

Dosaggio Proteine Totali

Analisi quantitative

Diversi metodi per la quantificazione delle proteine totali (*reazioni generali delle proteine*):

1. Dosaggio spettrofotometrico diretto
2. Metodi colorimetrici

1. Dosaggio spettrofotometrico diretto

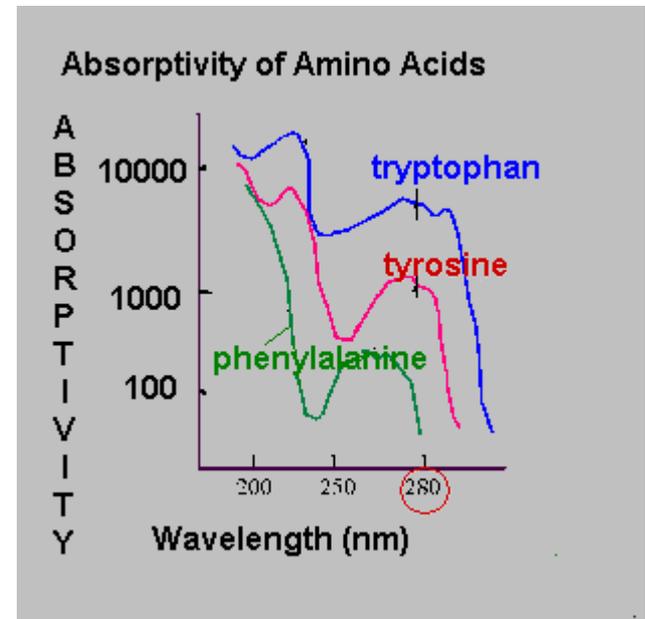
Metodo più semplice e più vantaggioso: permette il riutilizzo del campione esaminato.

Determinazione dell'*assorbanza a 280 nm* (amminoacidi aromatici). L'assorbimento varia in base alla composizione in aa della proteina.

$$\text{mg proteine/ml} = 1,55 * A_{280} - 0,76 * A_{260}$$

A_{260} = assorbanza a 260 nm, dovuta agli acidi nucleici

Svantaggio: limitazione di specificità e precisione.



2. Metodi colorimetrici

Basati sulla formazione di complessi colorati di proteine con alcuni reattivi.

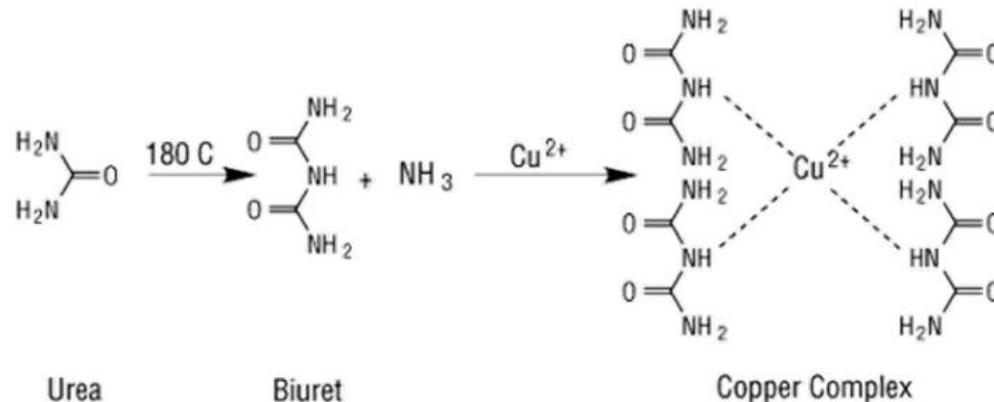
Principali metodi:

- a) **Metodo del Biureto**
- b) **Metodo di Lowry**
- c) **Metodo di Bradford (o del Blue Coomassie)**
- d) **Metodo dell'Acido Bicinconinico**

a) *Metodo del Biureto*

Aggiungendo alla soluzione proteica una soluzione rameica in ambiente basico, si ottiene una colorazione viola-porpora con un max assorbimento a 540 nm.

Dovuto alla formazione di un complesso tetra-coordinato del rame con legami peptidici (es. biureto, peptidi e proteine).



Vantaggi

1. Rapido e semplice.
2. Deviazioni del colore meno frequenti rispetto al metodo di Lowry, assorbimento UV e metodi turbidimetrici.
3. Poche sostanze di natura non proteica interferiscono con il dosaggio.
4. Non dosa l'azoto da sorgenti non proteiche o non peptidiche.

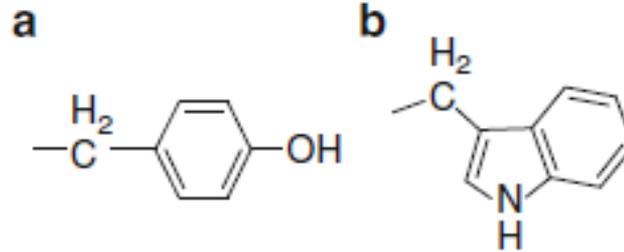
Svantaggi

1. Poco sensibile (almeno 2-4 mg di proteine per saggio).
2. Alte concentrazioni di sali d'ammonio interferiscono con il dosaggio.
3. Il colore può variare a seconda delle proteine (la gelatina dà una reazione rosa-porpora).
4. La soluzione può essere opalescente a causa di alto contenuto di lipidi e carboidrati.
5. Non è un metodo assoluto: necessaria una curva di taratura (e.g. con BSA).

b) Metodo di Lowry

Combina la reazione del biureto con la riduzione del reattivo fosfomolibdico-fosfotungstico per i fenoli, il **reattivo di Folin-Ciocalteu**.

Il reattivo di Folin reagisce con la tirosina e il triptofano delle proteine con un colore blu (750 nm) per la formazione di blu di tungsteno e blu di molibdeno grazie alla riduzione operata dal complesso rame-proteina.



a -Tirosina

b - Triptofano

Vantaggi

1. Molto sensibile: 50 -100 volte più sensibile del biureto; 10-20 volte più sensibile dell'assorbimento UV.
2. Meno sensibile alla torbidità del campione.
3. Più specifico di altri metodi.
4. Semplice (1-1,5 ore per il dosaggio).

Svantaggi

1. Il colore può variare a seconda della proteina maggiormente rispetto al biureto.
2. Il colore non è strettamente proporzionale alla concentrazione proteica.
3. Diverse sostanze interferiscono (saccarosio, lipidi, fosfati, monosaccaridi).
4. Alte concentrazioni di zuccheri riducenti, solfato d'ammonio, e composti sulfidrilici interferiscono con la reazione.

c) Metodo dell'Acido Bicinconinico

Proteine e peptidi riducono gli ioni rameici a rameosi in ambiente basico.

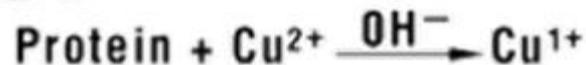
Gli ioni rameosi reagiscono con il reagente di Acido Bicinconinico (BCA), per formare un complesso viola-porpora (1 ione rameoso chelato da 2 molecole di BCA).

Il colore viene misurato alla lunghezza d'onda di 562 nm, ed è lineare con la concentrazione proteica da microgrammi fino a 2 mg/ml.

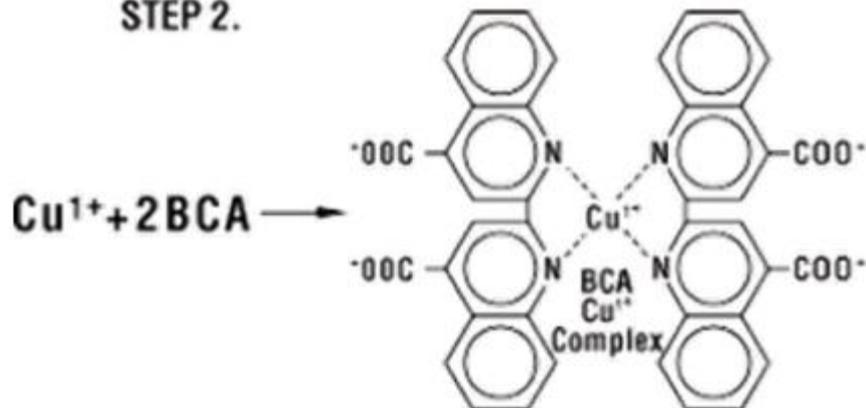
Contribuiscono al colore legami peptidici, cisteina, cistina, triptofano, tirosina.

NB. La reazione avviene per 30 minuti a 37°C, 15 minuti a 60°C o 2 ore a RT.

STEP 1.



STEP 2.



Vantaggi

1. Sensibilità compatibile o maggiore (micro-metodo, 0.5-10 µg di proteina) del Lowry.
2. Reazione in un unico passaggio, più semplice del Lowry.
3. Il reagente è più stabile del reagente di Lowry.
4. Detergenti non ionici e tamponi non interferiscono con il dosaggio.
5. Concentrazioni medie di reagenti denaturanti (Urea e Cloruro di Guanidinio) non interferiscono.

Svantaggi

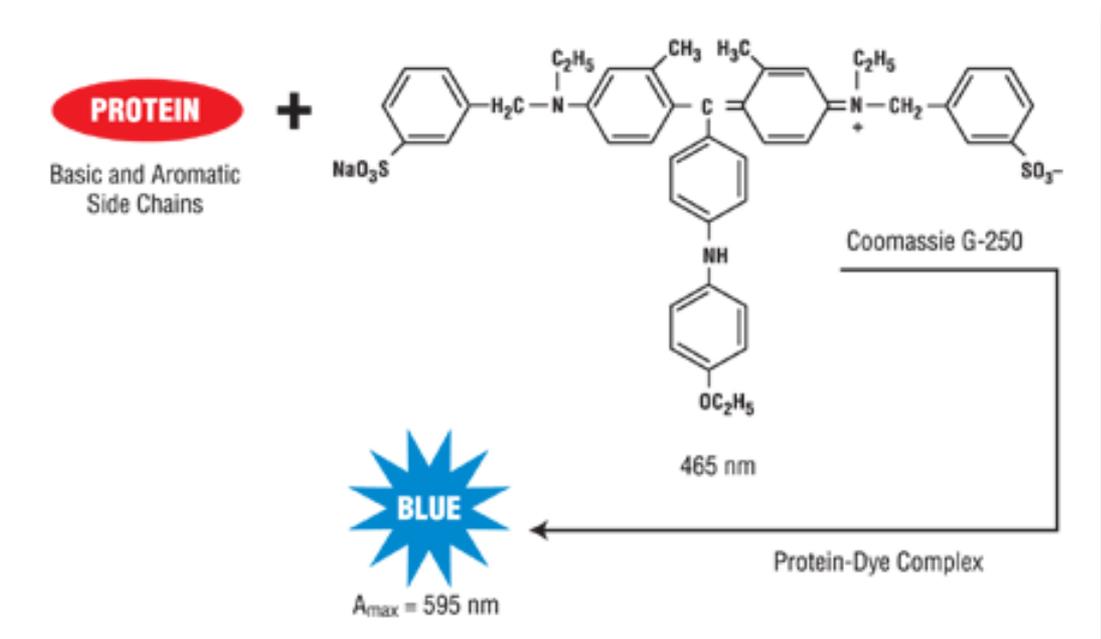
1. Il colore non è stabile nel tempo.
2. Ogni composto capace di ridurre Cu^{2+} a Cu^{+} formerà colore.
3. Gli zuccheri riducenti interferiscono maggiormente rispetto al Lowry.
4. Variazioni nella colorazione tra le proteine simile al metodo di Lowry.

d) Metodo di Bradford (o del Blue Coomassie)

Sfrutta l'uso di un colorante, il Coomassie Brilliant Blue G250.

Il legame del colorante *Coomassie Brilliant Blue* G-250 alle proteine determina uno spostamento del massimo di assorbimento del colorante da 465 nm (rosso) a 595 nm (blu) in soluzioni acide (Bradford, 1976)

Formazione di complessi non covalenti con le proteine tramite interazioni elettrostatiche con amminoacidi basici (positivi) ed interazioni idrofobiche con amminoacidi aromatici



VANTAGGI DEL METODO

- ❑ Semplicità di preparazione del reattivo
- ❑ Sviluppo del colore immediato
- ❑ Stabilità del complesso
- ❑ Elevata sensibilità (fino a 22 µg/ml)
- ❑ Il saggio è compatibile con la maggior parte dei tamponi comuni, degli agenti denaturanti e dei preservanti

SVANTAGGI

- ❑ La quantità di colorante che si lega alla proteina dipende dal contenuto in aminoacidi basici → ciò rende difficile la scelta di uno *standard*
- ❑ Molte proteine non sono solubili nella miscela di reazione acida
- ❑ I detergenti possono causare interferenza con il dosaggio

Calcolo della concentrazione proteica nei campioni di lisato di linfociti

<>	6	7	8	9
A	0,224800006	0,2296	0,6452	0,6439
B	0,360100001	0,3578	0,4739	0,4754
C	0,424699992	0,4292	0,6405	0,6439
D	0,480500013	0,4736	0,4978	0,4889
E	0,530099988	0,5354	0,6872	0,6626
F	0,565100014	0,5866	0,5324	0,5183
G	0,629299998	0,6616		
H	0,701799989	0,7008		

Dual wavelength measurement with reference wavelength

<>	6	7	8	9
A	0,416299999	0,4333	0,2789	0,2835
B	0,385899991	0,3754	0,3465	0,3364
C	0,357800007	0,3574	0,2813	0,2814
D	0,345499992	0,3394	0,3441	0,3424
E	0,33070001	0,3265	0,2657	0,2691
F	0,307999998	0,3108	0,3377	0,322
G	0,287999988	0,2943		
H	0,272399992	0,2741		

rapporto letture

BSA (ug/ml)	595/450	media	netti
0	0,539995	0,529887	0,534941
20	0,933143	0,953117	0,94313
30	1,186976	1,200895	1,193936
40	1,390738	1,395404	1,393071
50	1,602963	1,639816	1,62139
60	1,83474	1,887387	1,861064
80	2,18507	2,248046	2,216558
100	2,576358	2,556731	2,566545

retta taratura BSA

OD 595/OD 450

µg/ml

$y = 0,021x$
 $R^2 = 0,9941$

Campioni	595/450	media	netti	mg/ml
C1 20x	2,313374	2,271252	2,292313	1,757372
C1 40x	1,367677	1,413199	1,390438	0,855497
C2 20x	2,276929	2,288202	2,282565	1,747624
C2 40x	1,446672	1,427862	1,437267	0,902326
C3 20x	2,586376	2,462282	2,524329	1,989387
C3 40x	1,576547	1,609627	1,593087	1,058146