

Tecniche elettroforetiche

*SCOPO DELLA METODICA

ELETTROFORESI: movimento di particelle dotate di carica che immerse in un mezzo conduttore sono indotte a muoversi per effetto di un campo elettrico applicato al mezzo stesso.

A COSA SERVE: per distinguere, caratterizzare e identificare biomolecole anche in miscele complesse;

Sfruttare la migrazione elettroforetica per «risolvere» le biomolecole presenti nel campione in singole frazioni, distinte per la carica o per le proprietà strutturali.

APPLICAZIONI NELLA RICERCA BIOMEDICA (livelli di arricchimento in fasi di purificazione, caratterizzazione strutturale di miscele complesse).

- * Quando si applica una **differenza di potenziale (ΔV)** tra due elettrodi, si genera un **campo elettrico (E)**, che dipende dalla **distanza tra gli elettrodi (d)** verso l'elettrodo di carica opposta e che induce la mobilità di una molecola di **carica q** verso l'elettrodo di carica opposta, imprimendole una **velocità di migrazione (v)**;
- * Le molecole si spostano verso il catodo se hanno carica positiva e verso l'anodo se hanno carica negativa;
- * **Amminoacidi, peptidi, proteine, nucleotidi ed acidi nucleici** possiedono gruppi ionizzabili e quindi, ad ogni valore di pH, sono presenti in soluzione come specie elettricamente cariche e possono essere sottoposti ad elettroforesi.

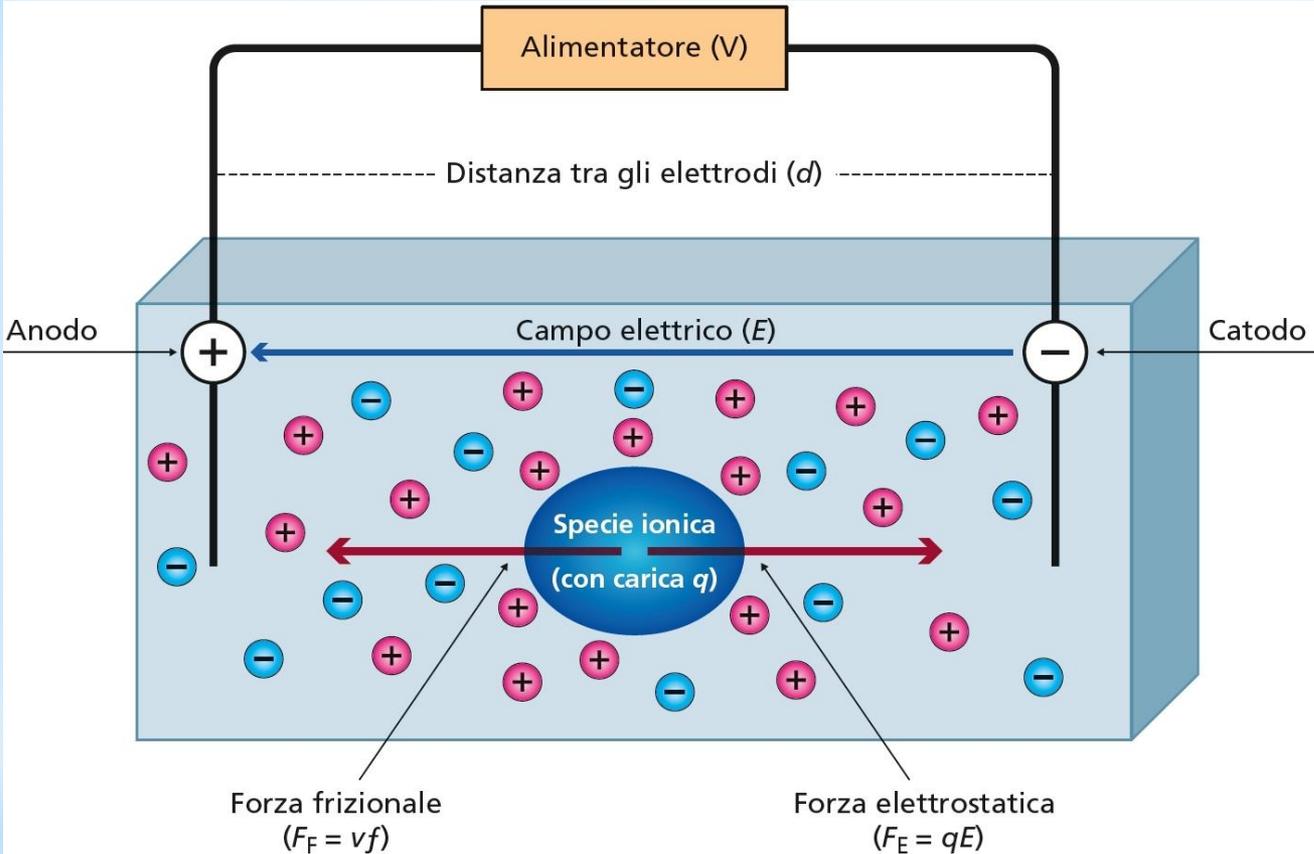


Figura 8.1
 Principi della migrazione elettroforetica. La differenza di potenziale applicato tra gli elettrodi (d.d.p.) genera un campo elettrico dipendente dal potenziale stesso (V , espresso in volt) e dalla distanza degli elettrodi tra di loro (d). E = campo elettrico, grandezza vettoriale il cui valore è espresso in V/cm e il cui vettore è diretto per convenzione dall'elettrodo collegato al polo positivo del generatore di corrente (anodo), all'elettrodo collegato al polo negativo (catodo); v = velocità della specie ionica di carica q in presenza della differenza di potenziale applicato (cm/s); f = coefficiente che misura la "resistenza frizionale", dipendente dalle dimensioni idrodinamiche e dalla forma della molecola in movimento, oltre che dalla viscosità e dalla natura del mezzo fluido in cui si sviluppa il movimento.

MOBILITA' ELETTROFORETICA: $\mu = v / E$

è una proprietà intrinseca di ogni molecola carica dipendente dal coefficiente frizionale nel mezzo fluido in cui si realizza l'esperienza:

$$\mu = q/f$$

FATTORI CHE INFLUENZANO LA MIGRAZIONE ELETTROFORETICA

- CAMPO ELETTRICO
- TEMPERATURA
- SUPPORTO
- TAMPONE
- SPECIE MOLECOLARE

Tabella 8.1 Fattori che influenzano la migrazione elettroforetica.

Campo elettrico	<p>Un incremento di d.d.p. permette di ridurre notevolmente i tempi di esecuzione della corsa, tuttavia causa un aumento del calore prodotto, con effetti negativi sulle sostanze termolabili. Esiste una relazione tra voltaggio, resistenza e corrente, espressa mediante la legge di Ohm:</p> $I = V/R$ <p>dove I indica l'intensità di corrente elettrica, V il voltaggio applicato e R la resistenza del mezzo, che a sua volta dipende sia dal mezzo di supporto del tipo di tampone che dalla sua concentrazione. Inoltre, R aumenta con l'aumentare della distanza tra gli elettrodi ma diminuisce con l'aumentare sia dell'area che della sezione trasversale del supporto.</p>
Temperatura	<p>In presenza di campi elettrici elevati si osserva un aumento del calore prodotto a causa del cosiddetto effetto Joule, da tenere sotto controllo sia per l'effetto denaturante sulle macromolecole che per l'induzione di modi convettivi che limitano il potere di risoluzione, ovvero la capacità di distinguere le diverse componenti di una miscela. L'aumento della temperatura durante lo svolgimento di un'elettroforesi può inoltre indurre fenomeni di evaporazione del tampone elettroforetico, con modifiche delle sue proprietà. Nell'elettroforesi su gel, la mancanza di uniformità di calore comporta una diversa velocità di migrazione tra le corsie periferiche più fredde e quelle interne più calde (e, quindi, a viscosità maggiore e "più veloci"). Il risultato è il cosiddetto effetto smile.</p>
Supporto	<p>Sebbene l'elettroforesi zonale utilizzi come mezzo di migrazione (supporto) materiale relativamente inerte, esso può presentare nei riguardi delle specie ioniche effetti selettivi di adsorbimento, in grado di modificare le proprietà di migrazione di alcuni componenti. I supporti comunemente usati per l'elettroforesi zonale sono riportati nella scheda in laboratorio 8.2 e discussi nel Paragrafo 8.2. Nelle separazioni di sostanze ad alto peso molecolare, come le proteine e gli acidi nucleici, l'uso del gel come mezzo di supporto ha ampiamente sostituito i sistemi elettroforetici su carta e su acetato di cellulosa.</p>
Tampone	<p>In un'elettroforesi, la corrente viene condotta principalmente dalla soluzione elettrolitica. In genere questa è rappresentata da un tampone, che ha l'ulteriore proprietà di mantenere le molecole del campione in uno stato ionizzato. Il valore del pH del tampone elettroforetico è critico per determinare sia la carica netta, e quindi la forza elettrostatica che determinerà la migrazione elettroforetica, che la solubilità stessa del campione. Il tampone ottimale deve essere ovviamente inerte chimicamente verso le specie ioniche da esaminare. Inoltre, la forza ionica è generalmente compresa tra 0,05 e 0,10 M: se è troppo elevata, infatti, ha un effetto negativo sulla velocità di migrazione a causa dell'effetto di competizione degli ioni del tampone sulle specie ioniche in movimento, mentre se è eccessivamente ridotta si tradurrà in un minor potere di risoluzione a causa della riduzione della conducibilità del mezzo, che si traduce in un aumento di diffusione delle "bande" elettroforetiche. Se il tampone presente nelle due camere dell'apparato elettroforetico è lo stesso utilizzato per saturare il supporto, si parla di sistema continuo; in caso contrario il sistema si definisce discontinuo.</p>
Specie molecolare	<p>La velocità di migrazione di una molecola aumenta all'aumentare della sua carica netta, che, a sua volta, dipende sia dal suo grado di dissociazione che dal pH del tampone elettroforetico. D'altra parte, per l'Equazione 8.3, il peso molecolare della molecola influenza in modo inverso la velocità di migrazione, perché con l'aumento delle dimensioni molecolari aumentano le forze frizionali rispetto al mezzo circostante. Molecole di dimensioni simili ma di forma molecolare diversa (per esempio, proteine fibrose e globulari) mostrano differenti caratteristiche di migrazione a causa del diverso effetto delle forze frizionali ed elettrostatiche. Questo principio è sfruttato, per esempio, in alcune applicazioni specializzate nel studio degli acidi nucleici (si veda il Paragrafo 8.4).</p>

Principali metodologie elettroforetiche nella ricerca e nella diagnostica biomedica

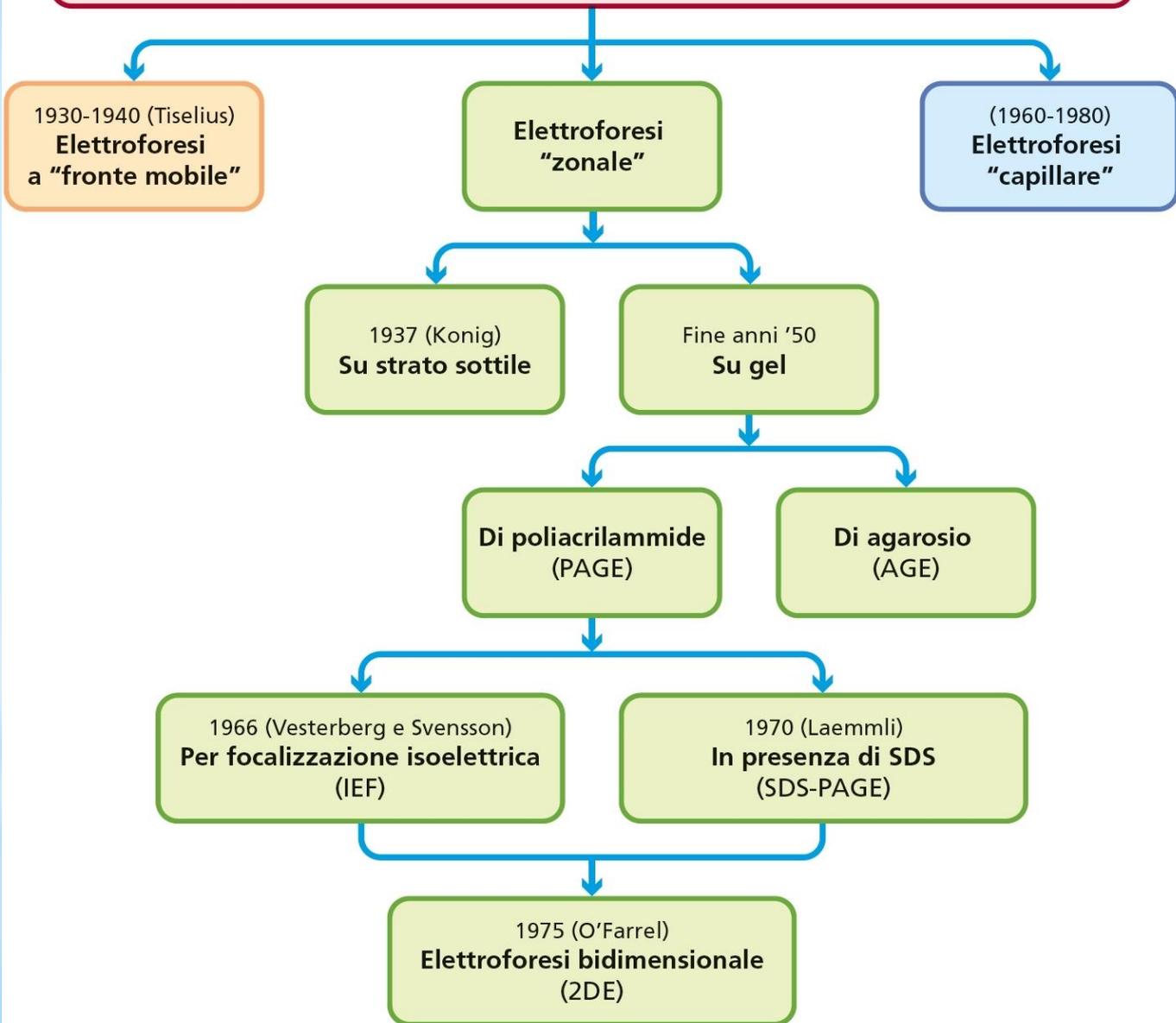
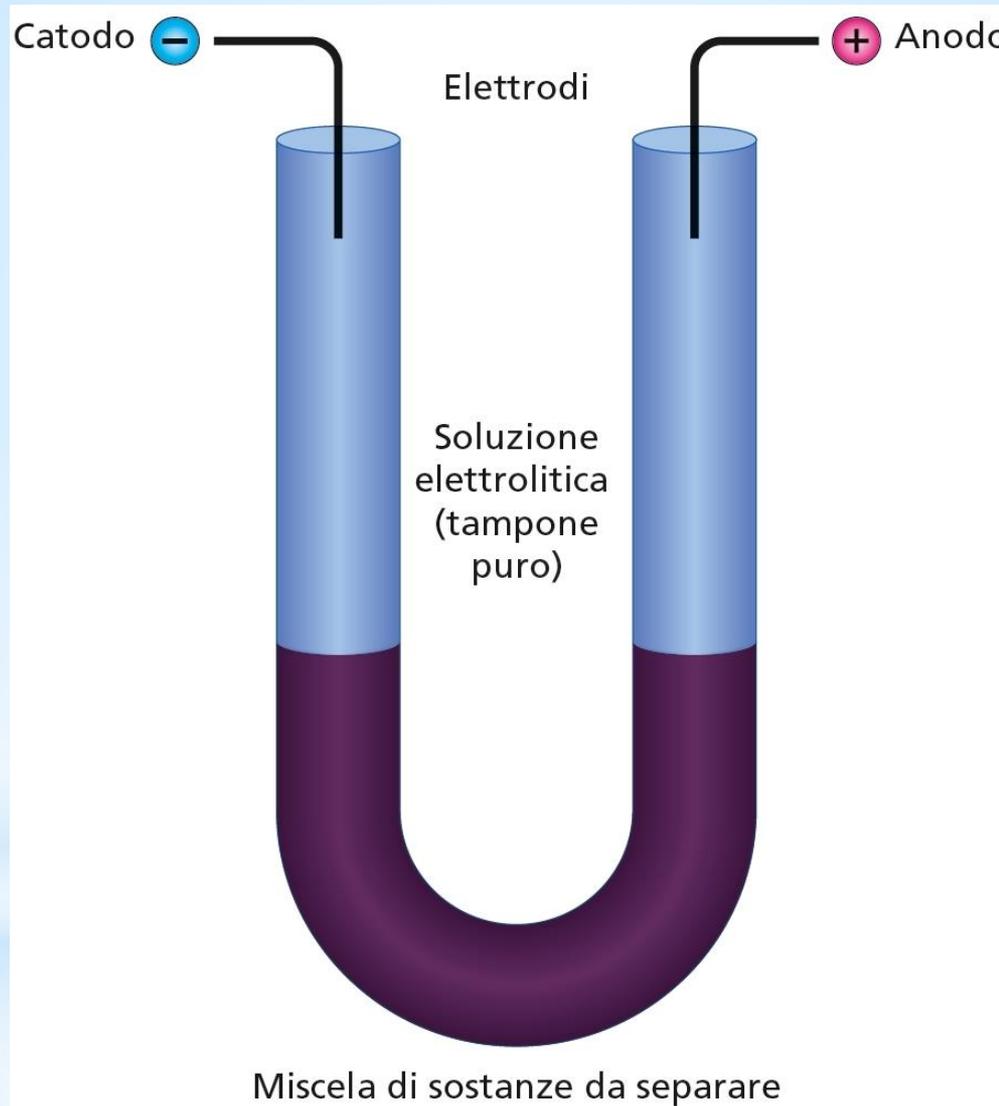


Figura 8.2

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

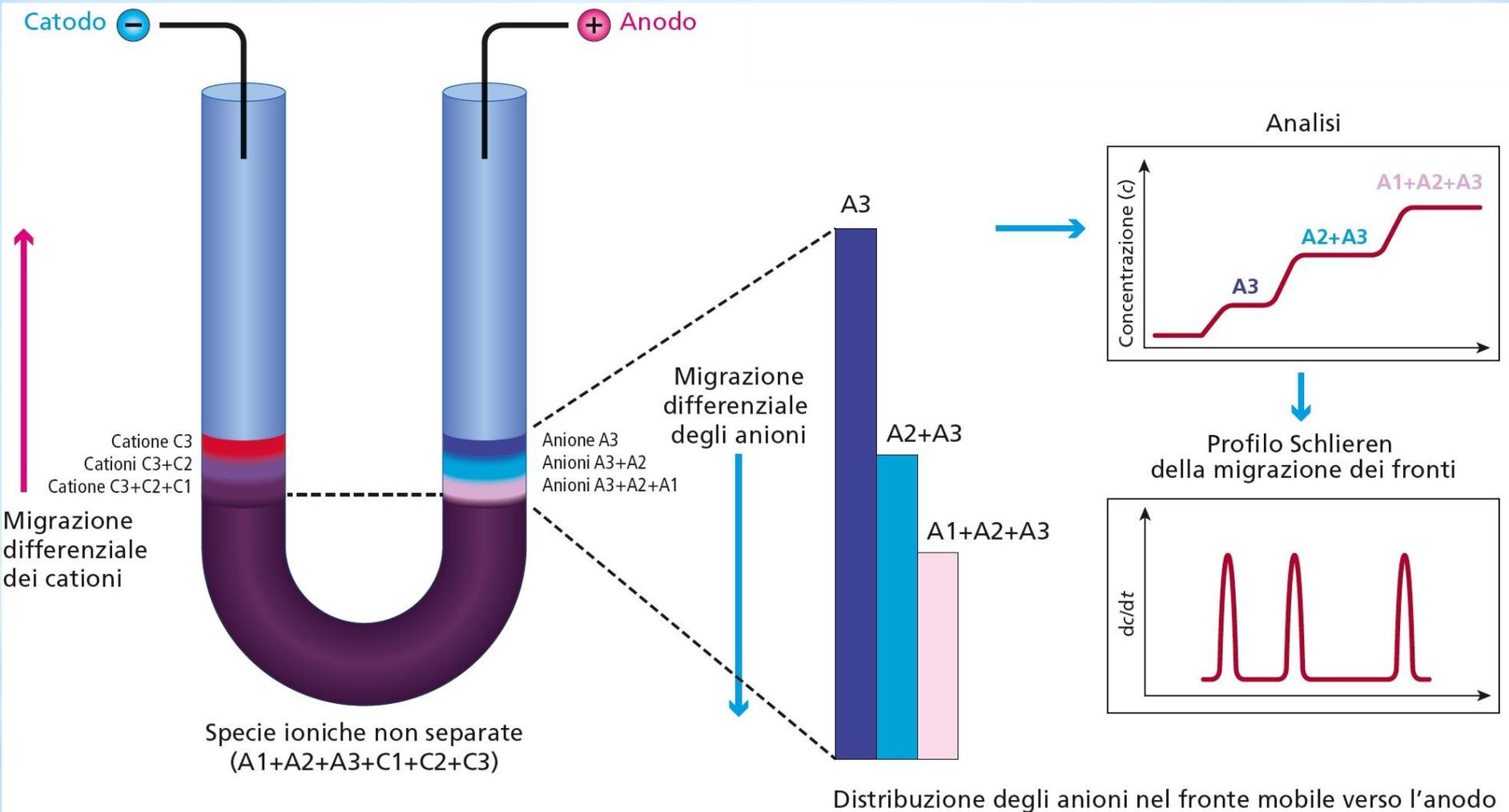
ELETTROFORESI IN FASE LIQUIDA (O A FRONTE MOBILE)

APPARATO



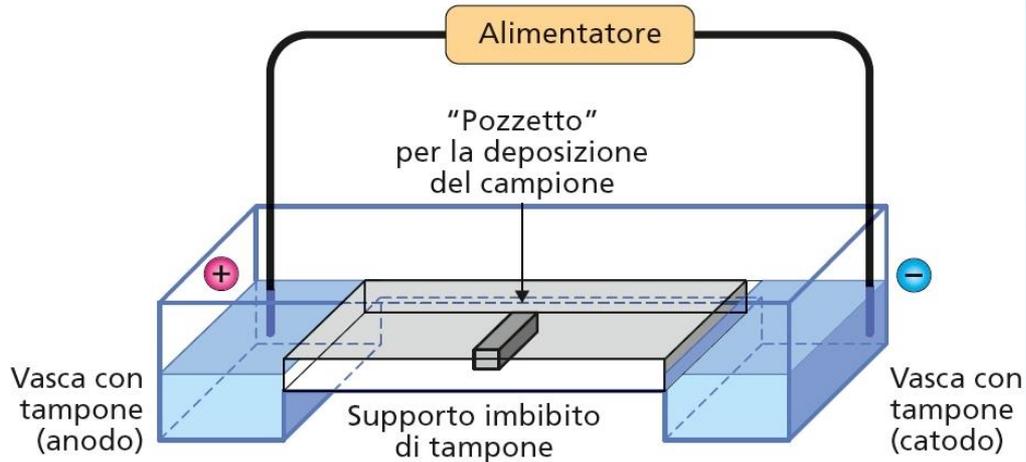
FORMAZIONE DEI «FRONTI MOBILI»

DETERMINAZIONE DELLA MOBILITA'

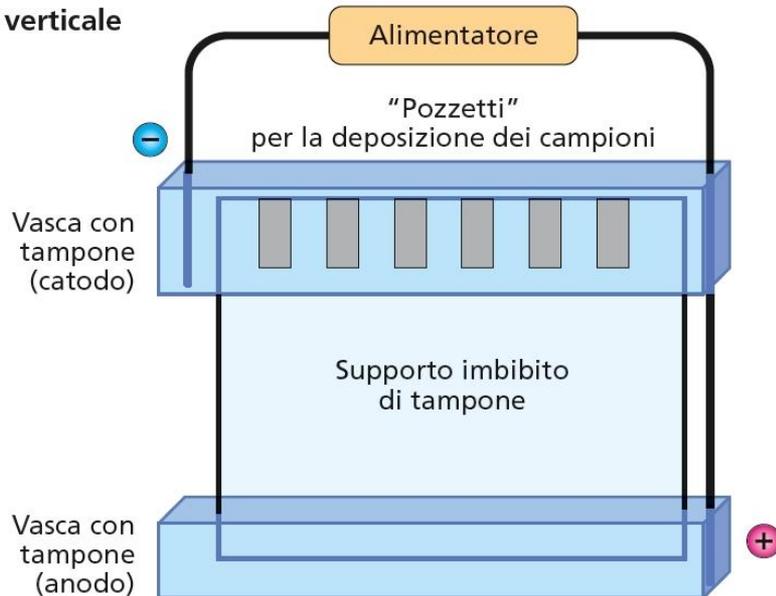


L'apparato (schema)

A sviluppo orizzontale



A sviluppo verticale



ELETTROFORESI ZONALE

SUPPORTI NON FILTRANTI:

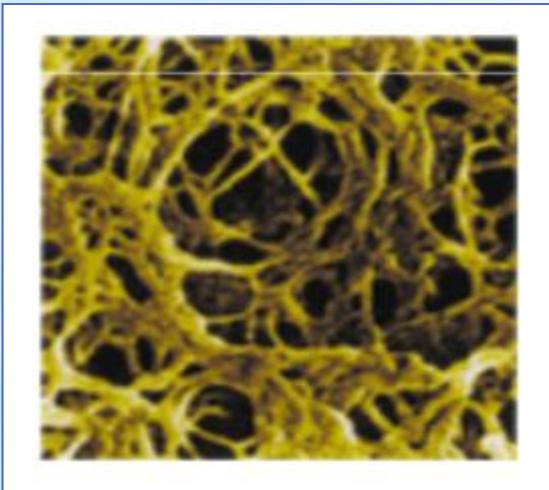
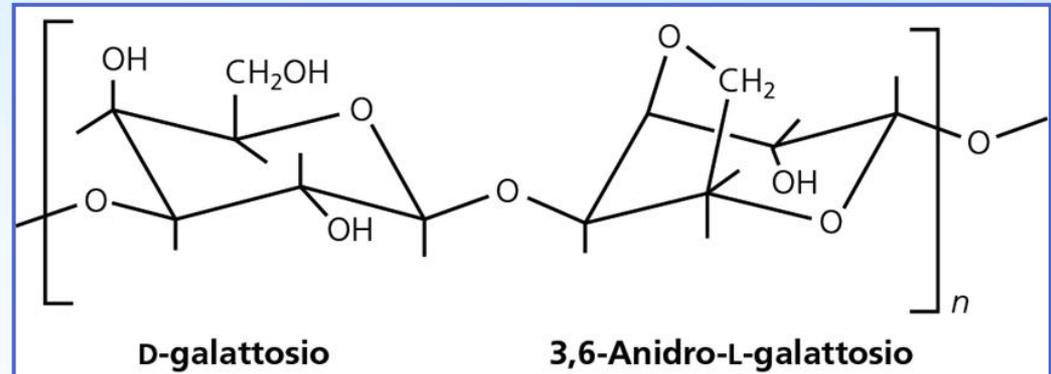
- ✓ CELLULOSA
- ✓ ACETATO DI CELLULOSA

SUPPORTI FILTRANTI:

- ✓ AGAROSIO
- ✓ POLIACRILAMMIDE

GEL FISICO REVERSIBILE: GEL DI AGAROSIO

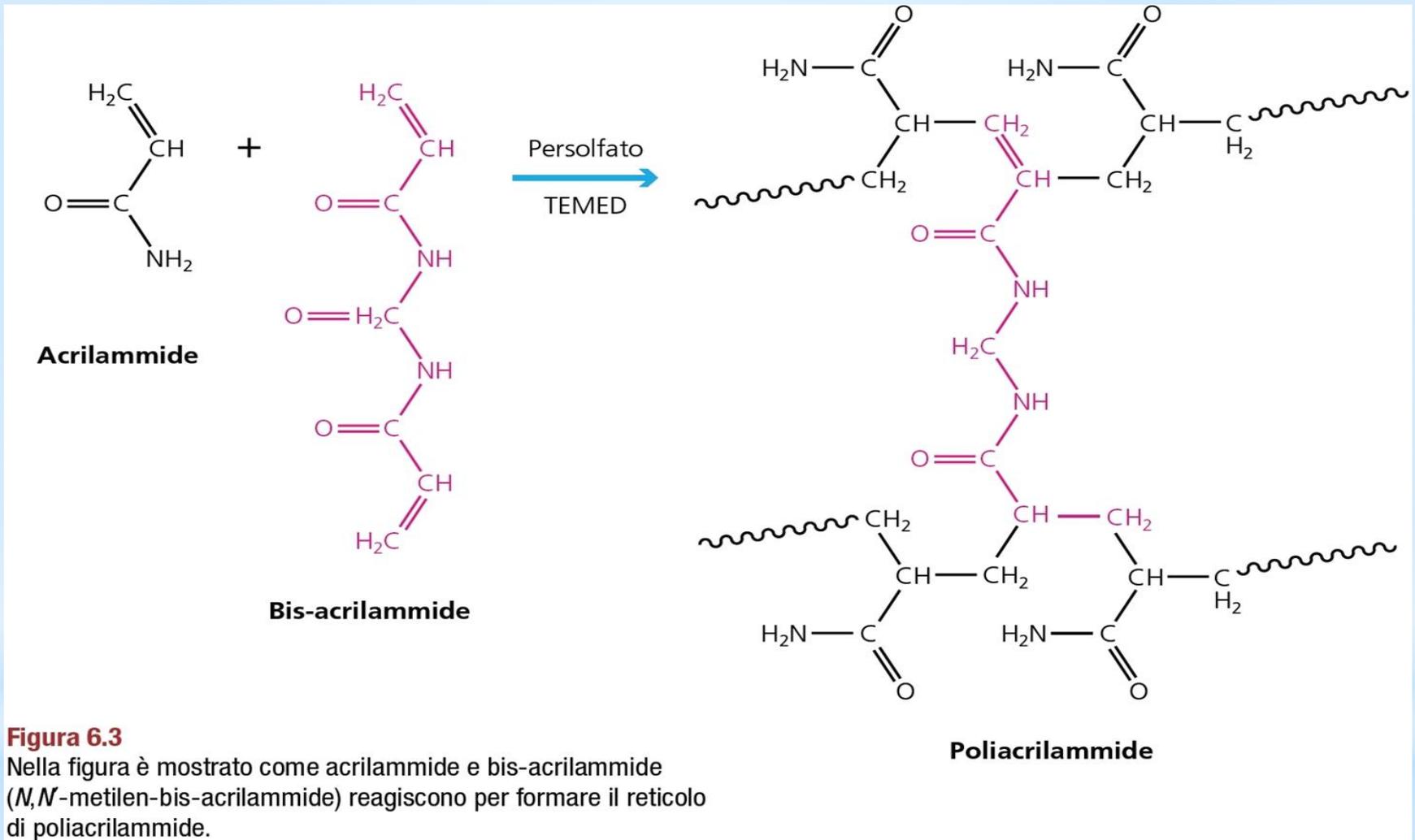
- ❖ L'**agarosio** è un polisaccaride lineare di unità di agarobiosio costituite da D-galattosio e 3,6-anidro-L-galattosio.



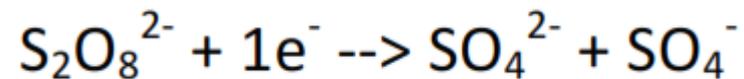
RETICOLO DI AGAROSIO POLIMERIZZATO

- ❖ Il **gel di agarosio** viene ottenuto sciogliendo a caldo nel tampone quantità variabili di agarosio (dallo 0,6 al 3% peso/volume). Una volta sciolto e dopo che ha raggiunto una temperatura moderata (circa 40 °C), a cui l'agarosio è ancora liquido, questo viene versato in una camera elettroforetica e lasciato solidificare.

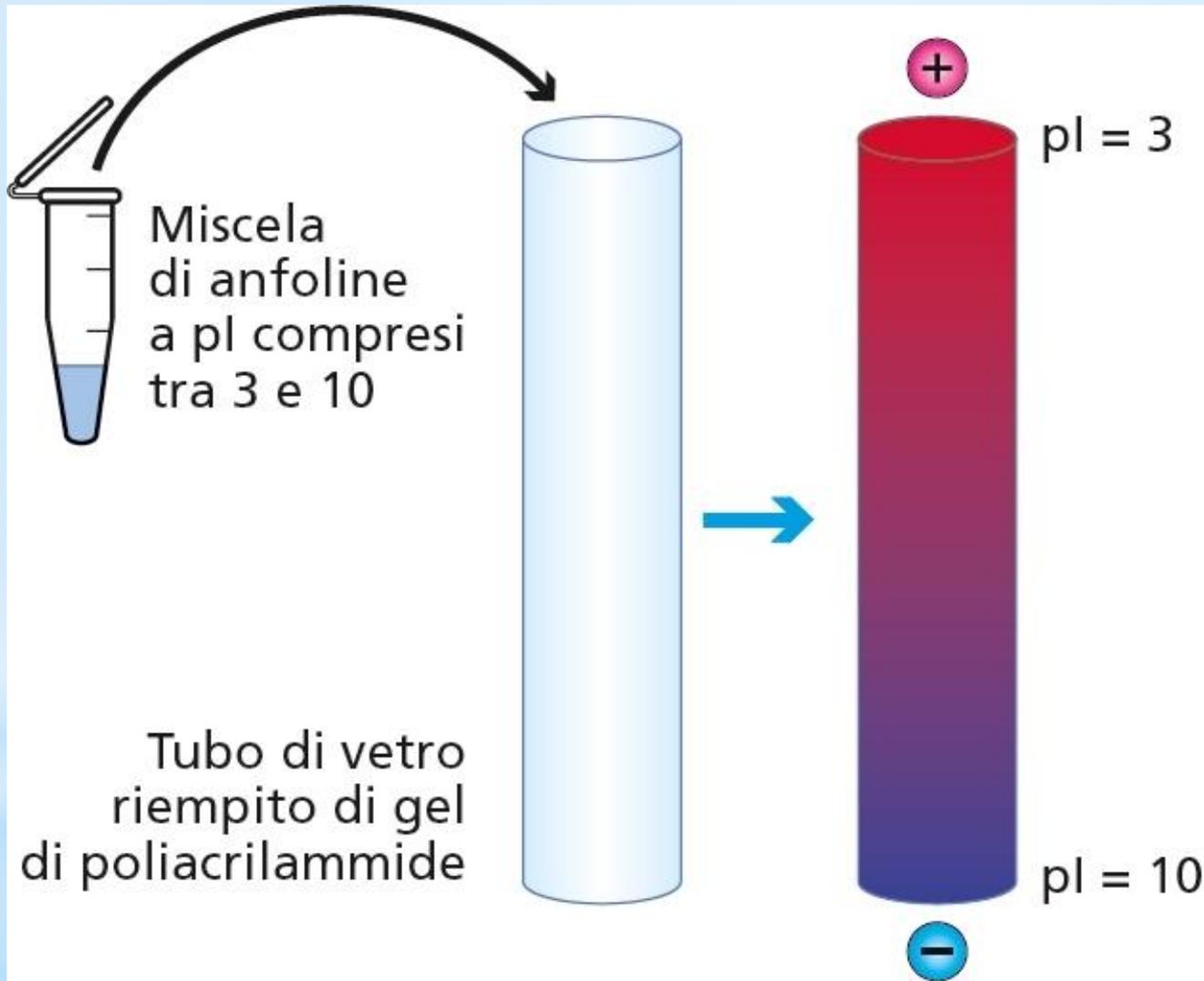
GEL CHIMICO IRREVERIBILE: GEL DI POLIACRILAMMIDE



- Il **gel di poliacrilammide** viene ottenuto mediante polimerizzazione di unità di acrilammide in presenza di piccole quantità (una parte su 20-30) di N,N'-metilen-bis-acrilammide, che formando legami crociati tra i polimeri di acrilammide genera un reticolo gelatinoso;
- La polimerizzazione dell'acrilammide è una reazione radicalica a catena, innescata dal **persolfato di ammoni** che tende a scindersi spontaneamente producendo radicali liberi. Per accelerare la formazione di questi radicali liberi, si include nella miscela di polimerizzazione la base **TEMED** (N,N,N',N'-tetrametilendiammina), che catalizza la decomposizione dello ione persolfato;
- Il radicale $\text{SO}_4^{\cdot -}$ rappresenta la specie efficace (R·) nella catalisi della polimerizzazione con persolfato. L'attacco radicalico di R· ad una molecola di acrilammide (M) innesca la polimerizzazione, in quanto genera un radicale libero della stessa molecola di acrilammide, che attacca una seconda molecola di acrilammide e così via, formano una catena crescente.



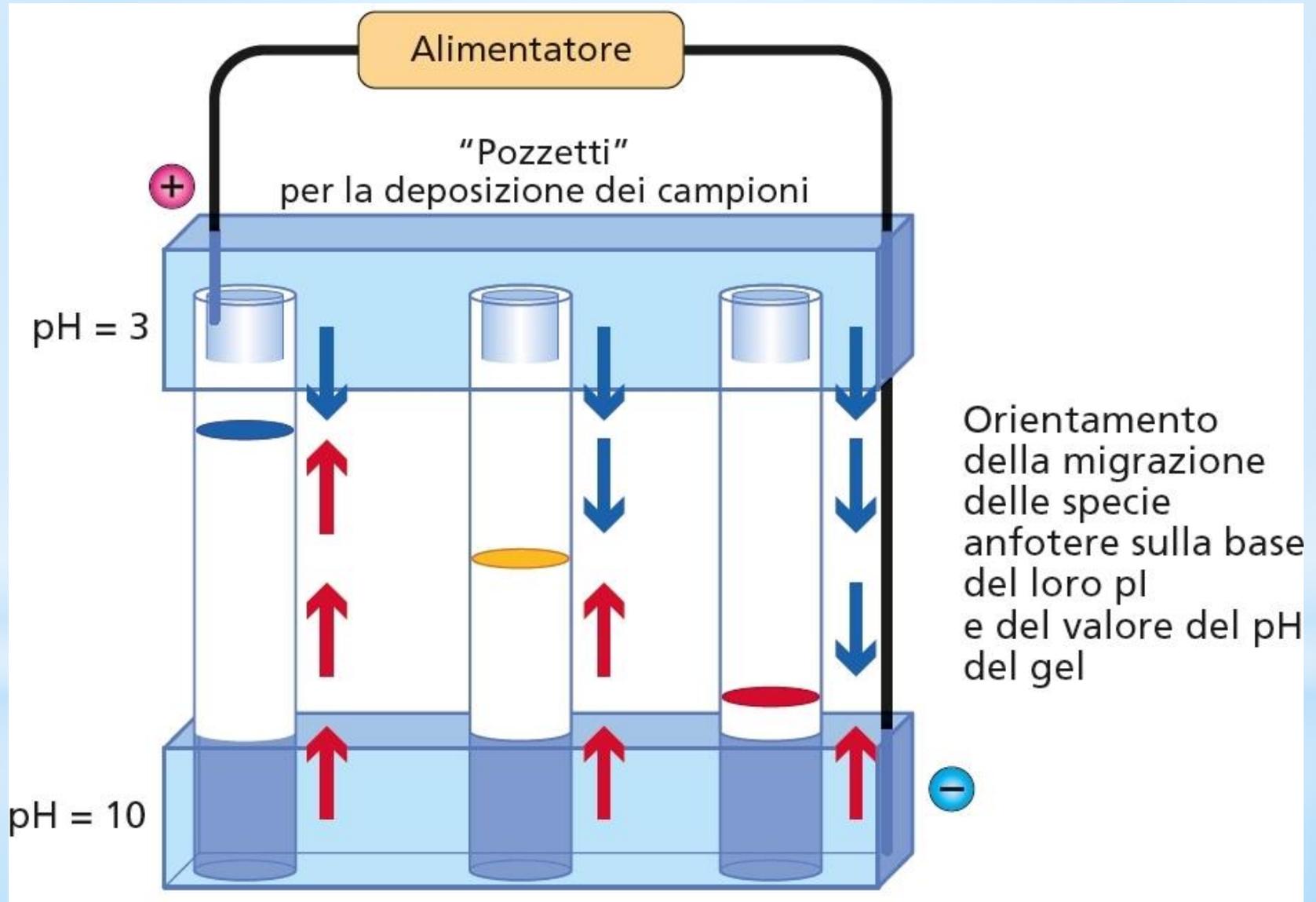
FOCALIZZAZIONE ISOELETTTRICA (IEF)



CREAZIONE DEL GRADIENTE DI pH

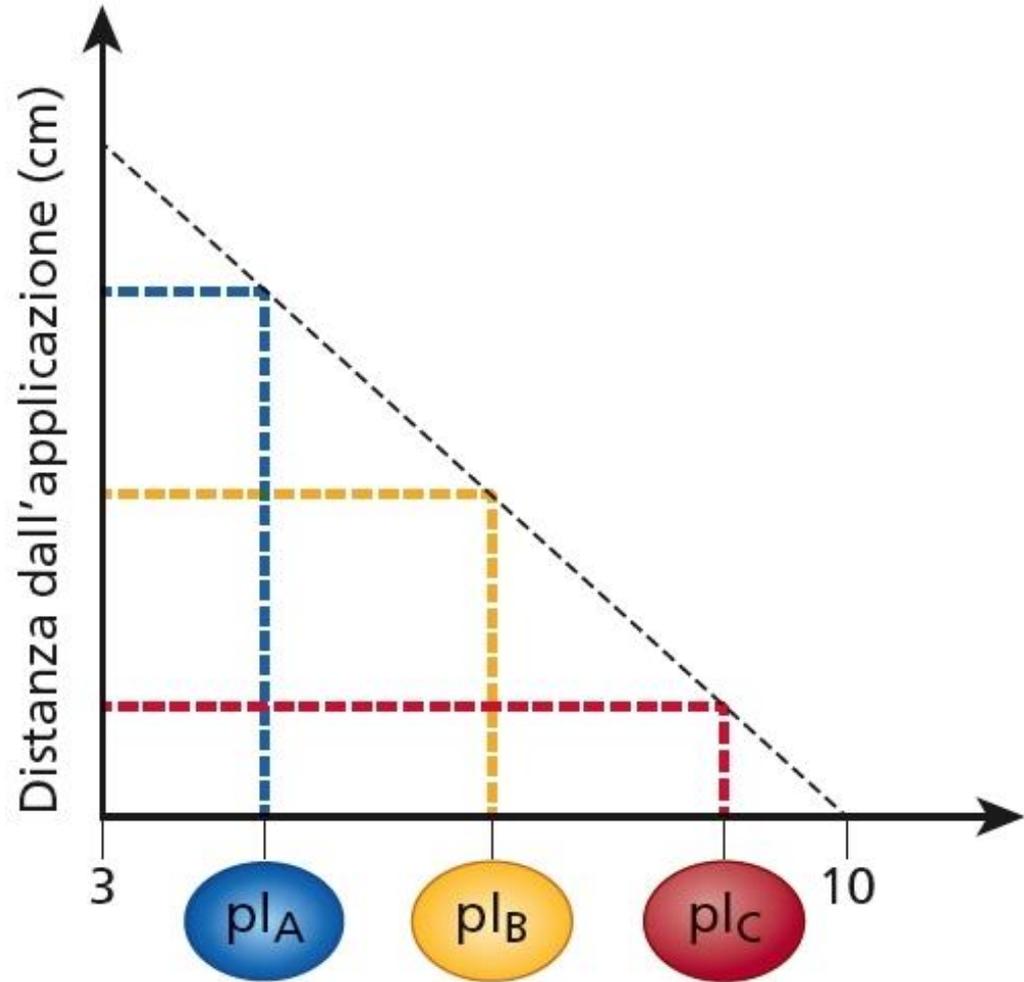
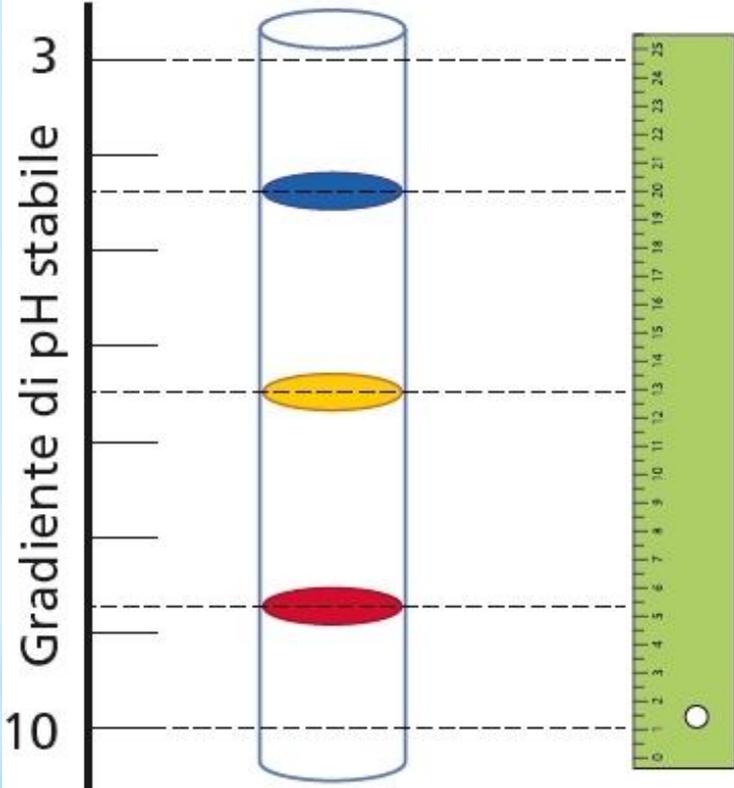
FOCALIZZAZIONE ISOELETTTRICA (IEF)

APPARATO E SVILUPPO ELETTROFORETICO



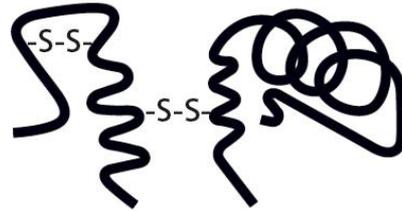
FOCALIZZAZIONE ISOELETTTRICA (IEF)

DETERMINAZIONE DEL pI DELLE PROTEINE



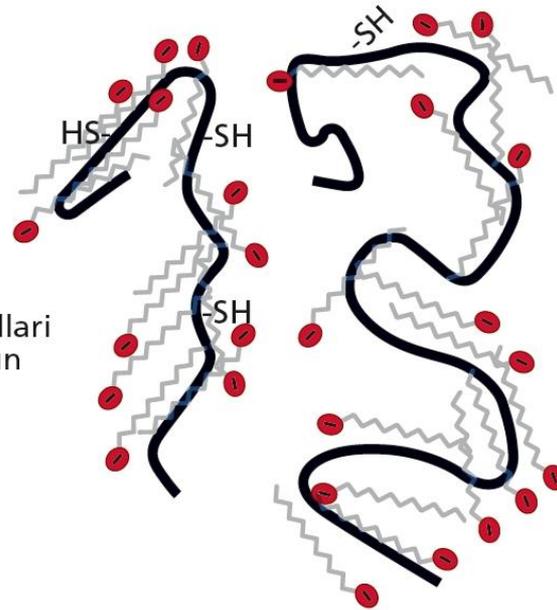
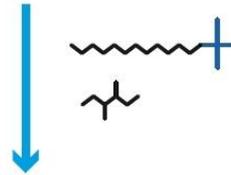
SDS PAGE E ANALISI DELLE PROTEINE

Proteine con legami disolfuro
intra- o intercatena



Denaturazione, in presenza di

- sodio dodecilsolfato (SDS)
- riducente (per esempio ditioneitrato)
- elevata temperatura.



Formazione di strutture micellari
cariche negativamente, con un
rapporto SDS:proteina pari
a 1,4:1 (in peso).

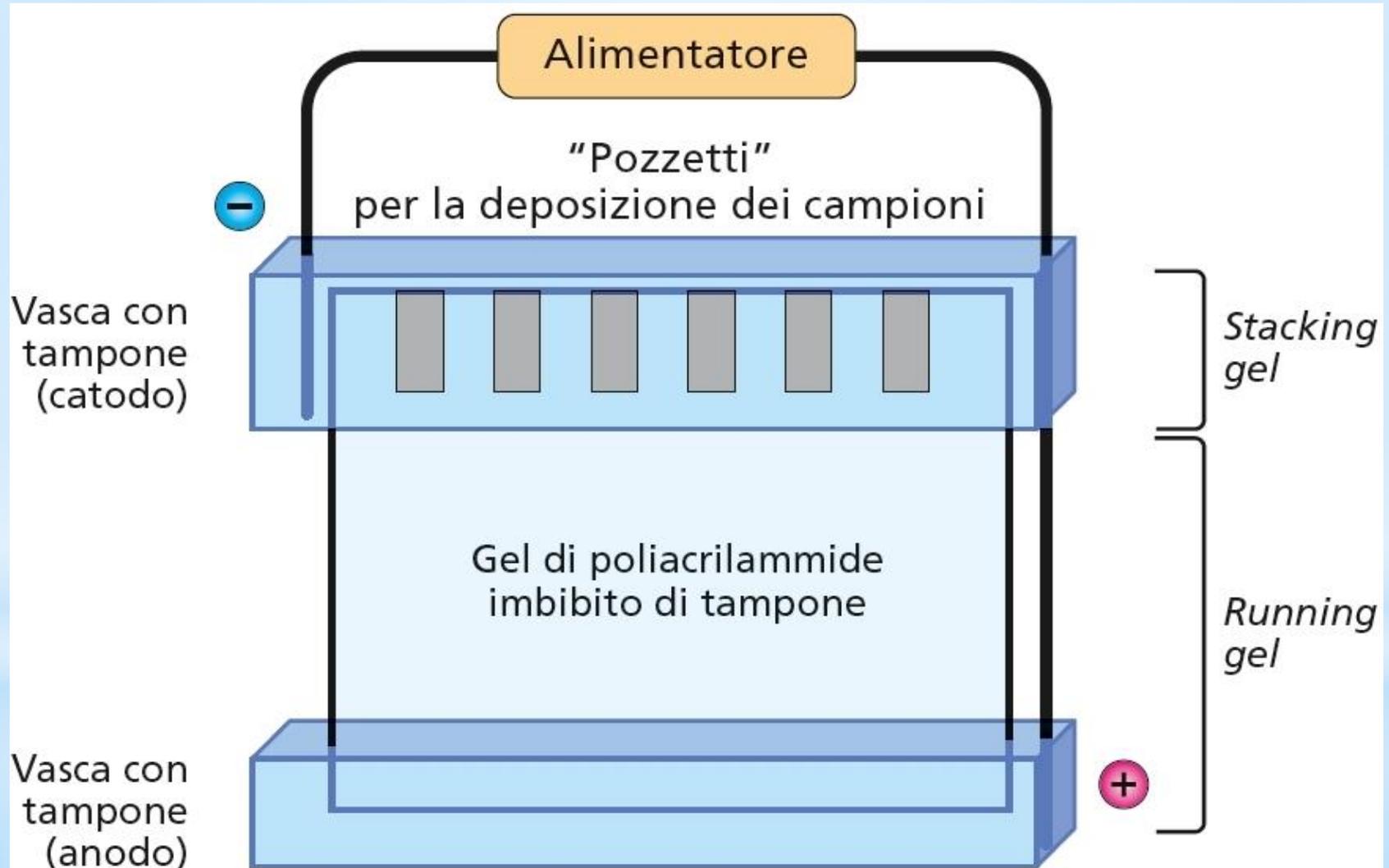
DENATURAZIONE DELLE PROTEINE

l'SDS:

- ✓ Impedisce le interazioni chimiche intracatena, responsabili della struttura tridimensionale e dell'associazione di più subunità polipeptidiche in proteine multimeriche;
- ✓ Conferisce carica negativa a tutte le proteine della miscela; l'SDS si lega con un rapporto stechiometrico fisso di circa una molecola di SDS ogni due amminoacidi proteina.

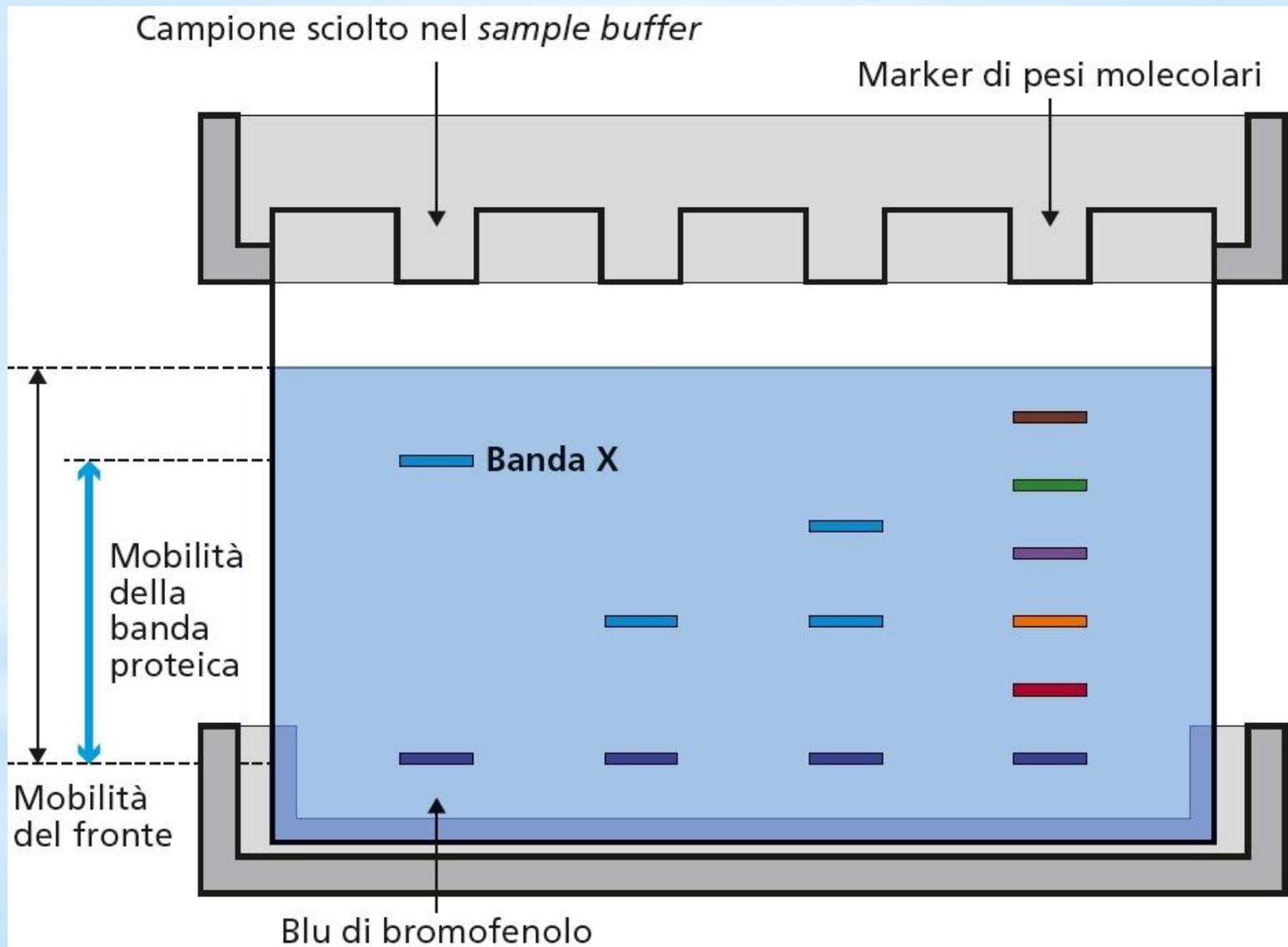
SDS PAGE E ANALISI DELLE PROTEINE

COMPOSIZIONE DEL GEL DI POLIACRILAMMIDE



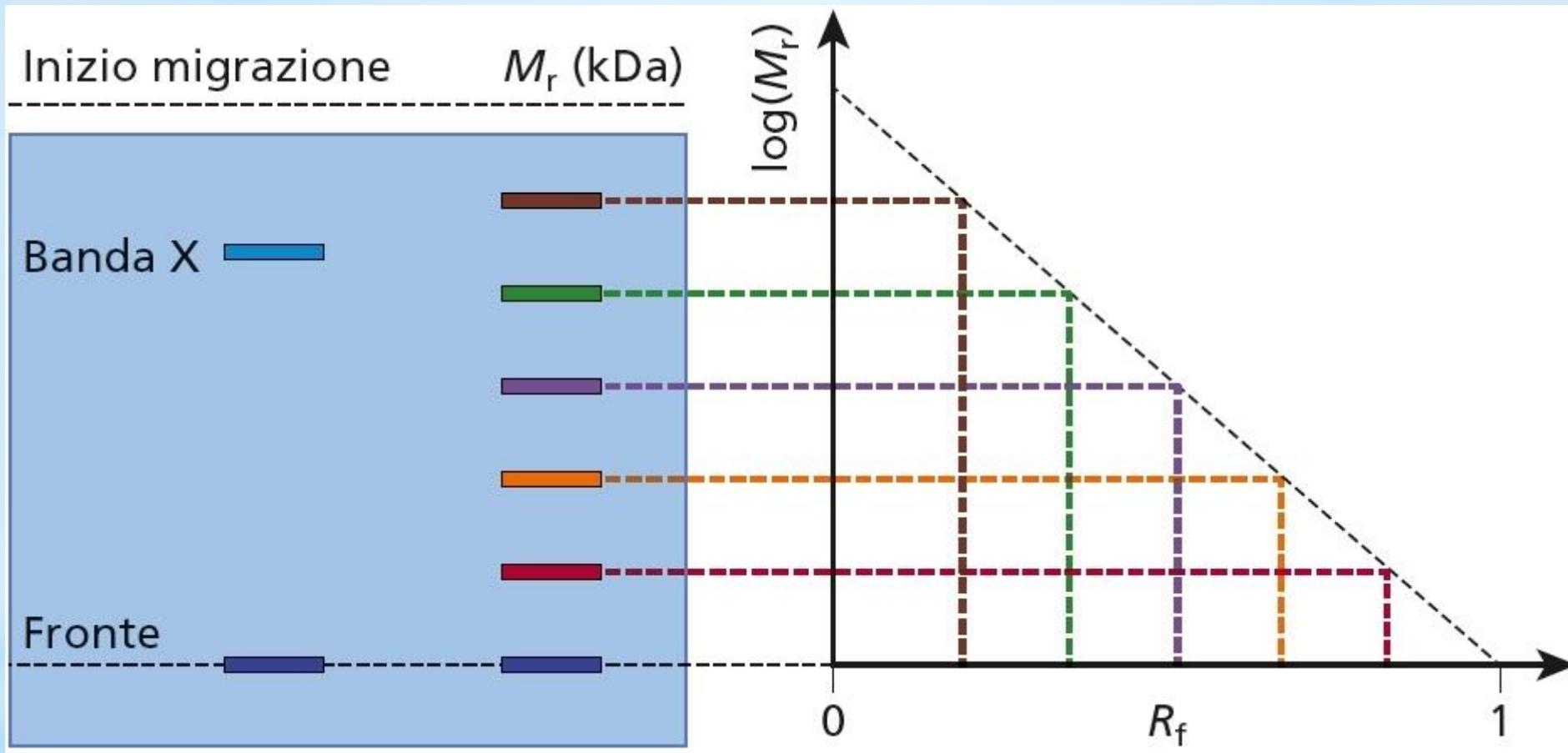
SDS PAGE E ANALISI DELLE PROTEINE

CARICAMENTO DEL CAMPIONE



SDS PAGE E ANALISI DELLE PROTEINE

DETERMINAZIONE DEL PESO MOLECOLARE



L'SDS PAGE viene utilizzata per:

1. Seguire il corso della purificazione di proteine. Permette di evidenziare i contaminanti e il grado di purezza;
2. Determinazione della massa molecolare di catene polipeptidiche;
3. Determinare la concentrazione di una proteina nelle cellule grazie ad una colorazione quantitativa o al successivo Western Blot (valutazione comparativa).

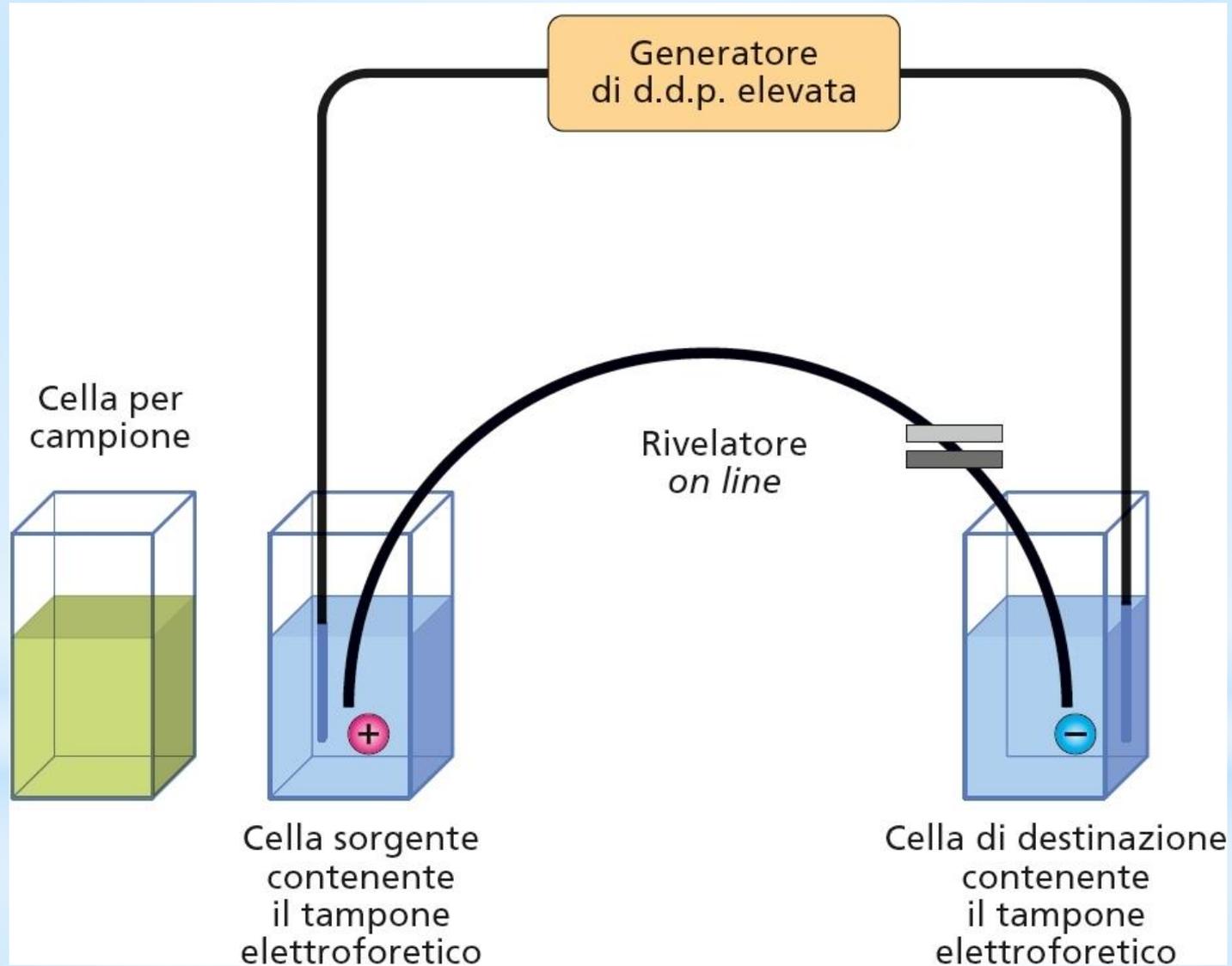
LIMITAZIONE

la potenza generata nel mezzo in cui passa la corrente viene dissipata sotto forma di calore, che può avere i seguenti effetti negativi:

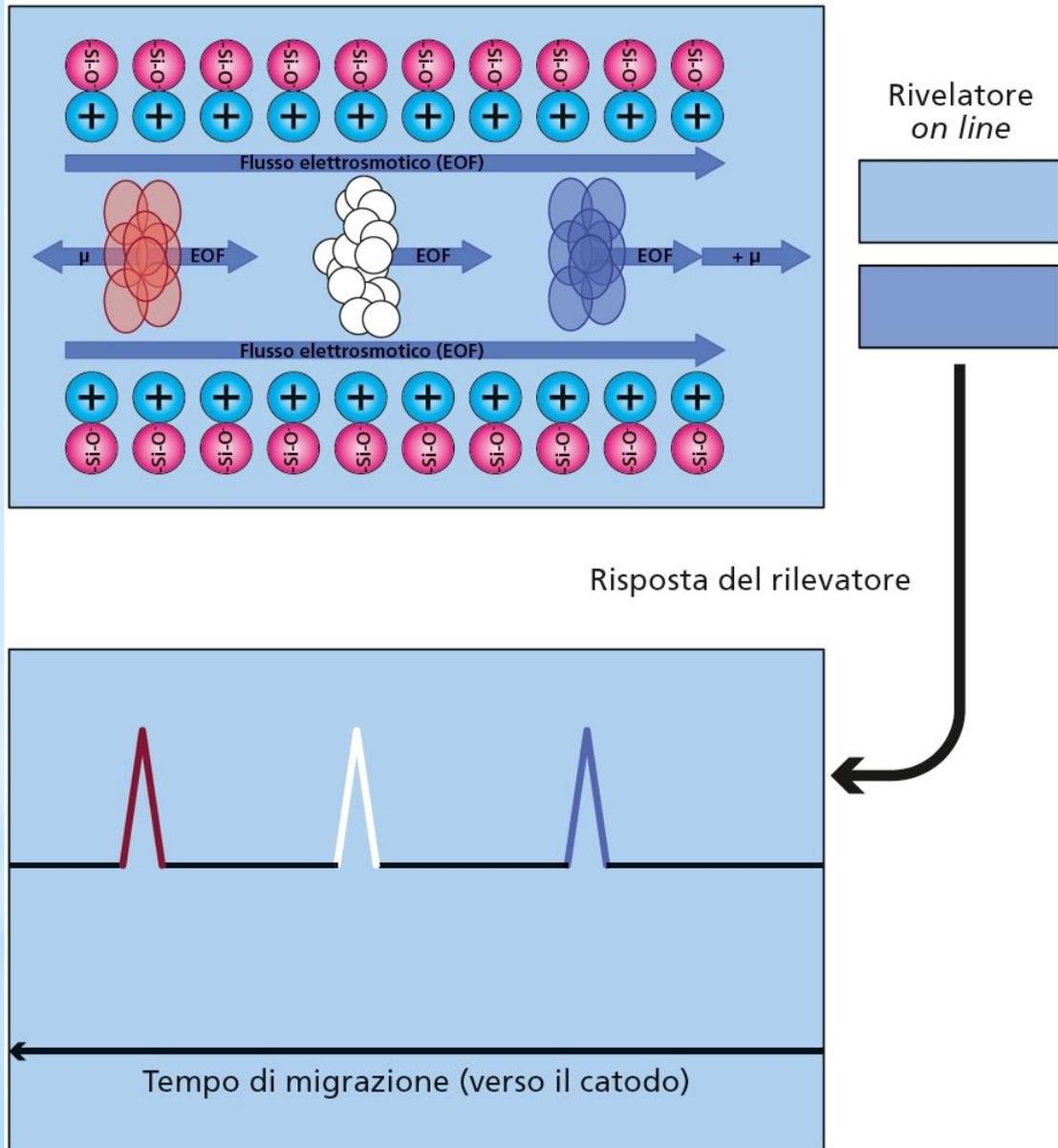
- Aumento della velocità di diffusione dei campioni e degli ioni del tampone, che determina la formazione di bande meno definite;
- Comparsa di correnti convettive, che portano al mescolamento dei campioni separati;
- Denaturazione di quei campioni che sono poco stabili alle alte temperature .

ELETTROFORESI CAPILLARE

APPARATO

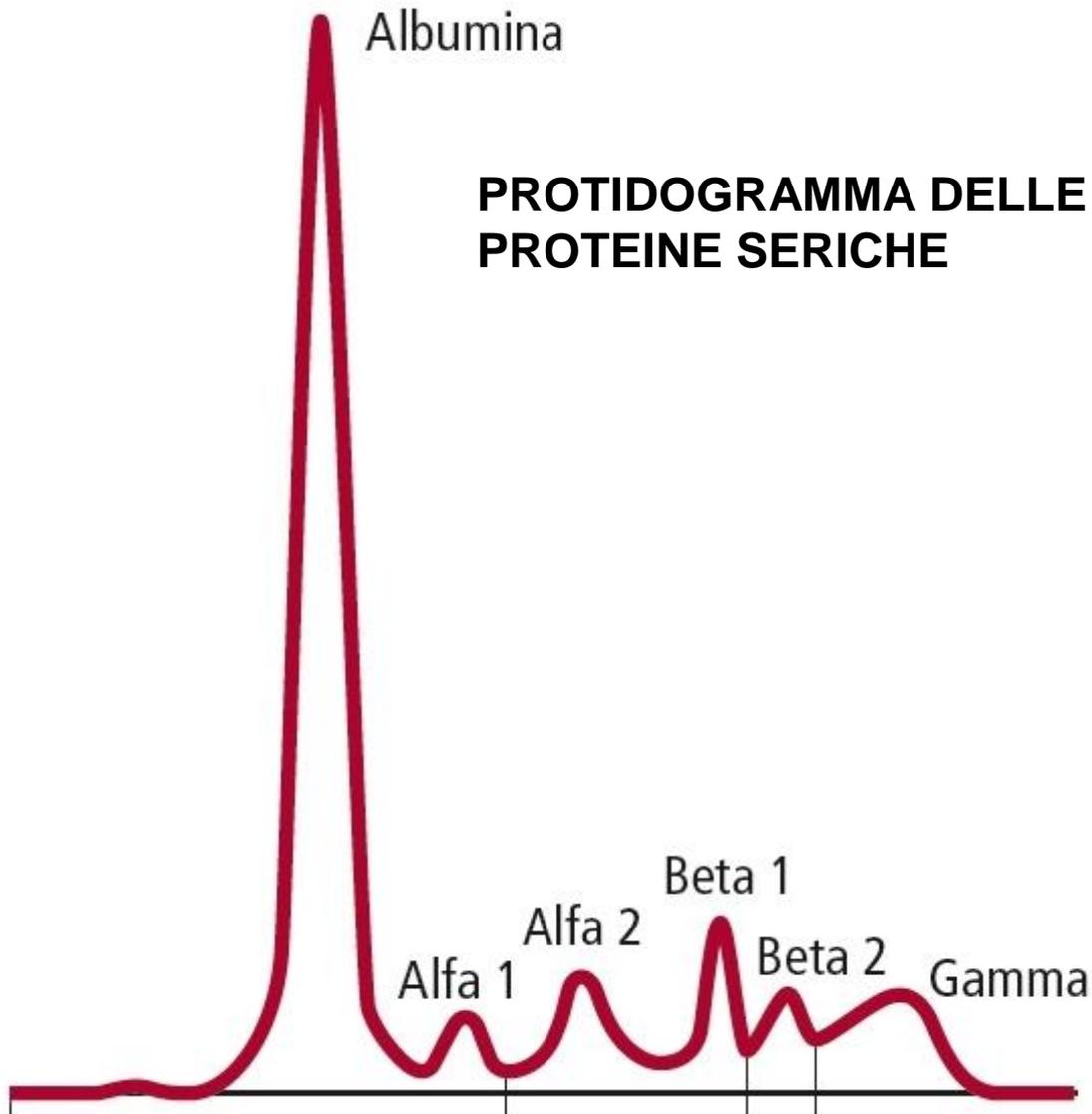


ELETTROFORESI CAPILLARE



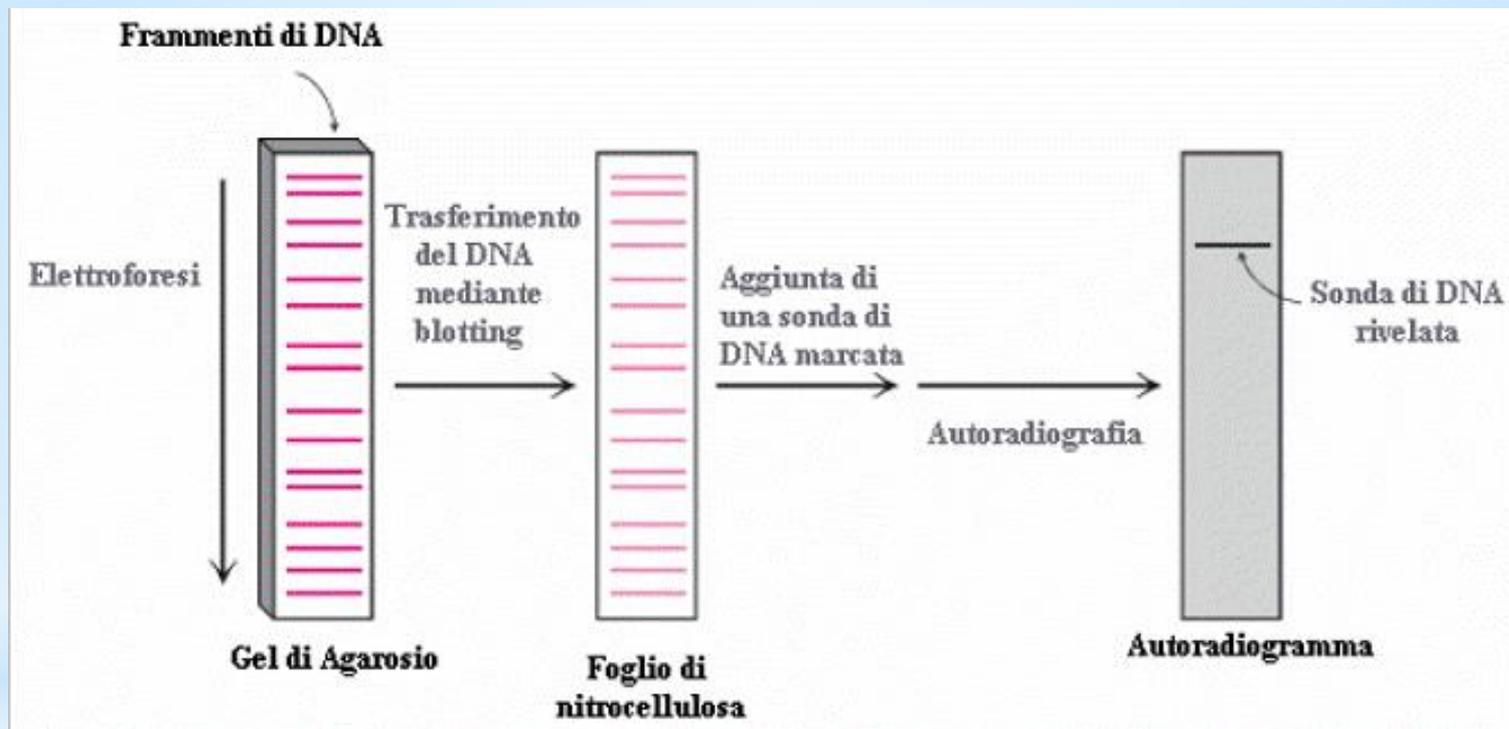
**FORMAZIONE DEI
«FRONTI MOBILI»**

ELETTROFORESI CAPILLARE



Frazioni	%
Albumina	60,4
Alfa 1	4,7
Alfa 2	10,5
Beta 1	6,9
Beta 2	5,6
Gamma	11,9
Totale	100

Southern blotting. Identificazione di una sequenza specifica di DNA



- Una miscela di frammenti di restrizione viene separata tramite elettroforesi su gel di agarosio, quindi si denatura il DNA portandolo nella forma a singola catena e lo si trasferisce su un foglio di nitrocellulosa per capillarità (“**blotting**”). I vari frammenti di DNA mantengono sulla nitrocellulosa le stesse posizioni che avevano nel gel. Le posizioni possono essere determinate esponendo il foglio a un filamento di DNA a singola elica di sequenza nota (detta “*probe*” o sonda) marcato radioattivamente.
- La sonda si lega con un filamento complementare e l'autoradiografia rivela quindi la posizione dell'insieme ibridato (cioè del complesso frammento di restrizione-sonda). In questo modo si può identificare un frammento particolare in mezzo a milioni di altri frammenti.
- Questa tecnica molto efficace prende il nome di **Southern blotting** in quanto ideata da Edwin Southern. La stessa procedura di analisi può essere seguita per individuare specifiche sequenze di RNA. La tecnica di analisi dell'RNA è stata chiamata **Northern blotting**.
- La **Western blotting** è una tecnica usata per rivelare una particolare proteina colorandola con uno specifico anticorpo. Southern, Northern e Western blotting sono noti anche come blotting di DNA, RNA e proteine.

APPARATI DELLE ELETTROFORESI ZONALI

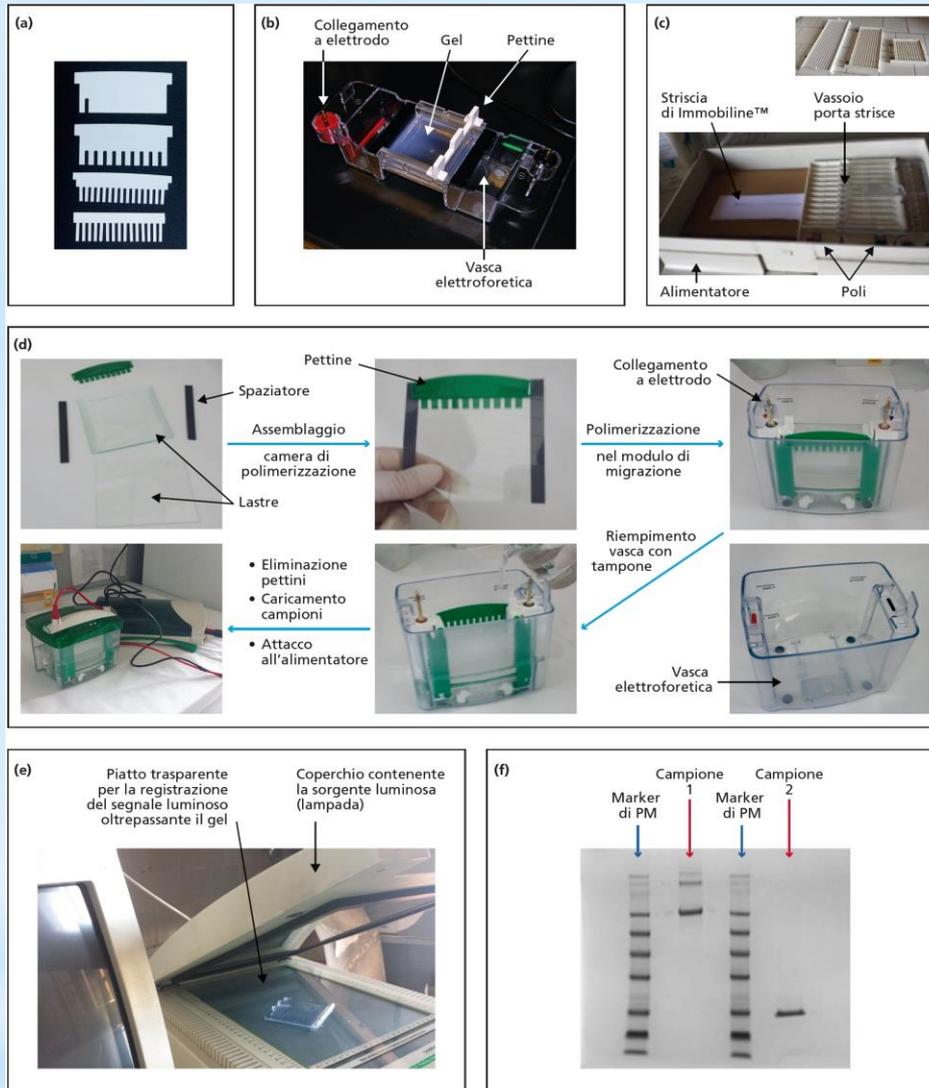


Figura 8.3

Apparati delle elettroforesi zonali e loro principali accessori. (a) Serie di "pettini" di teflon bianco, utilizzati per creare "pозzetti" di diverso numero e capienza nel gel. (b) Foto di un apparato elettroforetico a sviluppo orizzontale per l'elettroforesi su gel di agarosio e suoi accessori. Il gel è posizionato a ponte tra le due "vasche". (c) Apparato orizzontale per lo sviluppo di una focalizzazione isoelettrica su "strisce" di Immobiline™. (d) Accessori per elettroforesi su gel di poliacrilammide a sviluppo verticale, e principali fasi di allestimento. (e) Densitometro per analisi delle bande dopo colorazione (nell'esempio, con il colorante intercalante Coomassie®). Una volta chiuso il coperchio, il raggio emesso dalla sorgente luminosa penetra nel campione che, a sua volta, emette un segnale registrato ed elaborato in termini quantitativi. (f) Immagine densitometrica della corsa elettroforetica di due campioni, confrontati con marcatori (o marker) di peso molecolare (PM) noto.

Schema di base:

1. Alimentatore di corrente;
2. Camera di migrazione;
3. Sistema di controllo della temperatura

➤ APPARATI A SVILUPPO ORIZZONTALE

➤ APPARATI A SVILUPPO VERTICALE

ELETTROFORESI CAPILLARE PER LO STUDIO DI EMOGLOBINOPATIE



Figura 8.4

Rappresentazione schematica dell'uso dell'elettroforesi capillare nello studio delle emoglobinopatie. L'emoglobina umana è una proteina acida e l'eventuale presenza di varianti strutturali che comportino una variazione di carica di superficie potrà essere rilevata dal confronto elettroforetico con le proprietà di migrazione della HbA (la forma prevalente di emoglobina nel sangue degli adulti sani) o della HbF (l'emoglobina prevalente nell'età fetale). A causa della sua peculiarità strutturale ed epidemiologica, anche HbS (emoglobina falciforme) e HbA₂ (variante emoglobinica dei primi mesi di vita, la cui abbondanza relativa nel sangue dell'adulto è diagnostica di alcune forme di talassemia) sono sempre incluse nel campione di riferimento. A seconda dei casi, possono essere utilizzate come confronto anche altre emoglobine patologiche già note, che presentino una spiccata variabilità nelle proprietà elettroforetiche (per esempio HbC, che corrisponde alla doppia mutazione $\beta E6V, D63N$). Nella figura sono schematizzati i profili diagnostici di un emolisato ottenuti per elettroforesi capillare in alcune situazioni cliniche ben note. Le frazioni eluenti all'estremità anodica possono essere rilevate per assorbimento a 415 nm. L'ampiezza delle bande è correlata alla percentuale relativa di ciascuna variante emoglobinica nell'emolisato.

ELETTROTRASFERIMENTO

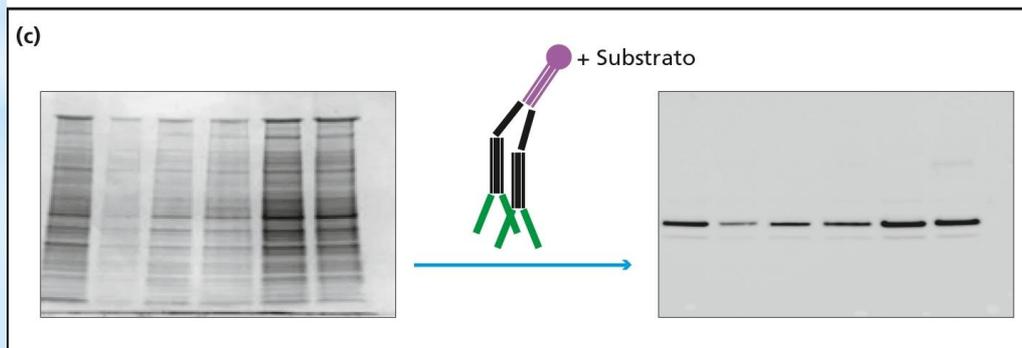
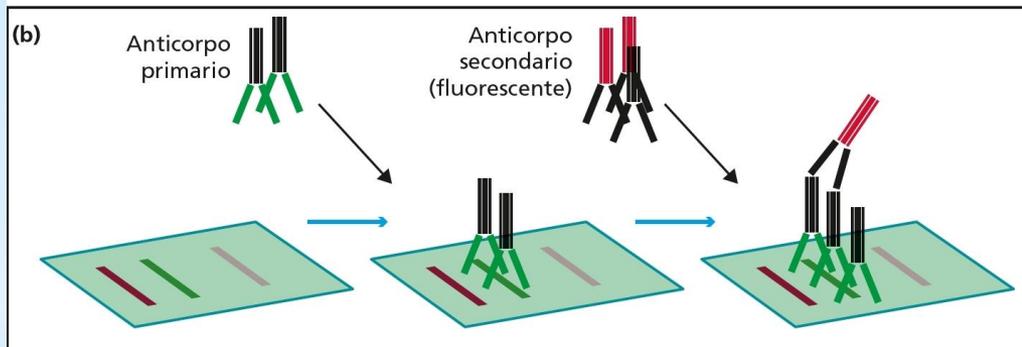
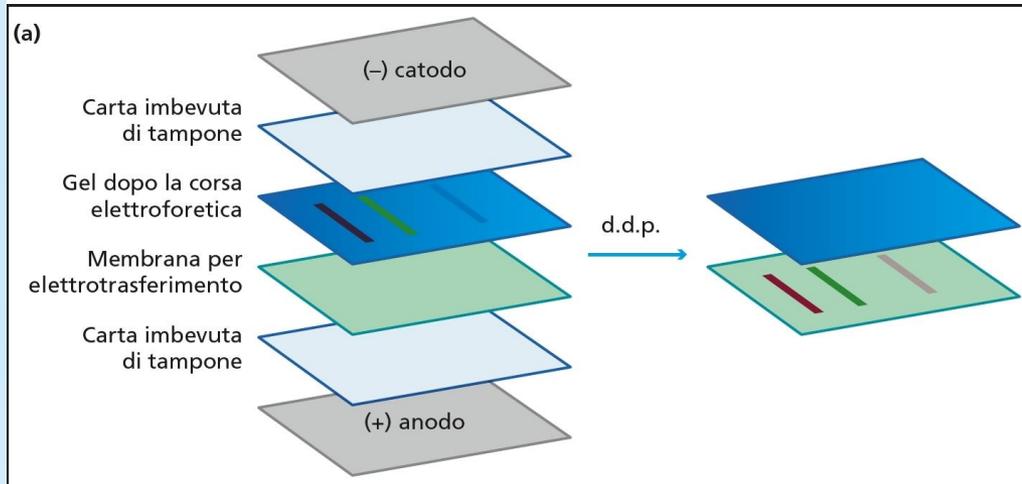


Figura 8.5

Immunorilevazione di proteine separate per elettroforesi.

(a) L'elettrotrasferimento delle componenti proteiche dalle regioni in cui risultano concentrate dopo la migrazione sul gel a un foglio (membrana) di materiale inerte permette di ottenere un calco del profilo elettroforetico (rappresentato dalle "bande" di 3 proteine codificate con colori diversi), immobilizzato per adsorbimento e, pertanto, compatibile con le metodologie di rilevazione per immunoaffinità. L'elettrotrasferimento ha luogo verso l'anodo, e quindi le proteine devono avere una carica negativa. Per questo motivo, generalmente, la tecnica elettroforetica che si usa è l'SDS-PAGE.

(b) Per mettere in evidenza la presenza di una determinata proteina tra le bande elettrotrasferite si ricorre a un anticorpo specifico per la proteina stessa, definito "anticorpo primario". A sua volta, la banda corrispondente al legame anticorpo primario-proteina antigenica può essere messa in evidenza sulla membrana grazie all'uso dei cosiddetti "anticorpi secondari", specifici per la regione costante e modificati covalentemente con un cromoforo fluorescente o un dominio enzimatico in grado di sviluppare fluorescenza a seguito dell'aggiunta di un adeguato substrato.

(c) Esempio di elettrotrasferimento di 6 "corsie" ottenute per SDS-PAGE di altrettanti estratti proteici ottenuti da cellule eucariotiche (a sinistra), e "immunorilevato" dopo Western blot per chemiluminescenza nei confronti di una specifica componente proteica (a destra).