



Università degli Studi
della Basilicata

TECNICHE ELETTROFORETICHE



DEFINIZIONE DI ELETTROFORESI

Composto da *elettrico* [voce del lat. scientifico ("electricus è attribuito a W. Gilbert, autore del De Magnete, 1600), (gr. elektron, ambra)] + *foresi* dal gr. *phoresis*, 'trasporto'.

...UN CENNO STORICO

La prima metodica elettroforetica è stata messa a punto, nel 1937, da *Arne Tiselius*, un pioniere in questo campo, premio Nobel nel 1948, ed è stata definita *elettroforesi in fase libera*

PRINCIPIO DELL' ELETTROFORESI

Migrazione, attraverso un mezzo liquido e/o solido, e sotto l'impulso di un campo elettrico, di particelle dotate di cariche, ioni o polielettroliti



- ❖ Molte molecole di interesse biologico (aa, peptidi, proteine, DNA RNA) possiedono gruppi ionizzabili e, quindi, ad un opportuno valore di pH, sono presenti in soluzione come **specie elettricamente cariche**
- ❖ Sotto l'influenza di un campo elettrico queste molecole cariche migrano verso il catodo o l'anodo, a seconda che possiedano una carica positiva (cationi) o negativa (anioni)
- ❖ Si distinguono, in generale, **metodi frontali**, in cui la separazione avviene in soluzione libera, e **metodi zonali**, che si avvalgono dell'utilizzo di mezzi solidi, porosi ed inerti, come carta, gel o acetato di cellulosa.

Tabella 6.2 Gruppi ionizzabili presenti nelle proteine

Gruppo aminoacidico	Ionizzazione dipendente dal pH	pK _a approssimativo
α-aminico N-terminale	$-\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons \text{NH}_2 + \text{H}^+$	8.0
α-carbossilico C-terminale	$-\text{COOH} \rightleftharpoons \text{COO}^- + \text{H}^+$	3.0
β-carbossilico (Asp)	$-\text{CH}_2\text{COOH} \rightleftharpoons \text{CH}_2\text{COO}^- + \text{H}^+$	3.9
γ-carbossilico (Glu)	$-(\text{CH}_2)_2\text{COOH} \rightleftharpoons (\text{CH}_2)_2\text{COO}^- + \text{H}^+$	4.1
imidazolico (His)	$-\text{CH}_2 \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{HN}^+ \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} \rightleftharpoons -\text{CH}_2 \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{N} \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} + \text{H}^+$	6.0
sulfidrilico (Cys)	$-\text{CH}_2\text{SH} \rightleftharpoons -\text{CH}_2\text{S}^- + \text{H}^+$	8.4
fenolico (Tyr)	$\text{C}_6\text{H}_4\text{OH} \rightleftharpoons \text{C}_6\text{H}_4\text{O}^- + \text{H}^+$	10.1
ε-aminico (Lys)	$-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons -(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2 + \text{H}^+$	10.3
guanidinico (Arg)	$-\text{NH}-\underset{\text{NH}_2^+}{\text{C}}-\text{NH}_2 \rightleftharpoons -\text{NH}-\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}-\text{NH}_2 + \text{H}^+$	12.5

Ionizzazione delle proteine

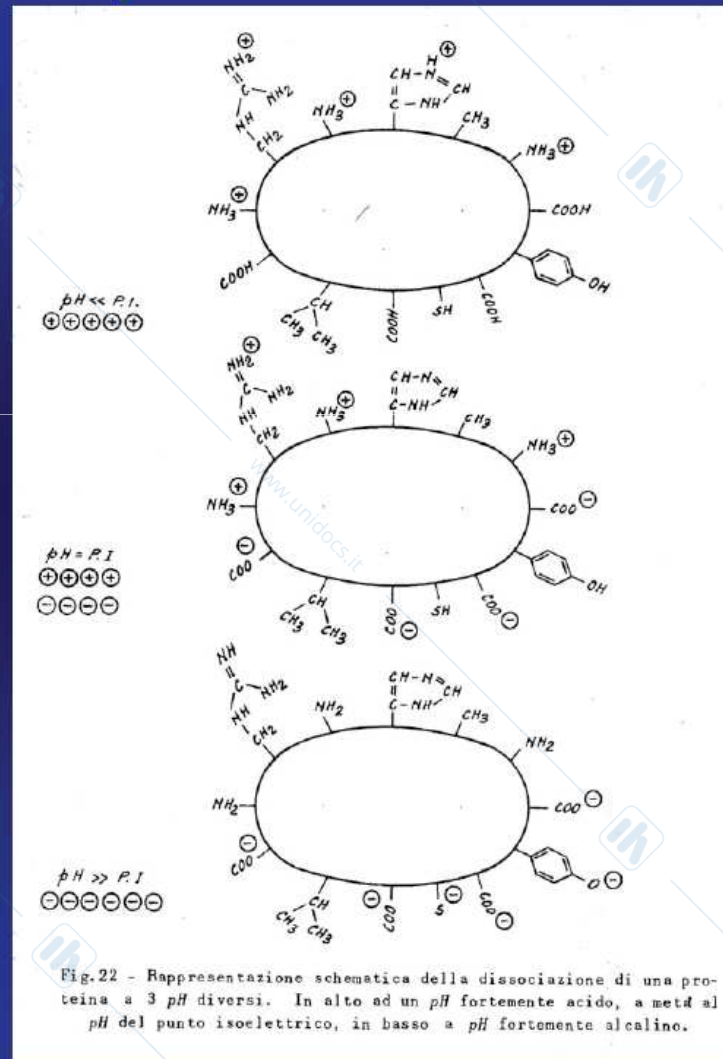
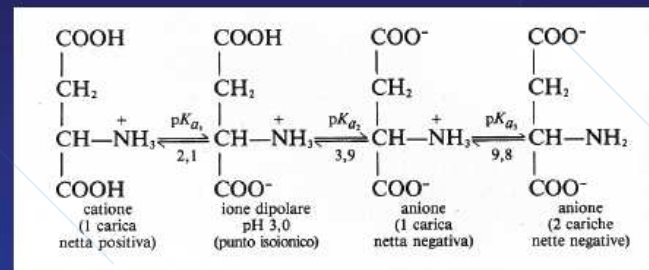
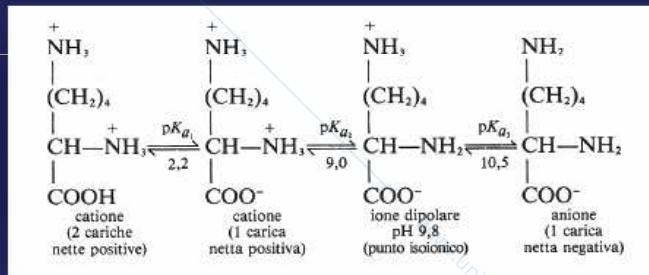
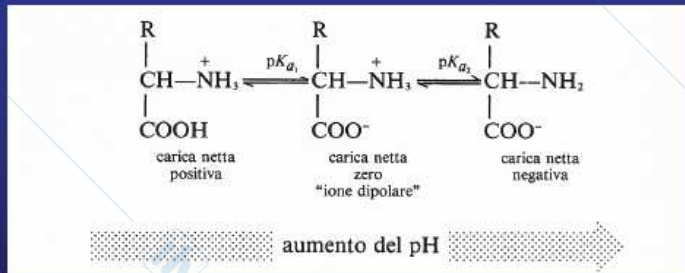


Fig. 22 - Rappresentazione schematica della dissociazione di una proteina a 3 pH diversi. In alto ad un pH fortemente acido, a metà al pH del punto isoelettrico, in basso a pH fortemente alcalino.



Parametri chiave

- ❖ L'elettroforesi è, dunque, il processo per cui molecole cariche si separano in un campo elettrico a causa delle loro diverse mobilità
- ❖ I **fattori** che influenzano la mobilità di una molecola in un campo elettrico comprendono :
 - la carica della molecola (**q**) (Coulomb)
 - il gradiente di potenziale del campo elettrico (**E**), dato dalla ddp tra i due elettrodi diviso la distanza in cm tra gli stessi ($V \cdot cm^{-1}$)
 - la resistenza di attrito del mezzo di supporto (**f**)
- ❖ Il prodotto dei parametri E e q ($E \times q$) fornisce la **forza**, misurata in Newton, che spinge una molecola di carica q verso un elettrodo di carica opposta



- ❖ La forza frizionale (f), che rallenta il movimento della molecola carica, dipende dalle dimensioni della molecola, dalla sua forma, dalle dimensioni dei pori del mezzo nel quale avviene l'elettroforesi e dalla viscosità del tampone
- ❖ La velocità (v) di una molecola carica che si sposta in un campo elettrico è data, dunque, dalla seguente equazione:

$$v = \frac{E \cdot q}{f}$$

- ❖ Da tale equazione si evince che, a parità di tutte le altre condizioni, cioè E ed f , la velocità di migrazione di una particella in un campo elettrico **dipenderà dalla sua carica elettrica q .**


Mobilità elettroforetica

Comunemente, non si fa riferimento alla velocità di migrazione di una particella nel campo elettrico, ma alla sua **mobilità elettroforetica**, indicata con μ e pari a :

$$\mu = \frac{v}{E}$$

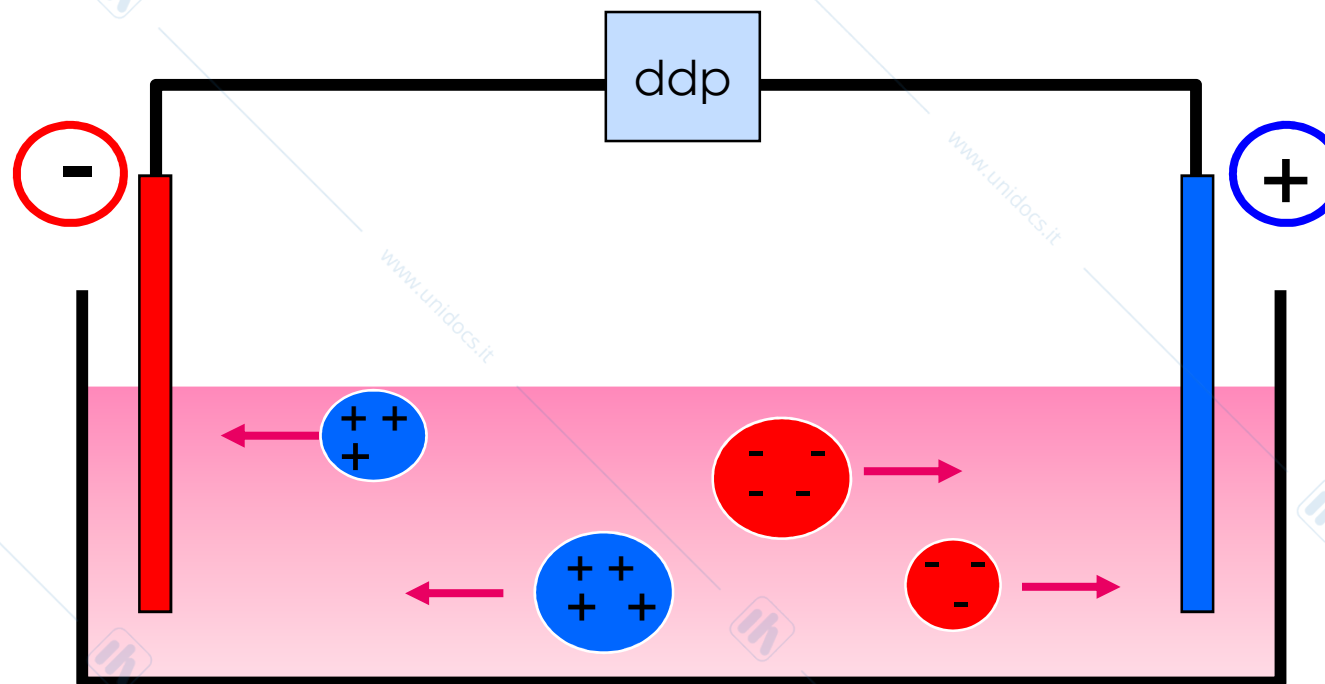
$$(\mu = \frac{\text{cm}}{\text{sec}} / \frac{\text{V}}{\text{cm}} = \frac{\text{cm}^2}{\text{sec} \cdot \text{V}} = \text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{V}^{-1})$$

definita come la velocità, in cm/sec, in un campo elettrico unitario:


$$\mu = \frac{q}{f}$$

Quindi, la mobilità è indipendente dal campo elettrico, ma dipende (a parità di altre condizioni) dalla struttura intrinseca della molecola (carica, dimensioni, forma, PM)

Quindi, la migrazione è DIRETTAMENTE proporzionale alla carica netta di una molecola, (che dipende dal proprio punto isoelettrico e dal pH del mezzo), ed INVERSAMENTE proporzionale alle dimensioni



ELETTROFORESI ZONALE

- ❖ Le particelle migrano e si separano, fra i pori di un **supporto solido inerte**, in base alla diversa mobilità e si raggruppano in zone ristrette;
- ❖ Supporti utilizzati:
 - su carta (non più in uso)
 - su acetato di cellulosa
 - su gel di agarosio
 - su gel di poliacrilammide

} inerti

} setacci molecolari
- ❖ Monodimensionale o bidimensionale;
- ❖ Su colonna, capillare, continua, preparativa: necessitano di apparecchiature particolari.



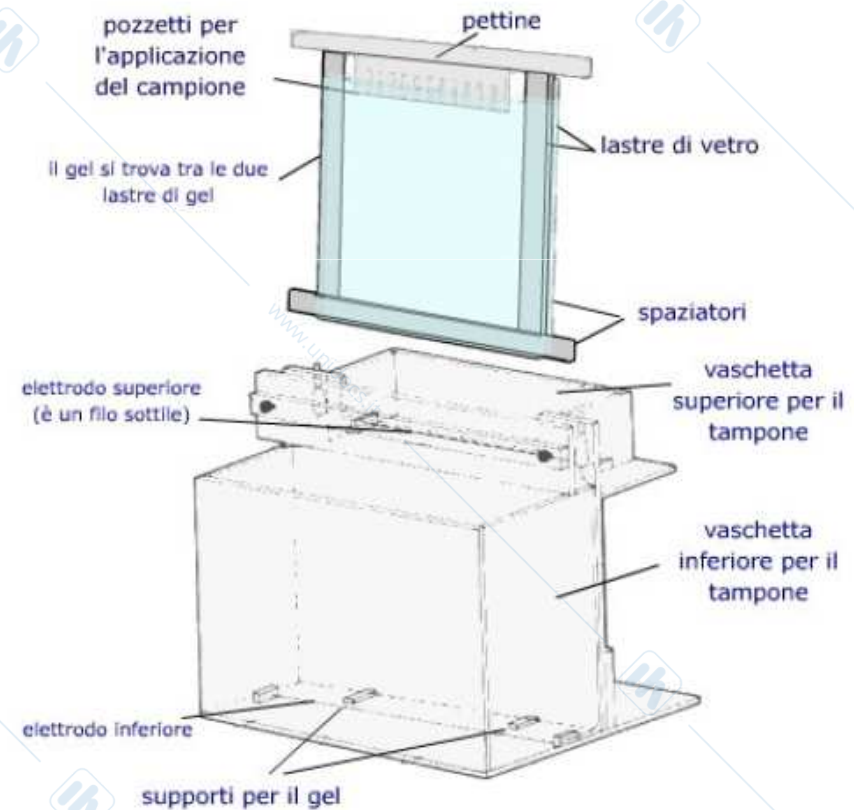
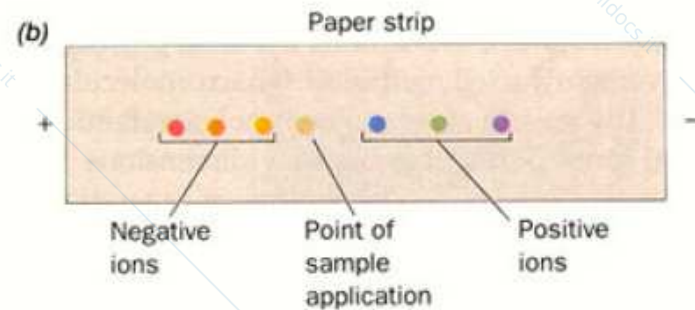
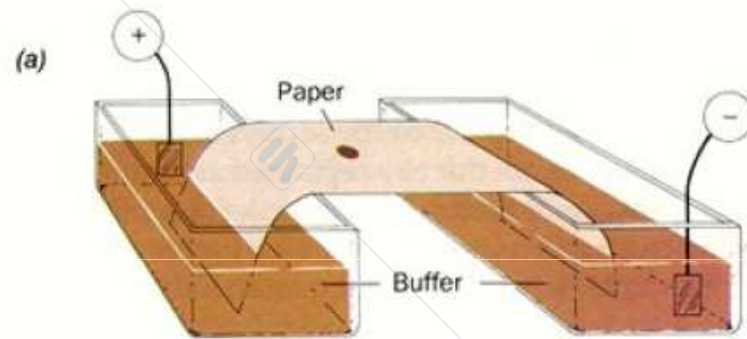
APPARECCHIATURA

- ❖ Un **alimentatore** con potenza fino a 3000 V;
- ❖ Una **cella** o vaschetta per elettroforesi:
 - ✓ a sviluppo orizzontale
 - ✓ a sviluppo verticale
- ❖ Una **soluzione tampone** opportuna;
- ❖ Una soluzione per la **colorazione** delle zone;
- ❖ Un **indicatore di corsa** (ad es. blu di bromofenolo);
- ❖ Eventualmente:
 - ✓ Un apparato per la preparazione del gel
 - ✓ Un apparato per la lettura e la quantificazione (densitometro)

Il supporto deve essere sempre in contatto col tampone di corsa

Questo nell'**elettroforesi orizzontale** può essere fatto con ponti costituiti da carta da filtro o garza (a meno che il supporto del campione non sia già la carta).

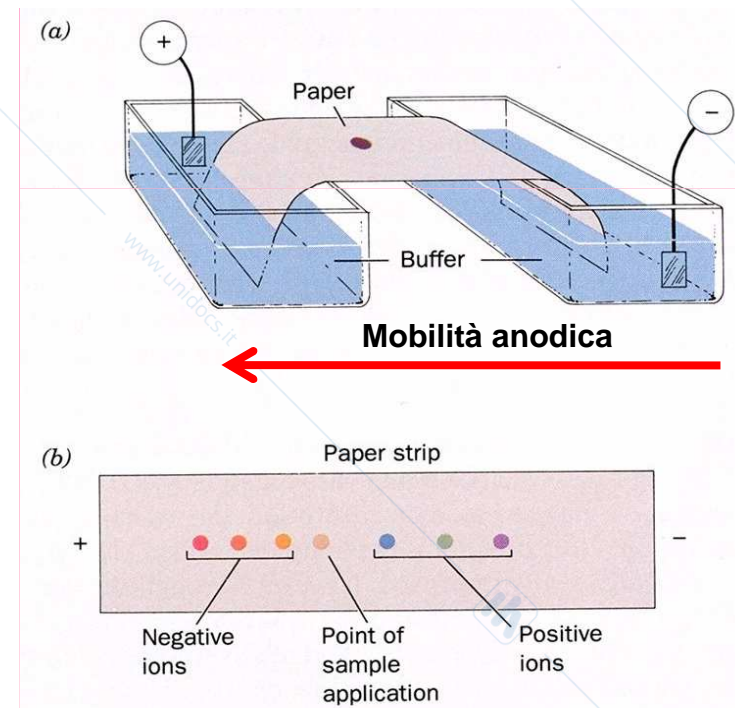
In alternativa, in un **sistema verticale**, si immerge direttamente il gel nel tampone in modo da permettere direttamente il passaggio di corrente attraverso il gel.



ELETTROFORESI SU ACETATO DI CELLULOSA

- ❖ Usata in analisi cliniche di routine:
 - ✓ **proteine sieriche**
 - ✓ lipoproteine
 - ✓ ricerca di immunoglobuline anomali

- Tampone veronal-acetato pH 8.7
- Corsa: 200 V per 30 min
- Fissaggio: TCA 10%
- Colorazione: Rosso Ponceau o Amido Black 0.5% per 10-20 min

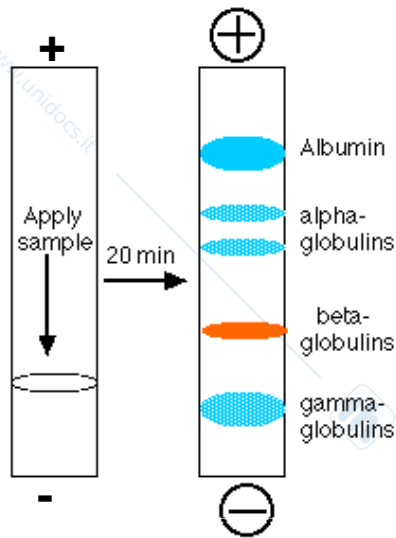




- ❖ Le proteine totali nel sangue si possono dosare sia su plasma che su siero (per il plasma, la proteinemia totale è più alta del 3-5% per la presenza del fibrinogeno);
- ❖ Variabilità legata all'età ed al sesso, all'attività fisica, alla postura, ai ritmi cronobiologici;
- ❖ Le plasmaproteine vengono sintetizzate principalmente dal fegato, in particolare l'albumina, il fibrinogeno e le globuline, ad eccezione delle immunoglobuline che vengono prodotte dal sistema immunitario (plasmacellule). Contribuiscono alla sintesi anche l'intestino per le lipoproteine ed il sistema monocito/macrofagico per alcuni fattori del complemento;
- ❖ I **livelli plasmatici fisiologici** dipendono dalla sintesi, dal catabolismo, dalla diminuzione delle proteine nei vari compartimenti corporei e da perdite esterne;
- ❖ Il **metabolismo delle proteine** è rapido ed intenso: viene giornalmente rinnovato, in condizioni fisiologiche, il 9% di tutte le proteine sintetizzate dal fegato ed il 10-25% di quelle circolanti.



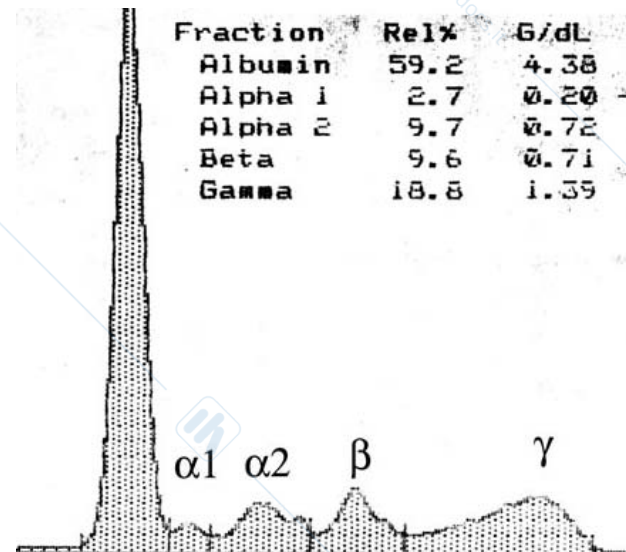
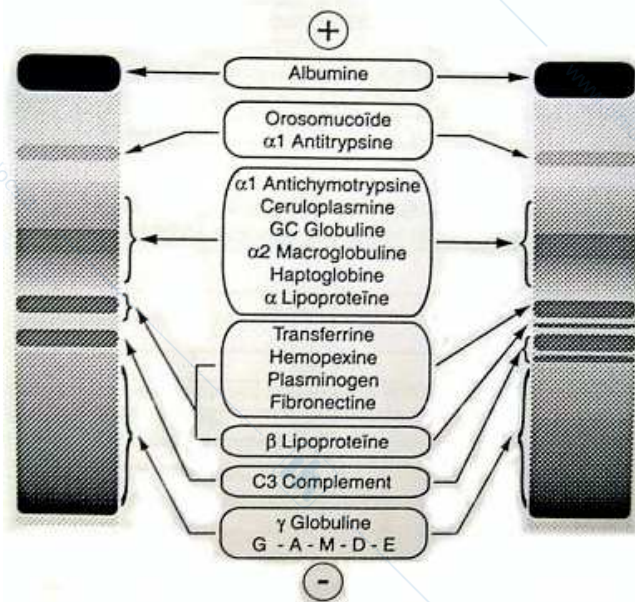
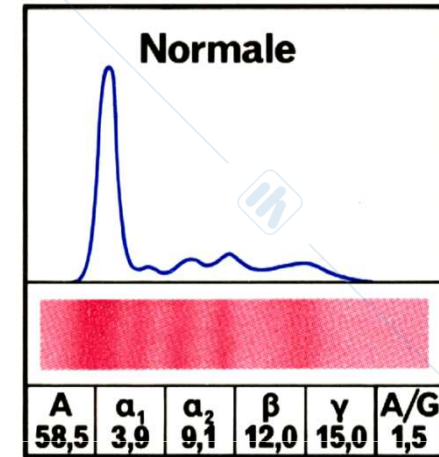
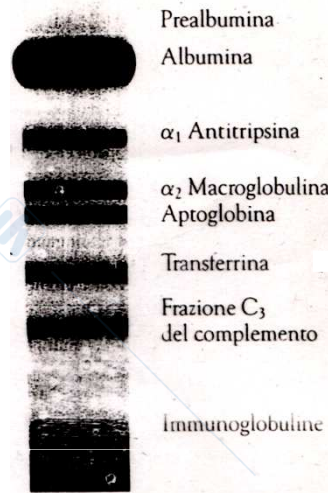
Elettroforesi su acetato di cellulosa



Separating serum proteins by electrophoresis



mobilità anodica



Valori normali (%):

Albumina : 52 – 68

Alpha 1 : 2,4 – 5,3

Alpha 2 : 6,6 – 13,5

Beta : 8,5 – 14,5

Gamma : 10,7 – 21

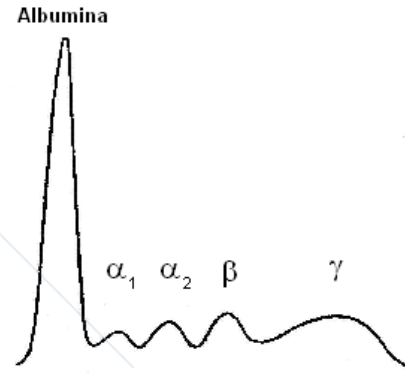


PARAMETRI NORMALI

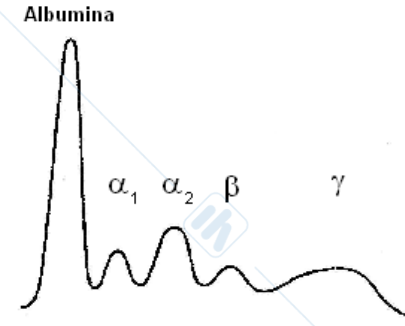
Banda prealbumina	prealbumina	
BANDA A	Albumina	55-66%
BANDA α_1	α_1 Antitripsina (lipoproteine HDL, fetoproteina ⁴ antichimotripsina, glicoproteina acida)	4-8 %
BANDA α_2	α_2 Macroglobulina (anodica) aptoglobina (catodica) (ceruloplasmina)	5-10%
BANDA β	(β_1) transferrina (anodica) (β_1 -lipoproteine (LDL) (β_2) C3 complemento (catodica) (emopessina, β_2 -microglobulina)	8-14%
BANDA γ	Immunoglobuline	9-18%



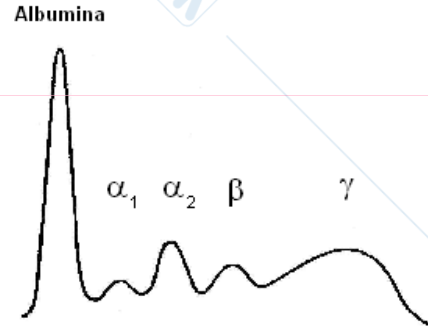
Elettroforesi su acetato di cellulosa



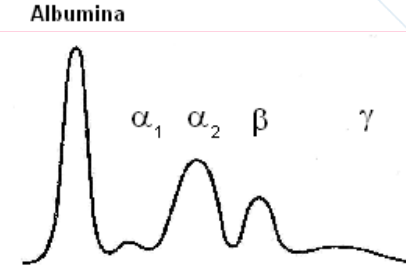
Tracciato normale



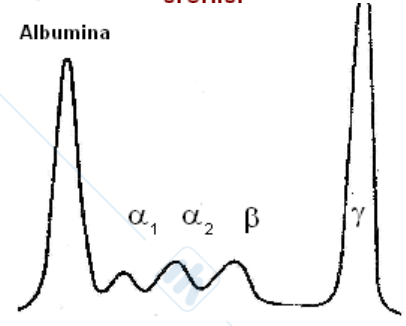
Processi infiammatori acuti



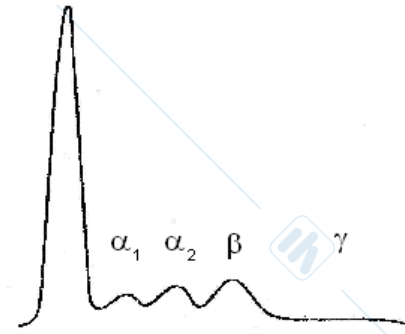
Processi infiammatori cronici



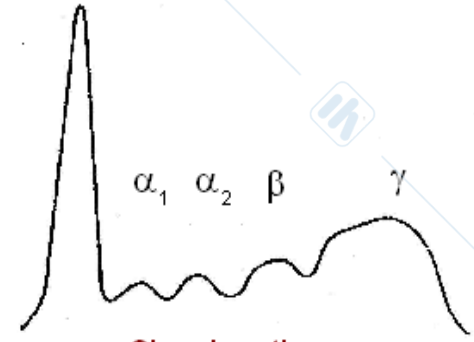
Sindrome nefrosica



Gammopatia monoclonale



Ipogammaglobulinemia



Cirrosi epatica

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

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



PREALBUMINA

- ❖ E' la banda più anodica;
- ❖ E' di sintesi epatica;
- ❖ PM 54-61 kDa;
- ❖ Struttura tetrameric;
- ❖ Possiede un sito di legame per la tiroxina;
- ❖ Emivita di 2 giorni;
- ❖ Si riduce nelle epatopatie, nelle reazioni infiammatorie e nella denutrizione;
- ❖ Aumenta nella nefrosi;
- ❖ Valori di riferimento: 10-40 mg/dl.

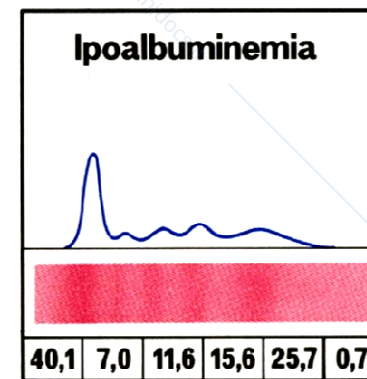


ALBUMINA

- ❖ PM circa 66 kDa;
- ❖ Singola catena polipeptidica e struttura secondaria stabilizzata da ponti disolfuro;
- ❖ Emivita 20 giorni;
- ❖ E' la proteina plasmatica **maggiormente responsabile della pressione colloidale del sangue** (80%);
- ❖ Proteina di trasporto a bassa specificità ed affinità: metalli sostanze fisiologiche (ormoni, vitamine, bilirubina, ac. grassi), farmaci;
- ❖ Una diminuzione della sintesi può essere causata da processi infiammatori, da malattie croniche ed acute del fegato; da fattori tossici endogeni ed esogeni; da malnutrizione e malassorbimento; un suo aumento potrebbe indicare una situazione di DISIDRATAZIONE;
- ❖ Concentrazione plasmatica: 35-55 g/l.

IPOALBUMINEMIA (<32 g/l)

- ❖ Perdita (nefrite, ustioni, dermatiti, attraverso il tubo digerente);
- ❖ Apporto inadeguato (stati tumorali, vomito, malassorbimento, fistole intestinali, coliti ulcerose, enteriti, etc.);
- ❖ Diminuita sintesi (malattie epatiche croniche);
- ❖ Aumento del catabolismo (ipertiroidismo, diabete scompensato, traumi, malattie febbrili prolungate);
- ❖ Situazioni fisiologiche (gravidenza, lattazione);
- ❖ Cause aspecifiche (diluizioni, clinostatismo).



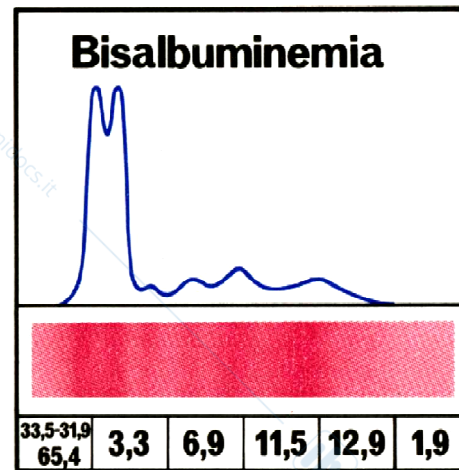
IPERALBUMINEMIE

- ❖ Fenomeno molto raro dovuto principalmente a disidratazione.



BISALBUMINEMIA

Varianti genetiche dell'albumina visibili per la presenza di due bande, una con la stessa mobilità dell'albumina normale, l'altra con mobilità anodica (variante fast) o più catodica (variante slow) negli stati eterozigoti. Al densitogramma la bisalbuminemia appare come un picco bicuspidato.





α_1 -ANTITRIPSINA

- ❖ Glicoproteina sintetizzata nel fegato, è un inibitore delle serin-proteasi;
- ❖ L'Alfa1-Antitripsina, sebbene prodotta dal fegato, esplica il suo principale effetto protettivo a livello dei polmoni;
- ❖ Agisce come inibitore della tripsina pancreaticca, della chimotripsina, della trombina, della proteina C attivata, dei fattori XI e XIII;
- ❖ Inibitore delle proteasi sieriche extracellulari (collagenasi, elastasi) liberate localmente in corso di processi infiammatori.



α_2 --MACROGLOBULINA

- ❖ Glicoproteina sintetizzata dal fegato. Inibitore di proteasi, ma aspecifico;
- ❖ Agisce solamente nel sangue e non nei tessuti a causa delle sue grosse dimensioni;
- ❖ Modulatore dell'attività delle citochine;
- ❖ Aumenta fisiologicamente nel 3° trimestre della gravidanza, nell'infanzia e nell'età avanzata;
- ❖ Aumenti patologici si hanno nell'infiammazione acuta, nelle epatopatie, nel diabete.



α_2 - APTOGLOBINA

- ❖ Glicoproteina capace di legare (in modo forte ed irreversibile) l'emoglobina libera nel plasma: il complesso così formato è rapidamente intercettato ed eliminato dalle cellule del SRE;
- ❖ Diminuisce in tutti i casi di emolisi intravascolare, per difetto di sintesi, per riduzione del numero di epatociti (anaptoglobinemia). Può diminuire anche in seguito a sport prolungati, che comportano distruzione di eritrociti.



TRANSFERRINA

- ❖ Glicoproteina di sintesi epatica, PM 76 kDa, lega 2 atomi di Fe^{3+} ed è deputata al trasporto dalla sede di assorbimento alla sede di sintesi o di deposito;
- ❖ Aumenta negli stati ferro-carenziali, in gravidanza;
- ❖ Diminuisce nelle anemie delle malattie croniche e nelle epatopatie;
- ❖ Valori di riferimento: 200-320 mg/dl.



Zona γ

E' costituita dalle diverse classi delle **immunoglobuline**, prodotte in seguito a infiammazioni croniche e in risposta ad agenti batterici, micotici, virali e parassitari. A causa della loro eterogeneità, le immunoglobuline si estendono dalla regione β a quella γ e talvolta occupano anche la zona α .

Le Ig sono l'espressione dell'attività secretoria di diversi cloni plasmacellulari

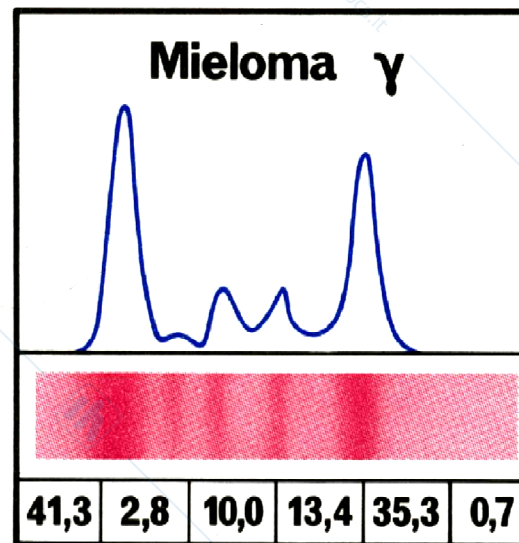
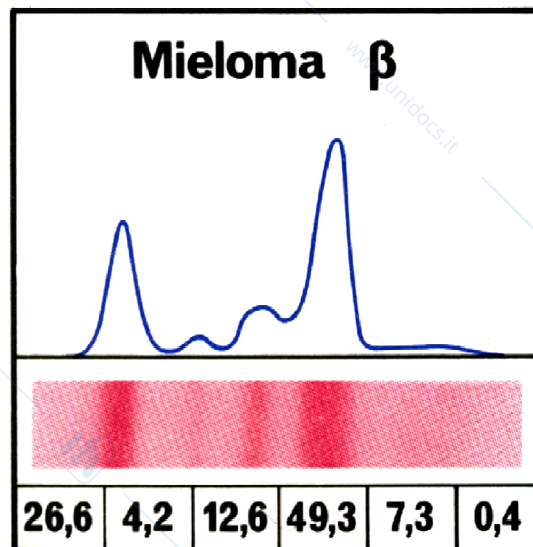
In ordine di frequenza nel siero si hanno: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE

Gli aumenti in altezza della curva delle gamma globuline (o la comparsa di picchi), dipendono da un'aumentata produzione di immunoglobuline:

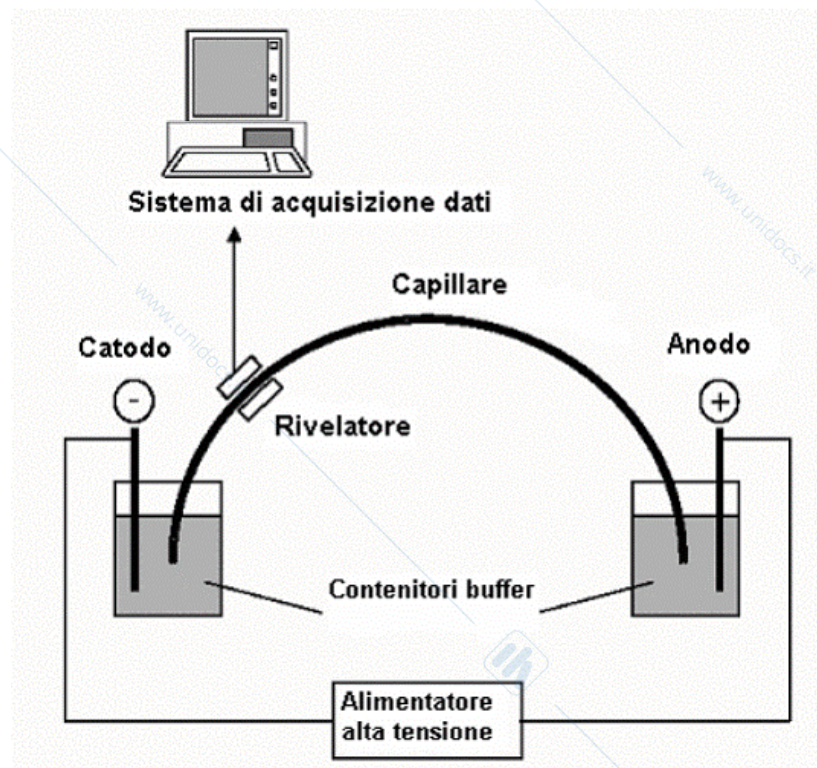
- ✓ **L'aumento policlonale** di una classe di Ig si manifesta come un incremento di colore in zona β - γ
- ✓ **La presenza di una componente monoclonale** si evidenzia con la comparsa in zona α - γ di un picco estremamente alto, con base molto stretta, che rispecchia una produzione anticorpale massiva di un unico tipo di anticorpo

Una loro aumentata sintesi può essere dovuta a tumori a carico delle cellule linfoidi (linfociti B e plasmacellule), quali leucemie, linfomi, mielomi e plasmocitomi extramidollari. La diminuzione, oltre che per condizioni da perdita (vedi albumina), può dipendere da ipoplasie o aplasie linfoidi (ereditarie o acquisite).

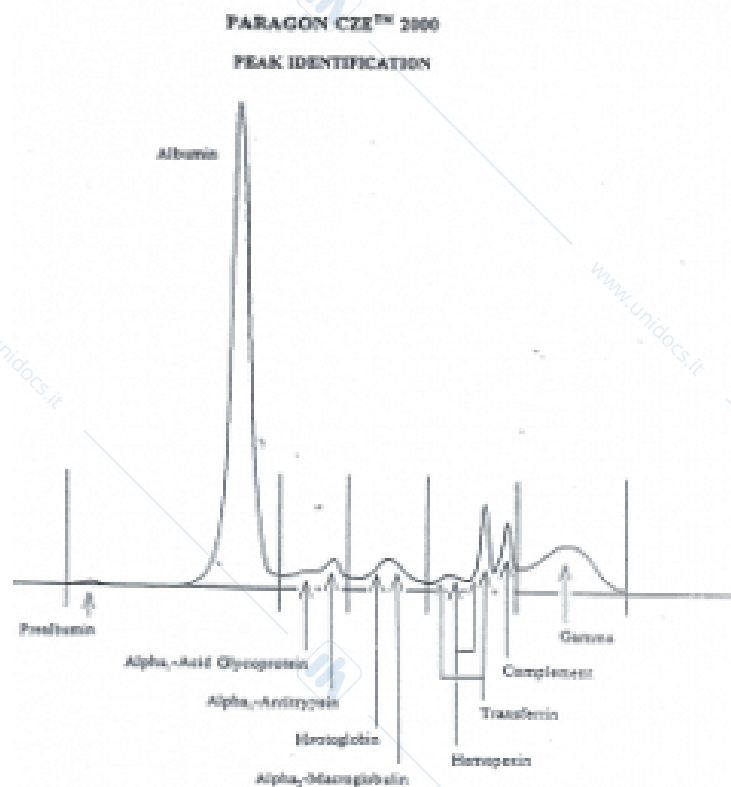
Il mieloma multiplo è la forma più comune di neoplasia plasmacellulare nell'uomo. Produce in genere un'immunoglobulina monoclonale ed un eccesso di catene leggere libere. Le Ig possono appartenere a tutte le classi di Ig con frequenza corrispondente al loro normale contenuto sierico



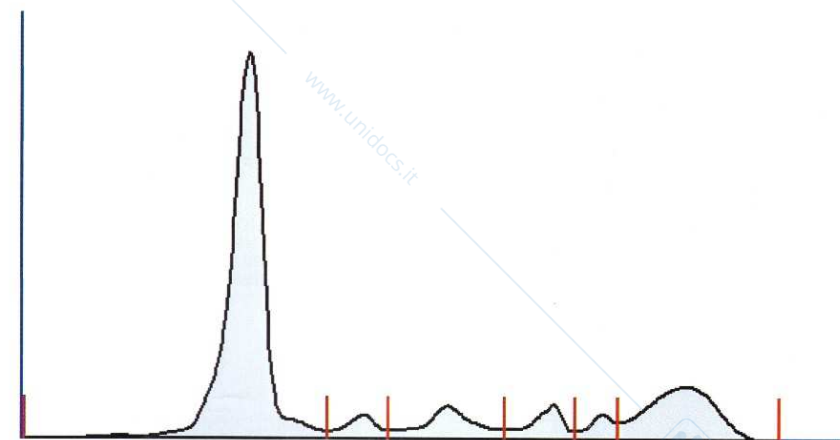
La separazione avviene in fase liquida a 24°C per 5' a 8000 V e le sieroproteine migrano in base alla carica elettrica e alla ripartizione cromatografica sulle pareti del capillare (si usa un micro capillare in silice fusa riempito da una sostanza che funge da setaccio molecolare). La rivelazione avviene senza ausilio di coloranti tramite misura dell'assorbanza a 214 nm da parte un detector UV posto alla fine del capillare.



La separazione avviene in fase liquida a 24°C per 5' a 8000 V e le sieroproteine migrano in base alla carica elettrica e alla ripartizione cromatografica sulle pareti del capillare (si usa un micro capillare in silice fusa riempito da una sostanza che funge da setaccio molecolare). La rivelazione avviene senza ausilio di coloranti tramite misura dell'assorbanza a 214 nm da parte un detector UV posto alla fine del capillare.



Elettroforesi capillare delle Sieroproteine

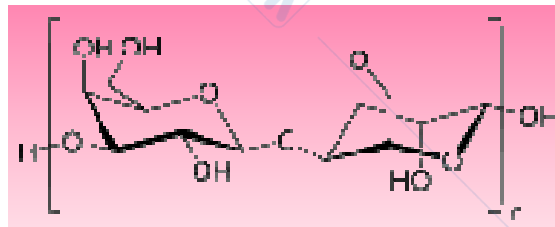


Frazioni	%	Int.rif. %	g/dL
Albumina	61,3	55.8 - 66.1	4,9
Alfa 1	3,8	2.9 - 4.9	0,3
Alfa 2	8,2	7.1 - 11.8	0,7
Beta 1	5,5	4.7 - 7.2	0,4
Beta 2	3,2	3.2 - 6.5	0,3
Gamma	18	11.1 - 18.8	1,4

Rapporto A/G 1,58 (Rif: 1.10 - 2.40) Proteine Totali: 8,00 g/dL (Valore di rif. 6.6 - 8.3)

ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

- ❖ Polisaccaride dell'agar, materiale isolato da alghe; è un polimero lineare e neutro formato da unità di D-galattosio e di 3,6-anidro-L-galattosio legate alternativamente con legami glicosidici:



- ❖ Si presenta come una polvere biancastra insolubile in acqua fredda
- ❖ Si prepara scaldando all'ebollizione una sospensione acquosa di agarosio, sino a chiarificazione; si lascia, quindi, raffreddare. Intorno ai 45° si ha la formazione del gel, i cui pori sono di dimensione inversamente proporzionale alla concentrazione dell'agarosio
- ❖ Usato sia per la separazione proteica che per l'elettroforesi di acidi nucleici (DNA e RNA)

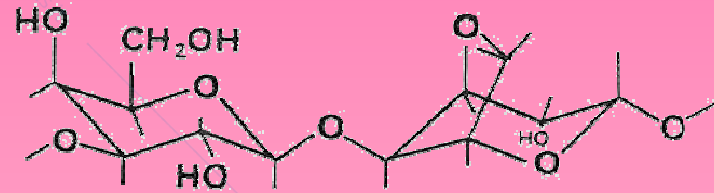


Fig. 26. Structure of the repeating unit of agarose. Note the presence of the unusual sugar 3,6-anhydro-L-galactose.

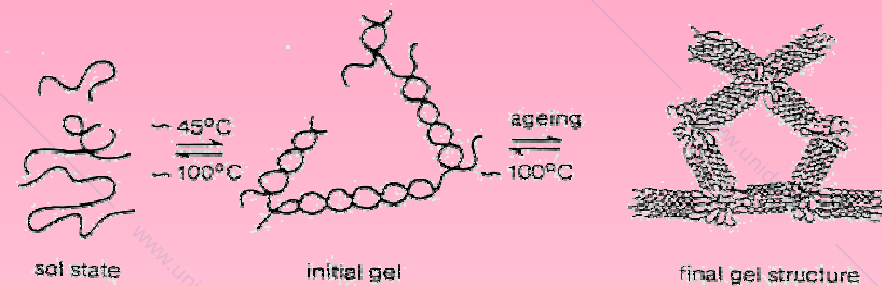


Fig. 25. Gel structure of agarose. (Llås, T. Doctoral thesis. Acta Universitatis Upsaliensis, 1975. Reproduced by kind permission of the Author.)

Table 6. Properties of Sepharose.

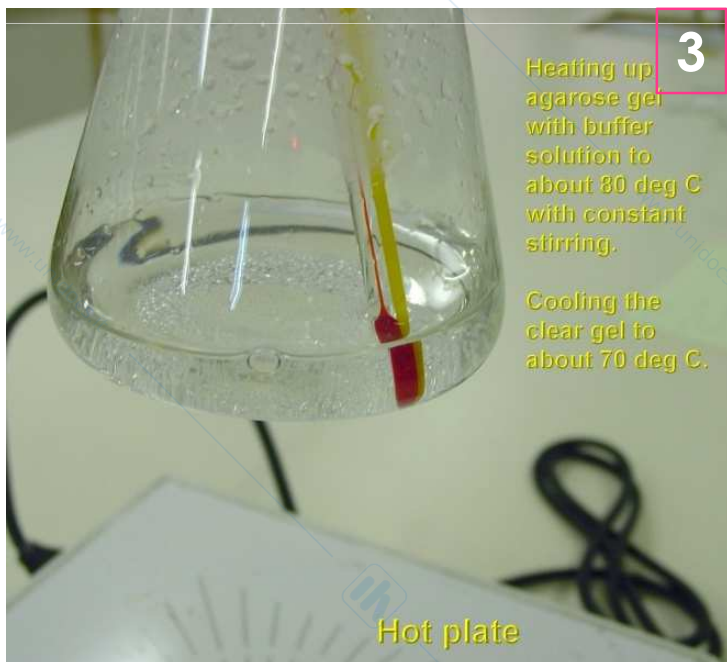
Gel type	Approx. % agarose	Bead size μm	Fractionation range Globular proteins.	Fractionation range Dextrans
Sepharose 6B	6	45 - 165	10 000 - 4 000 000	10 000 - 1 000 000
Sepharose 4B	4	45 - 165	60 000 - 20 000 000	30 000 - 5 000 000
Sepharose 2B	2	60 - 200	70 000 - 40 000 000	100 000 - 20 000 000



- ❖ Per l'analisi di **proteine sieriche**, si usa generalmente una soluzione 0,8% di agarosio in tampone a pH 8.7, versata su lastra di vetro e lasciata raffreddare;
- ❖ Campione diluito 1:1 con il tampone contenente 0,1% di blu di bromofenolo (indicatore della corsa); inserito in una sottile fessura nel gel e fatto assorbire prima di applicare la corrente;
- ❖ Corsa 20 V/cm, per 30 min;
- ❖ Fissaggio del gel con soluzione 80% acido picrico - 20% acido acetico;
- ❖ Colorazione gel con 0,1% Blue Comassie in metanolo - acqua - acido acetico (45:45:10 in volume).



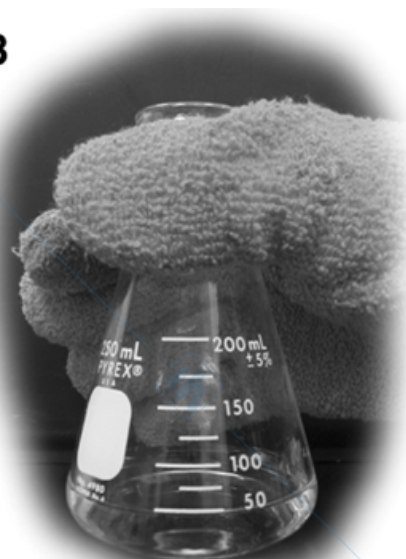
Elettroforesi su gel di agarosio



A

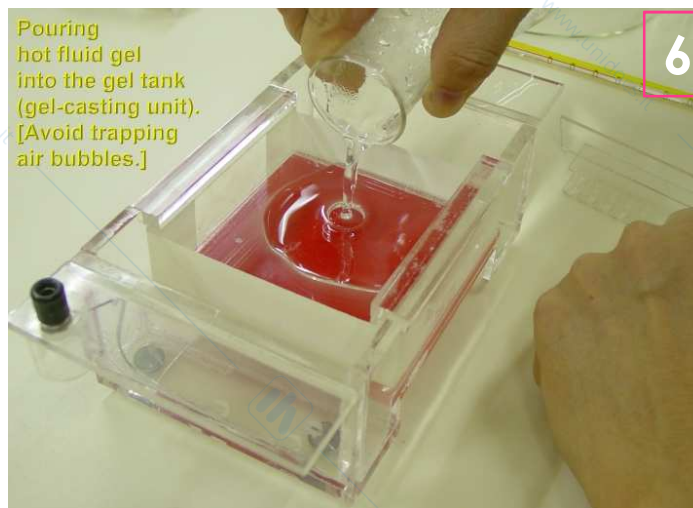
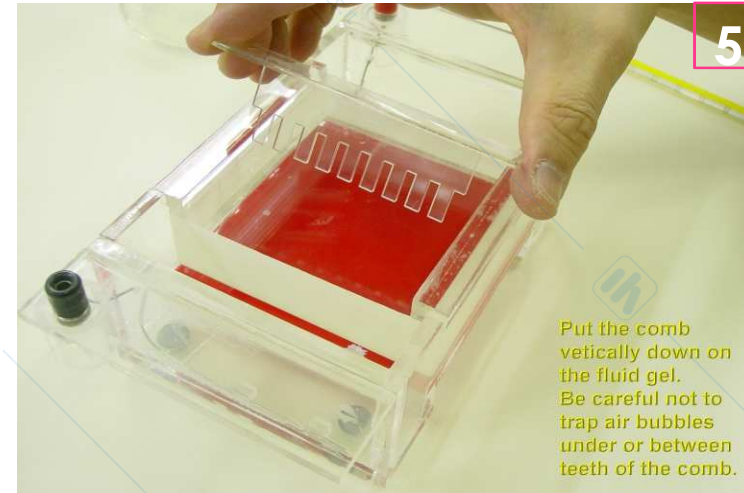
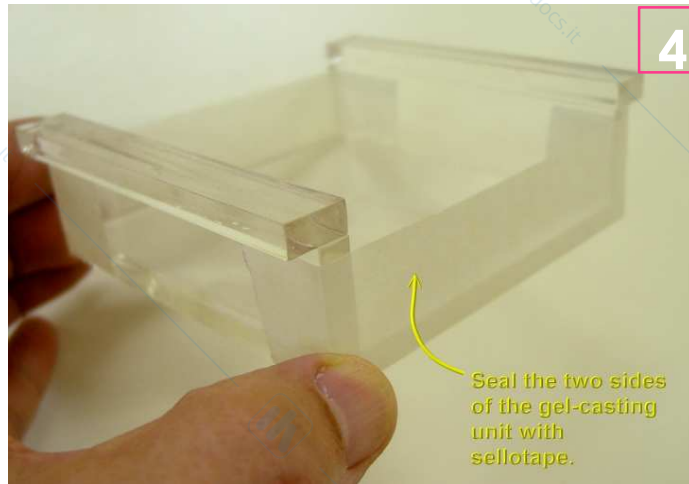


B



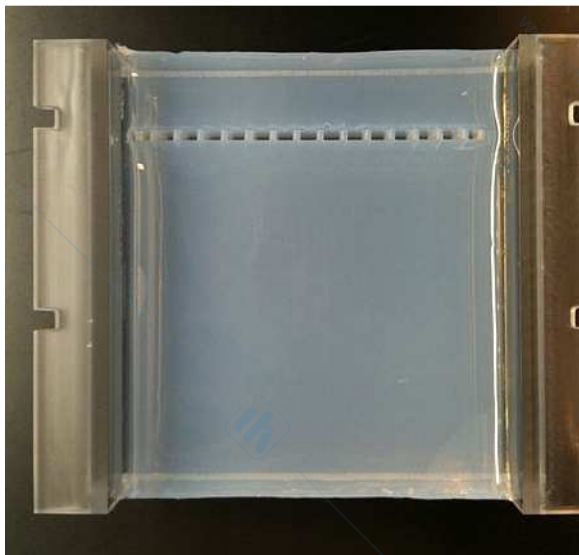
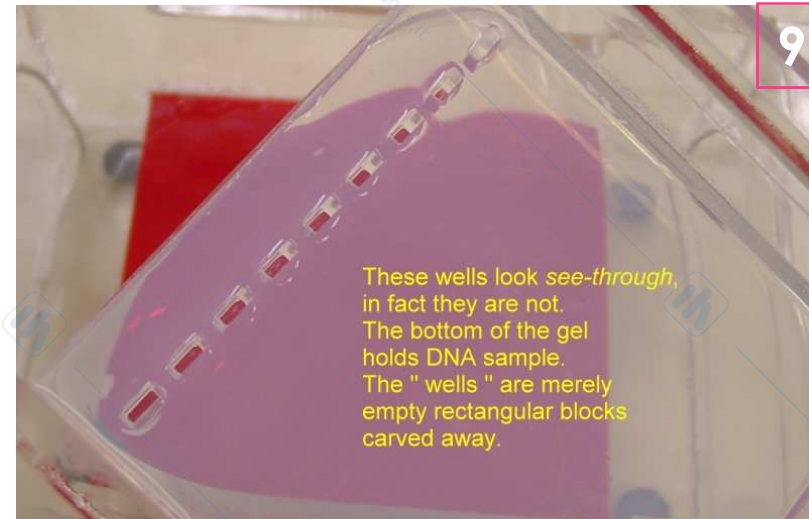


Elettroforesi su gel di agarosio



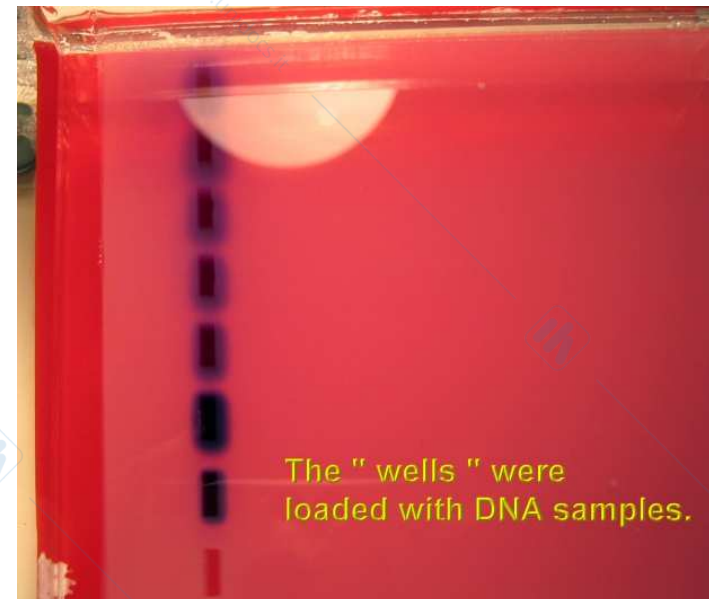


Elettroforesi su gel di agarosio



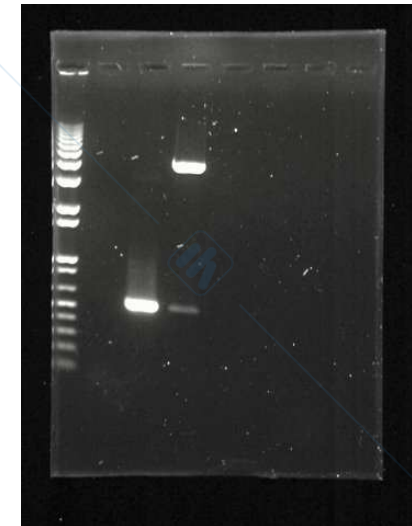
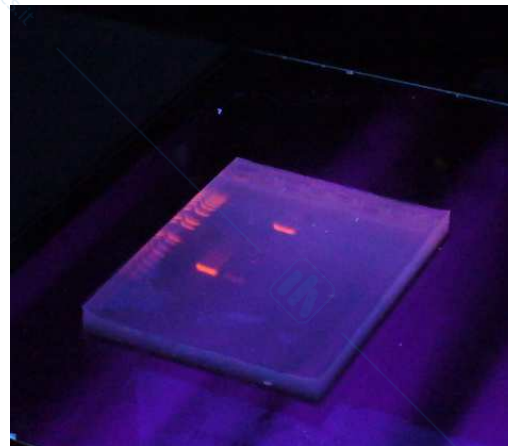
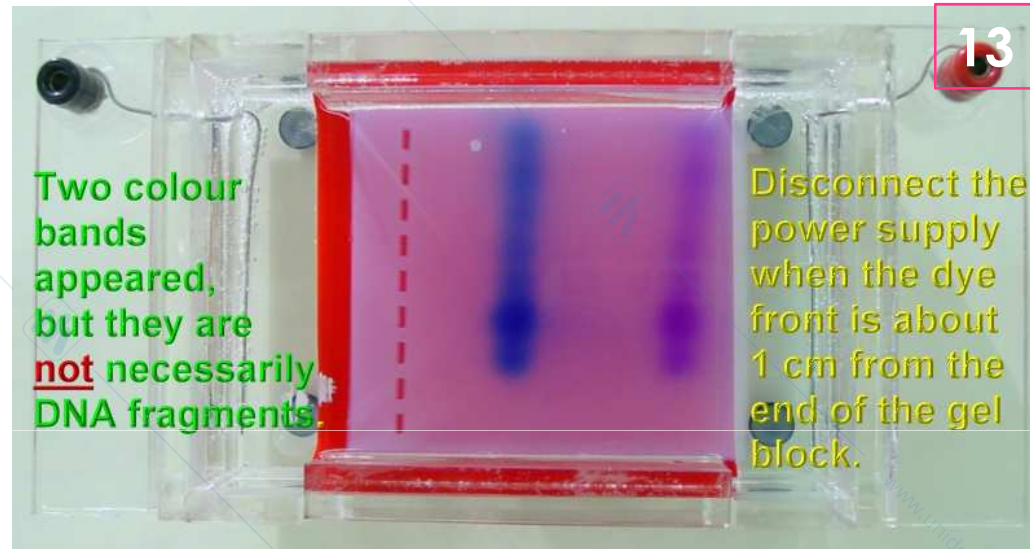


Elettroforesi su gel di agarosio



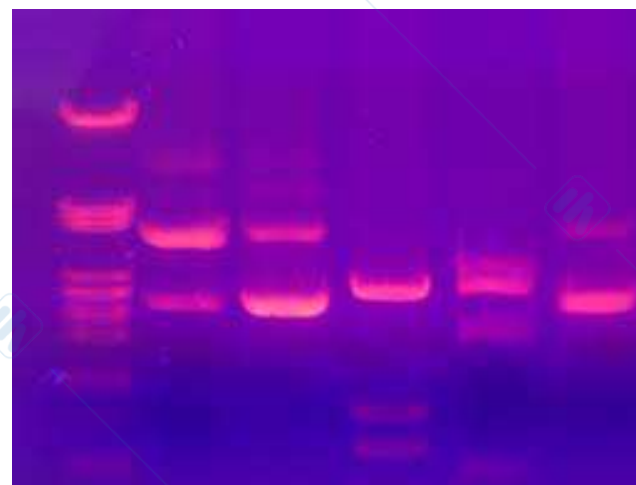
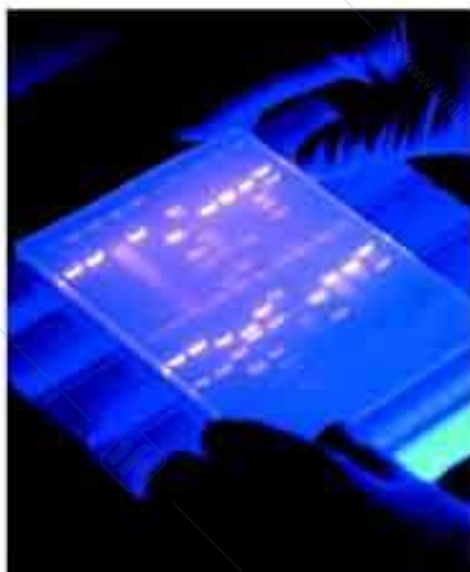
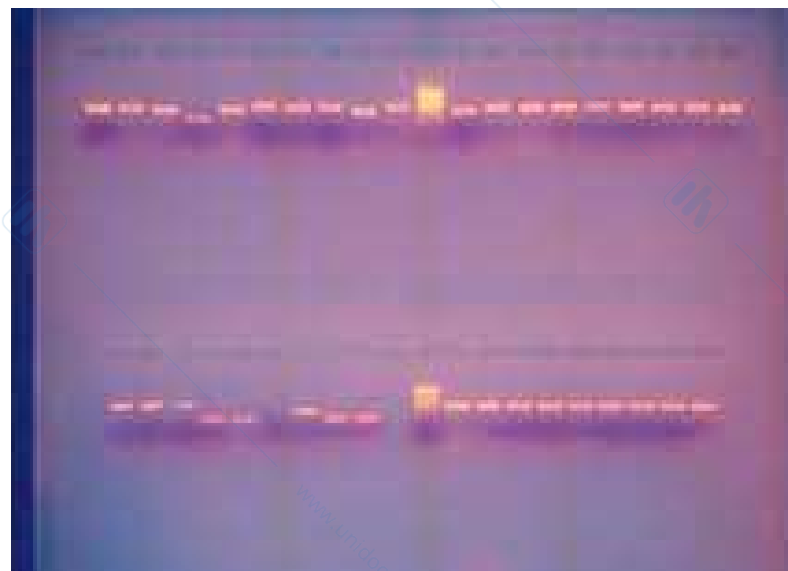


Elettroforesi su gel di agarosio





Transilluminatore UV

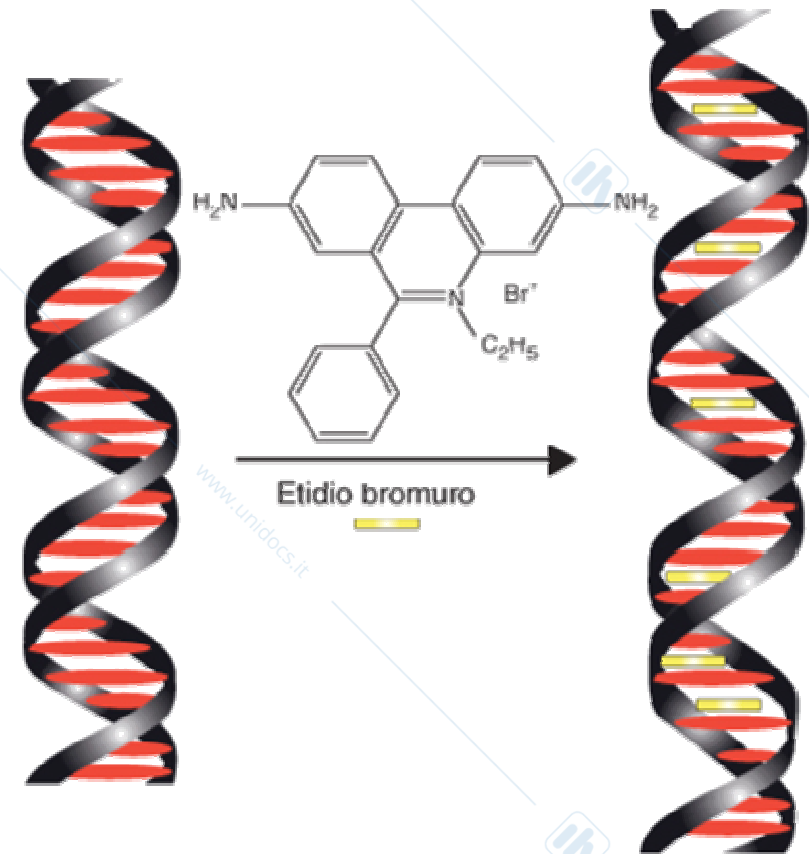


Elettroforesi su gel di agarosio

Etidio Bromuro (EtBr):

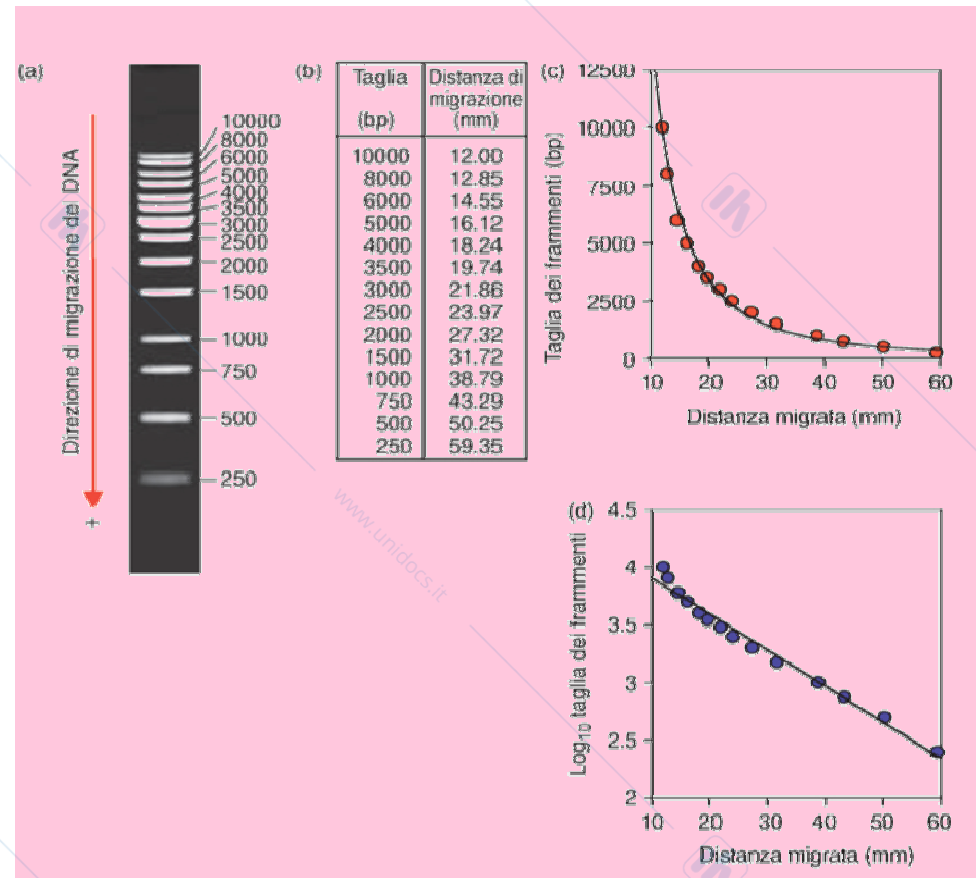
Colorante fluorescente che assorbe la luce UV a 254 nm e riemette in fluorescenza a 590 nm, dando colore giallo-arancio

E' utile sia per visualizzare, sia per quantificare il campione di DNA: l'intensità della fluorescenza è, infatti, proporzionale alla quantità del campione.



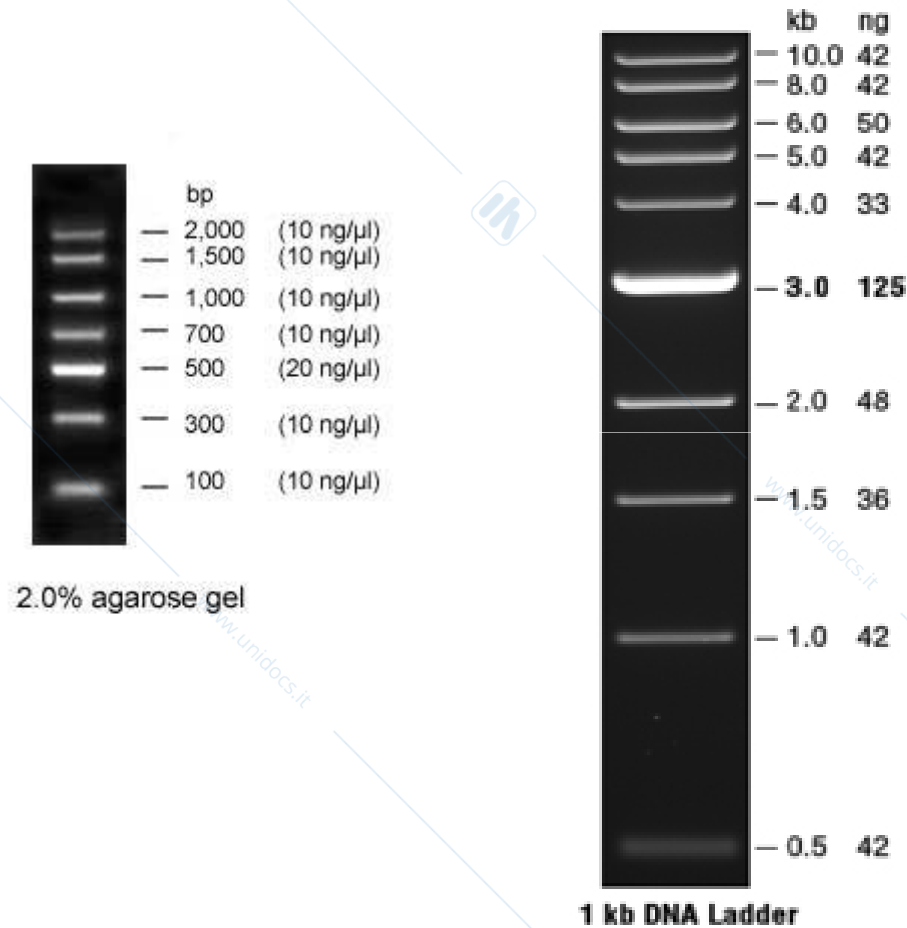
Markers

Per frammenti lineari di DNA e/o RNA la distanza di migrazione è inversamente proporzionale alle dimensioni della molecola (ovvero alla sua lunghezza in basi)



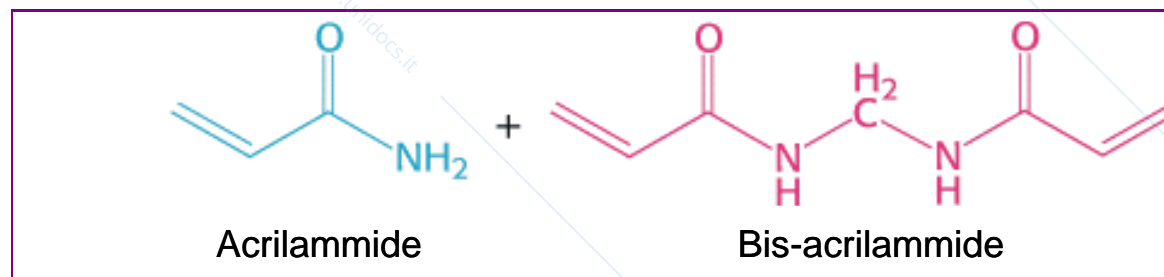


Elettroforesi su gel di agarosio



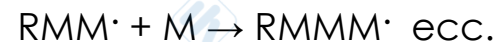
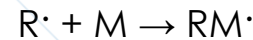
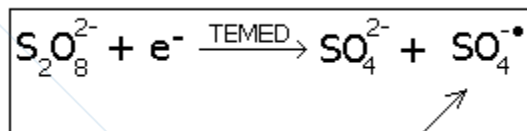
ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMMIDE

- ❖ La PAGE, *polyacrylamide gel electrophoresis*, è una delle metodiche elettroforetiche più utilizzate;
- ❖ I gel di poliacrilammide sono preparati facendo copolimerizzare monomeri di acrilammide in presenza di piccole quantità di N,N'-metilene bisacrilammide (bis-acrilammide)



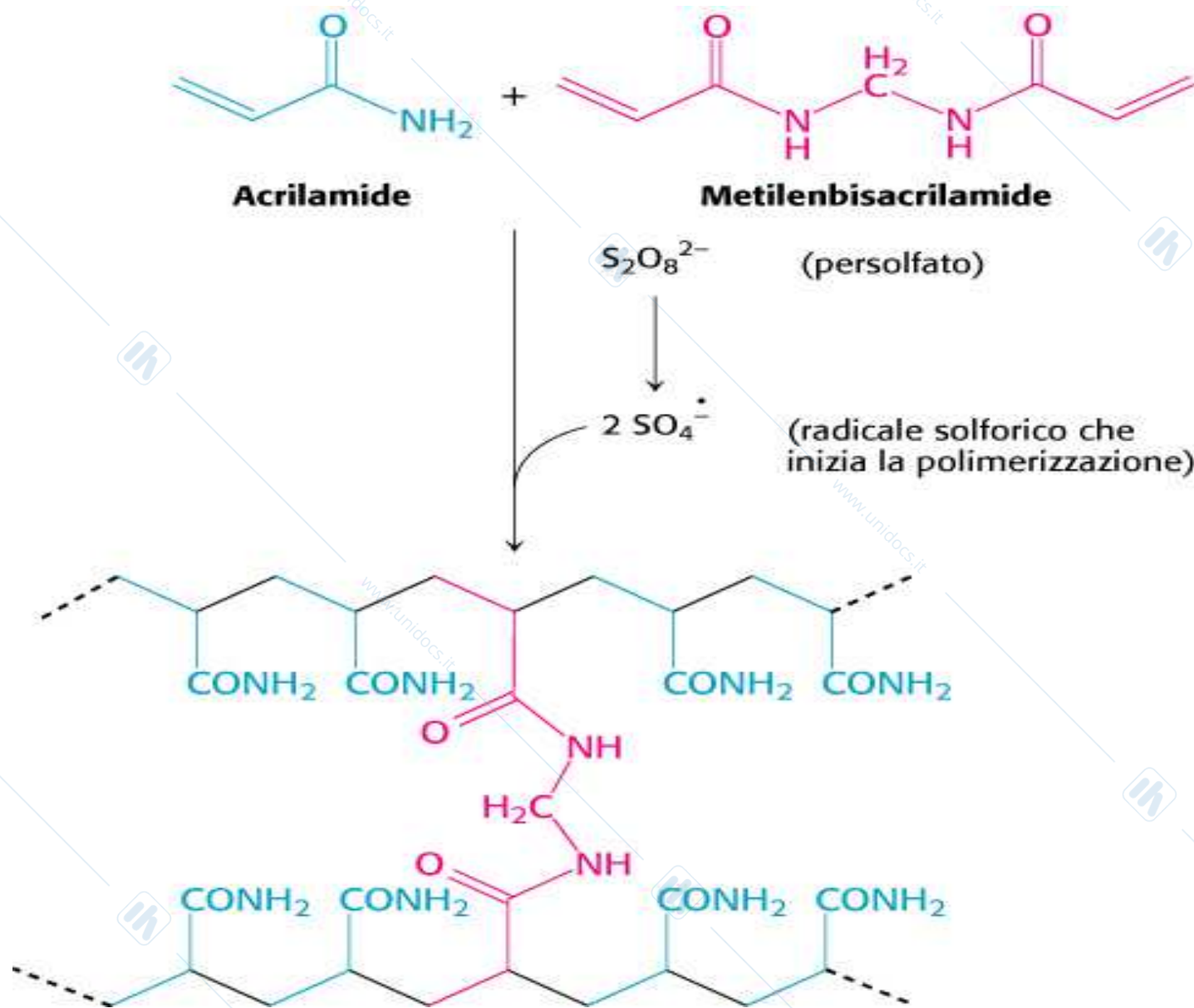


- ❖ La bis-acrilammide, composta da due molecole di acrilammide legate da un gruppo metilene, è utilizzata come agente in grado di formare legami crociati (*cross-linking agent*)
- ❖ I monomeri di acrilammide polimerizzano nel senso testa-coda e occasionalmente si legano ad una molecola di bis-acrilammide.
- ❖ Il processo di polimerizzazione dell'acrilammide avviene per **catalisi radicalica** ed inizia con l'aggiunta di **ammonio persolfato**, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (**iniziatore**) e della base N,N,N',N'-tetrametilendiammina (**TEMED, catalizzatore**). Il TEMED scompone lo ione persolfato dando origine al radicale libero $\cdot\text{SO}_4^-$, che innesca la polimerizzazione:





Elettroforesi su gel di poliacrilammide





- ❖ La poliacrilammide è il polimero più utilizzato per la elettroforesi di proteine con PM tra 5.000 e 200.000
- ❖ I suoi vantaggi sono:
 - ✓ notevole resistenza meccanica sia quando i gel sono idratati che quando vengono seccati;
 - ✓ completa trasparenza sia nel visibile che nell'UV, che resta anche quando i gel sono seccati;
 - ✓ aderisce bene al vetro evitando che si creino vie preferenziali;
 - ✓ La sua porosità può essere controllata: si può modulare l'effetto di setaccio molecolare (6% - 20% acrilammide);
 - ✓ E' utilizzabile per la elettroforesi sia nativa che denaturante;
 - ✓ il monomero e' una potente neurotossina!!!





- ❖ Si può **modulare la dimensione media dei pori**, variando la percentuale di acrilammide (in genere la percentuale di bisacrilammide è lasciata costante), come in altri SETACCI MOLECOLARI:

Proteine relativamente piccole → **migrazione più veloce**

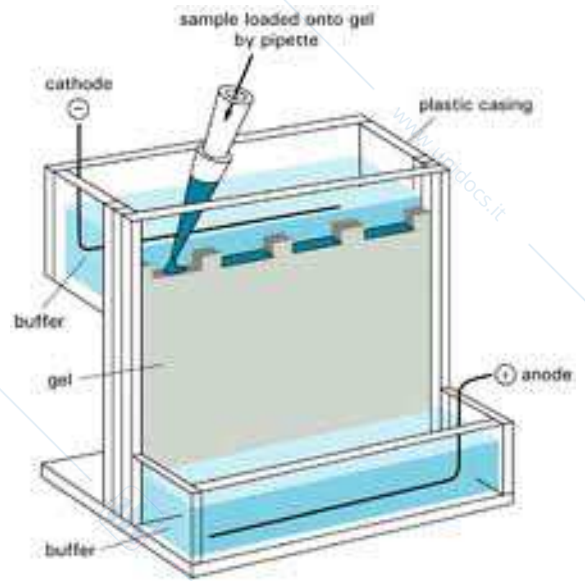
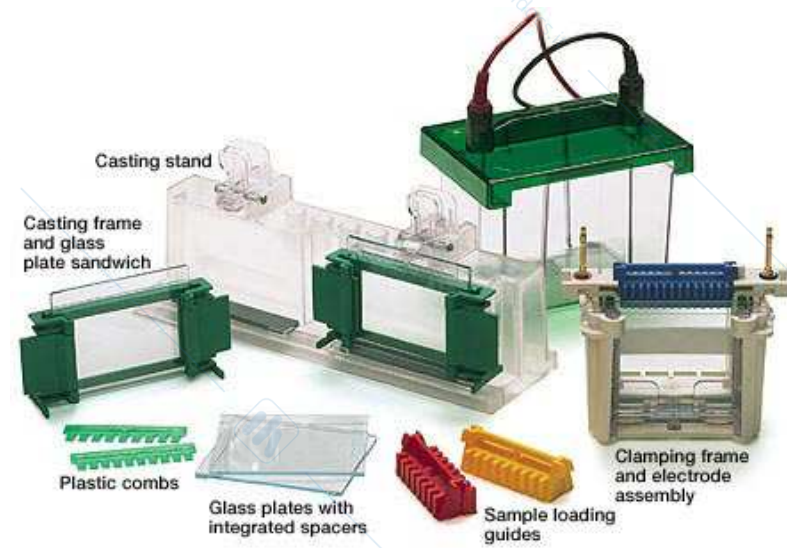
Proteine relativamente grandi → **migrazione più lenta**

% ACRILAMMIDE bassa → **SEPARAZIONE MOLECOLE ALTO PM**

% ACRILAMMIDE alta → **SEPARAZIONE MOLECOLE BASSO PM**



Elettroforesi su gel di poliacrilammide



ELETTROFORESI DI PROTEINE

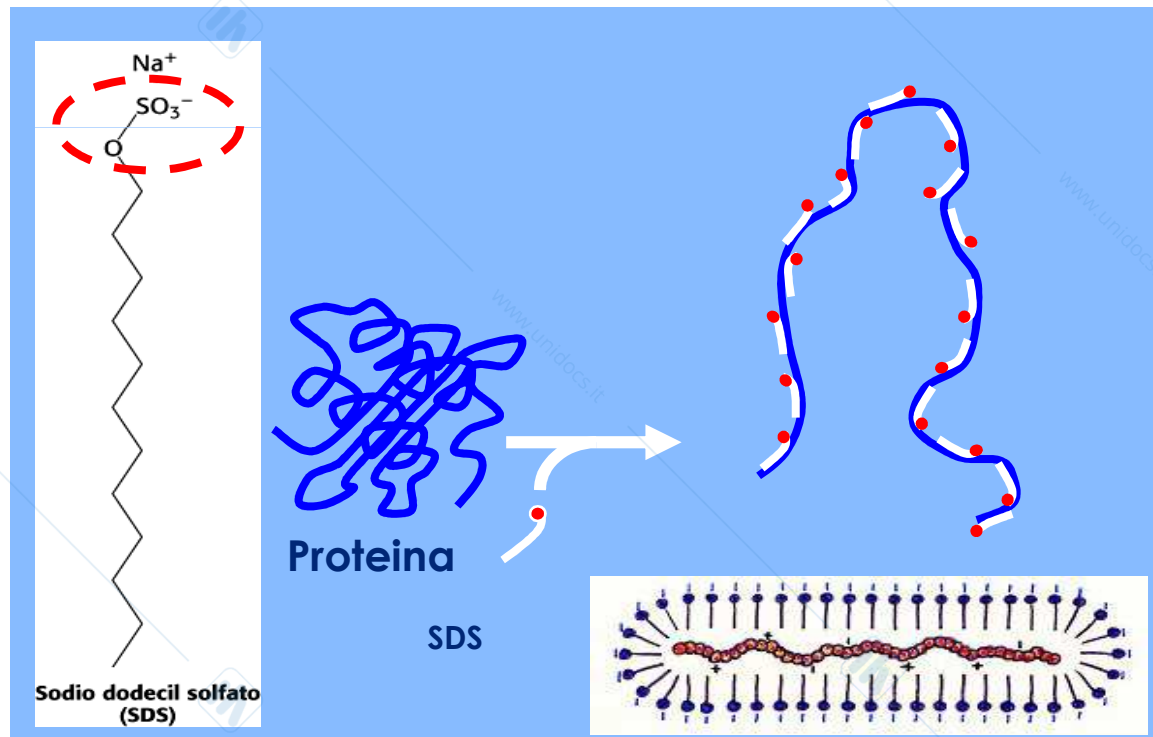
Tipi di gel elettroforesi applicabili alle proteine:

- Elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)
- Elettroforesi in condizioni native
- Isoelettrofocalizzazione (IEF)
- Elettroforesi bidimensionale (2D PAGE)

Quale tipo di elettroforesi usare?
Dipende tipo di analisi che vogliamo fare.

Identificazione/separazione in base alla dimensione	→	SDS-PAGE
Identificazione /separazione in base alla funzione	→	gel nativo
Separazione in base al pI	→	IEF
Analisi di una miscela complessa	→	2D gel

La SDS-PAGE prevede la separazione di miscele proteiche, non in base alla loro carica, ma alle loro dimensioni poiché l'SDS (sodio dodecil-solfato) conferisce alle proteine una carica negativa netta, di densità omogenea



**ELETTROFORESI IN
CONDIZIONI
DENATURANTI**



Principali impieghi della SDS-PAGE:

- Proteomica (analisi dell'insieme delle proteine di una cellula)
- Controllo di omogeneità (purificazione di proteine)
- Caratterizzazione (determinazione del peso molecolare)
- Analisi con anticorpi (western blotting)

- ❖ La parte superiore del gel di poliacrilammide, nota come *stacking gel* (o GEL DI CONCENTRAZIONE), è versata direttamente al di sopra del *resolving gel* (o GEL DI SEPARAZIONE)

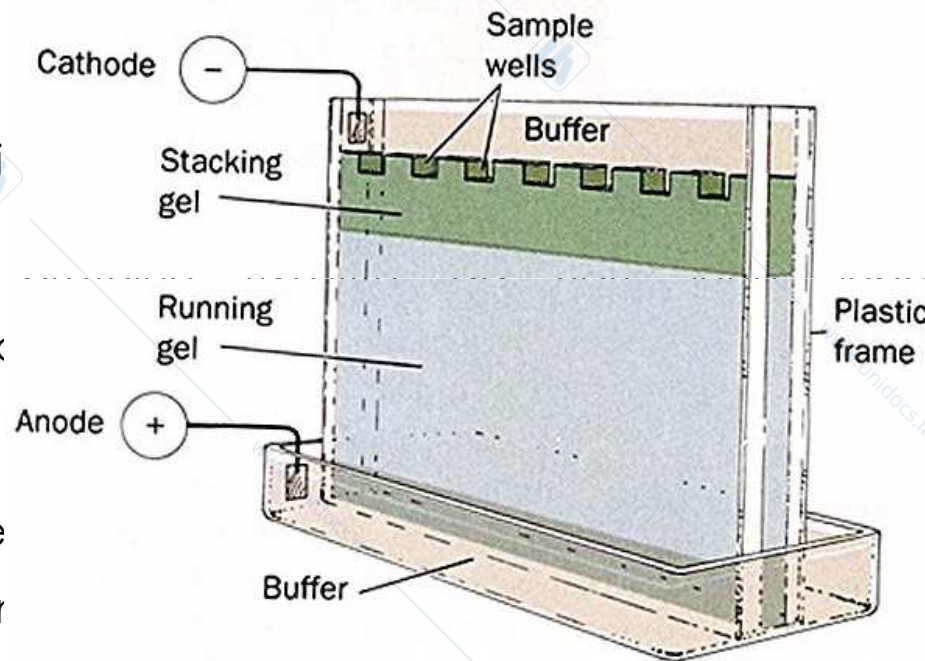
- ❖ Lo *stacking gel* del campione in

- ❖ In tal modo le proteine in

- ❖ Lo *stacking gel* di poliacrilammide è tamponato con

- ❖ Il *resolving gel* contiene invece una percentuale più alta di poliacrilammide ed è tamponato con Tris-HCl a **pH 8.8**

- ❖ Il tampone di corsa contiene Tris a **pH 8.3**, con Glicina come controione

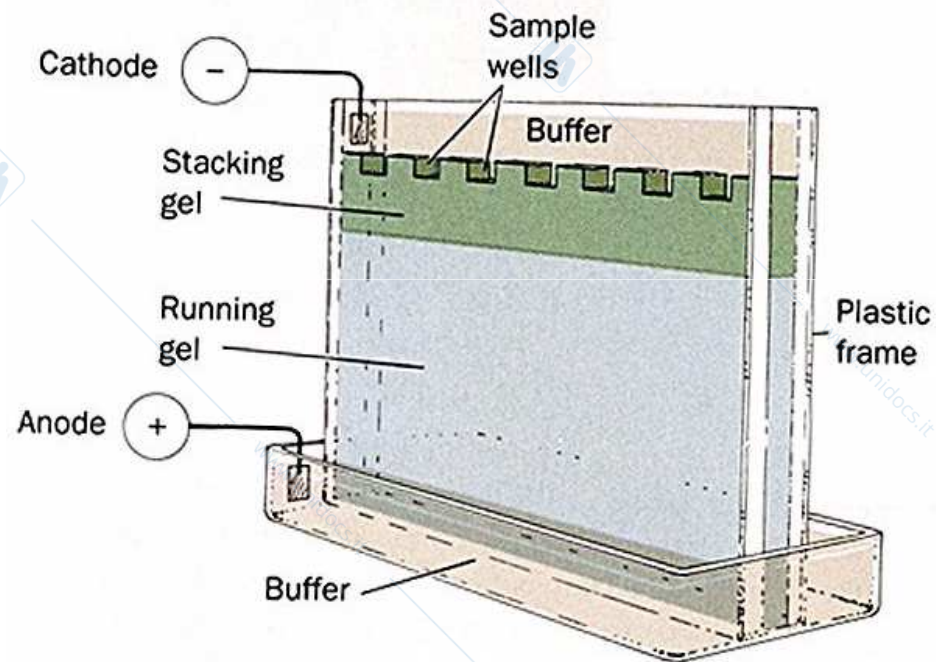


concentrazione delle proteine

tamponate nel *resolving gel* in

una percentuale di poliacrilammide di alta porosità, ed è

contiene una percentuale più alta di



FASI PROCEDURALI

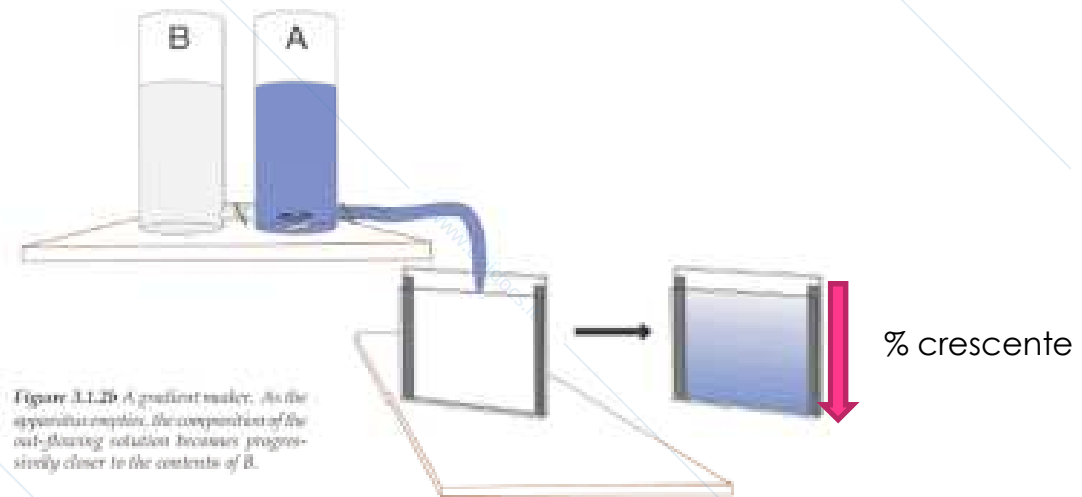
- ❖ Preparazione delle soluzioni
- ❖ Preparazione del gel (*casting*):
 - ✓ continuo
 - ✓ discontinuo
 - ✓ a gradiente
- ❖ Preparazione del campione (aggiunta *Sample Buffer*)
- ❖ Corsa elettroforetica
- ❖ Metodo di rivelazione
- ❖ Recupero (eventuale)

Formatore di gradiente

- deve essere posizionato sopra i vetri tra cui deve essere colato il gel, per incoraggiare il flusso per gravità
- consiste in due recipienti A e B collegati alle basi da un sottile connettore; dal contenitore (A) un connettore arriva al contenitore del gel

Funzionamento

Quando il liquido viene fatto uscire da A, è rimpiazzato da B a causa dell'equilibratura della pressione idrodinamica che tiene i livelli di A e B uguali. A è costantemente mantenuto in movimento, il che causa la progressiva diluizione della soluzione A con B fino a che, quando il formatore di gradiente è vuoto, il liquido che esce è essenzialmente B.

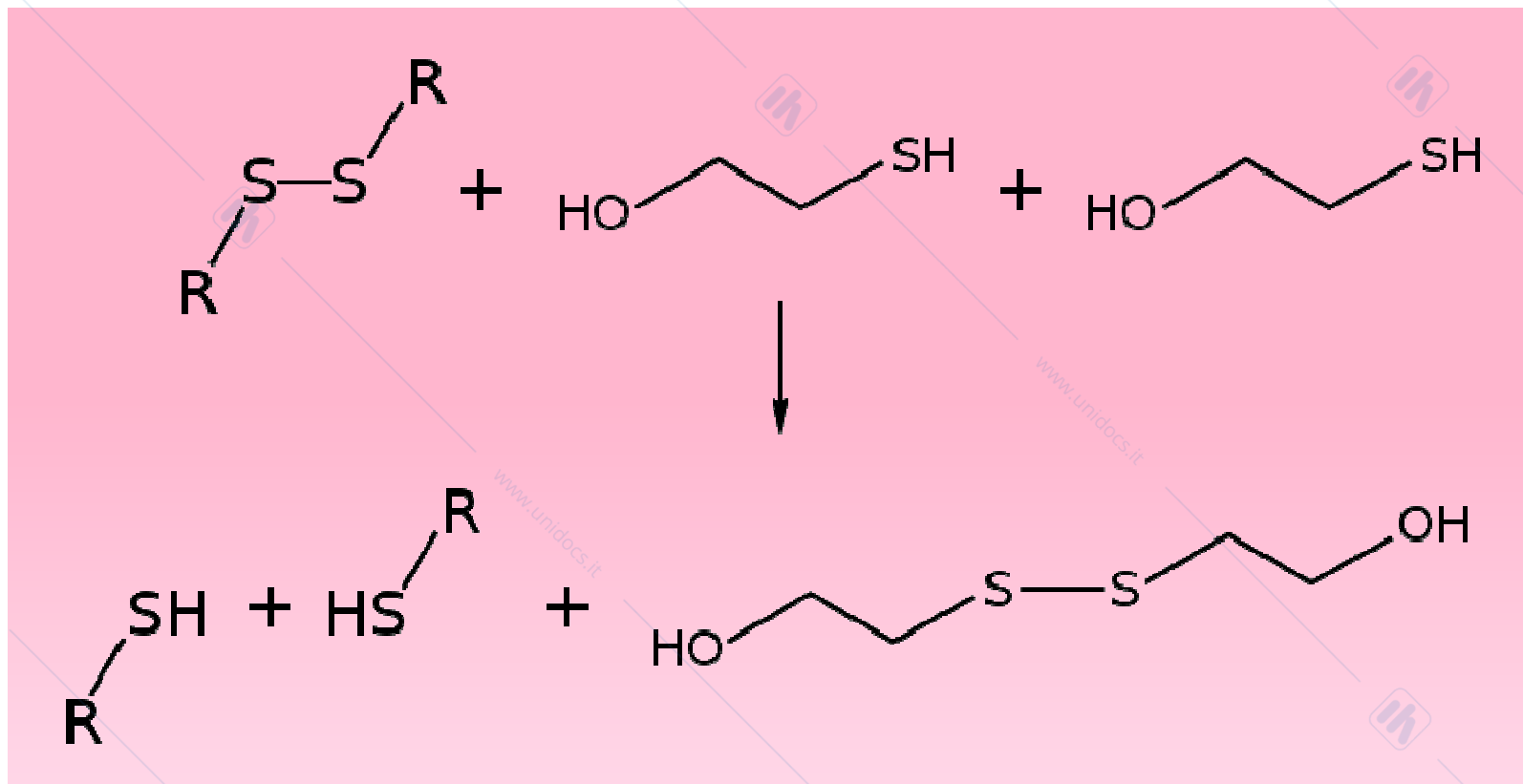


Nella formazione di gradiente di poliacrilammide, in **A** c'è la soluzione corrispondente alla **massima concentrazione** di acrilammide desiderata nel gel, in **B** quella corrispondente alla **minima**.

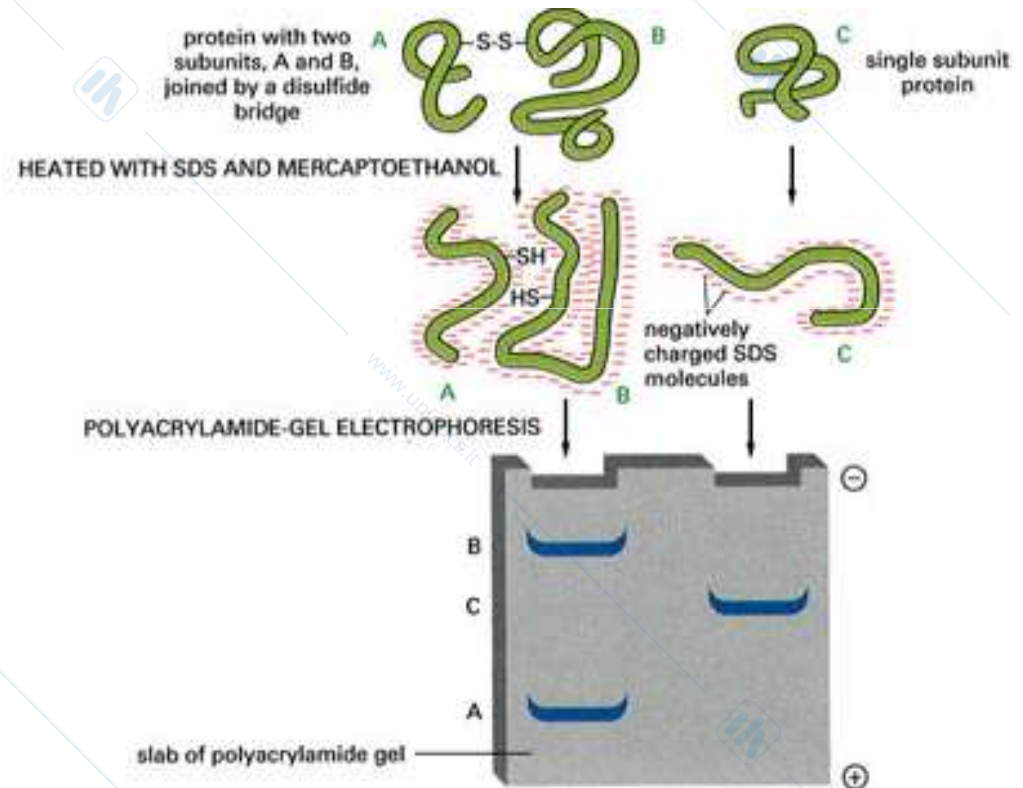
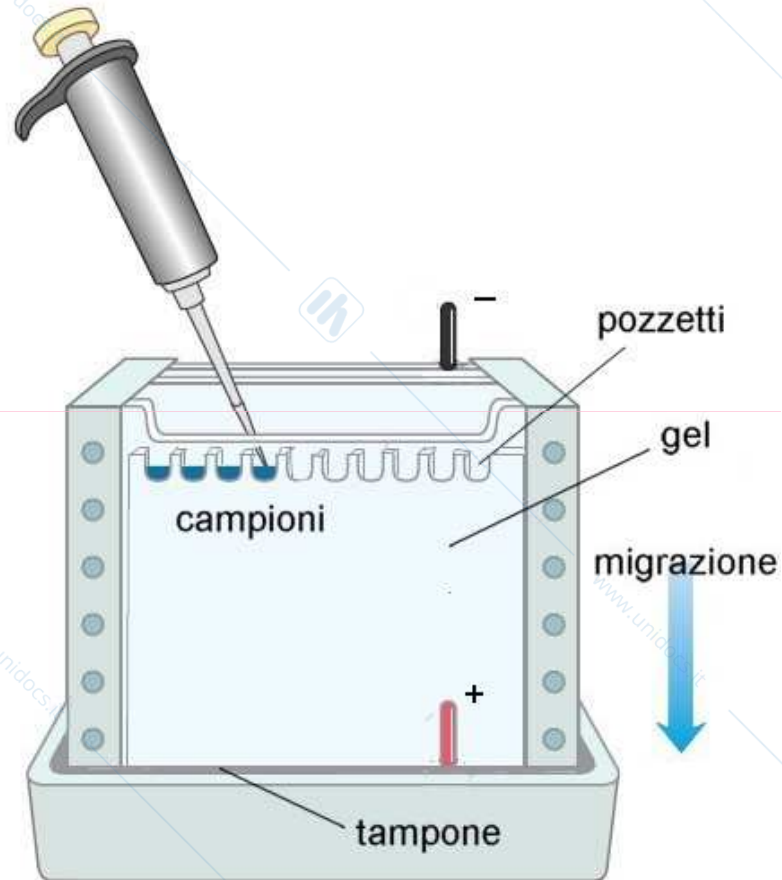
PREPARAZIONE DEL CAMPIONE - FUNZIONI DEL SAMPLE BUFFER

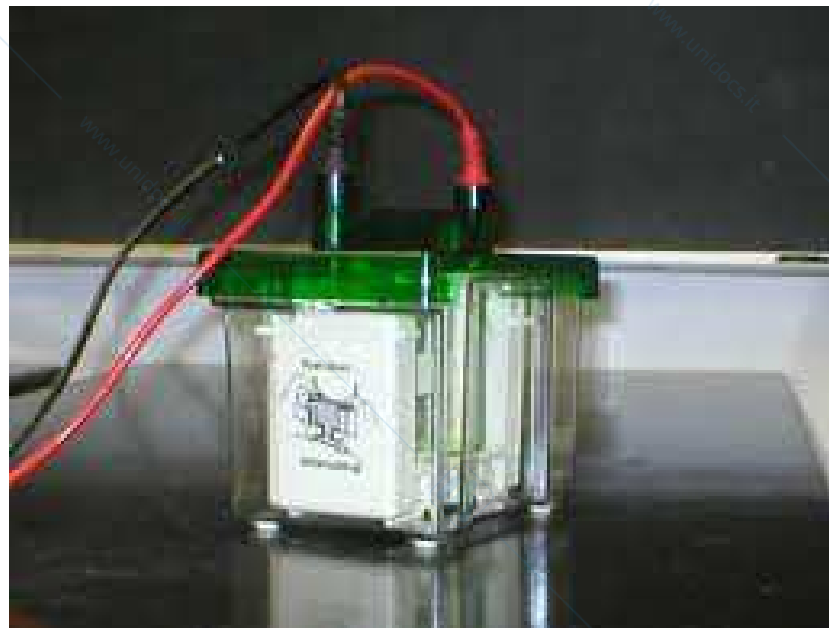
- ❖ **SDS**
 - ✓ denatura le proteine (stessa forma a “bastoncino”)
 - ✓ conferisce la stessa densità di carica (negativa)
- ❖ **β -Mercaptoetanololo (HS-CH₂CH₂OH) (agente riducente)**
 - ✓ rompe eventuali legami disolfuro
- ❖ **Glicerolo**
 - ✓ appesantisce i campioni, depositandoli nel pozzetto
- ❖ **Blu di bromofenolo (indicatore della corsa)**
 - ✓ visualizza i campioni e va a costituire il fronte di migrazione
- ❖ **Bollitura (100 °C per 5 min)**
 - ✓ accelera la completa denaturazione e quindi l'inattivazione

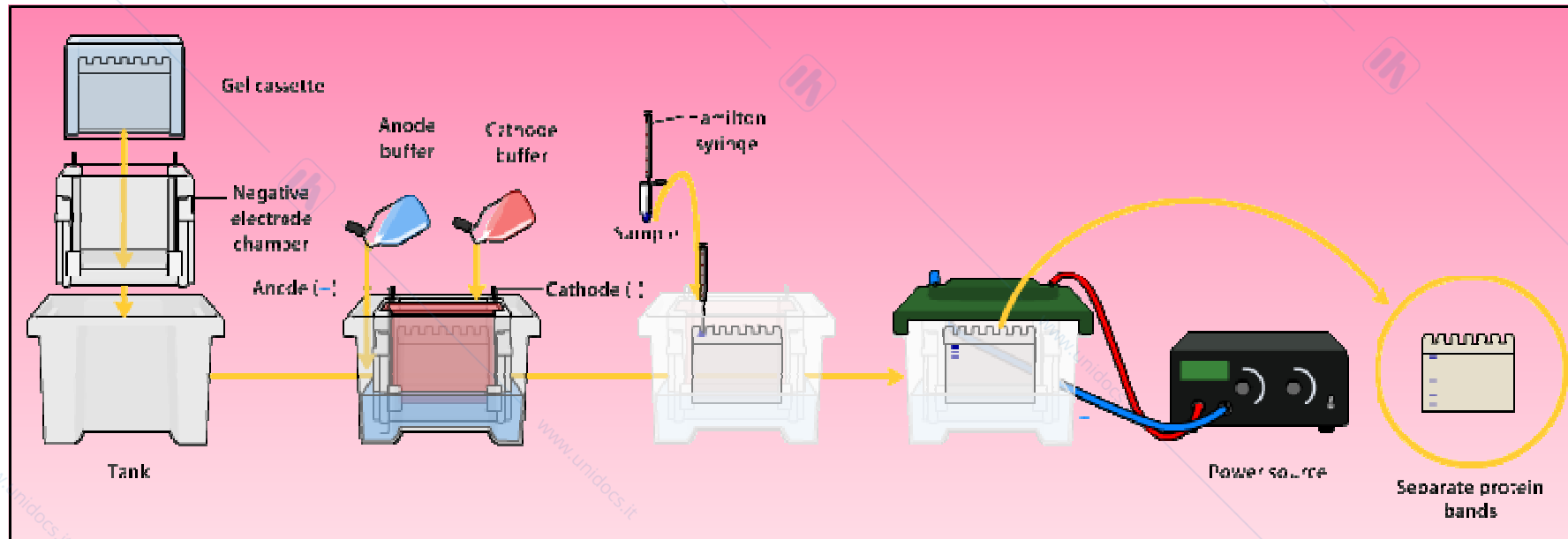
Riduzione proteica da parte del β -mercaptoetanololo



➔ Perdita della struttura terziaria e quaternaria delle proteine

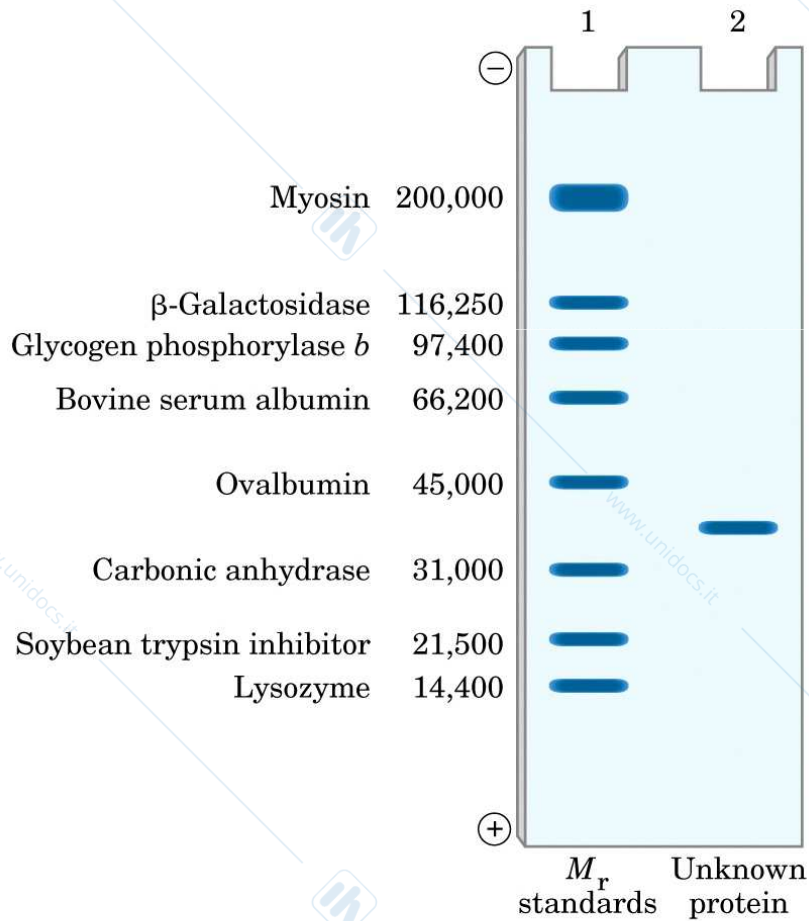




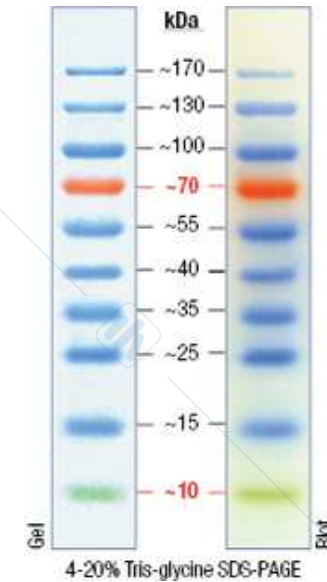
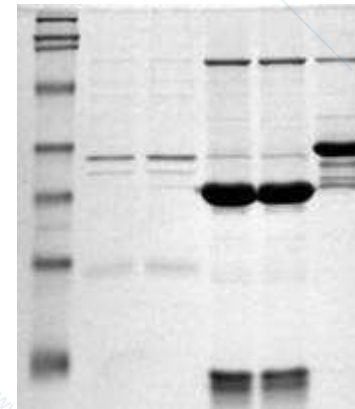




MARKERS



(a)

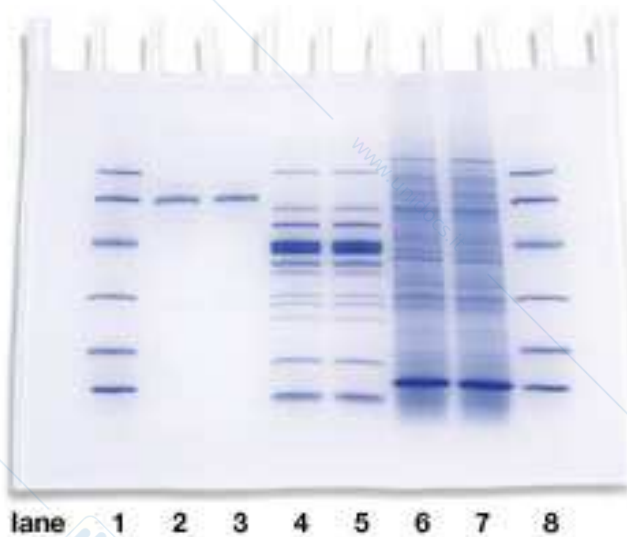




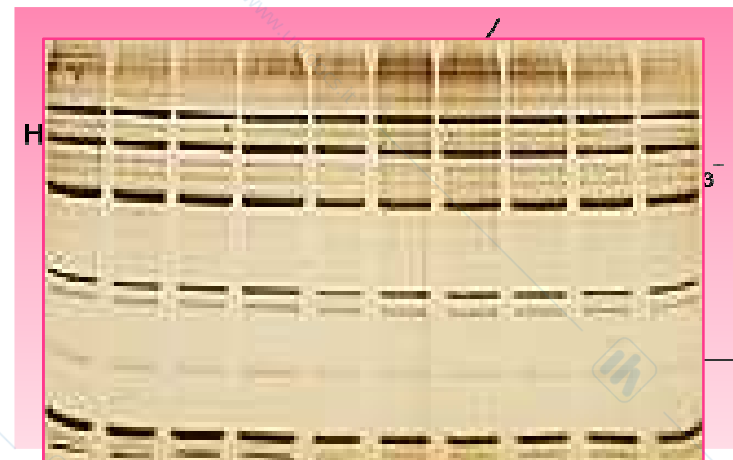
RIVELAZIONE DELLE PROTEINE

❖ COLORANTI ASPECIFICI:

Blue Coomassie
(sensibilità 100 ng)

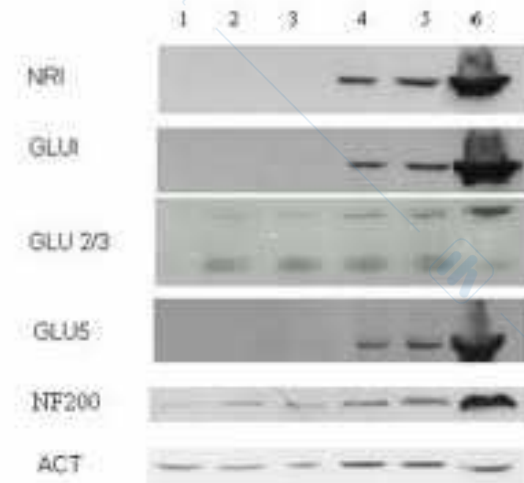
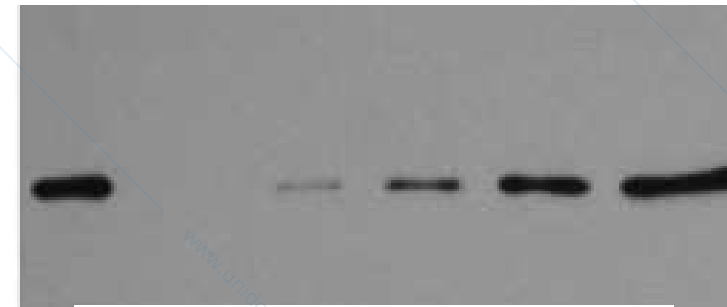
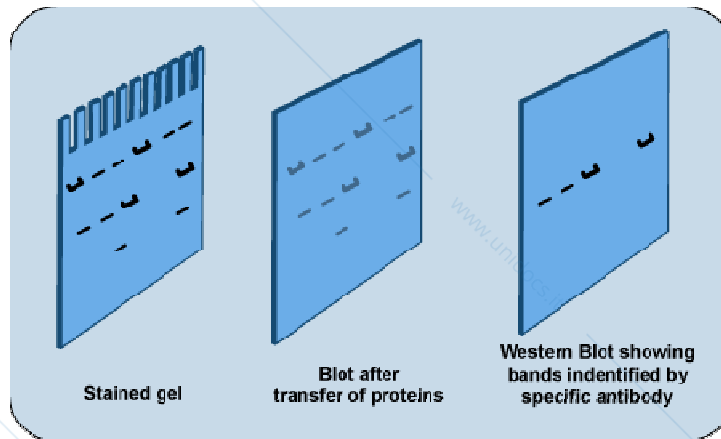


Silver Staining
(sensibilità 1 ng)



❖ IMMUNODECORAZIONE (WESTERN BLOTTING):

IDENTIFICAZIONE CON ANTICORPI SPECIFICI



❖ **COLORANTI SPECIFICI (ZIMOGRAMMI) (proteine native)**

(es., proteasi, fosfatasi, deidrogenasi)





❖ Vantaggi:

- I complessi proteina-SDS sono altamente carichi e tutti negativi (vanno tutti all'anodo)
- Si separano in base alla dimensione consentendo la determinazione del PM
- SDS solubilizza quasi tutte le proteine
- Le bande si fissano e si colorano facilmente

❖ Svantaggi:

- Glicoproteine possono migrare in modo anomalo
- Proteine basiche o di membrana migrano in modo anomalo e/o si solubilizzano male

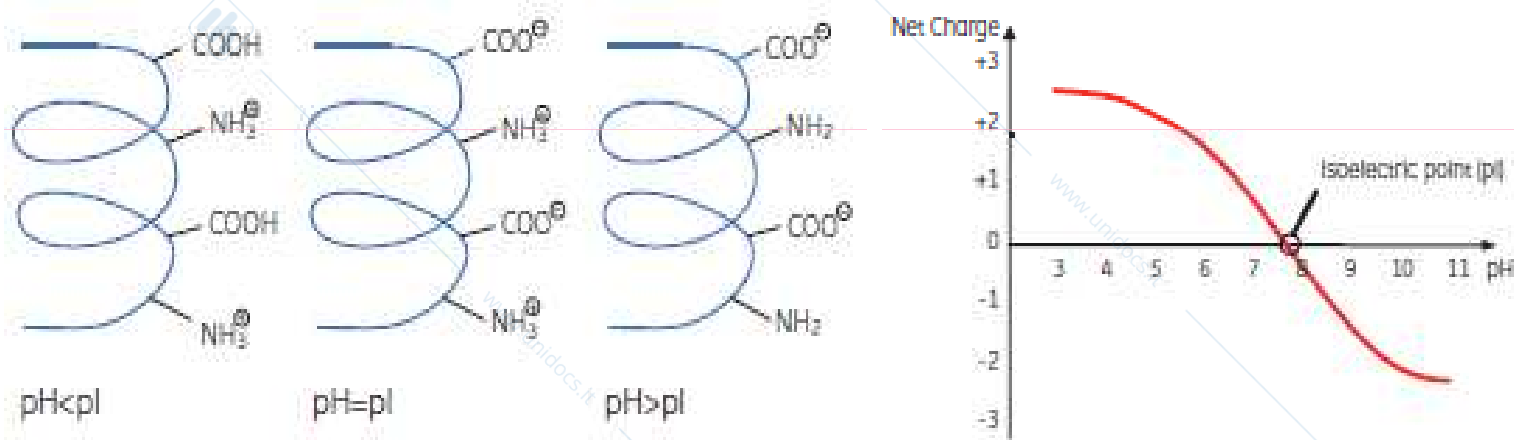


FOCALIZZARE (CONCENTRARE) NEL MEDESIMO PUNTO PROTEINE CON MEDESIMO pI

- ❖ Metodica introdotta nel 1965
- ❖ La separazione proteica non avviene in un tampone a pH definito, bensì in un mezzo nel quale è presente un **gradiente di pH**, crescente dall'anodo (ambiente acido) al catodo (ambiente basico)
- ❖ La separazione delle proteine avviene, quindi, non sulla base del differente PM, bensì sulla base del **differente punto isoelettrico**
- ❖ E' basata sull'uso di polielettroliti anfoteri, (es. poliammine policarbossiliche) denominati **ampholine**, posti in commercio con varie denominazioni (Ampholyte, Bio-Lyte, Pharmalyte), che copolimerizzano in un gel di acrilammide, garantendo il gradiente di pH

ISOELETTROFOCALIZZAZIONE (IEF)

- ❖ Le proteine sono molecole anfotere, che portano una carica netta positiva, negativa o pari a zero a seconda del valore di pH dell'ambiente in cui si trovano:



- ❖ In un gradiente di pH e sotto l'azione di un campo elettrico, ogni proteina della miscela si muoverà fino ad incontrare un valore di pH = pI

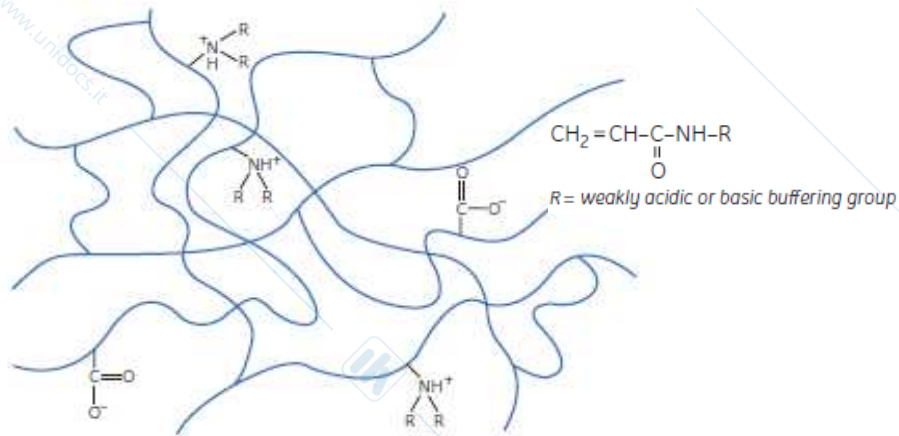


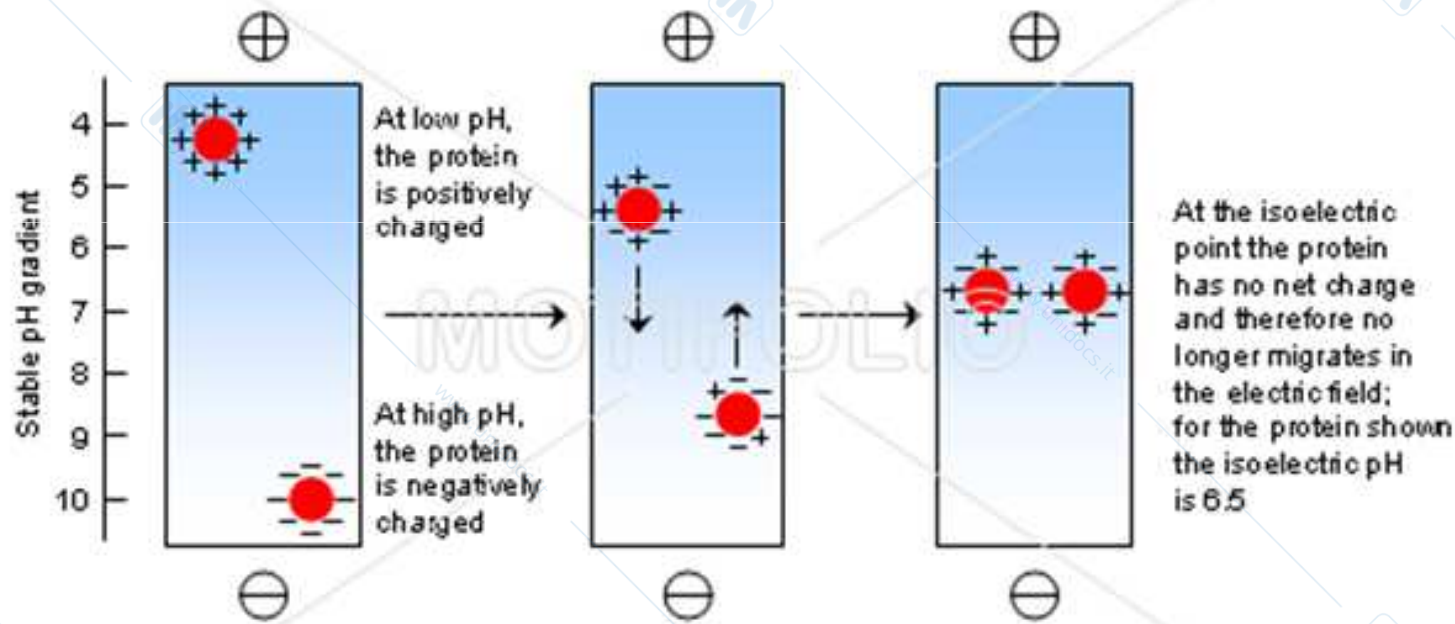
Fig 17. Immobilized pH gradient polyacrylamide gel matrix showing attached buffering groups.

Un gradiente di pH immobilizzato si forma legando covalentemente gruppi tamponanti acidi o basici ad una matrice polimerica (acrilammide)
(IMMOBILINE DRY STRIP)

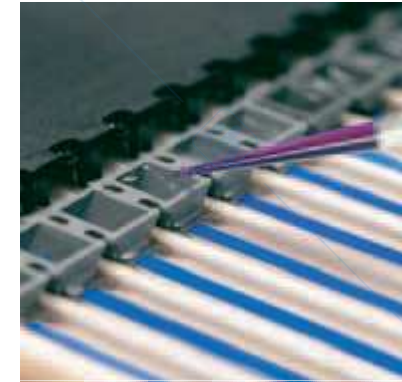
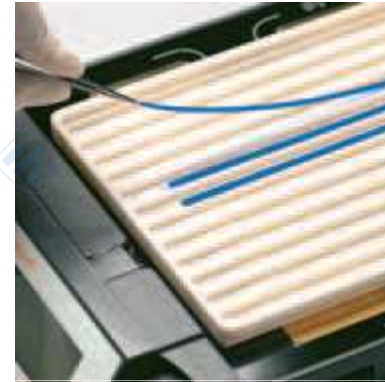
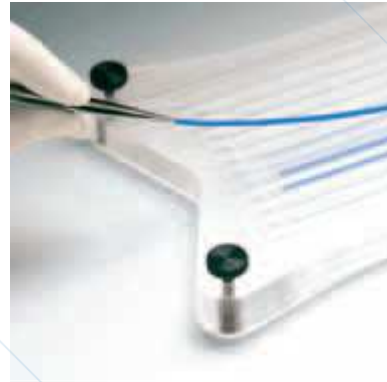
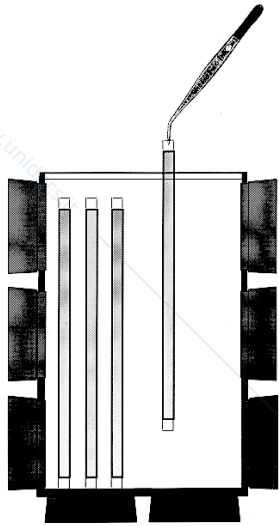
Immobiline DryStrip gel length (cm)	pH	Suitable sample load (µg of protein)	
		Silver stain (analytical)	Coomassie stain (preparative)
7	3-11 NL, 3-10 NL, 3-10	3-6	30-60
	4-7	4-8	25-150
	3-5.6 NL, 5.3-6.5, 6.2-7.5, 6-11, 7-11 NL	8-16	40-240
11	3-11 NL, 3-10	7-15	50-120
	4-7	10-20	50-300
	6-11, 3-5.6 NL, 5.3-6.5, 6.2-7.5, 7-11 NL	20-40	100-600
13	3-11 NL, 3-10 NL, 3-10	10-20	50-240
	4-7	15-30	75-450
	6-11 narrow and medium intervals†	30-60	150-900
18	3-11 NL, 3-10 NL, 3-10	20-40	100-500
	4-7	30-60	150-900
	6-11, 6-9, narrow and medium intervals‡	60-120	300-1500
24	3-11NL, 3-10 NL, 3-10	30-60	200-600
	4-7, 3-7 NL	45-90	200-1300
	6-9, narrow and medium intervals§	80-170	400-2000

ISOELETTROFOCALIZZAZIONE (IEF)

Separation of protein molecules by isoelectric focusing



ISOELETTROFOCALIZZAZIONE (IEF)

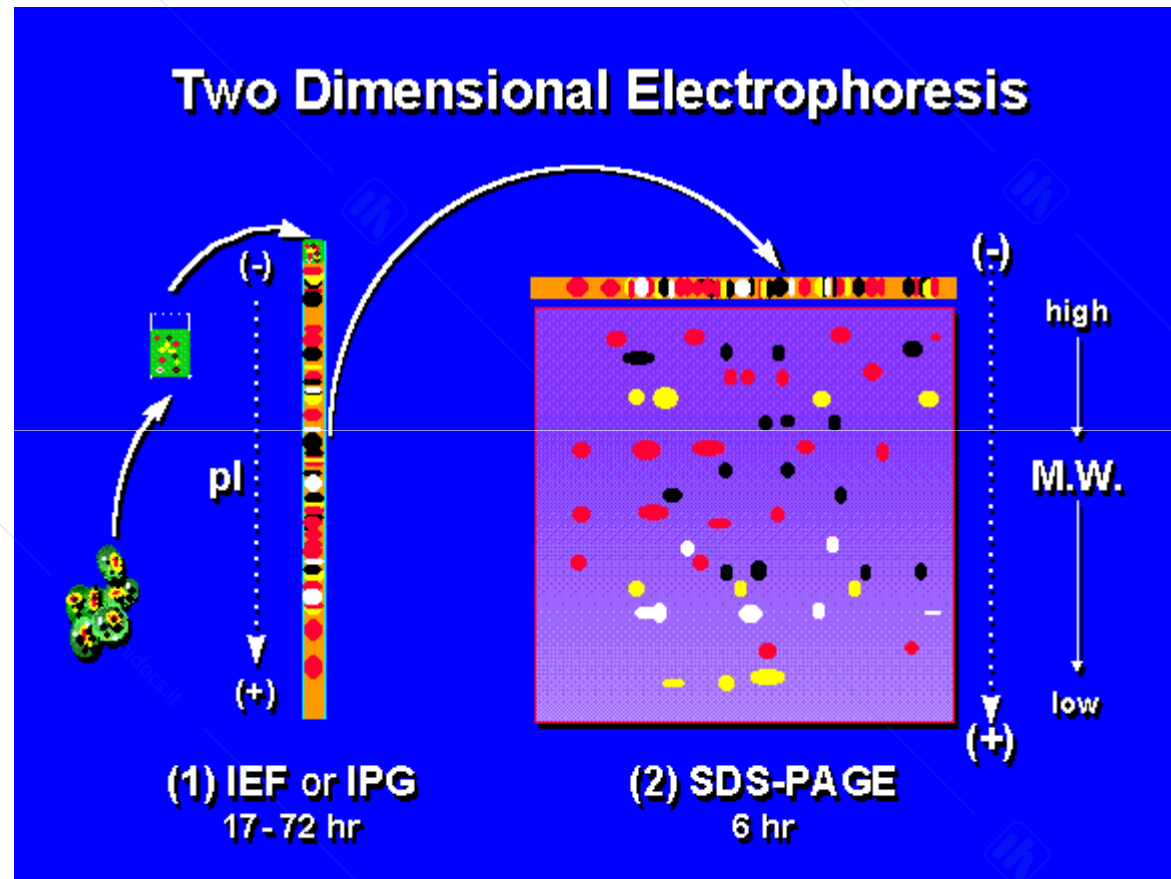
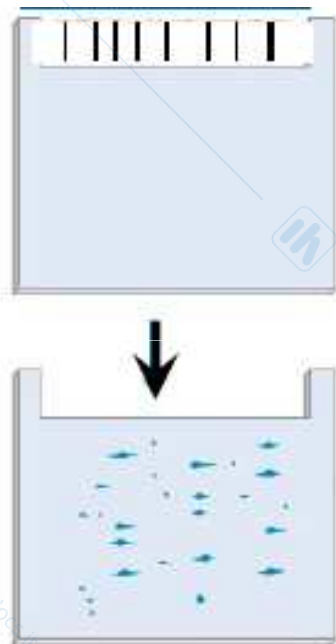


- ❖ Eccellente risoluzione ($\Delta pI < 0,01$ unità di pH), bande molto nette e sensibilità elevate;
- ❖ Largo intervallo di pI;
- ❖ Alto voltaggio (generalmente > 1000 V)



- ❖ **Combina** le caratteristiche della **IEF**, nella quale le proteine sono separate in base alla loro carica, con quella della **SDS-PAGE** classica, in cui le proteine sono separate in base alla loro massa.
- ❖ Tale combinazione consente di disporre di uno dei metodi analitici più sofisticati per la separazione di miscele proteiche complesse
 - ✓ 1°GEL: IEF su gel di poliacrilammide (IPG), con separazione proteica in base al diverso pI. Terminata la separazione la strip è incubata con SDS;
 - ✓ 2°GEL: il 1° GEL è posizionato adiacente ad un SDS-PAGE, fissato versando dell'agarosio sciolto nel tampone di corsa. Solidificato l'agarosio, può iniziare l'elettroforesi nella seconda dimensione e le proteine legate all'SDS entrano nel 2° gel e si separano sulla base del diverso peso molecolare.

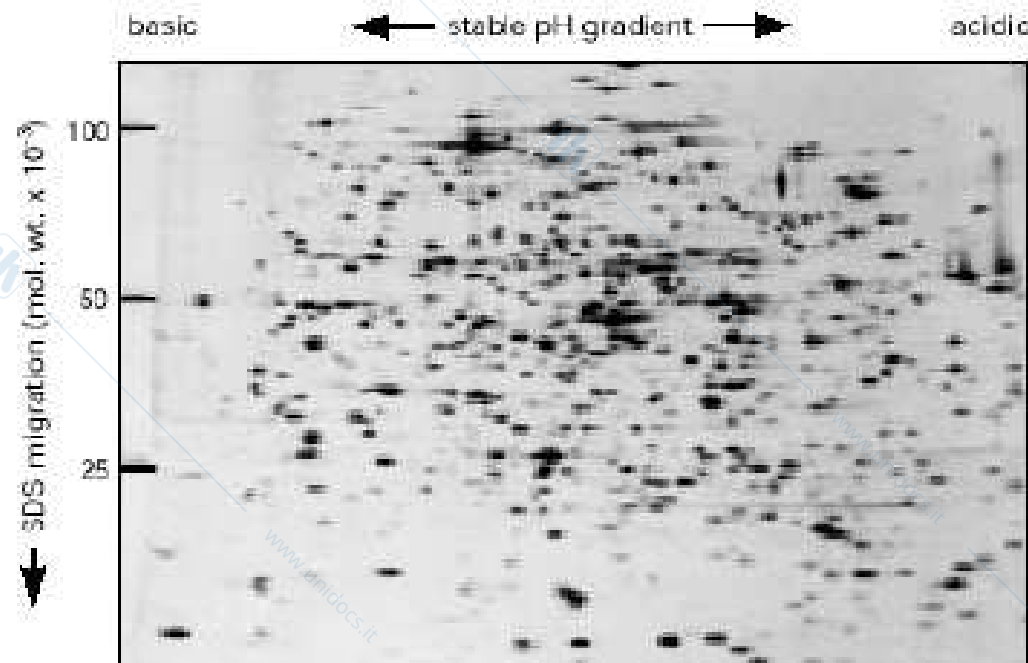
ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE (2D-PAGE)



E' possibile risolvere fino a 20000 proteine contenute in un estratto cellulare

ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE (2D-PAGE)

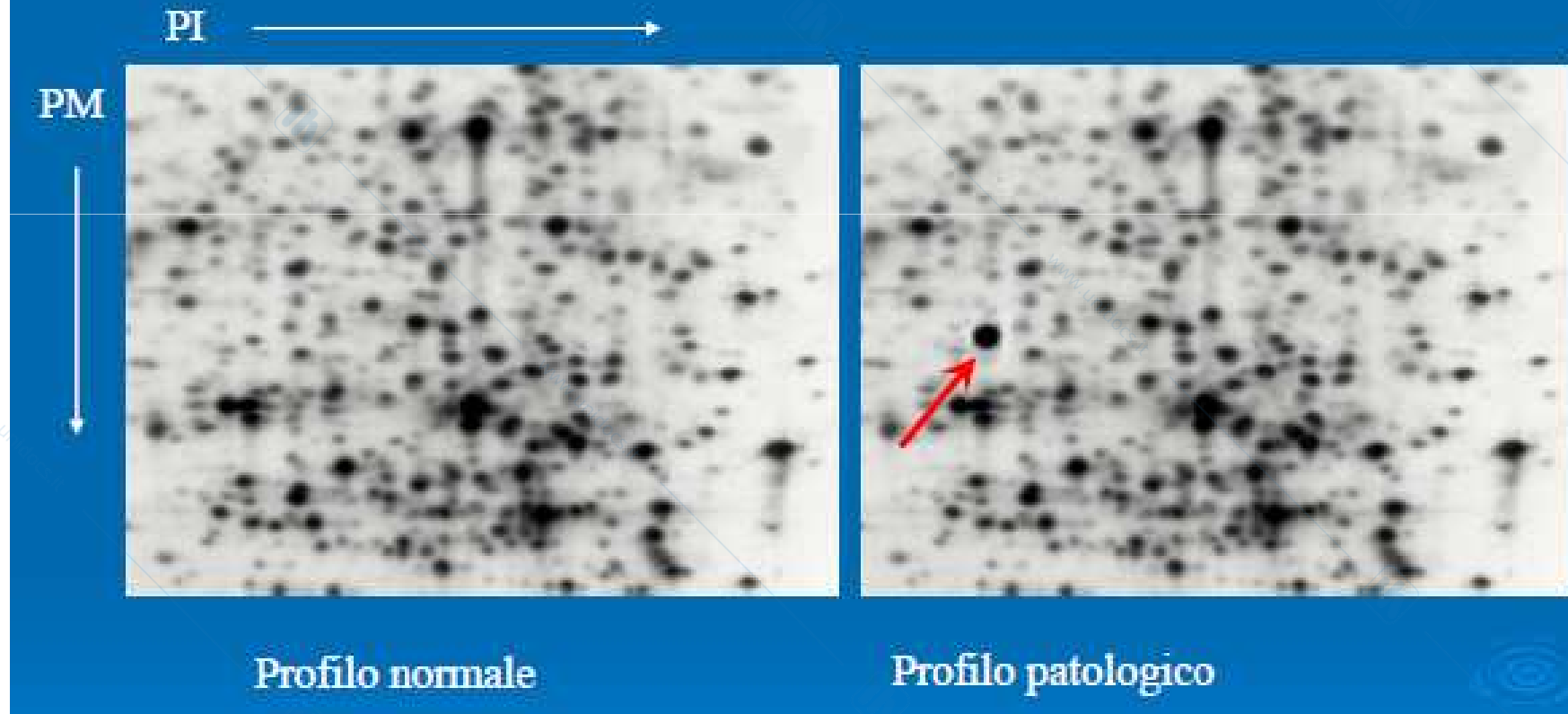
Elettroforesi 2D delle proteine contenute in una cellula batterica di *E. coli*



Ogni macchia corrisponde ad una catena polipeptidica; le proteine sono separate in accordo con il loro pI da sinistra a destra e in base alla massa molecolare dall'alto al basso.



Biomarker tumorali PSA, CA 125, etc



Profilo normale

Profilo patologico

ELETTROFORESI:

- ❖ Mieloma multiplo (γ -globuline)
- ❖ Gammopatie policlonali (β - e γ -globuline)
- ❖ Dislipoproteinemie (lipoproteine)
- ❖ Emoglobine normali e patologiche
- ❖ Composizione isoenzimatica dei liquidi biologici (siero, urine, saliva ecc.)

Tabella 3.2. Valori normali delle frazioni proteiche del siero di individui normali adulti, ottenuti mediante elettroforesi zonale.

Frazione	% del totale	Valori medi (g/dl)	± 2 S.D. (g/dl)
Albumina	45-70	4,2	3,2-5,2
a ₁ -globulina	2-5	0,2	0,1-0,3
a ₂ -globulina	8-14	0,8	0,6-1,0
b-globulina	10-15	0,9	0,7-1,1
g-globulina	11-22	1,2	0,8-1,6
Proteine totali		7,3	6,3-8,3

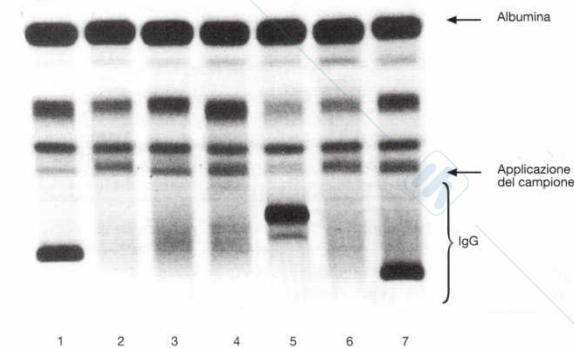


Figura 3.15 – Elettroforesi su gel di agarosio di siero umano. I pozzetti 2, 3, 4 e 6 mostrano profili proteici di siero normale. I pozzetti 1, 5 e 7 mostrano profili proteici di pazienti affetti da mieloma, identificabili per la eccessiva produzione di anticorpo monoclonale nella frazione IgG.

