

# Purificazione delle proteine

---

## Isolamento proteina ed eliminazione di altri componenti

Si tratta di una procedura alquanto complessa (soprattutto all'inizio), anche se oggi i protocolli per mettono in maniera semplice e standardizzata permettono di purificare una proteina con un buon grado di purezza.

*Perché purificare le cellule?*

- Per capire cosa accade in una cellula
  - Attribuzione attività biologica
  - Relazione struttura/funzione delle proteine
  - Ricostruzione attività metaboliche
- Per capire alterazioni del metabolismo e/o dei processi di regolazione
  - Determinare correlazione proteine/enzimi alterati e manifestazione patologie
- *Rational design* di farmaci
  - Predizione potenzialità agenti farmacologici da analisi della struttura 3D
- Altre ragioni
  - Agenti terapeutici
  - Nella ricerca scientifica e biotecnologica (reagenti, enzimi, substrati)

Con la cromatografia possiamo purificare le proteine ricombinanti, se ha un tag -> in pochissimi passaggi isolo e purifico una proteina

Per le proteine ricombinanti è un po' più complesso.

Fasi:

1. **Estrazione** della proteina **dalla fase biologica** -> ottengo un **estratto**, dalla fonte biologica scelta, che va mantenuto in forma solubile
2. **Frazionamento** -> bisogna eliminare le altre proteine e molecole che appartengono alla fase biologica -> pian piano si dovrebbe ottenere una fase sempre più arricchita esclusivamente della proteina scelta
3. Si dovrebbe così raggiungere un **elevato grado di purezza** mediante tecniche ad elevato potere risolutivo (**purezza del 80-90%**) e con buona resa

Per ottenere una purezza maggiore (>90%), si utilizzano tecniche che hanno un altissimo potere risolutiva ma che solitamente hanno una resa molto più bassa. Un grado di purezza elevato (ma una bassa resa servono per capire), ad esempio, la struttura di una proteina.

### **Il grado di purezza dipende dalla tecnica applicata.**

Durante una purificazione bisogna tener conto della **localizzazione della proteina**, nel caso questo dato sia noto! Ad esempio sapere se una proteina è *extracellulare* o *intercellulare* (in questo seconda caso bisogna rompere e omogenare la cellula infatti), oppure sapere se si trova dentro un organello o se è una proteina di membrana (in questo secondo caso serviranno dei solventi organici o dei detergenti).

In generale, **prima di procedere con la purificazione di una proteina bisogna cercare qualsiasi informazione nota su di essa.**

Conoscere le **caratteristiche fisiche** (pH, calore...) e **biologiche** (interazioni con altre proteine) aiuta a scegliere la tecnica di purificazione più adatta per una determinata proteina.

**Caratteristiche fisiche** che si possono usare per separare le proteine:

- Punto isoelettrico
- Diversa resistenza al calore
- Conosce anche le caratteristiche delle proteine NON di interesse

Anche le caratteristiche biologiche sono importanti (ovvero le interazioni, per esempio la necessità di enzimi o cofattori) per scegliere le procedure

**Estratto grezzo**: tecnica che si usa NON SOLO per la purificazione delle proteine

Preparazione di un estratto grezzo: la tecnica viene scelta sulla base della **localizzazione** della proteina (se nota) e si considera anche la fonte biologica da cui si parte.

Consideriamo una proteina ricombinante: contiene dei *tag* o dei segnali di secrezione-> proteina viene secreta

**Purificazione proteina secreta nel medium**:

- Centrifugazione sospensione cellulare

- Conservare il *surnatante* (**estrazione selettiva** quando si parte da un surnatante che contiene principalmente la proteina di interesse se si considera una proteina ricombinante over-espressa)

La **localizzazione subcellulare** della proteina serve a **trovare una metodica che estrarre selettivamente la proteina di interesse.**

### **Proteina citoplasmatica:**

1. **Rottura delle cellule e omogeneizzazione dei tessuti:** si tratta di una fase molto critica perché si influisce sulla stabilità ed integrità della proteina: bisogna cercare di mantenere al massimo questi due fattori.

### **Fattori che influenzano la stabilità della proteina:**

- **Minimizzazione T:** cercare di evitare il surriscaldamento del campione -> T il più bassa possibile (solitamente si lavora in ghiaccio)
- **Forza ionica** -> solitamente si aggiungono al tampone sacarosio, **KCl** o **NaCl** per mantenere la corretta osmolarità (altrimenti avviene la lisi di organelli -> può causare proteolisi!)
- **Proteolisi** -> si aggiungono alla soluzione inibitori di proteasi per minimizzare la proteolisi
- **Ossidazione** -> si aggiungono agenti riducenti per evitare l'oxi delle proteine a seguito della rottura della cellula. Ad esempio si usano EDTA e EGTA: agenti chelanti che chelano i metalli e inibiscono le *metallo proteasi*
- **Cofattori** -> per garantire la stabilità della proteina
- **Condizioni di conservazione** -> molto importante! Solitamente a T di -20/-80 se la proteina resiste al processo di congelamento/scongelamento (talvolta non resistono)

### **Metodi di rottura tessuti cellulari:**

Le varie cellule e i vari tessuti hanno caratteristiche differenti che si devono tenere in considerazione nella scelta dei metodi di rottura da utilizzare.

#### **1. Meccanici:**

1. **Estrusione fisica a pressione elevata:** usata per cellule microbiche (batteri, lieviti). Ad esempio: *French press*

2. **Omogeneizzatori a mescolamento:** frulla i tessuti o le cellule -> si ottiene un omogenato del tessuto o cellula. Ad esempio: Ultra-turrax (per tessuti resistenti, ad ex muscolare) e Dounce/Potter (per tessuti molli come il cervello o cellule di mammifero)
3. **Ultrasuoni:** è in grado di compiere una lisi attraverso suoni ad alta frequenza che disgregano la cellula o il tessuto. È il metodo che sviluppa più calore, tra tutti. Ad esempio: sonicatore a sonda (gli ultrasuoni generano onde pressorie che disgregano il tessuto).

In generale i **metodi meccanici generano calore** -> attenzione: potrebbe portare alla denaturazione della proteina! Bisogna fare cicli brevi e intervallare con pause in ghiaccio.

## 2. **NON meccanici:**

1. **Enzimi litici:** causano la lisi della parete cellulare e/o della membrana cellulare (esempi: lisozima, zimolasi, cellulasi per batteri, lieviti e cellule vegetali)
2. **Detergenti:** solitamente quando devo analizzare proteine di membrana int e est perché i detergenti (TUTTI) si inseriscono nel doppio strato lipidico delle membrane e concorrono alla distruzione di interazioni (del tipo: lipide-lipide, proteina-proteina e proteina-lipide). Possono essere: ionici, NON ionici o zwitterionici
3. **Freezer/Thaw:** tecniche congelamento/scongelo -> solitamente diversi cicli di congelamento in **azoto liquido** e scongelamento a T ambiente (37°C) -> solitamente si usa per proteine solubili perché si ottengono frammenti molto grandi
4. **Shock osmotico:** cellule poste in una soluzione ipertonica (ad alta osmolarità) e la rottura avviene trasferendo poi le cellule in soluzione ipotonica (-> la cellula scoppia). Questa tecnica si utilizza per cellule fragili (NON si usano per le cellule batteriche in quanto sopportano alte pressioni osmotiche)

## **Ottimizzazione purificazione:**

- Definire obiettivi
- Definire proprietà proteina
- Definire materiali di partenza migliore

• Sviluppo di un **metodo con dosaggio adeguato**: deve permettere di seguire la proteina durante i vari passaggi della purificazione:

- ◆ Attività enzimatica
- ◆ Attività immunologica
- ◆ Attività biologica

Il **metodo di dosaggio** deve essere:

1. Specifico: devo seguire SOLO la proteina di interesse
2. Rapido
3. Sensibile: anche se ho tante frazioni diverse, deve misurare anche piccole quantità di proteina
4. Quantitativo: devo ottenere proteina interesse con elevata resa ed elevata purificazione (devo dire da quanto sono partita e a quanto sono arrivati in termini di quantità di proteine)

Bisogna essere sicuri di riuscire ad estrarre nel modo più efficiente la proteina di interesse. **Sfruttando le caratteristiche dell'enzima/proteina** di interesse si cerca di ottenere frazioni sempre più arricchite di quella determinata proteina/enzima che cerco.

**Definire le proprietà della proteina di interesse** serve sia per allestire la migliore tecnica per l'estratto in grezzo che per le tecniche di separazione della proteina di interesse dalle altre.

Quindi devo sempre considerare le caratteristiche peculiari della proteina!

Ricorda: bisogna sempre fare il controllo negativo!!

*Come misurare la purificazione di una proteina/enzima?*

Fare un'**elettroforesi su gel di poliacrilammide** (sia su **SDS-page** sia in native page) per avere un controllo qualitativo della purezza.

Negli esempi in classe notiamo che la banda dell'enzima nella cromatografia di affinità è definita dal nome *eluente*.

Con queste tecniche misuriamo qualitativamente la purezza, ma NON quantitativamente! Non sappiamo quante volte lo abbiamo purificato.

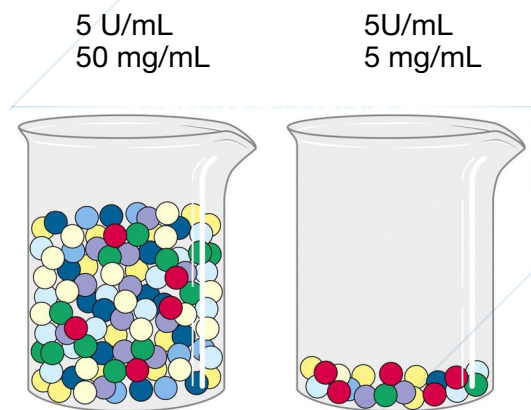
**Quantificazione della purificazione:** tramite determinazione dall'attività specifica dell'enzima (attività dell'enzima riferita a contenuto proteico).

Differenza:

- **attività enzimatica** = misura della variazione della concentrazione di reagente o prodotto nel tempo (quanto substrato viene convertito in prodotto in quanto tempo)
- **attività specifica dell'enzima** = unità di enzima per mg di proteine

In questo disegno l'enzima corrisponde alle palline rosse. L'attività enzimatica NON è cambiata: da 5 palline ne ho estratte 5. In numeri da 5 U/mL ne ho estratte 5 U/mL. Quindi l'attività enzimatica NON varia se estraggo tutto l'enzima.

Ma è cambiata l'attività specifica dell'enzima: nell'estratto ci sono molte meno proteine rispetto al contenuto dell'enzima (da 50 mg/mL a 5 mg/mL).



Per calcolare l'**attività specifica dell'enzima** faccio il rapporto tra **attività/ proteine totali**. L'attività specifica nel corso della purificazione aumenta perché le proteine totali diminuiscono!

**L'attività specifica di un enzima nel corso di una purificazione varia -> deve AUMENTARE.**

In teoria l'attività dell'enzima dovrebbe rimanere uguale, ma nella realtà NON succede: l'attività dell'enzima si perde, soprattutto in relazione al numero di passaggi (un po' di enzima viene perso durante i vari step di purificazione).

Per ogni frazione ottenuta dopo ogni step di purificazione è necessario misurare:

1. Volume
2. Attività enzima (U/mL)
3. Contenuto di proteine (mg/mL)

**Attività enzimatica totale (U):**

Attività (U/mL) x V totale (mL)

**Attività specifica (U/mg):**

Attività (U/mL) / contenuto totale di proteine (mg/mL)

(oppure espresso come attività riferita a volume unitario sul contenuto di proteine su volume unitario)

**Indice di purificazione:** ovvero quante volte è stato purificato l'enzima  
 attività specifica dopo uno step di purificazione / attività specifica prima dello step di purificazione

**Resa:**

(attività totale dopo uno step di purificazione / attività totale prima dello step) x 100%

Alla fine di una purificazione si compila una **tabella della purificazione**.

Bisogna riportare: V, attività totale, totale delle proteine, attività specifica, resa di ogni step di purificazione.

L'attività totale dell'enzima diminuisce (questo è inevitabile perché nei vari step un po' di enzima si perde).

Il max grado di purificazione è stato raggiunto quando l'attività specifica non varia più.

**Purification table (example)**

| Step    | Volume (ml) | Total activity (U) | Total protein (mg) | Specific activity (U/mg) | Yield (%) | Purification factor |
|---------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------------|-----------|---------------------|
| CE (1)  | 500         | 3,000              | 15,000             | 0.2                      | 100       | —                   |
| AS (2)  | 100         | 2,400              | 4,000              | 0.6                      | 80        | 3.0                 |
| IEC (3) | 45          | 1,440              | 500                | 2.9                      | 48        | 14.5                |
| GF (4)  | 50          | 1,000              | 125                | 8.0                      | 33        | 40.0                |

Steps: (1) Crude cell extract; (2) ammonium sulfate fractionation; (3) ion exchange chromatography; (4) gel filtration.

Purity-check: SDS-PAGE

Arrivare al 99% va a discapito della resa (devo fare tanti step quindi perdo enzima).

Infine **per verificare la purificazione si fa una SDS-PAGE.**

**Riassunto in breve della purificazione:**

- Estratto grezzo e omogenizzazione
- Eliminazione proteine contaminate
- Dosaggio delle proteine nella frazione di partenza e nell'estratto
- Compilazione della tabella

- Alla fine della purificazione vado a vedere le bande che ho ottenuto -> attenzione: VEDERE 1 banda sola non significa aver purificato a massima omogeneità, perché magari caricando più materiale VEDREI altre bande!
- Calcolo attività specifica per ogni frazione: vado a vedere l'attività specifica nell'omogenato (rappresenta il 100%) e nelle varie frazioni (le varie percentuali a seconda dei valori ottenuti che vanno divisi per il valore dell'omogenato)
- Alla fine possiamo concludere l'indice di purificazione e la resa ottenuti -> consente anche di valutare se uno step di purificazione è utile o meno: se in uno step non c'è aumento dell'attività specifica significa che quello step è inutile!

È possibile arrivare a delle rese **superiori al 100%**? Nelle frazioni iniziali possiamo avere attività dell'enzima maggiore alla fine.

**Sì**, potrebbe succedere: infatti **potrebbero esserci** degli **inibitori** nelle frazioni iniziali, che poi vengono eliminati nelle frazioni successive -> nelle frazioni iniziali l'attività enzimatica sarà minore rispetto a quella di partenza (dove l'enzima veniva inibito)