



# UNIVERSITÀ DI PISA

---

## METODOLOGIE CHIMICHE, BIOCHIMICHE E BIOANALITICHE PER LO STUDIO DELLE PROTEINE

**EMILIA BRAMANTI**

Academic year **2023/24**  
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-technica 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. Proprietà di amminoacidi e proteine al fine di scegliere la corretta metodologia di analisi. 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, tecniche elettroforetiche e cromatografiche per le proteine. Tecniche spettroscopiche: UV/ visibile, fluorescenza, test della tioflavina T. 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. Tensione superficiale (DSTD). Tecniche ifenate. Tecniche spettroscopiche per la caratterizzazione strutturale delle proteine: FTIR, Raman, spettroscopie CD, cristallografia a raggi X.

#### *Modalità di verifica delle conoscenze*

Accertamento delle conoscenze attraverso feedbacks durante le lezioni. Comprensione delle sezioni Materials and Methods tratte da riviste scientifiche.

#### *Capacità*

Lo studente sarà in grado di affrontare il problema analitico di trattamento di un campione proteico in base alle finalità della sua ricerca (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.

#### *Modalità di verifica dei comportamenti*

Durante le lezioni saranno richiesti brevi feedbacks concernenti gli argomenti trattati



## UNIVERSITÀ DI PISA

### Indicazioni metodologiche

- Lezioni frontali, con ausilio di slide
- Slide a disposizione sul sito elearning.
- possibilità di richiesta approfondimenti/spiegazioni previo appuntamento via mail
- se possibile prova pratica in laboratorio (2-4 ore)

### Programma (contenuti dell'insegnamento)

- Struttura e proprietà generale degli aminoacidi, stereoisomeri e attività ottica. Gli aminoacidi come anfoteri. Punto isoelettrico, pKCOOH e pKNH<sub>2</sub>, 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 Hofmeister (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 grezzo. 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.
- Riassunto della preparazione del campione proteico preliminare all'analisi mediante spettrometria di massa e proteomica (I). Preparazione del campione proteico all'analisi di massa: digestione enzimatica. Gli enzimi proteolitici.
- Presentazione di casi reali.

### 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.

### Modalità d'esame

Esame orale sugli argomenti trattati. Eventuale discussione sulla sezione Materiali e metodi di articoli scientifici

### Altri riferimenti web

Slides a disposizione sul sito:

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

### Note

Per ulteriori informazioni si prega di contattare per e-mail la docente ([bramanti@pi.iccom.cnr.it](mailto:bramanti@pi.iccom.cnr.it))

Ultimo aggiornamento 18/10/2023 14:03