

Modulo di Biochimica Applicata (6 CFU)
del CI di Biochimica Applicata e Metabolica
(4 CFU lezioni + 2 CFU laboratorio)



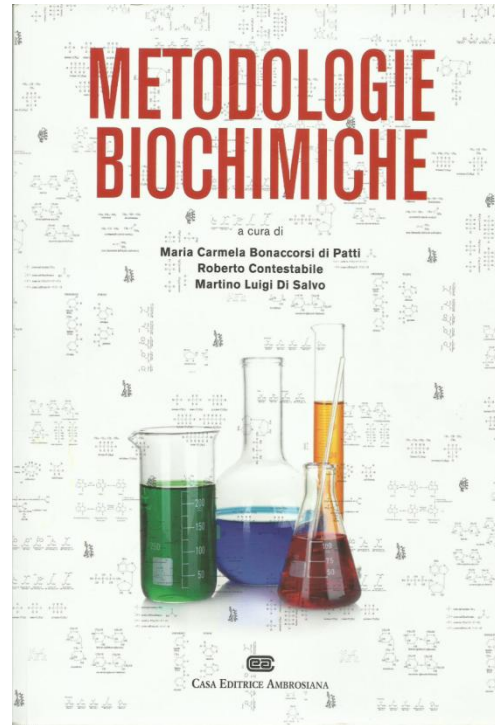
Prof.ssa **Alessandra Olianas**

Dip. Scienze della Vita e dell'Ambiente
Sezione Biomedica

Ricevimento studenti: **si riceve per appuntamento**

olianas@unica.it

Testi consigliati:



Materiali didattici del docente

Tecniche Elettroforetiche: tecniche di separazione che sfruttano la migrazione di molecole provviste di carica elettrica sotto l'influsso di un campo elettrico

Molecole di interesse biologico:

- Aminoacidi
- Proteine
- Nucleotidi
- Acidi nucleici

Anche altri composti come **carboidrati** (composti non ionici) se trasformati chimicamente

Obiettivo: Valutare il grado di purezza dei composti e loro dimensioni

Elettroforesi:

1930 Arne Tiselius (premio Nobel Chimica nel 1948)



Elettroforesi in fase libera

Processi di diffusione



Elettroforesi su supporti solidi

Elettroforesi zonale: uso di supporti per la separazione

Supporti

carta da filtro

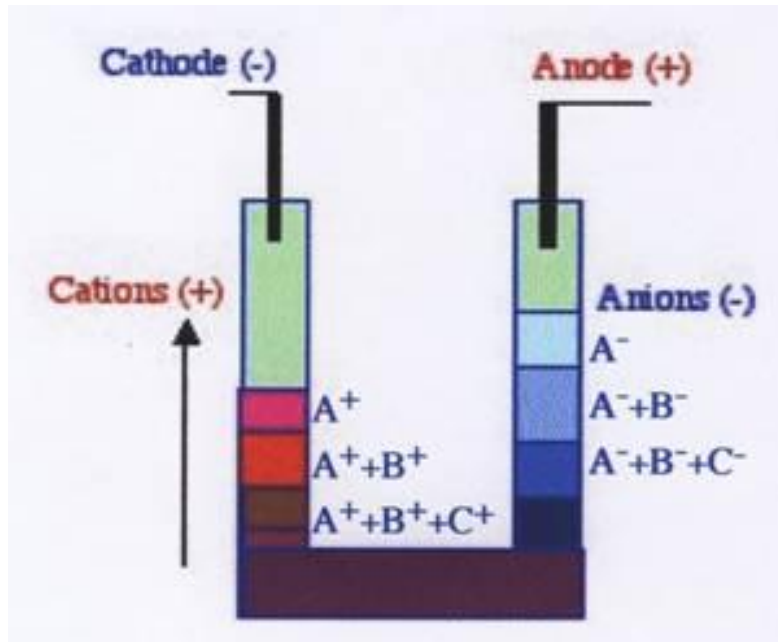
acetato di cellulosa

gel di poliacrilamide
gel di agarosio

risultati accettabili x molecole di piccole dimensioni

notevole aumento di risoluzione per effetto setaccio del gel

Elettroforesi in fase libera



La soluzione viene iniettata in un tubo

In ogni braccio del tubo viene immerso un elettrodo, riempito di soluzione elettrolitica

Viene applicata una ddp agli elettrodi

Le specie ioniche si muoveranno verso il polo di segno opposto

Elettroforesi

Alimentatore

(genera un flusso di corrente)



Cella elettroforetica
(orizzontale o verticale)



Cationi migrano
verso il catodo (-)

Anioni migrano
verso l'anodo (+)

Tampone: necessario per la conduzione della corrente e per mantenere
Lo stato di ionizzazione del campione.

Molecole cariche sottoposte ad un campo elettrico???

Applicando una **ddp** tra due elettrodi si genera un campo elettrico (E) che dipende dalla distanza tra i **due elettrodi**

Il campo elettrico induce la mobilità della molecola di carica (**q**) verso l'elettrodo di carica opposta con una velocità di migrazione **v**.

Il **supporto** esercita una frizione che si oppone al movimento delle molecole espressa come coefficiente frizionale **f**

$$F_{el} = q \cdot E$$

$$F_{fr} = v \cdot f$$

v = velocità di migrazione

f = coefficiente frizionale:

q = intensità di carica elettrica

E = intensità del campo elettrico applicato

misura del freno

In un campo elettrico costante le 2 forze si bilanciano

$$F_{el} \equiv F_{fr}$$

$$q \cdot E \equiv v \cdot f$$

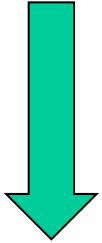
$$v \equiv q \cdot E / f$$

Dipende da:

- Dimensione e Forma dello IONE,
- Porosità del supporto

Introduciamo il parametro **mobilità elettroforetica** $\mu = v/E$ se $E=1$
 μ è la velocità elettroforetica in un campo elettrico di intensità unitaria

$$\mu = v/E$$



$$v = q \cdot E / f$$

$$\mu = v/E = (q E/f) / E = q / f$$

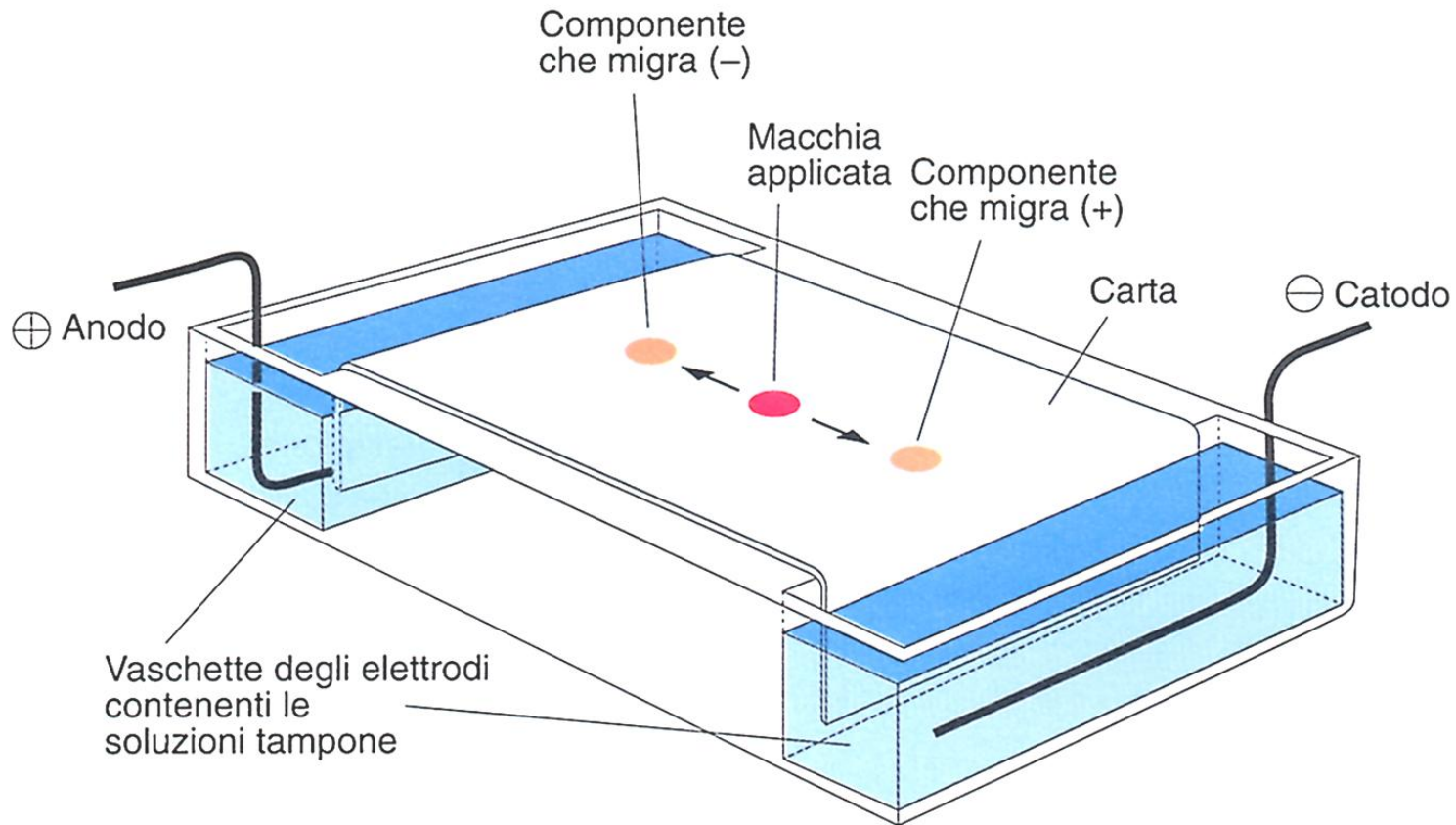
dal momento che f dipende molto dalle dimensioni

$$\mu = q/m$$

$$\mu_{AA, Proteine} = 0$$

$$\text{se } pH = pI$$

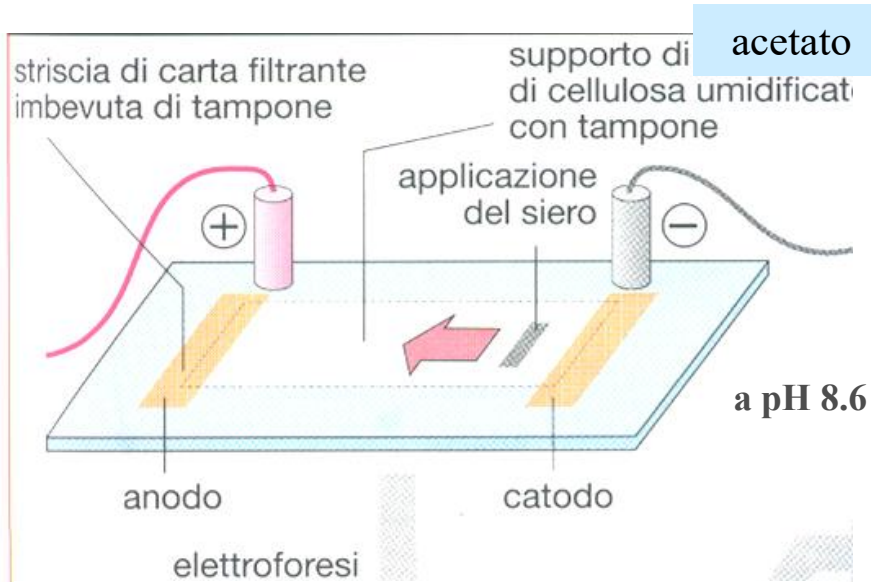
Elettroforesi su carta



Vantaggi: Apparecchiatura poco costosa e di facile utilizzo

Svantaggi: Lunghi tempi di analisi x interazione tra gruppi polari (proteine) e gruppi OH cellulosa → denaturazione e precipitazione proteine durante la corsa

Elettroforesi su acetato di cellulosa



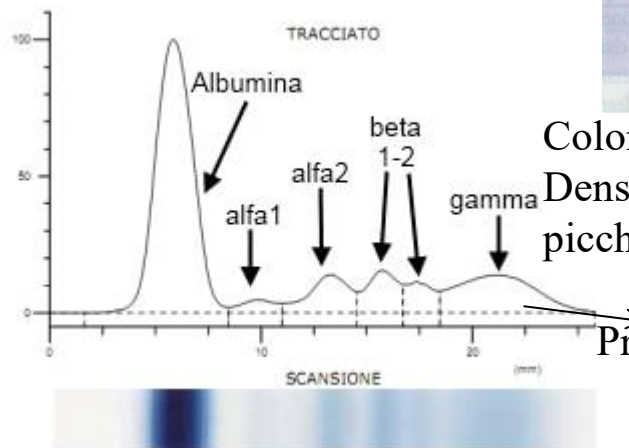
Le proteine del siero cariche negativamente migreranno verso il polo positivo in funzione della loro carica e massa

Vantaggi:

- Apparecchiatura poco costosa di facile utilizzo
- Ridotto adsorbimento delle proteine
- Tempi di analisi più ridotti

In uso nei laboratori di Chimica clinica

gruppo	proteina	M _r in kDa	funzione
albumine:	transtiretina, albumina: 45g/l	50-66 67	trasporto della tiroxina e di triiodotironina mantenimento della pressione osmotica, trasporto di acidi grassi, bilirubina, acidi biliari, ormoni steroidei, farmaci nonché ioni inorganici
α ₁ -globuline:	antitripsina, antichimotripsina, lipoproteina (HDL), protrombina, transcortina, glicoproteina acida, globulina legante tiroxina	51 58-68 200-400 72 51 44 54	inibizione della tripsina e di altre proteasi inibizione della chimotripsina trasporto di lipidi fattore II della coagulazione, precursore della trombina (3.4.21.5) trasporto di cortisolo, corticosterone e progesterone trasporto di progesterone trasporto di iodotironina
α ₂ -globuline:	ceruloplasmina, antitrombina III, aptoglobina, colinesterasi (3.1.1.8), plasminogeno, macroglobulina, proteina legante il retinolo, proteina legante la vitamina D	135 58 100 ca. 350 90 725 21 52	trasporto di ioni di rame inibizione della coagulazione legame dell'emoglobina scissione di esteri del colesterolo precursore della plasmina (3.4.21.7), dissoluzione di trombi legame di proteasi, trasporto di ioni di zinco trasporto della vitamina A trasporto di calcio
β-globuline:	lipoproteine (LDL), transferrina, fibrinogeno, globulina legante gli ormoni sessuali, transcobalamina, proteina C-reattiva	2000-4500 80 340 65 38 110	trasporto di lipidi trasporto di ioni di ferro fattore I della coagulazione trasporto di testosterone e di estradiolo trasporto della vitamina B ₁₂ attivazione del complemento
γ-globuline:	IgG, IgA	150 162 900 172 196	anticorpi della risposta matura anticorpi di protezione della mucosa anticorpi della risposta precoce recettori dei linfociti B reagine



Colorazione

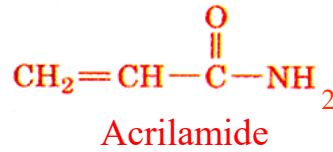
Densitometro (trasforma le bande in picchi di diversa altezza e larghezza)

Protidogramma

PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (PAGE):

utilizza un supporto di poliacrilamide

$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COOH}$
Acido acrilico
Acido 2-propenoico



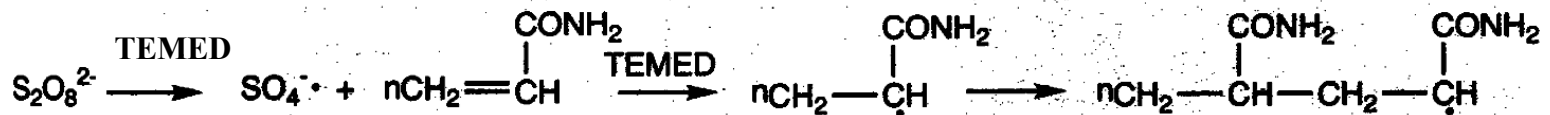
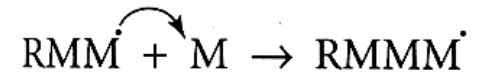
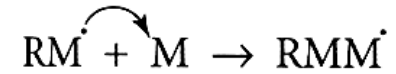
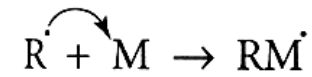
reazione di polimerizzazione radicalica richiede:

Ammonio Persolfato (AP)
 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ (Ione Persolfato)

TEMED $(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$
N,N,N',N' tetrametil-etilendiamina

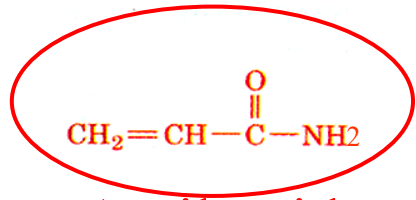
Iniziatore radicalico

Catalizzatore



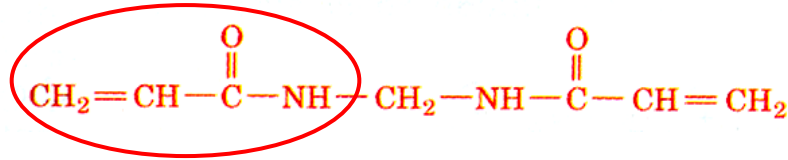
Il gel di poliacrilamide permette lo studio di proteine sia in condizioni native che denaturanti

PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (PAGE): utilizza un gel di poliacrilamide



Acrilamide

+



N,N'-metilen bisacrilamide

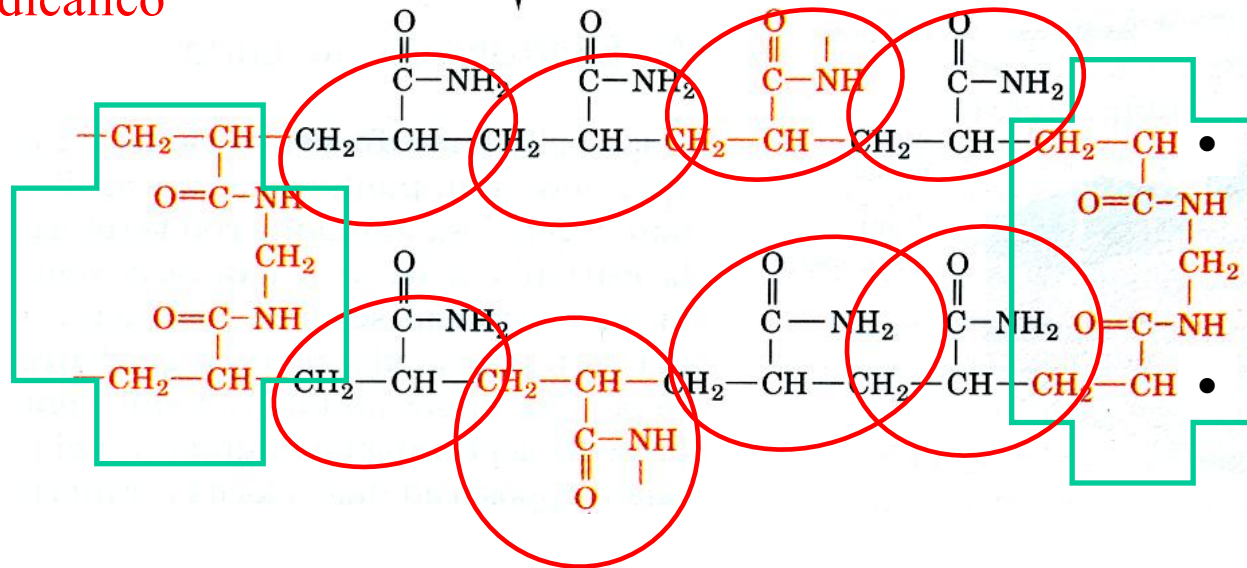
reazione di polimerizzazione radicalica richiede:

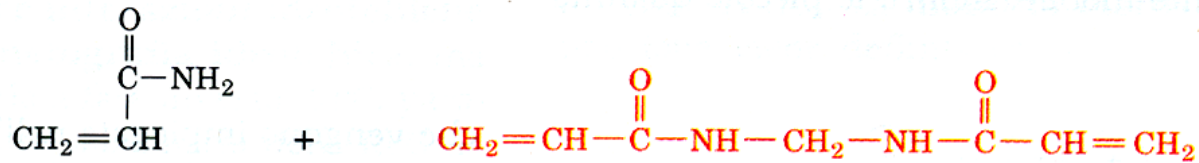
Catalizzatore

Ammonio Persolfato (AP)
 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ (Ione Persolfato)

TEMED $(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$
 N,N,N',N' tetrametil-etilendiamina

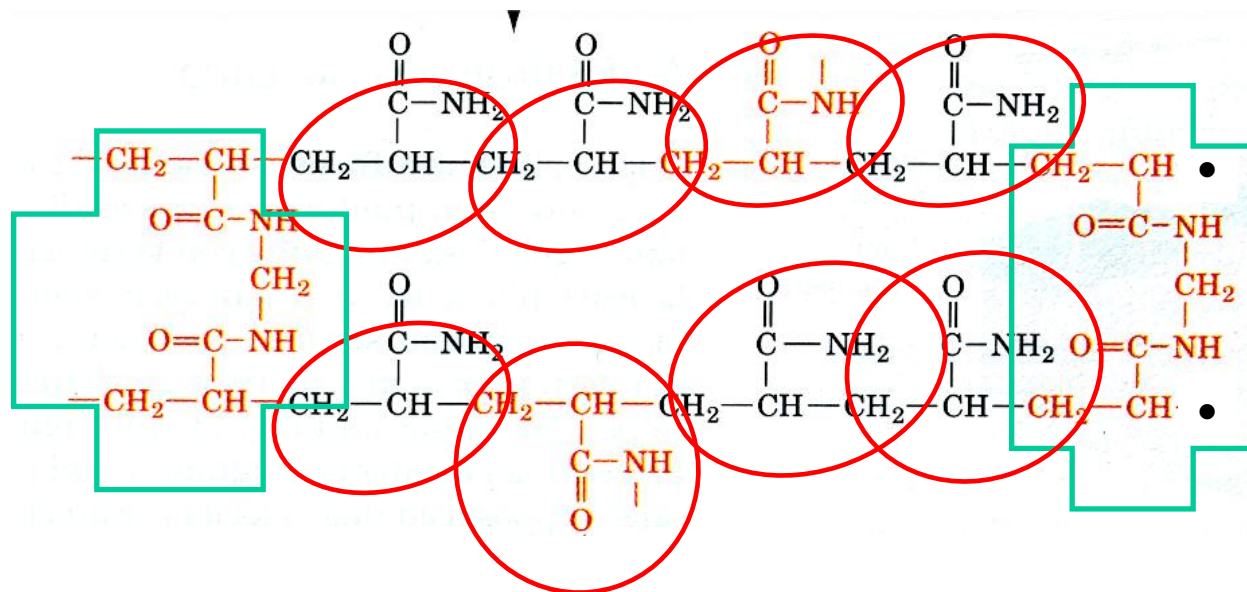
Iniziatore radicalico

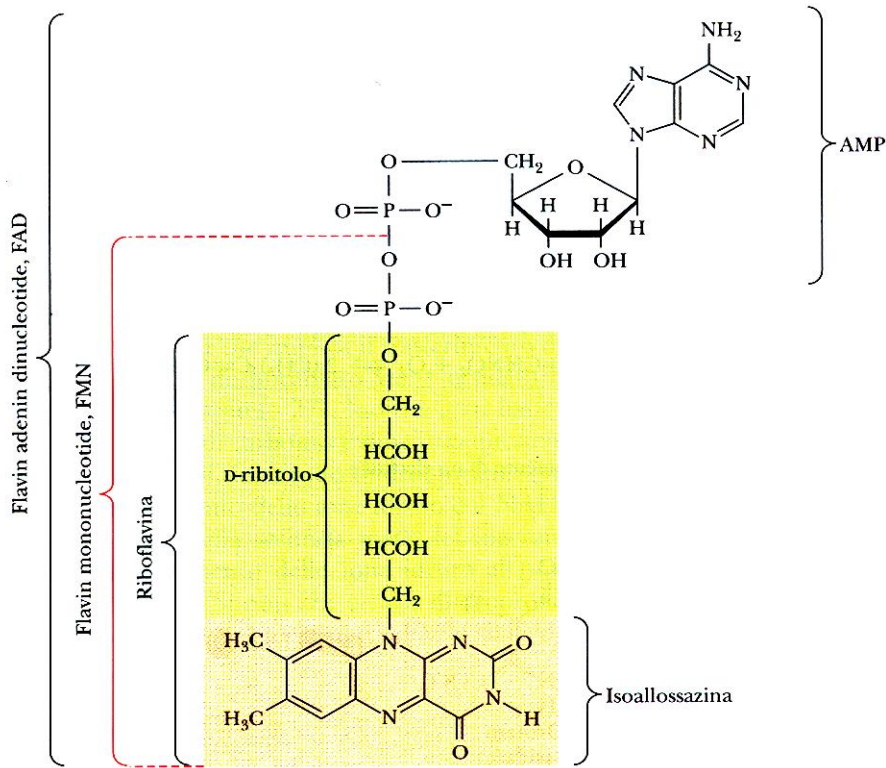




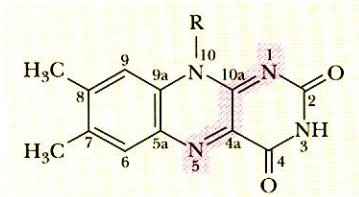
Attenzione:

Monomeri di acrilamide e bis-acrilamide sono tossici
(per contatto e inalazione),
vanno quindi maneggiati indossando gli appositi DPI

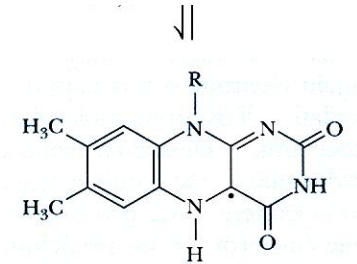




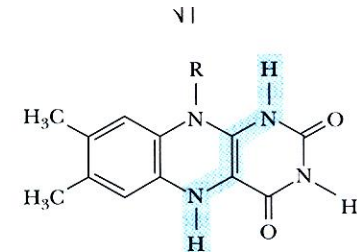
Forma ossidata
 $\lambda_{\max} = 450 \text{ nm}$
 (giallo)



Forma semichinonica
 $\lambda_{\max} = 570 \text{ nm}$
 (blu)



Forma ridotta
 (incoloro)

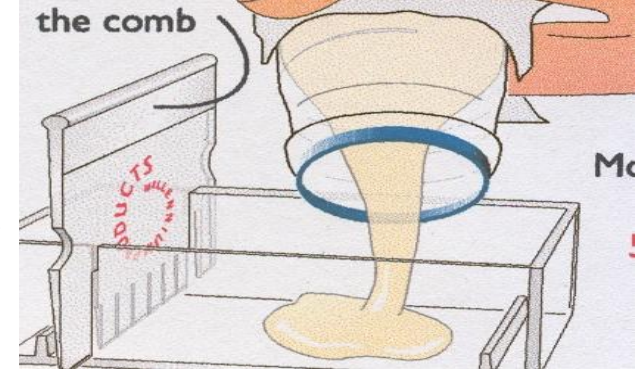
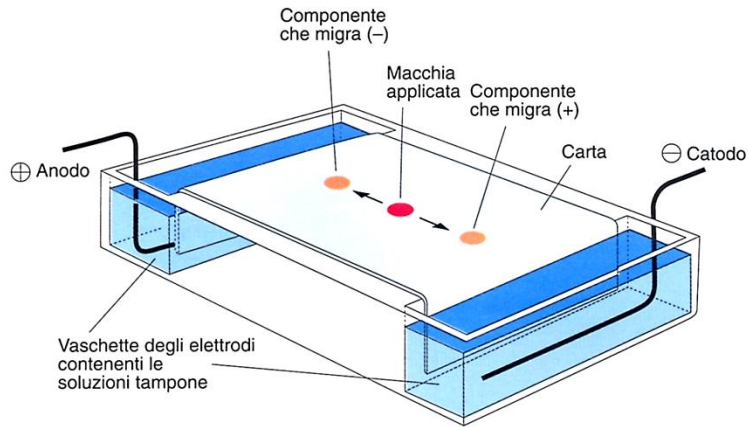


Riboflavina = catalizzatore radicalico x fotopolimerizzazione

E' un'alternativa all'ammonio persolfato

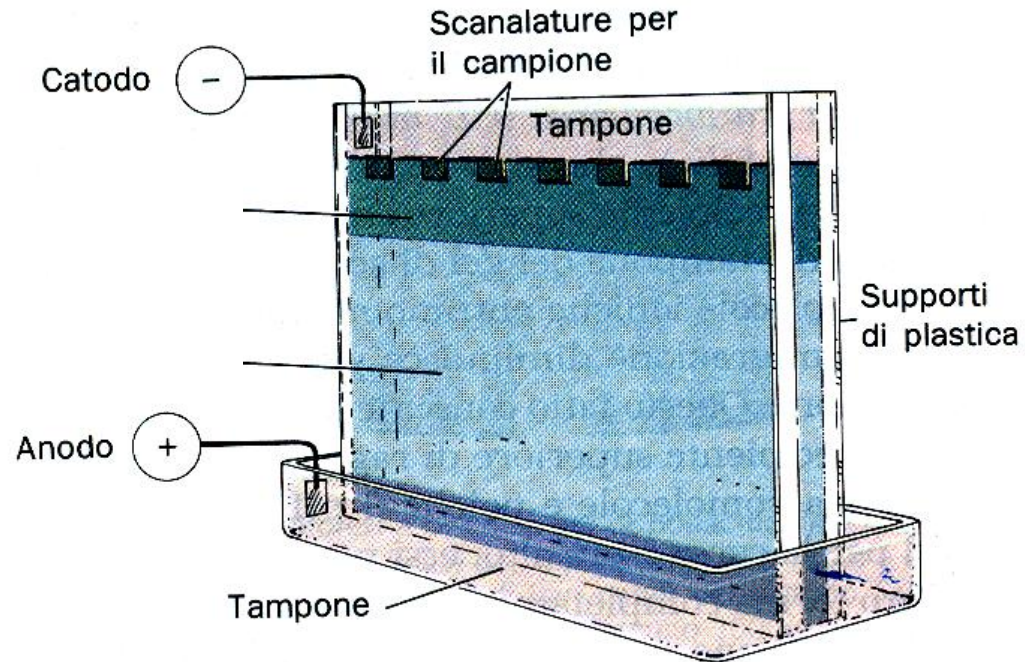
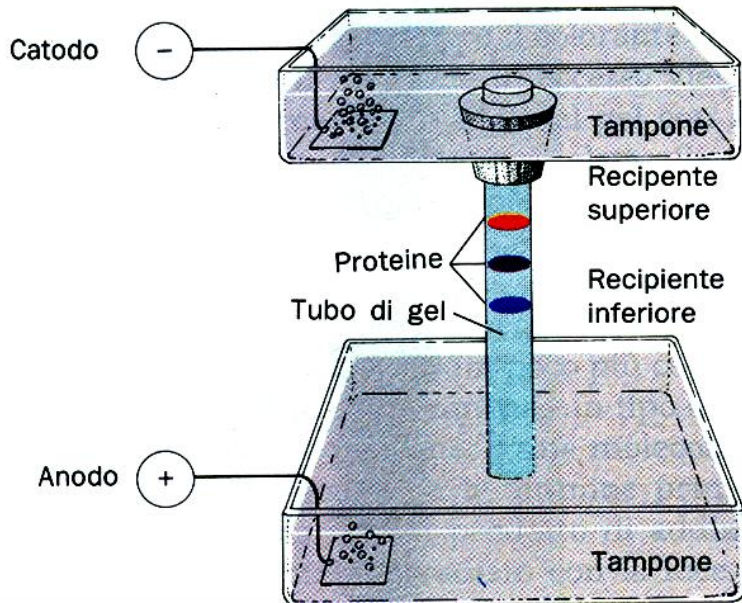
Camere elettroforetiche:

Elettroforesi su carta e su acetato di cellulosa

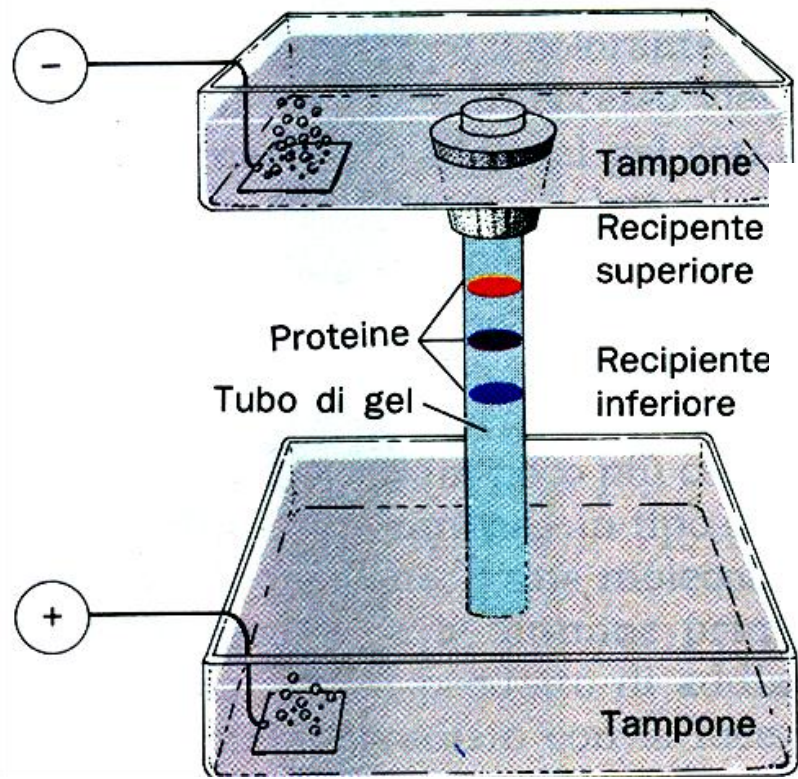


Elettroforesi su gel di agarosio

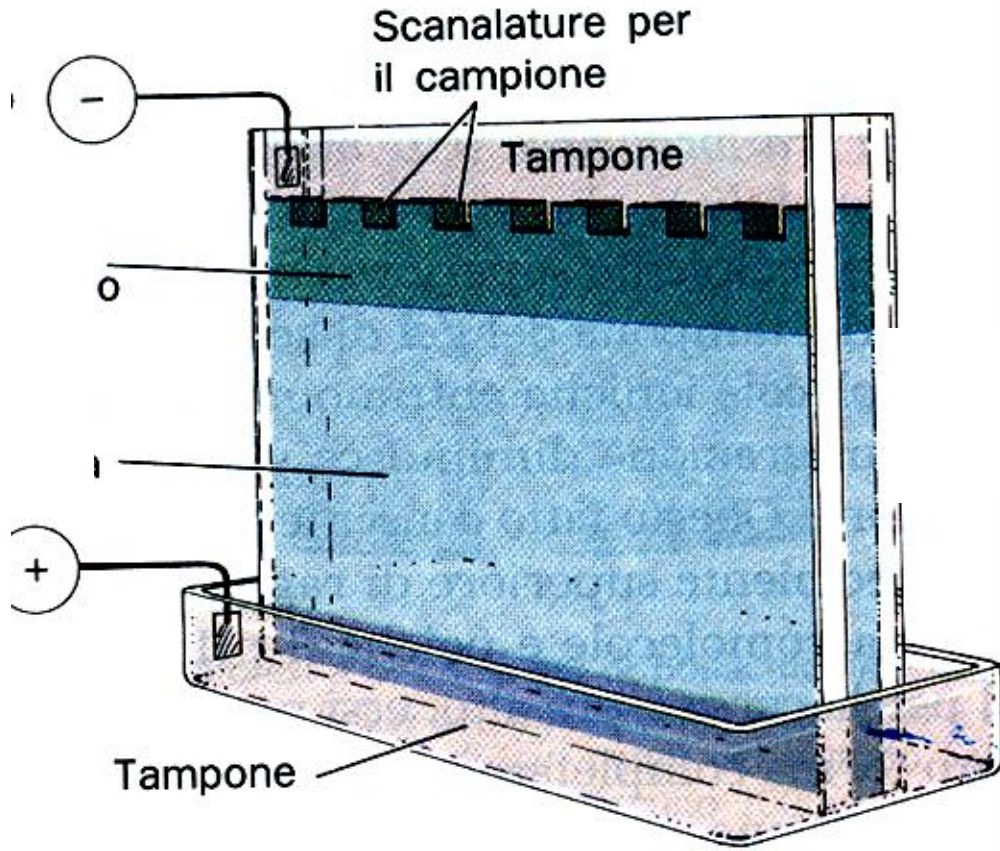
Elettroforesi su gel di poliacrilamide



Gel elettroforesi su tubicino

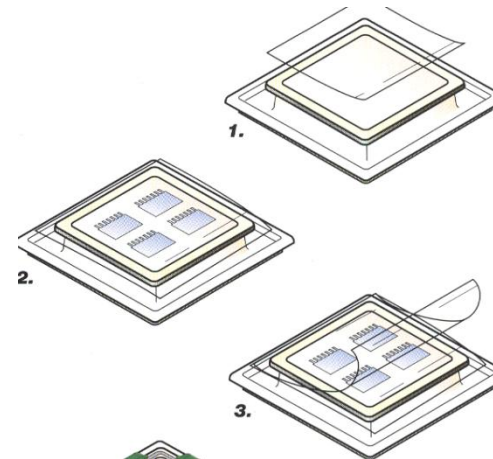
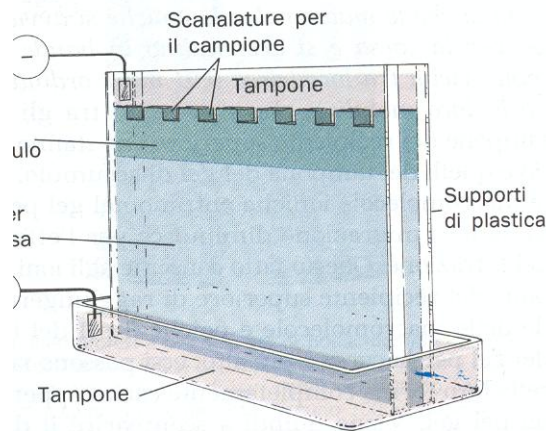


Gel elettroforesi su lastrina

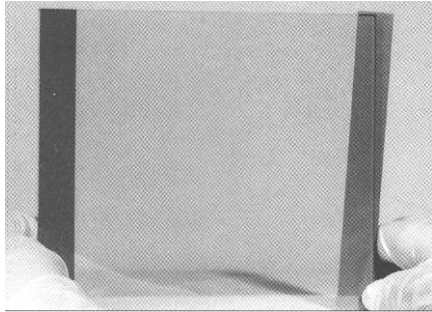


FASI della SEPARAZIONE ELETTROFORETICA

- Preparazione del gel
- Preparazione e Caricamento campioni
- Corsa Elettroforetica
- Interruzione Campo Elettrico
- Colorazione e Decolorazione
- Conservazione del gel



Allestimento delle lastrine



pettine

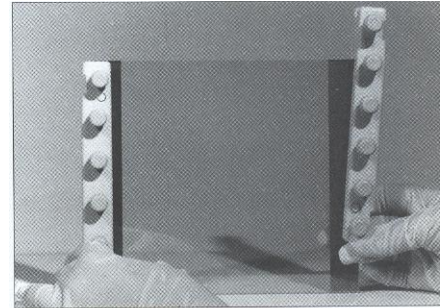


Figure 2.2B. Attaching the clamp

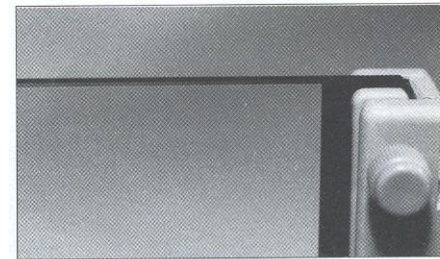


Figure 2.2C. Properly assembled gel sandwich. Glass plates and spacer are flush with the raised ribs on the end of the clamp.

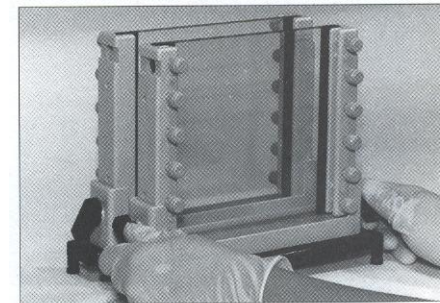
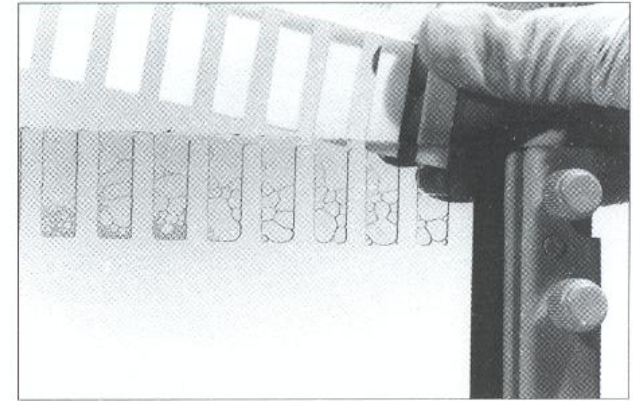
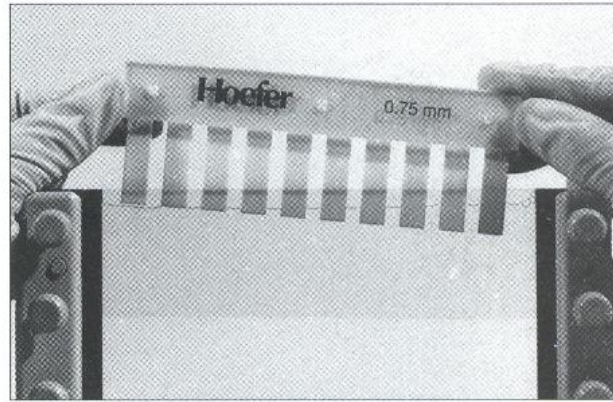
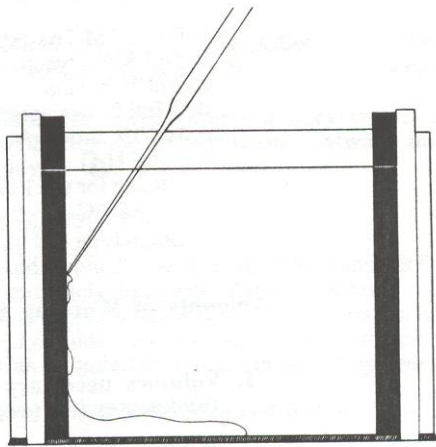
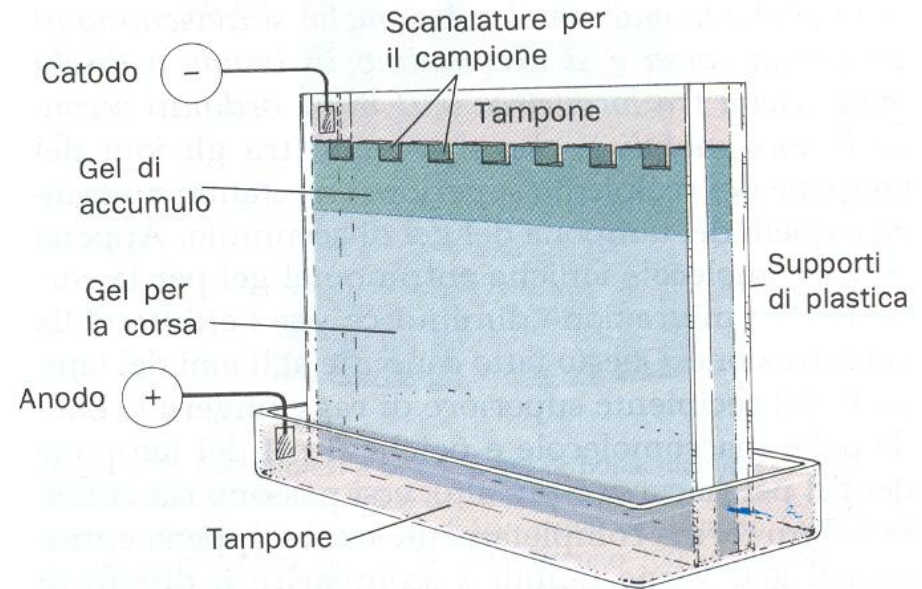
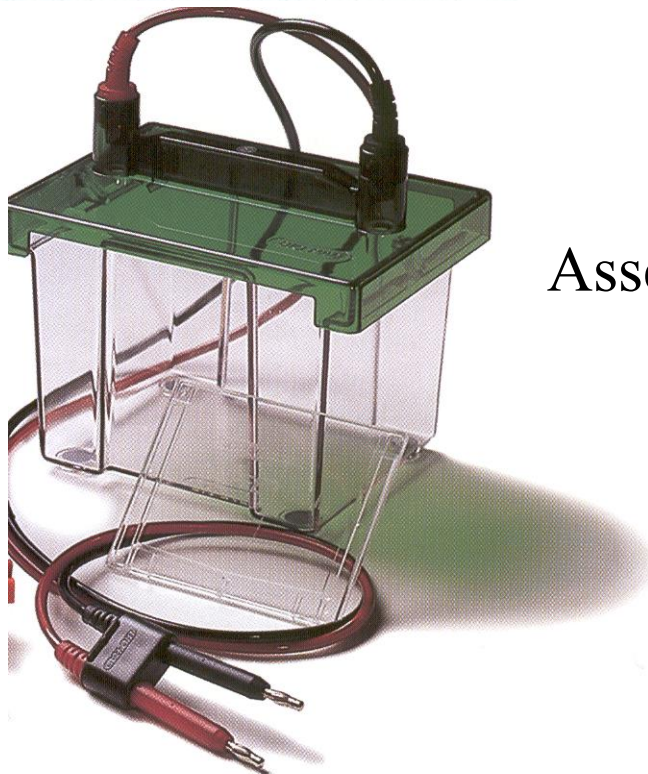
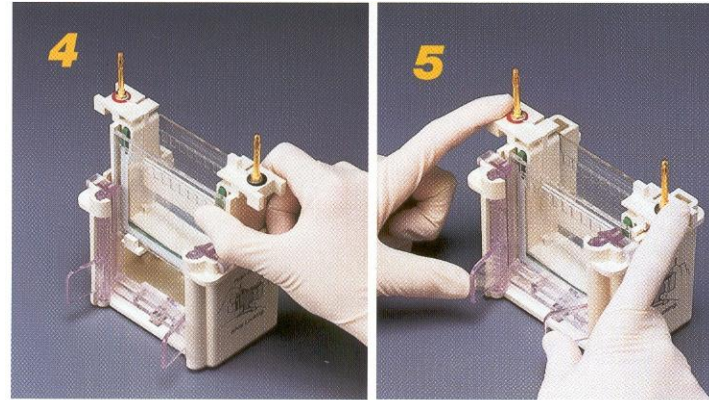
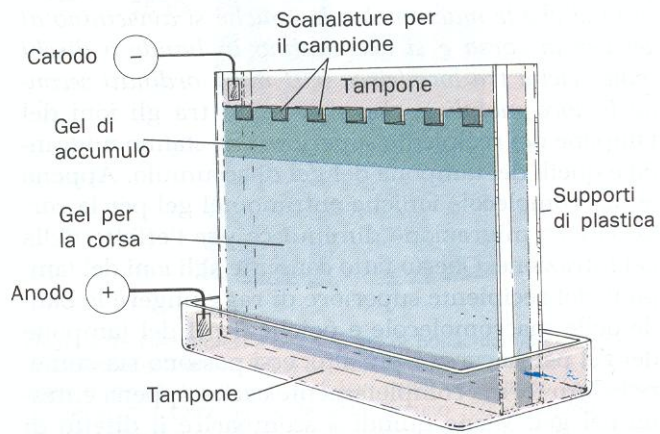


Figure 2.2D. Assembling the gel casting stand (step 1). The black cams are turned to seal the bottom surface of the sandwich into the casting stand gasket.



Preparazione del gel: •Pozzetti





Assemblaggio della camera elettroforetica

Per preparare un gel di poliacrilamide (x PAGE nativa) occorre:

- Soluzione acquosa contenente i monomeri di acrilamide e bisacrilamide
- Soluzione tampone
- Catalizzatori

$$\%T = \frac{\text{acrilamide (g)} + \text{bis acrilam (g)}}{\text{volume (ml)}} \times 100$$

$$\%C = \frac{\text{bis acrilam (g)}}{\text{acrilamide (g)} + \text{bis acrilam(g)}} \times 100$$

I gel di poliacrilamide possono essere facilmente preparati in laboratorio scegliendo opportunamente il valore di T più corretto (può variare tra 3 e 20%) e mantenendo costante il valore di C%

T ↑ = maglie strette → molecole rallentate in base alle loro dimensioni

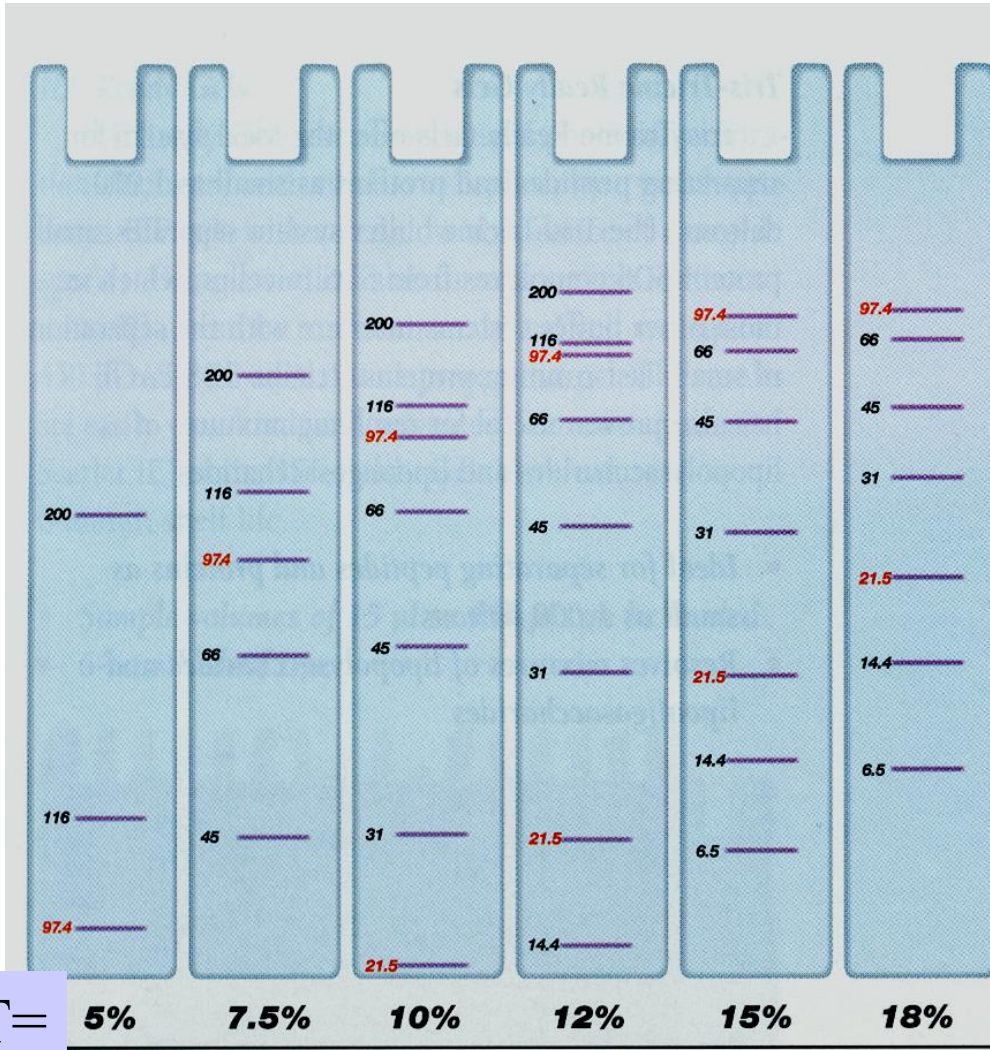
T ↓ = maglie larghe → rallenta solo le molecole più grandi

La gel elettroforesi è molto risolutiva perché separa le molecole cariche sfruttando l'effetto frizionale

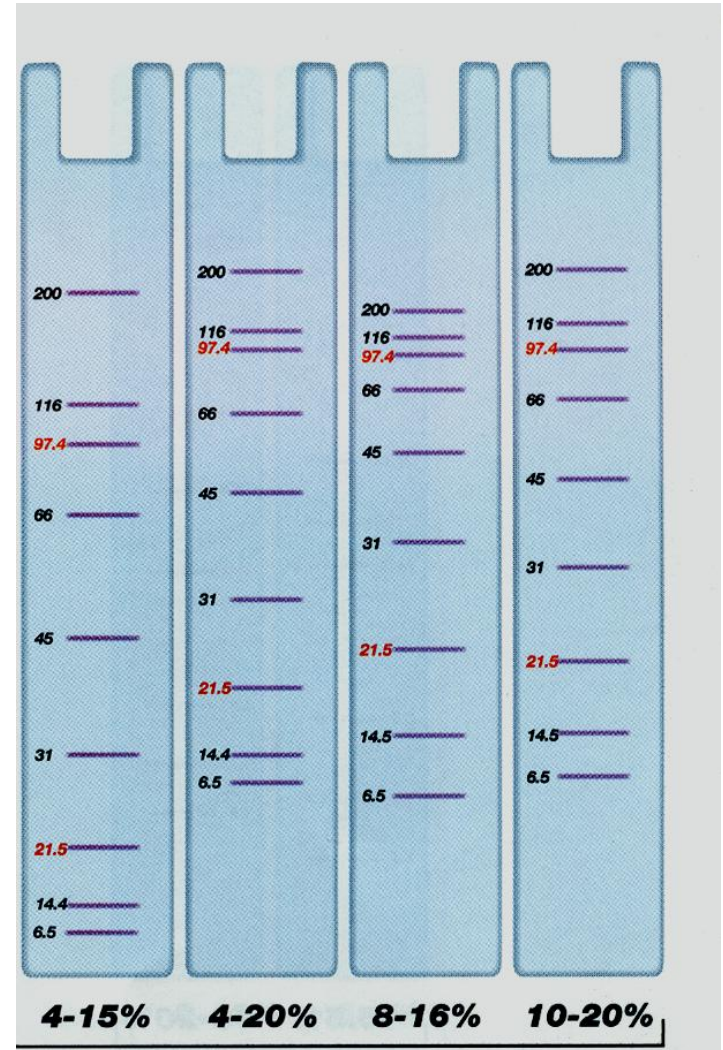
$$\mu = q/f$$

Nell'elettroforesi su carta l'effetto frizionale è minimo, la separazione avviene principalmente in base alla carica,
Può essere usata per molecole piccole

T costante



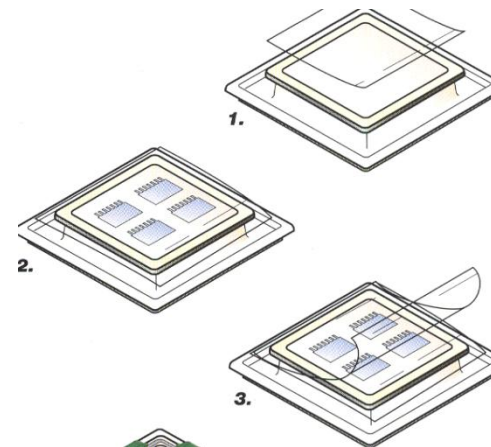
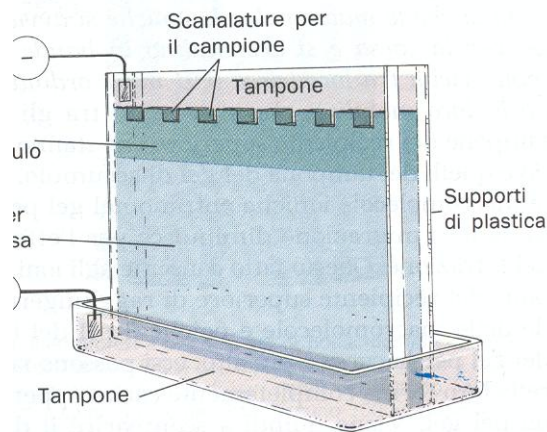
T in gradiente



T=

FASI della SEPARAZIONE ELETTROFORETICA

- Preparazione del gel
- Preparazione e Caricamento campioni
- Corsa Elettroforetica
- Interruzione Campo Elettrico
- Colorazione e Decolorazione
- Conservazione del gel



FASI della SEPARAZIONE ELETTROFORETICA

- Preparazione del gel
- **Preparazione e Caricamento campioni**
- Corsa Elettroforetica
- Interruzione Campo Elettrico
- Colorazione e Decolorazione
- Conservazione del gel

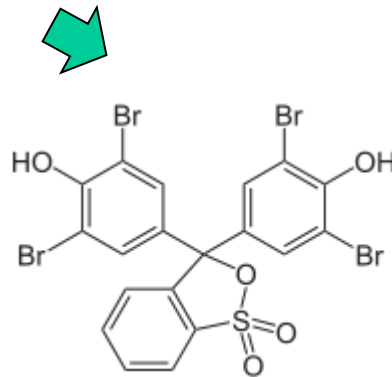


Preparazione campioni proteici:

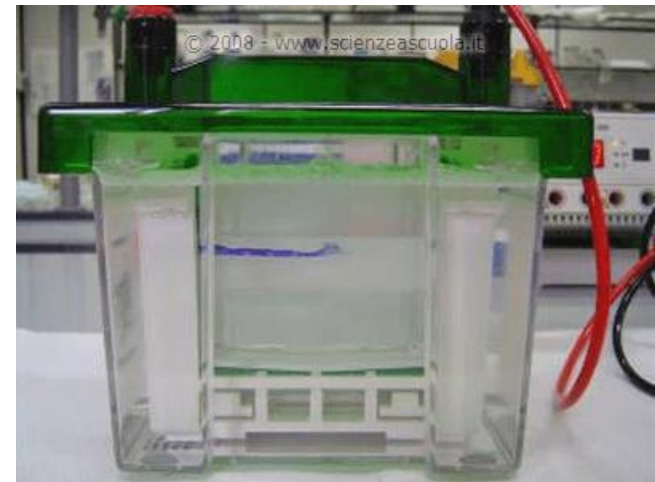
- **soluzione tampone** (a pH opportuno)
- **glicerolo** (per aumentarne la densità)
- **tracciante p.es. blue di bromofenolo**



- carica (-)
- colorata
- basso PM



MW= 669.96



FASI della SEPARAZIONE ELETTROFORETICA

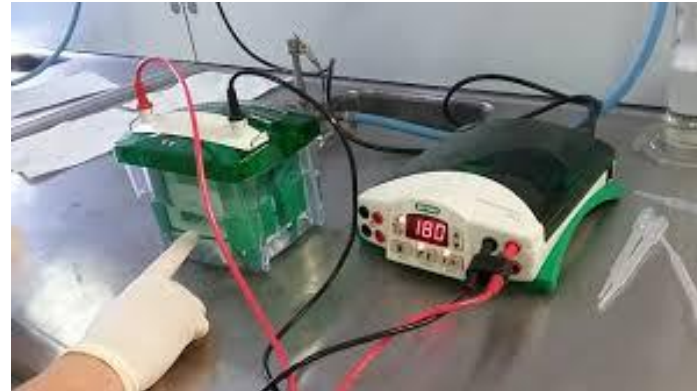
- Preparazione del gel
- Preparazione e Caricamento campioni
- **Corsa Elettroforetica**
- **Interruzione Campo Elettrico**
- Colorazione e Decolorazione
- Conservazione del gel

Durata ?

proteine non sono visibili

Interrompiamo l'applicazione della corrente quando il tracciante arriva alla fine del gel

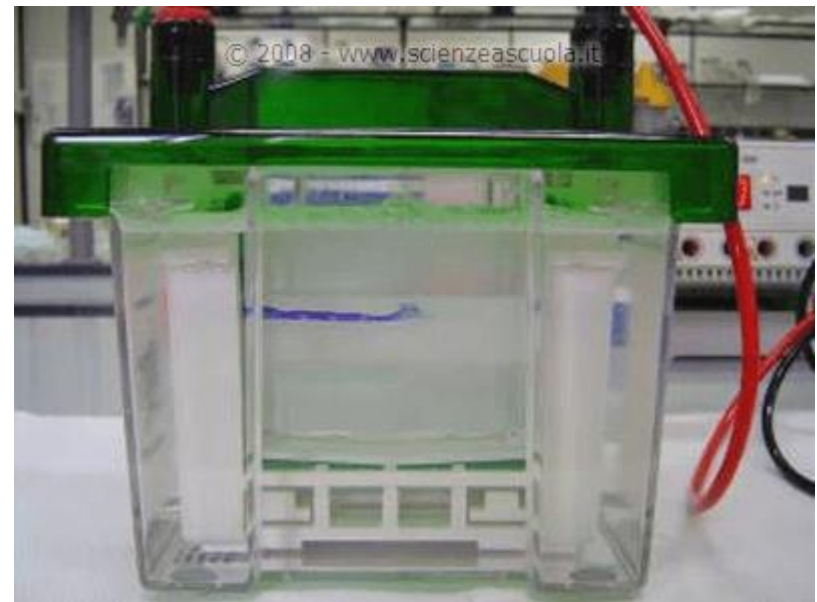
Perché siamo sicuri che le proteine, che hanno una mobilità elettroforetica $<$ rispetto al tracciante (PM $>$), non sono fuoriuscite dal gel



Perché ?

Tracciante:

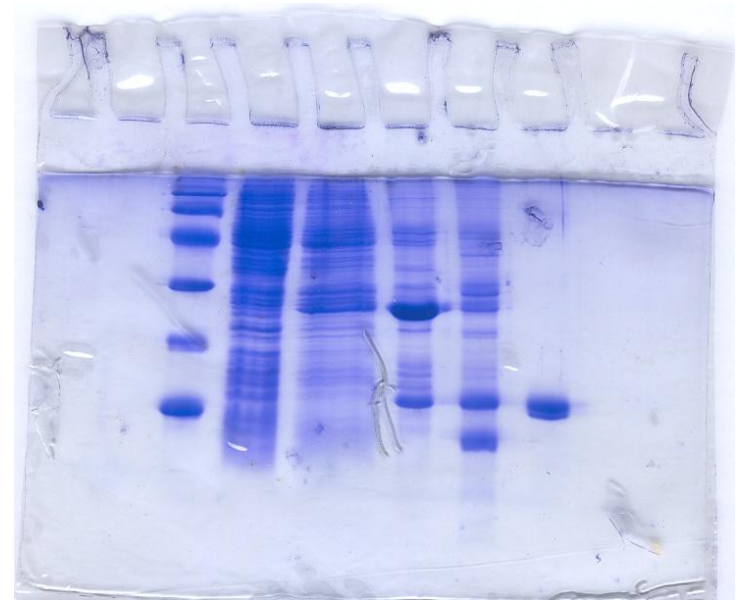
- carica (-)
- colorata
- basso PM



FASI della SEPARAZIONE ELETTROFORETICA

- Preparazione del gel
- Preparazione e Caricamento campioni
- Corsa Elettroforetica
- Interruzione Campo Elettrico
- Colorazione e Decolorazione
- Conservazione del gel

- 1) Fissaggio proteine
- 2) Colorazione



si può fare 1+2

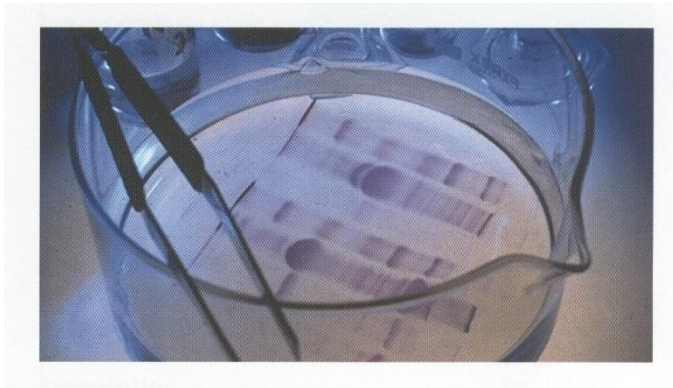
colorante x proteine p.e. (Coomassie Brilliant Blue)

in soluzione **alcolica/acida**

(dobbiamo denaturare le proteine x fissarle al gel)

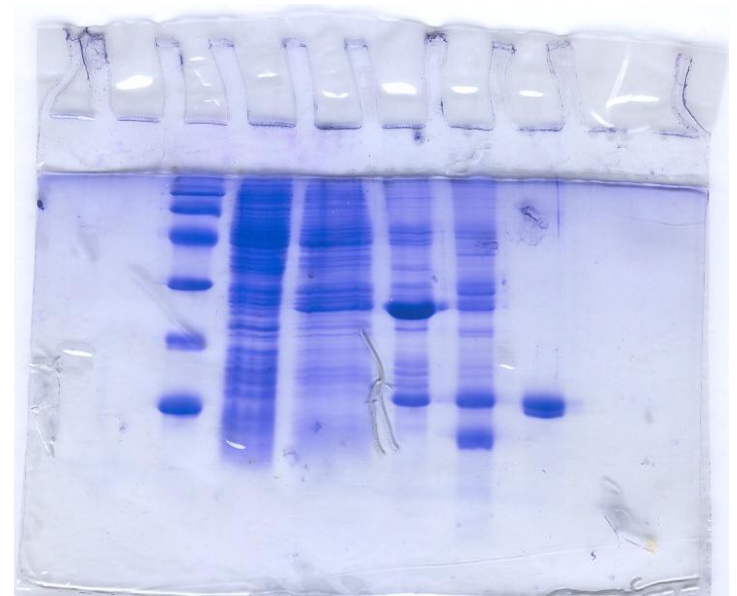
3) Decolorazione

una serie di lavaggi del gel con la soluzione alcolica/acida
per allontanare il colorante legato in maniera aspecifica alle
porzioni del gel che non contengono proteine



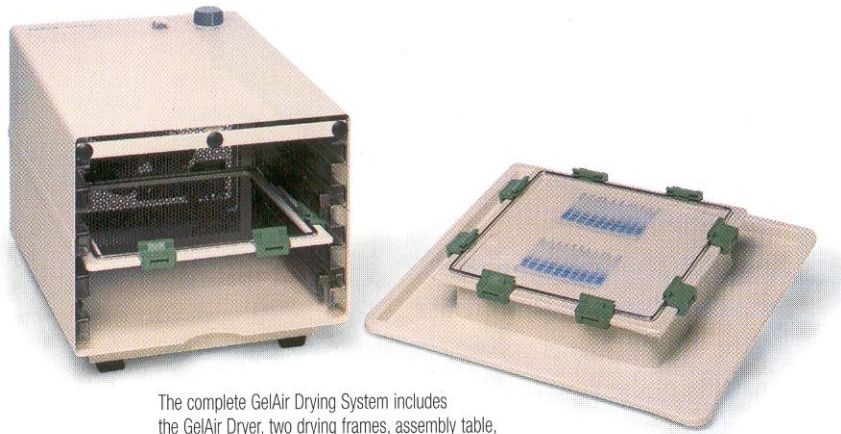
Coomassie BioSafe:

↓ Conc soluzione alcolica/acida
Decolorazione in acqua

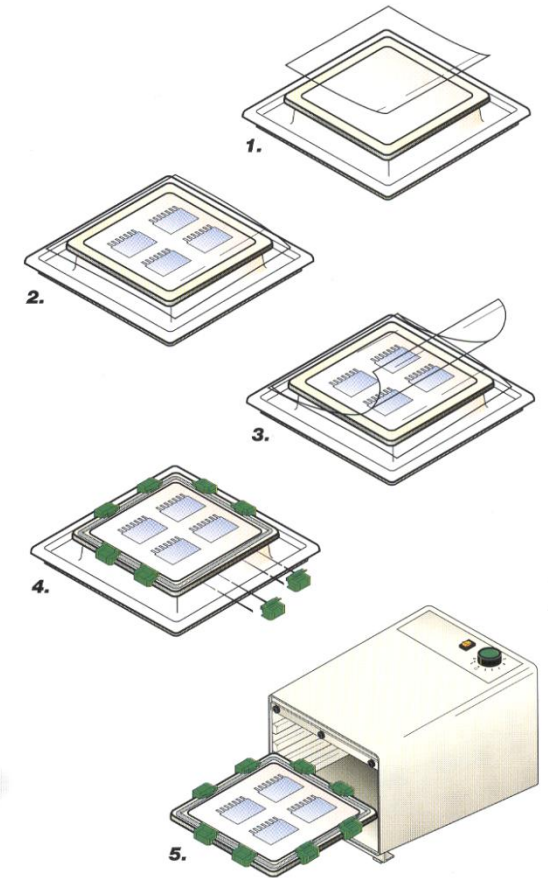


FASI della SEPARAZIONE ELETTROFORETICA

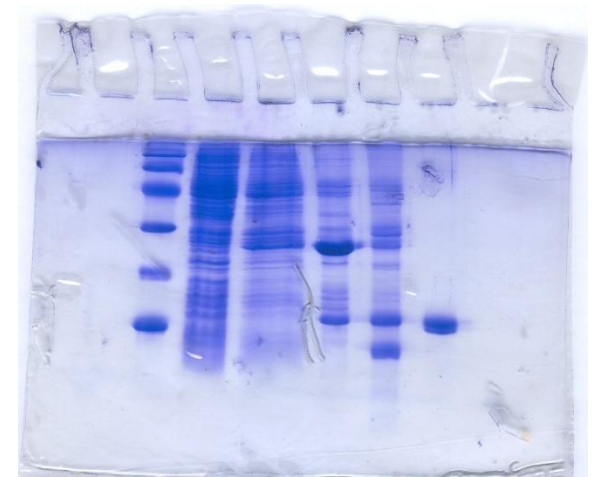
- Preparazione del gel
- Preparazione e Caricamento campioni
- Corsa Elettroforetica
- Interruzione Campo Elettrico
- Colorazione e Decolorazione
- Conservazione del gel



The complete GelAir Drying System includes the GelAir Drying System, two drying frames, assembly table, cellophane, and Gel Drying Solution.



- x la conservazione a lungo termine
i gel vengono essiccati fra due fogli di
cellophane
- all'aria
 - incubatore a temperatura > ambiente



Tecniche elettroforetiche **su gel di poliacrilamide:**

1) In condizioni native (PAGE nativa)

2) **In condizioni denaturanti in presenza del detergente ionico SDS (SDS-PAGE)
separa le proteine unicamente in base al PM**

3) **In gradiente di pH (Isoelettrofocalizzazione: IEF)
separa le proteine unicamente in base al pI**

4) Elettroforesi in condizioni denaturanti (AUT-PAGE)

5) **Elettroforesi Bidimensionale (2D-PAGE)= IEF e SDS
separa le proteine in base al pI e al PM**

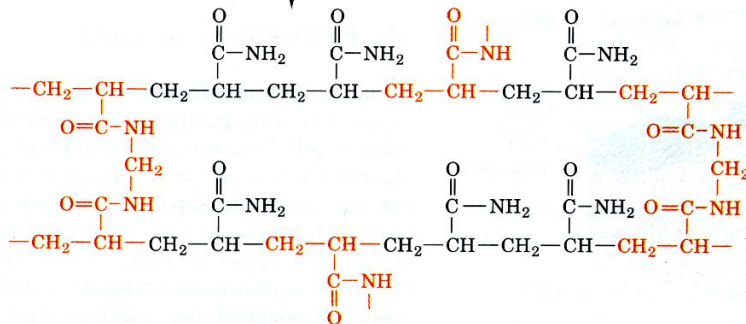
(PAGE nativa)

Preparazione del Gel di poliacrilamide:

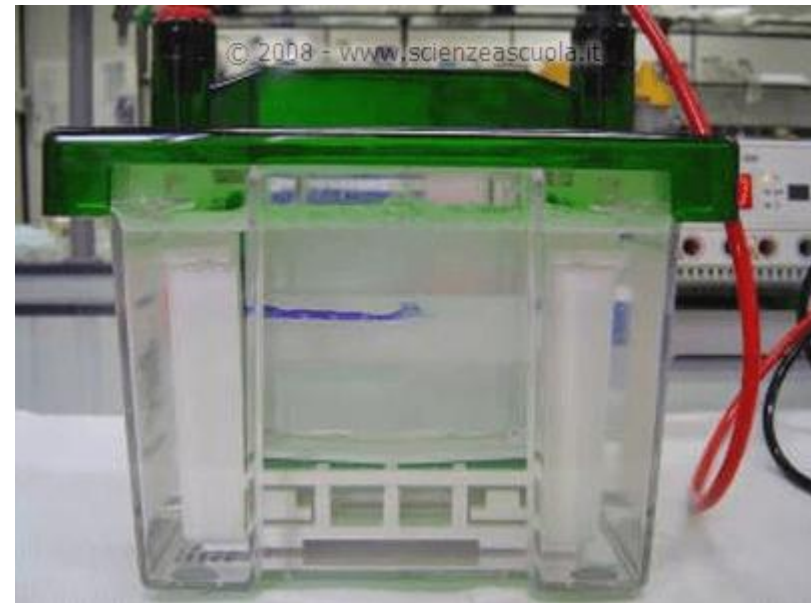
- Soluzione acquosa contenente i monomeri di acrilamide e bisacrilamide
- Catalizzatori (AP e TEMED)

• $S_2O_8^{2-}$ (Ione Persolfato)

$(CH_3)_2N-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$
N,N,N',N' tetrametil-etilendiamina

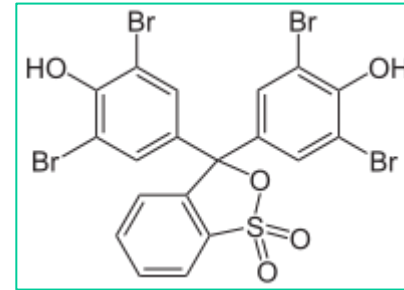


acrilamide e bisacrilamide



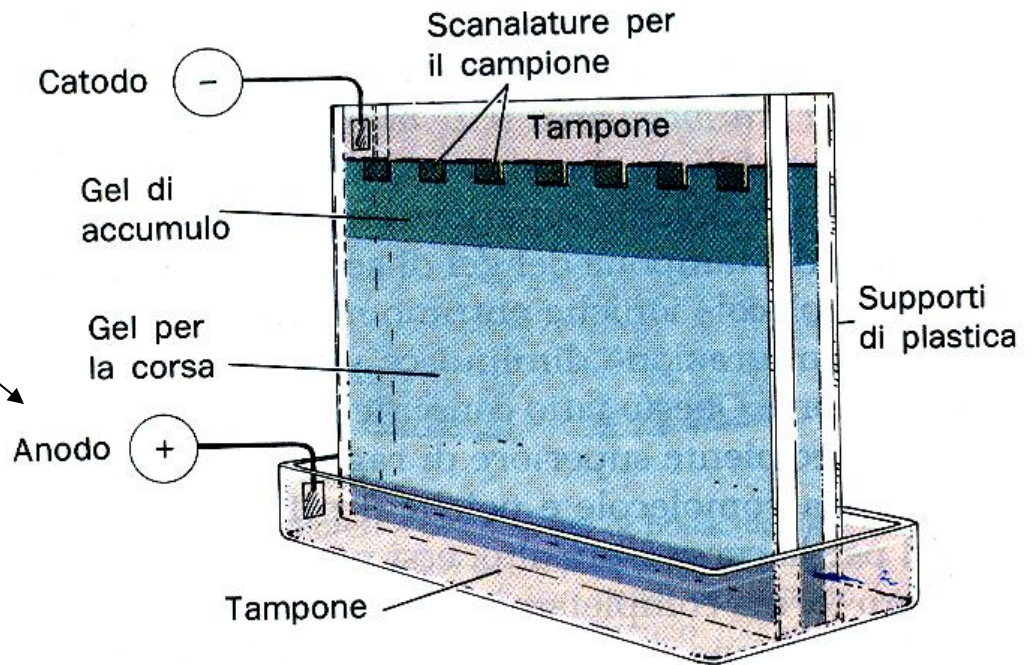
•Preparazione del campione:

- Proteine
- Tampone a pH basico
- Blu di bromo fenolo
- Glicerolo



Ad un pH basico (pH=8) tutte le proteine saranno cariche negativamente e migreranno verso il polo positivo (anodo)

Proteine
(-)



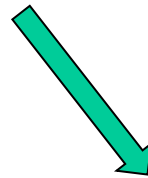
(PAGE nativa)

- Cella elettroforetica

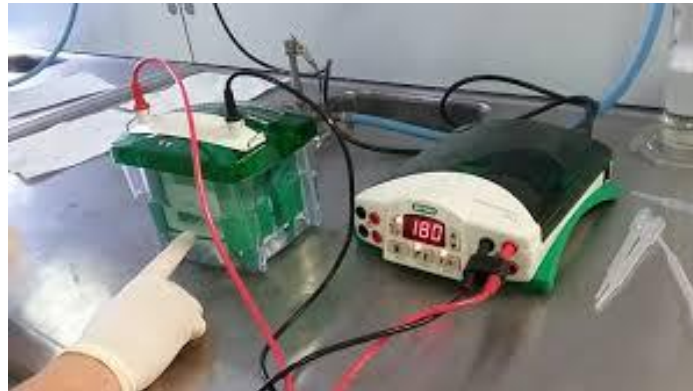
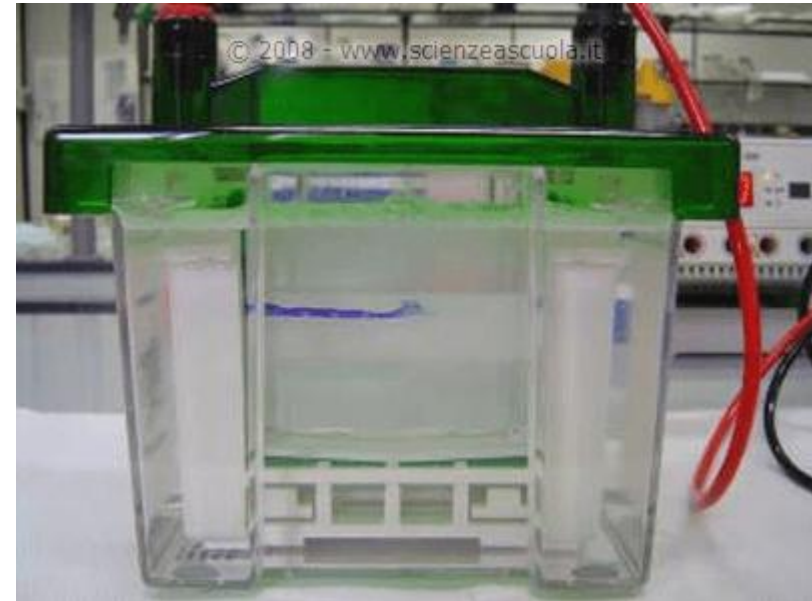
Soluzione tampone a pH basico (pH 8)

- Corsa elettroforetica

Voltaggio costante (180 V)



- Fissazione
- Colorazione
- Decolorazione



Tecniche elettroforetiche **su gel di poliacrilamide:**

1) In condizioni native (PAGE nativa)

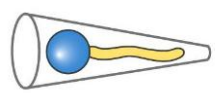
2) **In condizioni denaturanti in presenza del detergente ionico SDS (SDS-PAGE)
separa le proteine unicamente in base al PM**

3) **In gradiente di pH (Isoelettrofocalizzazione: IEF)
separa le proteine unicamente in base al pI**

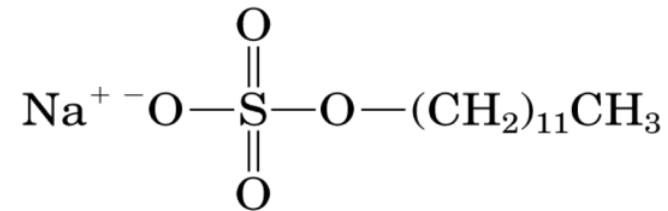
4) Elettroforesi in condizioni denaturanti (AUT-PAGE)

5) **Elettroforesi Bidimensionale (2D-PAGE)= IEF e SDS
separa le proteine in base al pI e al PM**

SDS-PAGE



Elettroforesi su gel di poliacrilamide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS)

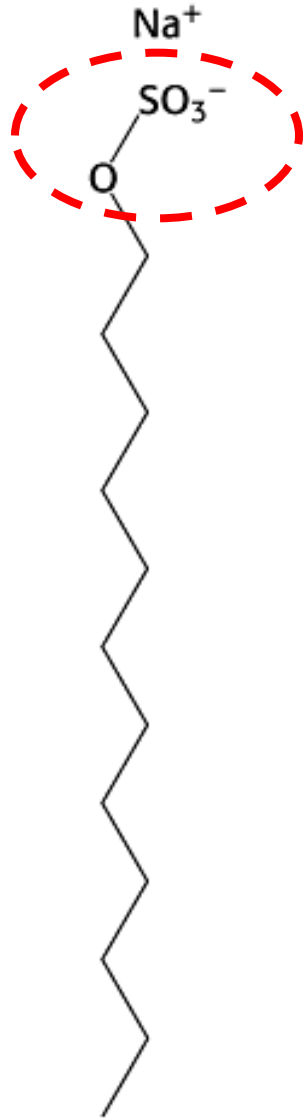


Il detergente ionico SDS interagisce con le proteine con un rapporto costante:

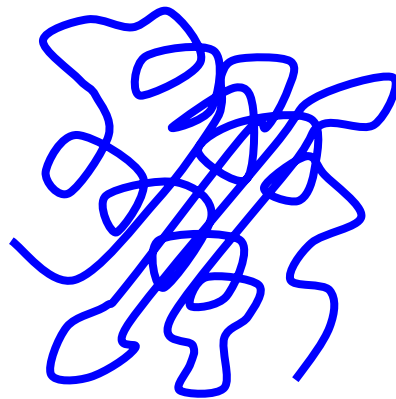
1 molecola di SDS ogni 2 residui aminoacidici

(1,4 g SDS/g proteina)

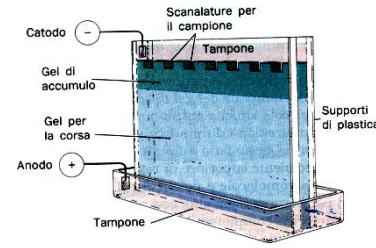
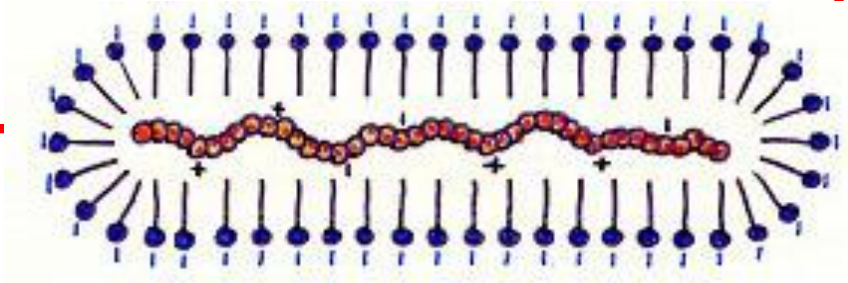
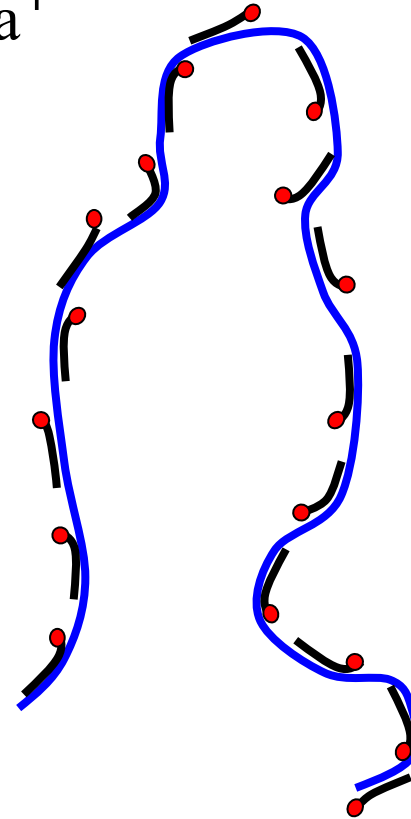
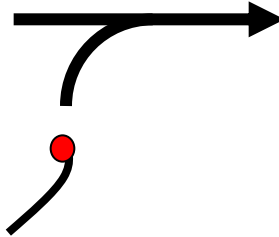
Sodio Dodecil Solfato



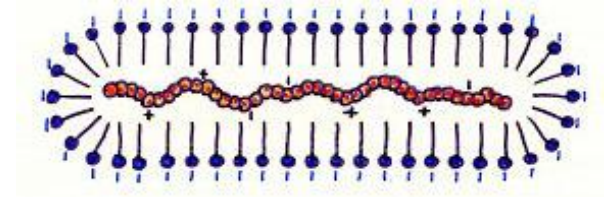
Sodio dodecil solfato (SDS)



proteina



La carica nativa della proteina viene mascherata:
tutti i complessi SDS-proteine sono carichi negativi



e l'intensità di carica q dei complessi SDS-proteine?

dipende dalle dimensioni molecolari della proteina

> **PM** > **intensità di carica -**

Carica/massa (q/m) dei complessi SDS-proteine?

è uguale per tutte le proteine (1 molecola SDS ogni 2 aminoacidi)

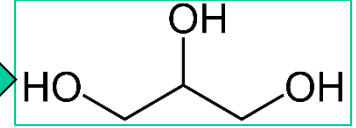
In SDS-PAGE le proteine si separano per l'effetto setaccio del gel di poliacrilamide in funzione delle loro dimensioni molecolari.

SDS-PAGE

condizioni
denaturanti

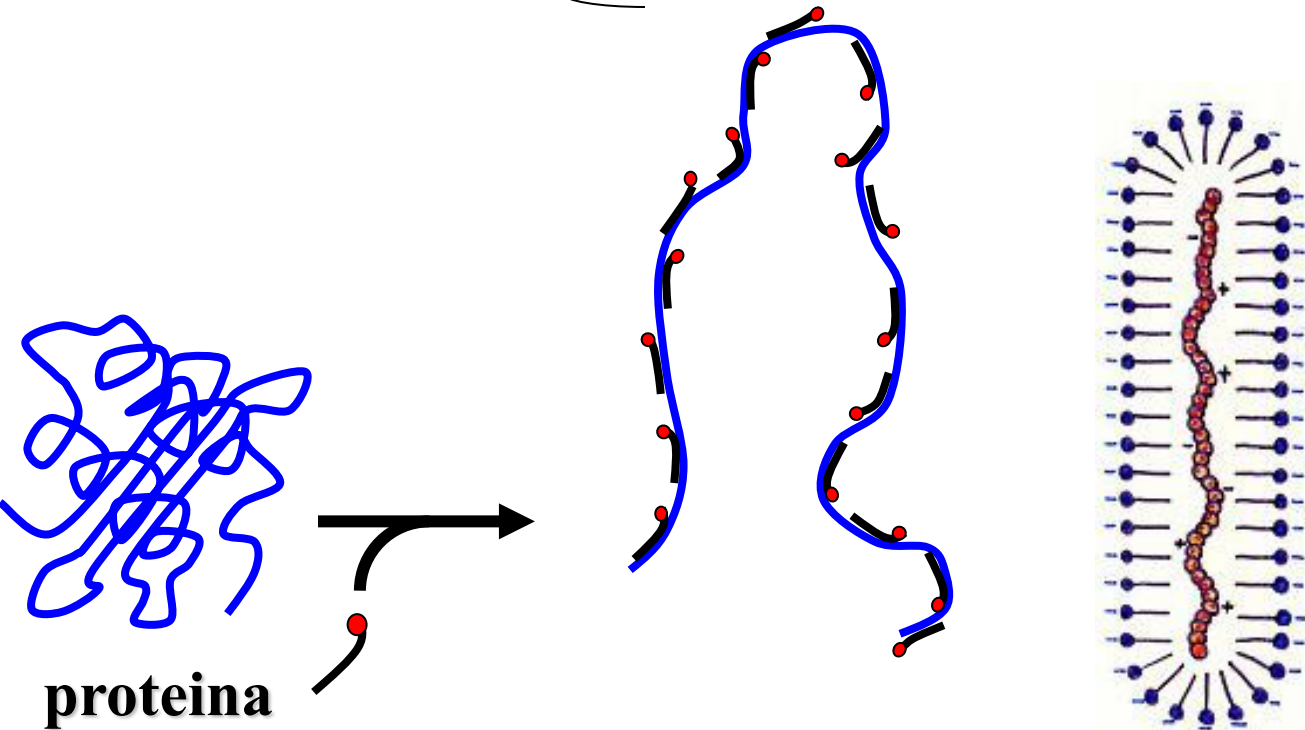
Preparazione campioni proteici:

- + soluzione tampone (a pH opportuno)
- + glicerolo (per aumentare la densità)
- + tracciante (blue di bromofenolo)



- + SDS (detergente ionico denaturante)
- + 2-mercaptoetanol (x rompere i ponti S-S)

HS-CH₂-CH₂-OH
2-mercaptoetanol

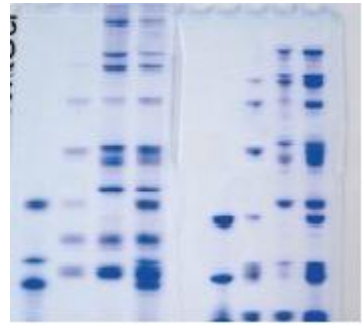


incubazione a 100°C x 5 minuti (denaturazione al calore, ma la proteina non precipita per la presenza del detergente che ne aumenta la solubilità!)

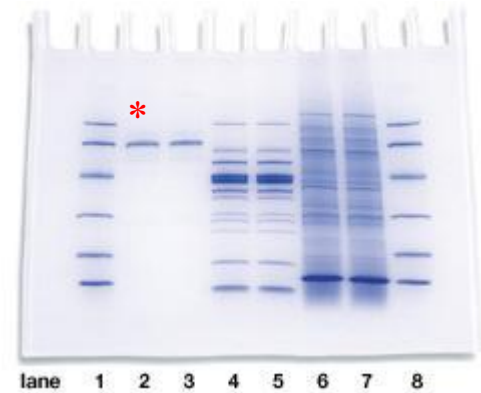
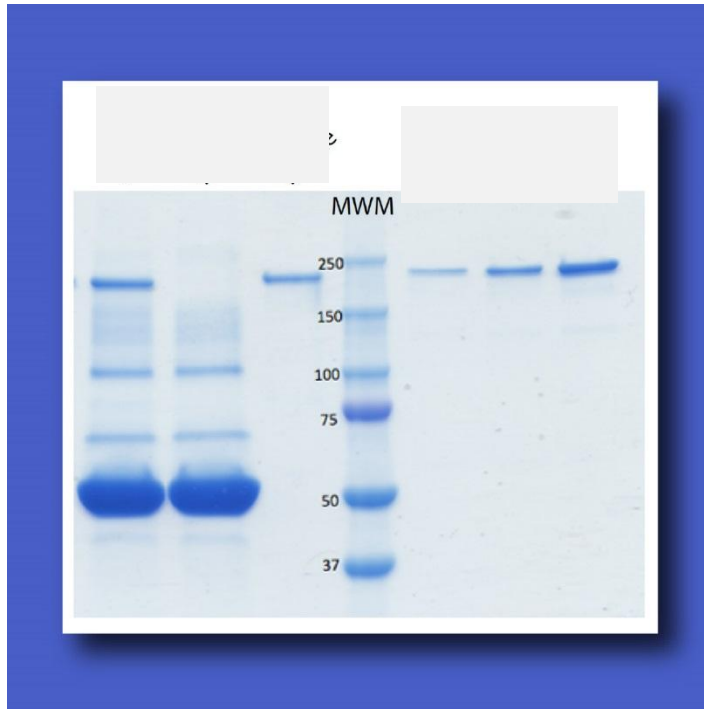
Applicazioni dell' SDS-PAGE

➔ •Analisi di miscele proteiche

➔ •Valutazione purezza di una proteina



•Determinazione PM

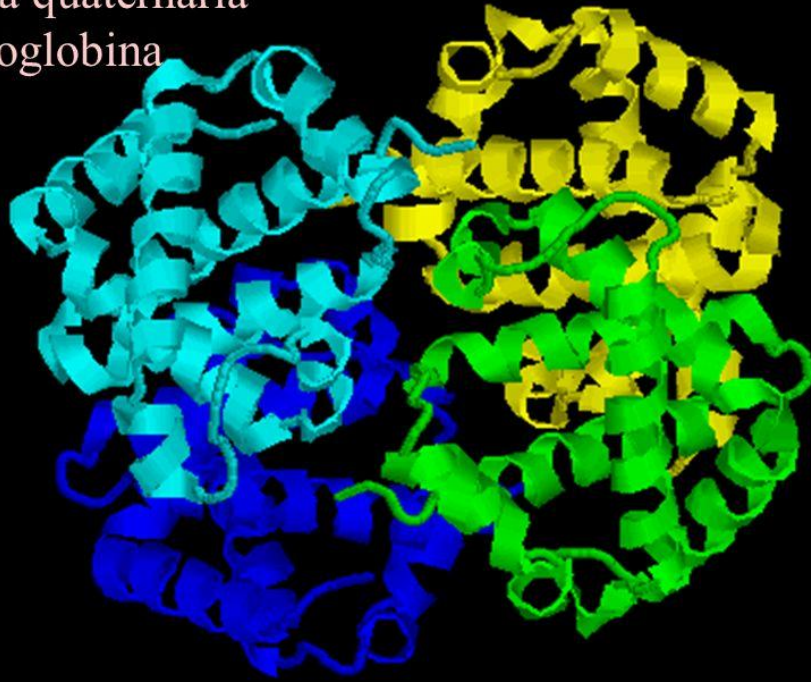


ATTENZIONE:

Si lavora in condizioni denaturanti :

le proteine pure con struttura IV possono presentare più di 1 banda

Struttura quaternaria
dell'emoglobina

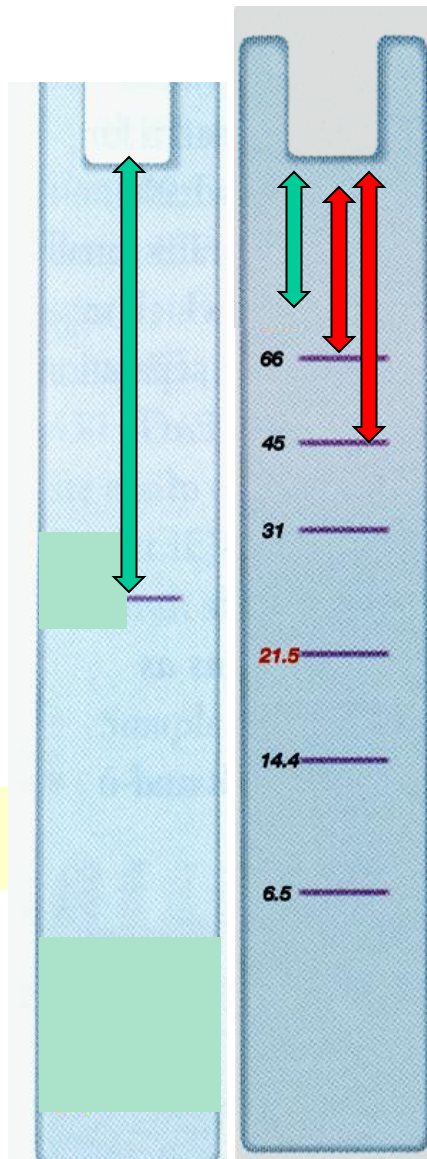


Determinazione PM mediante SDS-PAGE

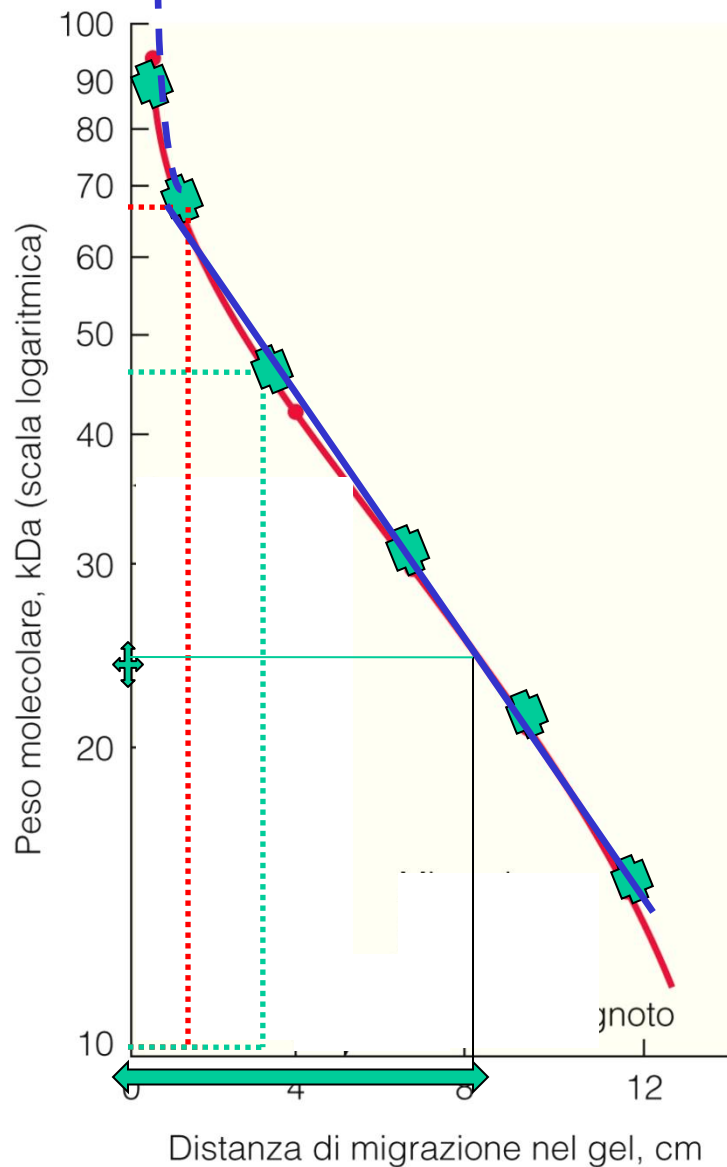
Condizioni denaturanti: PM delle subunità

Proteine a PM noto

Protein	MW
Phosphorylase b	97,400
Serum albumin	66,200
Ovalbumin	45,000
Carbonic anhydrase	31,000
Trypsin Inhibitor	21,500
Lysozyme	14,400
Aprotinin	6,500



Curva standard



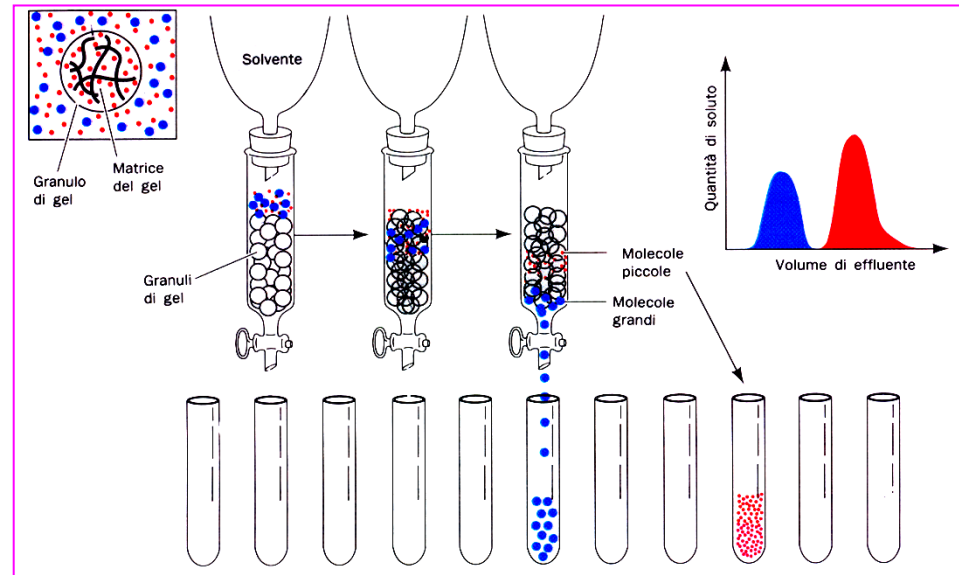
SDS-PAGE:

Condizioni denaturanti → PM subunità

Effetto setaccio: rallenta le molecole più grandi



Nella cromatografia x gel-filtrazione:



- Condizioni native → PM proteina con struttura quaternaria intatta
- Le molecole più grandi si muovono più velocemente

Ci aspettiamo di ottenere lo stesso PM dalla determinazione effettuata per una data proteina con le due tecniche?

I PM ottenuti per la stessa proteina con le due tecniche esaminate sono sempre coincidenti?

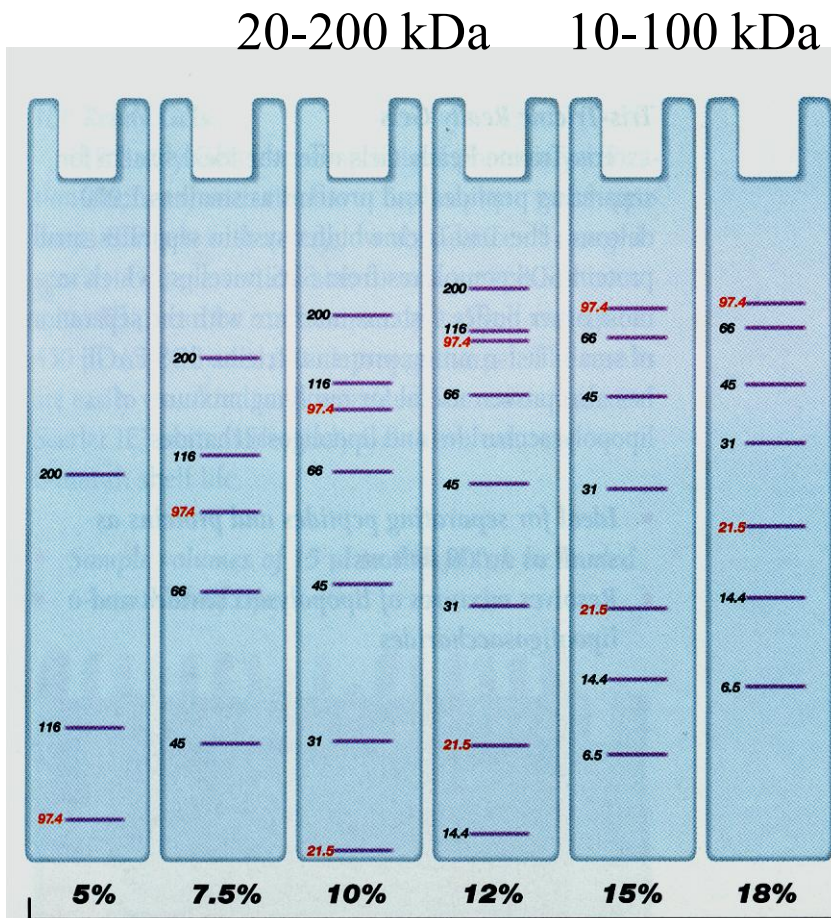
Nel caso di una proteina con struttura IV i valori di PM ottenuti con le due tecniche sono diversi

Nel caso di una proteina priva di struttura IV il PM ottenuto mediante gel cromatografia è simile al PM ottenuto mediante SDS-PAGE

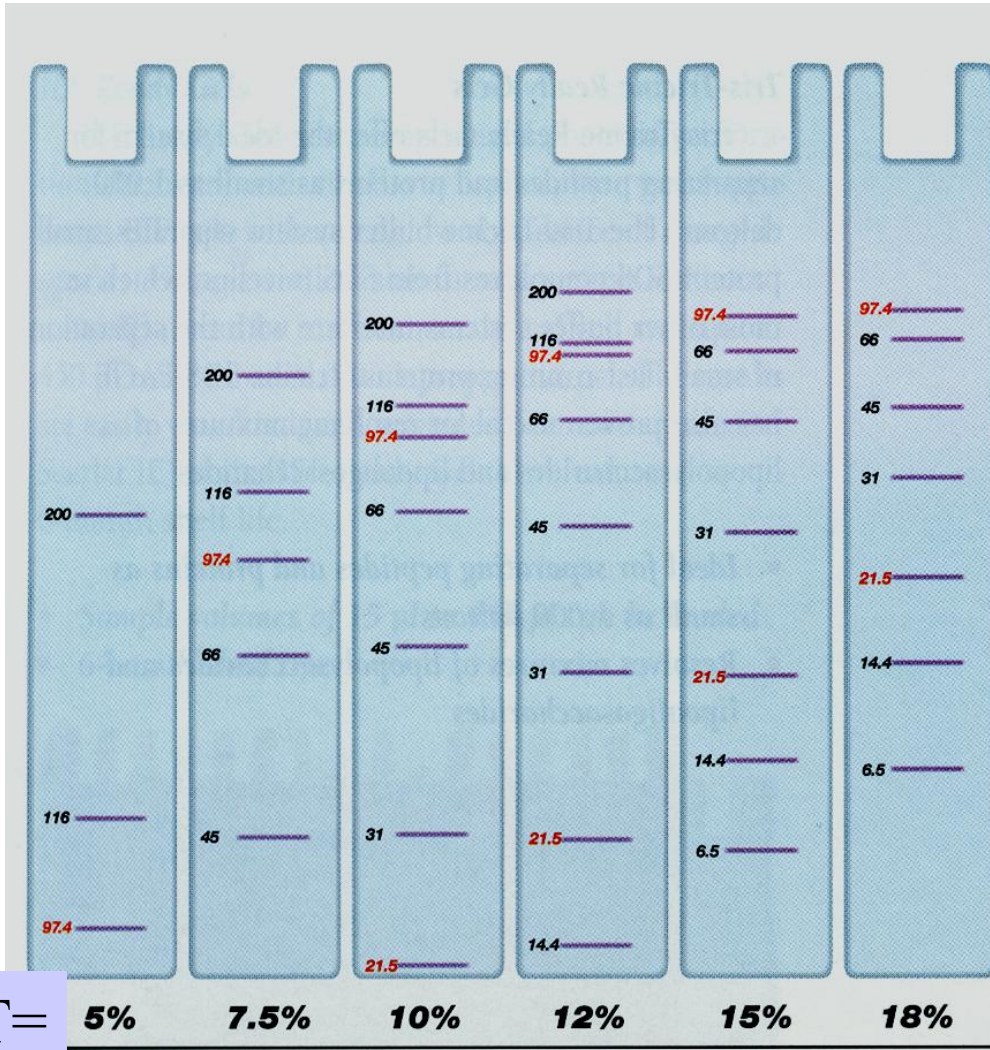
(ogni tecnica ha un suo errore sperimentale)

Per migliorare il potere risolutivo della PAGE:

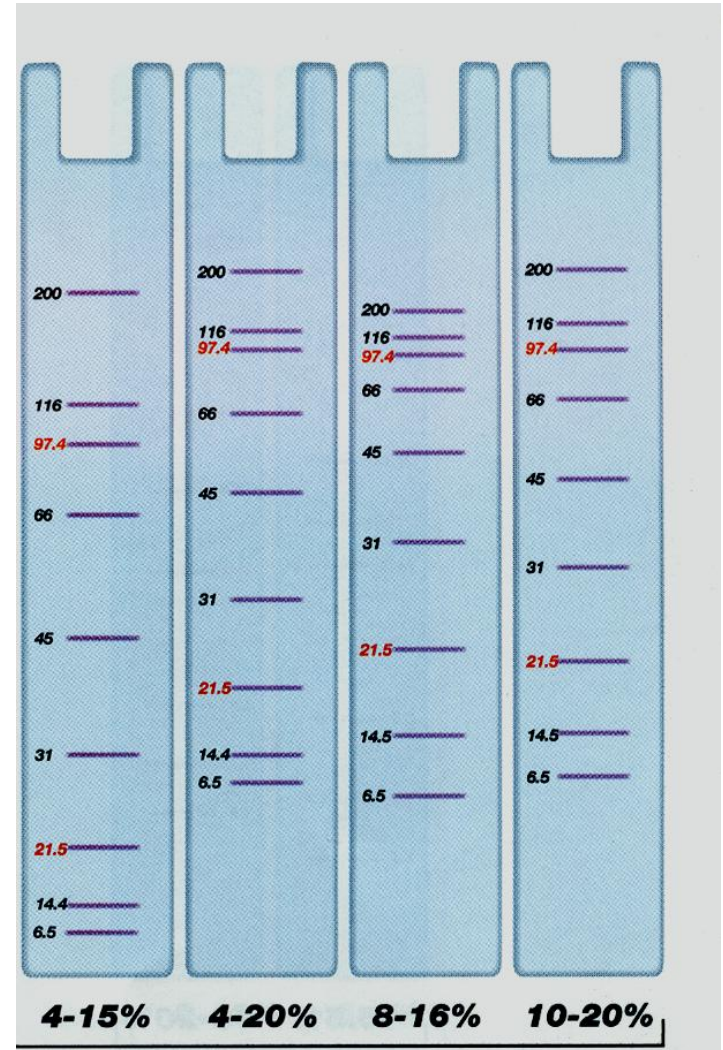
- Gel con T costante: Scegliere opportunamente il valore di T
- Gel con T in gradiente
- Gel discontinuo



T costante

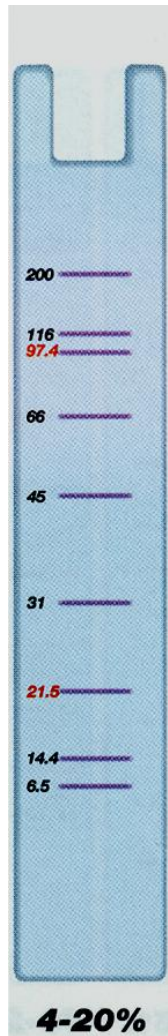


T in gradiente



T=

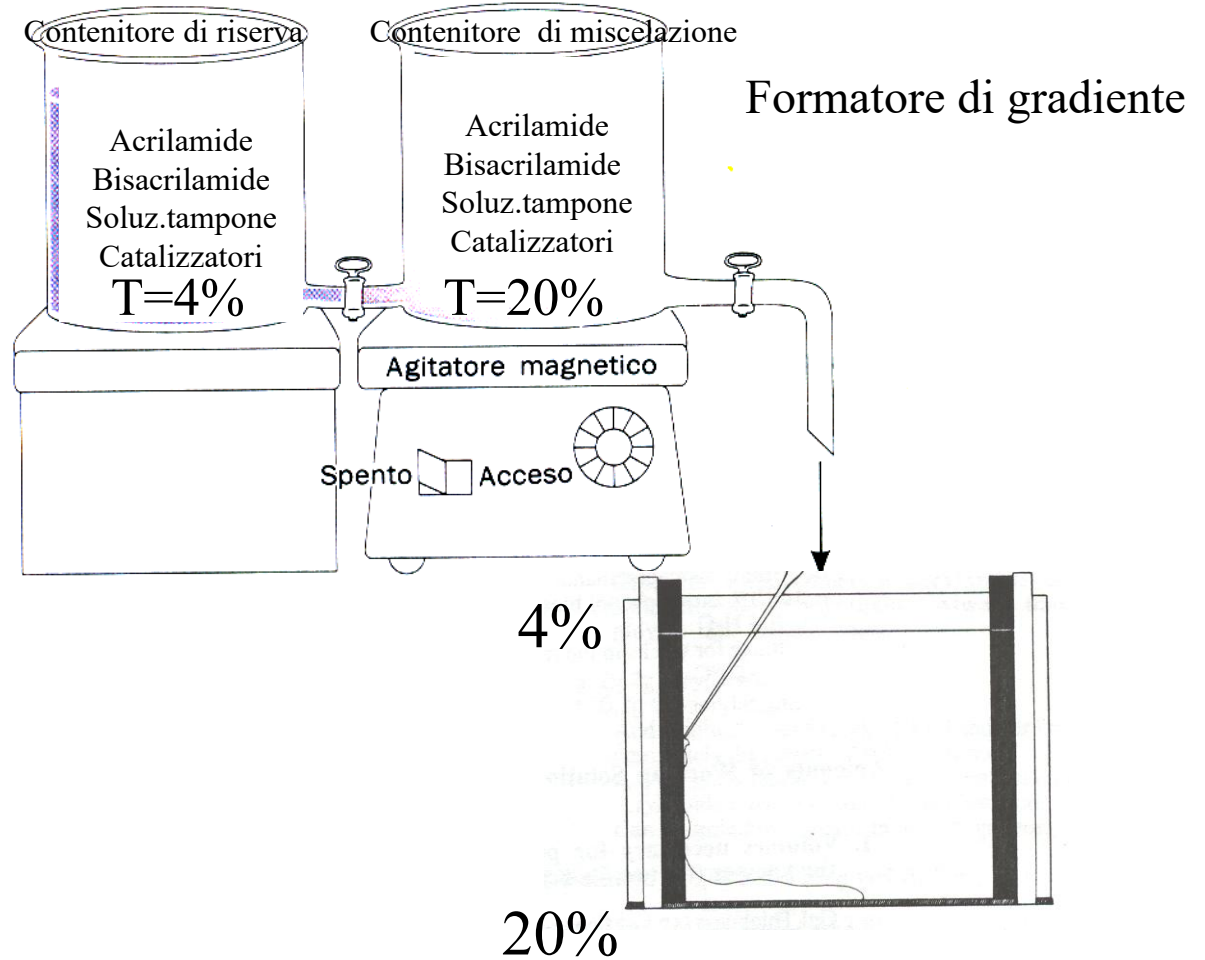
Gel in gradiente di concentrazione di acrilamide



4%

20%

4-20%



Per migliorare il potere risolutivo dell'elettroforesi: PAGE discontinua

Tampone della cella: Tris-glicina + SDS pH 8.3

- Gel inferiore
- Gel di separazione
- Running gel

T > 4% (7 - 18%)
Tris-HCl pH 8.8

- Gel superiore (Gel di impaccamento) (Stacking gel)

T = 4%
Tris-HCl pH 6.8

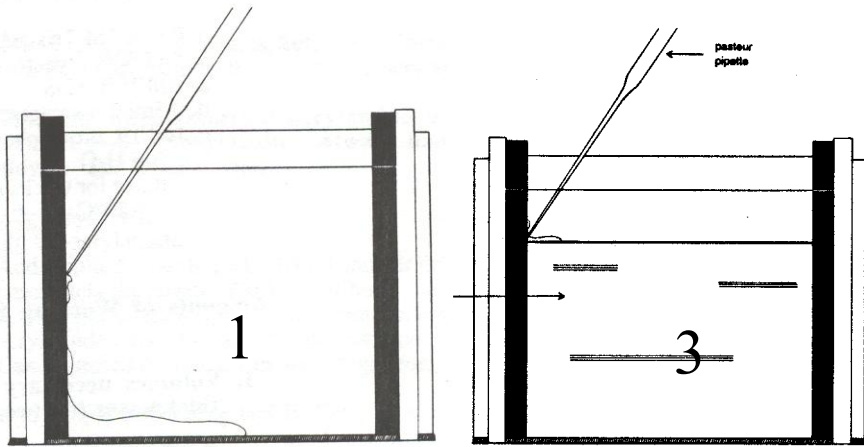
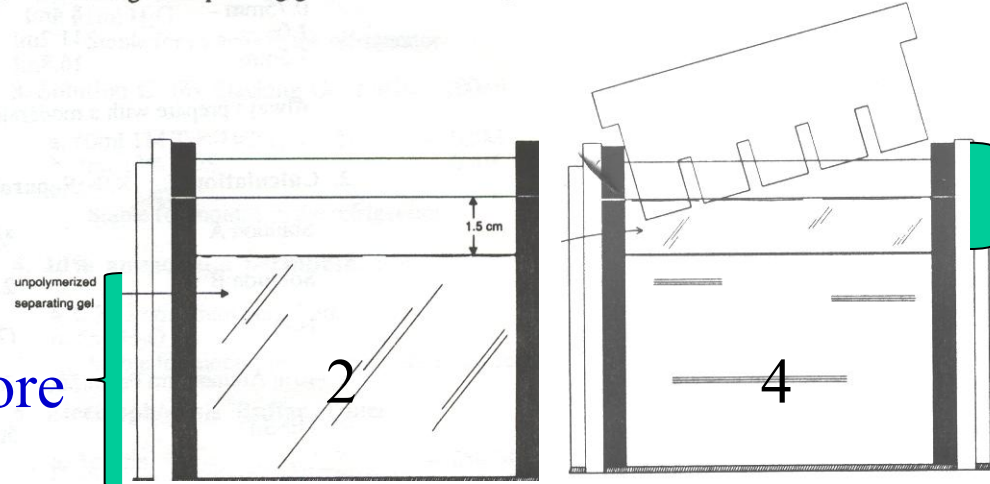


Figure 5.2. Introducing the separating gel solution into the gel

- Gel inferiore

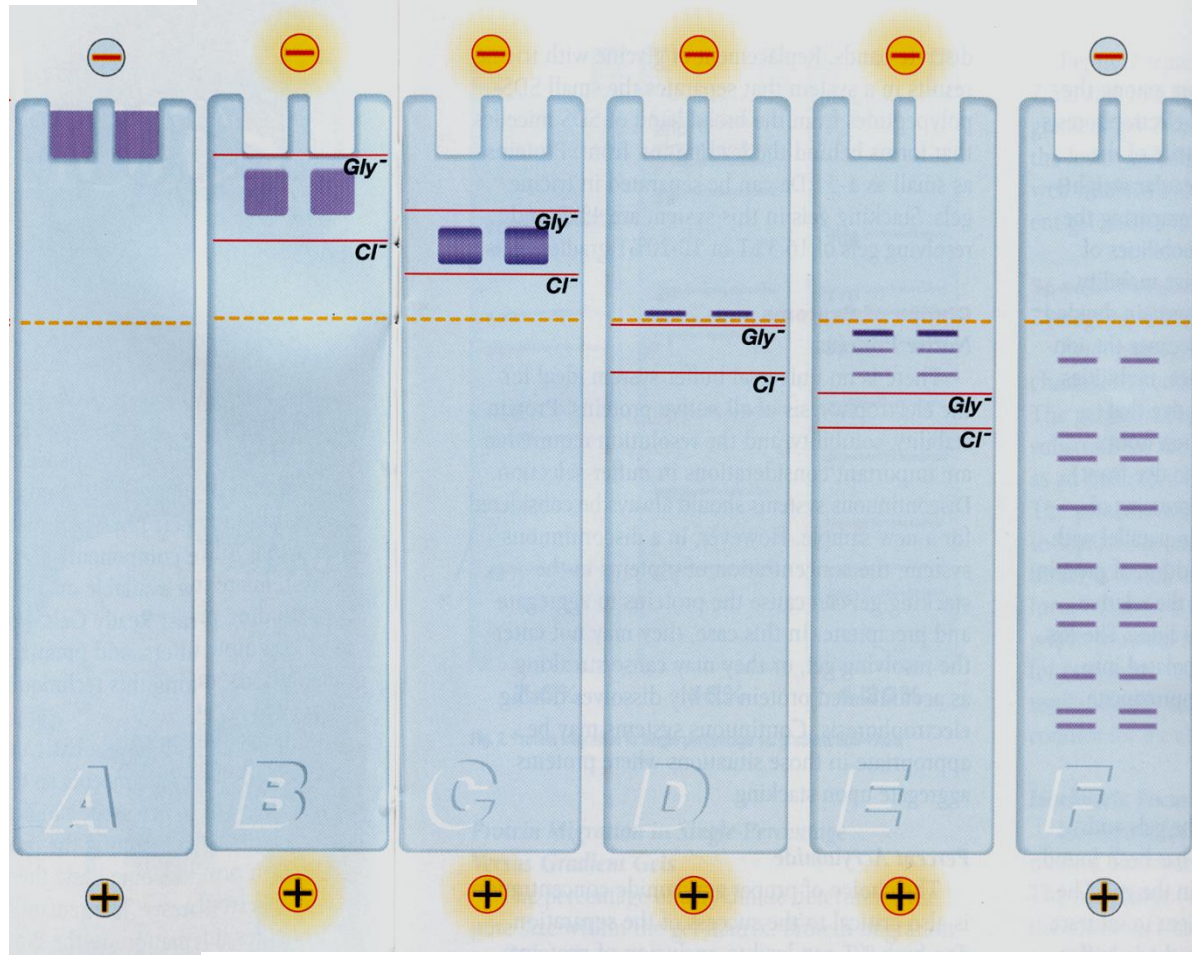


- Gel superiore

Tampone della cella: Tris-glicina (pI = 5.9) + SDS pH 8.3

T = 4%
Tris-HCl pH 6.8

T = 7 - 18%
Tris-HCl pH 8.8

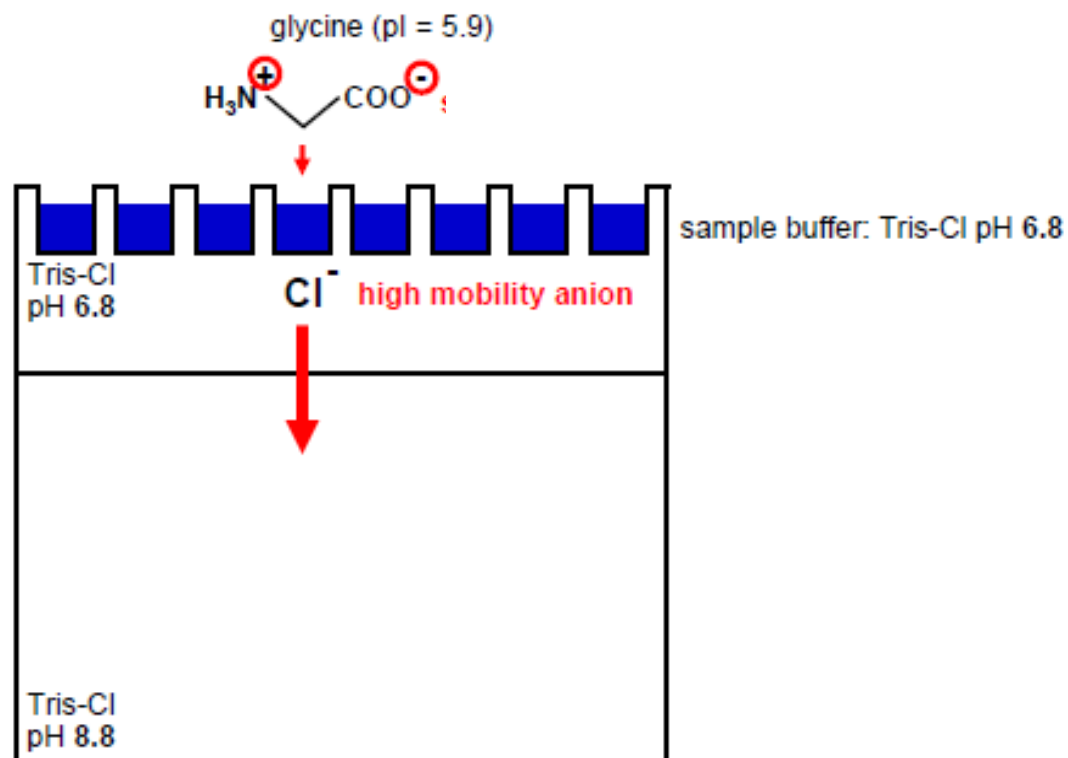


Le due specie ioniche che trasportano la corrente all'interno del gel (Cl⁻ e ioni glicina) si separano ampiamente nel gel superiore creando una zona di bassa conducibilità (e alta resistenza) in cui si trovano i complessi SDS-proteine. E' come se l'intero voltaggio applicato fosse concentrato in questa zona. Di conseguenza i complessi SDS-proteine si muovono molto velocemente e formano una banda molto stretta = si concentrano.

Laemmli gel:

Cathode buffer:

25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3



Anode buffer:

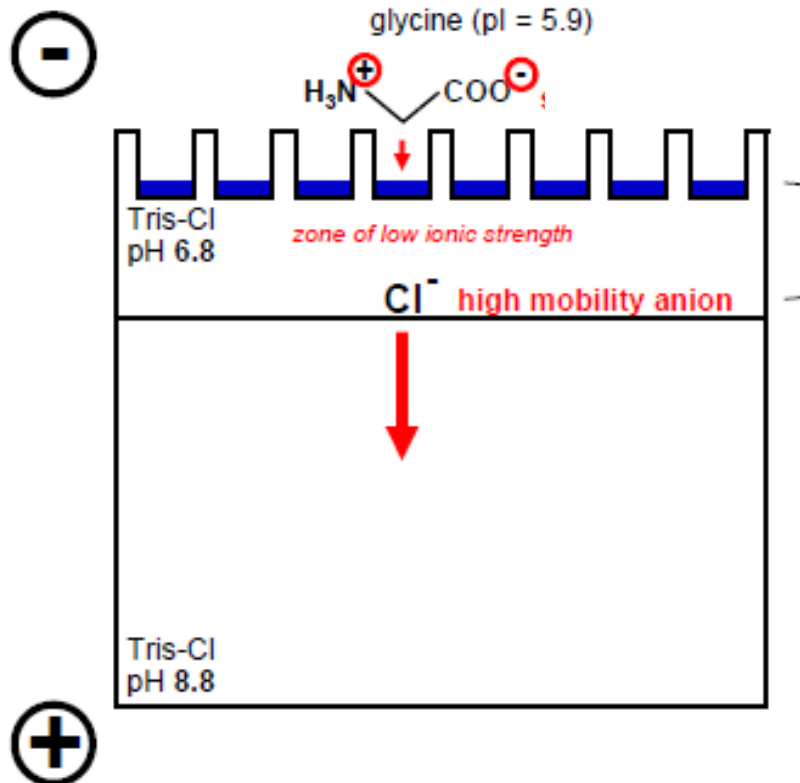
25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3

Laemmli UK, Nature (1970)

Laemmli gel:

Cathode buffer:

25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3



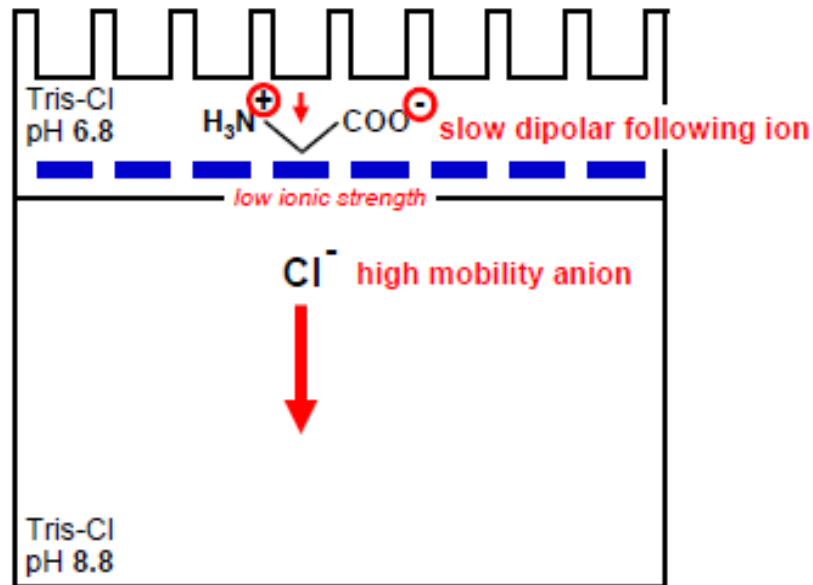
Anode buffer:

25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3

Laemmli gel:

Cathode buffer:

25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3



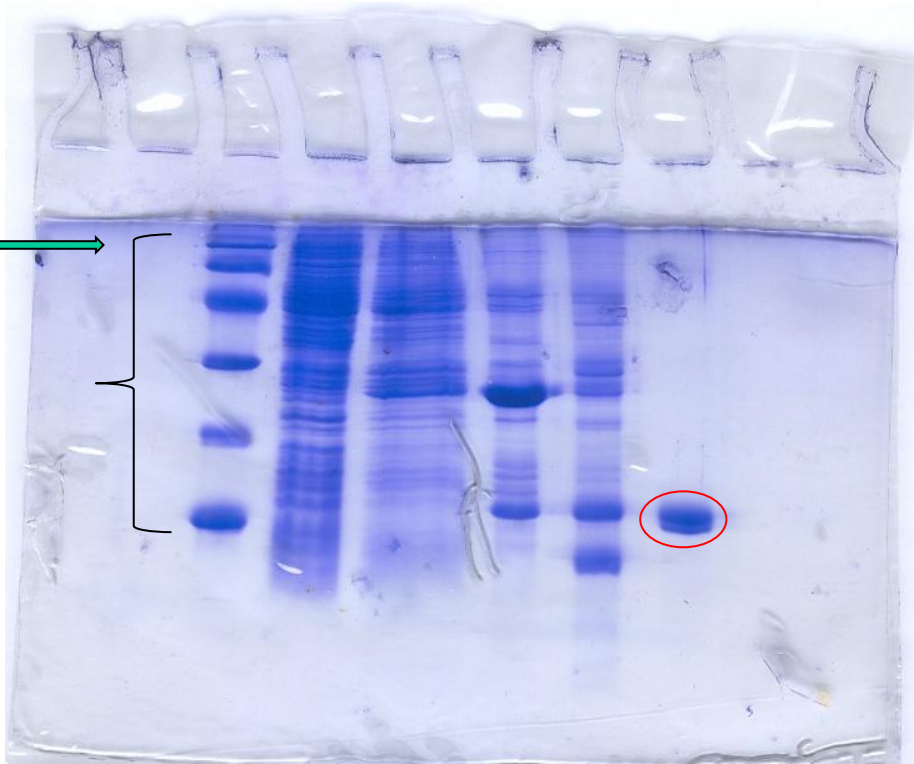
Anode buffer:

25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3

Laemmli UK, Nature (1970)

SDS

Standard →

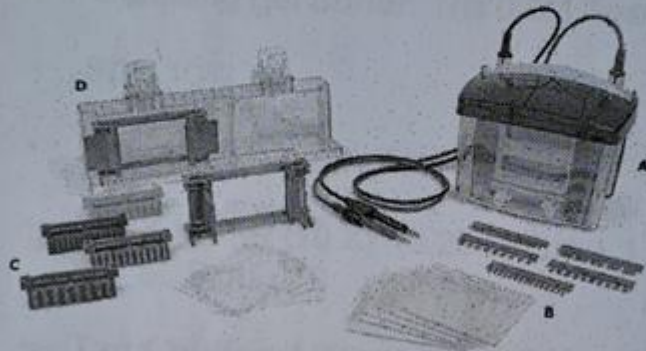


<https://www.youtube.com/watch?v=Tvqv0IR8q28>

<https://www.youtube.com/watch?v=XnEdmk1Sqvg>

ELETTROFORESI SDS

1. Preparazione delle soluzioni
2. Preparazione Gel e Polimerizzazione
3. Deposizione del campione
4. Corsa elettroforetica (separazione delle proteine)
5. Colorazione del gel (Coomassie brilliant blue)



Stock Solutions

- **Monomer solution** (30% Acrylamide + 0.8 % bisacrylamide)
- **Running gel buffer:** Tris/HCl 1.5 M pH 8.8)
- **Stacking gel buffer:** Tris 0.5M Tris/HCl pH 6.8
- **SDS** 10%
- **Ammonium persulfate** 10%
- **TanK buffer (10 X)** (0.25 M Tris + 1.92 M Glycine + 1% SDS pH 8.3)
- **TanK buffer (1 X)** (0.025 M Tris + 0.192 M Glycine + 0.1% SDS pH 8.3)
- **Water-Saturated n-butanol** (50 ml n-butanol + 5 ml H₂O)
- **Cracking solution:**
(60 mM Tris/HCl pH8, 1% SDS, 10% Glicerolo, 0.01 % bromophenol blue + β -mercaptoetanol 5%)

Stock Solutions

- **Monomer solution** (30% Acrylamide + 0.8 % bisacrylamide)

Preparare 100 mL di Monomer solution

30 grammi acrilamide + 0,8 bis acrilamide

Fino a 100 mL finali con acqua



PM Tris = 121.1

- Running gel buffer: Tris/HCl 1.5 M pH 8.8)

Preparare 100 mL di Running gel buffer

$$121,1\text{g}: 1\text{ M} = X: 1.5\text{ M} \quad X = 181,65\text{ g/L}$$
$$181,65:1000\text{mL} = X: 100\text{ mL} \quad X = 18,16\text{ g/100 mL}$$

Portare a pH 8,8 con HCl e portare il volume 100 mL

- Stacking gel buffer: Tris 0.5M Tris/HCl pH 6.8

Preparare 100 mL di stacking gel buffer

$$121,1\text{g}: 1\text{ M} = X: 0.5\text{ M} \quad X = 60,55\text{ g/L}$$

$$60.55\text{g}: 1000 = X: 100 \quad X = 6,055\text{ g/100mL}$$

Portare a pH 6,8 con HCl e portare il volume 100 mL



- SDS 10%

Preparare 100 mL di SDS 10%

10 grammi in 100mL

- Ammonium persulfate 10%

Preparare 1 mL di Ammonio persolfato al 10%

$10 \text{ g} : 100 \text{ mL} = x : 1 \text{ mL}$

0,1 g in 1 mL



- **TanK buffer (10 X)** (0.25 M Tris + 1.92 M Glycine + 1% SDS pH 8.3)
- **TanK buffer (1 X)** (0.025 M Tris + 0.192 M Glycine + 0.1% SDS pH 8.3)

Preparare 1 L di Tank buffer 10 x

PM Tris = 121.1

PM glicina = 75.07



- **Water-Saturated n-butanol** (50 ml n-butanol + 5 ml H₂O)

- **Cracking solution:**
(60 mM Tris/HCl pH8, 1% SDS, 10% Glicerolo, 0.01 % bromophenol blue + β-mercaptoetanolo 5%)



Separating Gel 10%:

• Monomer solution	<i>ca</i> (30% + 0,8%) <i>bis</i>	3.3 ml
• Running gel buffer: (Tris/HCl 1.5 M pH 8.8)		2.5 ml
• SDS 10%		0.1 ml
• H ₂ O		4 ml
• Ammonium persulfate 10%		50 μl
• TEMED		3.3 μl
		<hr/>
		10 ml



Calcolare il T% ---->

$$\%T = \frac{\text{acrilamide (g)} + \text{bis acrilam (g)}}{\text{volume (ml)}} \times 100 = \frac{0,99 + 0,026}{10} \times 100 = 10\%$$

$$30:100 = x : 3,3 \quad x = 0,99 \text{ g}$$

$$0,8 : 100 = x : 3,3 \quad x = 0,026$$

Stacking Gel 4 %:

• Monomer solution	0.44 ml
• Stacking gel buffer: Tris 0.5M Tris/HCl pH 6.8	0.83 ml
• SDS 10%	33 µl
• H ₂ O	2.03 ml
• Ammonium persulfate 10%	16.7 µl
• TEMED	1.7 µl



Calcolare il T% ---->

Calcolare il T% ---->

$$\%T = \frac{\text{acrilamide (g)} + \text{bis acrilam (g)}}{\text{volume (ml)}} \times 100 = \frac{0,1355}{3,35} \times 100 = 0,04 \times 100 = 4 \%$$

$$30 : 100 = x : 0,44 \quad x = 0,132$$

$$0,8 : 100 = x : 0,44 \quad x = 0,003512$$

HCl 37% d= 1.19 g/mL PM 36.46

Preparare una soluzione di HCl 1M (1L)

$$d = m/V \quad m = V \times d$$

In un litro \rightarrow 1190 g

HCl al 37% \rightarrow $(1190 \times 37)/100 = 440,3$ g

$$nmoli = 440,3/36,46 = 12,07 \text{ M}$$

$$12,07 : 1000 = 1 : V$$

$$V = 83 \text{ mL}$$

$$\begin{array}{l} M1 \ V1 = M2 \\ 12,07 \overset{V2}{\text{M}} \times V1 = 1 \text{ M} \times \\ \quad \quad \quad 1000 \end{array}$$

Preparare una soluzione di HNO_3 1M (1L)

HNO_3 65% $d = 1.4 \text{ g/mL}$ PM 63.01

$$d = m/V \quad m = V \times d$$

In un litro $\rightarrow 1400 \text{ g}$

$$\text{HNO}_3 \text{ 65\%} \rightarrow (1400 \times 65)/100 = 910 \text{ g}$$

$$n_{\text{moli}} = 910/63.01 = 14,44 \text{ M}$$

$$14,44 : 1000 = 1 : V$$

$$V = 69 \text{ mL}$$

$M_1 V_1 = M_2$
$14,44 \overset{V_2}{\text{M}} V_1 = 1 \text{ M}$
$\quad \quad \quad \times 1000$

Preparazione campioni proteici:

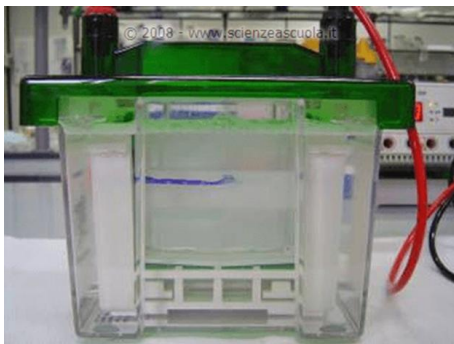
- Miscela di proteine [1mg/mL]
 - soluzione tampone
- glicerolo (per aumentarne la densità)
 - 2-mercaptoetanolo
- Blue di bromofenolo



- **Cracking solution:**
(60 mM Tris/HCl pH8, 1% SDS, 10% Glicerolo, 0.01 % bromophenol blue + β -mercaptoetanolo 5%)

- 100 °C x





Condizioni di corsa:
180 V

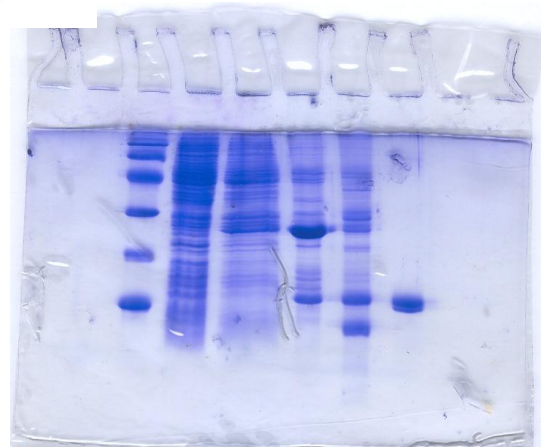
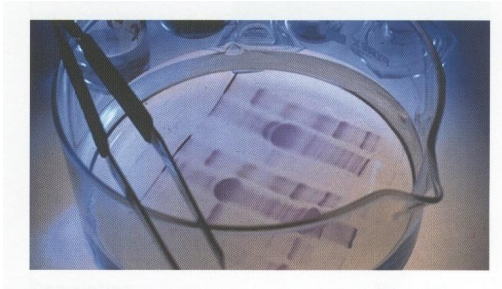


Co

Decolor:



Coomassie BioSafe:
↓ Conc soluzione alcolica/acida



<https://www.youtube.com/watch?v=Tvqv0IR8q28>

<https://www.youtube.com/watch?v=XnEdmk1Sqvq>