**Dicroismo Circolare – Denaturazione BLG (EXP – 08)**

Video 01

Spiegazione Teorica:

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

- Per questo esperimento si osserverà il processo di Denaturazione tramite il fenomeno di Dicroismo Circolare. Quello che si andrà ad anallizzare è la variazione dell’ Elletticità a diverse concentrazioni di denaturante;

- L’obbiettivo finale è quello di andare a confrontare il risultato ottenuto per l’energia libera di Ghibs con il valore ottenuto durante l’esperimento di Fluorescenza sempre sulla denaturazione della BLG.

- Il Dicroismo Circolare fa uso di luce polarizzata circolarmente destra ( che chiameremo l.p.c.DX) e luce polarizzata circolarmente sinistra (l.p.c.SX) in maniera alternata;

- In sostanza l’esperimento consiste nell’andare a studiare la differenza di Assorbanza della soluzione, la quale verrà ec citata con Luce Polarizzata a differenti lunghezze d’onda;

- In particolare, in questo caso si andrà a utilizzare radiazioni di eccitazione ricadenti nel range del FarUV (190 – 260 nm);

- Quello che poi si ottiene tramite il software del computer dall’Assorbanza è l’Elletticità Molare (ϑ), la quale però andrà divisa per la concentrazione di BLG per ottenere l’Elletticità Molare Residua (ϑR);

Svolgimento Effettivo:

- Operativamente, come primo passo, va calcolata la Concentrazione dello Stock iniziale ( Ci v CSTOCK ) di proteina BLG;

- Per ricavarla si utillizzerà la formula di conservazione della massa e la legge che lega l’Assorbanza alla Concentrazione, avendo ε = 17600 M-1cm-1 ;

- 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 |

- Ottenuta così la concentrazione iniziale dello Stock bisogna andare a preparare diversi campioni a identica Concentrazione di BLG (CBLG = 3 μM), ma con diversa Concentrazione di Denaurante (CGuHCl);

- Otteniamo così diversi campioni a partire dal campione di Proteina Nativa (CguHCl = 0 M) fino a una Concentrazione di denaturante pari a 5 M;

- Creare poi allora una Tabella Teorica con le varie Concentrazioni e Volumi per ogni campione, sia di BLG che di GuHCl che di Tampone Fosfato;

- La concentrazione di proteina come il suo volume devono rimanere fissi e bisogna anche inserire la Massa di GuHCl tenendo conto della sua densità pari a dGuHCl = 1.187 g/l;

- Per i calcoli usare sempre la legge di conservazione della Massa e tener conto che la Concentrazione di Stock del Cloruro di Guadininio e pari a 8 M;

- Il Volume finale di ogni campione deve essere di circa 2000 μl;

- ATT!! Anche in questo caso, come per l’esperimento di Fluorescenza, la cuvetta da utilizzare per i diversi campioni deve essere quella di Quarzo, così da non tagliare la radiazione Ultravioletta.

- Per la misura bisogna analizzare ogni campione a diverse lunghezza d’onda di eccitazione (λ);

- L’Elletticità Molare Residua (ϑR) è legata infatti alla differenza di Assorbanza ΔA tra la l.p.c.DX e la l.p.c.SX;

- Quello che si ottiene sono delle curve specifiche soggette a parecchio rumore;

- ATT!! I valori che si ottengono possono essere anche Negativi. Difatti il valore negativo è dovuto dal fatto che una delle due luci polarizzate circolarmente venga assorbita maggiormente rispetto all’altra;

- La curva di Denaturazione, all’inizio, ha una struttura ben definita, la quale è legata alle strutture interne della proteina (ovvero le α-eliche o i β-sheet), poi, pianpiano, la proteina tende ad aprirsi ed ad appiattirsi;

- Difatti vi è una perdita della struttura ordinata e compatta e scindendosi sempre di più, la proteina tenderà ad assorbire la l.p.c.DX e la l.p.c.SX in maniera circa euguale;

- In questo modo, siccome ϑ è legata direttamente alla differena ΔA, la curva tenderà ad azzerarsi assieme ad essa;

- Si otterranno così curve sempre più piatte e tendenti allo zero, in quanto la proteina sarà sempre più denaturata e quindi “piatta”.

Parte di Analisi Dati:

- Ogni curva va quindi divisa per la Concentrazione propria di proteina così da ottenere la elletticità Residua;

- Anche perché si commettono sempre degli errori sui volumi inseriti in ogni campione. In questo modo le concentrazioni effettive saranno leggermente diverse l’una dall’altra;

- Dividendo così ogni curva per la sua Concentrazione si va a correggere questi errori sperimentali;

- Tuttavia nel Dicroismo Circolare basta un minimo errore sulla concentrazione per andare a sfalzare i dati finali;

- A quel punto si deve sceglere una lunghezza d’onda di riferimento (es. 224nm) o un range di lunghezze, e riportare in un grafico la Elletticità Molare Residua [ϑR]224nm calcolata per quella lunghezza d’onda in funzione della concentrazione di Denaturante CGuHCl  ;

- La curva ottenuta è una Sigmoide e bisogna eseguire un fit come per l’esperimento sullo studio del processo di denaturazione tramite fluorescenza;

- Funzione di Fit:

dove M = m/RT;

- Dall’interpolazione vanno poi ricavati due parametri:

- m = parametro di cooperatività;

- Cmid = Concentrazione di MidPoint;

- In fine bisogna calcolare l’Energia libera di Ghibs di Denaturazione del processo, considerando come se il processo stesso stesse avvenendo in acqua;

- Per concludere bisognerà confrontare i due risultati ottenuti nei due esperimenti riguardanti il processo di Denaturazione della Betalattoglobulina.