

Relazione di Laboratorio di Biochimica

06 giugno 2018 - Cisternino Marianna

L'**ELETTROFORESI** è una tecnica analitica e preparativa che permette di separare molecole cariche (AA, proteine, RNA o DNA) o rese tali, facendole migrare sotto l'influsso di un campo elettrico. Necessita di un generatore di corrente, di un supporto in cui le molecole si muovono e di una soluzione tampone che conduce la corrente. In questa esperienza effettueremo una elettroforesi su supporto (o zonale) in quanto se la effettuassimo in soluzione la diffusione delle molecole impedirebbe la separazione e si avrebbero problemi nel conservare e osservare la migrazione. In questa elettroforesi le particelle si separano in zone o bande in base alla loro densità di carica, dimensioni o forma. Nella elettroforesi orizzontale la deposizione del campione sul supporto può essere fatta ad un'estremità o al centro se si sa già che vi sono molecole (+) e (-). Il supporto, per essere efficiente, deve avere delle caratteristiche specifiche:

- Resistenza per poter essere maneggiato;
- Idrofilicità;
- Assenza di carica propria;
- Stabilità in un'ampia gamma di Ph, forza ionica, temperatura, ...
- Porosità definita per controllare l'effetto setaccio;

In questo caso utilizzeremo come supporto un gel. Il setaccio molecolare costituito dai gel (maglie intrecciate di lunghi polimeri) può cooperare alla separazione di molecole con densità di carica simile ma differenti per grandezza e forma. L'**AGAROSIO** purificato è un polimero del galattosio (ripetizione di unità di agarobiosio) ed è molto usato per la separazione di proteine ad alto PM e soprattutto di acidi nucleici. Non esplica effetto setaccio per le proteine e in base alla purezza non presenta elettroendosmosi (o comunque è molto bassa);

Separazione degli isoenzimi della lattato-deidrogenasi dell'estratto di muscolo scheletrico e di muscolo cardiaco, tramite elettroforesi in condizioni native su gel di agarosio orizzontale

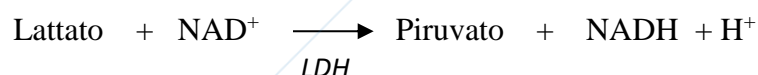
La lattato deidrogenasi è un tetramero formato dall'associazione di 4 catene polipeptidiche. Queste possono essere di tipo M (muscle, prodotte dal muscolo) o di tipo H (heart, prodotte dal cuore). A seconda di come queste catene si associano tra loro, possiamo avere 5 forme isoenzimatiche diverse: H_4 , H_3M , H_2M_2 , HM_3 , M_4 . La presenza di diverse forme isoenzimatiche indica differenze metaboliche tra muscolo e cuore: nel muscolo la lattato DH catalizza la reazione che trasforma il piruvato in lattato e rigenera NAD^+ , nel cuore viene catalizzata la reazione inversa, ovvero la trasformazione di lattato in piruvato.

A) Preparazione del gel di Agarosio 1%

- 1) Pesare 0,2 g di polvere di agarosio;
- 2) Trasferire in becker in vetro e aggiungere 20 ml di tampone Tris-Tricina pH 8,6;
- 3) Sciogliere a caldo;
- 4) Versare nel sistema di lastrine assemblato (senza inserire pettine) e attendere la polimerizzazione.

B) Gel elettroforesi e colorazione

- 1) Trasferire il gel di Agarosio 1% sul supporto in plastica;
- 2) Applicare sul gel la mascherina che presenta le incisioni per caricare i campioni, eliminando le bolle d'aria;
- 3) Applicare 2 ml di estratto di muscolo scheletrico e di muscolo cardiaco di ratto (in tampone RSB/Triton) per ogni fessura ed attendere 10' dalla deposizione dell'ultimo campione, per permettere l'assorbimento dei campioni da parte del gel;
- 4) Eliminare la mascherina;
- 5) Posizionare il gel nella cella per elettroforesi, contenente in totale 120 ml (60 ml per vaschetta) di tampone Tris-Tricina pH 8,6 (Tris 80 mM, litio L-lattato 1 mM, Tricina 25 mM); assicurarsi del corretto orientamento rispetto agli elettrodi;
- 6) Selezionare il voltaggio a 100 Volt ed eseguire l'elettroforesi per 20';
- 7) Ricostituire il substrato LD (L-Lattato 208 mM; NAD⁺ 5,6 mM; NBT 2,4 mM; PMS 0,33 mM) aggiungendo 10 ml di tampone Tris-Tricina pH 8,6 al tubo contenente la polvere; mescolare invertendo gentilmente;
- 8) Dopo l'elettroforesi, le bande corrispondenti agli isoenzimi della LDH presenti nel gel saranno evidenziate per mezzo delle seguenti reazioni:



PMS



LDH = Lattato Deidrogenasi

NBT = p-Nitro Blue Tetrazolio Cloruro

PMS = Fenazina Metilsolfato

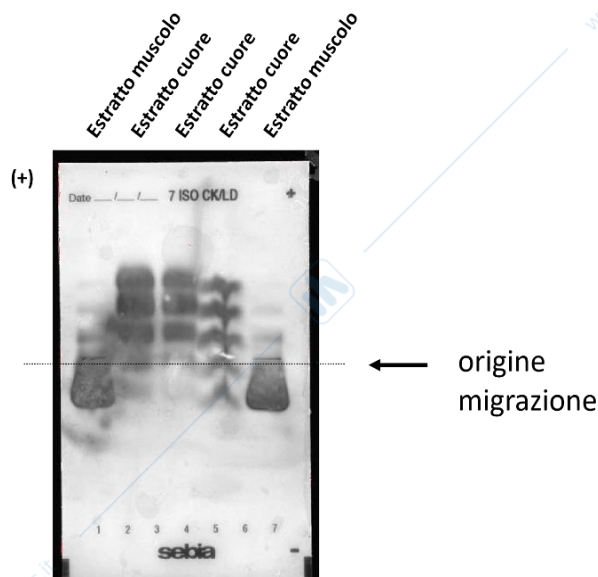
- 9) Trasferire il gel in un contenitore per l'incubazione;
- 10) Per realizzare le reazioni, saturare un foglio di carta assorbente con 3 ml di substrato LD ed appoggiarlo sul gel eliminando le bolle l'aria;
- 11) Avvolgere il contenitore in foglio di alluminio per eliminare la luce e incubare a 45°C per 5-10';
- 12) Rimuovere il foglio di carta assorbente ed, eventualmente, trasferire il gel in acido acetico al 5% per la decolorazione (1 min);
- 13) Essiccare il gel;
- 14) Verificare l'attività relativa delle varie isoforme di LDH.

Le catene di tipo M hanno prevalenza di AA carichi positivamente per cui migrano verso il polo negativo. Le catene di tipo H hanno prevalenza di AA carichi negativamente per cui migrano verso il polo positivo.

Il muscolo ha un'unica banda, il tetramero M_4 perché il muscolo produce esclusivamente le catene di tipo M. Nel cuore invece vi sono tutte le forme isoenzimatiche in quanto esso produce in gran parte catene di tipo H e, in quantità nettamente inferiori, catene di tipo M.

Si nota una forma isoenzimatica, la HM_3 , che si è mossa meno rispetto alle altre forme in quanto presenta un punto isoelettrico molto vicino al pH a cui è avvenuta l'elettroforesi.

Nei laboratori biochimici, a fine esperimento, le striscette vengono seccate e diventano una lastrina che viene passata ad un densitometro. I risultati sono dei picchi che permettono l'analisi delle forme isoenzimatiche e del loro rapporto.



Separazione delle proteine dell'estratto cellulare di muscolo scheletrico e cardiaco tramite Elettroforesi su Gel di PoliAcrilammide contenente SDS

(SDS-PAGE) e determinazione del peso molecolare della GLICERALDEIDE-3P DEIDROGENASI e della TUBULINA

Un altro tipo di gel utilizzato nelle elettroforesi su supporto è la POLIACRILAMMIDE, un polimero sintetico dovuto alla reazione di polimerizzazione tra acrilamide e bisacrilamide in presenza di catalizzatore (TEMED) e iniziatore (APS). E' molto usato per la separazione di proteine e acidi nucleici e non presenta elettroendosmosi. La porosità del gel di poliacrilammide dipende dalla quantità totale e dal rapporto acrilammide/bisacrilammide, che possono essere variati a piacere. Sono molto versatili, altamente riproducibili e la loro porosità può essere prevista e scelta in base ai pesi molecolari delle molecole da separare così da aumentare il potere di risoluzione della elettroforesi. (Il potere di risoluzione è la più piccola differenza di peso molecolare che il gel riesce a discriminare.) Presenta facilità nell'analisi dei risultati sia direttamente, sia dopo colorazione.

Materiale occorrente:

- **Gel di poliacrilammide al 12% in tampone 0,375 M Tris base pH 8,8, 0,1% SDS;**
- **4X upper buffer:** 0,5 M Tris base pH 6,8, 0,4% SDS
- **4X lower buffer:** 1,5 M Tris base pH 8,8, 0,4% SDS
- **Soluzione di acrilammide:bisacrilammide 30:08** (30 g di acrilamide + 0,8 g di bisacrilammide in 100mL);
- Tampone di corsa (25 mM Tris base, 0,19 M glicina, 0,15% SDS);
- Estratto cellulare di muscolo scheletrico e cardiaco;
- Proteine a PM incognito (Gliceraldeide 3-P deidrogenasi e Tubulina);
- Miscela di proteine a PM noto (marker);
- Sample buffer;
- Soluzione colorante e decolorante.

Preparazione del LOWER (Ranning) GEL di poliacrilammide al 12%, in lower- buffer

Acrilammide/bisacrilammide 30:0,8	4 ml
H ₂ O distillata	3,5 ml
4X lower-buffer*	<u>2,5 ml</u>
Vol. Fin.	10,0 ml

In un tubo monouso di plastica aggiungere i volumi calcolati delle soluzioni indicate, mescolare per inversione, aggiungere 24 ml di ammonio persolfato al 25% (APS, iniziatore di reazione) e 16 ml di TEMED (tetrametil etilen diammina, catalizzatore). Mescolare bene e versare nello spazio tra le due lastre di vetro fino a ~ 2 cm dalla sommità; per uniformare il livello del gel, si stratificano ~ 2 ml di isopropanolo, lasciare polimerizzare (circa 45 min) e conservare in frigorifero a 4°C.

* **4X lower buffer:** 1,5 M Tris base pH 8,8, 0,4% SDS

