

martedì 6 ottobre 2020

Tecniche elettroforetiche

Tecniche separative che consentono di identificare diverse classi di componenti

Si basano sul principio di migrazione differenziale in un campo elettrico di molecole cariche

Il campione viene infatti posto tra catodo e anodo.

Elettroforesi zonale:

- orizzontale
- verticale

Le particelle sono cariche: posso avere una carica negativa o positiva.

Tramite elettroforesi si possono separare:

- **acidi nucleici** -> carichi negativamente a causa del gruppo fosfato
- **proteine** -> carica dipende dal pH

Quando tra i due elettrodi si applica una ΔV si genera un gradiente di potenziale elettrico

Forza del campo:

$$F_{\text{elett}} = E q$$

Esiste anche una forza frizionale che agisce in senso opposto:

$$F_{\text{frizionale}} = v f$$

[f=coefficiente frizionale e v= velocità di migrazione]

La velocità di migrazione di una molecola carica $v = (E q)/f$

La **mobilità elettroforetica** (μ) dipende dalla velocità di migrazione

In condizioni stabilite è una caratteristica intrinseca della molecola (come il PM, etc...) quindi non varia!

Elettroforesi

martedì 6 ottobre 2020

$$\mu = v/E = q/f$$

Fattori che influiscono sulla velocità di migrazione:

1. **Il campione:** la natura dei composti carichi influisce sulla velocità

- carica netta -> se una molecola ha carica netta uguale a 0 non si muoverà (non sarà attratta né dal catodo né dall'anodo)
- dimensioni -> le molecole più piccole vanno più veloci
- forma -> a seconda della forma varia la forza di frizionamento: proteine globulari più veloci di quelle fibrose oppure DNA superavvolto, lineare o circolare (DNA superavvolto è quello più compatto e quindi il più veloce, poi viene quello lineare e infine quello circolare)

2. **Campo elettrico**

$$I=V/R$$

$$P= I^2 \cdot R$$

Anche il **calore può cambiare i risultato:** troppo calore può portare ad un'eccessiva diffusione del campione -> non vedo bene il risultato [solitamente esistono dei sistemi di refrigerazione]

3. **Il tampone:** perché può determinare se una molecola migra o non migra (ad esempio nelle proteine). Inoltre ha la **funzione di stabilizzare il pH del campione.**

Quello che conta è:

- Composizione
- Concentrazione: molto importante
- pH: le proteine hanno carica netta che dipende dalle catene aa laterali -> possono essere + o - a diversi pH

4. **Supporto:** generalmente una matrice porosa che spesso funge da "setaccio" -> filtrazione molecolare

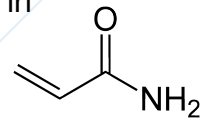
Come gel si utilizza:

- gel d'agarosio: preparazione -> scioglio l'agarosio fino ad ottenere la concentrazione ottimale. La sua concentrazione si esprime in percentuale peso su volume. Significa che se lo voglio all' 1%: 1 g di agarosio su 100 di soluzione.

Elettroforesi

martedì 6 ottobre 2020

- gel di poliacrilammide (page): questi in concentrazione possono variare dal 3% al 30%. La preparazione -> facendo copolimerizzare monomeri di acrilamide con un agente che può stabilire legami crociati (solitamente **N,N'-metilbisacrilamide**) in presenza di un **catalizzatore (ammoniopersolfato)** ed un **iniziatore (TEMED)**



Quello che cambia tra i due gel è la grandezza dei pori: il gel di poliacrilamide ha una maglia molto più stretta del gel di agarosio -> la si userà per molecole piccole

Parametri che determinano la grandezza dei pori di un gel di poliacrilamide:

1. Concentrazione totale dei due monomeri (%T)
2. Rapporto bis-acrilamide/acrilamide totale (%C)

$$\%C = \frac{\text{g (bis-acrilamide)}}{\text{g(acrilamide + bis-acrilamide)}}$$

La scelta della % di acrilamide/bis del gel dipende dalle dimensioni delle proteine che voglio separare (se voglio separare proteine grandi dovrò scegliere una bassa concentrazione).

Gel di poliacrilamide a concentrazione fissa o in gradiente: la concentrazione può essere uguale su tutta la page (**concentrazione fissa**) oppure essere **in gradiente**, cioè pian piano aumentare (in tal caso si scrive per esempio 4-15% oppure 4-20% -> significa che parte da 4 e arriva a 15 o a 20).

Perché utilizzare un gel in gradiente? Se devo analizzare un campione proteico con un range di peso molecolare molto ampio mi conviene utilizzare quello in gradiente in modo tale che avrò una divisione più accurata delle varie proteine (in modo che tutte corrano almeno un po' all'inizio, e che alla fine non scappino tutte quelle piccole ma che comunque continuino a separarsi). Se lo facessi a concentrazione fissa non otterrei una separazione e chiara e accurata.

PAGE = Poliacrilamide Gel Electrophoresis: utilizzata per la separazione di proteine. Si divide in:

Elettroforesi

martedì 6 ottobre 2020

1. **Elettroforesi denaturante (SDS-PAGE)** separazione di proteine preventivamente denaturate con agenti denaturanti (e spesso anche riducenti) ad alta T.

La separazione avviene in base al PM.

Serve per:

- Valutare se la purificazione è andata a buon fine
- Determinare la MM (massa molecolare)
- Determinare la presenza di subunità: mi darà informazioni circa la struttura delle proteine
- Valutazione di variazioni di espressione genica
- Purificazione di proteine denaturate: permette di separare proteine denaturate (che poi possono essere iniettate nell'organismo, in presenza di acrilamide che funziona da adiuvante)

2. **Elettroforesi in condizioni native (native-PAGE)** consiste nella separazione di proteine mantenute in forma nativa -> no agenti denaturanti

La migrazione e quindi la **separazione avviene in base alla forma e alla carica.**

- Rivelazione/identificazione enzimi
- Valutazione presenza forme isoenzimatiche
- Valutazione purezza della conformazione nativa
- Analisi campioni biologici complessi (**siero**)

[Esoenzimi -> proteine la cui funzione è al di fuori della cellula che lo ha prodotto]

SDS-PAGE: separa le proteine in funzione del loro PM.

SDS= Sodio-Dodecil Solfato -> detergente anionico che (in quanto anionico) conferisce una carica netta negativa proporzionale alla massa del polipeptide -> quindi è per questo che si separano in base al PM: **la carica negativa conferita dall'SDS dipende dal PM.**

La sua funzione (dell'SDS) è denaturare le proteine. La funzione denaturante è esplicitata a seguito della rottura di quei legami deboli che caratterizzano la struttura secondaria delle proteine -> questi legami vengono rotti dall'SDS.

Agente denaturante -> SDS

Elettroforesi

martedì 6 ottobre 2020

È anche necessario un **agente riducente**!! Perché SDS non riesce a rompere i legami più forti come i ponti di solfuro (legame covalente) e quelli della struttura quaternaria. Se non aggiungo un agente riducente non riesco a conferire una carica proporzionale!!

Agenti riducenti: β -mercaptoetanolo e Ditiotreitolo (DTT)

In base al numero delle bande che ottengo posso definire se una proteina è costituita da un determinato numero di subunità.

Attenzione: l'agente riducente non rompe tutti i legami covalenti ma soltanto i ponti solfuro, altrimenti distruggerebbe completamente la proteina!

Possibile domanda d'esame: analizzare una proteina X con tecnica elettroforetica e bisogna dire quali risultati ottengo. Devo sapere la funzione dell'agente riducente (rompere i legami più forti in modo da permettere all'SDS di conferire una carica proporzionale)

SDS-PAGE

Separazione delle proteine in base alle loro dimensioni

Domanda d'esame: cos'è SDS-PAGE?

Separazione di proteine su gel di poliacrilamide in condizioni denaturanti utilizzando SDS-PAGE.

Separa le proteine solo in base al PM perché la presenza dell'agente denaturante denatura le proteine e conferisce una carica negativa proporzionale alle loro dimensioni (PM) -> quindi nella successiva elettroforesi le proteine correranno di più o di meno a seconda delle dimensioni.

Serve un **agente denaturante** (rottura legami deboli) e un **agente riducente** (per rompere i ponti disolfuro)

SDS: detergente denaturante anionico che conferisce una carica - costante per unità di massa.

Agenti riducenti: β -mercaptoetanolo o DTT

Notiamo una differenza se usiamo solo SDS o se aggiungiamo l'agente riducente: senza l'agente riducente SDS non riesce a legarsi in maniera costante per unità di massa (quindi non conferisce carica proporzionale) -> grazie all'aggiunta dell'agente riducente possiamo capire se una proteina è formata da più di una subunità (subunità

Elettroforesi

martedì 6 ottobre 2020

sono legate da ponti disolfuro) e quindi avere informazioni circa la struttura quaternaria.

Come in qualsiasi elettroforesi bisogna aggiungere:

- **ammoniopersolfato (catalizzatore)**
- **TEMED (iniziatore)**

Sistema discontinuo di Laemmli (1970):

Utilizza 2 gel (entrambi contenenti **SDS**):

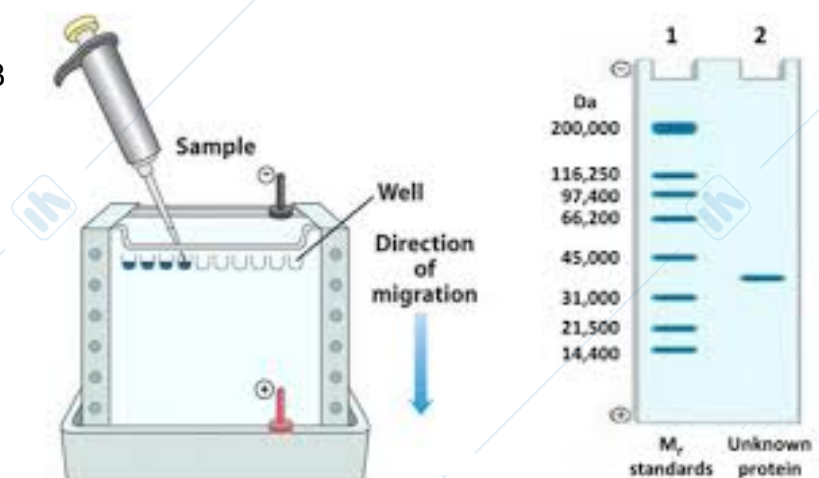
- **stacking gel** (gel di impaccamento) -> concentrazione acrilammide/bis del 3-4% (non funge da setaccio molecolare!)
- **running gel** (gel di separazione) -> deve sceglierlo in base da ottimizzare la separazione delle proteine. Per prepararlo si utilizza acrilammide. Lo preparo su due piastrine. Concentrazione acrilammide/bis del 7-15%

SDS-PAGE: **alto potere risolutivo** (tuttavia non il migliore)

Differenze tra i due gel: lo stacking gel ha una minor forza ionica e non ha funzione di setaccio (non ostacola la migrazione di proteine!). Anche il tampone (quindi il pH) dei due gel è diverso.

Tecnica di SDS-PAGE:

- Preparo il gel
- Preparo il tampone di corsa (running buffer) -> utilizza la glicina (acido debole); pH=8.3
- Caricamento campioni denaturati nei pozzetti (le proteine devono essere denaturate quindi vengono mescolate ad un tampone di denaturazione)
- Tampone di denaturazione (**SDS-sample buffer**):
contiene SDS, **glicerolo** (serve



Elettroforesi

martedì 6 ottobre 2020

perché rende più densa la soluzione e quindi facilita il caricamento), Tris-HCl, blu di bromofenolo (colorante che serve a capire quando fermare l'elettroforesi)

[Coloranti: piccole molecole anioniche -> essendo molto piccole sono anche le più veloci -> quando lo vedo arrivare alla fine significa che devo fermare tutto altrimenti usciranno le proteine]

- Si fa partire l'elettroforesi: le proteine sono posizionate vicino al catodo (-) e si muovono verso l'anodo (+) [le proteine hanno carica negativa conferita da SDS]

L'elettroforesi quindi termina quando vedo arrivare il fronte (il blu di bromotimolo).

Alla fine di un'elettroforesi si procede dunque con delle **colorazioni** (per capire se ho separato le proteine) -> il gel viene processato per rilevare polipeptidi, solitamente usando **Comassie Brilliant Blue** oppure **Silver staining**

Altre colorazioni dette *specifiche*, altrimenti si possono marcare le proteine con isotopi e procedere con una **autoradiografia** oppure fare una **colorazione in fluorescenza**.

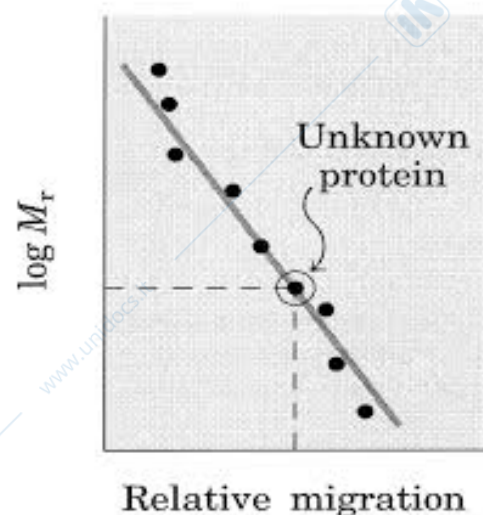
Caratteristiche SDS-PAGE:

- SDS-PAGE ha un buonissimo potere risolutivo ma non è il migliore: le bande mi fanno capire quali proteine pesano di più e quali uguali ma non mi dice nulla sulla loro composizione amminoacidica (potrebbero esserci due proteine diverse che pesano uguale)
- SDS-PAGE permette una buona **analisi qualitativa** e anche **quantitativa** (permette di capire anche quanta proteina c'è in termini relativi)

Come si può determinare il peso molecolare delle proteine una volta separata con SDS-PAGE?

Bisogna caricare insieme alle proteine in analisi, uno *standard* di proteine note e fare una curva di calibrazione sulla base della migrazione elettroforetica degli standard.

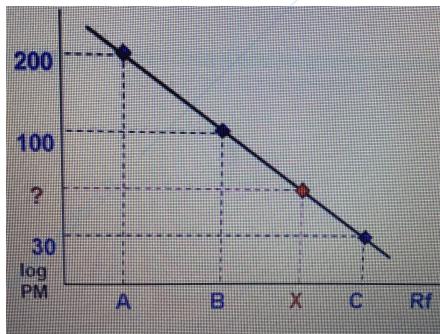
La M_r (massa molecolare relativa) si determina confrontando la sua mobilità con quelle di proteine **standard** delle quali si conosce la M_r separate sullo stesso gel.



martedì 6 ottobre 2020

Costruzione grafico.

Calcolo la mobilità relativa (oppure la distanza di migrazione, ma la mobilità relativa è più accurata) e costruiamo una curva di calibrazione: mobilità relativa della proteina a PM incognito confrontata con la curva di calibrazione mi fa capire il PM della proteina. Nella curva di calibrazione ho la mobilità relativa sulle x e il logaritmo della MM (massa molecolare) sulle y.



Mobilità relativa: rapporto tra distanza di migrazione della proteina e distanza di migrazione del fronte (il bromofenolo)

Oggi abbiamo sistemi di documentazione e analisi del gel: dei software dedicati permettono di fare valutazioni **quantitative**. La curva di calibrazione deve dirti il range dinamico di **linearità** del campione (tra segnale e campione)

Devo sempre avere dei sistemi di controllo che stabiliscono la finestra di valori in cui posso operare -> rischio la saturazione se non lo faccio.

Isoelettrofocalizzazione (IEF)

Proteine separate in base al loro punto isoelettrico

Significa che non si deve denaturare con SDS!

L'SDS infatti conferisce una carica che non è quella intrinseca della proteina -> voglio separare sulla base della loro carica intrinseca!

Le proteine vengono denaturate in urea (che non altera la carica della proteina!)

Su gel di poliacrilamide o gel di agarosio a bassa concentrazione -> il gel NON funge da setaccio!

Il gel deve aver preconstituito un **gradiente stabile di pH** che **permette di determinare il punto isoelettrico delle proteine.**

[differenza con le normali tecniche elettroforetiche: nelle tecniche elettroforetiche standard il pH ha un valore stabilito non un gradiente!]

Elettroforesi

martedì 6 ottobre 2020

Aggiungo le anfoline (molecole polianioniche e policationiche derivate della poliacrilammide) al gel. A seconda delle anfoline scelte viene precostituito il gradiente di pH.

Altrimenti posso anche usare delle strisce su cui vi sono le immobiline (supporti con gradiente di pH immobilizzato). Si chiamano *immobiline dry strips*.

Applicando il campo elettrico le proteine migrano secondo la loro carica e si fermano in corrispondenza del punto isoelettrico (valore di pH a cui la carica netta 0). Nel momento in cui la proteina ha una carica netta 0 si ferma la sua migrazione (non è più attratta).

Si può caricare una miscela contenente proteine con pt isoelettrico noto: così posso costruire un grafico.

Si tratta di una tecnica ad **alto potere risolutivo**.

Serve anche per capire se ci sono proteine mutate -> la mutazione anche di un solo amminoacido cambia la carica netta della proteina e quindi il suo punto isoelettrico.

Elettroforesi 2-D PAGE

Combina separazione proteine in base al punto isoelettrico (1^a dimensione) e separazione in base all'MM (2^a dimensione)

Tecnica analitica con il più elevato potere risolutivo per la separazione delle proteine: combina IEF con SDS-PAGE.

IEF: prima dimensione -> proteine separate sulla base della loro carica intrinseca

SDS-PAGE: seconda dimensione -> proteine separate sulla base delle dimensioni

L'analisi 2D richiede l'utilizzo di software per lo scanner del gel e per processare i dati dell'immagine. Questi software processano l'immagine e la comparano con quella di altri gel permettendo l'identificazione di singole proteine.

Ha permesso di definire tutto il proteoma. Vengono risolte tutte le proteine presenti in un organismo perché vengono distinte sia per punto isoelettrico sia per peso molecolare.

Permette di separare e caratterizzare una singola proteina.

Elettroforesi