eq. di
Stoscheck
(1990)

SCELTA DEL PICCO DI ASSORBIMENTO PER LA LETTURA SPETTROFOTOMETRICA



SCELTA DEL SOLVENTE

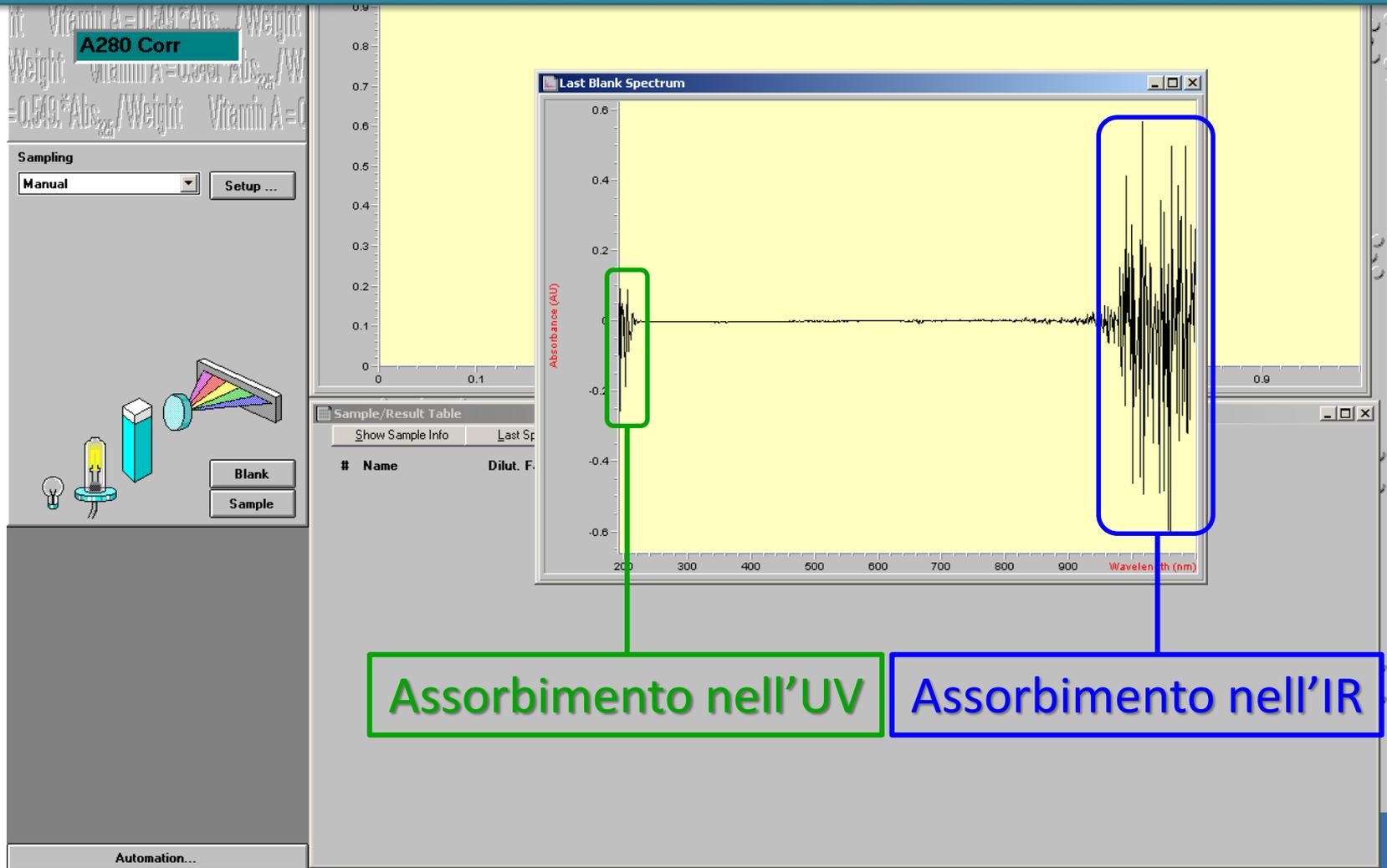
Un solvente dovrebbe:

- sciogliere tutti i composti presenti nel campione,
- trasparente a tutte le λ ,
- non infiammabile,
- non tossico,
- non volatile.

L'**H₂O distillata** si avvicina a questa condizione, ma è inadatta a composti organici apolari.

LETTURA DEL BIANCO (HBS)

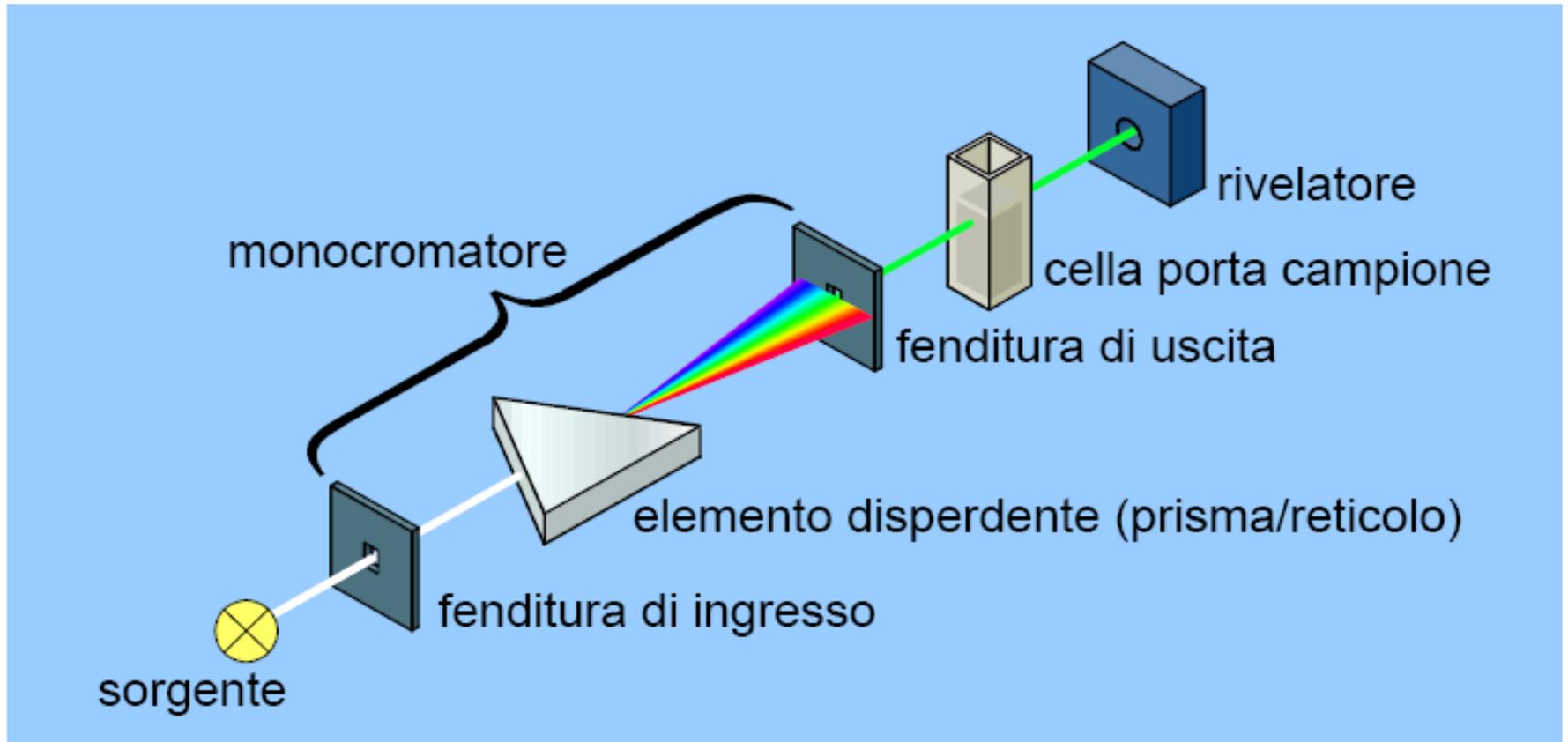
La > parte dei solventi mostra una regione nell'UV, sotto la quale assorbono troppo per consentire misure sul campione (λ critica).



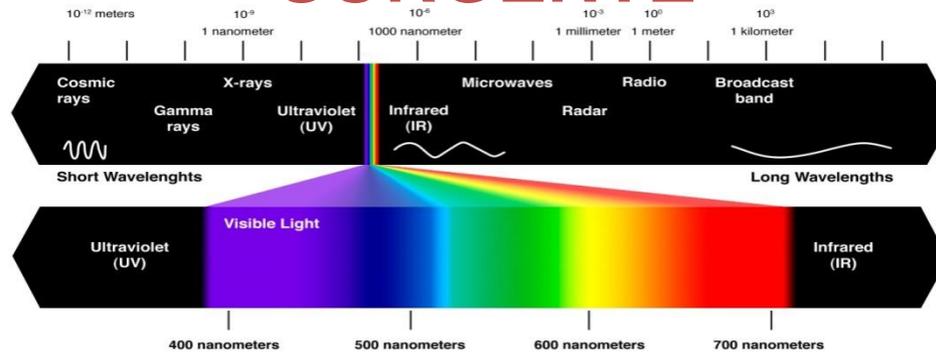
Assorbimento nell'UV

Assorbimento nell'IR

SPETTROFOTOMETRI A SINGOLO RAGGIO



SORGENTE



La sorgente luminosa è costituita da una lampada a:



- **deuterio** per la zona dell'UV
emissione: $\approx 160-375$ nm



- **tungsteno** per la regione
visibile
emissione: $\approx 350-2500$ nm

- **xenon** per entrambe le zone
emissione: $\approx 190-1100$ nm



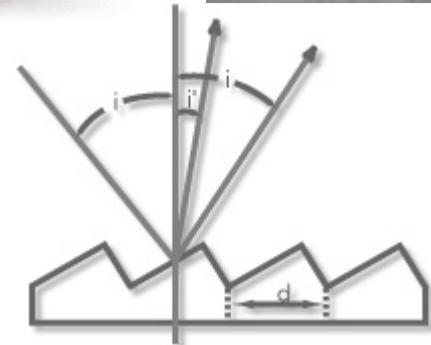
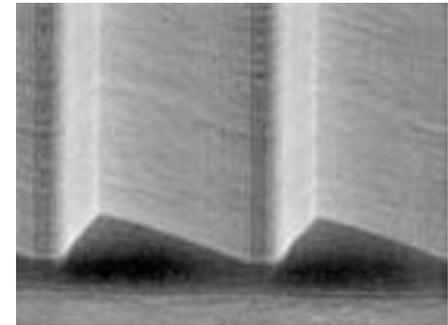
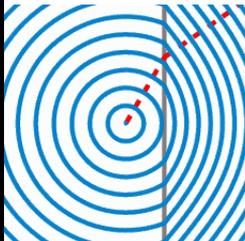
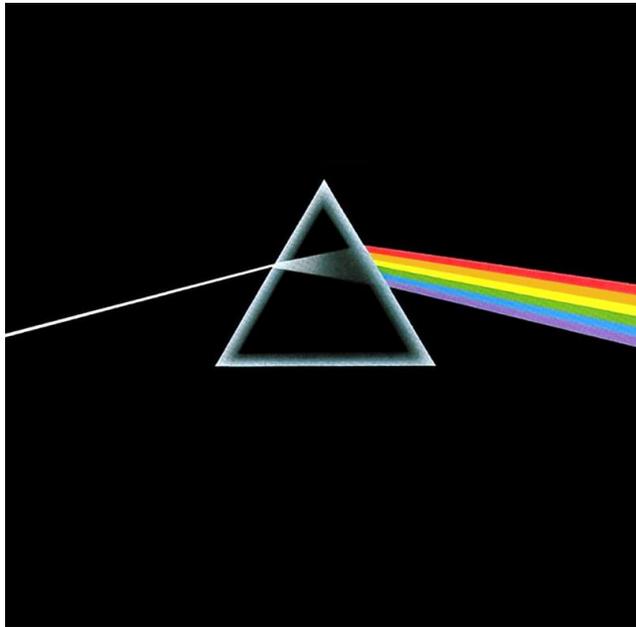
MONOCROMATORE

Il monocromatore scinde la luce nelle sue lunghezze d'onda costituenti. La λ d'interesse verrà selezionata da una fenditura successiva.

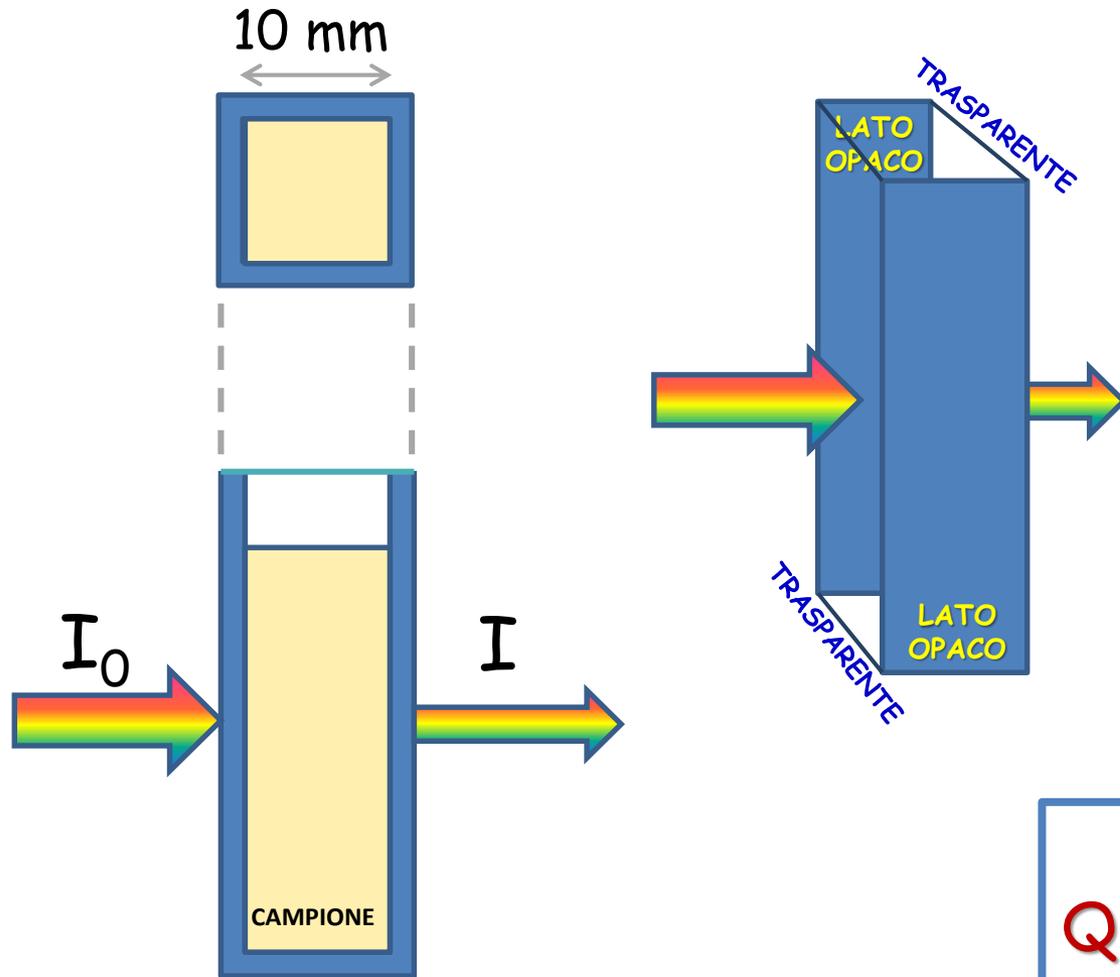
Prismi

Reticoli di:

- trasmissione
- riflessione
- diffrazione



CELLA O CUVETTA



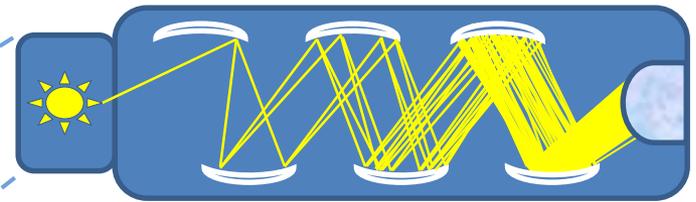
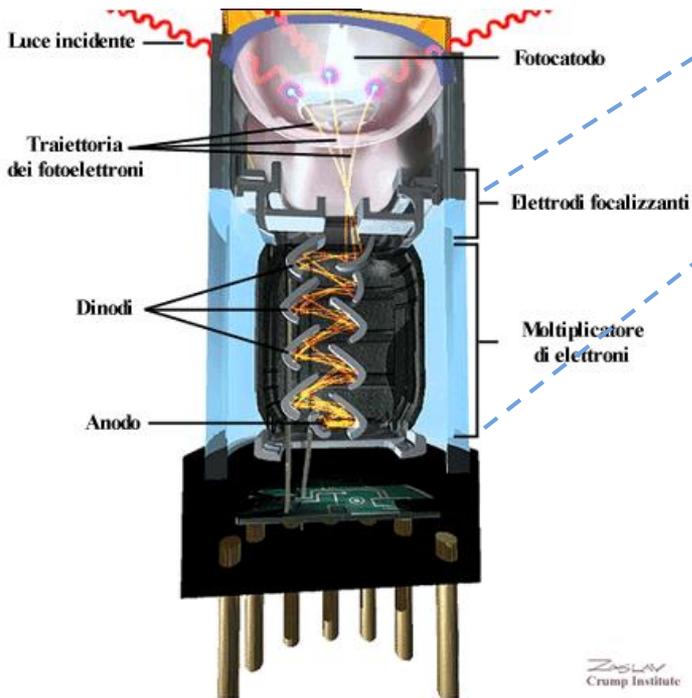
Da cosa dipende la scelta?

	TRASPARENZA
Quarzo	165-2600 nm
Std. silice	220-2500 nm
Vetro	360-1000 nm
Polistirene	360-800 nm
Metacrilato	320-800 nm

RIVELATORE

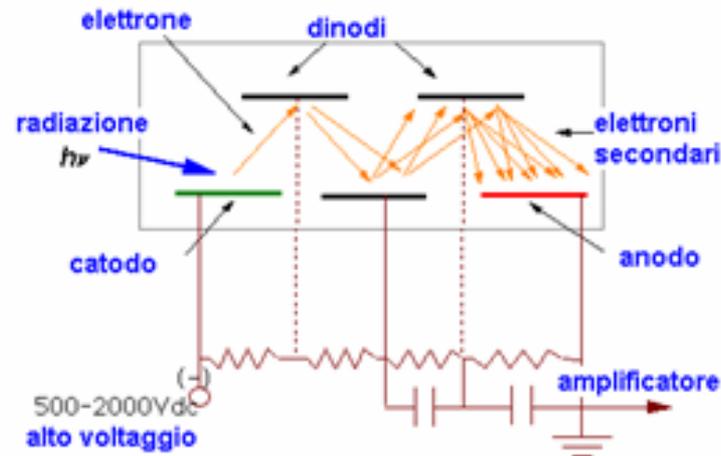
Converte l'intensità luminosa in un segnale elettrico: **effetto fotovoltaico**.

Fototubi



Fotomoltiplicatore

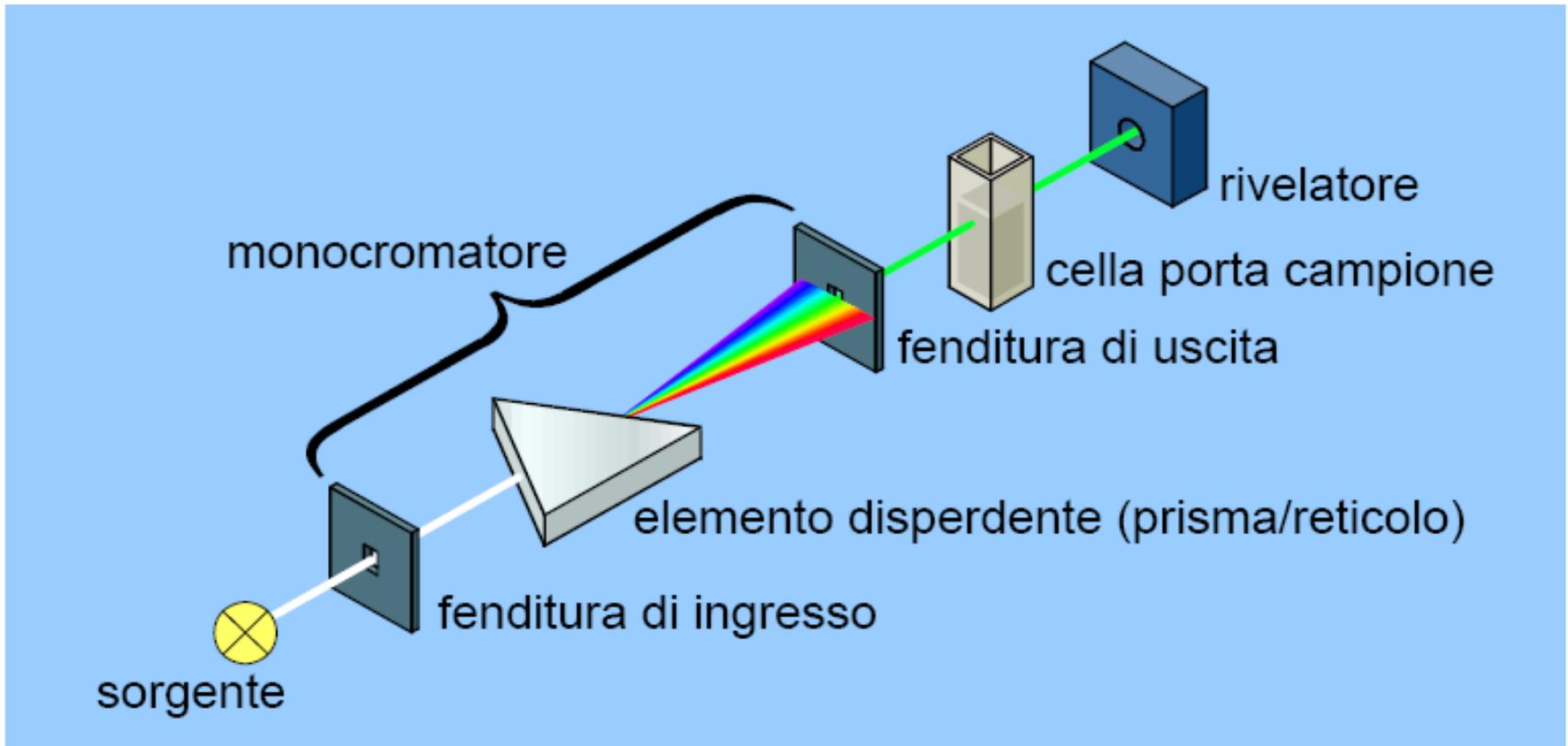
Fotodiodi



Fotocellule

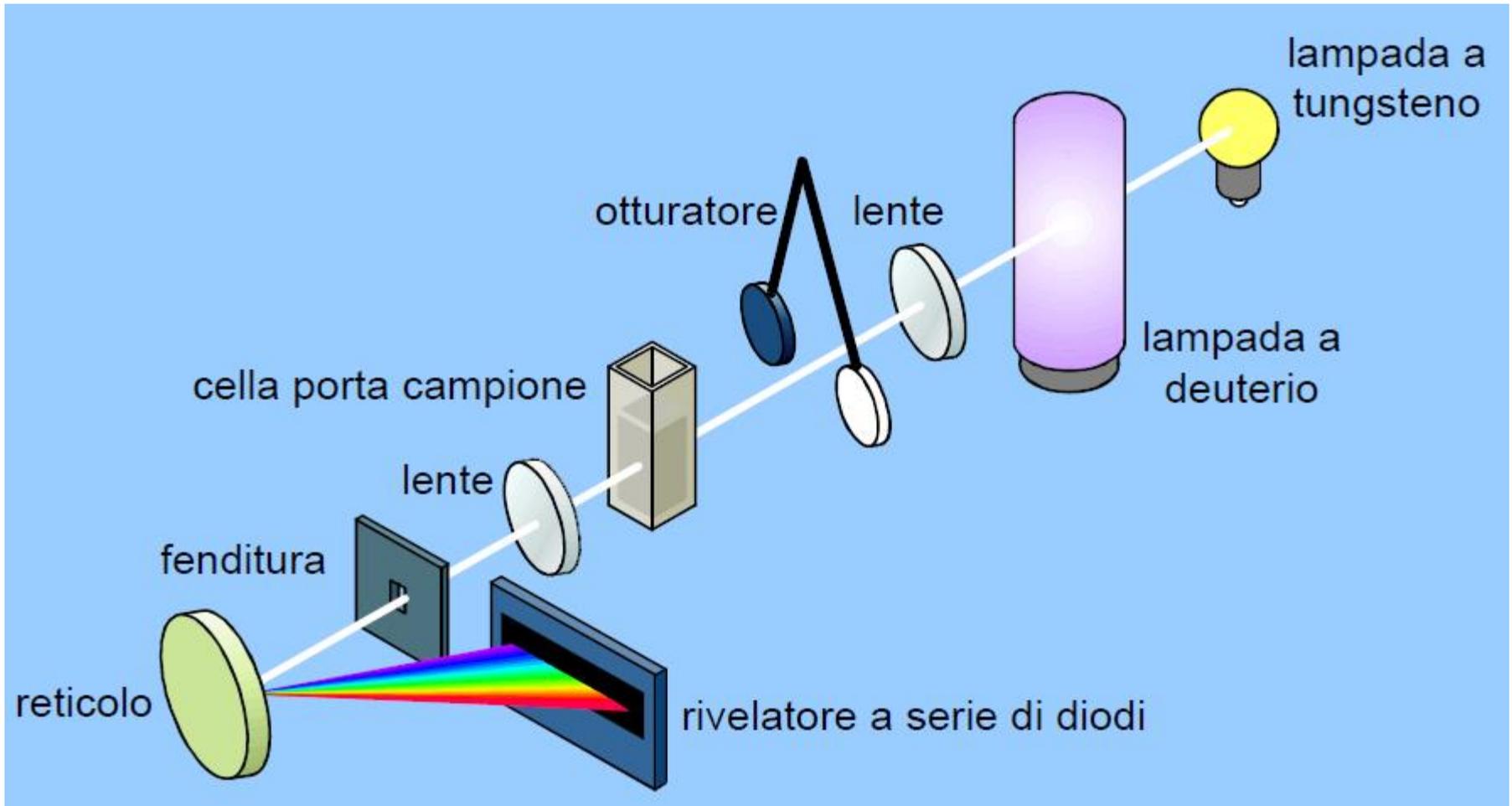


SPETTROFOTOMETRI A SINGOLO RAGGIO



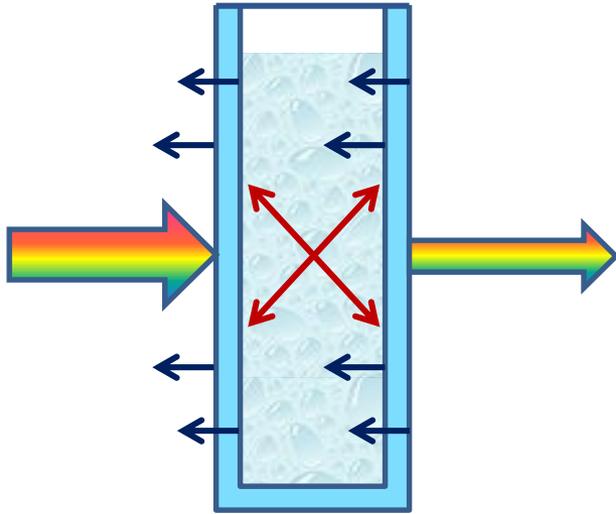
Strumento semplice ed adatto a **singole λ** ,
ma non ottimale per spettri di assorbimento.

SPETTROFOTOMETRI A SINGOLO RAGGIO A SERIE DI DIODI



Tipicamente acquisiscono l'intero spettro di una sostanza.

SPETTROFOTOMETRI A DOPPIO RAGGIO

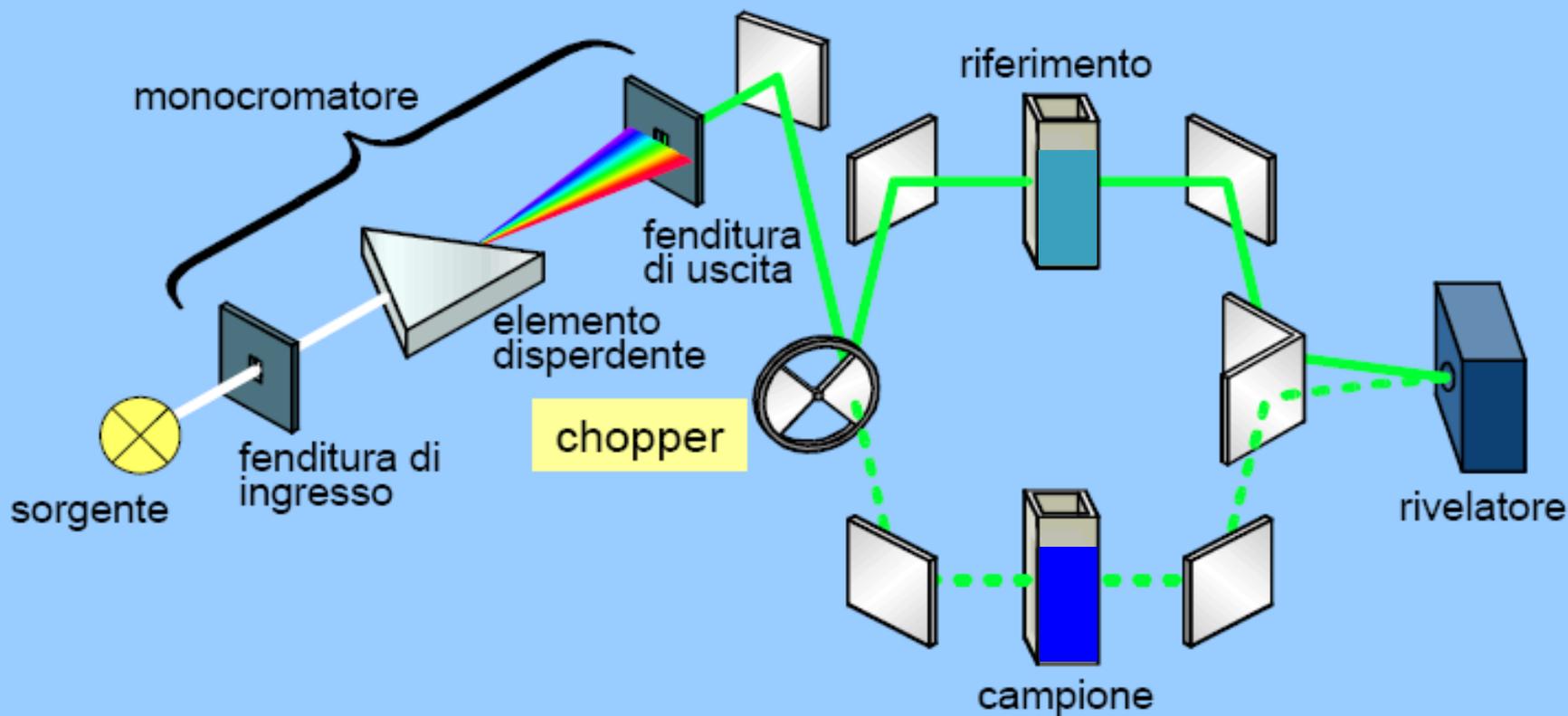


Alle due interfacce aria/parete che a quelle parete/soluzione si verifica **riflessione**.

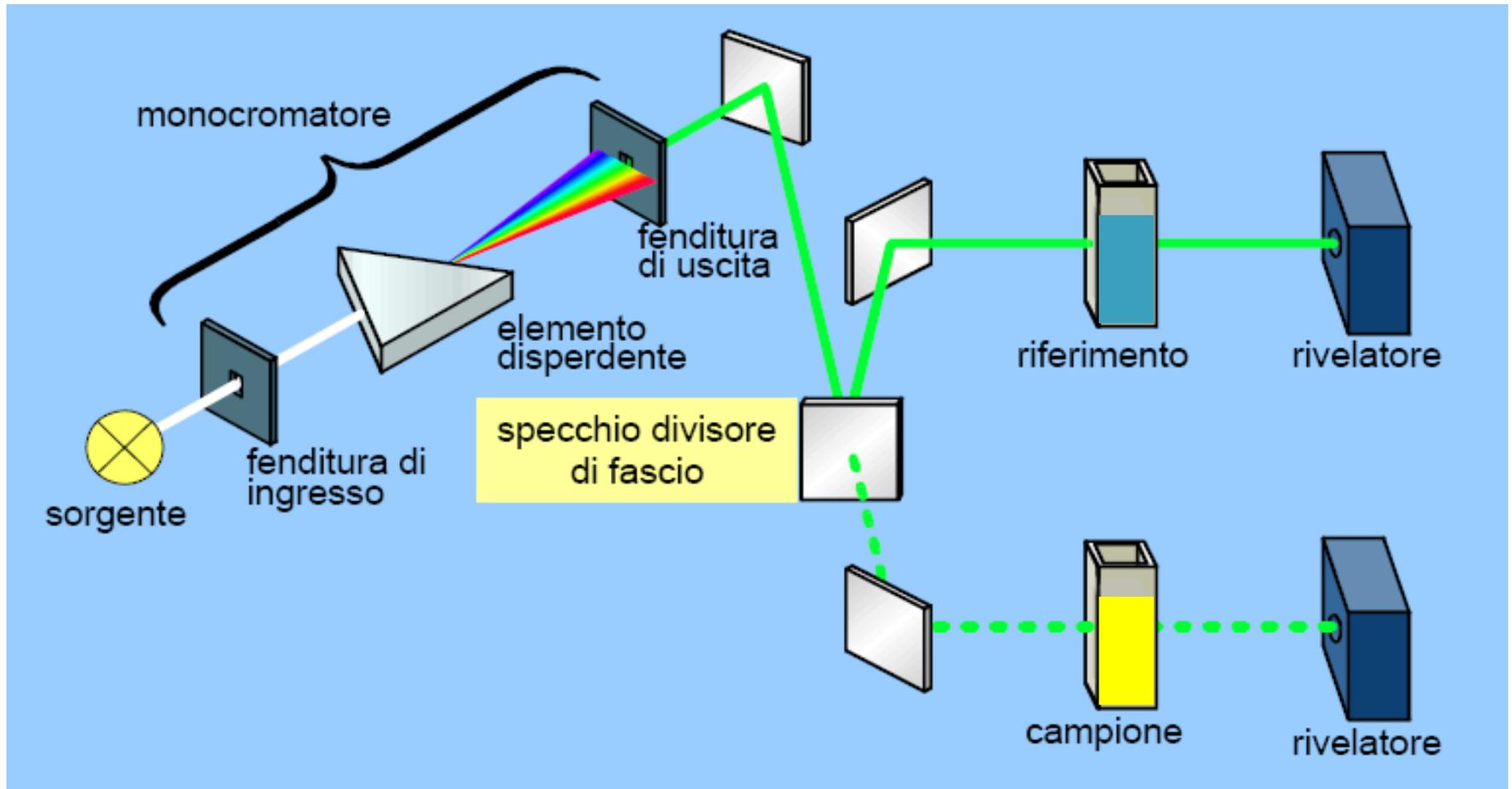
L'attenuazione del fascio è notevole e può esser anche causata da **grosse molecole** presenti in soluzione.

Per considerare tali effetti, il raggio trasmesso dalla soluzione campione viene confrontato con il fascio trasmesso da una **cella identica** contenente **solo solvente**.

SPETTROFOTOMETRI A DOPPIO RAGGIO NEL TEMPO



SPETTROFOTOMETRI A DOPPIO RAGGIO NELLO SPAZIO



SPETTROFOTOMETRI A DOPPIO RAGGIO



Tengono conto delle attenuazioni della luce per riflessione e diffusione.

In generale:



Riducono gli errori dovuti alle variazioni di emissione della lampada.

Alternativa
ai costosi
"doppio raggio"

NANODROP

Thermo
SCIENTIFIC



Analizza **microlitri** di campione (1-1,5 μL) senza costose cuvette.

Analisi in 30 secondi, perché senza la necessità di diluire i campioni.



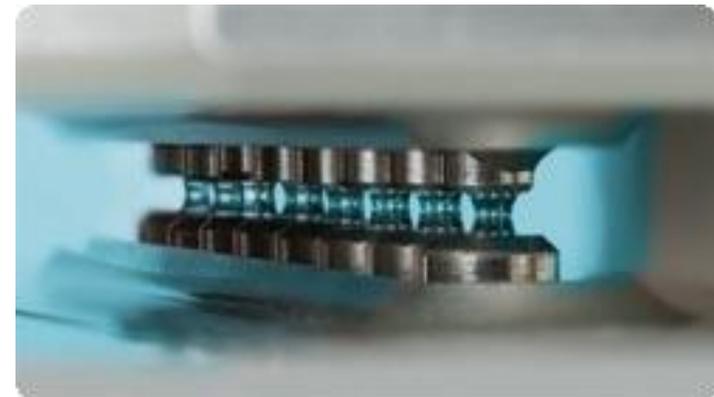
NANODROP

Thermo
SCIENTIFIC



Versione 8000, utilizzabile
anche con **micropiastre** per
analisi di 8 campioni
simultaneamente.

96 campioni in 6 minuti!



The DS-11 Spectrophotometer & FX Fluorometer Series



Fluorometer: 0.5 ml thin-walled PCR tube



Fluorometer

Microvolume: 0.5 - 1.0 ml full spectrum UV-Vis

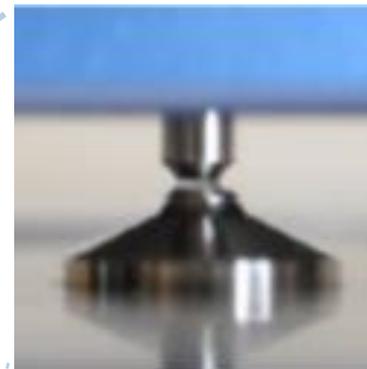


Microvolume

Cuvette: standard quartz and disposable cuvettes, full spectrum UV-Vis



Cuvette



NANOPHOTOMETER



PICCOLO E VELOCE

Stampante integrata opzionale
Memorizzazione dati via SD card, Bluetooth,

TUTTO IN UNO

Possibilità di leggere nanovolumi o di
Inserire una cuvetta standard

FACILE IMPIEGO

Tastiera e display grafico per un
immediato dialogo con l'operatore

PRONTO ALL'USO

Microprocessore e software integrati
Indipendenza da PC esterno

VOLUME ULTRA BASSO

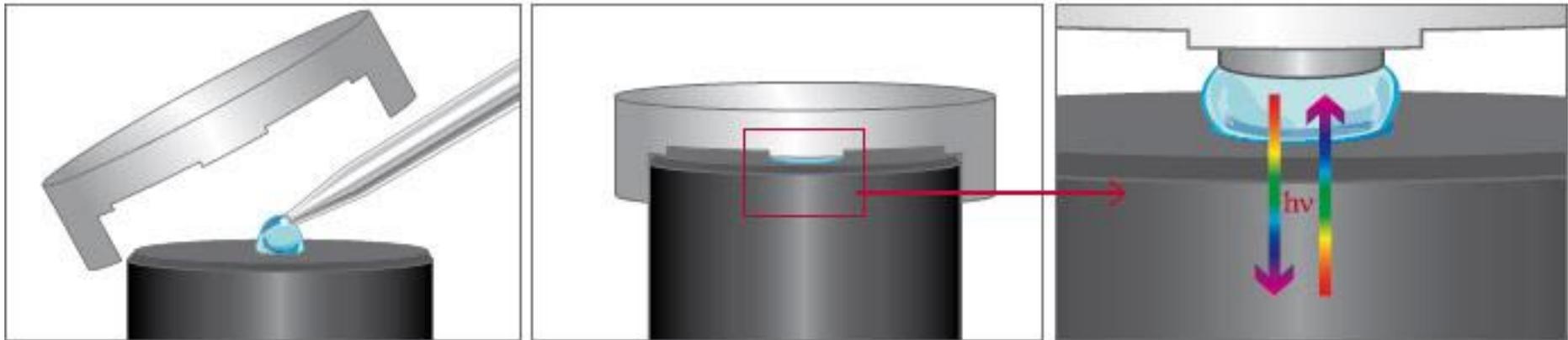
con il sistema a fibre ottiche
LabelGuard™, nessuna evaporazione
né problemi di tensione superficiale del campione

Solamente 0.3 μ l di campione!

NANOPHOTOMETER

Funzionamento e caratteristiche

SAMPLE COMPRESSION TECHNOLOGY™



DETECTION RANGE (DNA):

2 ng/μl to 18750 ng/μl

NANOPHOTOMETER

Fasi manuali

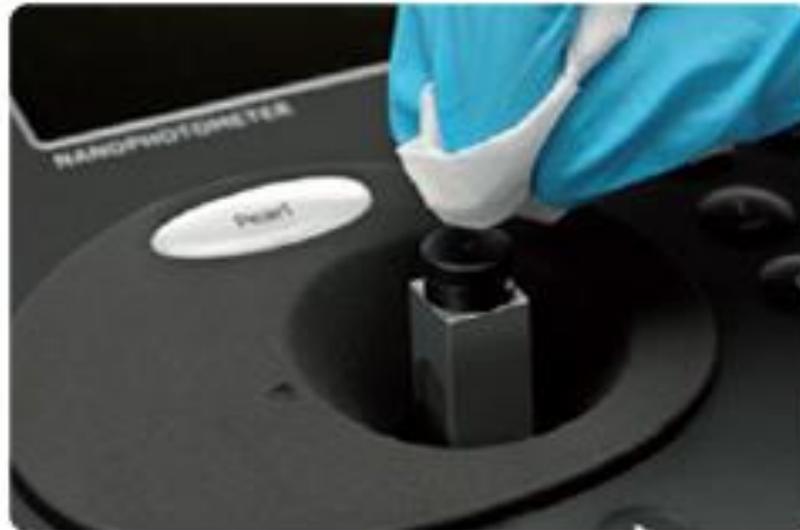
Caricamento



Chiusura



Letture e pulizia



QUANTIFICAZIONE DEI CAMPIONI

Metodi colorimetrici

VS

Determinazione
spettrofotometrica
diretta



Metodi
immunochimici

DETERMINAZIONE DELLA QUANTITA' DI PROTEINE

Metodi colorimetrici

VS

Determinazione
spettrofotometrica
diretta

TUTTI DIPENDONO DALLA
COMPOSIZIONE AMMINOACIDICA

Oggi esiste un'alternativa indipendente.

DETERMINAZIONE DELLA PROTEINE SVINCOLATA DALLA COMPOSIZIONE



SPETTROFOTOMETRO FTIR

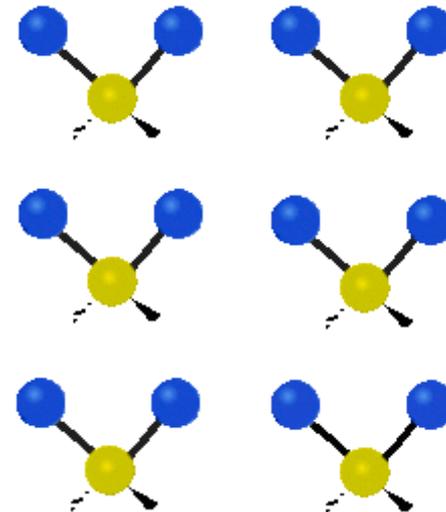
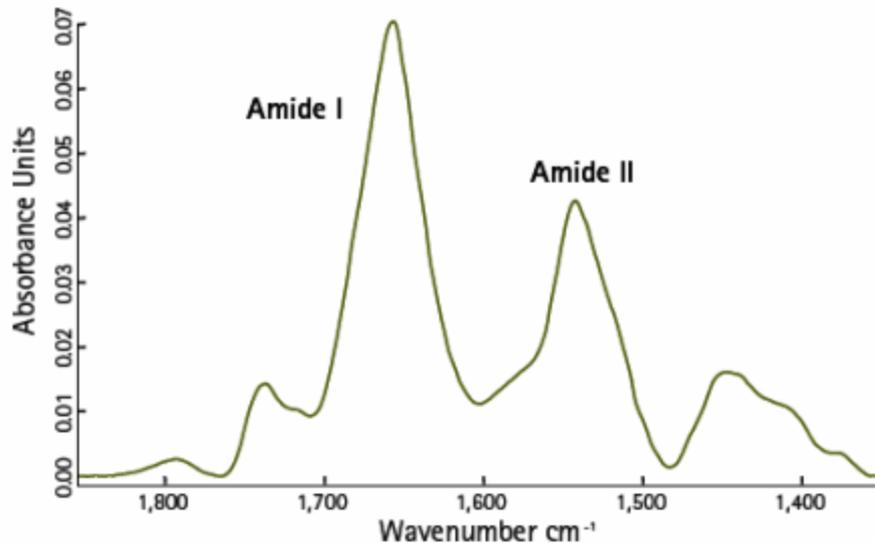
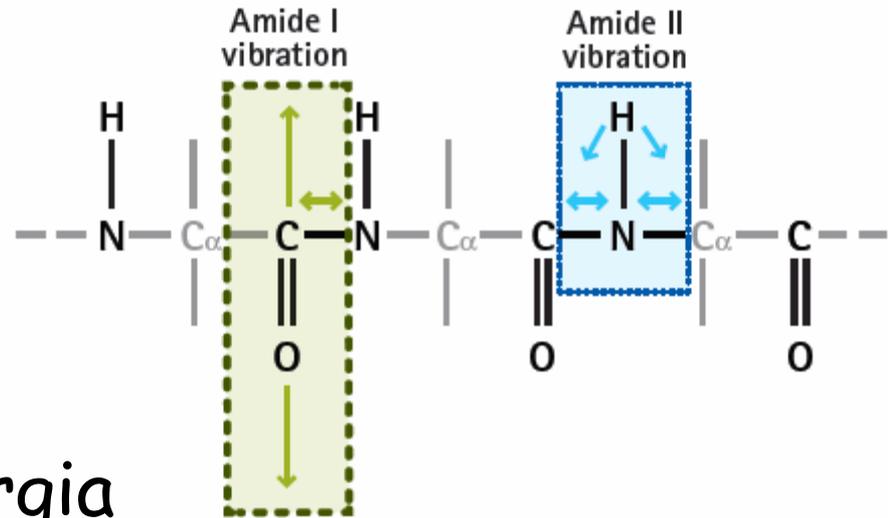


Rivelazione del **legame amidico**, mediante spettroscopia **IR**, senza interferenze.

SPETTROSCOPIA INFRAROSSA (IR)

E' una tecnica di spettrofotometria di **assorbimento**.

Gli **IR** sono a bassa energia e provocano vibrazioni all'interno delle molecole.



SPETTROFOTOMETRO FTIR

VANTAGGI OGGETTIVI

Determina una caratteristica intrinseca di **ogni** proteina. Perciò analizza anche proteine coinvolte in **complessi**, in **miscele** o **singoli peptidi**.

Non modifica il campione.

Non è influenzato dalla presenza di detergenti o altre sostanze di miscele complesse.

Adatto anche a carboidrati, **lipidi**, acidi nucleici e altre biomolecole.

Rapido e riproducibile.

SPETTROFOTOMETRO FTIR

Fasi manuali

1) CARICAMENTO.
Solo 2 μL di campione.



2) INSERIMENTO CARD.

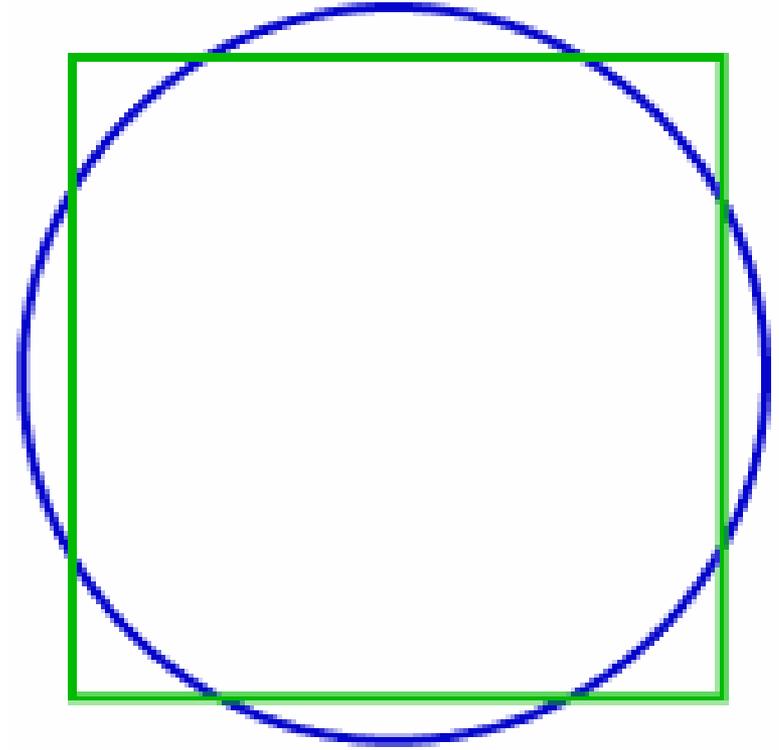
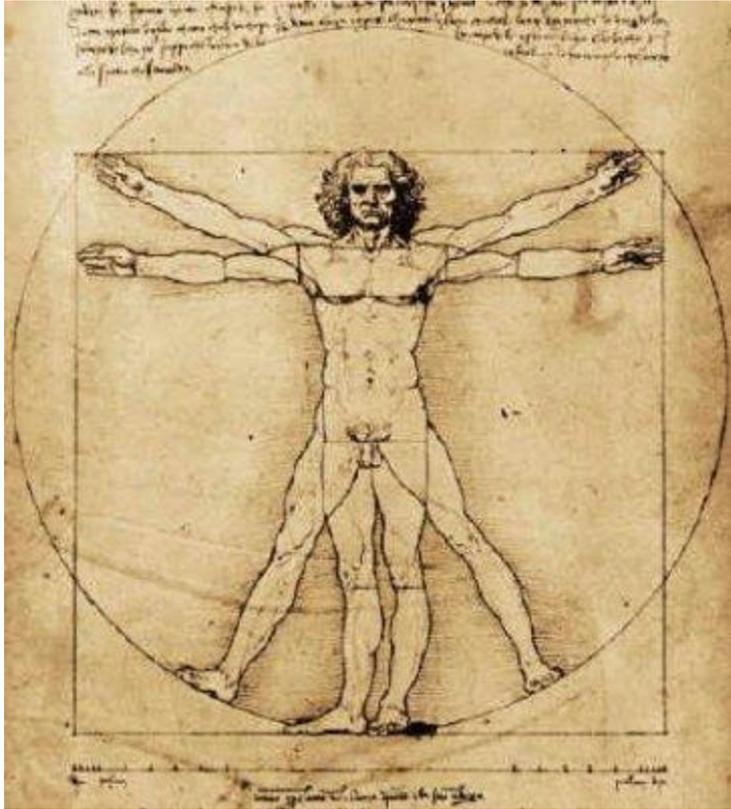


3) ANALISI, in appena 2 minuti!

Nessun
pretrattamento
del campione!

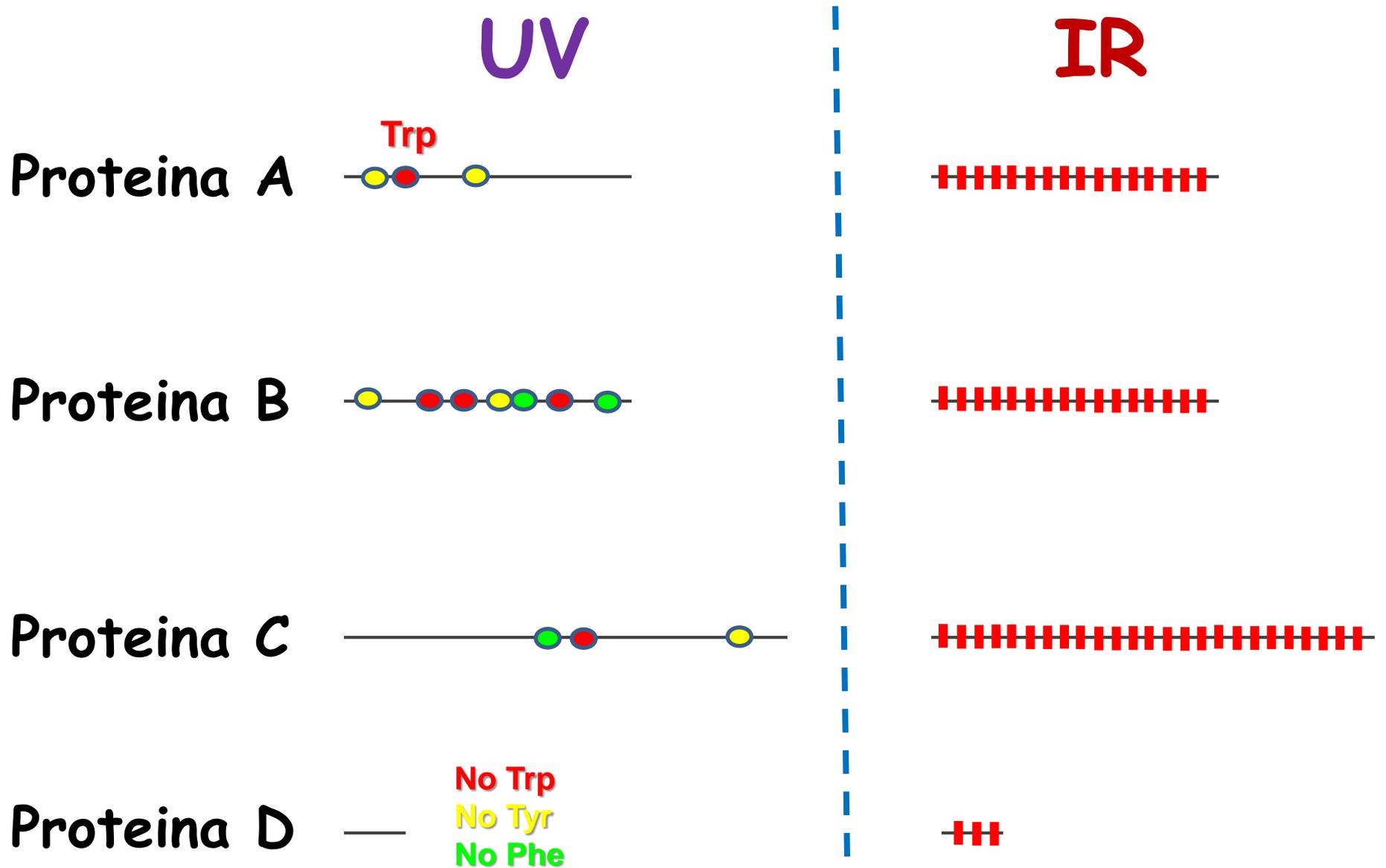


IN CONCLUSIONE...



Rivelazione accurata, indipendentemente dal tipo di **proteina** e di **soluzione**.

CONFRONTO FRA UV ED IR



DETERMINAZIONE DELLA QUANTITA' DI PROTEINE

Vi sono numerosi metodi.

Alcuni forniscono **valori relativi**, altri **assoluti**;
in tal caso lo standard esterno più comune è la **BSA**.



Metodi colorimetrici

VS



Determinazione
spettrofotometrica
diretta

COLORAZIONI PROTEICHE

Le proteine non assorbono nel visibile, è l'operatore a doverle «colorare».

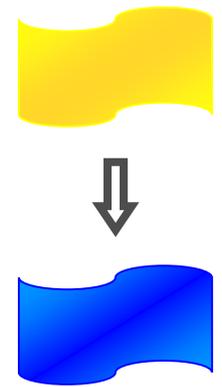
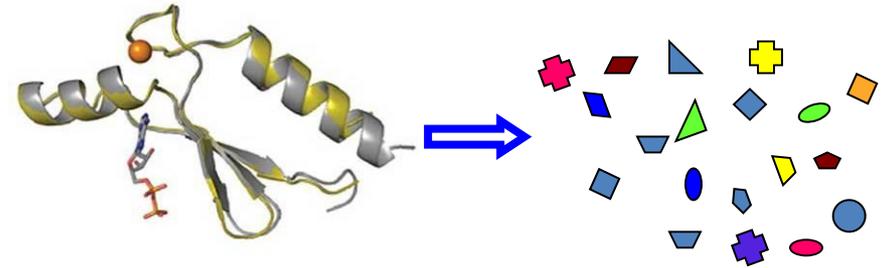


Svantaggio: il campione non si può recuperare.

COLORAZIONE DI PROTEINE IN SOLUZIONE

METODO DI LOWRY

- Idrolisi del campione con 2M NaOH a 100°C.
- Tamb + **CuSO₄** (riduzione).
- Aggiunta del reattivo di Folin, **giallo** (sali di Na⁺ degli acidi fosforico, molibbdico e tungstico).
- Viraggio al colore **blu**; dopo **30'-60'** lettura assorbimento a **660 nm**.



METODO DI LOWRY

Difetti:

- 1) **poco sensibile**; 10000 ng di proteina;
- 2) Tempo di incubazione critico per la riproducibilità.
- 3) Proteine ricche in **Tyr** sembreranno + presenti.
- 4) Molte molecole possono interferire.

Meccanismo d'azione

Formation of a complex between Cu^{2+} and protein amide (peptide) bonds in an alkaline solution causing a reduction of copper to Cu^+



Cu^+ and radical groups of **tyrosine**, tryptophan and cysteine reduce a **yellow** phosphomolybdate-phosphotungstate complex (**Folin reagent**: $\text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{Na}_2\text{WoO}_4 + \text{H}_3\text{PO}_4$) to a **deep blue color**



(F-C) = phospho-Mo-Tungstate acid

COLORAZIONI DI PROTEINE SU GEL

PONCEAU S

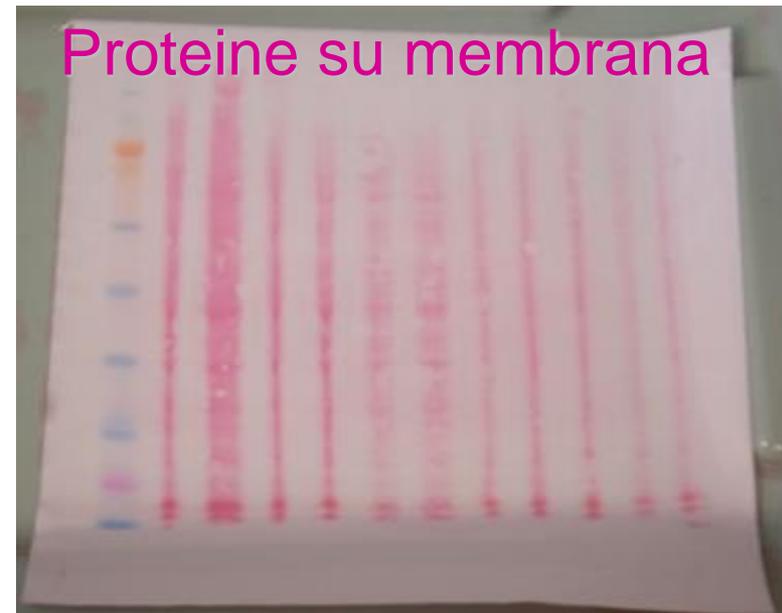
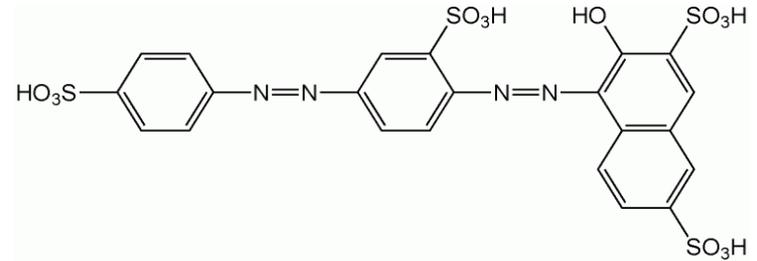
Si lega ai **gruppi basici** degli aa.

Produce un vivido color **rosso**.

Colorazione semplice, **reversibile**, molto rapida ed economica. Frequente uso su nitrocellulosa.

Sensibilità superiore al **metodo Lowry**, fino a 50 ng di proteina.

Pochi secondi di incubazione, poi rimozione con tampone o H₂O distillata.



COLORAZIONI DI PROTEINE SU GEL

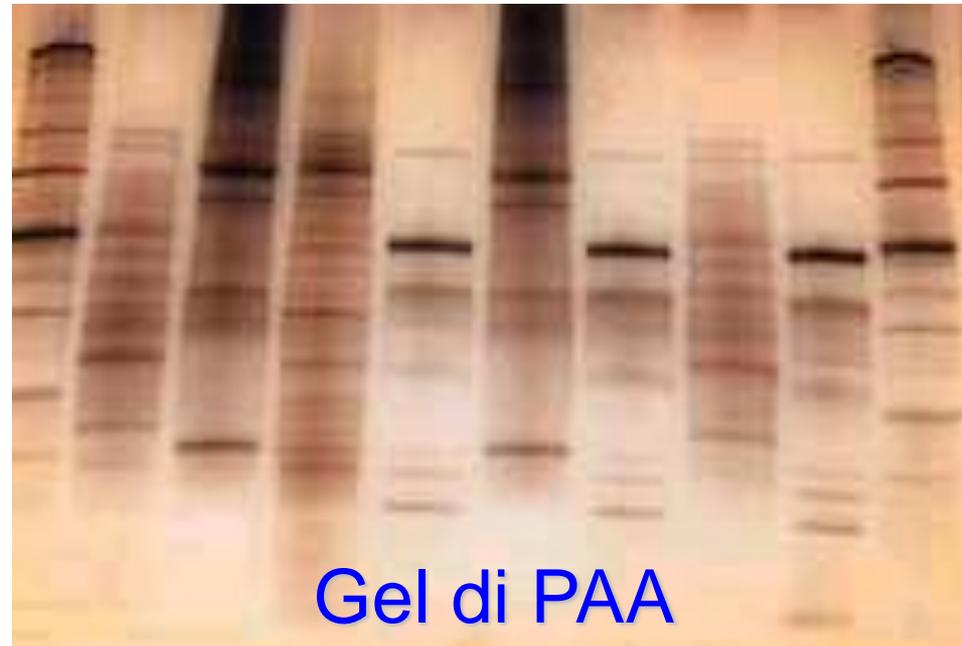
COLORAZIONE ARGENTICA

Sensibilità 1 - 0.5 ng di proteina.

Presenza nel colorante di **ioni Ag^+** che reagiscono in presenza di formaldeide con i **gruppi -SH** delle proteine.

Si forma Ag metallico ben visibile.

- **Costoso**
- Risposta **non** lineare.



COLORAZIONI DI PROTEINE SU GEL

BLUE COOMASSIE

Sensibilità 50-200 ng di proteina.

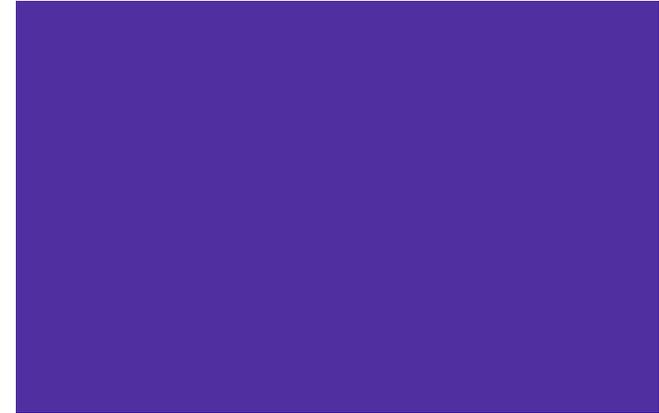
Usato tipicamente su gel.

- Colorante anionico + H₂O + acido acetico e metanolo.
- Per **decolorare** H₂O + etanolo.

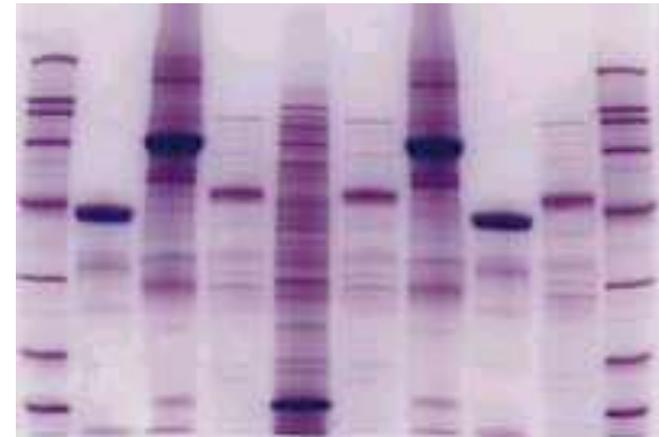
Pregi: facilità, rapidità, stabilità.

Difetti: metodo condizionato dalla presenza di **residui basici**.

Colorazione



Decolorazione



PROBLEMA: E LE PROTEINE IN SOLUZIONE?

COLORAZIONE DI PROTEINE IN SOLUZIONE

METODO BRADFORD (1976)

Si basa sul legame del **coomassie G-250** alle proteine.

Utilizzabile **su micropiastra** e solo su peptidi superiori a 3 kDa.

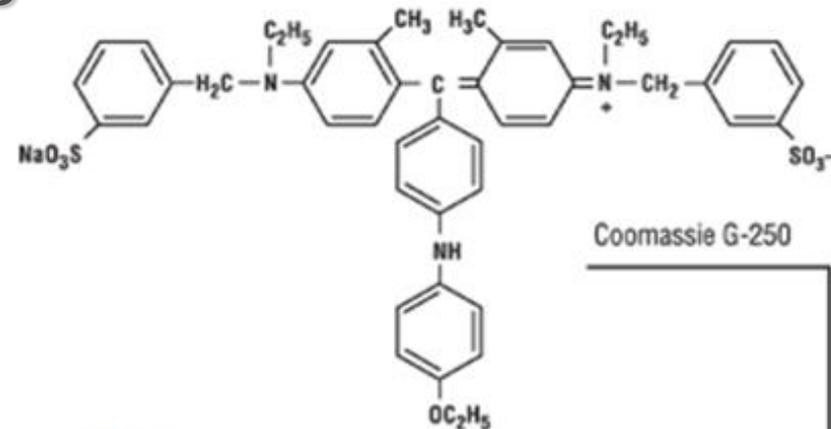
Veloce, facile e sensibile.

Compatibile con moltissimi sali, buffers, chelanti...tranne alcuni **detergenti**.

Proteine

con catene laterali basiche

+



Coomassie G-250



$A_{\max} : 465 \text{ nm} \rightarrow 595 \text{ nm}$

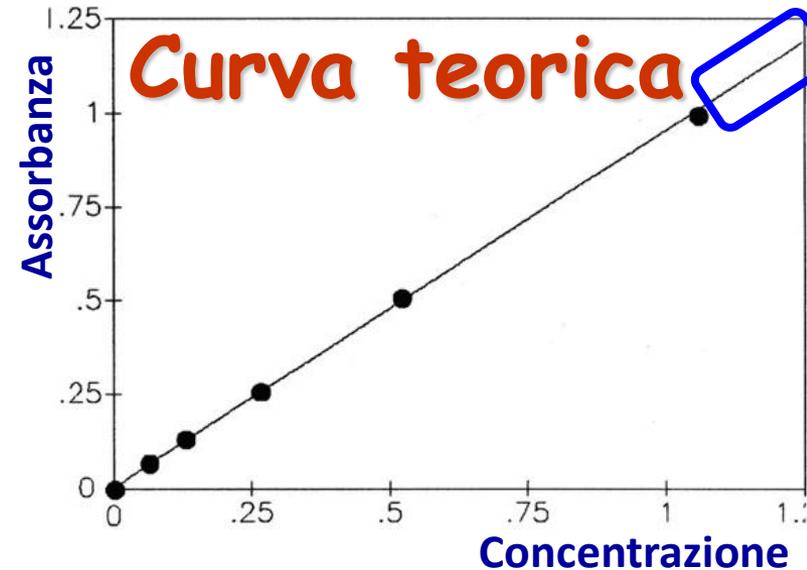
Protein-Dye Complex

CURVA DI TARATURA

Occorrono **numerosi punti** di misurazione, almeno 4-5 e misure ripetute in doppio o triplo.



Concentrazione

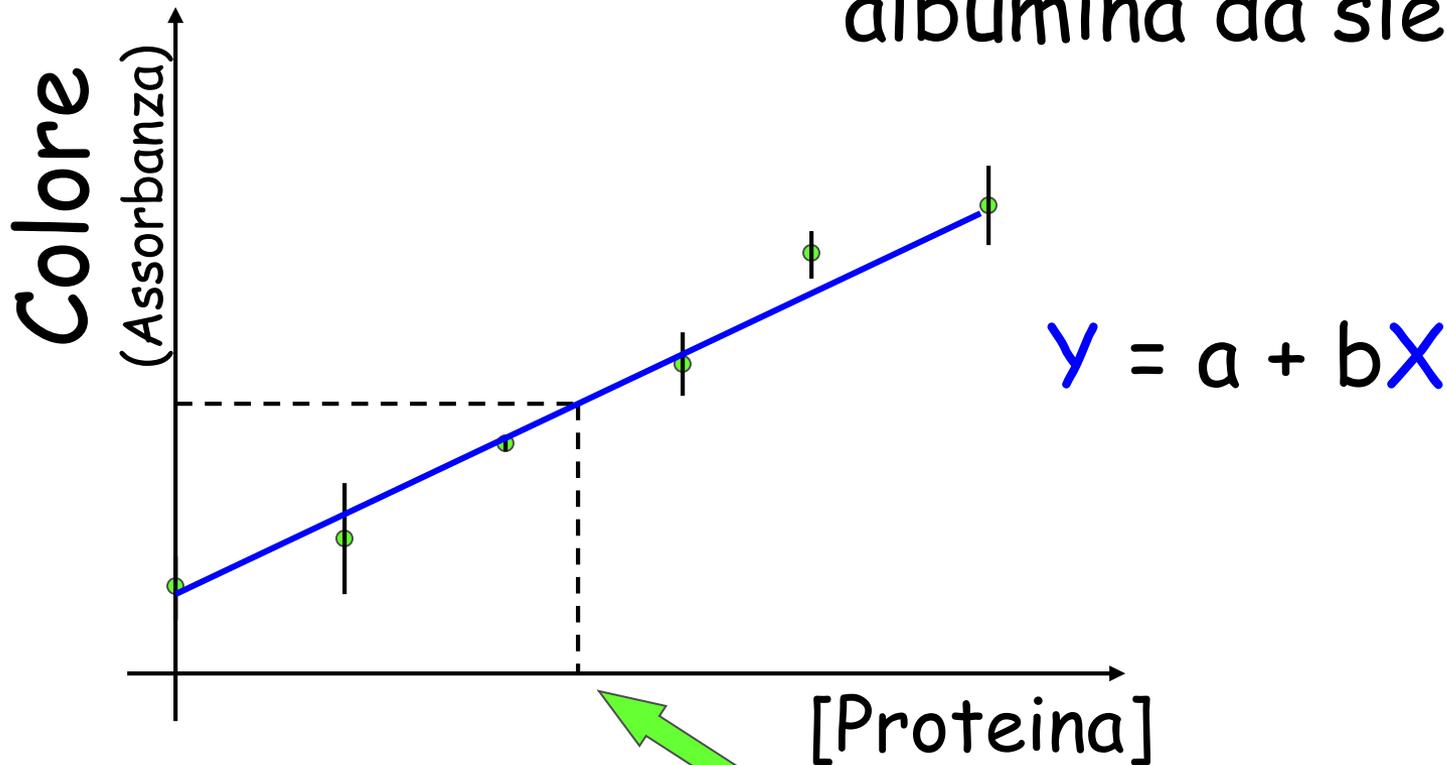


Il "**bianco**" deve contenere tutti i reagenti, tranne la sostanza da determinare.

Non si deve **estrapolare** la curva oltre il valore più alto determinato.

DETERMINAZIONE DELLA QUANTITA' DI PROTEINE

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



$$X = \frac{y - a}{b}$$