



UNIVERSITÀ DI PISA

METODOLOGIE CHIMICHE, BIOCHIMICHE E BIOANALITICHE PER LO STUDIO DELLE PROTEINE

EMILIA BRAMANTI

Academic year	2021/22
Course	CHIMICA
Code	354CC
Credits	3

Modules	Area	Type	Hours	Teacher(s)
METODOLOGIE CHIMICHE, BIOCHIMICHE E BIOANALITICHE PER LO STUDIO DELLE PROTEINE	CHIM/01	LEZIONI	24	EMILIA BRAMANTI

Obiettivi di apprendimento

Conoscenze

Il corso si propone di fornire un approccio integrato multi-tecnica per l'analisi di proteine in matrici biologiche complesse. La scelta della tipologia di analita, le proteine, è dovuta alla vastità delle problematiche analitiche ad esse connesse in chimica clinica, ambientale, chimica degli alimenti, farmaceutica, chimica dei beni culturali, biotecnologie e chimica forense provenienti dal mondo della ricerca e dell'industria. L'obiettivo del corso è quello di fornire allo studente le conoscenze per scegliere la metodologia di conservazione, trattamento del campione proteico e la tecnica analitica più idonea per l'ottenimento di dati affidabili compatibilmente con l'obiettivo da raggiungere (preparativo o analitico). Tale obiettivo verrà raggiunto attraverso la trattazione degli argomenti di seguito elencati associata alla scelta delle tecniche analitiche strumentali necessarie per applicazioni a problematiche reali. Manipolazione dei campioni biologici per l'analisi di proteine in matrici biologiche complesse: campionamento e conservazione. Dissociazione, denaturazione reversibile/irreversibile delle proteine. Agenti salting in, salting out. Tensione superficiale delle proteine. Unfolding e aggregazione proteica: principi e tecniche di studio. Metodi di identificazione, purificazione, separazione. Turbidimetria, fluorescenza, test della tioflavina T e del Rosso Congo. Studio dell'idrofobicità: ANS binding assay. I saggi enzimatici per la determinazione di proteine e substrati in chimica bioanalitica. Sequenziamento, western blotting, immunoblotting, e degradazione di Edman, spettrometria di massa. Dynamic light scattering (DLS) e size exclusion chromatography (SEC). Tensione superficiale (DSTD). Tecniche ifenate.

Modalità di verifica delle conoscenze

Accertamento delle conoscenze attraverso feedbacks durante le lezioni

Capacità

Lo studente sarà in grado di affrontare il problema analitico di trattamento di un campione proteico in base alle finalità della ricerca analitica (identificazione, purificazione, quantificazione, caratterizzazione strutturale).

Modalità di verifica delle capacità

- Lo studente potrà (opzionale) preparare e presentare con slides la parte materiali e metodi di un articolo di suo interesse riguardante la preparazione ed analisi di un campione proteico

Comportamenti

- Lo studente potrà acquisire sensibilità e conoscenze nella scelta del trattamento del campione proteico a scopi analitici e/o preparativi.
- Lo studente potrà essere in grado di scegliere le tecniche adeguate per la caratterizzazione delle proteine in campioni biologici complessi.
- Lo studente potrà essere in grado di orientarsi nella lettura e comprensione della parte sperimentale e dei risultati di articoli scientifici al fine di adattare le metodologie al proprio problema analitico.



UNIVERSITÀ DI PISA

Modalità di verifica dei comportamenti

Durante le lezioni saranno richiesti brevi feedback concernenti gli argomenti trattati

Programma (contenuti dell'insegnamento)

- Struttura e proprietà? generale degli aminoacidi, stereoisomeri e attività? ottica. Gli aminoacidi come anfolti. Punto isoelettrico, pK_{COOH} e pK_{NH_2} , pK dei gruppi laterali degli aminoacidi. Classificazione degli aminoacidi in base alle proprietà della catena carboniosa. Idrofobicità?, idrofilicità?. Effetto idrofobico. Il legame peptidico. La struttura primaria delle proteine: importanza biologica e applicativa. Struttura secondaria delle proteine. Struttura terziaria. Struttura quaternaria e significato funzionale.
- Proprietà spettroscopiche. UV visibile. I cromofori. Determinazione quantitativa delle proteine mediante assorbanza. I cofattori. Metodi di dosaggio delle proteine in campioni biologici. Fluorescenza molecolare delle proteine. Cromofori intrinseci e tagging.
- Denaturazione delle proteine: agenti denaturanti fisici (calore, ultrasuoni, pressione, interfacce) e chimici (pH, agenti salting in caotropici, solventi organici, detergenti). Tecniche per lo studio dell'unfolding. Serie di Hofmaister (agenti salting in e salting out). Molten globule. Precipitazione, aggregazione.
- Preparazione del campione: vari metodi di omogenizzazione, precipitazione, purificazione. Tecniche elettroforetiche. Tecniche di separazione bidimensionale: isoelettrofocalizzazione, PAGE, SDS-PAGE. Tecniche di blotting: Western blotting. Diagramma di flusso del protocollo analitico generale per la determinazione di proteine da materiale biologico. Esempi
- Proteine speciali: gli anticorpi ed enzimi. Reazioni antigene-anticorpo. Anticorpi monoclonali e policlonali. Tecniche di immunometria. Immunofluorescenza. Labelling. Vantaggi e svantaggi dei metodi immunoenzimatici. Metodi competitivi e non competitivi eterogenei (test ELISA). Test competitivi e non competitivi omogenei. Vantaggi in chimica clinica e in chimica analitica. Enzimologia e saggi enzimatici. Equazione di Michaelis-Menten: utilizzo nei saggi per la determinazione del substrato o dell'enzima.
- Saggi enzimatici (II parte). Determinazione del substrato mediante saggio a punto finale e mediante velocità iniziale. Saggi continui e discontinui. Vantaggi e limiti. Come si esegue praticamente un saggio enzimatico: procedure e strumentazione. Tecniche ifenate applicate allo studio delle proteine: protein labelling.
- Tecniche ifenate (continua). Studio della tensione superficiale delle proteine: metodi convenzionali e rivelatore dinamico di tensione superficiale. Alcuni esempi per lo studio della denaturazione proteica.
- Tecniche per lo studio della struttura secondaria delle proteine: spettroscopia FTIR. Strumentazione e metodi di preparazione del campione proteico solido o in soluzione acquosa. Analisi in trasmissione e ATR. Dallo spettro FTIR alla determinazione della struttura secondaria: importanza della banda Ammide I. Analisi qualitativa e quantitativa della struttura secondaria. Limiti e vantaggi dell'FTIR per lo studio della conformazione delle proteine. Alcuni esempi.
- Spettroscopia Raman e SERS (Dr Beatrice Campanella). Confronto Raman/IR. Strumentazione Raman. Spettro Raman degli aminoacidi e delle proteine. La banda Ammide I, Ammide II e lo stretching S-S. Gli aminoacidi aromatici. Come l'ambiente influenza lo spettro Raman delle proteine. Alcuni esempi. Surface Enhanced Raman Scattering (SERS).
- Tecniche per lo studio della struttura secondaria delle proteine (II): Dicroismo Circolare. Lo spettro CD delle proteine. Cristallografia a raggi X. Metodi di cristallizzazione delle proteine. Confronto tra i vari metodi: limiti e vantaggi.
- Spettrometria di massa e proteomica (I). La spettrometria di massa nelle scienze «omiche». Tecniche di ionizzazione hard e soft. ESI, MALDI. Gli analizzatori. Preparazione del campione proteico all'analisi di massa: digestione enzimatica. Gli enzimi proteolitici.
- Spettrometria di massa e proteomica (II). Genoma e proteoma: un gene = una proteina? Non più. Vantaggi della proteomica. Metodi bottom-up e Top down. Un caso reale step-by-step: USO DELL'ANALISI PROTEOMICA DIFFERENZIALE IN FASE LIQUIDA NELLO STUDIO DELL'ESPRESSIONE INDOTTA DA SELENIO E DELLA RESISTENZA AL CISPLATINO.

Indicazioni per non frequentanti

Gli studenti non frequentanti sono tenuti a prendere visione del programma svolto. Sono a disposizione sia le slides presentate sia la registrazione delle lezioni.

Altri riferimenti web

Slides a disposizione sul sito:

<https://polo3.elearning.unipi.it/course/view.php?id=3270>

e sul canale MSTeams per gli utenti registrati

Note

Per ulteriori informazioni si prega di contattare per e-mail il docente (bramanti@pi.iccom.cnr.it)

Ultimo aggiornamento 14/12/2021 10:05