

- 1. Tecniche elettroforetiche: SDS-PAGE**
- 2. Tecniche immunochimiche: Western blotting; ELISA; sandwich ELISA**
- 3. Tecniche spettroscopiche: spettrofotometria UV/vis; spettrofluorimetria**

Testo consigliato

Keith Wilson, John Walker, **Biochimica e biologia molecolare**, VI edizione, Raffaello Cortina Editore, Milano, 2006

Definizioni

Qualità: l'insieme delle caratteristiche di un'entità (prodotto, servizio, ecc.) che ne determinano la capacità di soddisfare esigenze espresse ed implicite.

Controllo di Qualità: le tecniche e le attività a carattere operativo messe in atto per soddisfare i requisiti per la qualità

Controllo di Qualità negli Alimenti

Nel caso dei prodotti alimentari il controllo di qualità è volto a stabilire se essi siano genuini o abbiano subito i processi di alterazione, adulterazione, sofisticazione o falsificazione.

Definizioni:

*Alterazione: processo spontaneo determinato da cattiva conservazione o conservazione troppo prolungata dell'alimento. Il processo di alterazione può aver luogo a causa di **agenti fisici** (variazione di T, umidità, pressione) o di **contaminanti biologici** (microrganismi, muffe, lieviti) e **contaminanti chimici** (inquinamento atmosferico, reazioni chimiche spontanee all'interno dell'alimento, come l'irrancidimento dei grassi o aumento di acidità del latte).*

Glossario

Adulterazioni: operazioni fraudolente che fanno variare la composizione analitica dell'alimento nel senso di aggiungere o sottrarre qualche componente.

Un esempio di alterazione è l'aggiunta di acqua al vino o al latte.

Sofisticazioni: operazioni fraudolente che consistono nell'aggiungere nell'alimento sostanze estranee alla sua composizione con lo scopo di migliorarne l'aspetto o coprirne i difetti.

Esempi di sofisticazione sono l'aggiunta di clorofilla all'olio di semi raffinato, aggiunta di aromatizzanti al burro, ecc.

Falsificazioni: sostituzione totale di un alimento con un altro.

Per esempio olio di semi al posto di quello di oliva o margarina al posto del burro

Elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE)

Tecniche Elettroforetiche

Un esempio introduttivo

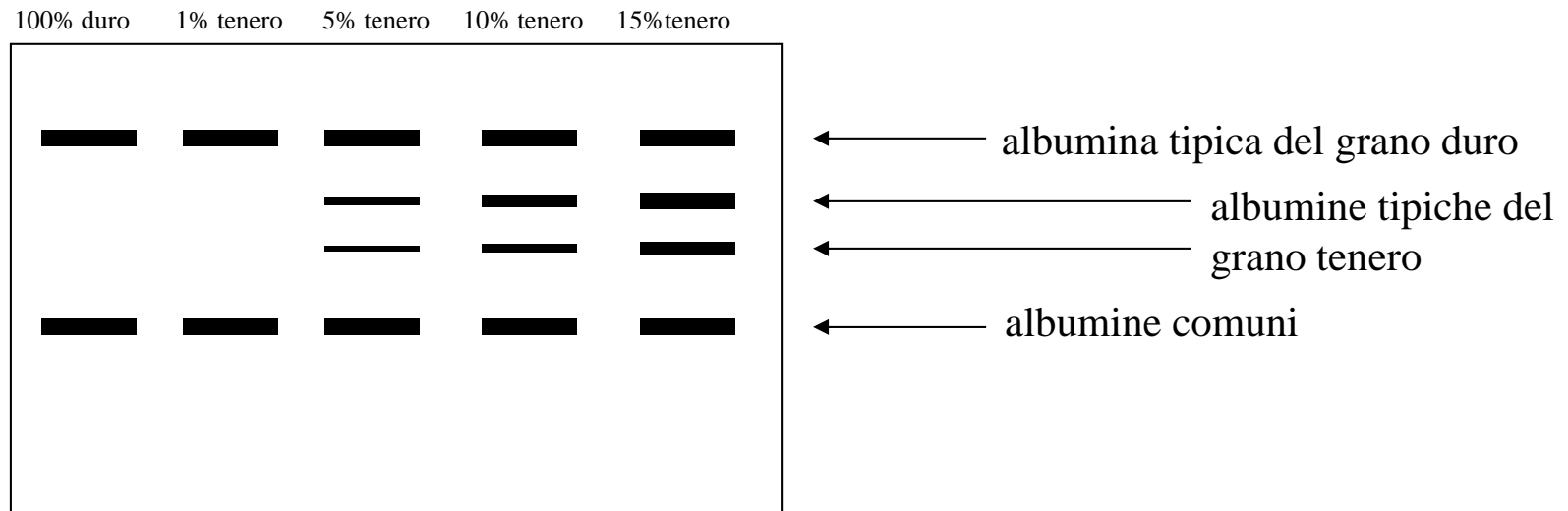
La legge 580/67 definisce “pasta di semola di grano duro il prodotto ottenuto dalla trafilazione, laminazione e conseguente essiccamento di impasti preparati con **semola di grano duro** e acqua”

La più comune **frode alimentare** riscontrabile nelle paste alimentari consiste nell’uso non dichiarato di farine di grano tenero in aggiunta o al posto della semola di grano duro.

Analisi delle Albumine tramite elettroforesi

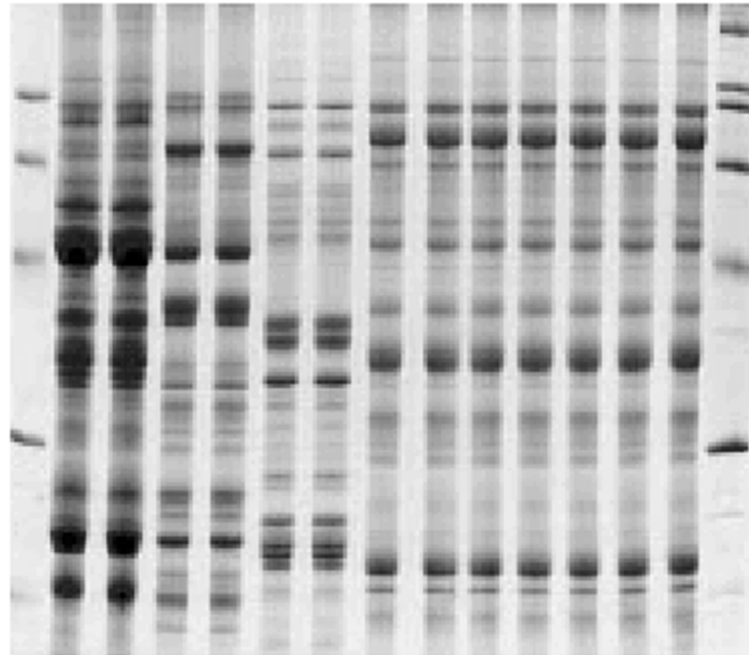
Questo tipo di sofisticazione può essere rivelata tramite l'identificazione nella pasta di **albumine specifiche** del grano tenero non presenti nel grano duro

Queste proteine possono essere identificate tramite **western-blotting** della frazione proteica estratta dalla pasta, usando **anticorpi** diretti contro le albumine del frumento:



Elettroforesi

L'**elettroforesi** è una tecnica che consiste nella migrazione differenziata in un campo elettrico, di molecole elettricamente cariche.



Caratteristiche Generali

L'elettroforesi è una tecnica

1. relativamente poco costosa
2. rapida
3. versatile

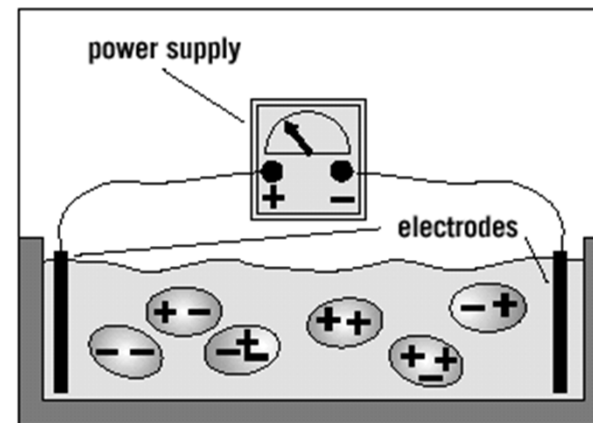
che viene usata per separare molecole elettricamente cariche.

Molte molecole di interesse biologico, come gli amminoacidi, i peptidi, le **proteine**, i nucleotidi e gli **acidi nucleici**, possiedono **gruppi ionizzabili** e possono esistere in soluzione come specie elettricamente cariche, sia come cationi, sia come anioni.

Anche composti tipicamente non ionici, come i **carboidrati**, possono assumere una carica se trasformati chimicamente oppure se sono strutturati in polimeri complessi quali i glicosamminoglicani.

Apparato Elettroforetico

L'apparecchiatura per l'elettroforesi è composta, fondamentalmente, da due parti: un **alimentatore** ed una **cella elettroforetica**. L'alimentatore fornisce un flusso di corrente continua agli elettrodi applicati alla cella elettroforetica e pertanto i cationi migrano verso il catodo e gli anioni verso l'anodo ad una velocità che dipende dall'equilibrio che si instaura tra le forze di spinta del campo elettrico e le forze frenanti esistenti tra ioni e mezzo circostante.



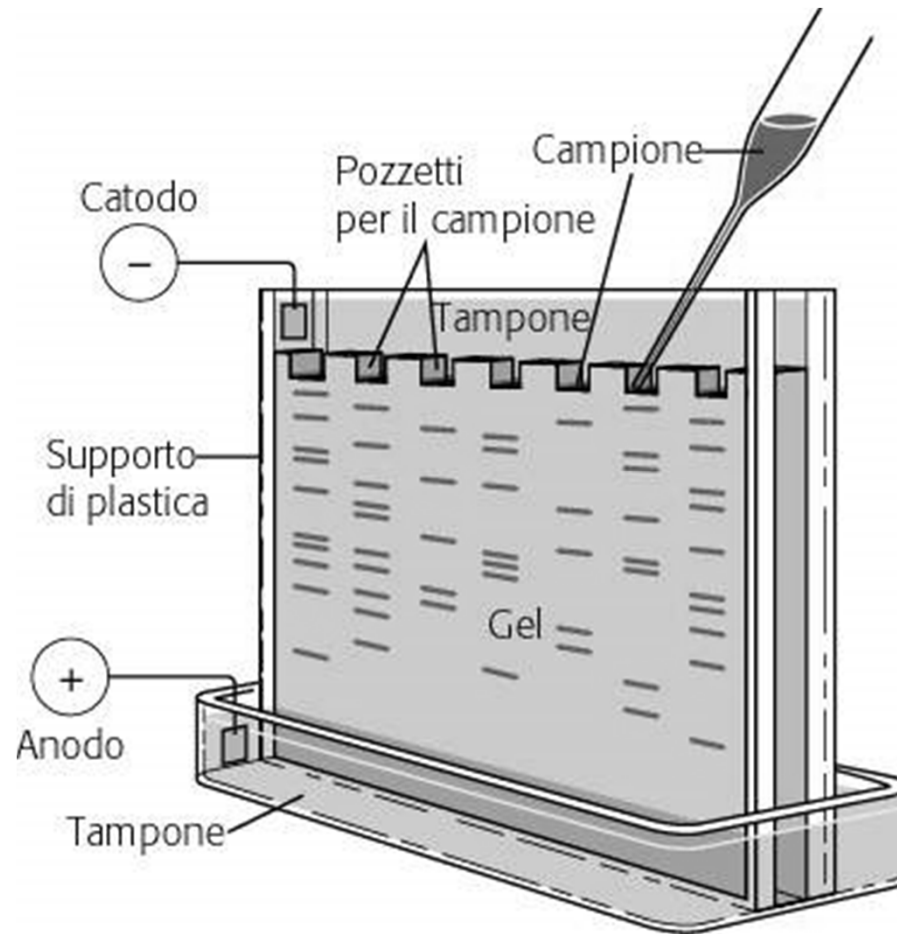
Principio Fisico

Da considerazioni di carattere fisico, si risale alla seguente formula:

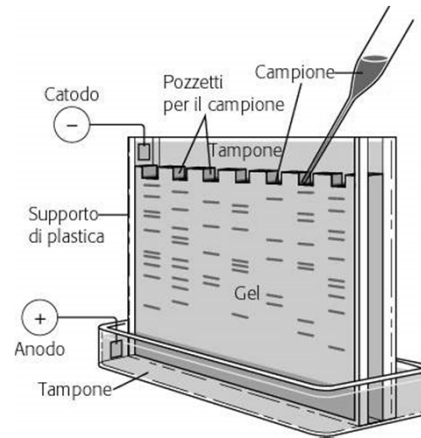
$$\mathbf{V_e} = \frac{\mathbf{q} \times \mathbf{E}}{6\pi \times \eta \times \mathbf{r}}$$

La velocità elettroforetica ($\mathbf{V_e}$) è direttamente proporzionale alla carica della particella (\mathbf{q}) e al campo elettrico applicato ($\mathbf{E}=V/d$) e inversamente proporzionale alla viscosità (η) e alle dimensioni della particella (\mathbf{r}), quindi nel caso di particelle aventi la stessa carica, migrerà più velocemente la particella di raggio minore.

Apparato Elettroforetico Verticale



L'elettroforesi viene condotta su un supporto inerte ed omogeneo (**gel o matrice**), il campione viene sciolto in un opportuno tampone, col quale, inoltre, viene saturato l'eventuale supporto in modo da consentire la conduzione della corrente.



Sotto la spinta del campo elettrico le varie molecole presenti nel campione si muoveranno attraverso la matrice a velocità differenti. Alla fine della separazione, le differenti specie saranno “identificate” come bande a differente posizione nella matrice.

Il supporto (gel o matrice) è essenziale perché il calore generato dalla corrente elettrica, che passa attraverso la cella, in assenza di un medium stabilizzante, causerebbe moti convettivi e diffusivi delle bande (e quindi perdita di potere risolutivo).

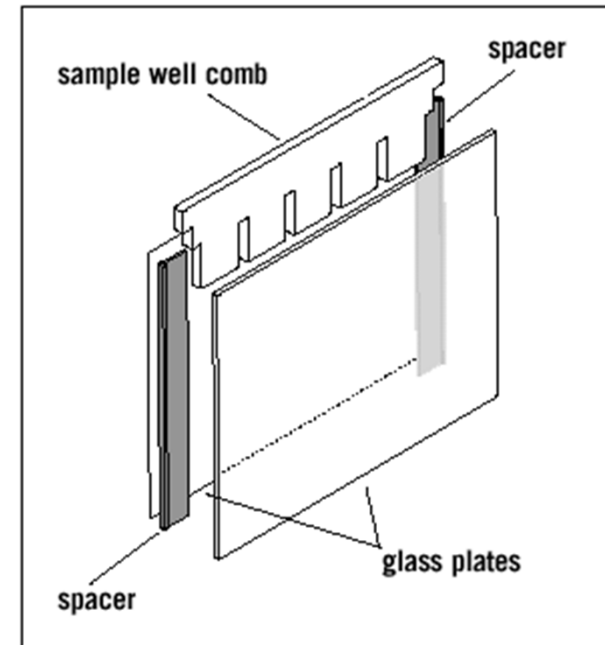
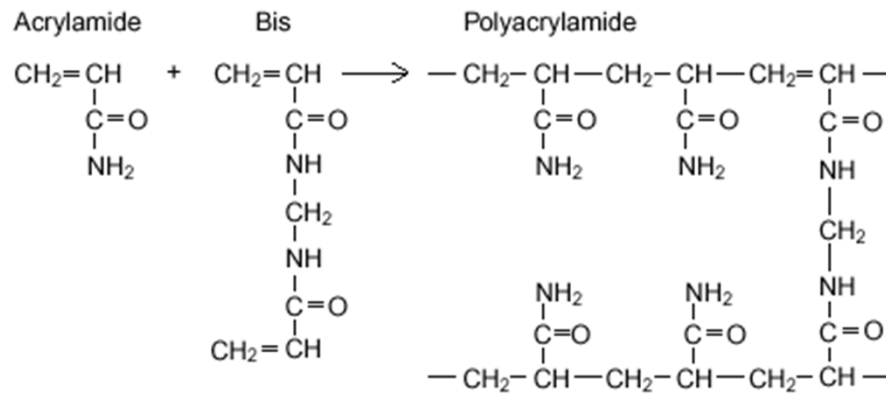
La matrice può essere composta da una varietà di differenti materiali, inclusa la carta, l'acetato di cellulosa, o **gel** fatti di **poliacrilammide** e **agarosio**.

Gel di AGAROSIO

Agar. L'agar è una miscela poco costosa, non tossica e chimicamente mal definita di due polimeri derivati dal galattosio: l'agarosio e l'agarpectina. Sottoforma di gel all'1% l'agar presenta un elevato contenuto d'acqua, una buona struttura fibrosa, un diametro dei pori elevato ed una bassa resistenza frizionale. Di conseguenza, durante l'elettroforesi, il movimento degli ioni è molto rapido e favorisce la separazione delle macromolecole.

I gel d'agar si prestano molto bene alla colorazione dopo la corsa e la loro scarsa resistenza alla diffusione delle proteine anche di alto peso molecolare li rende un ottimo supporto per la identificazione delle proteine con metodi immunochimici. I gel di agarosio **sono usati soprattutto per la separazione di acidi nucleici e frammenti di DNA**; in questo caso la migrazione differenziale è funzione semplicemente del numero di basi di cui sono composti gli acidi nucleici da separare.

Preparazione del Gel di poliacrilammide



I gel di poliacrilammide vengono preparati al momento dell'uso facendo copolimerizzare acrilamide con metilen-bisacrilammide, un agente cross-linkante, in presenza di un catalizzatore come il persolfato di ammonio (**APS**) allo 0,1-0,3% e un iniziatore 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.

TEMED

N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine

Il TEMED catalizza la rottura omolitica dell'APS, producendo così i radicali necessari per la reazione di polimerizzazione radicalica dell'acrilammide.

Il TEMED va conservato al buio, a RT, e possibilmente, in ambiente anidro. Questo perché il TEMED è igroscopico ed in presenza di acqua si ossida perdendo le sue proprietà catalitiche. Il TEMED ossidato si riconosce in quanto assume colorazione giallastra.

APS

L'APS è una molecola instabile, ed estremamente igroscopica.

Quando è sciolto in acqua si scompone spontaneamente, pertanto si consiglia di preparare la soluzione appena prima dell'uso.

In pratica si prepara una soluzione madre al 10% e la si congela a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

APS e TEMED aggiunti in quantità eccessive, oltre ad alterare le proprietà del gel, possono ossidare le proteine del campione.

Dimensione dei pori del gel

$$\%T = \frac{\text{g(acrylamide + bisacrylamide)}}{100 \text{ ml}} \times 100$$

$$\%C = \frac{\text{g(bisacrylamide)}}{\text{g(acrylamide + bisacrylamide)}} \times 100$$

La dimensione dei pori è funzione della quantità totale di monomeri (%T) presenti nella soluzione e del rapporto tra la l'agente cross-lincante e l'acrilammide (%C).

Più spesso la composizione del gel viene data come rapporto in peso acril:bis-acril (per es. 30:0,8).

Elettroforesi su gel di poliacrilammide

Due Tipi:

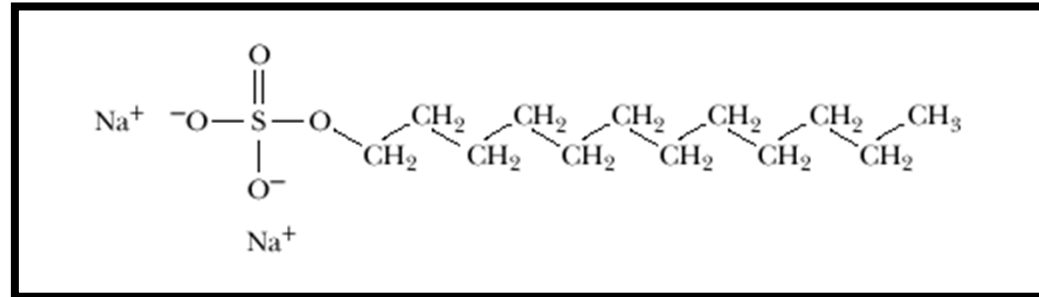
- **Elettroforesi Nativa:** le P si muovono in funzione della loro massa e della loro carica netta
- **Elettroforesi Denaturante in presenza di SDS (SDS-PAGE):** le P, uniformemente dotate di carica negativa (SDS), si muovono in base alla loro massa.

SDS-PAGE

(Elettroforesi su Gel di PoliAcrilammide in SDS)

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.

SDS



L'SDS è un detergente anionico forte che si lega saldamente alle proteine e ne provoca la denaturazione, di conseguenza l'elettroforesi avviene in condizioni non native; in media per ogni due amminoacidi si lega una molecola di SDS, fornendo alla proteina una **carica negativa costante per unità di massa.**

SDS-PAGE

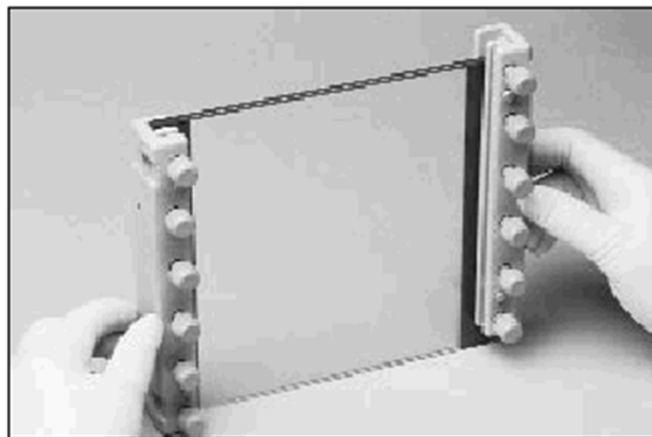
preparazione del campione

I campioni proteici sono solubilizzati in una soluzione Tris HCl a pH 8.3 contenente 2% SDS, 100 mM DTT, 10% glicerolo e tracce di blue di bromofenolo come indicatore della corsa. La denaturazione viene eseguita a 95 °C per 10 min.

Elettroforesi con buffer discontinui

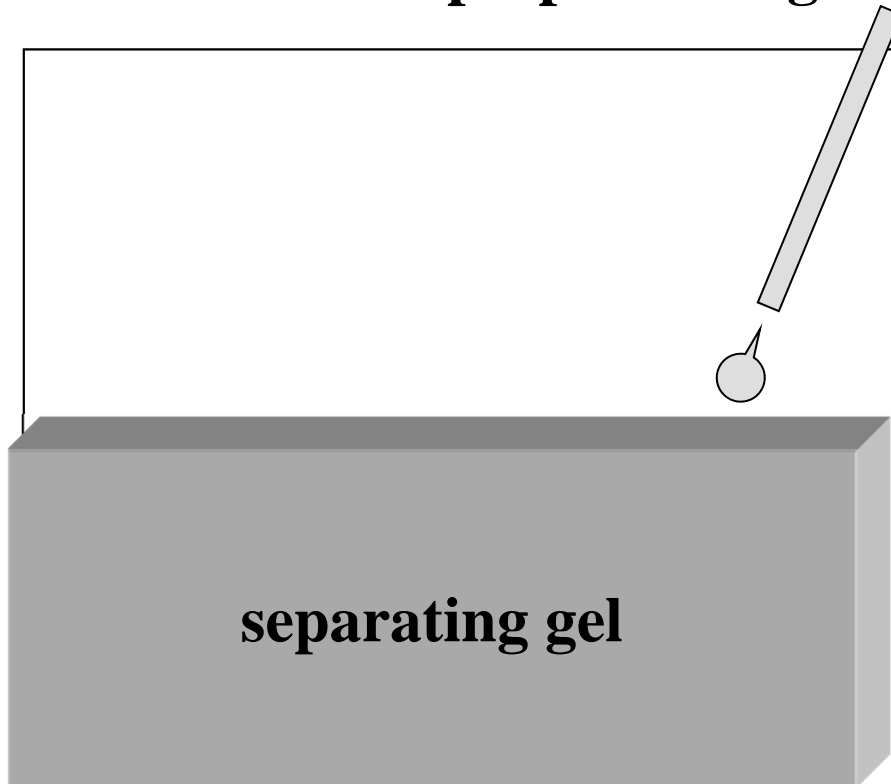
La SDS-PAGE viene normalmente preparata secondo il sistema dei buffer discontinui, per via del suo maggiore potere risolutivo.

In questa tecnica si impiegano due tipi di gel o buffer, che vanno posti in una camera verticale, con l'anodo posto inferiormente, e stratificati l'uno sull'altro, il gel così formato è posto a contatto tra l'anodo e il catodo da un buffer (detto di corsa) contenente Tris-HCl a pH 8,3 e 190 mM glicina, 0,1% SDS.



Gel di Separazione

Prima di tutto va preparato il gel di separazione (o separating)

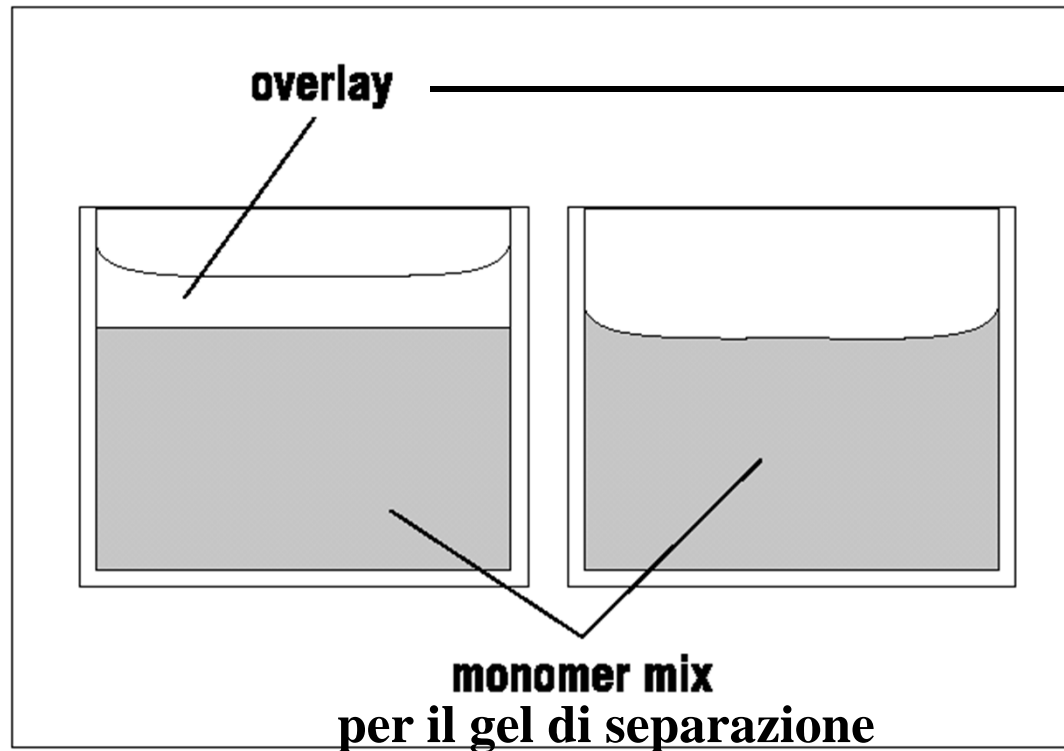


Il gel di separazione ha un pH di 8,8, e un rapporto di acrilam/bis-acrilam variabile da 5% al 18% in funzione del range di proteine che si intende separare

Resolving gel solution (80 ml; 2 ea. 1.5-mm-thick SE 600/SE 400 gels)

	Final gel concentration				
	5%	7.5%	10%	12.5%	15%
Acrylamide solution	13.3 ml	20 ml	26.7 ml	33.3 ml	40 ml
4× Resolving gel buffer	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml
10% SDS	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml
ddH ₂ O	45.5 ml	38.8 ml	32.1 ml	25.5 ml	18.8 ml
10% Ammonium persulphate*	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl
TEMED*	27 µl	27 µl	27 µl	27 µl	27 µl

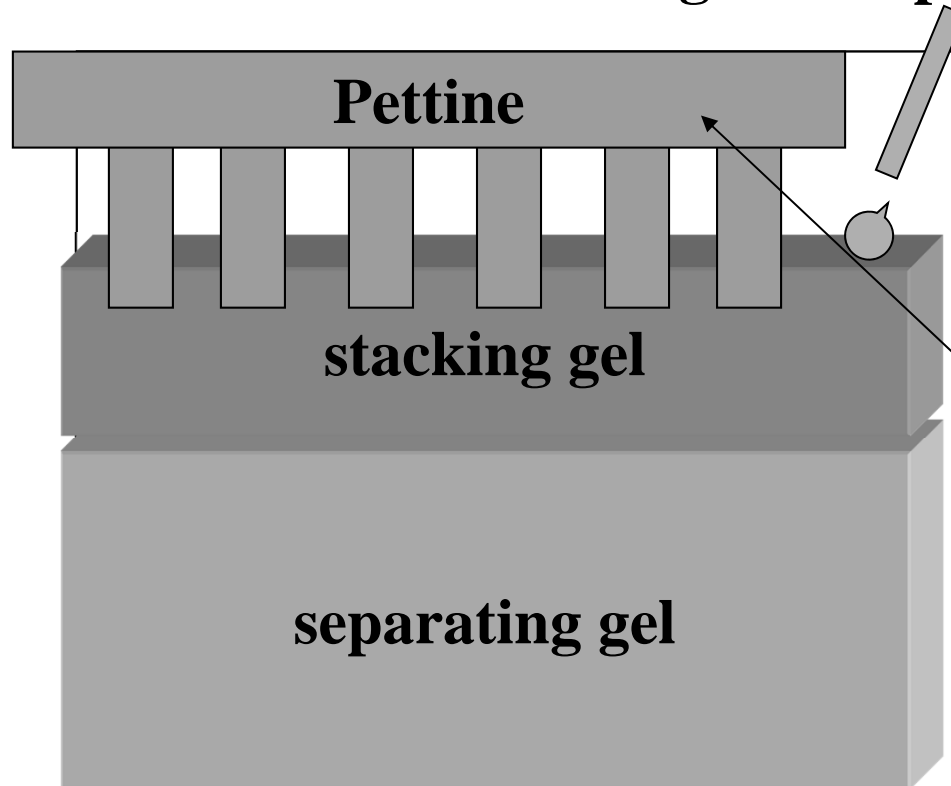
Menisco ed Ossigeno



butanolo saturo di acqua
(10:1)

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/bis-acrilam pari al 4%

Appena deposto il gel di impacc. si dispone il **pettine** per la formazione dei pozzetti

Stacking gel solutions (4% acrylamide; for two gels)

Gel thickness:	0.75 mm (10 ml total volume)	1.5 mm (20 ml total volume)
Acrylamide solution	1.33 ml	2.66 ml
4× Stacking gel buffer	2.5 ml	5 ml
10% SDS	0.1 ml	0.2 ml
ddH ₂ O	6 ml	12 ml
10% Ammonium persulphate*	50 µl	100 µl
TEMED*	5 µl	10 µl

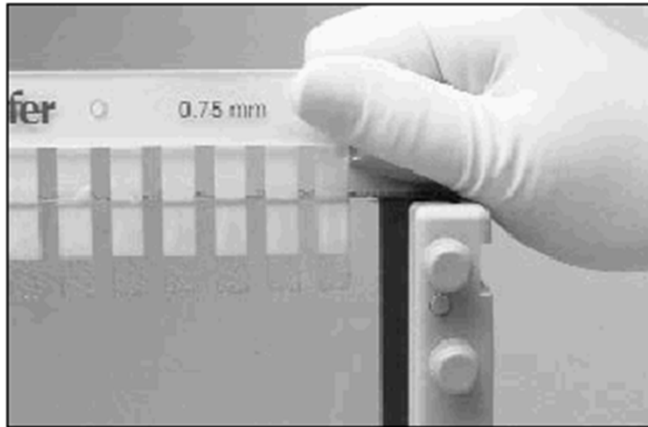
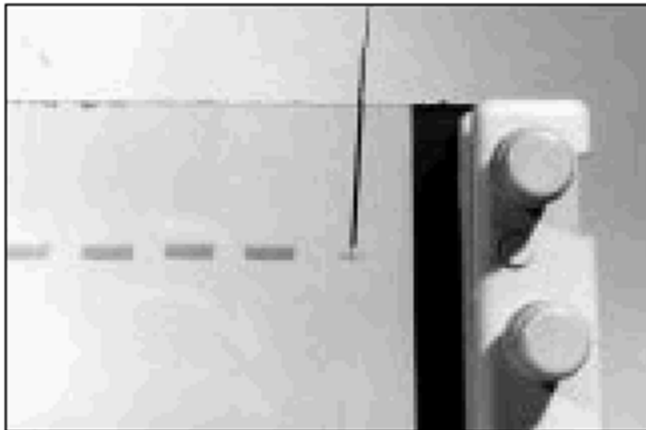


Fig 2.6. Removing comb from stacking gel (step 17). Do this gently to avoid damaging the well arms.



Quando i gel si sono solidificati si rimuove il pettine, lasciando nello stacking la serie di pozzetti pronti per il caricamento dei campioni.

Rivelazione delle Proteine su gel di poliacrilammide

Dopo la corsa su SDS-PAGE le proteine possono essere rivelate **direttamente su gel** o trasferite **su un supporto inerte** per la loro successiva identificazione tramite dosaggi immunocolorimetrici o radioattivi.

Analisi dei GEL

Dopo la corsa su SDS-PAGE le proteine possono essere rivelate **direttamente su gel** o trasferite **su un supporto inerte** per la loro successiva identificazione tramite dosaggi immunocolorimetrici o radioattivi.

Rivelazione su Gel

1. Colorazione di proteine con coloranti che si legano con forza ad esse.

Es. **Rosso Ponceau**

Blue di Coomassie

Colorazione con Argento

2. Autoradiografia (se si parte da Proteine radiomarcate)

Es. proteine marcate con ^{35}S o con ^{14}C

Analisi

Dopo preventivo essiccamento (gel dryer system) le proteine colorate su gel possono essere analizzate (PM, quantità) tramite **densitometria** (scanner, digital camera, densitometro)

Blue di Coomassie

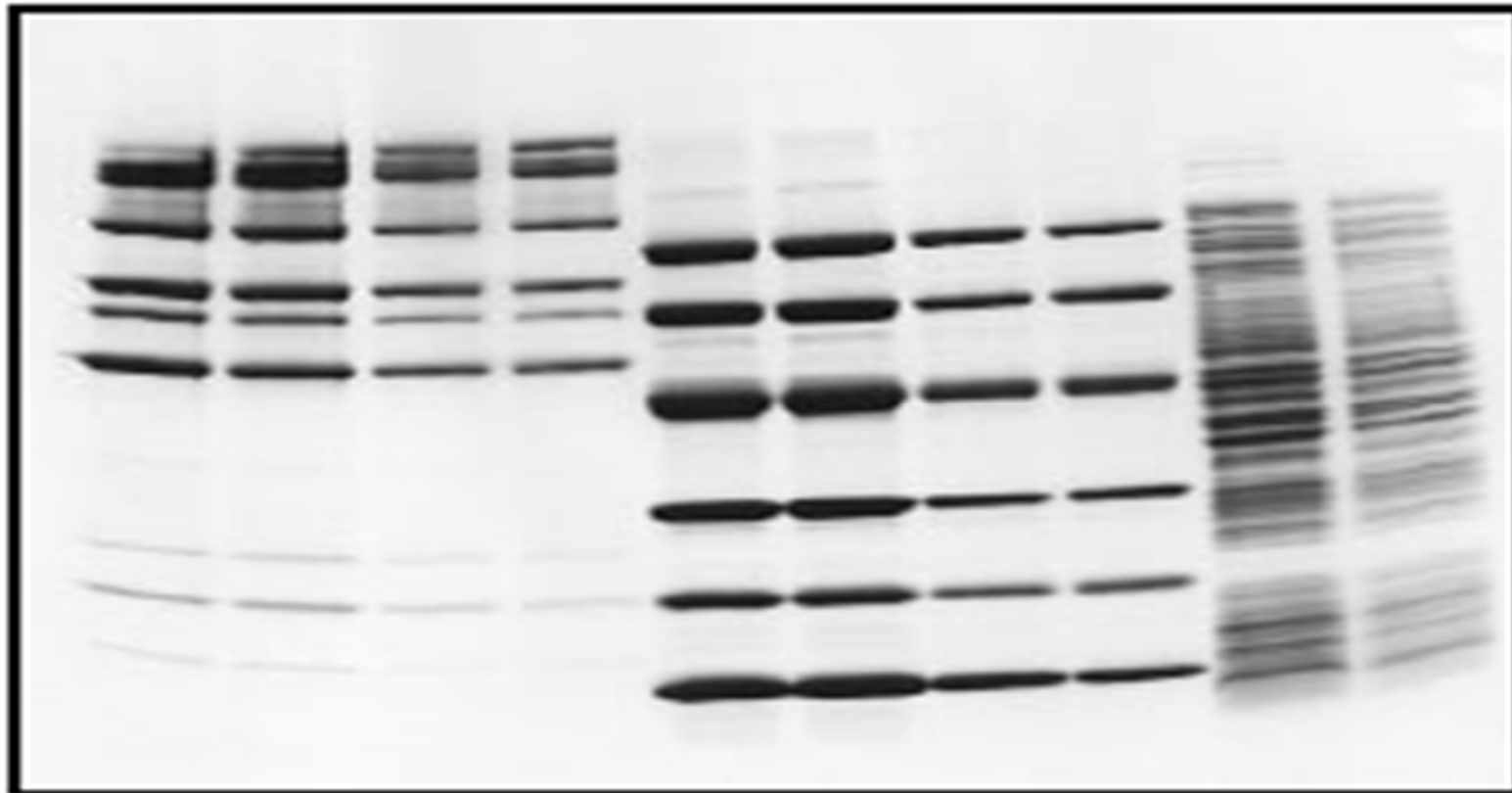
Procedura di colorazione:

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

NB Con questo metodo si possono quantificare le P sottoponendo il gel a scansione con un densitometro

Blue di Coomassie

Detection limit: 1–5 μg of protein



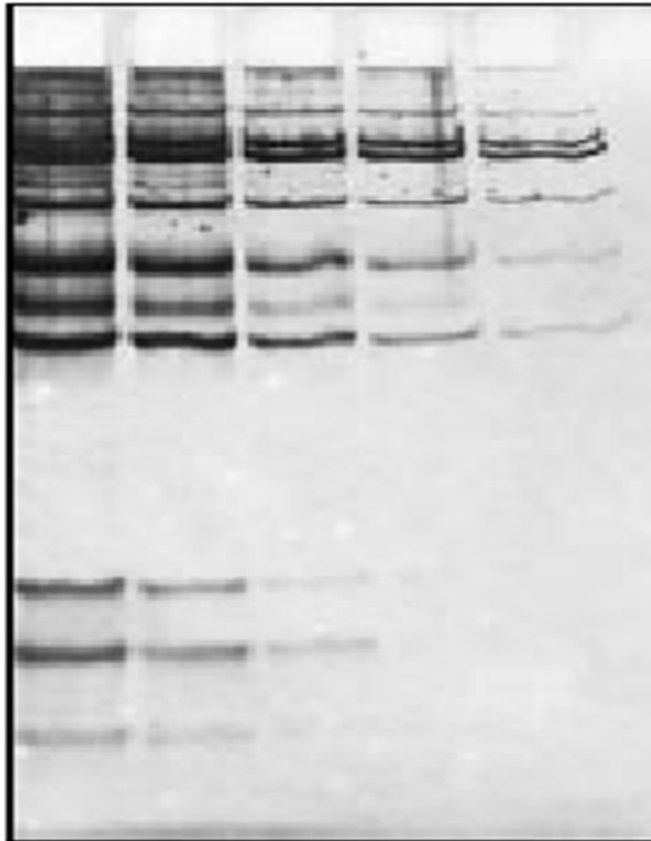
Colorazione con Argento

Procedura:

1. rimozione del gel dall'apparato di corsa e inserimento in una vaschetta
2. trattamento gel con acido acetico diluito e metanolo per fissaggio proteine al gel e rimozione dell'SDS
3. Incubazione del gel con una soluzione acida di nitrato di Ag che reagisce con le P
4. Incubazione con formaldeide a pH alcalino che riduce Ag^+ ad Ag metallico che colora le proteine a cui si era precedentemente legato
5. Arresto della reazione con acido acetico

Colorazione con Argento

Detection limit: 0.1–0.5 μg of protein



Essiccamento dei Gel

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



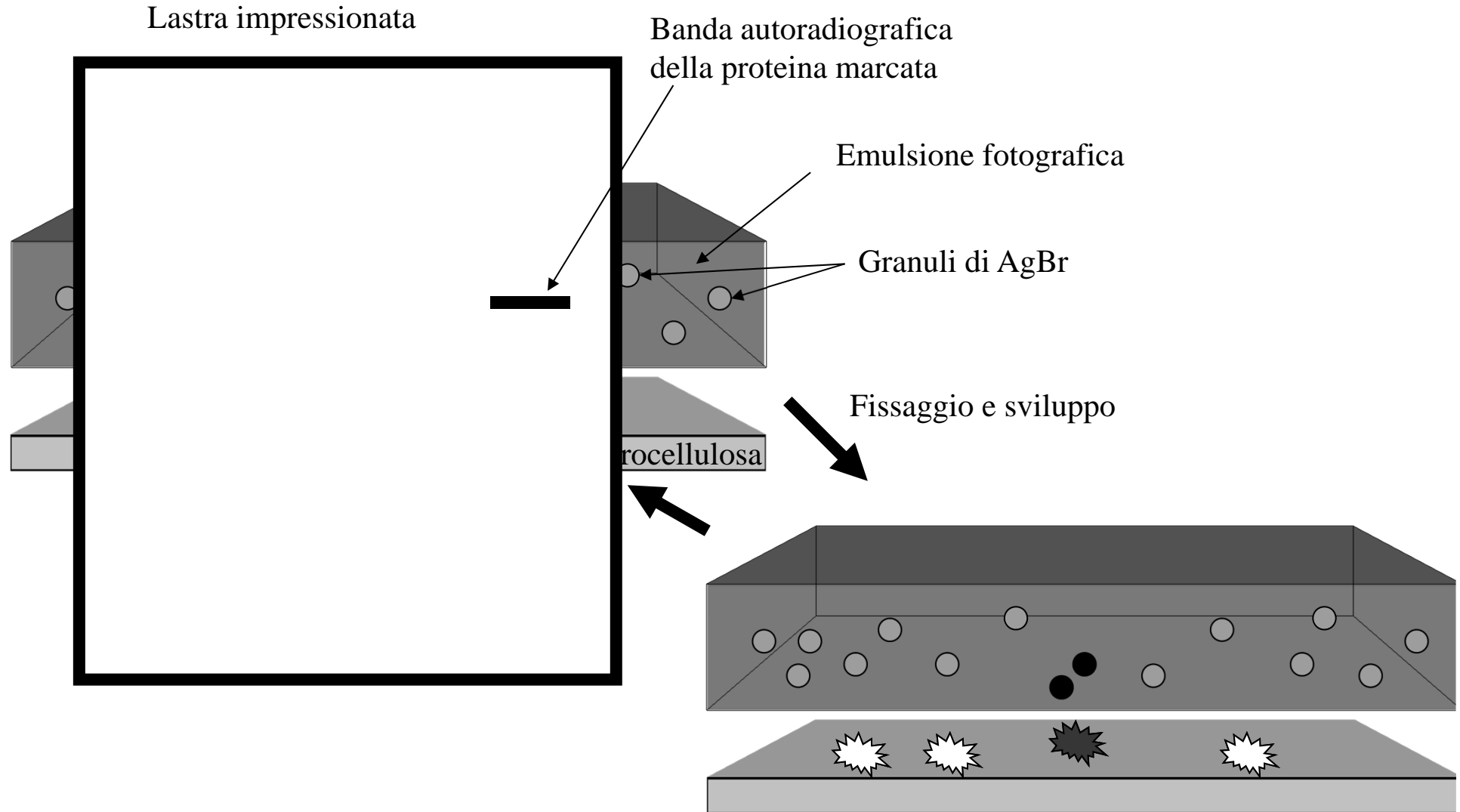
Fig 4.4. Hoefer GD 2000 Vacuum Gel Dryer System.

Autoradiografia

Se si parte da P marcate con isotopi radioattivi per es ^3H , ^{35}S e ^{14}C , le bande radiomarcate vengono rivelate ponendo il gel direttamente a contatto con una lastra radiosensibile al buio

In caso di radioisotopi a bassa energia (^3H , ^{35}S), il gel deve essere trattato con fluorofori che assorbono le emissioni a bassa energia e producono luce che puo essere registrata su una lastra fotosensibile

L' Autoradiografia



Mobilità elettroforetica in SDS-PAGE

L'SDS rompe i legami idrogeno, blocca le interazioni idrofobiche, sostanzialmente denatura la proteina, eliminandone la struttura secondaria, terziaria (ed ev., quaternaria). La proteina viene completamente denaturata quando viene impiegato un agente riducente come il DTT, che rompe tutti i ponti disolfuro tra i residui di cisteina.

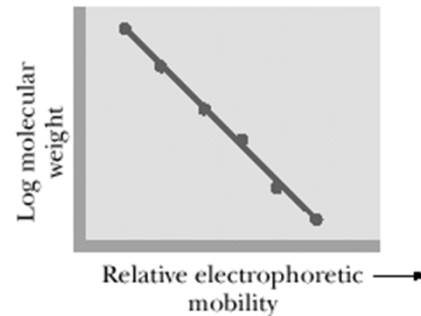


FIGURE 5A.4 • A plot of the relative electrophoretic mobility of proteins in SDS-PAGE versus the log of the molecular weights of the individual polypeptides.

La proteina così denaturata e ridotta diventa un “bacchetta flessibile” con una carica negativa uniforme proporzionale alla lunghezza della sua catena polipeptidica. Quindi, siccome il peso molecolare è essenzialmente funzione lineare della lunghezza della catena polipeptidica, nel gel “a setaccio” le proteine si separano solo in base al loro peso molecolare.