www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

coggle
made for free at coggle.it

TECNICHE ELETTROFORETICHE

INTRODUZIONE

metodo basato su migrazione di particelle cariche in campo elettrico

hanno applicazione:
- analitica: per determinare caratteristiche di pp (massa e pI)
- preparativa: purificare e valutazione di purificazioni di pp

- effettuata in **cella elettroforetica** con supporto di gel: sistema diviso da soluzione tampone con ioni
- alimentatore che fornisce corrente continua tra elettrodi (anodo e catodo)

principi elettroforesi
- vedi formulario
- molecola in campo elettrico ha mobilità che dipende dal suo rapporto **carica/massa**
  => maggiore rapporto maggiore è mobilità, quindi ioni piccoli con alta carica sono veloci
- campo elettrico (vedi formulario)

supporto-gel
- elimina correnti connettivi e moti di diffusione a fine corsa mantenendo i separati in bande strette
- può avere setaccio molecolare

tampone
- ≠ a seconda del gel
- determina e stabilizza pH del supporto
- influenza velocità di migrazione perchè mantiene costante stato di ionizzazione di molecole
- condiziona in base a molarità: alta aumenta R diminuisce V, bassa campione diffonde facilmente

ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE

- gel agarosio: per acidi nucleici e pp (isoelettrofocalizzazione) polimero lineare di unità di agarobioso, ovvero D-galattosio+3,6-anidro-L-galattosio
- poliacrilammide: sequenziamento DNA e pp (sds-page, in condizioni native, isoelettrofocalizzazione, bidimensionale) gel preparato con copolimerizzazione di acrilammide con agente caos-linker=bis-acrilamide
  con catalisi radicalizza, APS iniziatore e TEMED (tetrametilendiammina) catalizzatore
  % di acrilammide determina porosità gel

caratterizzare pp post elettroforesi 2D
analisi che permettono di ottenere dati di sequenza parziale utilizzando uno dei seguenti metodi:
1. sequenziamento proteico diretto mediante degradazione di Edman
2. profili di masse peptidiche ottenute con le analisi di spettrometria di massa di un digerito proteico (forniscono un'impronta caratteristica della proteina)
3. determinazione di sequenza con la spettrometria di massa

queste informazioni vengono poi confrontate con le informazioni presenti in DATABASE per l'identificazione della macchia proteica stessa
in commercio sono disponibili vari software d'analisi

applicazioni
seguire i cambiamenti nell'espressione di TUTTE le pp espresse da un organismo, da un tessuto o da una cellula per:
- identificare proteine con condizione fisiologica o mutazione
- identificare le modificazioni post-traduzionali di proteine (es. fosforilazioni)
- confrontare un tessuto normale con uno malato
- analizzare gli effetti del trattamento con farmaci o tossine
- studiare cambiamenti nella componente proteica nei diversi stadi del ciclo cellulare o durante l'apoptosi

SDS
seconda dimensione , avviene inserendo tubo di IEF, dopo averlo trattato con SDS e DTT riducente, orizzontalmente direttamente nel running gel con gradiente.
la seconda dimensione è a 90° dalla prima e non richiede stacking gel in quanto campione arrivata già compatto da prima dimensione

ultimo passaggio è isolamento e caratterizzazione di spot (non bande), con diverse colorazioni, da Coomassie a fosforescenza

tecnica risultante di combinazione IEF+SDS-page

IEF
prima dimensione con separazione secondo pI all'interno di un tubo di vetro (oggi strip di ≠ pH che posso far correre in parallelo)
in condizioni:
- native senza aggiunta di SDS
- denaturanti: no SDS perchè mi annulla le cariche, ma posso aggiungere urea

IEF isoelettrofocalizzazione

- separa pp in base a valori di pI: pH=pI ho carica netta pari a zero quindi no mobilità
- con gradiente di pH includendo nel gel anfoliti: acido acetico all'anodo e NaOH al catodo
- quindi gradiente stabilito nella precorsa con anfoliti e carica elettrica
- carico il campione che a seconda della carica netta migra fino a pH del pI (posso caricarlo in qualsiasi punto)

applicazioni
- determino pI di pp
- studio microeterogeneità di pp
- separazione isoenzimi
- diagnostica molecolare (ex. mutanti)
- più efficiente della. natia con riconoscimento di modificazioni posttraduzionale, percepisce anche solo un ponte bisolfuro

ELETTROFORESI IN CONDIZIONI NATIVE

- sistema discontinuo con gel poliacrilammide in condizioni NON denaturanti
- SDS assente in gel e tampone di corsa
- migrazione per Q/m, quindi non per determinare peso molecolare

applicazioni
- rivelazione e identificazione enzima con reazione substrato cromogenico
- purificazione piccole quantità enzimi oligomerici
- studi struttura e funzione di enzimi in forma natia
- studio modificazioni covalenti come ponti bisolfuro, ma ne servono almeno 2

ci sono ≠ rivelatori cromogenici, come Coomassie blu, attività della lattasi o colorazione in negativo con attività ferrossidasica

ELETTROFORESI IN GRAIDENTE

- sia in condizioni natie che SDS-page
- running gel con gradiente di poliacrilammide
- nella natia aiuta per elettroforesi all'equilibrio, quindi a stoppare pp in base alla massa (ma lungo), per massa molecolare di pp oligomeriche native
- permette di separare pp con masse simili

ELETTROFORESI SU AGAROSIO

- per separazione di DNA in quanto lineare e non va bene setaccio molecolare
- a pH neutro DNA negativo e migra verso anodo
- sistema orizzontale
- conc. agarosio 0,5-2 %
- voltaggio variabile, tenendo conto del calore che esso genera
- altre varianti sono: rapporto carica/massa, conformazione DNA, bromuro di etidio

bromuro di etidio
- colorante fluorescente che intercala a DNA post elettroforesi (fino 590 nm)
- in sua assenza: DNA circolare < DNA lineare < DNA superavvolto

preparazione
1. agarosio pesato e sciolto in tampone TAE (tris, acetato, EDTA) mediante bollitura
2. raffreddato a T<50° e versato in apparato di elettroforesi
3. ricavo pozzetti con pettine
4. campioni risospinsi in TAE con glicerolo e xilema cieanolo e blu di bromofenolo (coloranti), per visualizzare la corsa e stopparla
5. vaschetta riempita con tampone e collegata a alimentatore
6. fine corsa gel in etidio bromuro e visualizzato in uv, permette di risaline alla massa di DNA
   https://www.youtube.com/watch?v=vq759wKCCUQ

SDS-PAGE

https://www.youtube.com/watch?v=EDi_n_0NiF4

- page: poliacrilammide gel elettroforesi
- elettroforesi per pp in condizioni denaturanti
- gel di poliacrilammide e SDS, detergente presente in gel, tampone di corsa, tampone del campione (sample buffer)
- separazione secondo dimensioni di catene polipeptidiche
- setaccio molecolare

SDS
- sodium dodecil solfato
- solvente forte con parziale azione denaturante
- presente in tutti il sistema di elettroforesi
- si lega a pp stechimetricamente e ne maschera le cariche, quindi acquisiscono stesso rapporto Q/m, ma le rende distinguibili secondo lunghezza (che riflette la massa) in quando ogni 2 aa si associa un SDS con carica -, quindi più lungo è più è negativo e migra
  => carica negativa proporzionale alle dimensioni

GEL
- sistema discontinuo in due tipologie differenti per pH e porosità

1. **stacking gel**:
   - gel di impaccamento
   - pori grandi per movimento pp
   - ph 6,8
   - 4% acrilammide
   - compito di focalizzare le pp in unica banda compatta
2. **running gel**:
   - gel di corsa
   - dimensioni pori ≠ a seconda di % di acrilammide che va da 6 a 21%
   - pH 8,8
   - gradiente di acrilammide per maggiore risoluzione di soluzioni con pesi molecolari simili
   - separa pp in base al peso molecolare con setaccio

- caricamento: prima creo running gel con gradiente portandolo a volume con H_2O, quindi polimerizzanti ed infine stacking gel evitando le bolle e per avere linea dritta uso alcool e H_2O
  https://www.youtube.com/watch?v=XUjLO-ek2C8

campione
- pp denaturate con SDS in sample buffer a 100° per 3'
- sample buffer contiene:
  - SDS,
  - ßmercaptoetanolo che riduce ponti bisolfuro,
  - blu bromofenolo marcatore (670 Da),
  - glicerolo o saccarosio per appesantire campione

tampone di corsa
- composizione:
  - TRIS: tampona le variazioni di pH e fornisce ioni Cl- che hanno mobilità maggiore
  - glicina: ioni glicinato carichi negativamente con mobilità inferiore a complessi SDS
  - SDS
- isotacoforesi: dove c'è caduta conduttanza si ha accelerazione di migrazione

1. Nel buffer a pH 8,3 Gli carica - quindi migra a v1, con ordine mobilità nello stacking gel Gly<SDScomplex<CL-
2. arrivata a loading buffer e stacking gel pH 6,8 la Gly è quasi neutra ed è speciepiù lenta e Cl- più veloce, quindi il complex è racchiuso e compattato in banda sottile
3. inizio running gel pH8,8 quindi Gly isotacoforesi e supera complex, quindi pp rallentano e si ritrovano compattati al massimo, quindi inizia separazione molecolare per setaccio

coloranti

densitometria
no coloraozione, ma permette stima quantitativa di pp in singole bande mediante densiometro, con scansione ogni picco sono una banda del gel

coomassie blu
- si lega ad alcuni residui Arg, His, Lys, Tyr, Trp, Phe
- limite risoluzione 100 ng
- con acido acetico ed etanolo che denaturano pp e le fissano a supporto
- gel viene colorato per qualche minuto e quindi decolorato con acetico/metanolo, che toglie colorante in eccesso non legato a pp
- colorazione irreversibile
- tempo: 40'
- sempre con colonnina standard

silver staining
- pp ossidate con dicromato di K, Ag+ lega pp ossidate e si converte in Ag metallico colorandole nero-marrone
- fase di incubazione = sviluppo (come fotografia)
- limite risoluzione 0,1 ng
- tempo: 3 h
- più preciso

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari