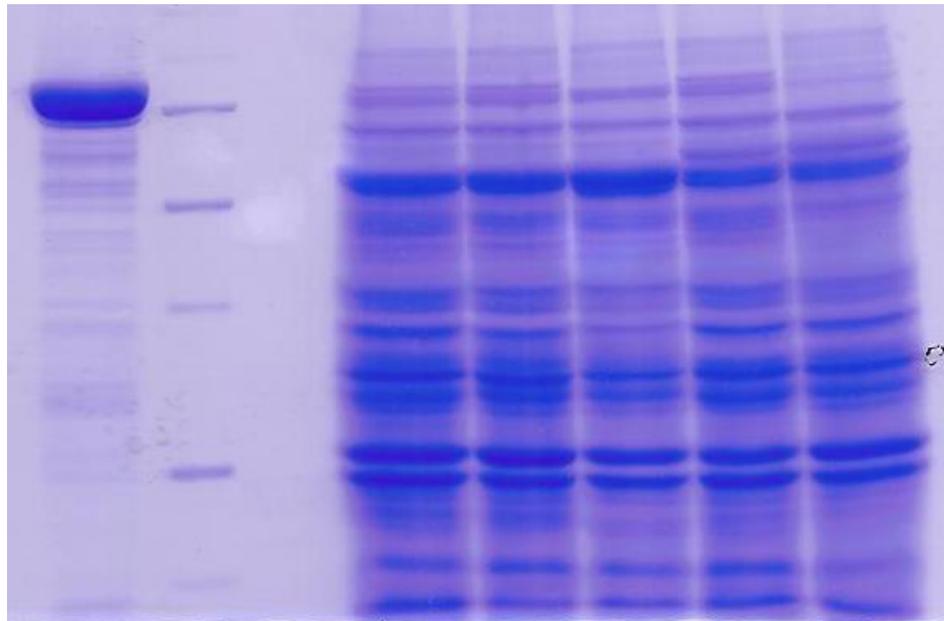


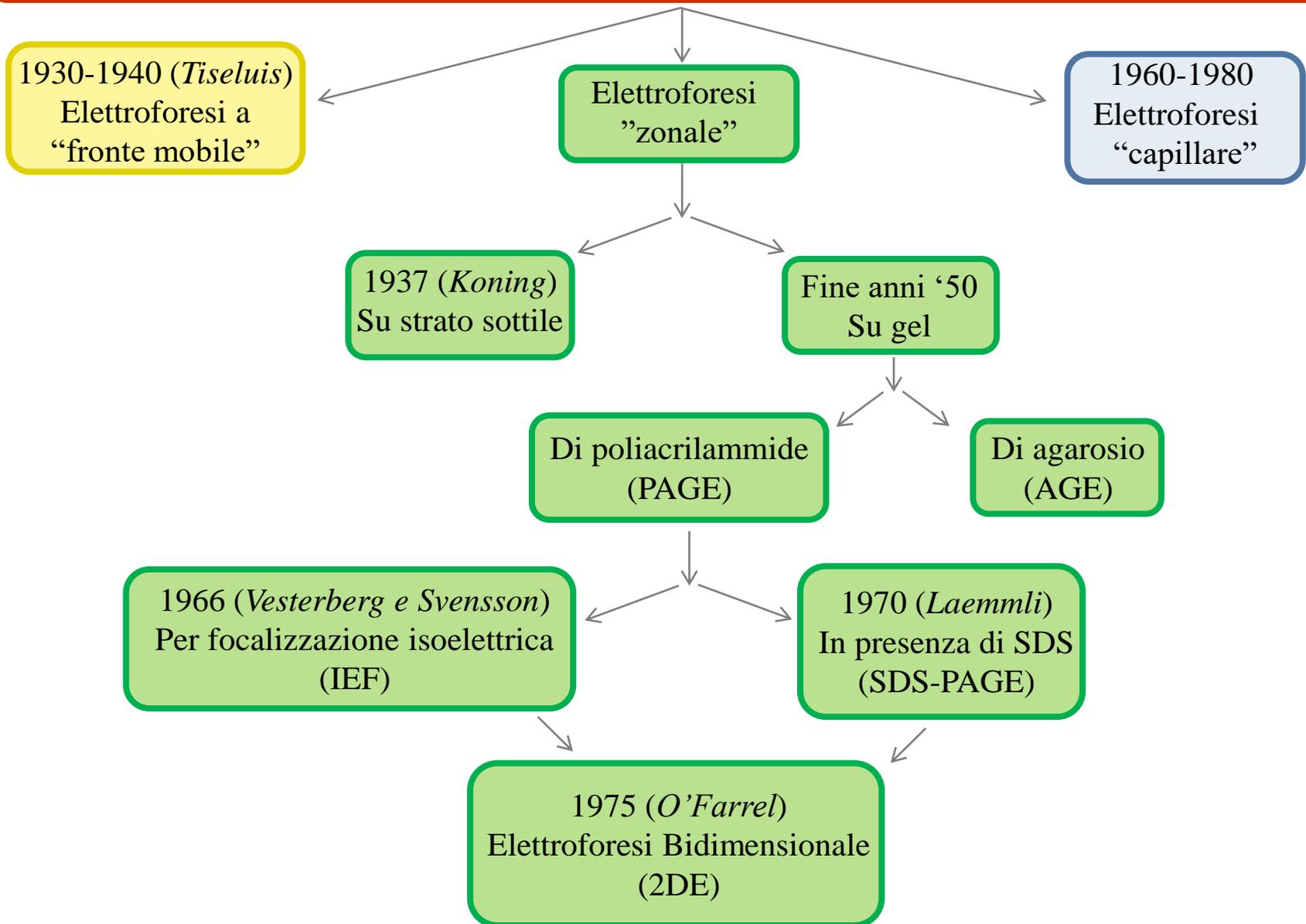
Elettroforesi

Il termine elettroforesi indica il movimento di particelle cariche all'interno di un mezzo percorso da un campo elettrico.

In biochimica questo termine viene utilizzato per indicare un complesso di metodi utilizzati per separare e analizzare le componenti di una miscela di macromolecole elettricamente cariche (proteine o acidi nucleici) in base alla loro diversa capacità di migrare nella fase liquida di un opportuno supporto, soggetto a un campo elettrico generato per mezzo di una coppia di elettrodi.



Principali metodologie elettroforetiche nella ricerca e nella diagnostica biomedica



Tecniche elettroforetiche:

Gel di agarosio (AGE),

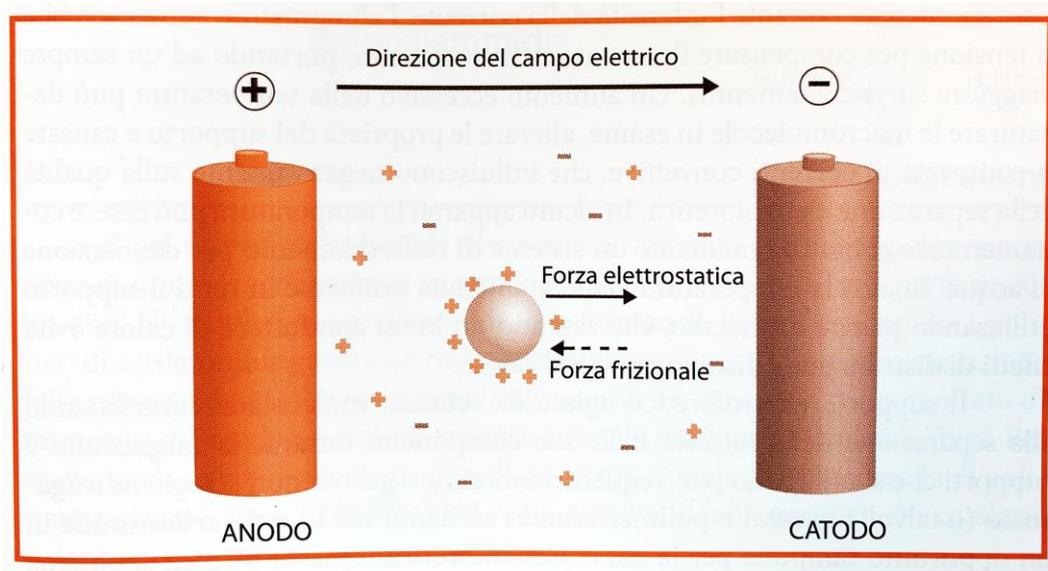
Nativa (PAGE),

SDS-PAGE,

Isoelettrofocalizzazione (IEF),

2D-PAGE (2DE)

Gel di
poliacrilammide



Quando si applica una **differenza di potenziale**, V , tra i due elettrodi, si genera un **campo elettrico**, E , che dipende dalla **distanza tra gli elettrodi**, d , 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. La migrazione viene arrestata interrompendo la corrente prima che le molecole giungano agli elettrodi, in modo che esse si fermino in zone definite del supporto. La velocità con cui la molecola migra dipende anche dal supporto elettroforetico utilizzato che esercita una frizione in opposizione al movimento delle molecole, che dipende dalle caratteristiche del supporto e dalla forma della molecola, che è espressa dal **coefficiente frizionale** f .

La velocità di migrazione viene espressa come:

$$v = Eq/f$$

Spesso si definisce come **mobilità elettroforetica**, μ :

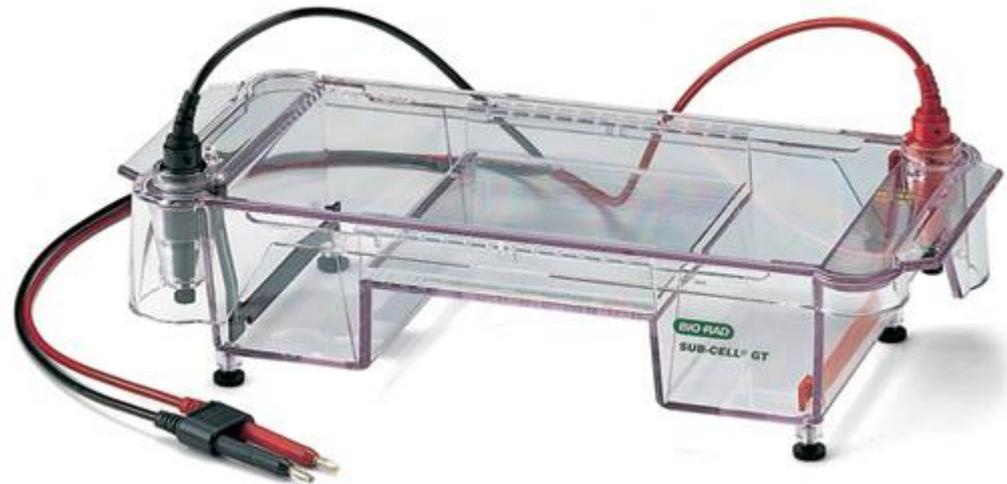
$$\mu = v/E$$

Elettroforesi verticale e orizzontale

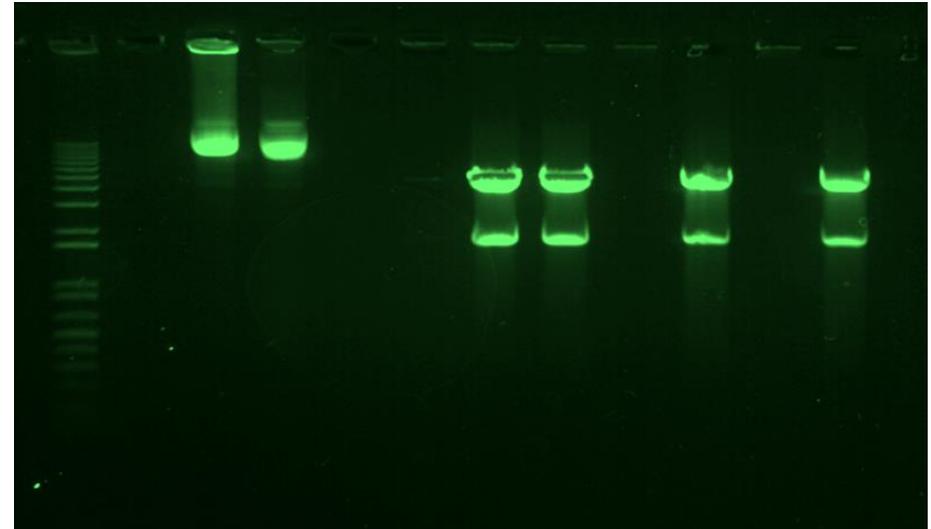
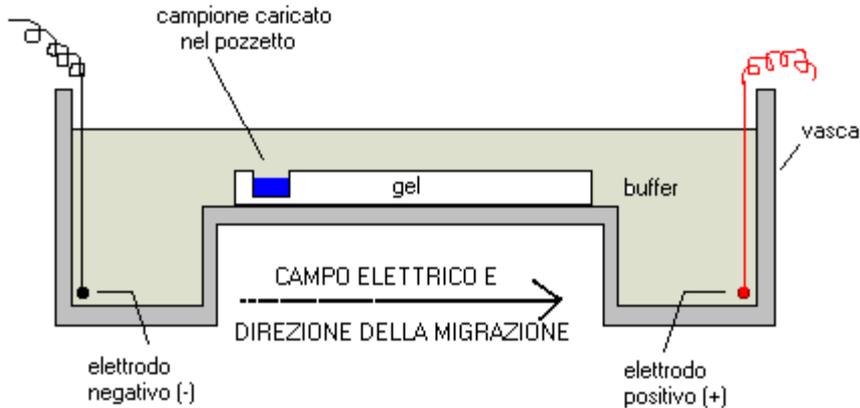


protein electrophoresis

nucleic acids electrophoresis



Apparato Elettroforetico orizzontale

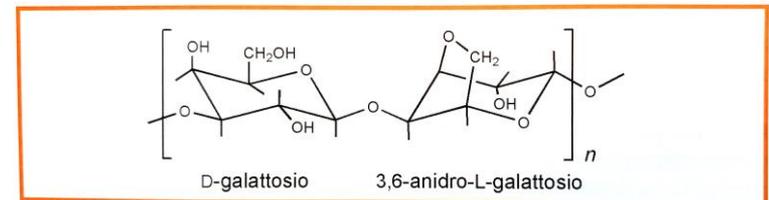


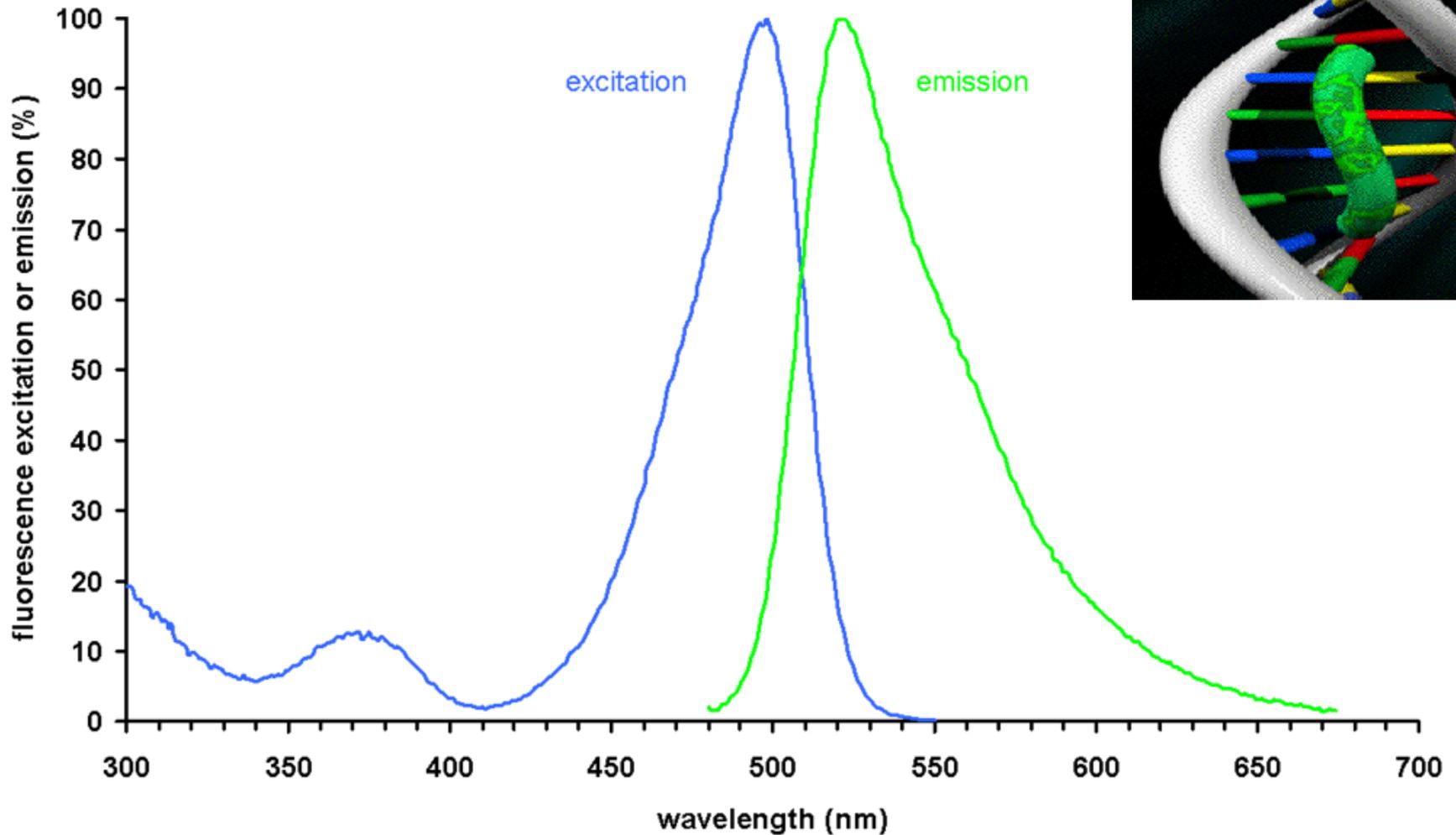
Gel di agarosio : digestione enzimatica miniprep rFAAH-ΔTM .

tecnica che permette di separare facilmente i **frammenti di DNA**.

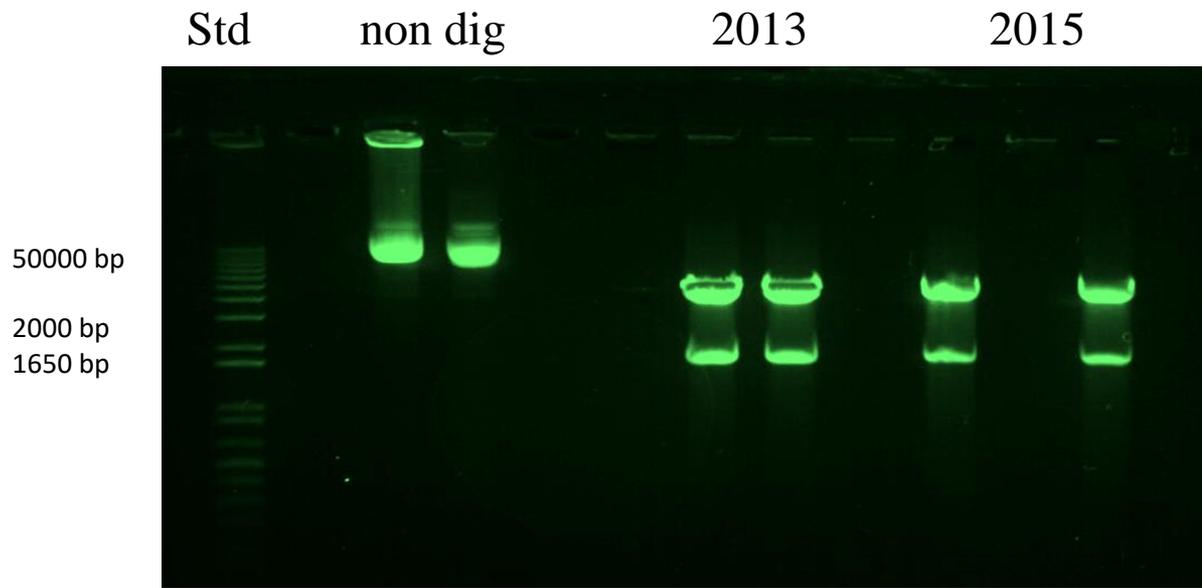
A seconda della loro lunghezza i frammenti rimarranno intrappolati nelle maglie formate dall'agarosio.

Struttura dell'agarobiosio, un disaccaride composto di D-galattosio e 3,6-anidro-L-galattosio. Unità ripetute di agarobiosio formano l'agarosio.

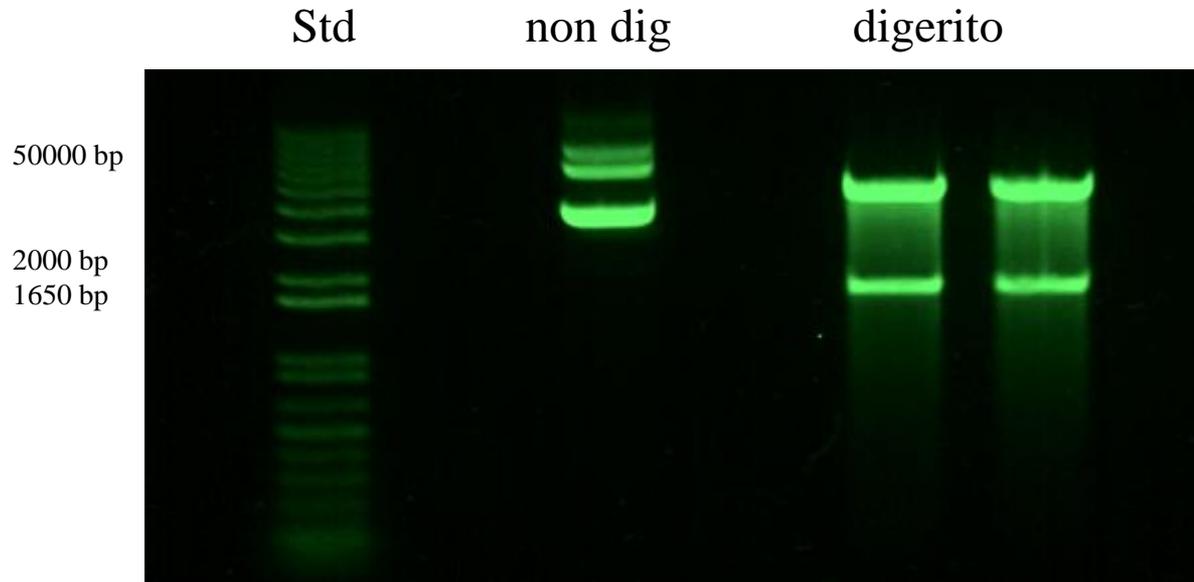




Il SYBR Green I è un agente intercalante e si lega preferenzialmente a DNA a doppio filamento (dsDNA). Il complesso DNA-colorante assorbe **luce blu** ad una lunghezza d'onda $\lambda_{\text{max}} = 488 \text{ nm}$ ed emette **luce verde** $\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$. Altri picchi di assorbimento, sebbene più deboli, si trovano nella regione dell'ultravioletto ($\lambda = 284 \text{ nm}$ e 382 nm)

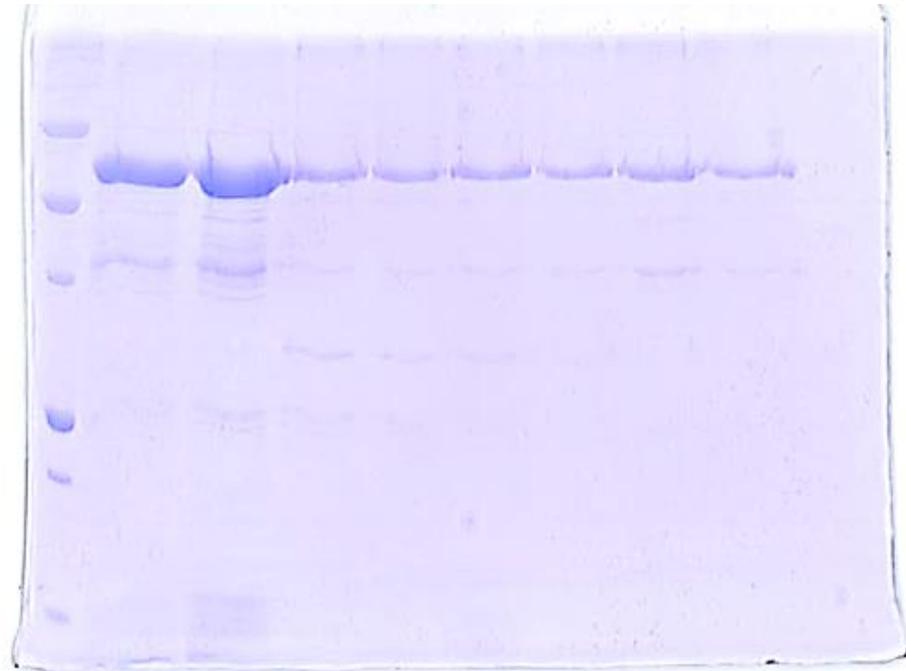
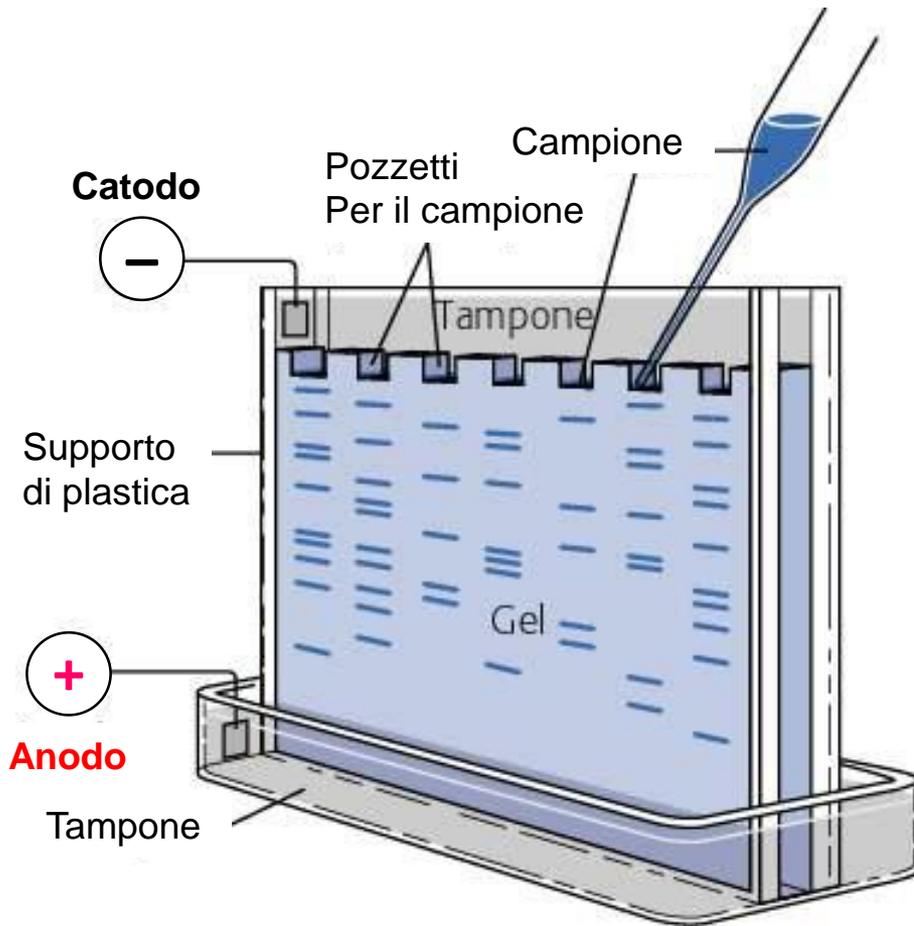


Digestione enzimatica miniprep rFAAH- Δ TM (2013-2015)



Digestione enzimatica miniprep prot *C269S*

Apparato Elettroforetico verticale



Purificazione della proteina rFAAH Δ TM. SDS-PAGE

Tecnica che permette di separare facilmente le proteine.

Elettroforesi su gel di poliacrilammide

Due Tipi:

- ***Elettroforesi Nativa***: le proteine si muovono in funzione della loro massa e della loro carica netta
- ***Elettroforesi Denaturante in presenza di SDS*** (SDS-PAGE): le proteine, uniformemente dotate di carica negativa (SDS), si muovono in base alla loro massa.

Elettroforesi nativa

Le proteine vengono separate sulla base della loro carica netta e in base alle dimensioni,

La risoluzione è relativamente bassa,

Discrimina tra proteine con PM uguale ma con carica differente,

Permette la rapida purificazione e il recupero di proteine in condizioni native,

Può essere usata per una colorazione catalitica,

Permette lo studio di proteine polimeriche,

Nell'elettroforesi nativa i campioni **non vengono denaturati né caricati negativamente prima della corsa**: la velocità di migrazione pertanto sarà il risultato della massa molecolare del campione e della sua carica intrinseca

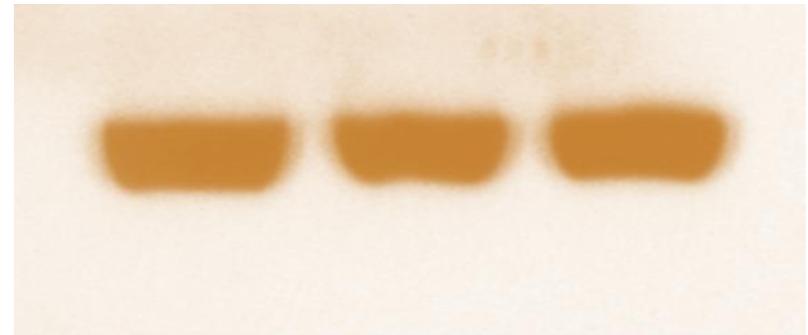
colorazione catalitica della LOX-1 di soia

IEF nativa della
LOX-1 di soia



La **lipossigenasi (LOX-1)** è un enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi

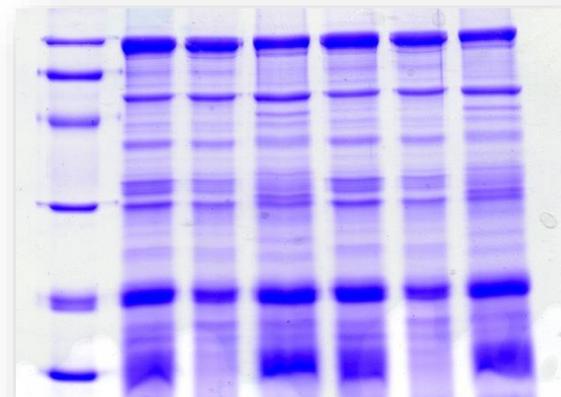
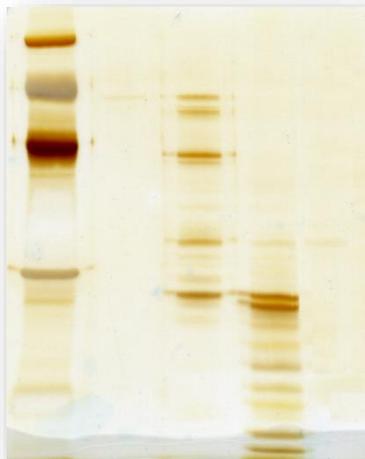
colorazione catalitica della
Ceruloplasmina umana



La **ceruloplasmina** è una proteina con attività enzimatica ferrossidasica

SDS-PAGE

(Sodium-Dodecyl-Sulphate-Polyacrilamide-Gel-Electrophoresis)



SDS-PAGE

E' uno dei metodi più largamente usati per separare le proteine e determinare il loro peso molecolare apparente.

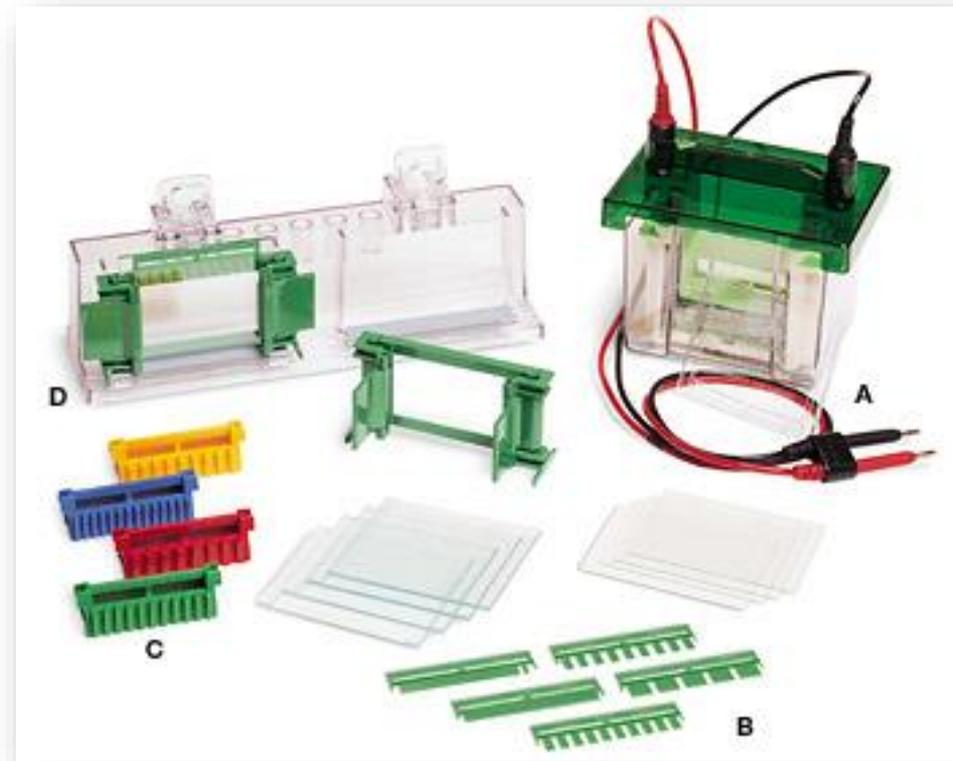
Abbinata al Western Blot e all'immunocolorazione costituisce un metodo riproducibile, rapido ed efficace per l'isolamento e l'identificazione delle proteine.

Fasi di una SDS-PAGE

- 1 - Montaggio dell'apparato;
- 2 - Preparazione del gel;
- 3 - Preparazione e caricamento dei campioni;
- 4 - Corsa elettroforetica;
- 5 - Colorazione;
- 6 - Studio dell'immagine ottenuta.

Fase 1 - Montaggio dell'apparato:

- Lastra di vetro grande;
- Lastra di vetro piccola;
- Castello;
- Pettini;





A

Lastre di vetro grande con
spaziatori da 0.75 , 1 e 1.5 mm

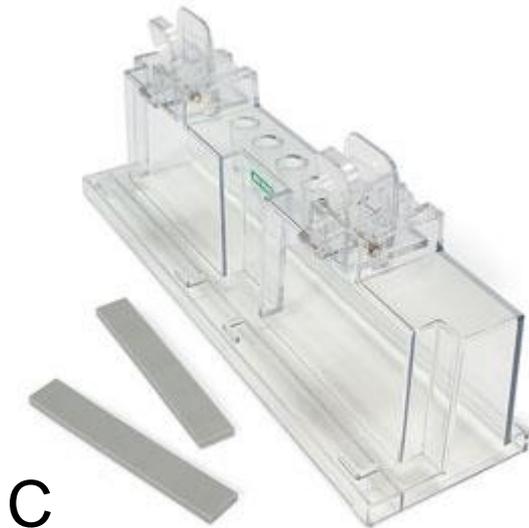


A



B

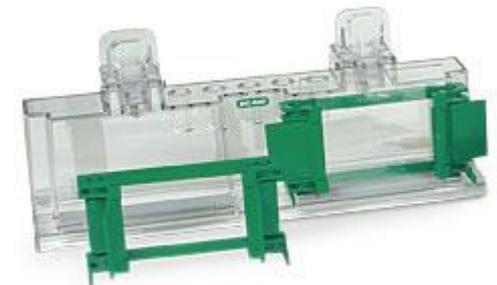
Lastre di vetro piccole



C

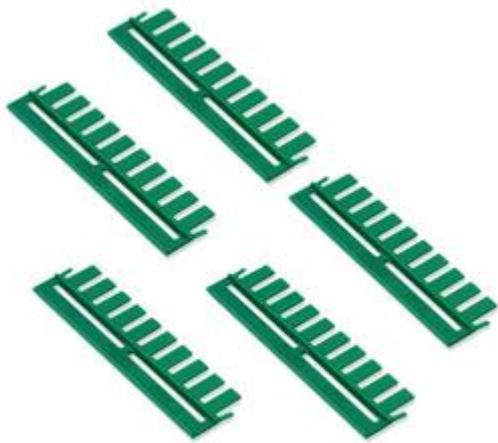


D



E

Castello per il montaggio dei vetri

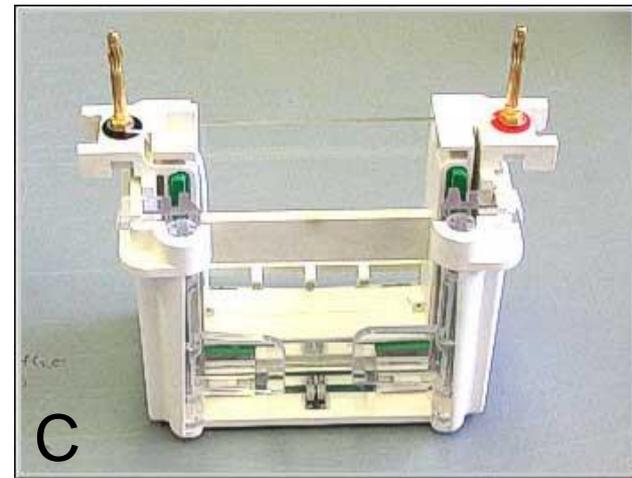


A

Pettini da 0.75, 1 e 1.5 mm

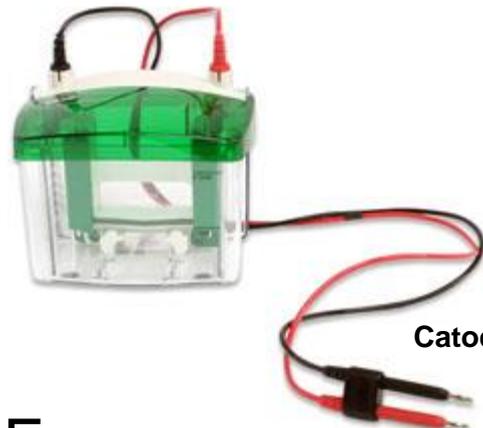
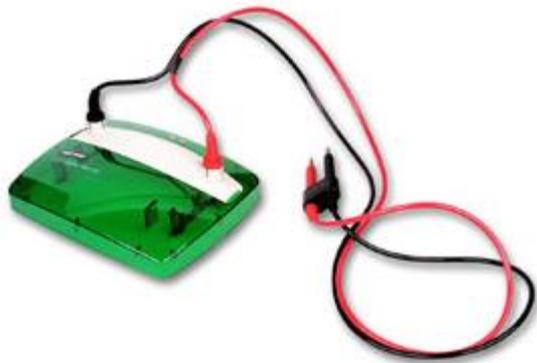


B



C

elettrodo



Catodo -

Anodo +

E

Vaschetta per il tampone di corsa e il coperchio con gli elettrodi

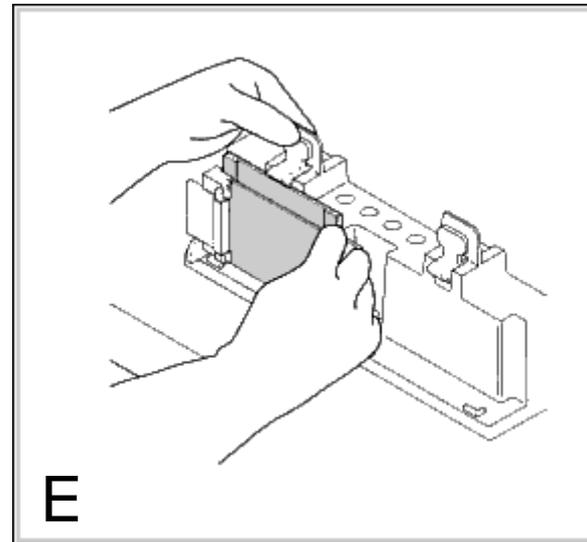
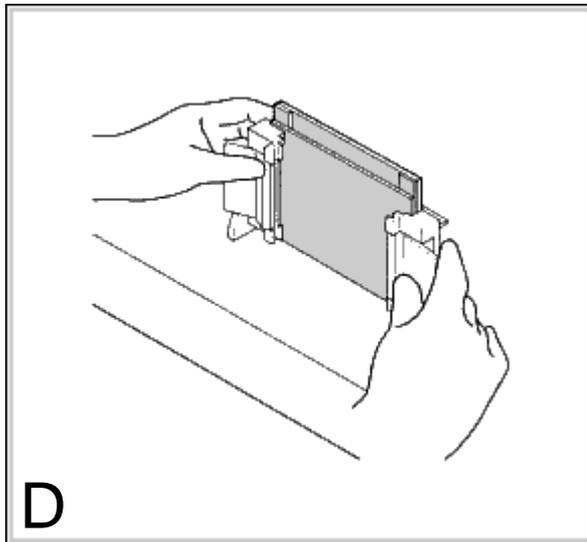
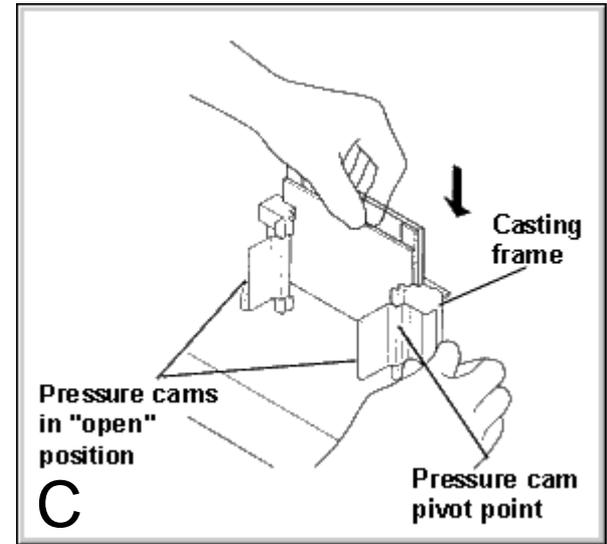
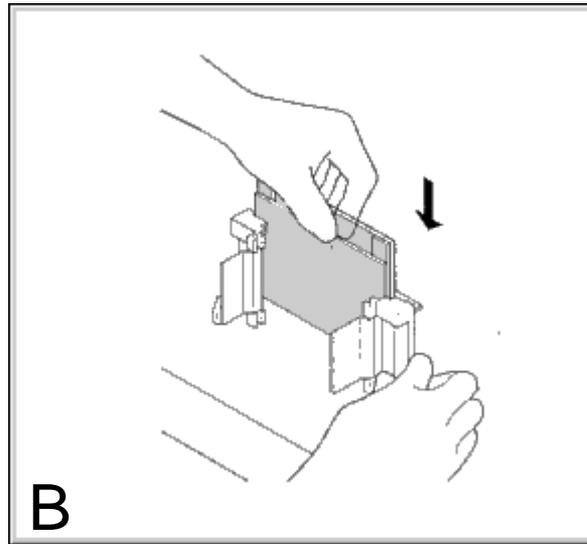
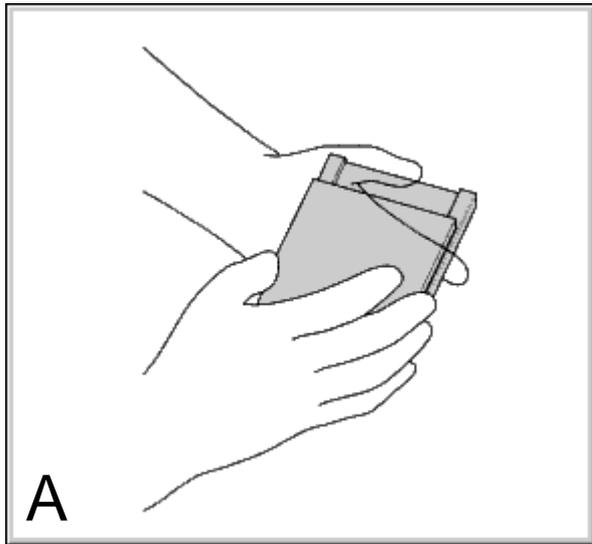


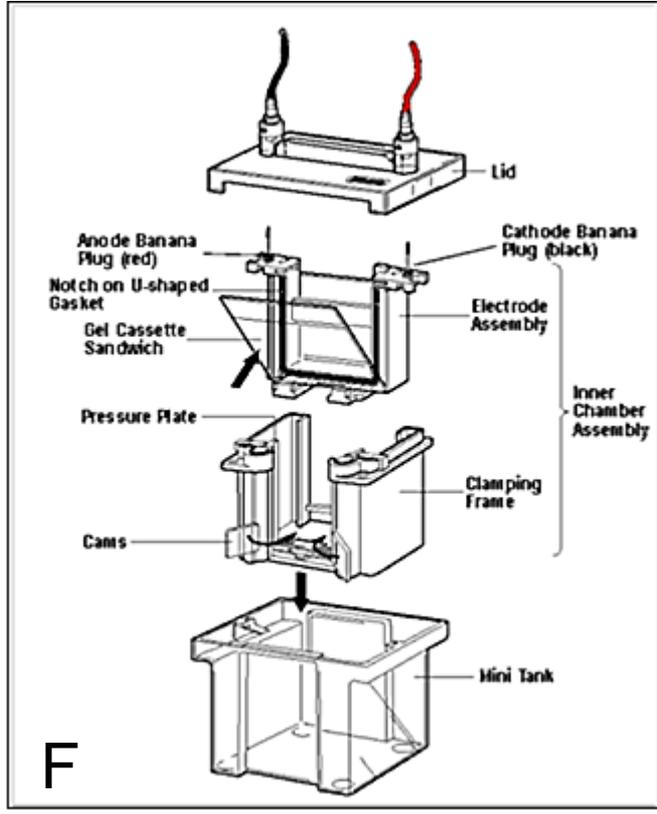
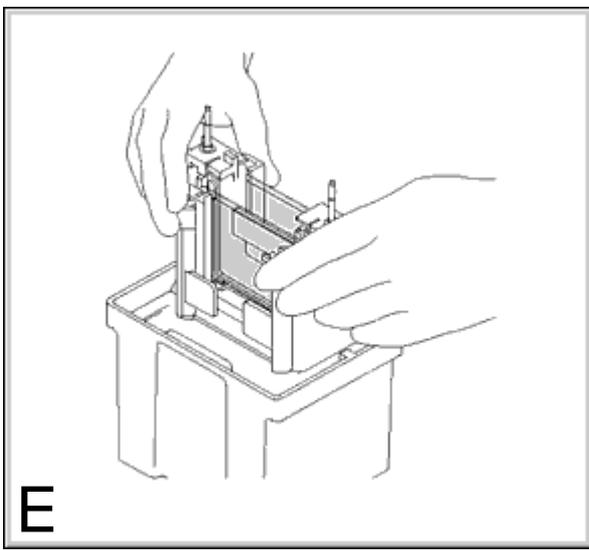
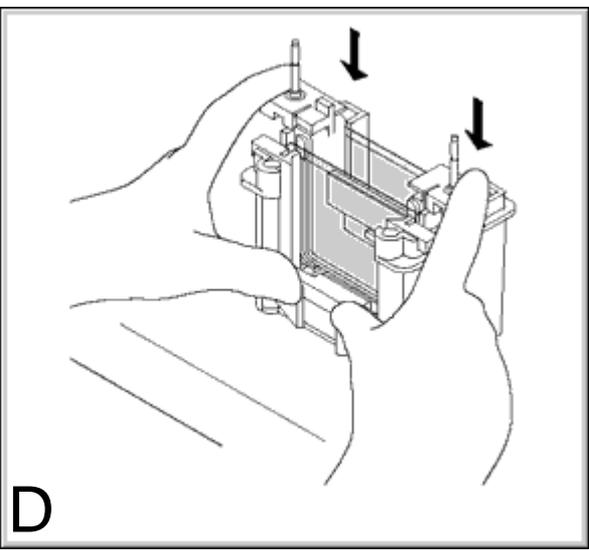
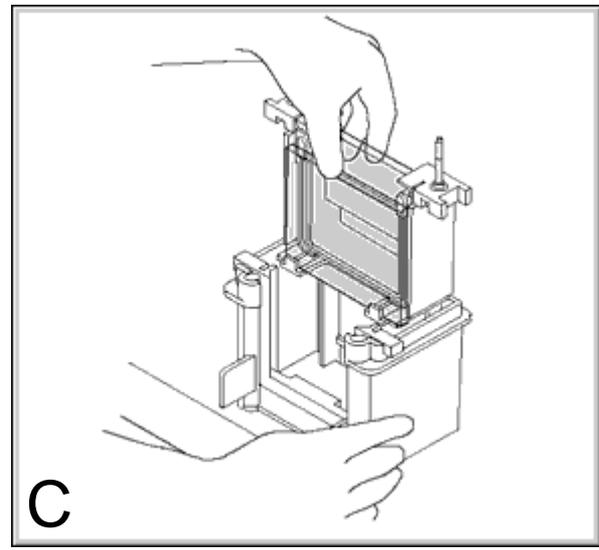
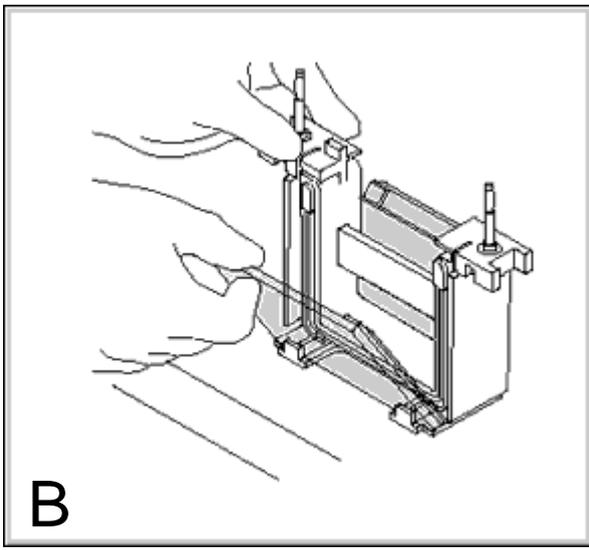
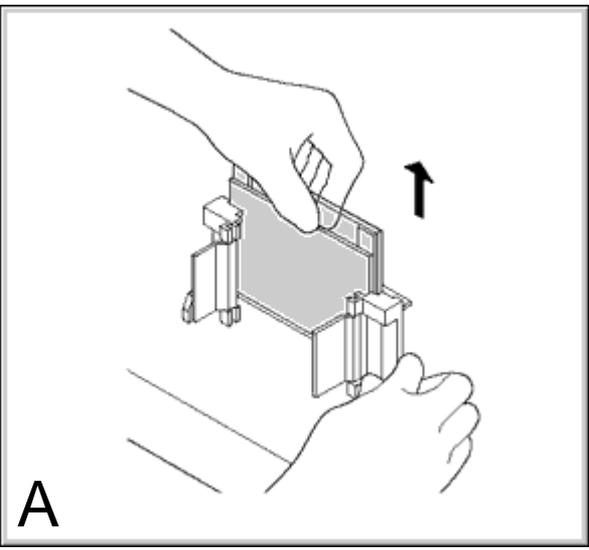
F

Alimentatore di corrente

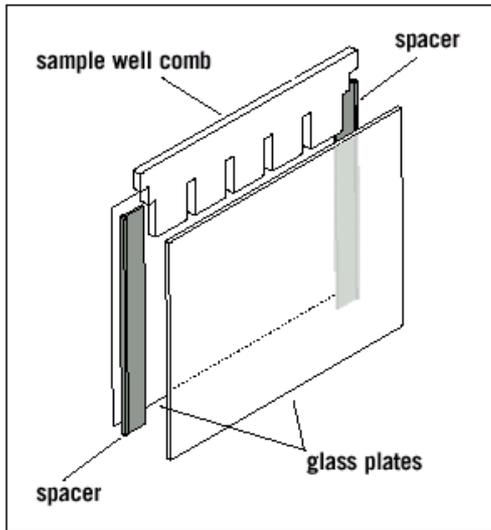


D

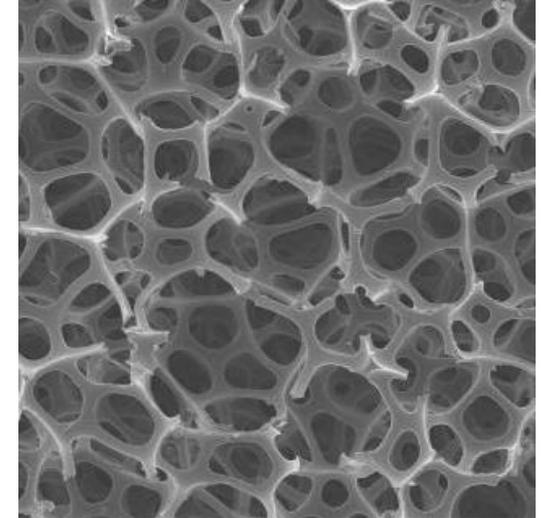




Fase 2 - Preparazione del gel:



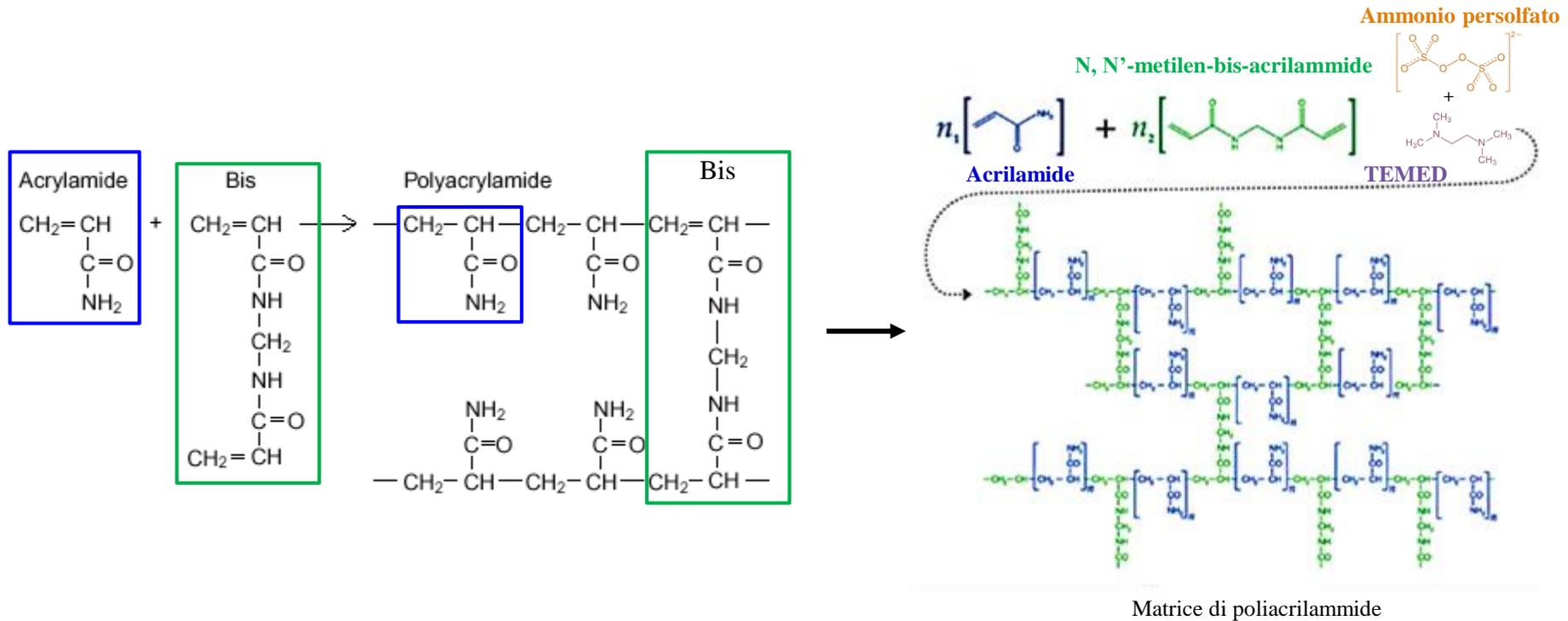
Porosità del gel



<i>% T</i>	<i>Intervallo di frazionamento</i>
5-12	20.000 – 150.000
10-15	10.000 – 80.000
≥ 15	≤ 15.000

La porosità del gel dipende dalla concentrazione di acrilamide e bisacrilamide. Generalmente al crescere di % T la dimensione dei pori decresce perché l'acrilammide è più concentrata, mentre al disotto del 3% si perde l'effetto setacciante.

Preparazione del gel di poliacrilammide



I gel di poliacrilammide vengono preparati al momento dell'uso facendo copolimerizzare **acrilamide** con **bisacrilammide**, un agente cross-lincante, in presenza di persolfato di ammonio (**APS**) allo 0,1-0,3% e un catalizzatore come il **TEMED**. Questa polimerizzazione radicalica viene fatta avvenire all'interno dello spazio compreso tra due vetri, in modo da ottenere una matrice piatta con spessore che varia da 0,75 mm a 1,5 mm.

Preparazione del resolving gel e dello stacking gel

-Preparazione del resolving gel (gel di risoluzione).

La scelta della % di acrilamide è in base alle dimensioni della proteina in esame);

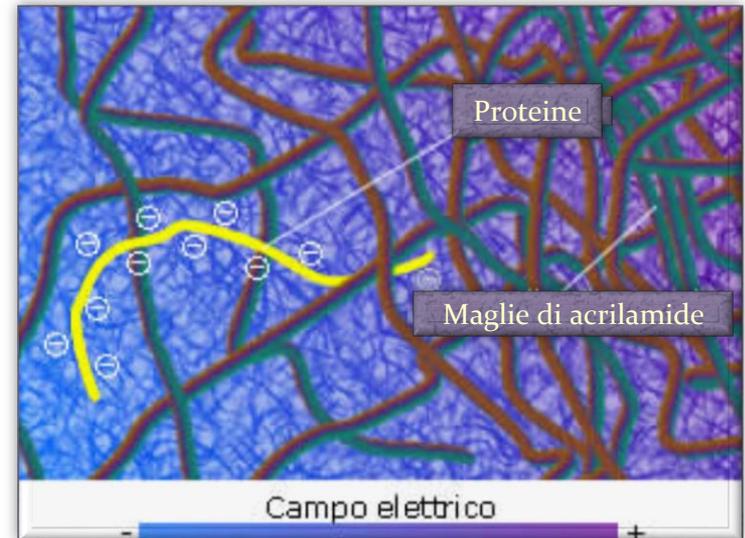
-Preparazione dello stacking gel (gel di impaccamento al 4-5%)

Resolving gel al 10%

Componenti:

Volume 20 ml

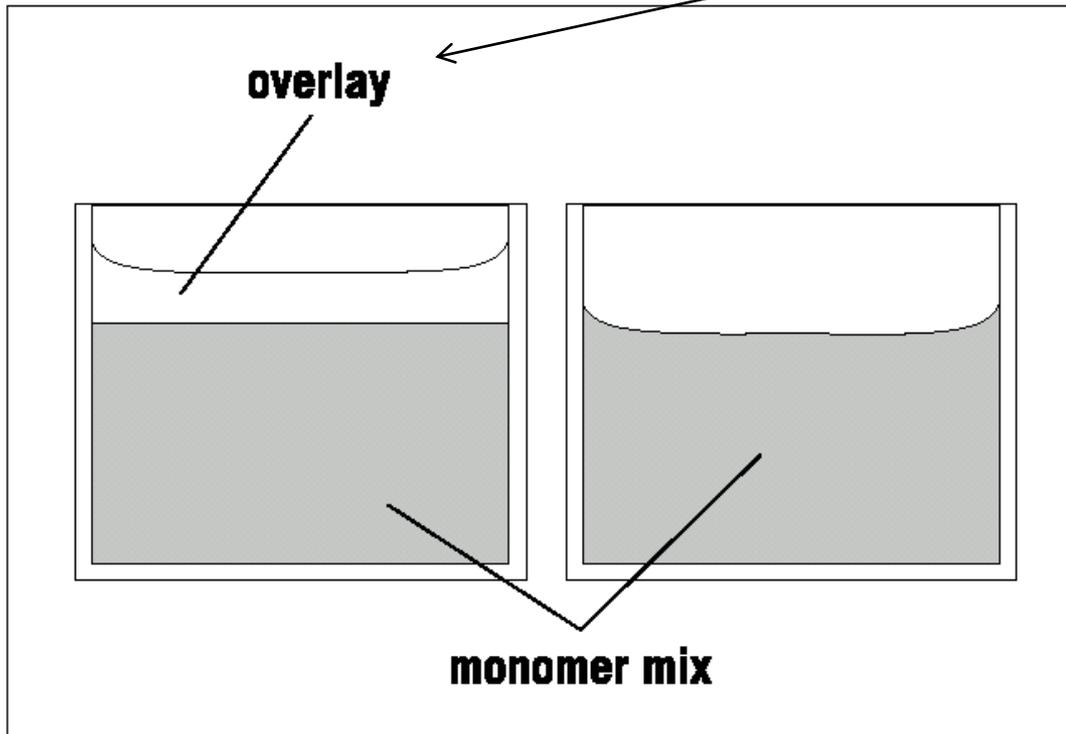
H ₂ O	7,9
30% acrilamide	6,7
1.5 M Tris/HCl (pH 8.8)	5,0
10% SDS	0,2
10% ammonio persolfato	0,2
TEMED	0,008



Menisco di ossigeno

*butanolo saturo di acqua
(10:1)*

*Oppure semplicemente
acqua*

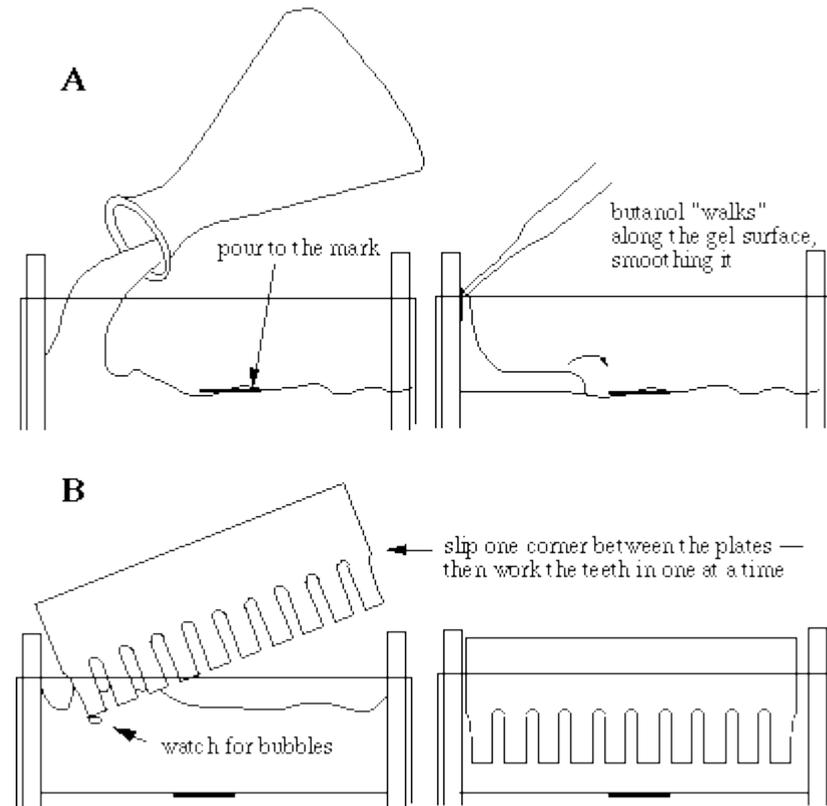


gel di separazione

Preparazione dello Stacking al 5 %:

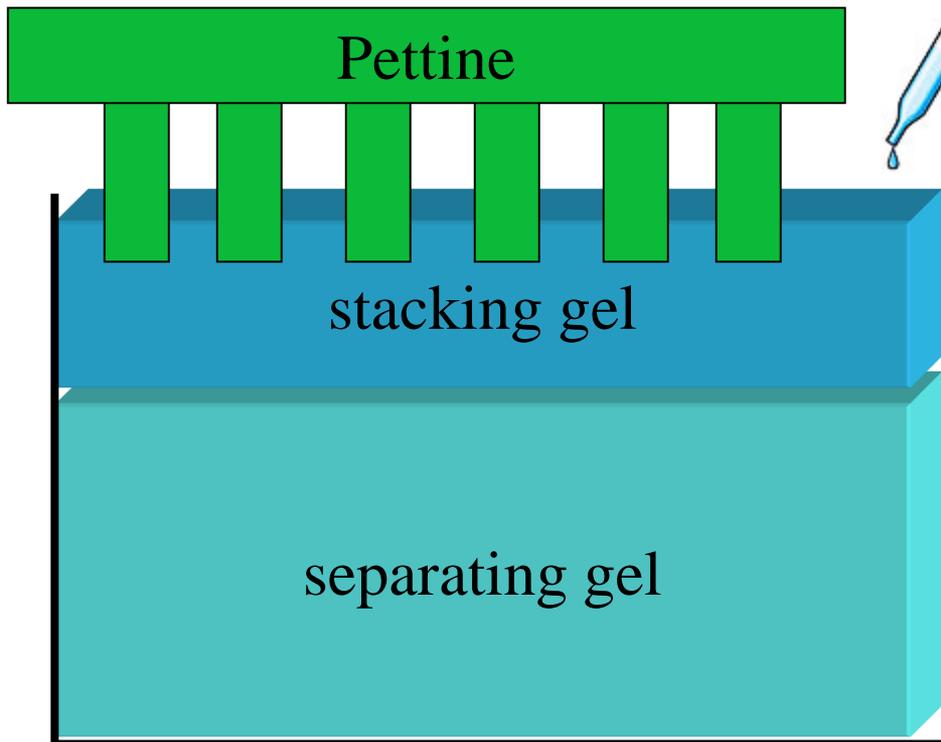
Componenti:

	Volume 10 ml
H ₂ O	6,8
30% acrilamide	1,7
1.0 M Tris/HCl (pH 6.8)	1,25
10% SDS	0,1
10% ammonio persolfato	0,1
TEMED	0,01



Gel di impaccamento

Dopo circa 1 h dalla deposizione del gel di separazione, si stratifica su di esso il gel di impaccamento (o stacking)



Il gel di impaccamento ha un pH di 6,8 e un rapporto di acrilam/bisacrilam pari al 5%

Appena deposto il gel di impaccamento, si dispone il pettine per la formazione dei pozzetti

Fase 3 - Preparazione e caricamento dei campioni

Campione contenente l'Albumina:

Sample buffer 5x

(Tris/HCl 0.3 M pH 6.8, 10% SDS, 0.05% Blu di Bromofenolo, 50% Glicerolo e 500 mM DTT)

Agitare il campione dopo preparazione

Riscaldare a 95° C per 5 minuti



Preparazione dei campioni

SDS: Denatura le proteine e conferisce la stessa densità di carica negativa

DTT: (ditiotreitolo) e β -Mercaptoetanololo: Rompe eventuali ponti disolfuro

Glicerolo: Aumenta la densità dei campioni depositandoli nel pozzetto

Blu di bromofenolo: Visualizza i campioni e va a costituire il fronte di migrazione

Bollitura: (95-100°C per 2-5 minuti): Accelera la completa denaturazione

Caricamento dei campioni

Dopo solidificazione dei gel, si rimuove il pettine, lasciando nello stacking la serie di pozzetti pronti per il caricamento dei campioni.

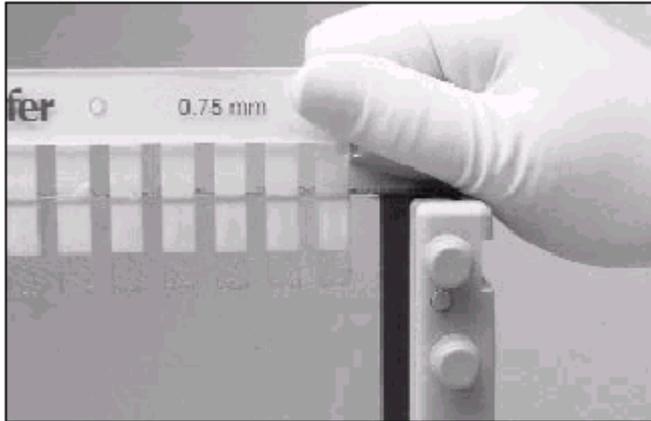
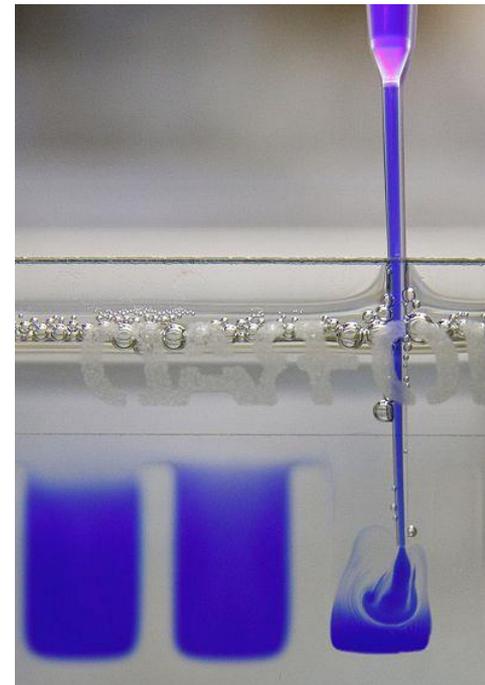


Fig 2.6. Removing comb from stacking gel (step 17). Do this gently to avoid damaging the well arms.

A



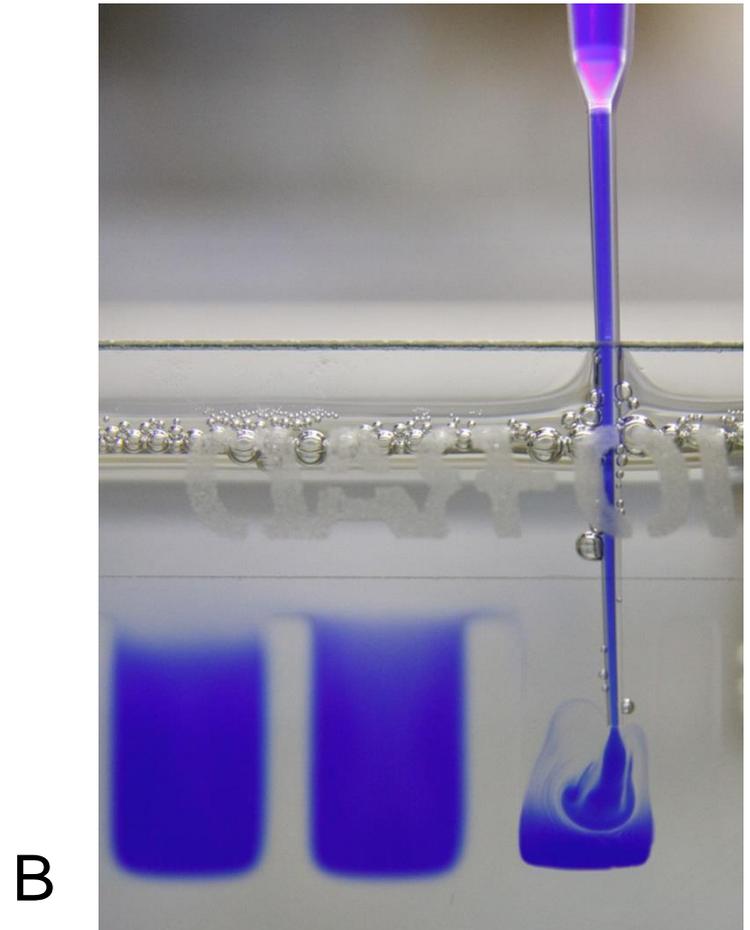
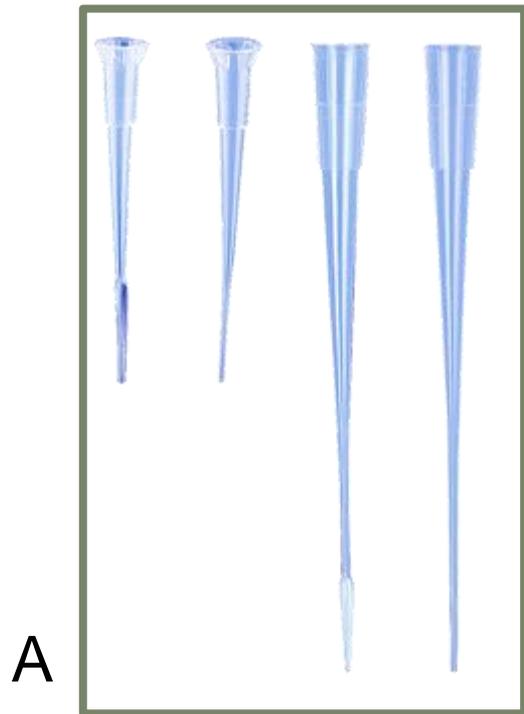
B



C

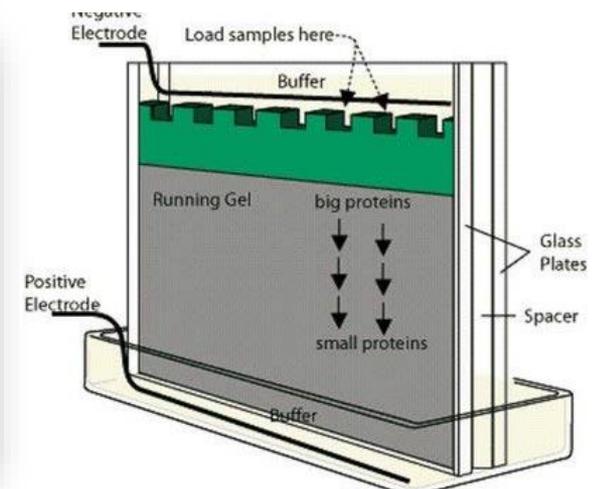
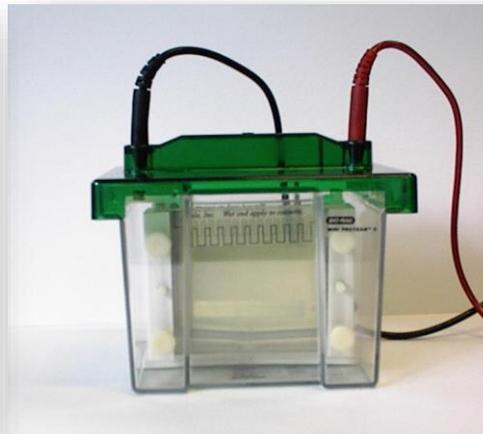
Caricamento dei campioni

Inserimento dei campioni tra le due lastre di vetro mediante puntali monouso



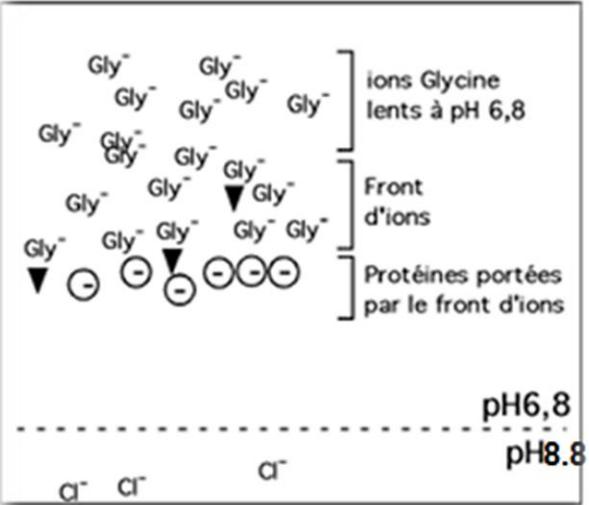
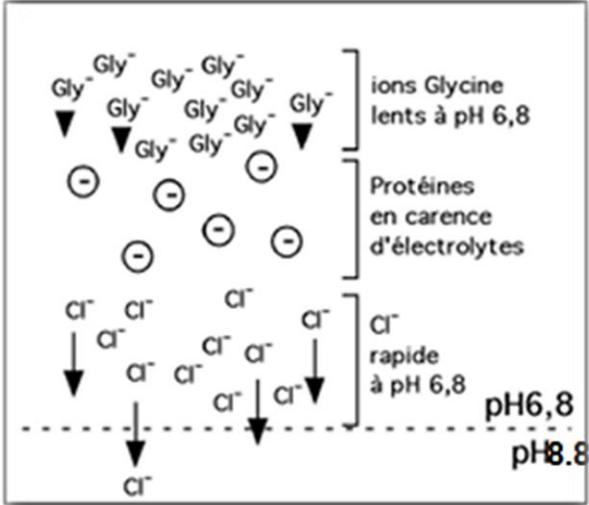
Fase 4 - Corsa elettroforetica

- connessione all'alimentatore di corrente;
- impostazione dei valori di voltaggio o amperaggio desiderato;
- avvio della corsa;
- arresto della corsa quando si vede che il fronte e' giunto alla fine del gel.



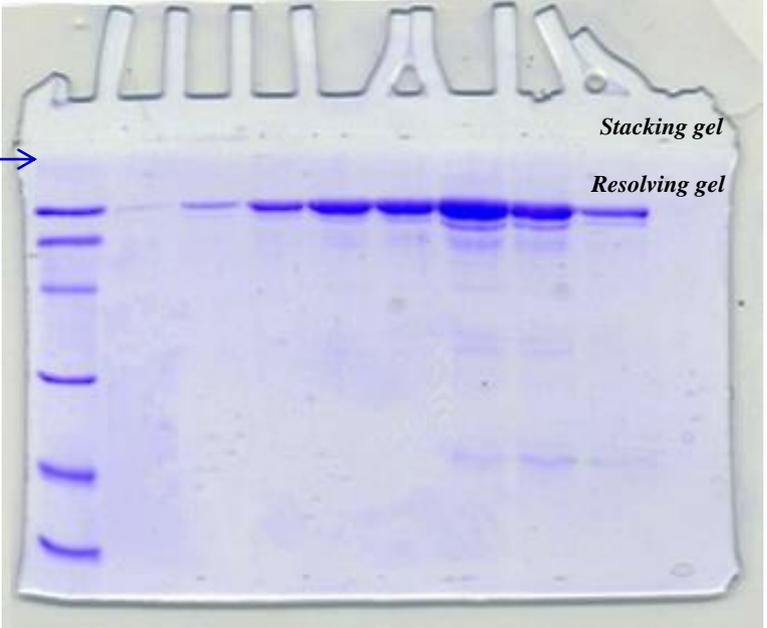
Corsa elettroforetica

Stacking gel



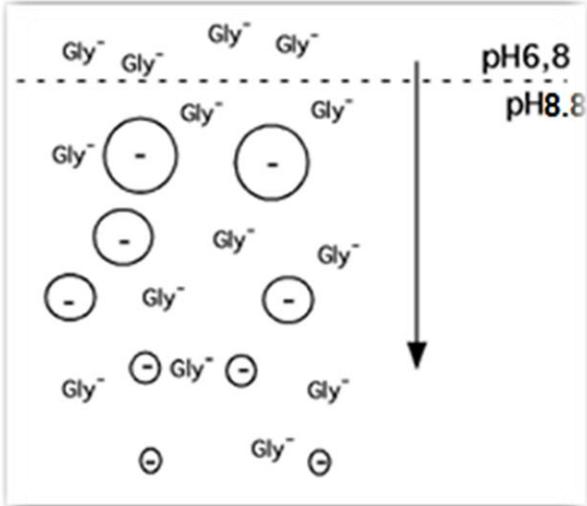
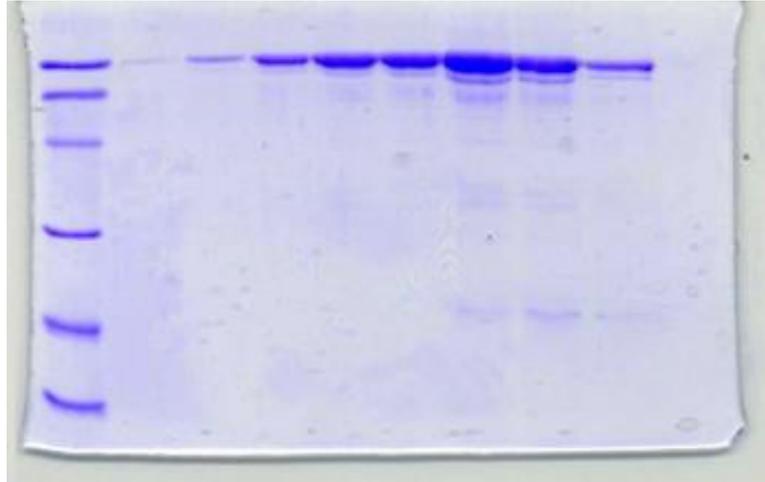
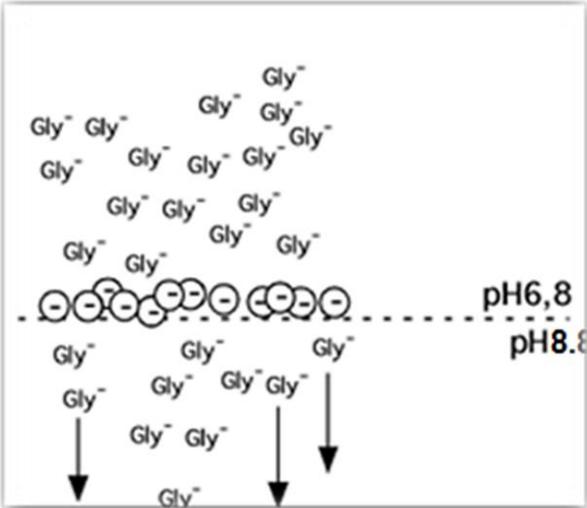
pH 6,8 →

pH 8,8

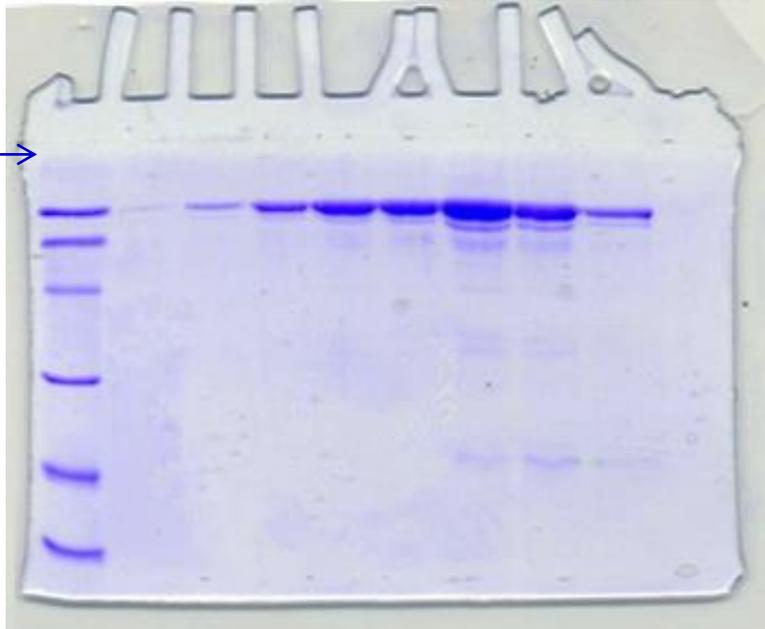


Corsa elettroforetica

Resolving gel



pH 6,8
pH 8,8



Il pH del gel di caricamento è inferiore di circa 2 unità rispetto a quello del tampone di corsa.

In quest'ultimo il pH è 8,8 e la glicina (acido debole) è quindi presente per il 95% sotto forma di ione dipolare (zwitterione $\text{CH}_2(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$) e solo per il 5% sotto forma di anione glicinato ($\text{CH}_2(\text{NH}_2)\text{COO}^-$).

Quando viene applicata la corrente :

- gli ioni di glicina nel tampone di corsa si muovono allontanandosi dal catodo (elettrodo -) per cui si dirigono verso il campione e il gel di caricamento, ma con una mobilità inferiore rispetto allo ione Cl^- ;
- In quel punto il pH è basso (6.8) per cui gli ioni glicina perdono molta della loro carica e rallentano il loro movimento. In questo modo la glicina non potrà portare efficacemente la corrente e saranno le stesse proteine a portarla, migrando verso l'anodo.

Allo stesso tempo nel gel di caricamento e nel campione:

- gli ioni cloruro altamente mobili si muovono per allontanarsi dal catodo;
- questo crea una zona ristretta nella parte superiore del gel di caricamento in cui la conduttanza è molto bassa (cioè c'è un'alta resistenza);
- come risultato si avrà una concentrazione degli anioni proteici a ridosso degli ioni cloruro in ordine di mobilità ionica decrescente;

Cl⁻ > proteine > glicinato;

- le proteine penetrano nel gel di corsa sotto forma di bande sottilissime al seguito dello ione cloruro. Si concentrano in un volume molto piccolo e nel gel si osserva proprio la formazione di una strato molto sottile al limite tra gel di separazione e il gel di caricamento.

Quando il fronte del colorante, blu di bromofenolo (presente nel campione) raggiunge la prossimità del fondo del gel, è il momento di interrompere la corsa.

Fase 5 - Colorazione

Poiché le proteine non sono direttamente visibili, il gel deve essere processato. La procedura più comune di rivelazione è la colorazione. In genere, dopo che le proteine sono state colorate, il gel viene fotografato o essiccato. Le proteine colorate su gel possono essere analizzate (PM, quantità) tramite densitometria (scanner, digital camera, densitometro)

Blue di Coomassie
Colorazione con Argento

Blue di Coomassie

Il blue Coomassie si lega alle proteine con forze di Van der Waals e legami ionici tra i gruppi sulfonici del colorante e i gruppi amminici delle proteine

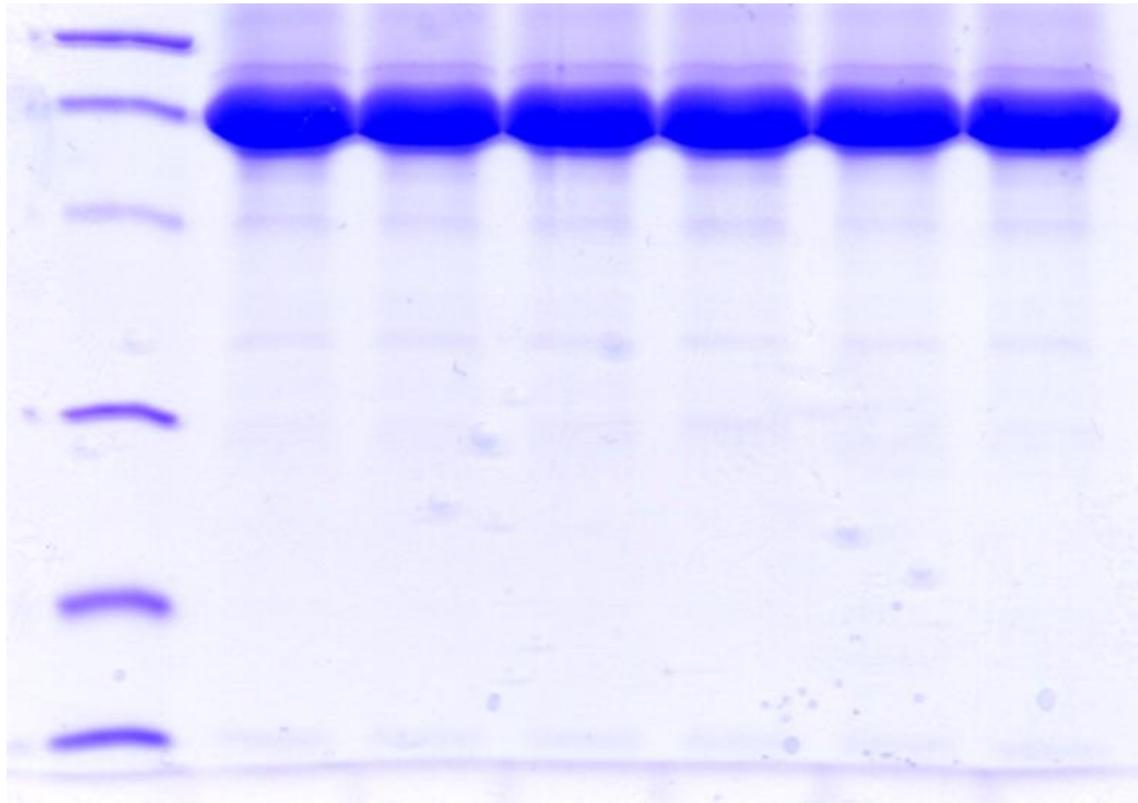
Colorante-SO₃⁻NH₃⁺-L-COOH (proteine basiche)

Procedura:

1. rimozione del gel dall'apparato di corsa e inserimento in una vaschetta pulita,
2. trattamento del gel con una soluzione di acido acetico e metanolo per fissaggio delle proteine al gel e rimozione dell'SDS,
3. immersione del gel, da 5 min a 1 h, in una soluzione colorante di Blue Coomassie e acido acetico e metanolo,
4. rimozione del colorante non legato alle proteine tramite immersione del gel in una soluzione di acido acetico e metanolo.

Blue di Coomassie

Detection limit: 1–5 μg of protein



Albumina di siero bovino. SDS-PAGE

Colorazione con l'argento

SOLUZIONI DA PREPARARE:

- **FIXING SOLUTION:** 40% etanolo; 10% acido acetico.
- **WASHING SOLUTION I:** 30% etanolo.
- **WASHING SOLUTION II:** 20% etanolo.
- **SENSITIZER SOLUTION:** 0,02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (tiosolfato di sodio)
- **SILVER STAIN:** 0,2% AgNO_3 **-fotosensibile-** (Aggiungere 0,02% di Formaldeide prima dell'uso).
- **SOLUZIONE DI SVILUPPO:** 3% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Aggiungere 0,05% di Formaldeide prima dell'uso).
- **BLOCKING SOLUTION:** 0,5% Glicina

METODICA:

Incubare il gel nella Fixing solution per almeno 3h

Lavare per 20 minuti nella Washing Solution I

Lavare per 20 minuti nella Washing Solution II

Lavare per 20 minuti in H₂O bd

Incubare il gel nella Sensitizer solution

Lavare per 20 secondi in H₂O bd (x3)

Colorare per 20 minuti con il Silver Stain

Lavare per 20 secondi in H₂O bd (x3)

Incubare per 3-5 minuti nella soluzione di Sviluppo

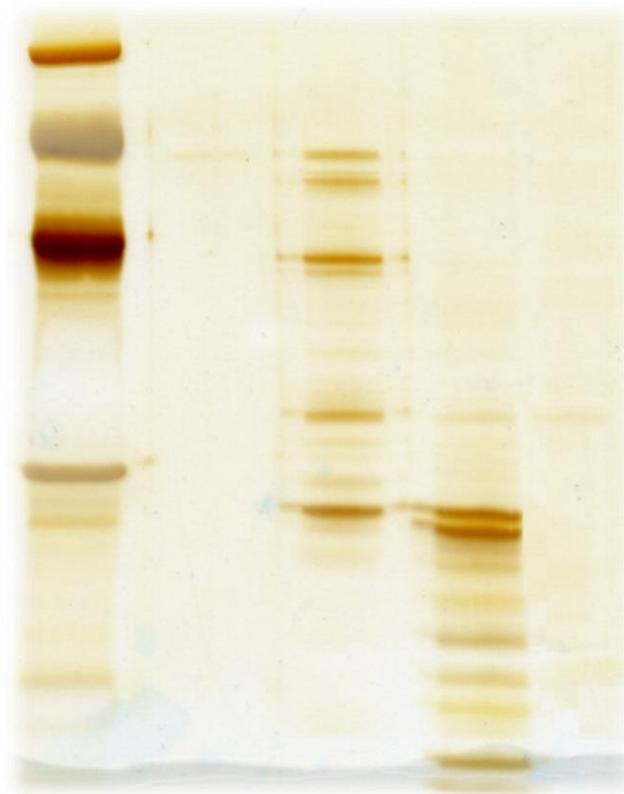
Lavare per 20 secondi con H₂O bd

Incubare per 5 minuti nella Blocking Solution

Lavare per 10 minuti in H₂O bd (x3)

Colorazione con l'argento

Detection limit: 0.1–0.5 μg of protein

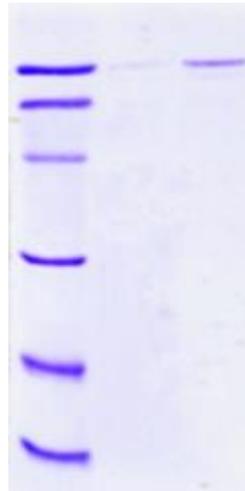


Problemi di caricamento del gel

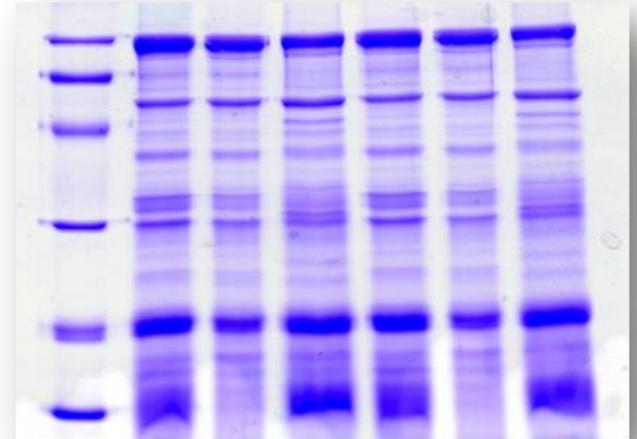
Il gel di poliacrilamide ha una capacità limitata e sovraccaricarlo con le proteine può dare risultati di precipitazioni ed aggregazione, produzione di striature e macchie. I risultati migliori si ottengono caricando, per ogni pozzetto, 20 μ l di proteina denaturata concentrata 0,5 mg/ml (10 μ g per pozzetto).



troppo



poco



giusto

Essiccamento del gel

Una volta “colorati” i gel devono essere essiccati per una buona e lunga conservazione



Fase 6 - Studio dell'immagine ottenuta

La massa molecolare relativa (M_r) di una proteina può essere determinata confrontando la sua mobilità con quella di una serie di proteine “standard”, delle quali si conosce la massa molecolare relativa, separate sullo stesso gel.

E' da tenere presente che tramite questa metodica si determina il peso molecolare apparente di una proteina, in quanto alcune proteine, per loro natura (composizione aminoacidica, modificazioni, ecc.) migrano in modo anomalo, non rispecchiando il loro effettivo peso molecolare.

Standard proteici:

In commercio sono disponibili diversi standard proteici che coprono un'ampia gamma di pesi molecolari (PM) diversi.

Ve ne sono per tutte le applicazioni:

- per determinare con la massima approssimazione il peso molecolare,
- per verificare l'efficienza di trasferimento su membrana.

I marker possono essere non colorati oppure pre-colorati

I primi permettono una determinazione più accurata del PM, mentre i secondi sono più adatti per la conferma dell'andamento dell'elettroforesi e del trasferimento su membrana.

La maggior parte dei marker pre-colorati in commercio produce 6-12 bande che possono essere tutte dello stesso colore oppure di colori diversi. L'uso di colori differenti facilita l'identificazione del PM di ogni proteina.

SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range

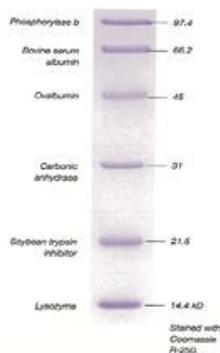
Size Range:	Quantity:	Recommended Load Volume:
6 proteins from 14.4–97.4 kD	~2.4 mg protein in 200 μ l 50% (v/v) glycerol, 300 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8.5, 2 mM EDTA, 3 mM Na ₂ S ₂ O ₃	Mini gels: 5 μ l of a 1:20 dilution (Coomassie R-250 stain)

For accurate molecular weight determination on SDS-polyacrylamide gels. Blended to give even band intensities when stained with Coomassie R-250 or with zinc stain.

Recommended gel: 12% acrylamide, or gradient acrylamide gels with an upper concentration of 12% or greater. See migration chart on page 7 for approximate migration distances with varying gel percentages.

Note: Dilute 1:20 in SDS-containing reducing sample buffer. Heat for 5 min at 95 °C. Cool and load 10 μ l/well for full-length gels or 5 μ l/well for mini gels. If silver staining, we recommend using Silver Stain SDS-PAGE standards (see pages 12–13). Store at –20 °C.

Catalog # 161-0304



Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range

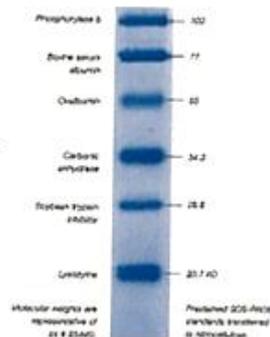
Size Range:	Quantity:	Recommended Load Volume:
6 proteins from 14.4–97.4 kD	~0.63 mg protein in 500 μ l 33% (v/v) glycerol, 3% SDS, 10 mM Tris, pH 7.0, 10 mM DTT, 2 mM EDTA, 0.01% Na ₂ S ₂ O ₃	Mini gels: 10 μ l Mini blots: 5 μ l Large gels: 20 μ l Large blots: 10 μ l

For electrophoretic transfer monitoring and to estimate an approximate molecular weight only.

Recommended gel: 12% acrylamide. See migration chart on page 17 for approximate migration distances with varying gel percentages.

Note: Premixed with sample buffer, no heating or dilution required. Allow standard to reach room temperature, and mix thoroughly to dissolve any precipitated solids. Store at –20 °C.

Catalog # 161-0305



Kaleidoscope Prestained Standards

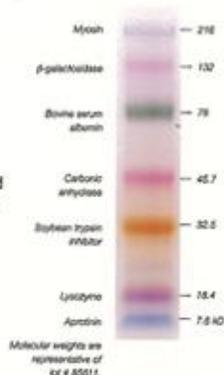
Size Range:	Quantity:	Recommended Load Volume:
7 proteins from ~7–216 kD	~1.6 mg protein in 500 μ l 33% (v/v) glycerol, 3% SDS, 10 mM Tris, pH 7.0, 10 mM DTT, 2 mM EDTA, 0.01% Na ₂ S ₂ O ₃	Mini gels: 10 μ l Mini blots: 5 μ l Large gels: 20 μ l Large blots: 10 μ l

Multicolored proteins for instant band recognition on membranes or SDS-polyacrylamide gels.

Recommended gel: 4–20% gradient gels. See migration chart on page 17 for approximate migration distances with varying gel percentages.

Note: Premixed with sample buffer, no reconstitution or dilution is required. Allow standard to reach room temperature, and mix thoroughly to dissolve any precipitated solids. Not intended for molecular weight determinations. Store at –20 °C.

Catalog # 161-0324



Biotinylated SDS-PAGE Standards, Low Range

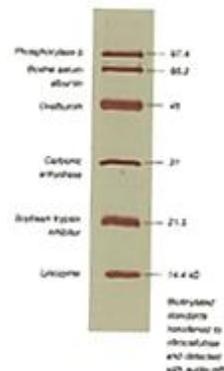
Size Range:	Quantity:	Recommended Load Volume:
6 proteins from 14.4–97.4 kD	~0.13 mg protein in 250 μ l 50% (v/v) glycerol, 150 mM NaCl, 3 mM Na ₂ S ₂ O ₃	Mini gels: 10 μ l of a 1:20 dilution

For accurate molecular weight determination of immune-detected proteins. The proteins have been blended to give equal intensities when detected with avidin-HRP and HRP color development reagent.

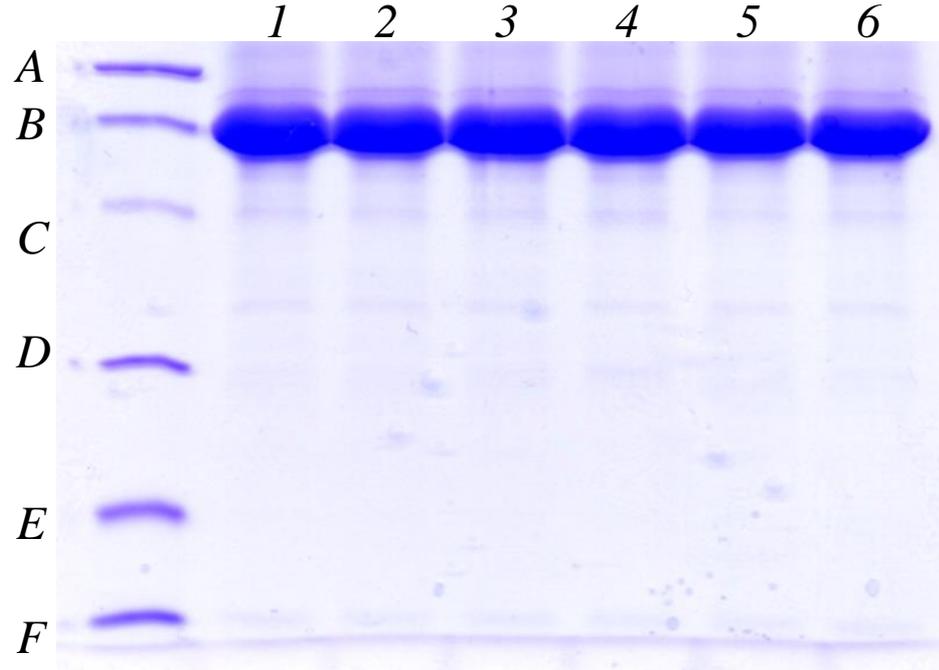
Recommended gel: 12% acrylamide. See migration chart on page 23 for approximate migration distances with varying gel percentages.

Note: Dilute 1:4 (HRP color development) or 1:20 (AP color development) in SDS-containing reducing sample buffer. Heat for 5 min at 95 °C. Cool and load 10–15 μ l/well for full-length gels or 10 μ l/well for mini gels. Store at –20 °C.

Catalog # 161-0306



6 - Studio dell'immagine ottenuta



Standard (low range)

MM

A- Fosforilasi B

97.400

B- BSA

66.200

C- Ovalbumina

45.000

D- Anidrasi carbonica

31.000

E- Inibitore della tripsina

21.500

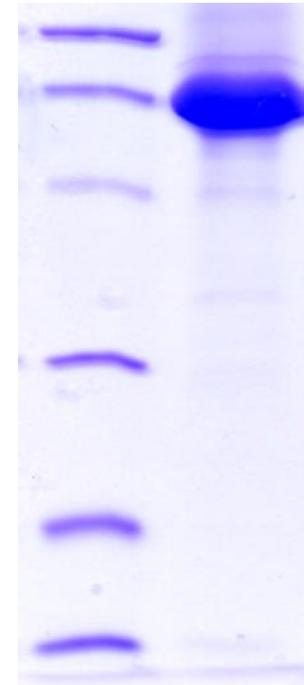
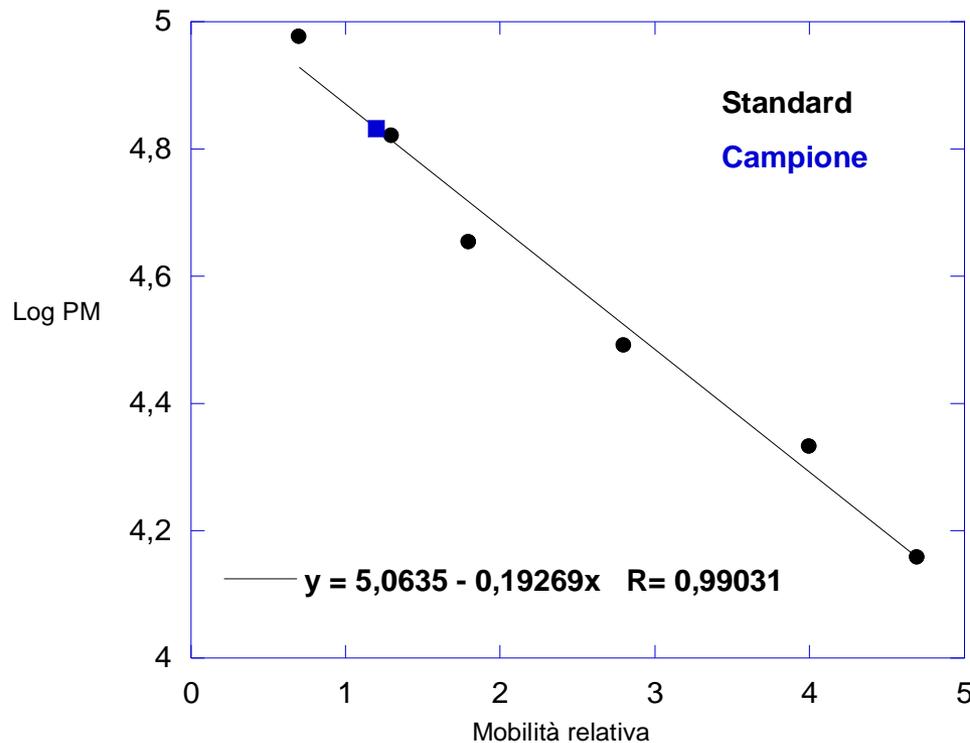
F- Lisozima

14.400

1, 2, 3, 4, 5, 6 = campioni di albumina

Determinazione della massa molecolare di catene polipeptidiche

Mobilità relativa di ciascuna proteina



Standard e Campione

Standard in nero, campione in blu

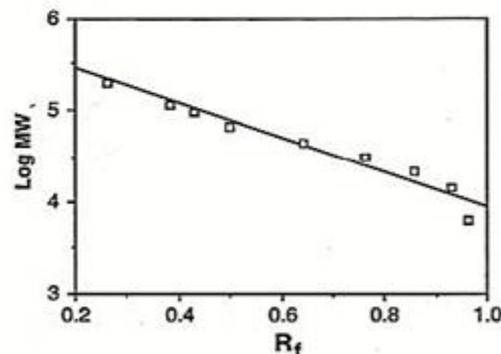
Molecular Weight Determination

Molecular weights of proteins are determined by comparison of their mobilities with those of several marker proteins of known molecular weight:

1. After gel has been run, but before it has been stained, mark the position of the tracking dye.
2. After staining, measure the migration distance of each protein (markers and unknowns) from the top of the resolving gel.
3. Calculate the relative mobility of each protein = R_f .

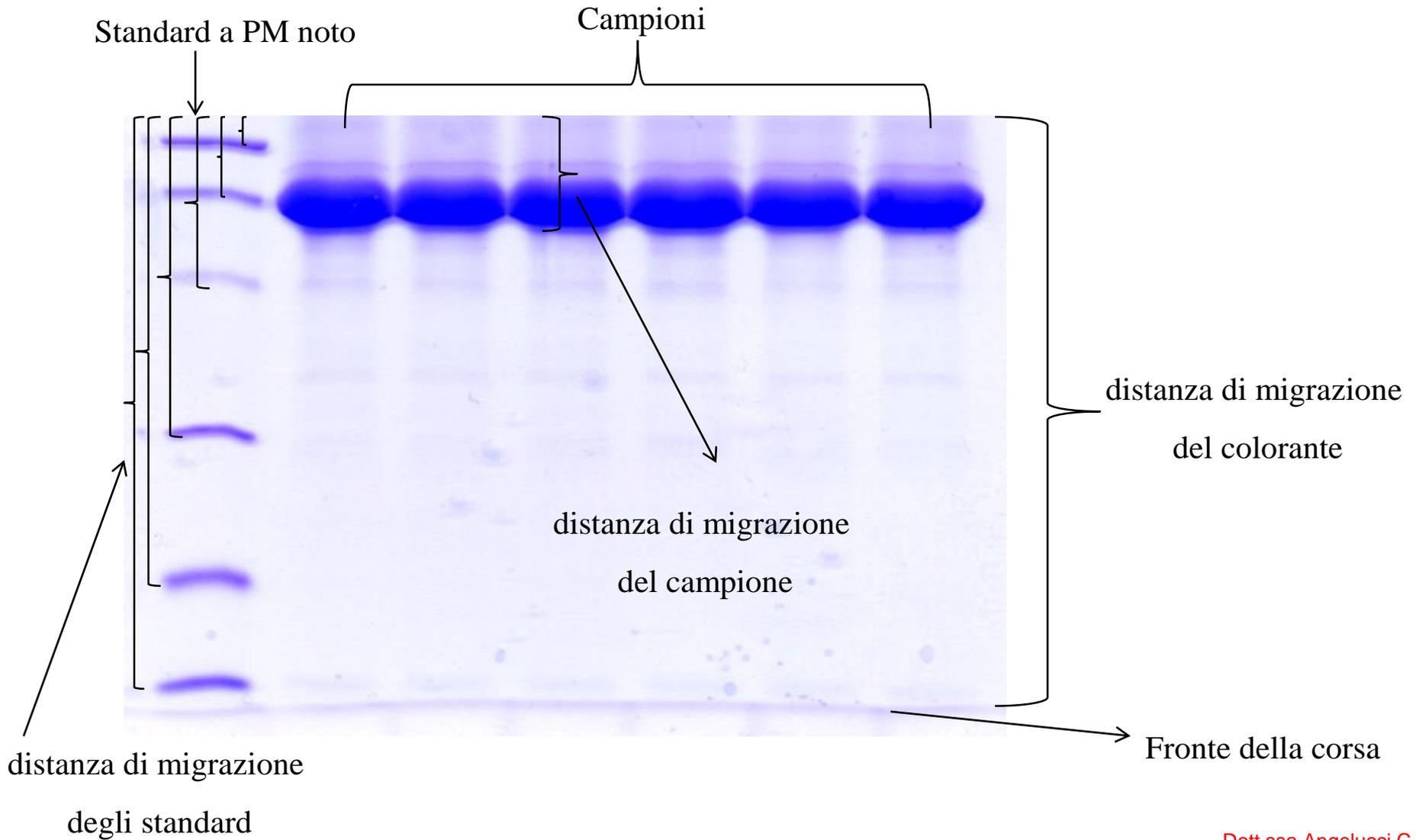
$$R_f = \frac{\text{distance migrated by protein}}{\text{distance migrated by dye}}$$

4. Plot the R_f of each standard protein against the \log_{10} of its molecular weight as shown below to generate a standard curve.



5. To estimate the molecular weight of an unknown protein: use the standard curve to interpolate its \log_{10} MW from its R_f . Take the antilog to determine its molecular weight.

Dopo la colorazione, si misura la distanza di migrazione di ciascuna proteina dalla sommità del gel risoluzione fino alla distanza di migrazione del colorante (fronte della corsa)

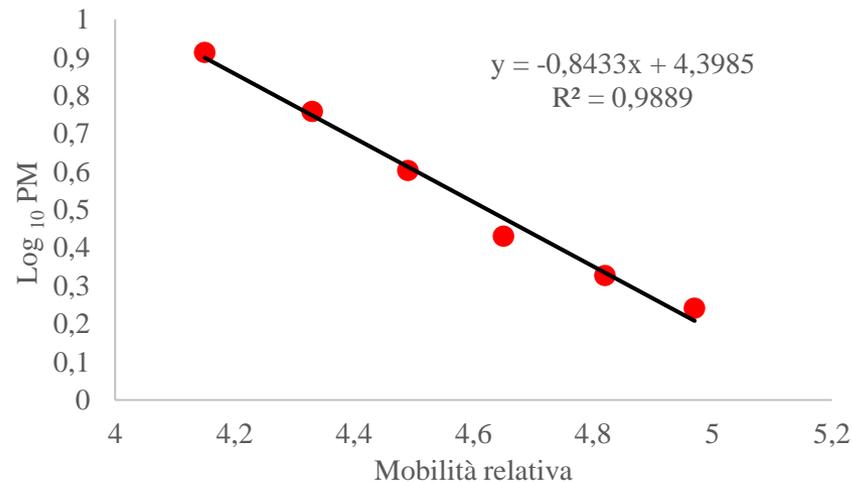


Dopo la colorazione, si misura la distanza di migrazione di ciascuna proteina dalla sommità del gel risoluzione fino alla distanza di migrazione del colorante

$$R_f = \frac{\text{distanza di migrazione della proteina}}{\text{distanza di migrazione del colorante}}$$

la distanza di migrazione del colorante è 5,8

	PM	Mobilità Relativa	Log₁₀
Fosforilasi B	94700	1,4	4,97
BSA	66200	1,9	4,82
Ovalbumina	45000	2,5	4,65
Anidrasi carbonica	31000	3,5	4,49
Inibitore della Tripsina	21500	4,4	4,33
lisozima	14400	5,3	4,15



Principali impieghi di una SDS-PAGE

Controllo di omogeneità (*purificazione di una proteina*)

Caratterizzazione (*determinazione del peso molecolare*)

Proteomica (*analisi dell'insieme di proteine di una cellula*)

Analisi con anticorpi (*Western Blotting*)