

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

Molecole cariche sottoposte ad un campo elettrico???

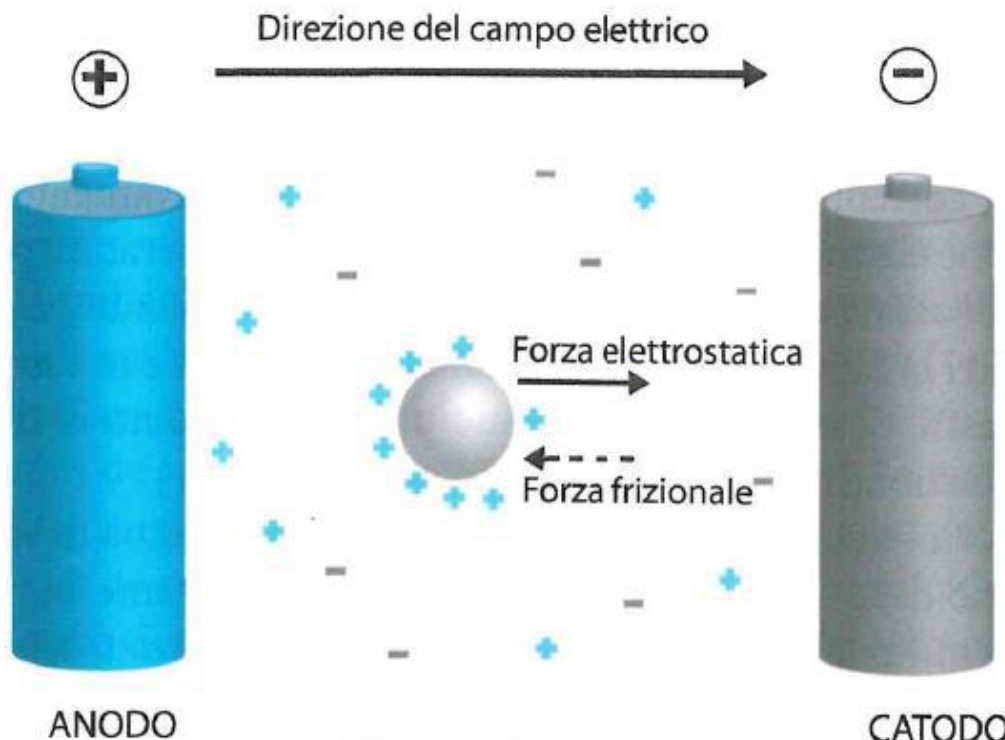
Applicando una **ddp (V)** tra due elettrodi si genera un campo elettrico (E) che dipende dalla distanza tra i **due elettrodi**

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

$$F_{1spinta} = q \cdot E$$

$$F_{2frenante} = v \cdot \textcircled{f}$$

Coefficiente frizionale che tiene in considerazione:
-dimensione e forma dello IONE
-porosità del supporto



$$F_{1\text{spinta}} = q \cdot E$$

$$F_{2\text{frenante}} = v \cdot f$$

Coefficiente frizionale che tiene in considerazione:
 -dimensione e forma dello IONE
 -porosità del supporto

In un campo elettrico costante le 2 forze si bilanciano

$$F_1 = F_2 \quad q \cdot E = v \cdot f \quad v = q \cdot E / f$$

introduciamo il parametro **mobilità elettroforetica** μ
Velocità in cm/sec in un campo elettrico UNITARIO

$$\mu = q / f$$

dal momento che f dipende molto dalle dimensioni

$$\mu = q/m$$

$$\mu = 0 \text{ per proteine a } \text{pH} = \text{pI}$$

Quindi, la mobilità è indipendente dal campo elettrico, ma dipende (a parità di altre condizioni) dalla struttura intrinseca della molecola (carica, dimensioni, forma, PM)

Principali metodologie elettroforetiche nella ricerca e nella diagnostica biomedica

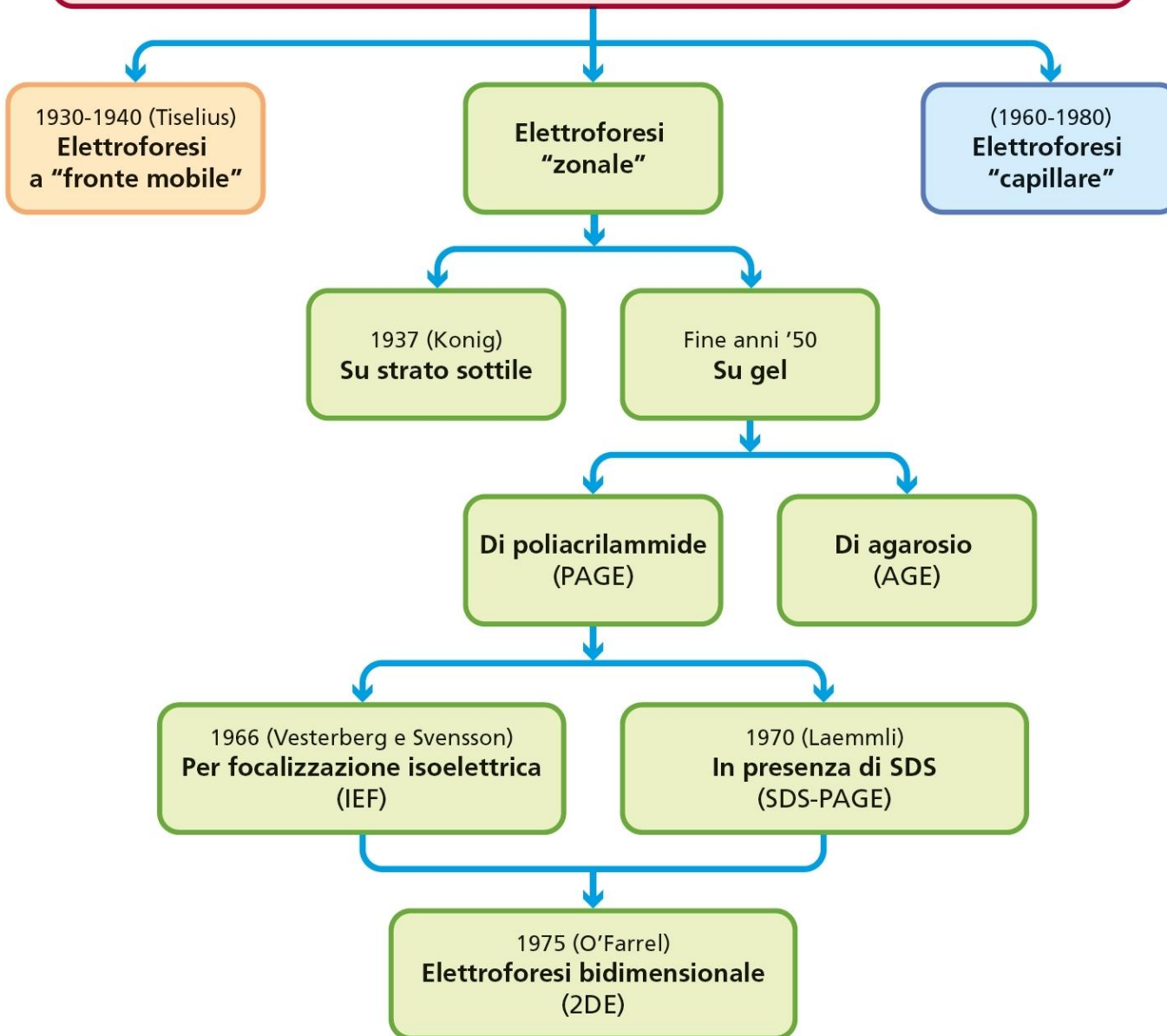
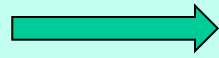


Figura 8.2

Classificazione delle tecniche elettroforetiche in base al tipo di mezzo in cui avviene la migrazione delle specie ioniche.

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

risultati accettabili x molecole di piccole dimensioni

gel di poliacrilamide
gel di agarosio

notevole aumento di risoluzione per effetto setaccio del gel

Elettroforesi zonale

Alimentatore

(genera un flusso di corrente)

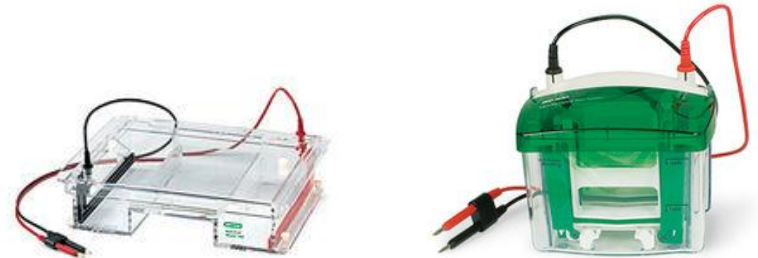


Cella elettroforetica
(orizzontale o verticale)

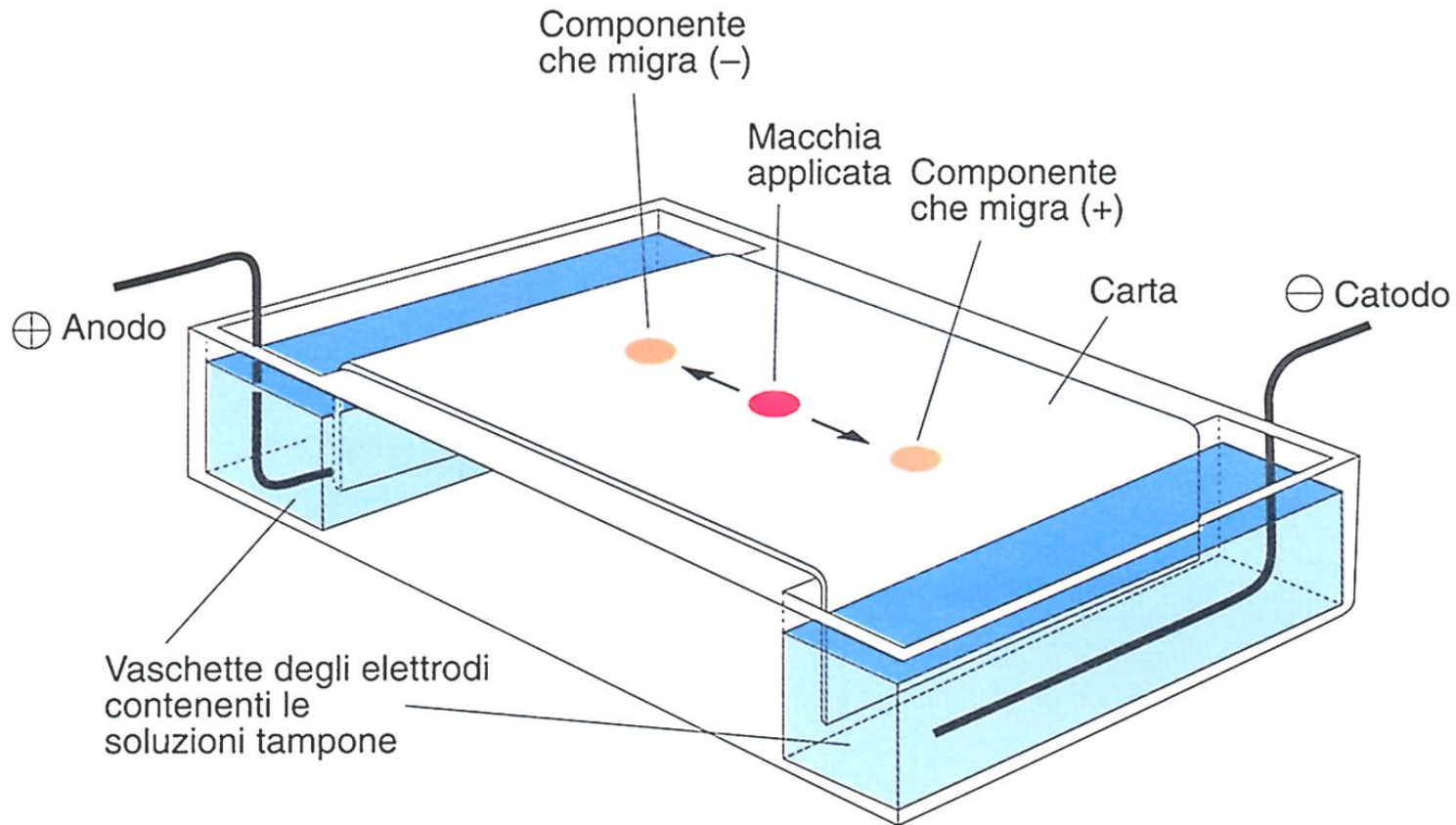
Cationi migrano
verso il catodo (-)

Anioni migrano
verso l'anodo (+)

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



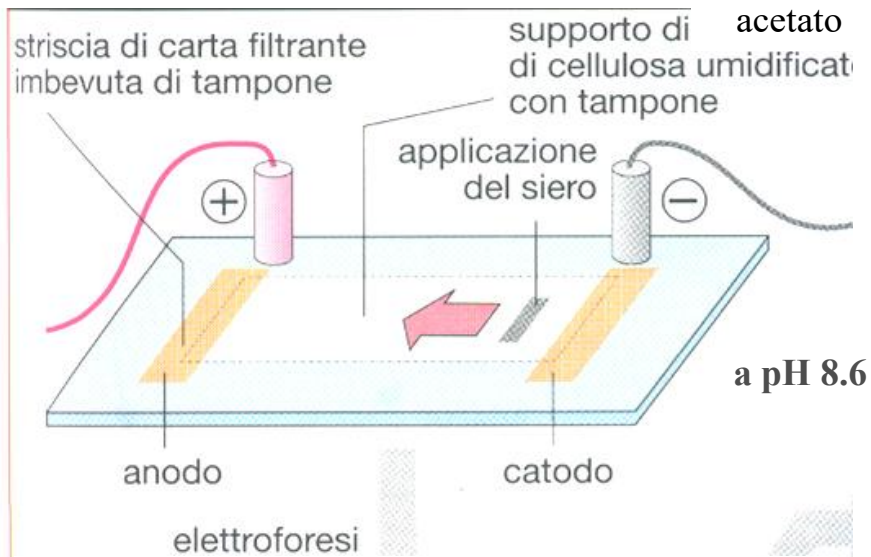
Elettroforesi su carta



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



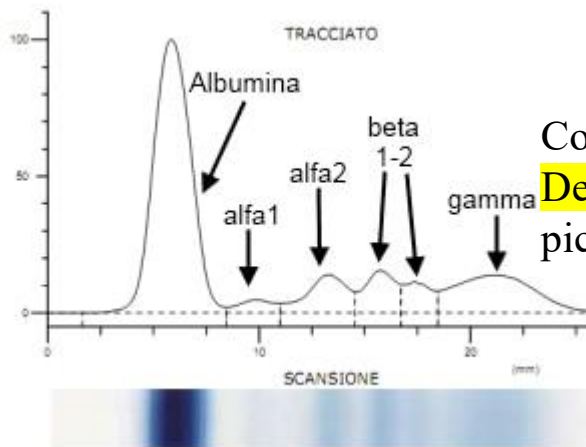
Le proteine del siero cariche negativamente migreranno verso il polo positivo in funzione della loro carica e massa

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, IgM	150 162 900 172 196	anticorpi della risposta matura anticorpi di protezione della mucosa anticorpi della risposta precoce recettori dei linfociti B reagine



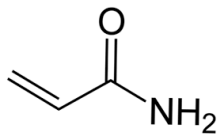
Colorazione

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

Protidogramma

utilizza un supporto di poliacrilamide

Acido acrilico
Acido 2-propenoico



Acrilamide

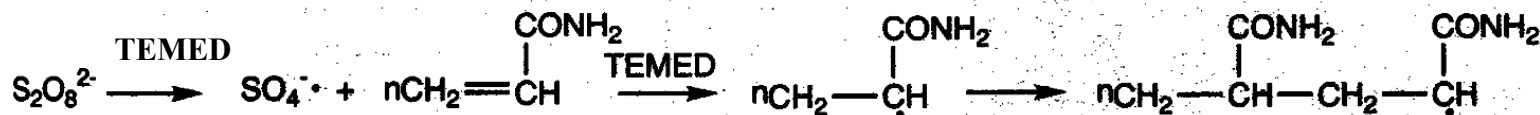
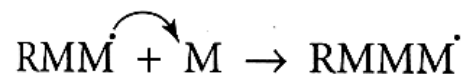
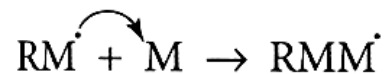
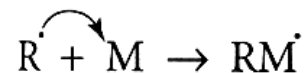
reazione di polimerizzazione radicalica richiede:

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

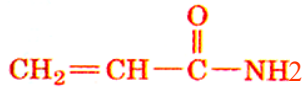
Catalizzatore

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

Iniziatore radicalico

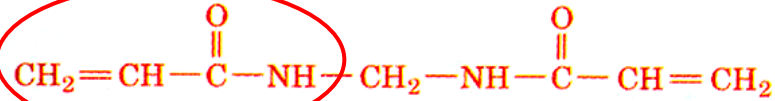


PolyAcrilamide Gel Electrophoresis (PAGE): utilizza un gel di poliacrilamide

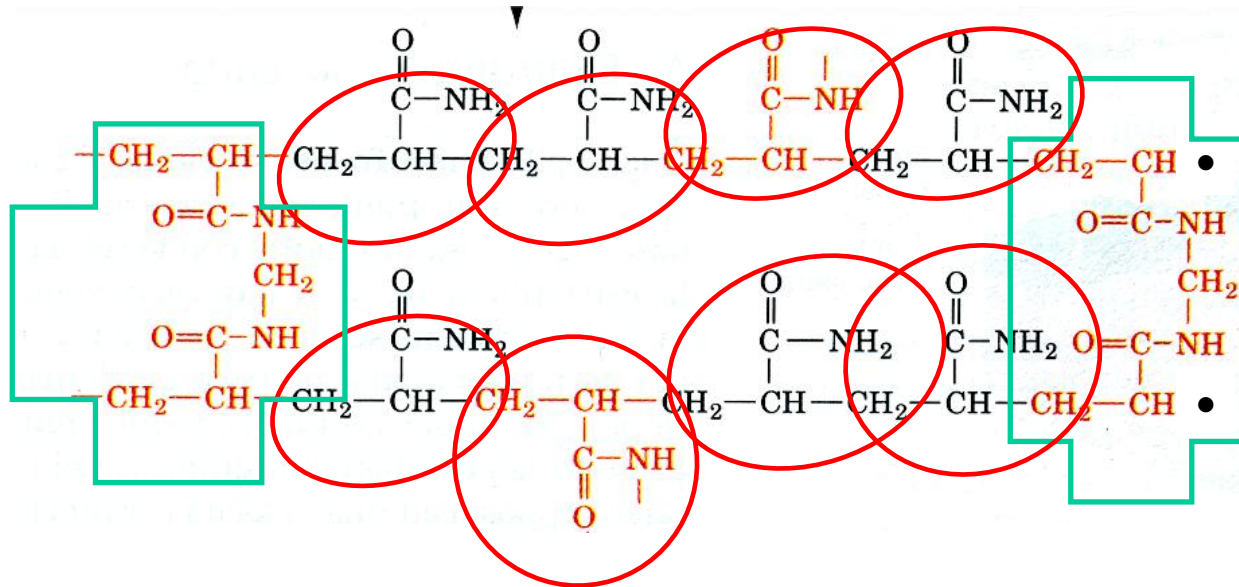


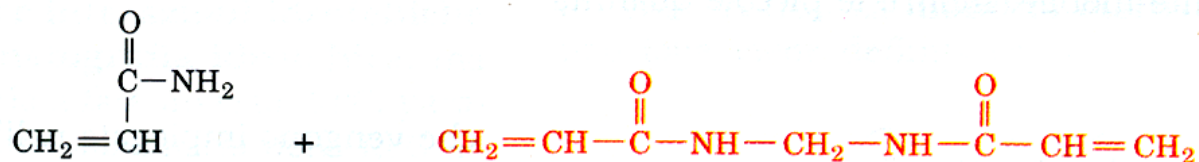
Acrilamide

+



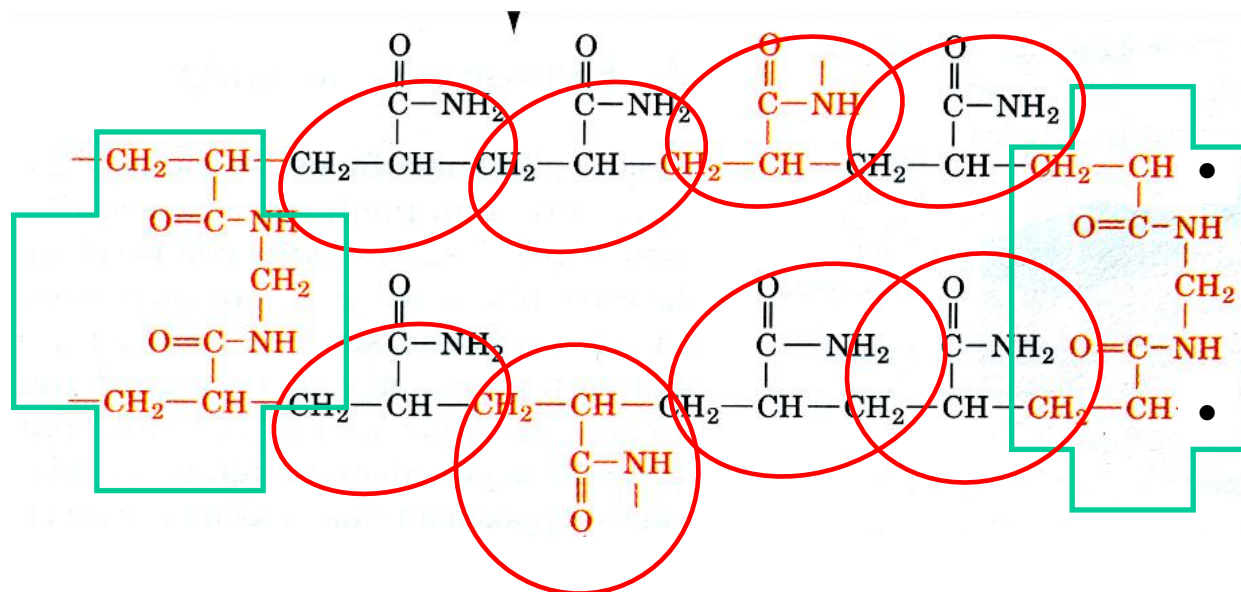
N,N'-metilen bisacrilamide





Attenzione:

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



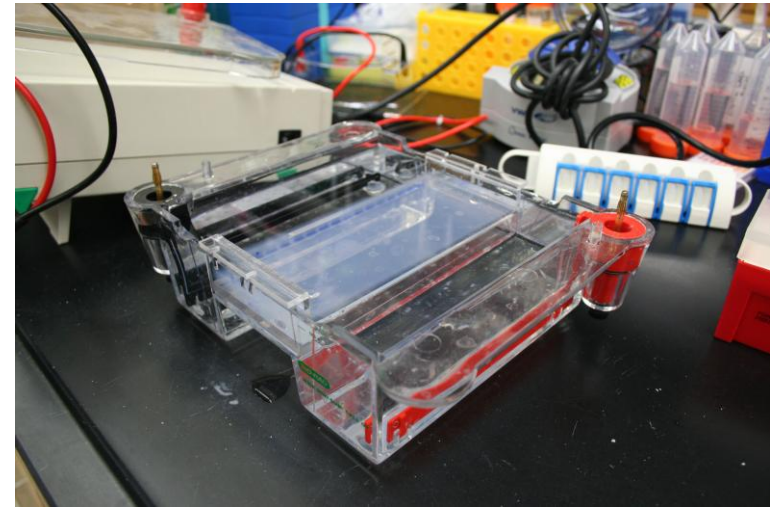
Si forma una maglia che offre un effetto setaccio per la separazione delle molecole

Camere elettroforetiche:

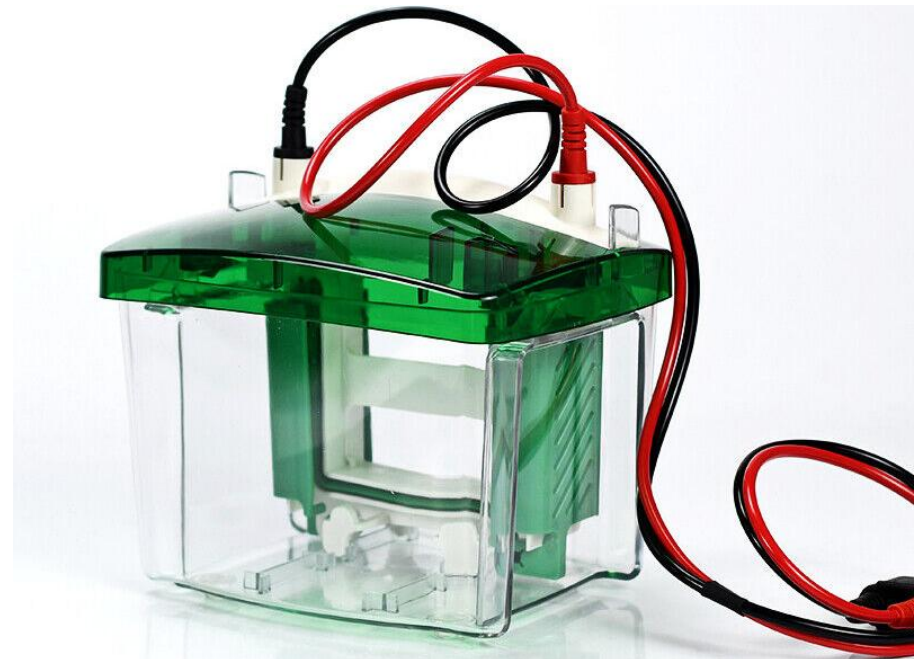
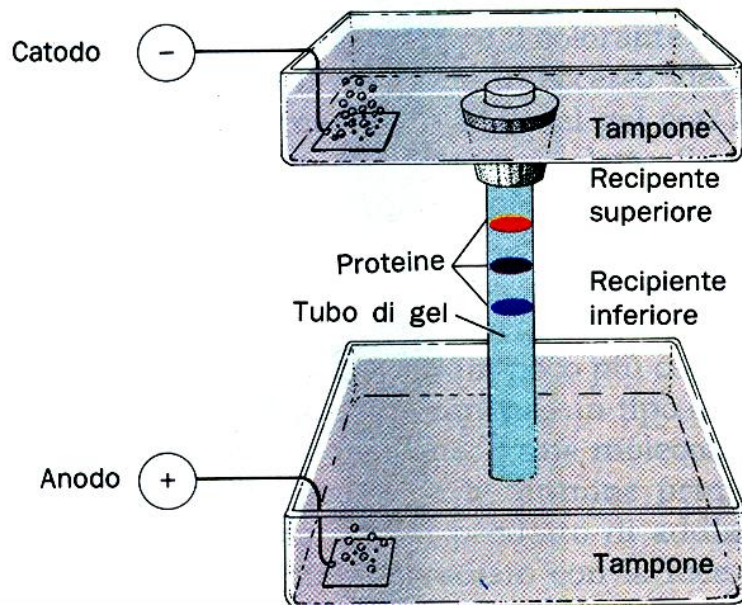
Elettroforesi su carta e su acetato di cellulosa



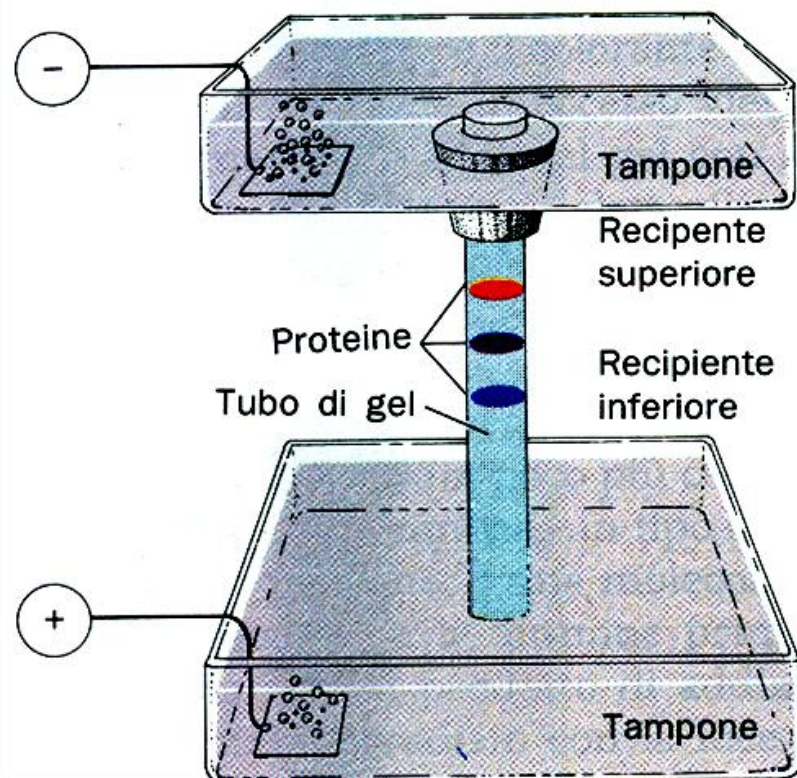
Elettroforesi su gel di agarosio



Elettroforesi su gel di poliacrilamide



Gel elettroforesi su tubicino

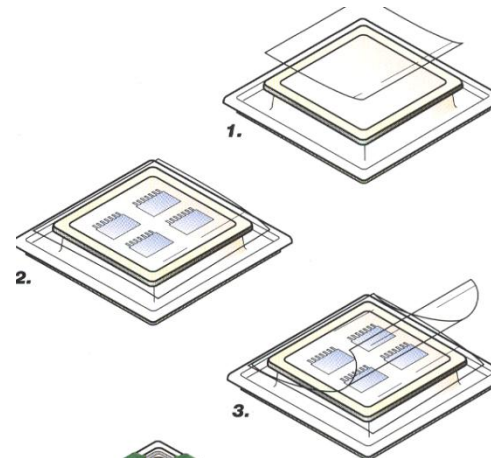
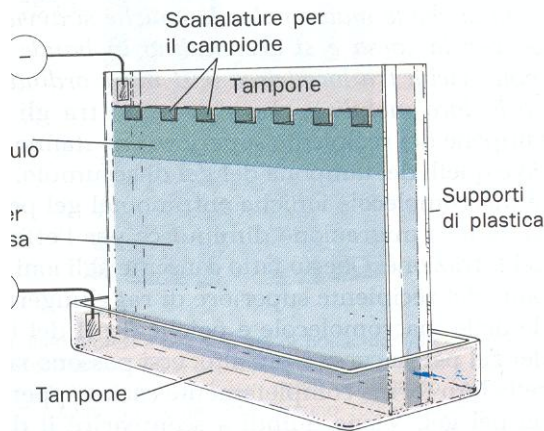


Gel elettroforesi su lastrina



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

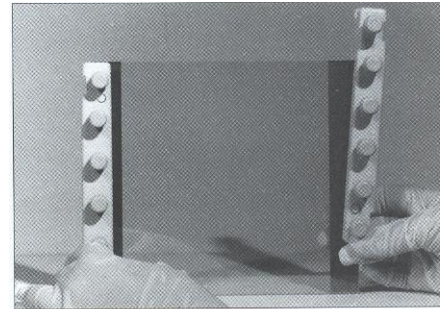
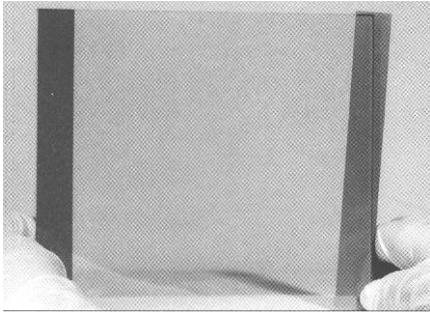


Figure 2.2B. Attaching the clamp

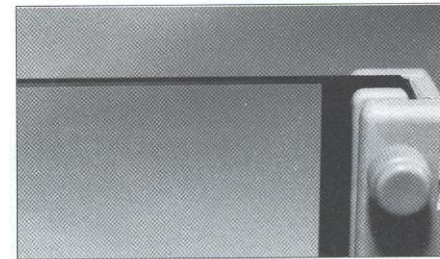


Figure 2.2C. Properly assembled gel sandwich. Glass plates and spacer are flush with the raised ribs on the end of the clamp.

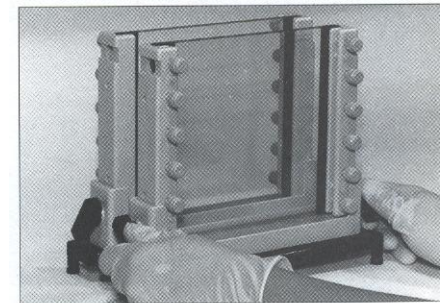
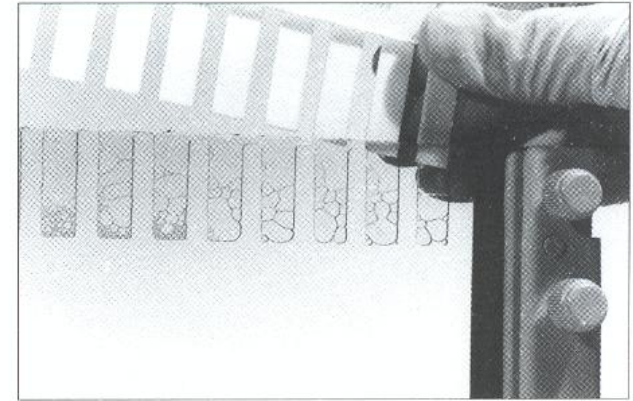
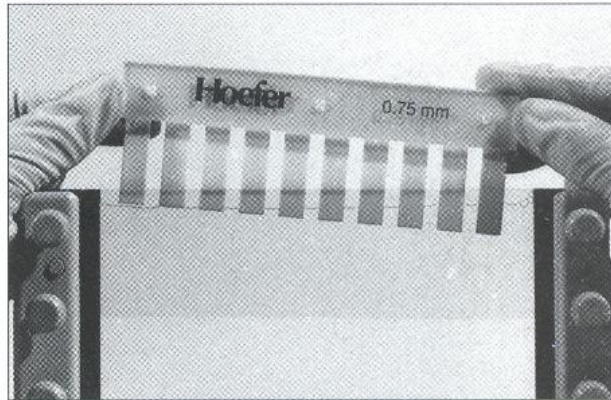
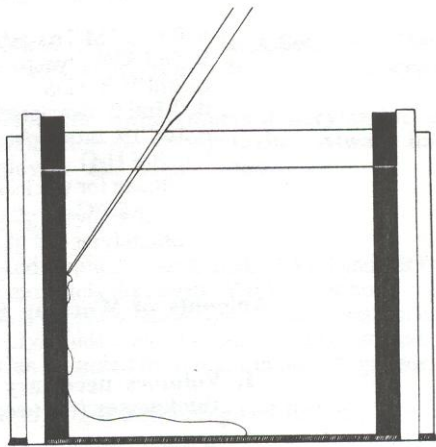


Figure 2.2D. Assembling the gel casting stand (step 1). The black cams are turned to seal the bottom surface of the sandwich into the casting stand gasket.

pettine

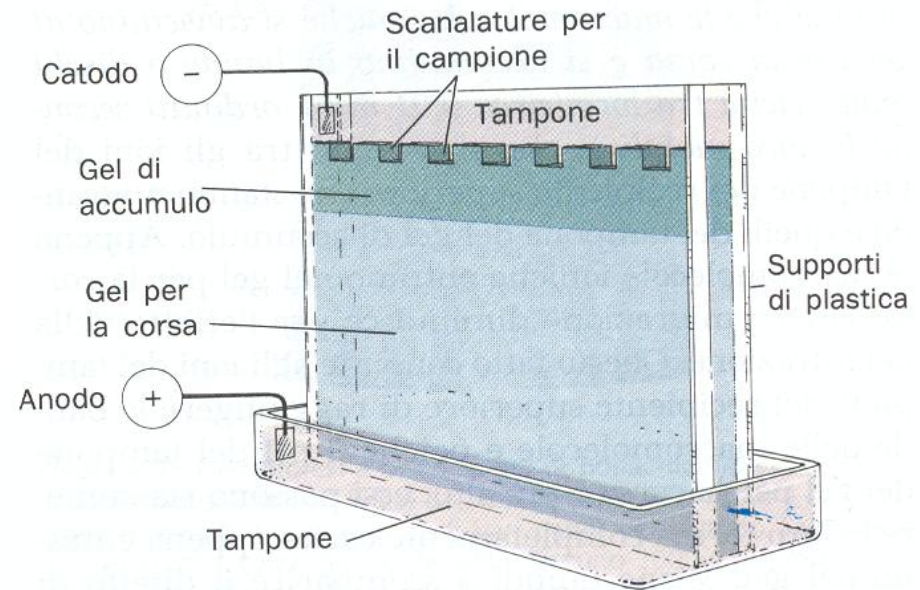


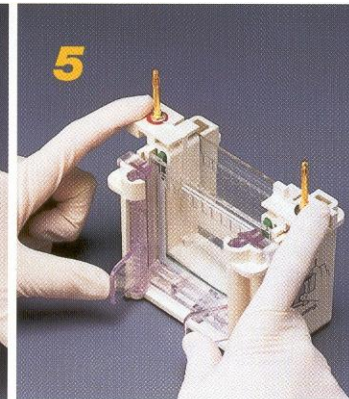
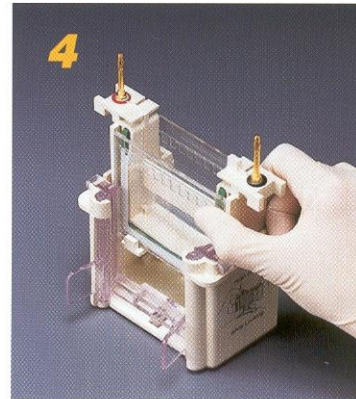
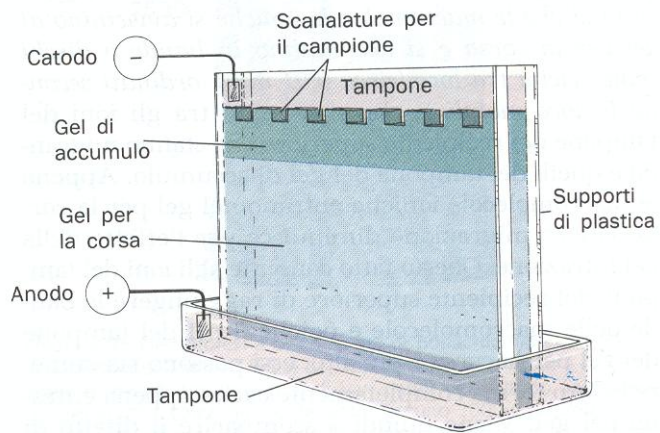
<https://www.youtube.com/watch?v=Tvqv0IR8q28>



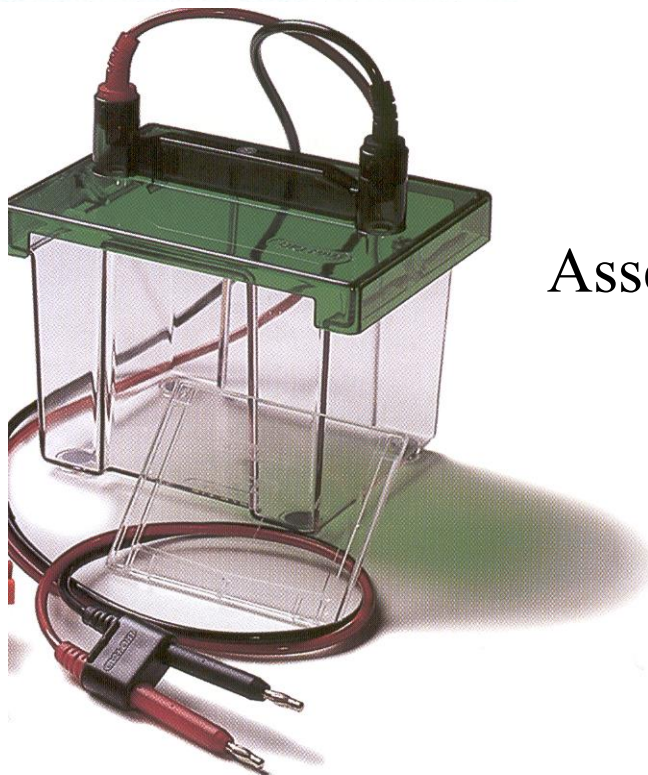
Preparazione del gel:

- 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

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

I gel di poliacrilamide possono essere facilmente preparati in laboratorio scegliendo opportunamente il valore di T più corretto (può variare tra 3 e 18%)

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

FASI della SEPARAZIONE ELETTROFORETICA

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

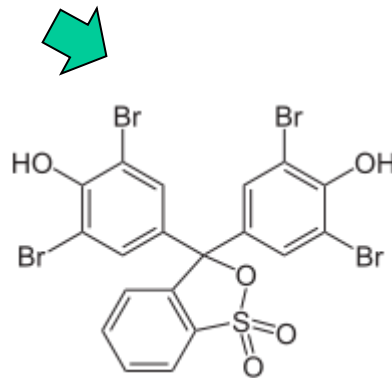


Preparazione campioni proteici:

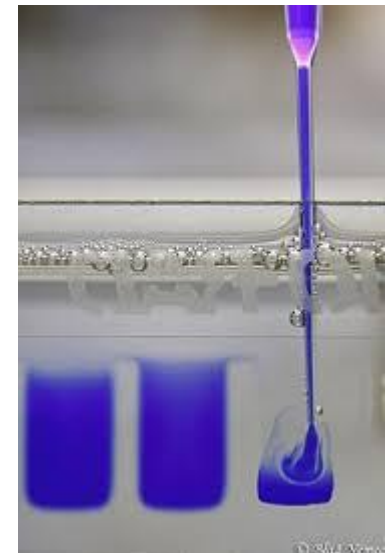
- soluzione tampone (a pH opportuno)
- glicerolo (per aumentarne la densità)
- tracciante p.es. blue di bromofenolo



- carica (-)
- colorata
- basso PM



MW= 669.96



FASI della SEPARAZIONE ELETTROFORETICA

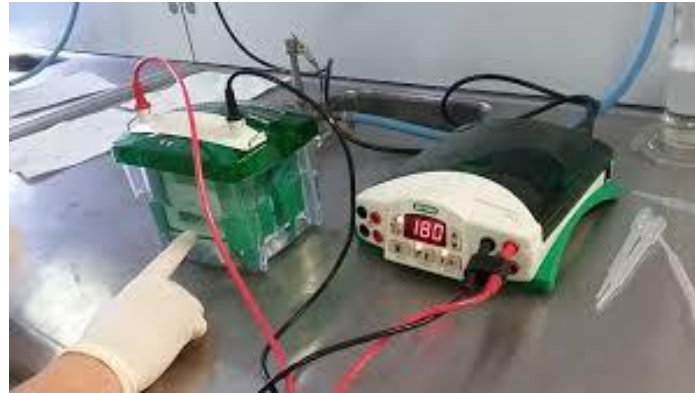
- Preparazione del gel
- Preparazione e Caricamento campioni
- **Corsa Elettroforetica**
- **Interruzione Campo Elettrico**
- Colorazione e Decolorazione
- Conservazione del gel

Durata ?

proteine non sono visibili

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

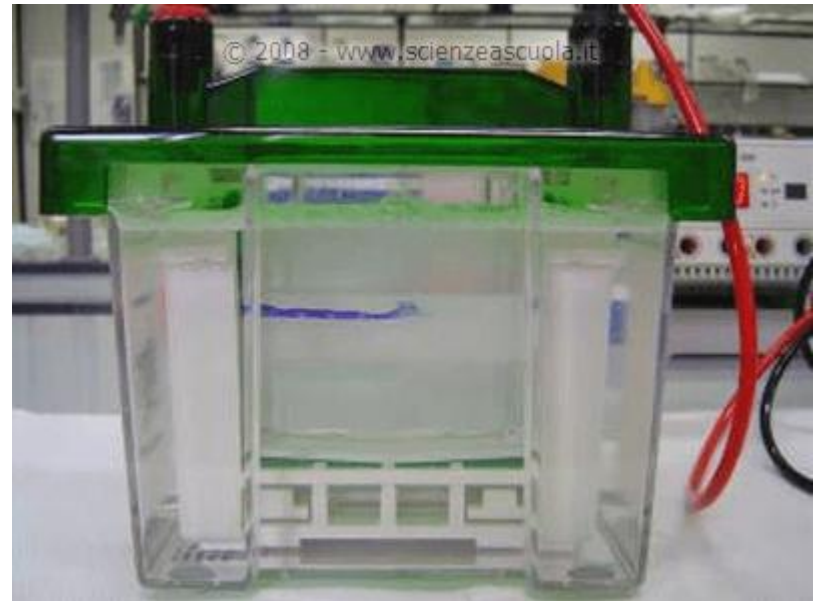
Perché siamo sicuri che le proteine, che hanno una mobilità elettroforetica $<$ rispetto al tracciante ($PM >$), non sono fuoriuscite dal gel



Perché ?

Tracciante:

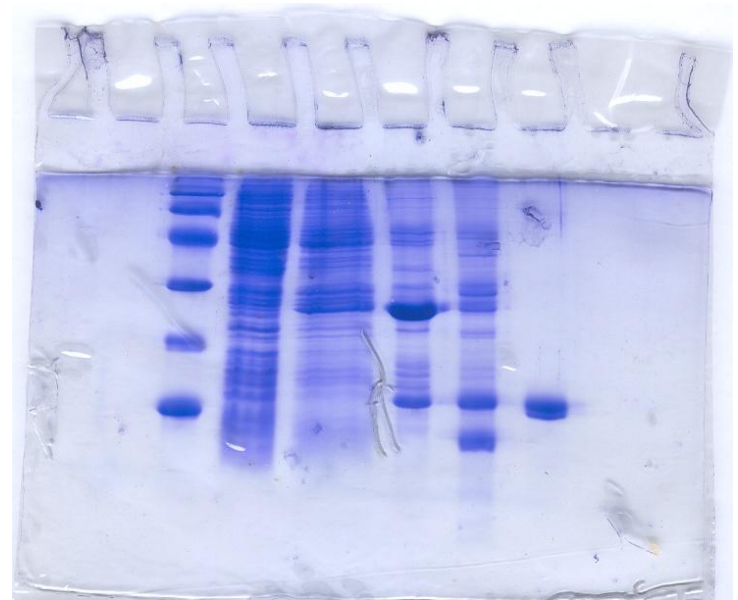
- carica (-)
- colorata
- basso PM



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)

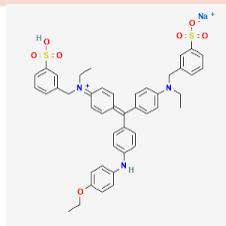


Staining Polyacrylamide Gels

Coomassie Blue Stain-

can usually detect a 10-50 ng protein per band

- Requires an acidic water/alcohol fixing solution
- Binds preferentially tyrosins
- Compatible with MS
- Requires destaining to remove aspecific binding of the dye from the gel



Blue Safe Stains

Similar to Coomassie. Destaining optional or water rinse. (8 ng/band)

- BioSafe Blue
- SimplyBlue
- InstantBlue-destaining not recommended

Silver Staining- 50 times more sensitive than Coomassie Blue. (0.3ng/BAND)

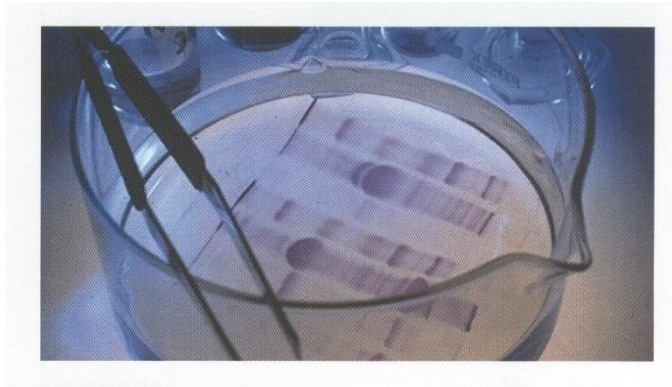
- Fixation [Acetic acid-methanol]
- Stain with silver solution and rinse with water
- Develop with formaldehyde and carbonate followed by stopping with Glacial acetic
- Not compatible with MS

Fluorescent Stains – almost as sensitive as Silver but requires excitation source

- Flamingo Fluorescent Gel Stain
- Deep Purple* Total Protein Stain
- SYPRO* Ruby Protein Gel Stain
- Krypton Protein Stain
- IR stains
- Stain-free: allow immediate visualization of proteins without the time, mess, and cost associated with traditional gel staining and destaining.

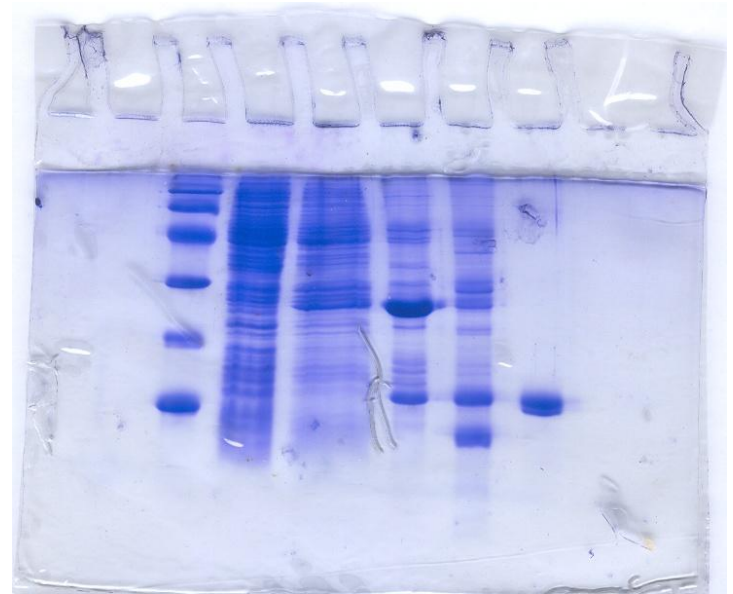
3) Decolorazione

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



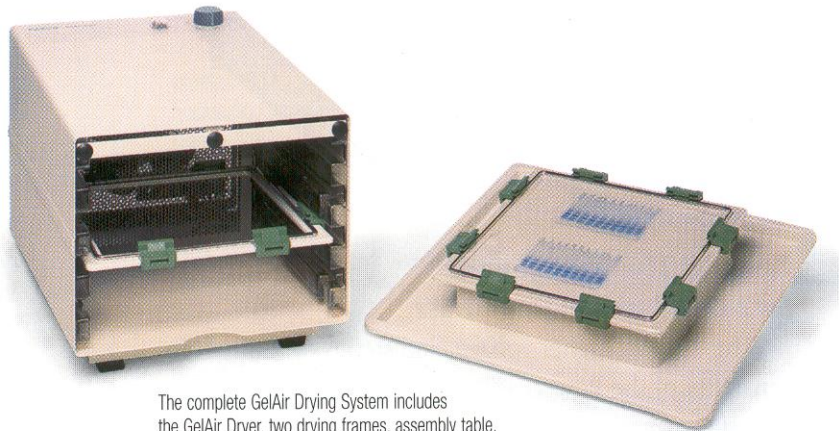
Coomassie BioSafe:

↓ Conc soluzione alcolica/acida
Decolorazione in acqua

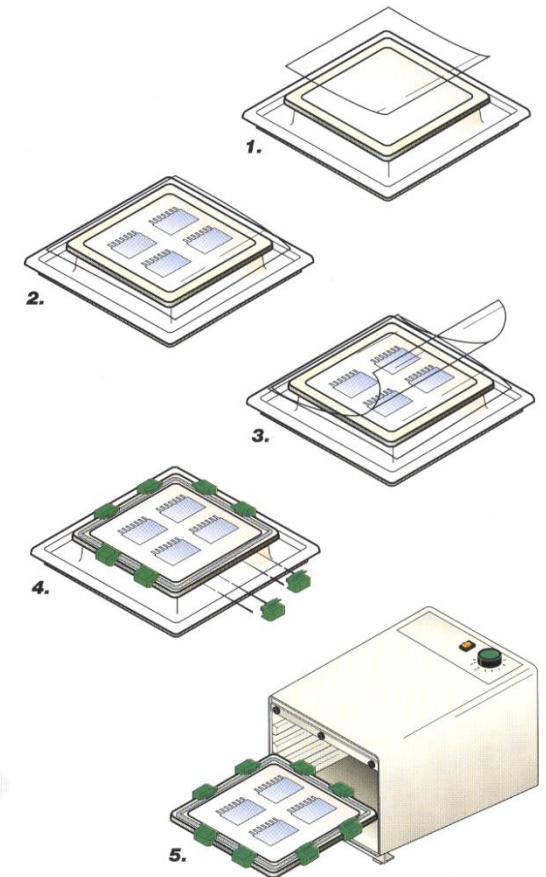


FASI della SEPARAZIONE ELETTROFORETICA

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

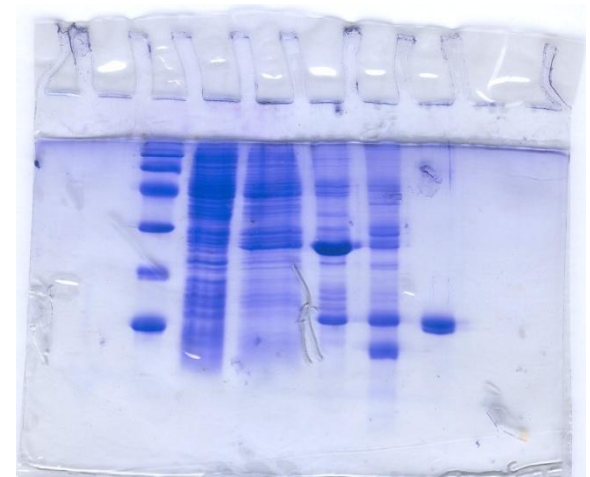


The complete GelAir Drying System includes the GelAir Dryer, two drying frames, assembly table, cellophane, and Gel Drying Solution.



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

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

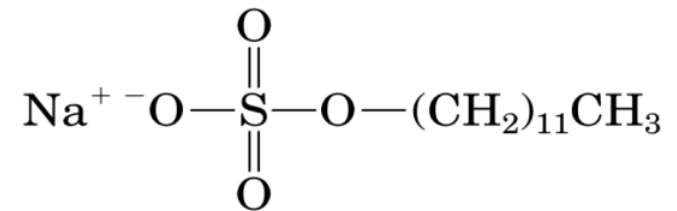
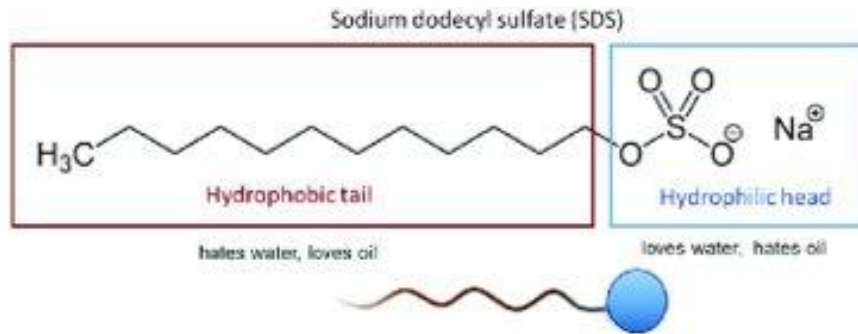
3) In gradiente di pH (Isoelettrofocalizzazione: IEF)
separa le proteine unicamente in base al pI

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)

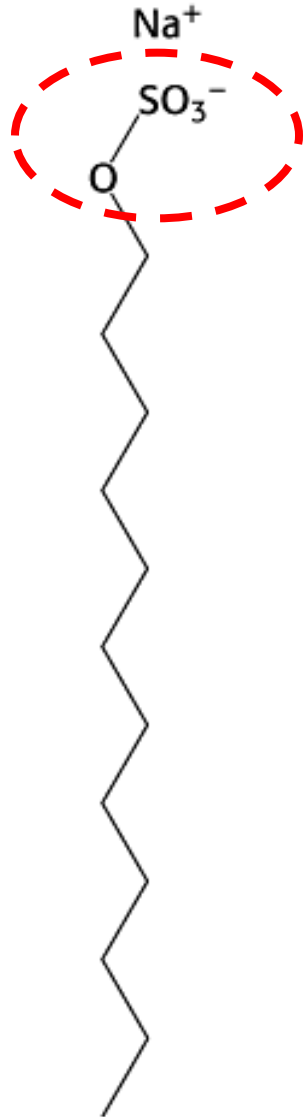


Il **detergente ionico** SDS interagisce con le proteine con un rapporto costante:

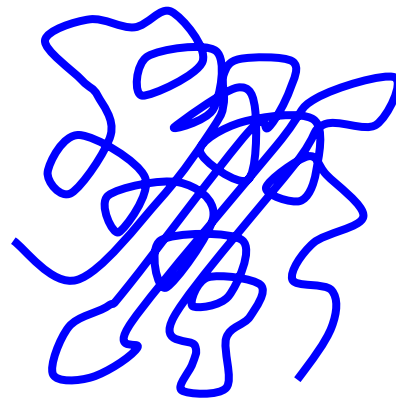
1 molecola di SDS ogni 2 residui aminoacidici

(1,4 g SDS/g proteina)

Sodio Dodecil Solfato

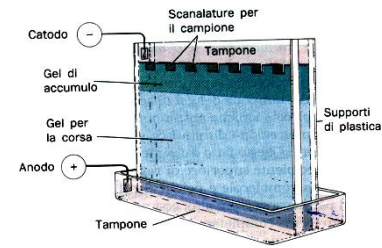
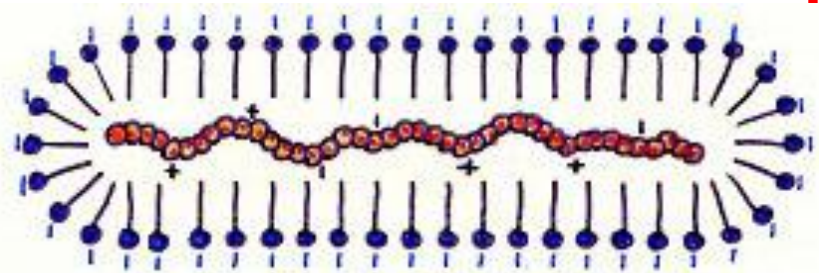
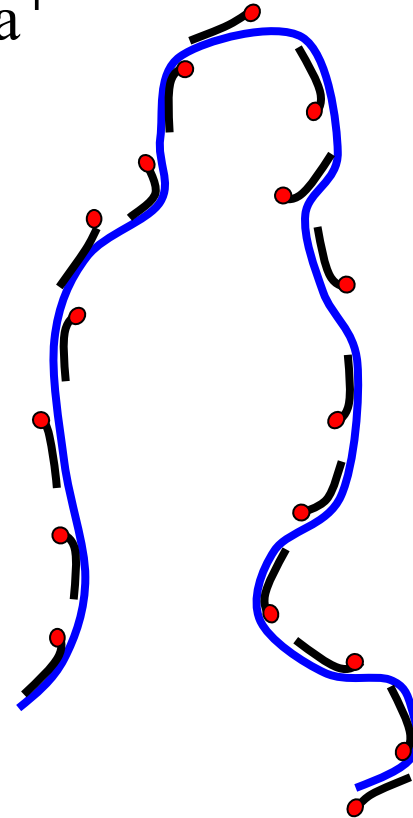
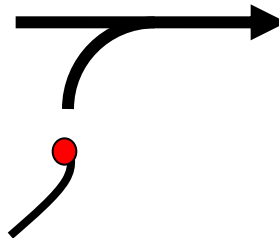


Sodio dodecil solfato
(SDS)

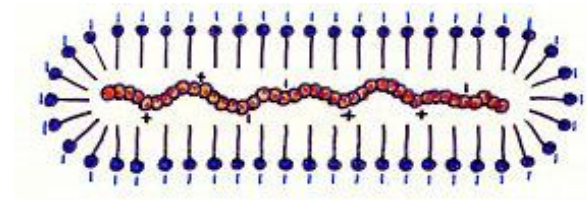


proteina

?



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



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

dipende dalle dimensioni molecolari della proteina

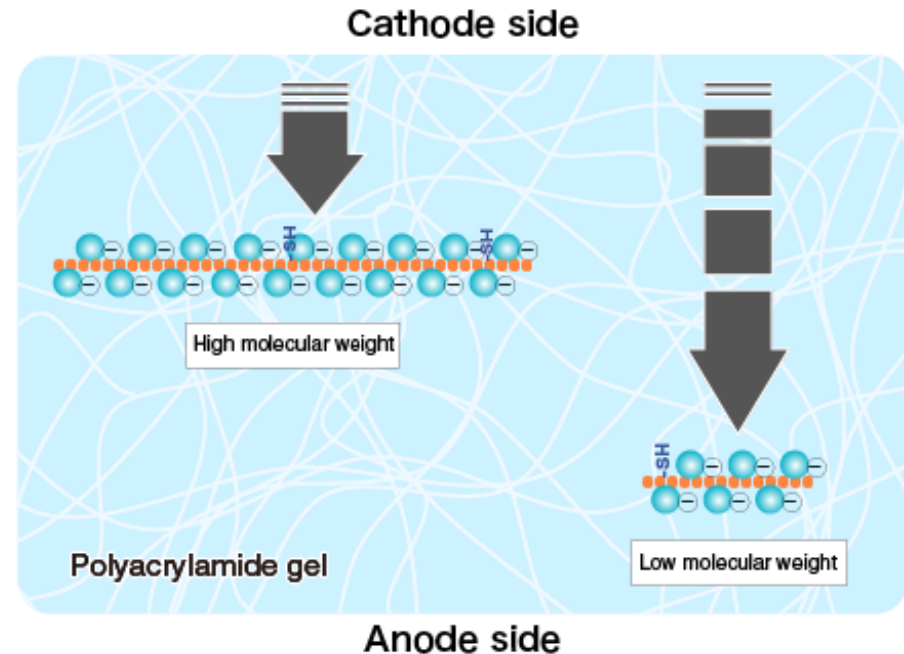
> PM > intensità di carica -

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

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

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

Proteins are separated based on their polypeptide chain length by electrophoresis in a polyacrylamide gel with an appropriate mesh size.



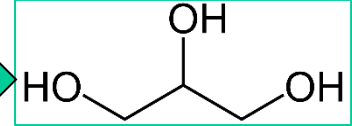
$$\mu = q/m$$

SDS-PAGE

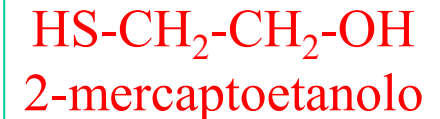
condizioni
denaturanti

Preparazione campioni proteici:

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

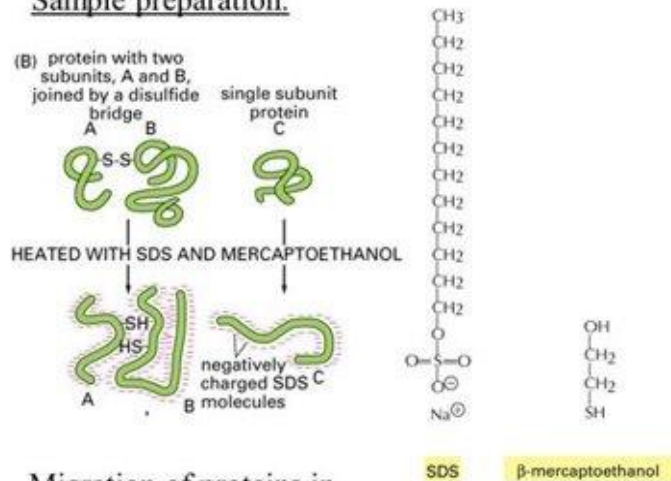


- + **SDS** (detergente ionico denaturante)
- + **2-mercaptoetanol** (x rompere i ponti S-S)

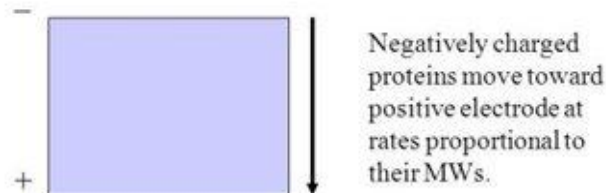


Reminder: how SDS-PAGE works

Sample preparation:



Migration of proteins in the gel:

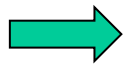


incubazione a **100°C x 5 minuti** (denaturazione al calore, ma la proteina non precipita per la presenza del detergente che ne aumenta la solubilità!)

Applicazioni dell'SDS-PAGE

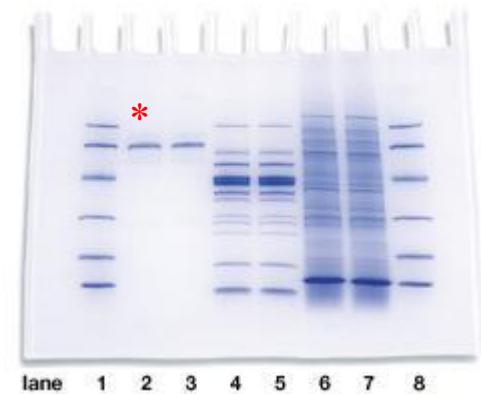
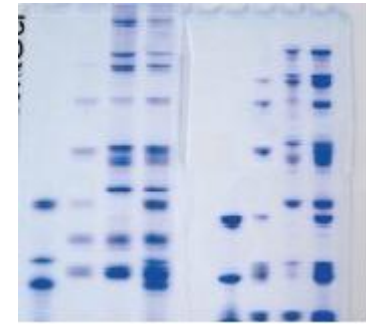
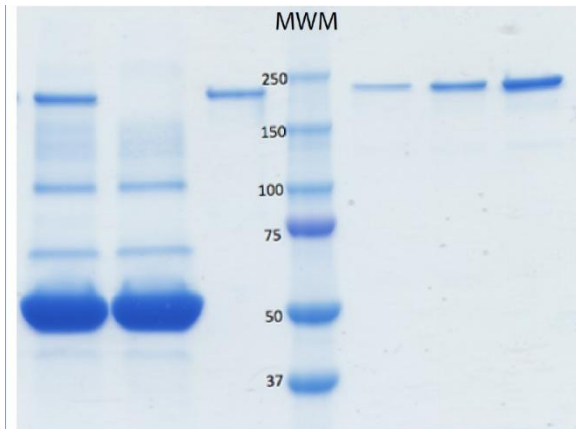


•Analisi di miscele proteiche



•Valutazione purezza di una proteina

•Determinazione PM



Proteine a PM noto

Protein	MW
Myosin	200,000
β-galactosidase	116,250
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

acrilamide (g) + bis acrilam (g)

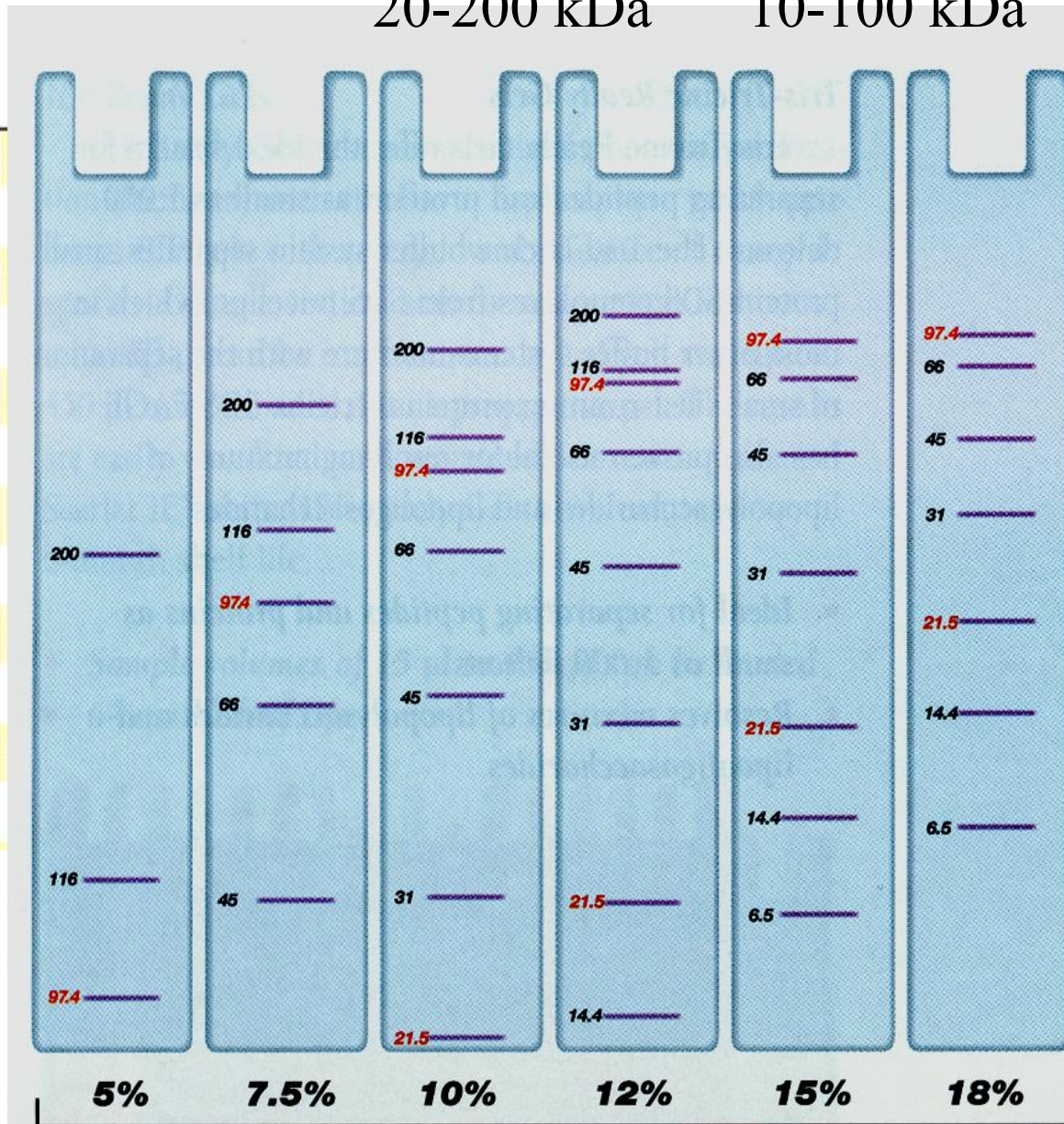
$$T = \frac{\text{volume (ml)}}{\text{volume (ml)}} \times 100$$

T=

SDS-PAGE

20-200 kDa

10-100 kDa

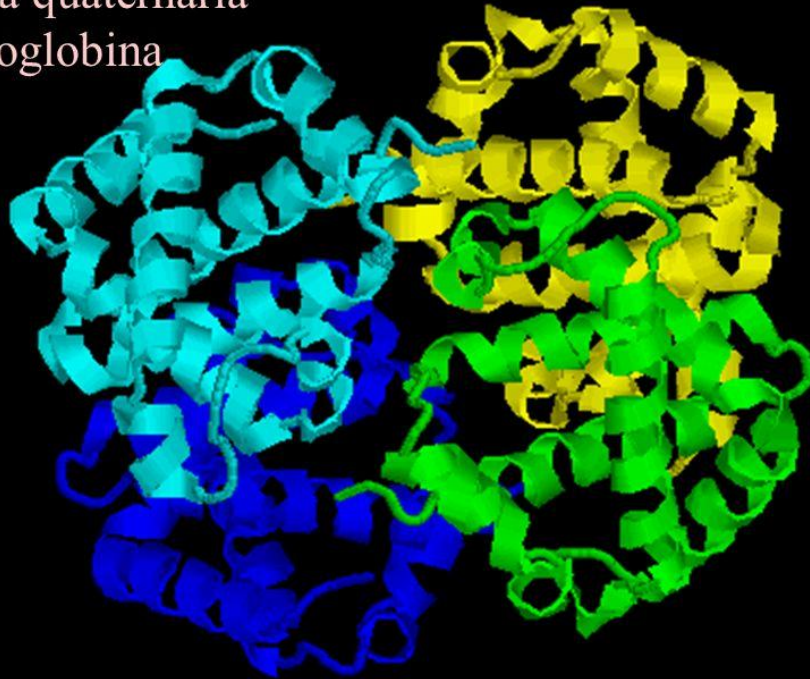


ATTENZIONE:

Si lavora in condizioni denaturanti :

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

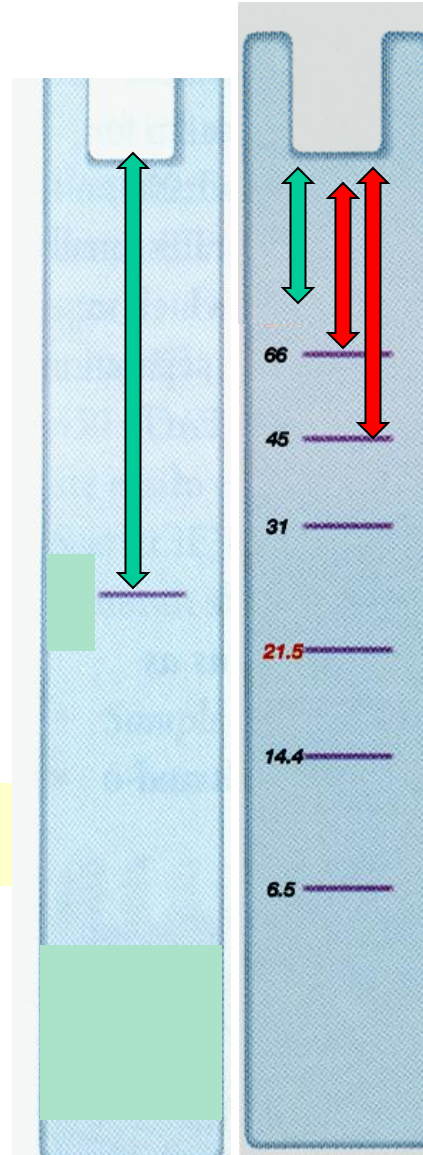
Struttura quaternaria
dell'emoglobina



Determinazione PM mediante SDS-PAGE

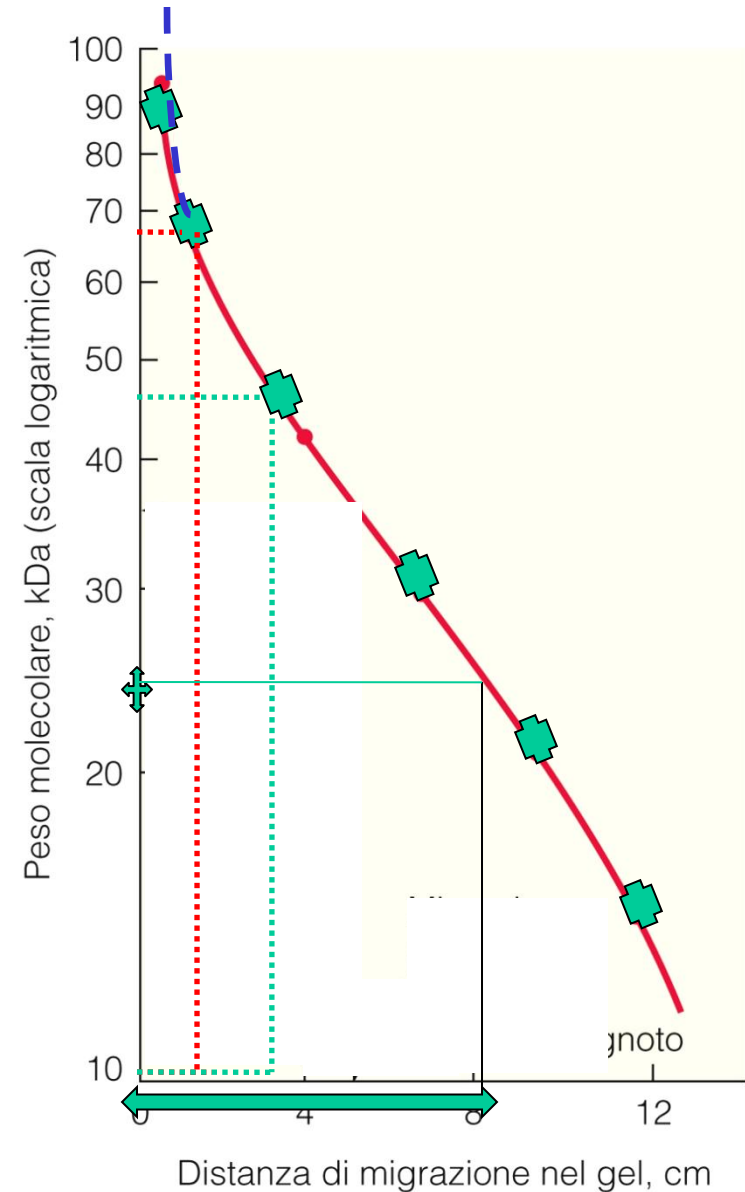
Proteine a PM noto

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



Condizioni denaturanti: PM delle subunità

Curva standard

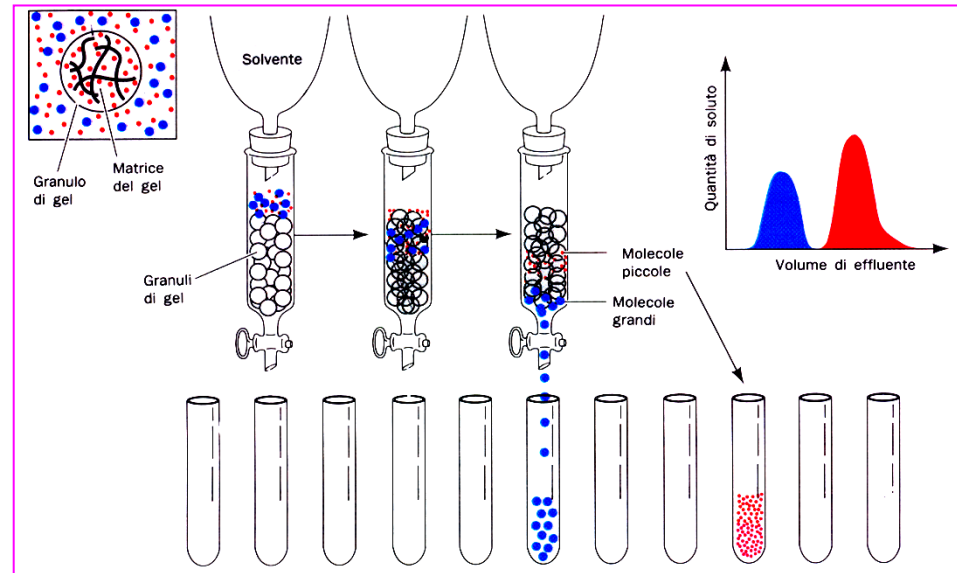


SDS-PAGE:

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?

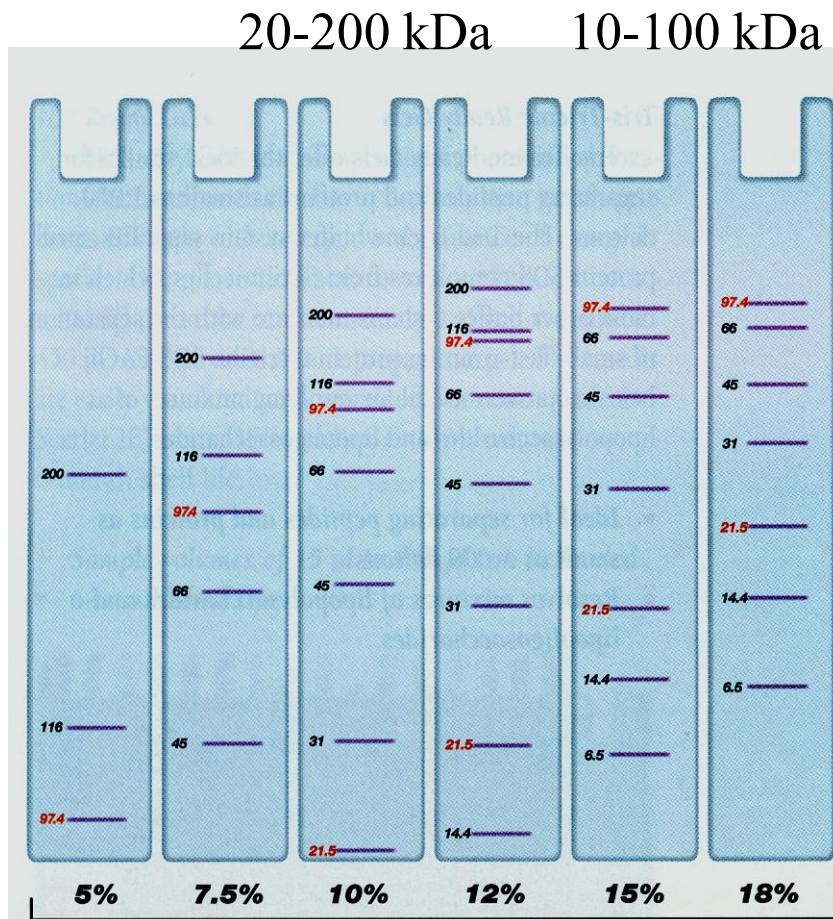
Nel caso di una proteina con struttura IV i valori di PM ottenuti con le due tecniche sono diversi

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

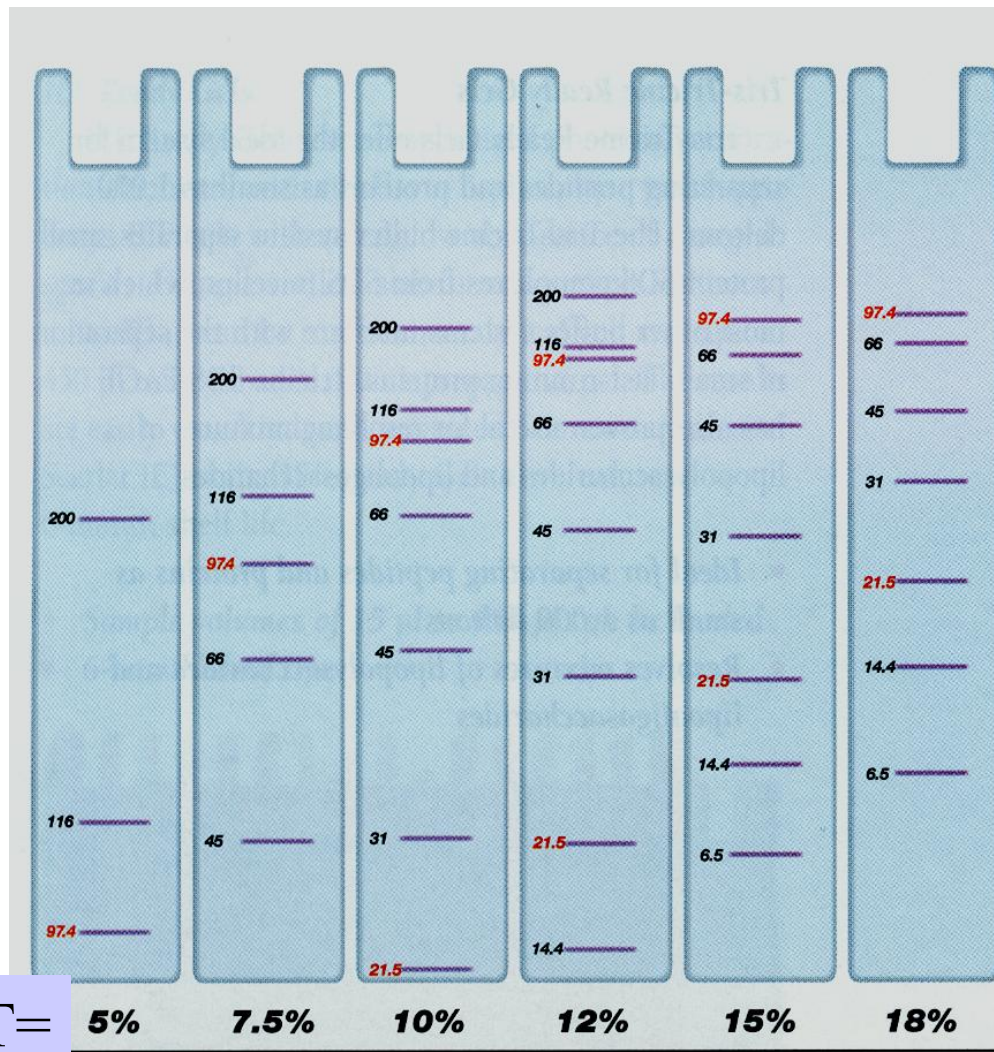
(ogni tecnica ha un suo errore sperimentale)

Per migliorare il potere risolutivo della PAGE:

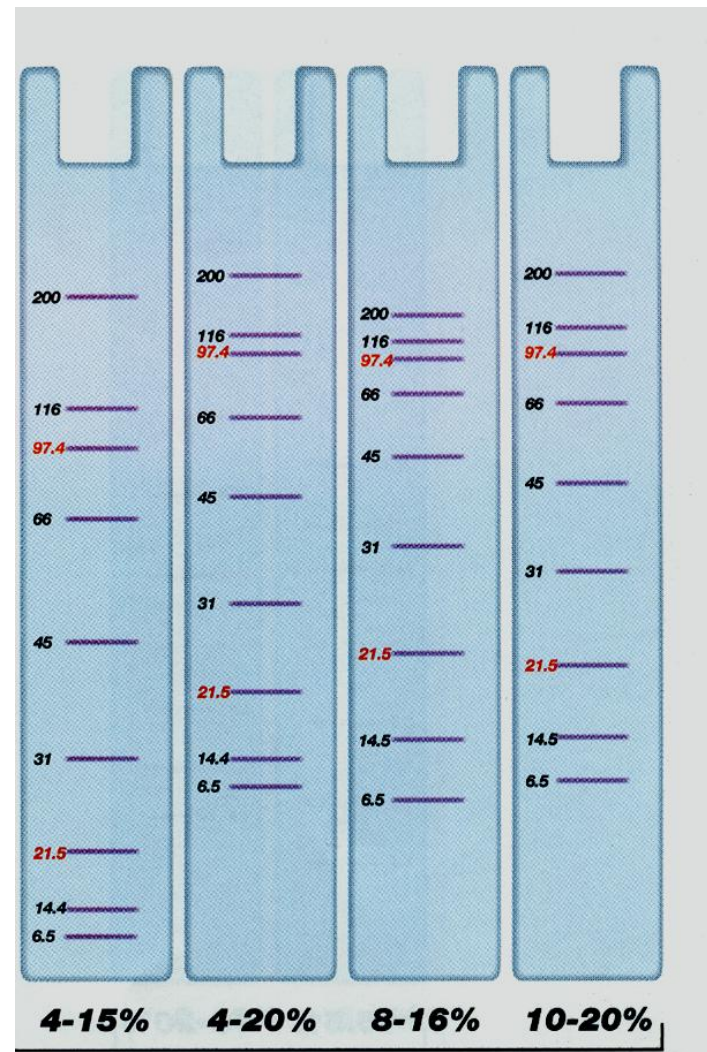
- Gel con T costante: Scegliere opportunamente il valore di T
- Gel con T in gradiente
- Gel discontinuo



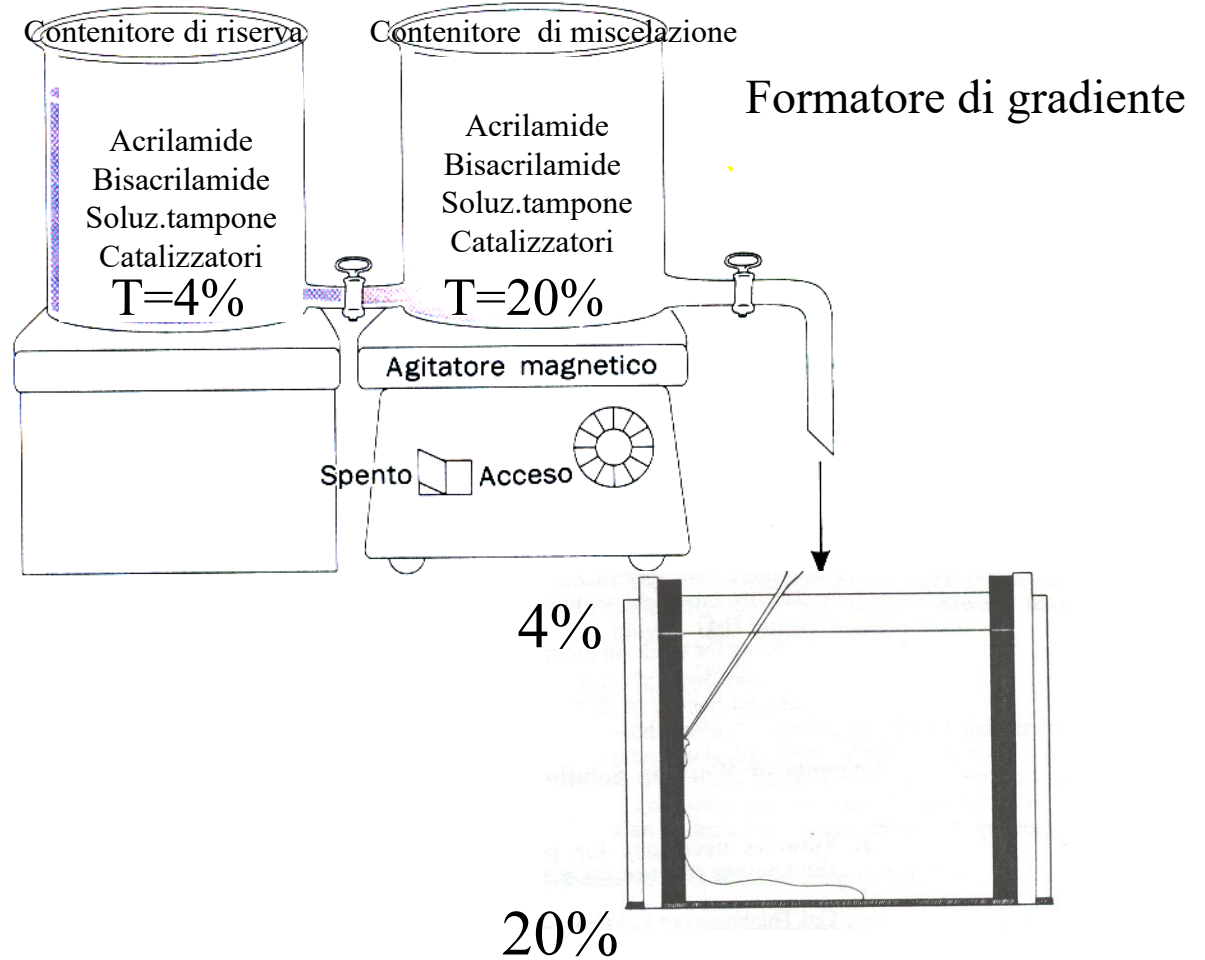
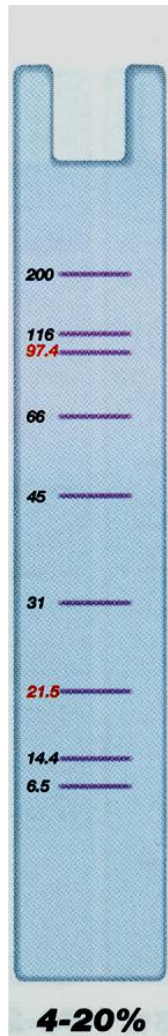
T costante



T in gradiente



Gel in gradiente di concentrazione di acrilamide



SDS

Standard

