**Denaturazione (EXP – 02)**

Video 01

Spiegazione Teorica:

- Obbiettivo: Studio della Denaturazione della Betalattoglobulina (BLG) ottenuta tramite Cloruro di Guadininio (GuHCl) in soluzione acquosa (Tampone Fosfato).

- Fase 1°:

- Come per l’ EXP-01, la fase iniziale dell’esperimento consiste nel calcolo della concentrazione iniziale Ci dello Stock di BLG tramite lo Spettrofotometro, quindi tramite il calcolo dell’Assorbanza A di un campione diluito della proteina;

- Per farlo si va a diluire un volume iniziale Vi prelevato dallo Stock e lo si diluisce per pemmettere allo Spettrocolimetro di ricevere un buon segnale, in quanto lo Stock ad alta concentrazione non permetterebbe un passaggio consistente della radiazione;

- Utilizzando poi la legge che lega l’Assorbanza (ottenuta grazie allo spettro di emissione) alla concentrazione e la Legge della conservazione della Massa, andiamo a calcolare la concentrazione iniziale;

- Formule:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| CiVi = CfVf | Dove: | - Ci = concentrazione dello Stock  - Vi = volume dello Stock  - Cf = concentrazione della soluzione diluita  - Vf = concentrazione della soluzione diluita |
| A = εCl | Dove: | - A = assorbanza  - ε = coefficente di estensione molare  - C = concentrazione  - l = lunghezza cammino ottico |

- Il volume Vi da prelevare dallo Stock è di circa 100 μl e la diluizione va fatta subito con il tampone Fosfato poiché è il tampone di solito utilizzato per lo scioglimento delle proteine a pH = 7;

- ATT!! Ricorda sempre di utilizzare sempre i valori calcolati accuratamente con la bilancia per minimizzare l’errore;

- ATT!! Ricorda anche che, prima di andare ad acquisire lo spettro di emissione del campione con lo Spettrofotometro, va acquisito lo spettro di fondo del solo tampone da poi sottrarre allo spettro della soluzione diluita;

- ATT!! Fondamentale da ricordarsi è anche che l’Assorbanza va misurata a una precisa lunghezza d’onda: ovvero quella a cui conosco il Coefficente di estenzione molare (ε = 17600 M-1cm-1), quindi va acquisita a 280 nm;

- AVVERTENZA: La Cuvetta ha un cammino ottico lungo 1cm e va utilizzata la cuvetta di Quarzo, non quella di plastica. Questo è dovuto dal fatto che andremo a fare una acquisizione nel range dell’UV (190nm – 350nm) dove le cuvette di plastica taglierebbero la radiazione;

- RICORDO TEORICO: a 190nm assorbe il Legame Peptidico mentre gli Amminoacidi Aromatici assorbono nel range 250 – 300 nm (con picco a 280 nm);

- Fase 2°:

- La seconda parte dell’esperimento si basa invece sulla preparazione progressiva di diversi campioni di soluzione (di BLG + GuHCl + Tampone) per studiare poi nella fase successiva, all’aumentare del Denaturante, lo spostamento del picco dello spettro di Fluorescenza;

- La proteina va tenuta a una concentrazione Costante pari a 5 μM, mentre andrà a variare la concentrazione del Denaturante;

- Il primo campione va preparato a una con centrazione di GuHCl pari a 0 μM così da rappresentare il campione della proteina allo stato Nativo;

- Ogni campione viene portato a volume con il tampone Fosfato fino al raggiungimento di un volume finale di 2000 μl;

- ATT!! Per fare il conto bisogna tener ben presente il fatto che il Cloruro di Gadininio non ha una densità pari a quella dell’acqua, ma bensì pari a dGuHCl = 1.187 g/l, quindi andrà rivalutata la lettura della bilancia;

- Per il conto usiamo sempre la Legge di conservazione della Massa CiVi = CfVf ;

- I dati iniziali per il primo campione sono: Ci = 60 μM (Concentrazione dello Stock di BLG), Cf = 5 μM e Vf = 2000 μl. In questo modo possiamo andare a calcolare il volume iniziale di BLG che dobbiamo andare a prelevare dallo Stock da mettere in ogni campione, tenendo conto che dovrà rimanere costante per tenere costante la sua concentrazione;

- Per i campioni successivi devo andare a calcolare, nello stesso modo, sempre il Vi (ma di GuHCl) tenendo conto che la concentrazione iniziale di Stock di GuHCl è pari a Ci = 8 M e tenendo come concentrazioni finali una progressione di 1 M, poi 2 M … fino a 5 M.

- Fase 3°:

- Preparati i vari campioni, va acquisito lo spettro di emmissione di ognuno tramite lo Spettroclorimetro;

- La lunghezza d’onda di eccitazione da tenere per ogni campione è di 295 nm;

- Questo perché vogliamo seguire il processo di Denaturazione tramite l’eccitazione di un particolare Amminoacido Aromatico, cioè il Triptofano;

- RICORDO TEORICO: Il Triptofano (idrofobo) all’inizio è collocato all’interno della struttura terziaria della proteina così da essere protetto dall’ambiente acquoso della soluzione. Pian piano che invece avanza il processo di denaturazione della proteina, si verifica un cambiamento conformazionale della BLG e il Triptofano entra a contatto con l’ambiente acquoso. Questo contatto porta ad una ulteriore modifica conformazionale della proteina modificandone anche le sue caratteristiche spettroscopiche;

- In questo caso l’evidenza sperimentale di questa modifica alle sue caratteristiche spettroscopiche è uno spostamento dello spettro di fluorescenza verso lunghezze d’onda maggiori (dal blu verso il rosso);

- ATT!! Lo spettro di fluorescenza va acquisito tra i 300 e i 450 nm;

- A qesto punto, ottenuti tutti gli spettri bisogna interpolare ogni picco parabolicamente per ottenere la cordinata x di ogni vertice (ovvero la loro lunghezza d’onda);

- ATT!! Il cambiamento conformazionale della proteina non porta solo allo spostamento di tutto il suo spettro di fluorescenza a lunghezze d’onda maggiori, anche l’intensiotà stessa degli spettri viene modificata e tenderà ad aumentara (approfondimento articolo su e-learning);

- In fine ottenute tutte le lunghezze d’onda andiamo a riportare quest’ultime in funzione della concentrazione del GuHCl, per verificare il corretto andamento del processo;

- La curva caratteristica del processo di denaturazione è la Sigmoide;

- RICORDO TEORICO: Il modello su cui si basa questa rappresentazione sigmoidale del processo è una schematizzazione della denaturazione a un sistema a due stadii (P.Nativa → P.Denaturata);

Inoltre assumiamo il Linear Energy Model, ovvero che l’energia libera di Ghibs di Denaturazione è proporzionale in maniera lineare alla Concentrazione di Denaturante;

- Effettuato l’interpolazione Sigmoidale dei dati, i due parametri da estrarre dal fit sono m (parametro di Cooperatività) e il Cmid (la concentrazione di Mid Point);

- Da questi poi va calcolata l’energia libera di Ghibs del processo come se avvenisse in acqua:

- Nelle relazioni finali va riportato il valore di ΔG (ATT!! Attenzione alle unità di misura) e bisogna poi andare a confrontare quest’ultimo con il valore tabulato in letteratura;

-In più, visto che il processo di denaturazione viene studiato anche tramite il fenomeno del Dicroismo Circolare, si può andrea anche effettuare un confronto tra i valori ottenuti tramite i due metodi differenti.

Svolgimento a casa

1) Calcolo di concentrazione dello Stock di Beta-LattoGlobulina (BLG):

Dati iniziali:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Volume Stock | Vi | 98.1 μl |
| Volume Proteina + Tampone | Vf | 1983,45 μl |
| Assorbanza | A | 0,25754 |
| Coefficente di Estensione Molare | ε | 17600 Mol-1cm-1 = 0,0176 μM-1cm-1 |

Dall’equazione A = εCfl otteniamo Cf = 14,633 μM

(Concentrazione della Proteina diluita in Acqua)

Dall’equazione CiVi = CfVf otteniamo Ci = 295,86 μM (Concentrazione dello Stock di partenza).

2) Tabella teorica per il Processo di Denaturazione:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Concentrazione di  GuHCl [ μM ] | Volume di  BLG [ μl ] | Volume di  GuHCl [ μl ] | Massa di  GuHCl [ μg ] | Volume del  Tampone [ μl ] |
| 0 | 166,67 | 0,00 | 0,00 | 1833,33 |
| 1 | 166,67 | 250,00 | 296,75 | 1583,33 |
| 2 | 166,67 | 500,00 | 593,50 | 1333,33 |
| 3 | 166,67 | 750,00 | 890,25 | 1083,33 |
| 4 | 166,67 | 1000,00 | 1187,00 | 833,33 |
| 5 | 166,67 | 1250,00 | 1483,75 | 583,33 |

Tenendo costante il VTOT (ovvero Tampone + BLG + GuHCl ) a un valore di 2000 μl e tenendo costante anche la concentrazione di BLG a 5 μM, possiamo prevedere questi valori di volume del tampone e di GuHCl.

3) Analisi del picco del Triptofano:

Funzione di Fit:

dove M = m/RT;

*Mancano i vari fit parabolici di tutti gli spettri*

*aspetto ad aggiungerli prima che dobbiamo rifarli per minimizzare gli errori*

- 1° serie di dati:

*IMMAGINE GRAFICO  
E FIT*

*li lascio in sospeso fino a quando non li avremo corretti*

*anche i prossimi dati potrebbero non corrispondere a quelli finali*

Grafico della Lunghezza d’Onda del picco del Triptofano in funzione della Concentrazione del GuHCl usando la prima serie di dati.

- 2° serie di dati:

*IMMAGINE GRAFICO  
E FIT*

Grafico della Lunghezza d’Onda del picco del Triptofano in funzione della Concentrazione del GuHCl usando la seconda serie di dati.

Risultati dei due Fit: *(Potrebbero venir modificati in seguito, non sono quelli definitivi)*

|  |  |
| --- | --- |
| 1° Serie di dati: | 2° Serie di dati: |
| YN = 334,73 ± 0,51 | YN = 335,44 ± 0,46 |
| YD = 355,94 ± 0,26 | YD = 356,08 ± 0,27 |
| M = 3,95 ± 0,35 | M = 5,07 ± 1,22 |
| C = 2,211 ± 0,025 | C = 2,687 ± 0,778 |

Calcolo del ∆G: *(Mancano le unita di misura e i valori ottenuti sono sbagliati, vanno ancora corretti)*

Tenendo conto che R = 8,314 e che la temperatura sia di T = 293° otteniamo per le due serie di dati:

|  |  |
| --- | --- |
| 1° serie di dati: | 2° serie di dati: |
| m = 0,00162± 0,00014 | m = 0,00208± 0,00050 |
| ∆G = 0,00359 ± 0,00032 | ∆G = 0,00559 ± 0,00135 |

*In fine manca tutta la parte di commento e di confronto dei risultati ottenuti.*

*Se vuoi iniziare a scrivere qualcosa se no aspettiamo di correggere i vari dati.*