**Curva di Legame (EXP – 03)**

Video 01

Spiegazione Teorica:

- Obbiettivo: Studiare il Binding, ovvero la Curva di Legame, della proteina Bovine Serum Albumin BSA attraverso il sale ANS, usato come sonda;

- Questo perché, se libera in soluzione, la sonda ANS ha una resa Quantica prossima allo 0, mentre se questa viene legata alla proteina BSA dimostra una resa di Fluorescenza molto elevata.

- L’esperimento si svolge nell’acquisire gli spettri di Fluorescenza di vari campioni, partendo da uno con BSA a concentrazione nota e con concentrazione di ANS tenuta fissa a 5 μM, per poi andare ad attuare una diluizione progressiva della sola proteina;

- In questo modo si va a seguire il processo di Binding atteaverso la Fluorescenza dell’ANS, e non quella della proteina, che andrà ad affievolirsi con il calo di concentrazione di BSA;

- Questo a partire da una concentrazione tale per cui tutto il sale è legato alla proteina fino ad arrivare a una tale per cui quasi tutto il sale è libero in soluzione.

- Fase 1°:

- Come per l’ EXP-01 e EXP-02, la fase iniziale dell’esperimento consiste nel calcolo della concentrazione iniziale Ci dello Stock di BSA 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 mentre la concentrazione iniziale dello stock che dovrebbe risultare dal calcolo è di circa 60 μM;

- In seguito bisogna andare a calcolare il volume iniziale Vi di sonda che bisognerà prelevare dallo stock di ANS per poi andare a inserirlo nel nostro campione per ottenere una concentrazione finale Cf di quest’ultima di circa 5 μM;

- Per attuare poi la diluizione progressiva della proteina tenendo costante la concentrazione di sonda, si prepara in un Becher (il “Beverone” ) un elevato volume di soluione ( circa 30 ml) con solo ANS a concentrazione di 5 μM così che, per diluire e quindi diminuire della metà la concentrazione di BSA dal campione di partenza, basterà preparare il nuovo campione prelevando metà del volume dal primo campione e metà volume dal Beverone;

- In questo modo da ogni diluizione si otterrà un nuovo campione avente sempre concentrazione di ANS costante, ma avente una concentrazione di BSA pari alla metà di quello precedente;

- Per svolgere l’esperimento bisogna preparare in questo modo da una decina a una quindicina di campioni.

- Fase 2°:

- La seconda fase consiste nell’acquisizione, tramite lo Spettroflorimetro, degli spettri di emissione per ogni campione, avendo una lunghezza d’onda di eccitazione di 350 nm, proprio perché andiamo a osservare la fluorescenza della sonda, tenendo un range di acquisizione dai 360 nm ai 600 nm;

- ATT!! Tra il campione con concentrazione di BSA di 60 μM e quello di 30 μM (o anche eventuali concentrazioni maggiori) potrebbe risultare una differenza di intensità minima o pressochè nulla. Questo dipende dal fatto che se il sale ANS è in entrambi i casi tutto legato alla proteina, il segnale sarà pressochè lo stesso;

- L’acquisizione dei dati invece finisce quando si ottiene uno spettro di fluorescenza praticamente piatto, in quanto non distinguendo più facilmente il picco i dati risulterebbero irrilevanti. Questo avviene al raggiungimento di una concentrazione di BSA abbastanza bassa da avere quasi tutto il sale libero in soluzione;

- RICORDA: Può essere utile nell’esperimento acquisire anche lo spettro di emissione del solo Tampone + ANS così da avere un punto di riferimento e di partenza per la curva di legame;

- Ottenuti tutti gli spettri, in fine per la fase 2°, va attuata una interpolazione parabolica di tutti i picchi per ottenere l’Intensità di fluorescenza in funzione della concentrazione di BSA.

- Fase 3°:

- Per analizzare in fine la Curva di Binding si pone appunto l’Intensità di emissione in funzione dalla concentrazione di BSA per poi fittarla con l’equazione:

dove:

|  |  |
| --- | --- |
| P | È la Concentrazione di Proteina, ovvero la variabile indipendente; |
| Δη | È la differenza tra le rese quantiche di ligandi legati e ligandi liberi; |
| CANS | È la Concentrazione costante a 5 μM di ANS; |
| KD | È la Costante di Dissociazione; |
| I0 | È l’Intensità di Fluorescenza di partenza, cioè di ANS libero in soluzione. |

- Dal fit bisogna estrarre la Costante Kass di Associazione e il numero n di Siti di Legame (essendo un numero intero deve risultare un valore compatiblie con n = 3 ).