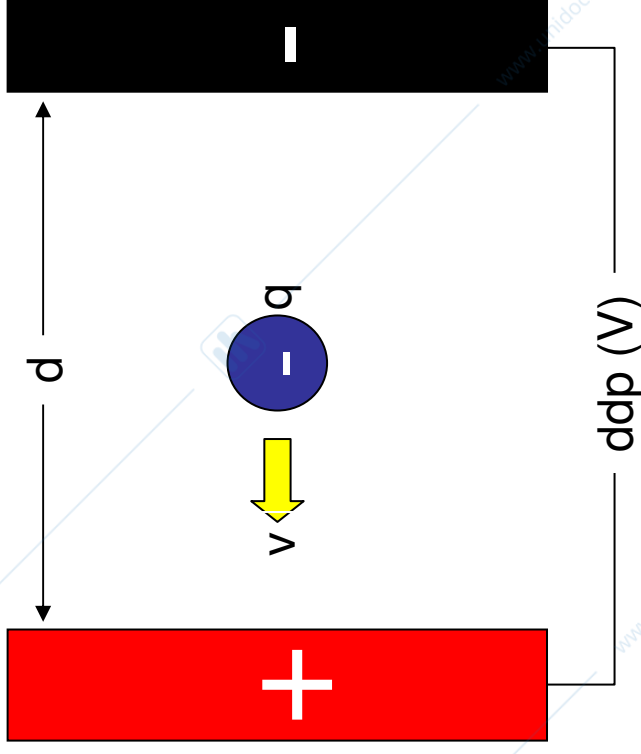


ELETTROFORESI – principi generali

Una molecola con una carica netta non nulla posta tra due elettrodi di segno opposto migra verso l'elettrodo con segno opposto alla sua carica netta



ddp (V): differenza di potenziale applicata tra gli elettrodi

d: distanza tra gli elettrodi

q: carica della molecola

E (campo elettrico) = V/d

La molecola si muove verso l'elettrodo di segno opposto con una velocità (v) che è proporzionale all'entità del campo elettrico (V) e della sua carica (q) e inversamente proporzionale all'attrito che incontra nel muoversi (f – coefficiente d'attrito)

$$v = Eq/f$$

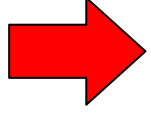
ELETTROFORESI – principi generali

Molecole biologiche presentano gruppi acidi o basici che sono quindi ionizzabili

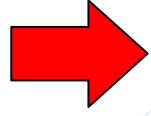
Per essere analizzata in elettroforesi una molecola deve avere una carica non nulla



pH del mezzo in cui sono in soluzione le molecole deve condizionare la loro carica
(**soluzione tampone**)



N° di ioni non basso
ioni dati dalle proteine (spesso trascurabili come entità numerica)
ioni dati dai costituenti del tampone: non trascurabili



Applicare una ddp (V) in un mezzo che contiene ioni equivale a generare una corrente (I) che è inversamente proporzionale alla resistenza (R) del mezzo stesso

$$V=RI \text{ (legge di Ohm)} \Rightarrow I = V/R$$

ELETTROFORESI – principi generali

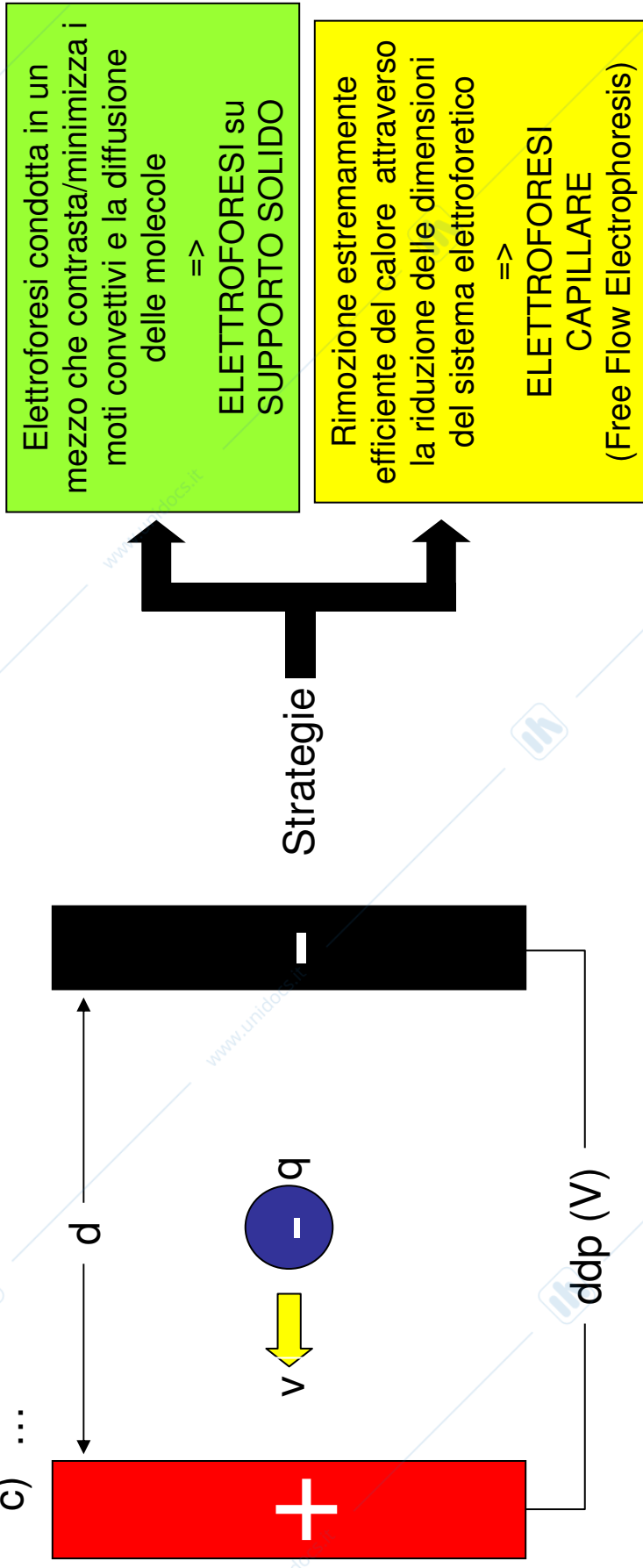
Per la legge di Joule in un sistema elettrico caratterizzato da una resistenza R e nel quale viene fatta passare una corrente I si sviluppa sotto forma di **calore** una potenza che è data da

$$W = VI = I^2R$$

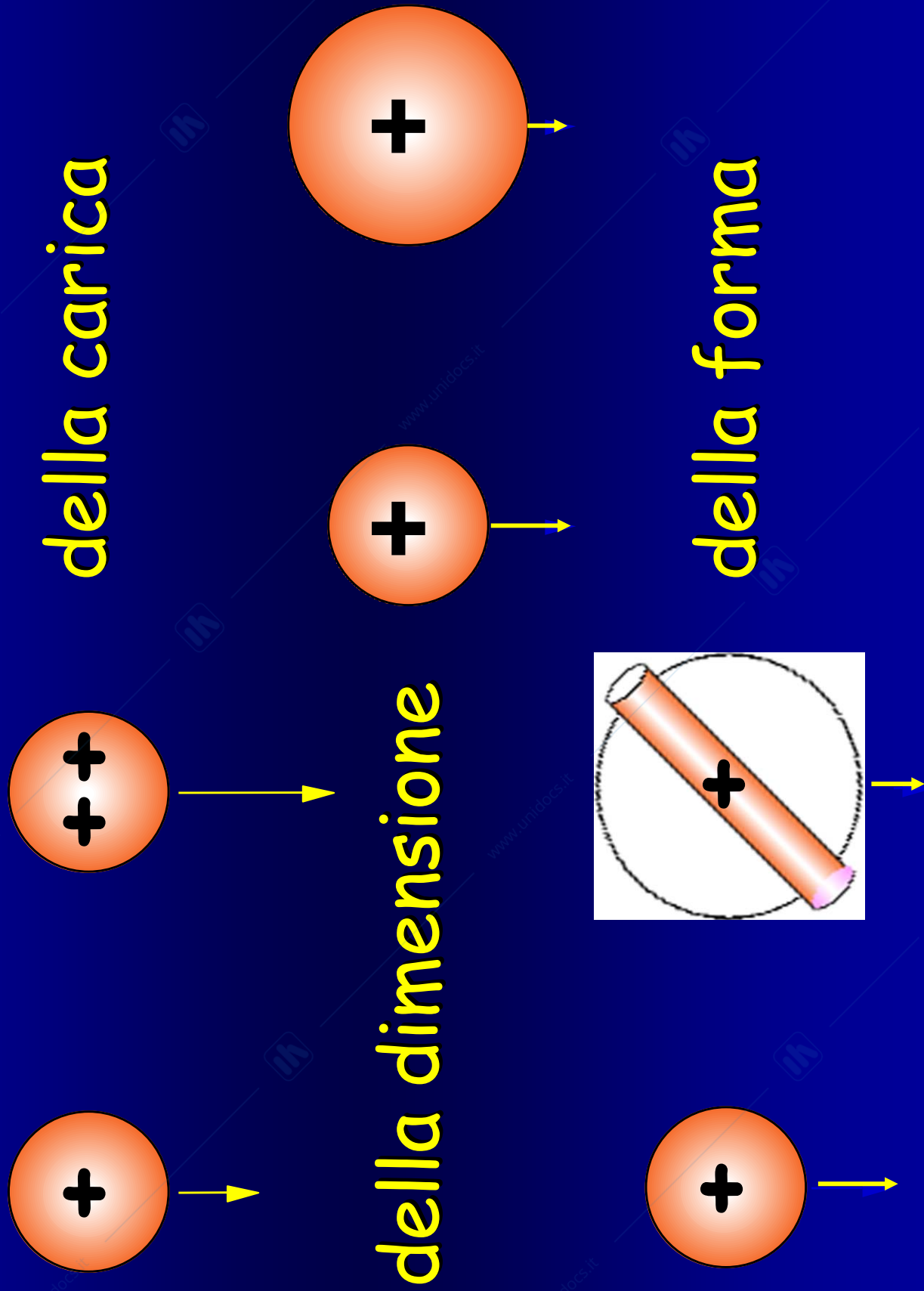
Cosa provoca il calore in un sistema del genere?

- a) Moti convettivi nel sistema
- b) Aumento diffusione molecole
- c) ...

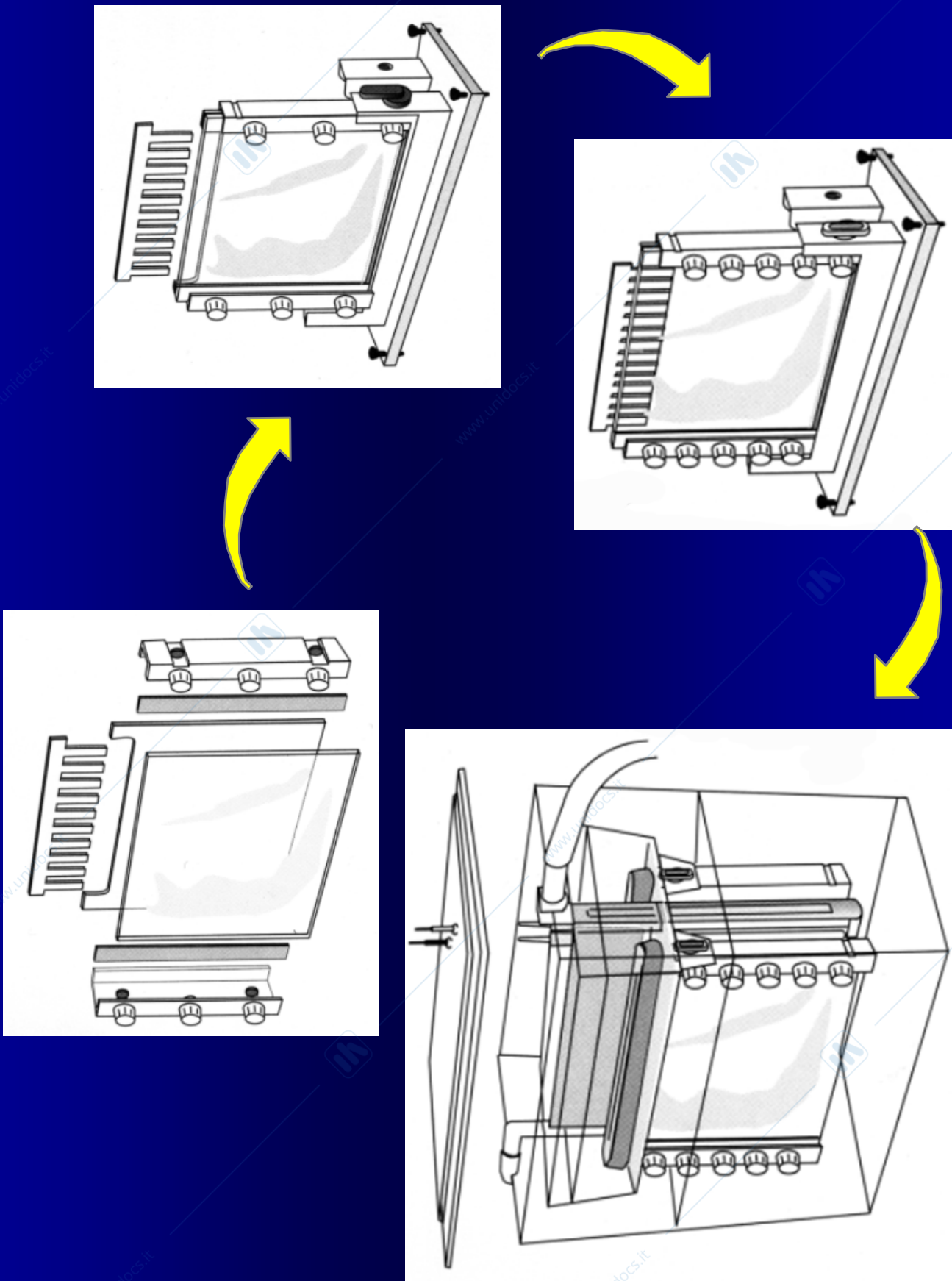
Effetto negativo sulla separazione delle molecole
– Risoluzione -



Fattori che influenzano la mobilità elettroforetica



cella elettroforetica verticale

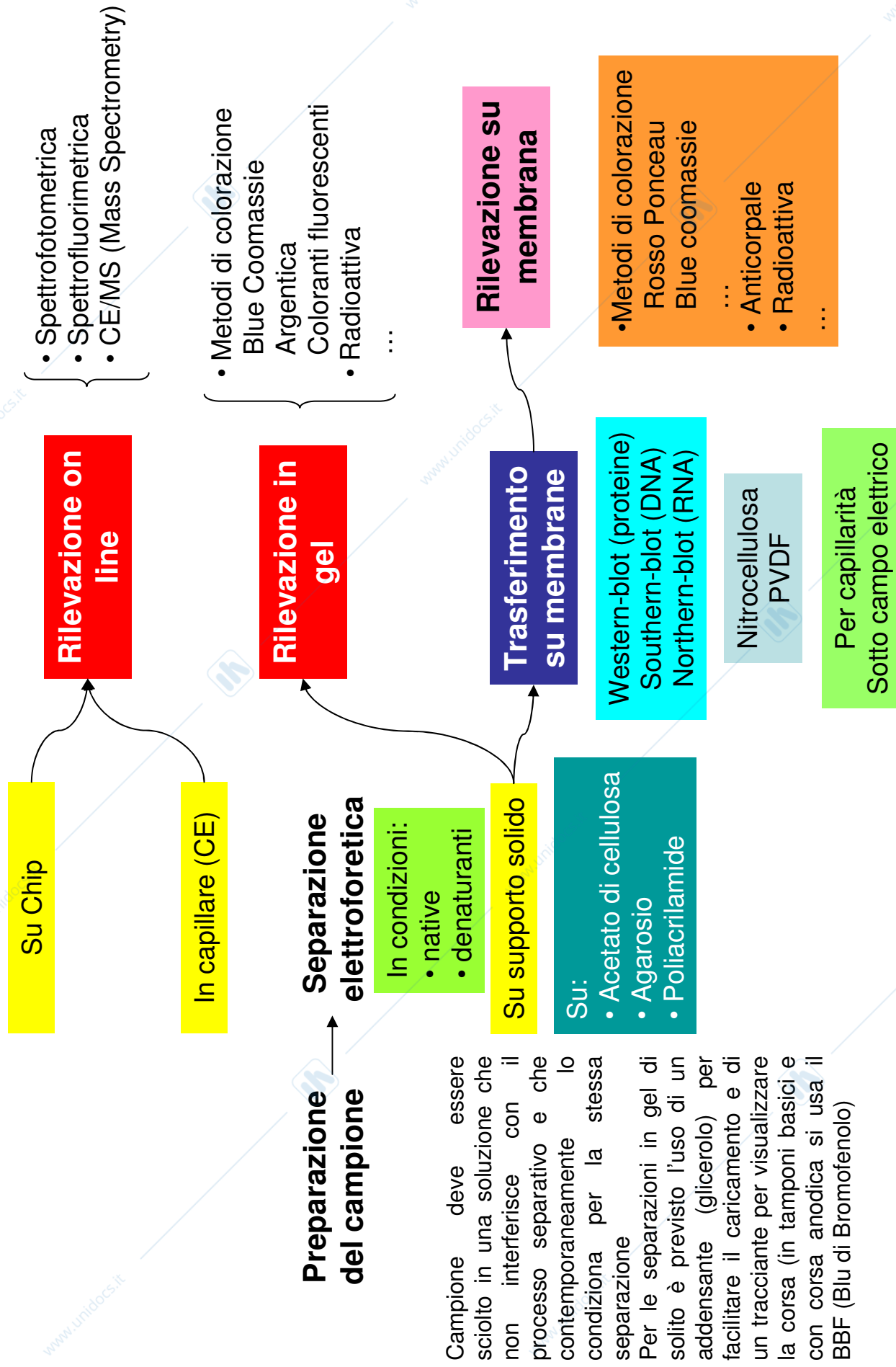


cella elettroforetica orizzontale



CELLA DI ELETTROFORESI

Analisi elettroforetica – workflow -



Elettroforesi su supporti solidi

“Su fogli sottili”

⇒ Carta

⇒ Acetato di cellulosa

⇒ Strati sottili di silice, cellulosa, etc.
su supporti solidi
(TLE Thin Layer Electrophoresis)

L'elettroforesi su acetato di cellulosa, che pur essendo una metodica che non raggiunge le risoluzioni ottenibili con i più moderni gel di poliacrilamide ed agarosio, riveste ancora un ruolo in ambito clinico per la valutazione delle proteine del siero ed altre specifiche applicazioni.

Metodiche relativamente veloci

⇒

Buona applicabilità in campo diagnostico/clinico
(test rapidi)

“In Gel”

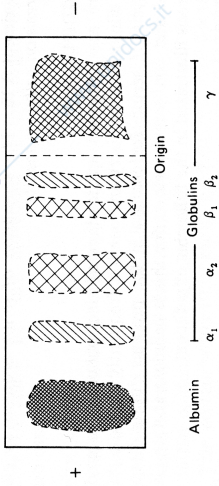
⇒ Gel di agarosio

⇒ Gel di poliacrilamide

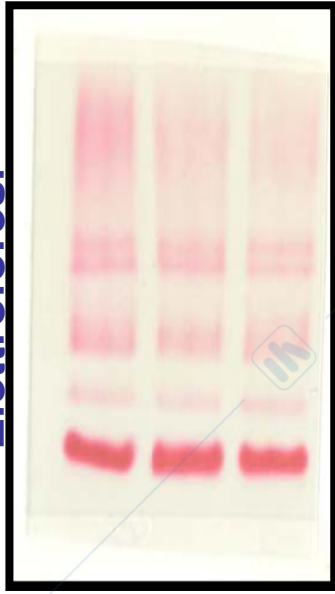
L'elettroforesi su gel di agarosio e su gel di poliacrilamide offrono una buona risoluzione e vengono comunemente impiegati nei laboratori di ricerca rispettivamente soprattutto per l'analisi di DNA e delle proteine.

L'elevato tempo richiesto per effettuare una corsa con queste metodiche non li rende attrattivi per quel che concerne un uso diagnostico ad alta processività.

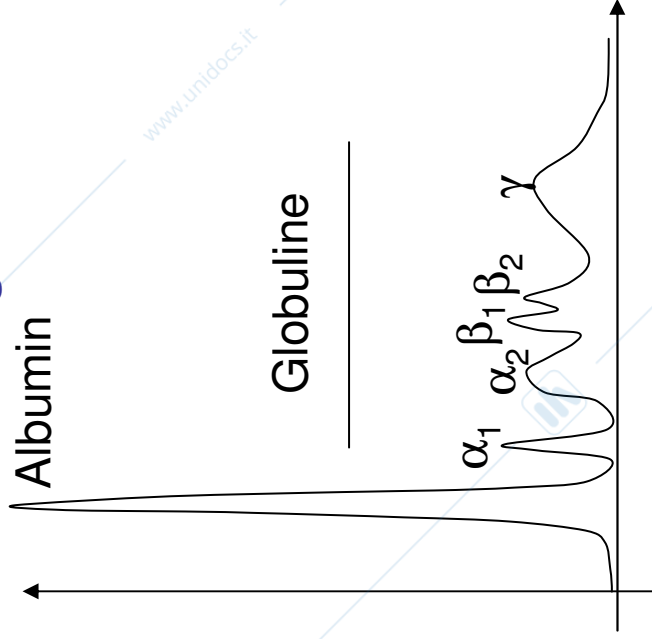
Elettroforesi (schema)



Elettroforesi



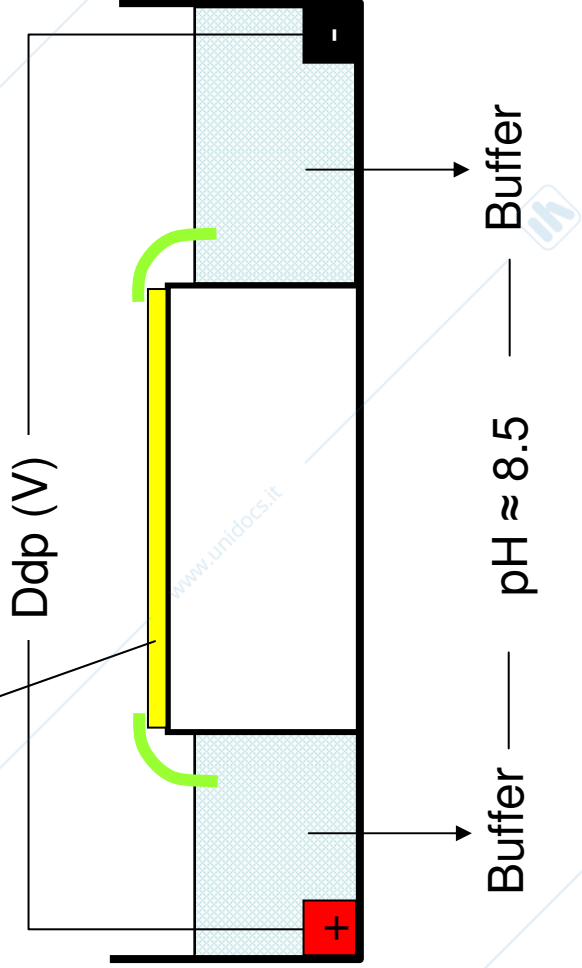
Elettroferogramma



Elettroforesi su acetato di cellulosa

Campione viene depositato sulla superficie del supporto di acetato di cellulosa che è imbibito del tampone di corsa e successivamente viene applicata la ddp. Il pH del tampone determina la carica delle molecole che si separano secondo il loro rapporto m/z e l'attrito che incontrano nel muoversi.

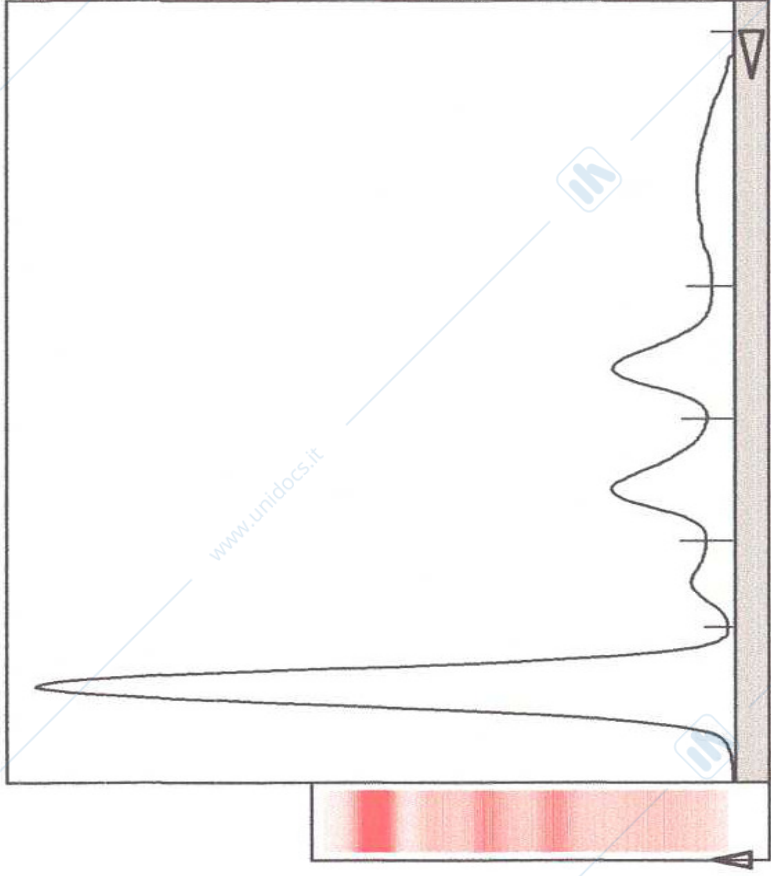
Striscia di acetato di cellulosa



Analisi condotta in circa 15 minuti

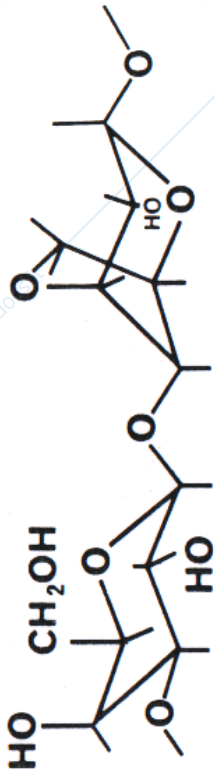
Esempio di un referto riguardante le Sieroproteine

Frazioni	%	% Normale	g/dl
Albumina	55,3	52,0-68,0	4,04
Alfa1	4,6	2,0- 5,0	0,34
Alfa2	14,6	6,6-13,5	1,07
Beta	14,3	8,5-14,5	1,04
Gamma	11,2	11,0-21,0	0,82
Prot. Tot. (g/dl)		(6,00-8,00)	7,30
Rapp. A/G 1,24			

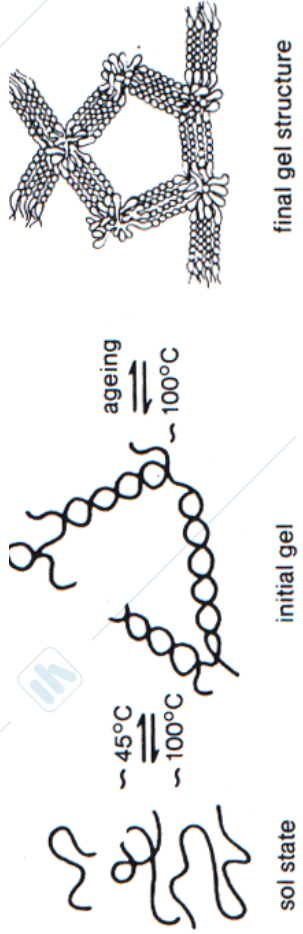


Alcune patologie sono caratterizzate da specifiche alterazioni del profilo elettroforetico delle proteine del siero. Sono in commercio anche kit per la valutazione di proteine urinarie, lipoproteine, emoglobine, etc.

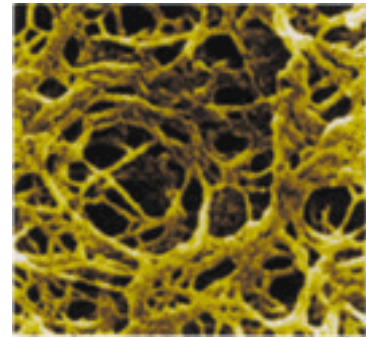
Gel di Agarosio



Polimero di D-galattosio
e
3,6 anidro L-galattosio

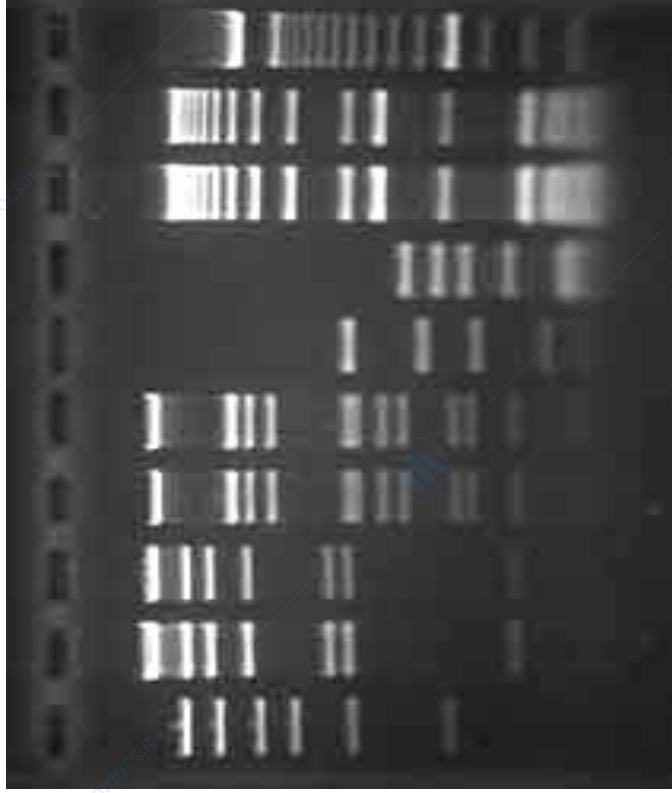


Transizione di stato
(macroreticolo sulla base di legami idrogeno)
Transizione gel-sol tramite riscaldamento
Agarosio modificato mediante aggiunta di gruppi CH₃ sui gruppi OH ha temperature di transizione minori (low melting agarose)



Reticolo di agarosio polimerizzato
"setaccio molecolare"

Gel di Agarosio – Separazione molecole di DNA

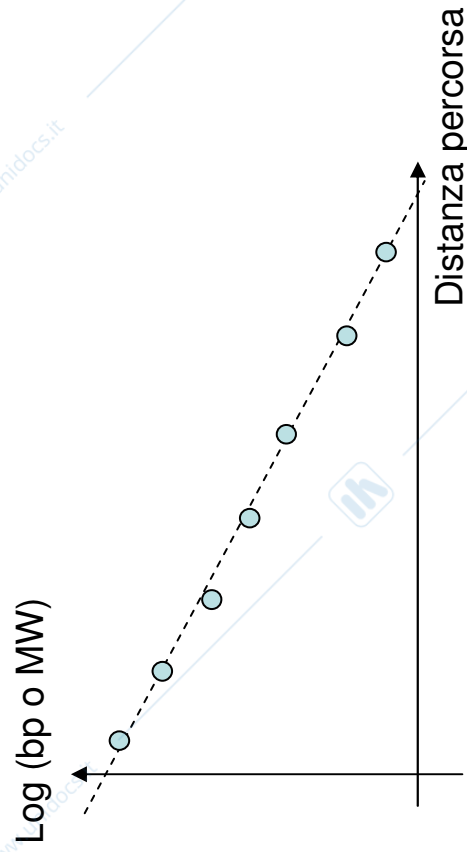


Molecole di DNA, essendo costituite da unità ripetitive recanti ciascuna la stessa carica, hanno tutte lo stesso rapporto massa/carica.

Se messe in una soluzione e poste sotto l'azione di un campo elettrico esse migrerebbero sostanzialmente alla stessa velocità, indipendentemente dalla loro grandezza.

Se la migrazione viene fatta avvenire in un setaccio molecolare esse si separano in base all'attrito/difficoltà che incontrano nel muoversi lungo la matrice stessa.

Molecole di piccole dimensioni (numero di paia di basi minori) presenteranno una migrazione elettroforetica maggiore rispetto a molecole più grandi (numero di paia di basi maggiore)



Tipiche condizioni di corsa:

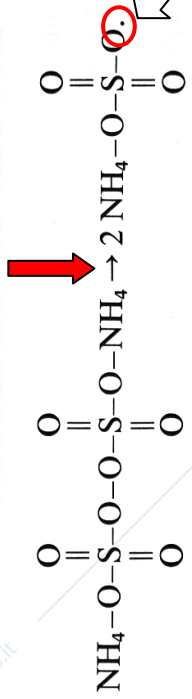
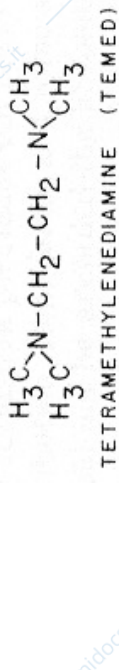
Tampone: TAE o TBE (Tris/Acetato/EDTA o Tris/Borato/EDTA) – pH circa 8
ddp: circa 5 V/cm

% Agarosio: dal 0.5 al 1-2%

Visualizzazione tramite intercalazione di Etidio Bromuro (fluorescenza su transilluminatore UV)

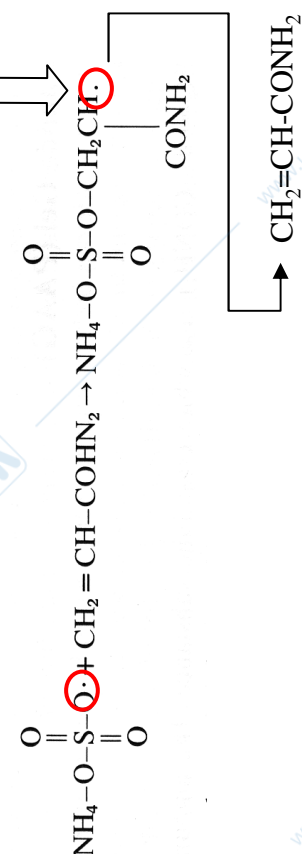
Polimerizzazione di un gel di poliacrilamide

(APS + TEMED + Acrilamide + Bis-Acrilamide)



Radicale libero

Radicale libero



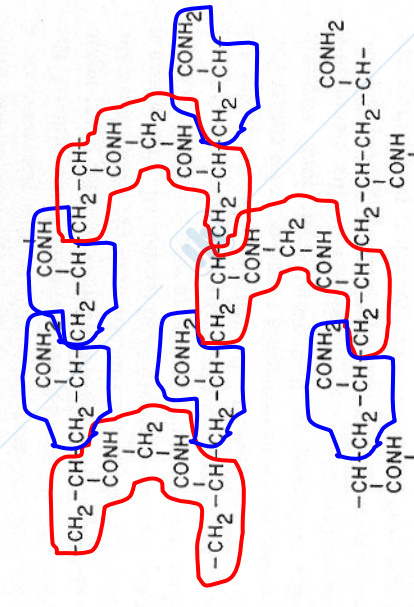
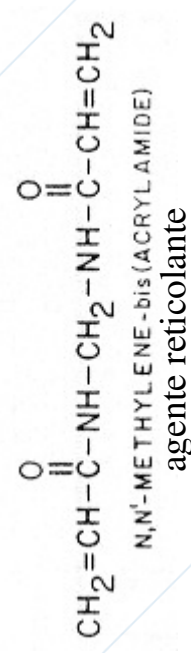
T: (g acril. + g bis-acril.) / volume (espressa come percentuale)
x grammi/100 ml => x %

C: g bis-acrilamide / (g bis-acril. + g acril.) (espressa come percentuale)
y grammi bis-acril / 100 gr (bis-acril. + acril.) => y %

T e C devono essere determinati empiricamente. Nella IEF, si usano bassi valori (soprattutto per quanto concerne T; T=4%, C=3%) poiché le proteine devono essere libere di raggiungere la zona dove il pH del gel è uguale al loro pI. In altre metodiche elettroforetiche, la frizione che le molecole incontrano muovendosi durante la corsa elettroforetica è parte integrante del processo separativo => è opportuno valutare quali siano le migliori combinazioni di T e C per ottenere una buona separazione.



Catena di poli(acrilamide) reticolata senza la presenza di un agente reticolante



Catena di poli(acrilamide) reticolata in presenza di un agente reticolante ("bis-acrilamide")

Elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE) - Proteine

Native

Viene mantenuta la struttura secondaria / terziaria ed eventualmente quaternaria delle proteine (o di loro complessi con altre molecole come ad esempio il DNA)

Condizioni:

Si opera con tamponi ad un pH non lontano dalla neutralità.

Si evita assolutamente il riscaldamento del sistema cromatografico che può causare la denaturazione delle proteine/complessi per effetto termico

Non è possibile utilizzare detergenti non-ionici né tanto meno ionici, come anche non si possono utilizzare sostanze riducenti.

La migrazione elettroforetica è influenzata sia dalla carica della molecola che dall'ingombro sterico della stessa che comporta un rallentamento a causa dell'effetto setaccio del gel in cui avviene la migrazione.

Non si possono fare alcune ipotesi circa il peso molecolare delle proteine analizzate.

Condizioni

La struttura secondaria / terziaria ed eventualmente quaternaria delle proteine viene persa a causa dell'utilizzo di detergenti (i.e. SDS) o agenti denaturanti (i.e. UREA).

Condizioni:

Possono essere adottati tamponi di corsa anche a pH lontani dalla neutralità.

Generalmente è accettabile un blando riscaldamento del sistema elettroforetico.

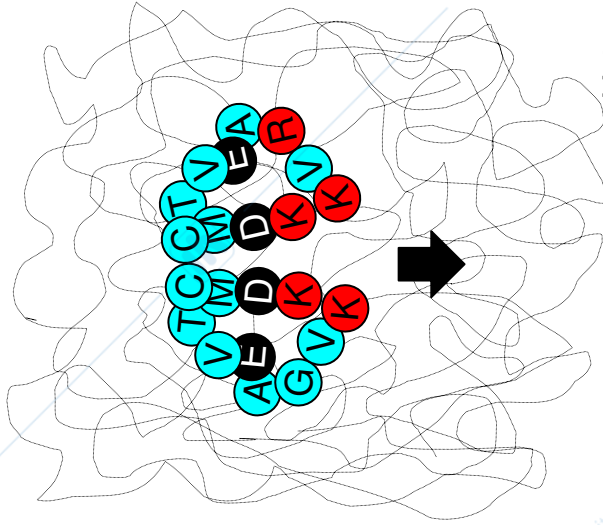
Si fa in modo che eventuali dimeri o complessi macromolecolari uniti da ponti disolfuro vengano rotti per azione di agenti riducenti (DTT o beta-mercaptoetanolo).

Nel caso in cui non vengano utilizzati detergenti ionici la migrazione è influenzata dalla carica della molecola e dall'attrito che essa incontra muovendosi nel gel, con la differenza rispetto ai gel nativi che l'attrito non è collegato alla sua struttura secondaria/terziaria né tanto meno quaternaria ma solo all'estensione della sua struttura primaria. Nel caso si utilizzino dei detergenti ionici questi vanno a conferire sostanzialmente a tutte le proteine il medesimo rapporto m/z e pertanto esse si separano in base al loro peso molecolare

Elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE) - Proteine

NON NATIVA

NATIVA

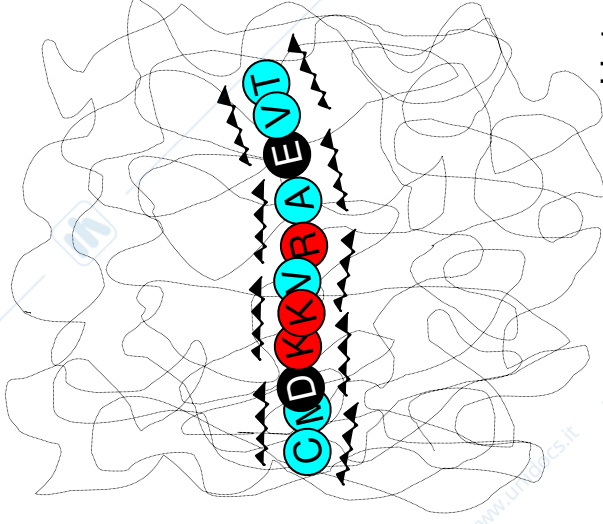


pH 8



- z (carica): propria
- Struttura mantenuta (I, II, III, IV)
- Separazione:
 - Effetto setaccio su struttura II, III e IV
 - Carica

Detergenti/agenti caotropici non ionici

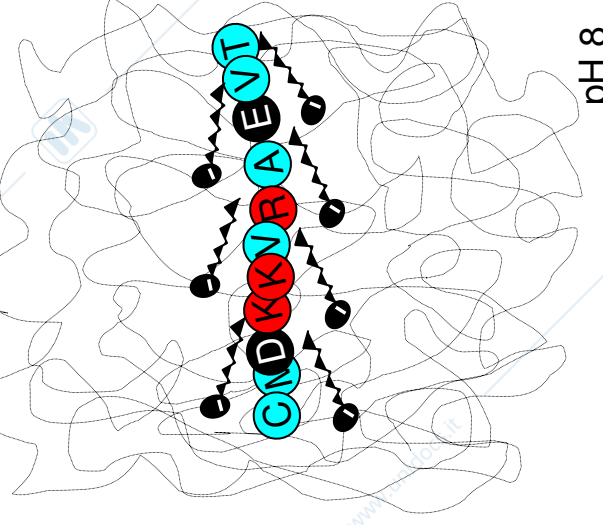


pH 4
UREA
DTT



- z (carica): propria
- Struttura mantenuta (I)
- Separazione:
 - Effetto setaccio su struttura I
 - Carica
- Entro certi limiti si può dire dipendente dal rapporto m/z

Detergenti/agenti caotropici ionici



pH 8
SDS
DTT



- Z (carica): imposta
- Struttura mantenuta (I)
- Separazione:
 - Effetto setaccio su struttura I
- Entro certi limiti si può dire dipendente da m (massa)

Elettroforesi

Tris/Glicine-PAGE

25 mM Tris
192 mM Glicine

Scelta iniziale per lo studio di proteine nella loro conformazione nativa

EMSA

(Electro-Mobility-Shift-Assay)

Tris/Borate/EDTA buffer – TBE
Analisi di complessi DNA/proteina

E' una tecnica che si basa sul ritardo nella migrazione anodica del DNA quando questo è legato a una proteina; anche nota come Band Shift

Blue Native Gel

Analisi di complessi proteici e di proteine a bassa solubilità (come ad esempio proteine di membrana)

Tecnica molto particolare che si basa sul fatto che viene aggiunto il Blue Coomassie al tampone di corsa (catodico) e questo si lega alle proteine e conferisce loro una carica negativa che le fa migrare verso l'anodo ma contemporaneamente non le denatura.

Acido Acetico/Urea
(AU PAGE)

1M Acido acetico
8M Urea

Triton X-100/Acido Acetico/Urea
(TAU PAGE)

1M Acido acetico
8M Urea
0.5% Triton X-100

AU e AUT PAGE costituiscono una metodica analitica che fornisce ottimi risultati per analisi di proteine fortemente basiche come ad esempio gli istoni

Isoelettrofocalizzazione

-Corso proteomica-

Metodica elettroforetica che separa le proteine in base al loro punto isoelettrico

SDS-PAGE
25 mM Tris
192 mM Glicine
0.1% SDS

-Corso proteomica-

E' la metodica elettroforetica in assoluto più diffusa nei laboratori che si occupano di proteine.
Separa le proteine in base al loro peso molecolare – attenzione -

Acido Acetico/Urea/CTAB
(AUC PAGE)

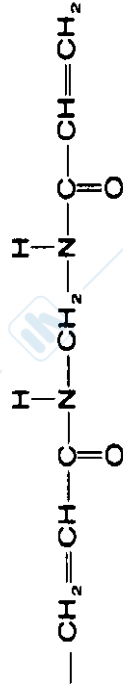
1M Acido acetico
8M Urea
0.15% CTAB

Anche questa metodica, come la AU e la AUT è sfruttata soprattutto per lo studio di proteine basiche e prevede l'utilizzo di un detergente (CTAB) carico positivamente.

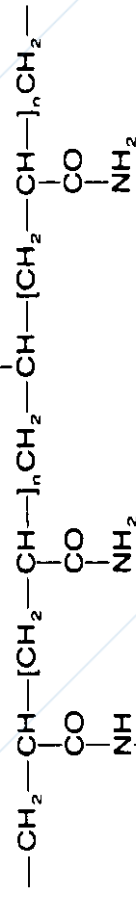
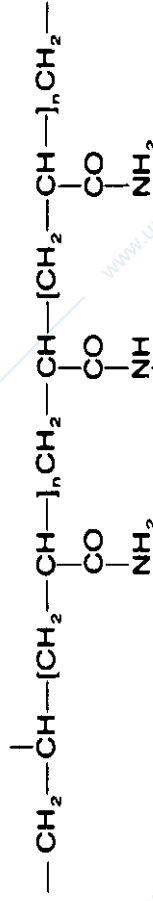
Gel di poliacrilamide (PAGE)



Monomero di acrilamide



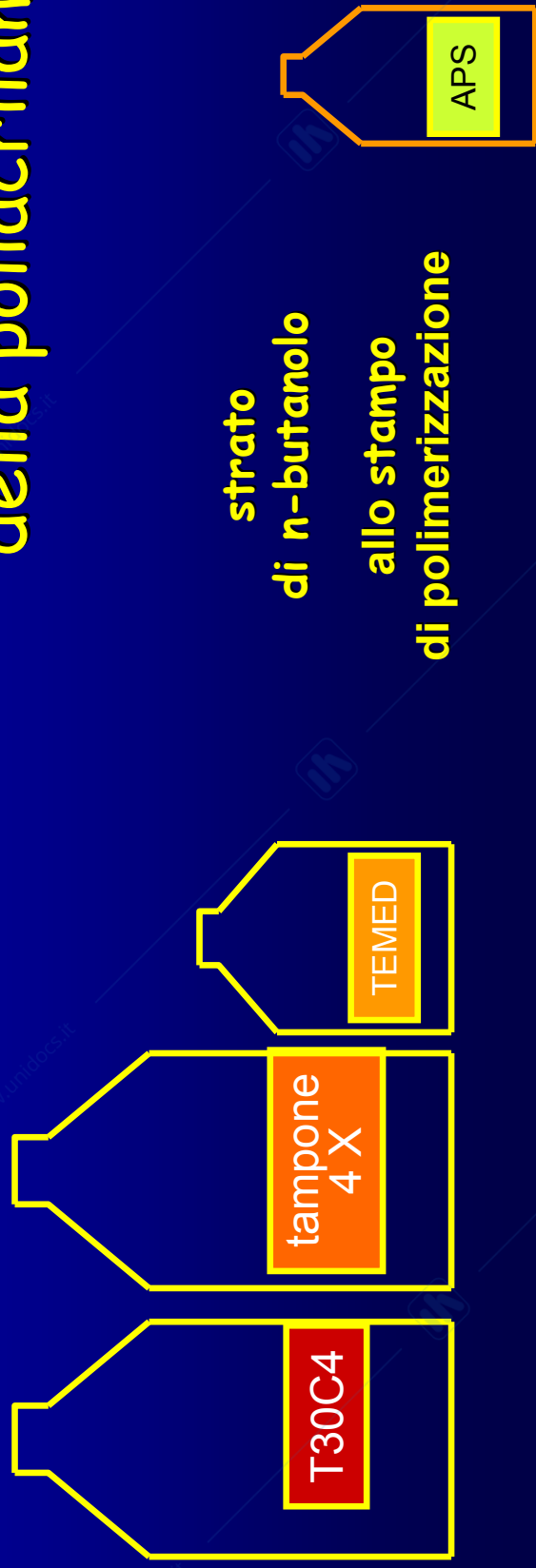
N,N'-methylenebisacrylamide



cross-linked
polyacrylamide

Attenzione: L'acrilamide è neurotossica, si accumula e può venire assorbita attraverso la pelle: usate i guanti!!
Dopo la polimerizzazione, la tossicità può essere legata ad eventuali residui non polimerizzati.

passaggi nella polimerizzazione della poliaccrilamide



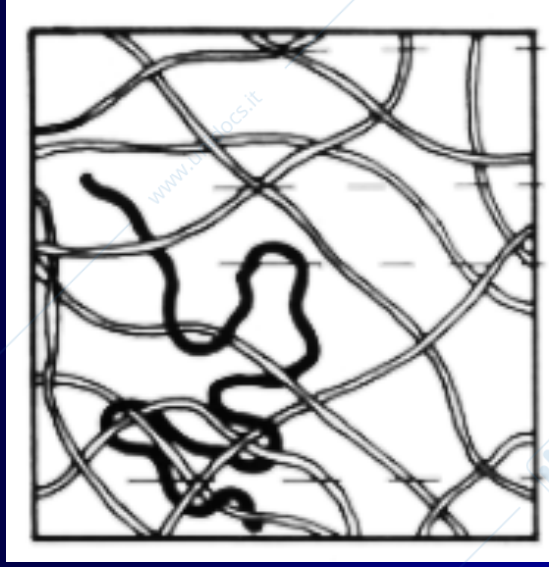
strato
di n-butanolo
allo stampo
di polimerizzazione

l'ossigeno molecolare (diradicale singolo) inibisce la polimerizzazione

Effetto setacciante della matrice

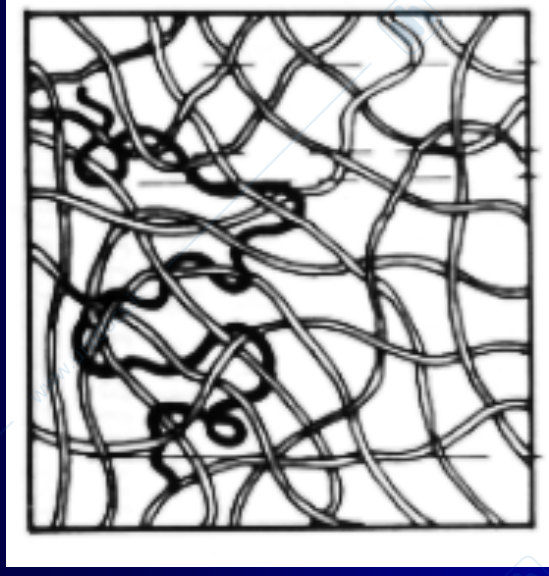
↑ maggiore
porosità

↓ minore effetto
di setacciamento



↓ minore porosità

↑ maggiore effetto
di setacciamento



tipo di gel	AGAROSIO	PAA
<i>chimica</i>	polisaccaride naturale	polimero sintetico
<i>legami che stabilizzano la struttura del gel</i>	legami a idrogeno; transizione reversibile sol-gel in seguito a cambiamenti di temperatura	legami covalenti
<i>preparazione del gel</i>	riscaldamento-raffreddamento	polimerizzazione mediata da radicali a partire da monomeri mono- e bifunzionali
<i>concentrazioni tipiche</i>	0.5-1.5%	5-20%
<i>dimensioni dei pori</i>	non setaccianti	setaccianti
<i>gruppi carichi</i>	alcuni -COOH e -SO ₄ H	nessuno
<i>proprietà meccaniche</i>	scadenti	buone

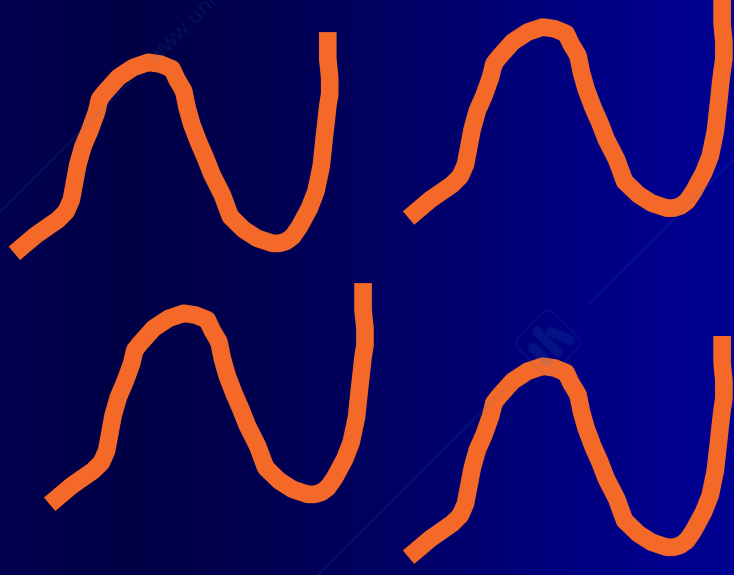
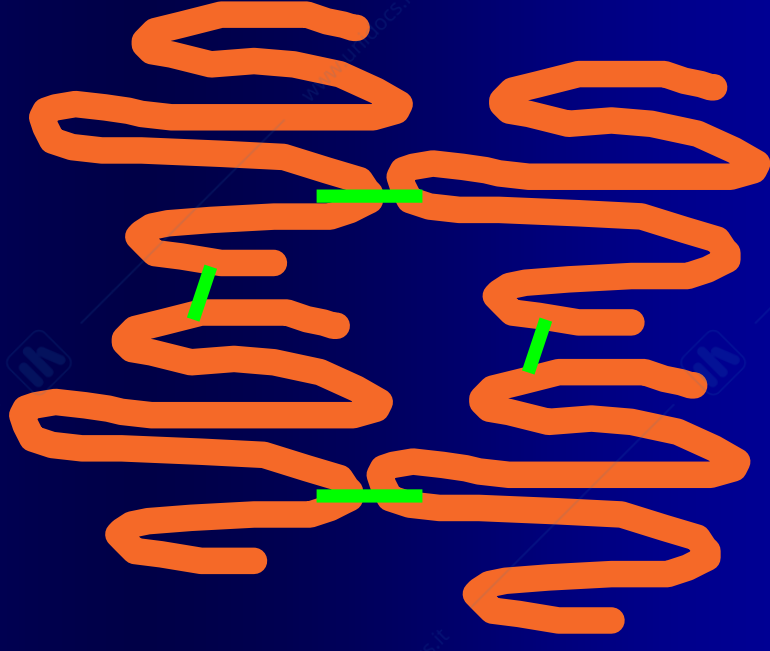
SDS-PAGE

Elettroforesi in gel poliacrilamide in
presenza di sodio dodecilsolfato

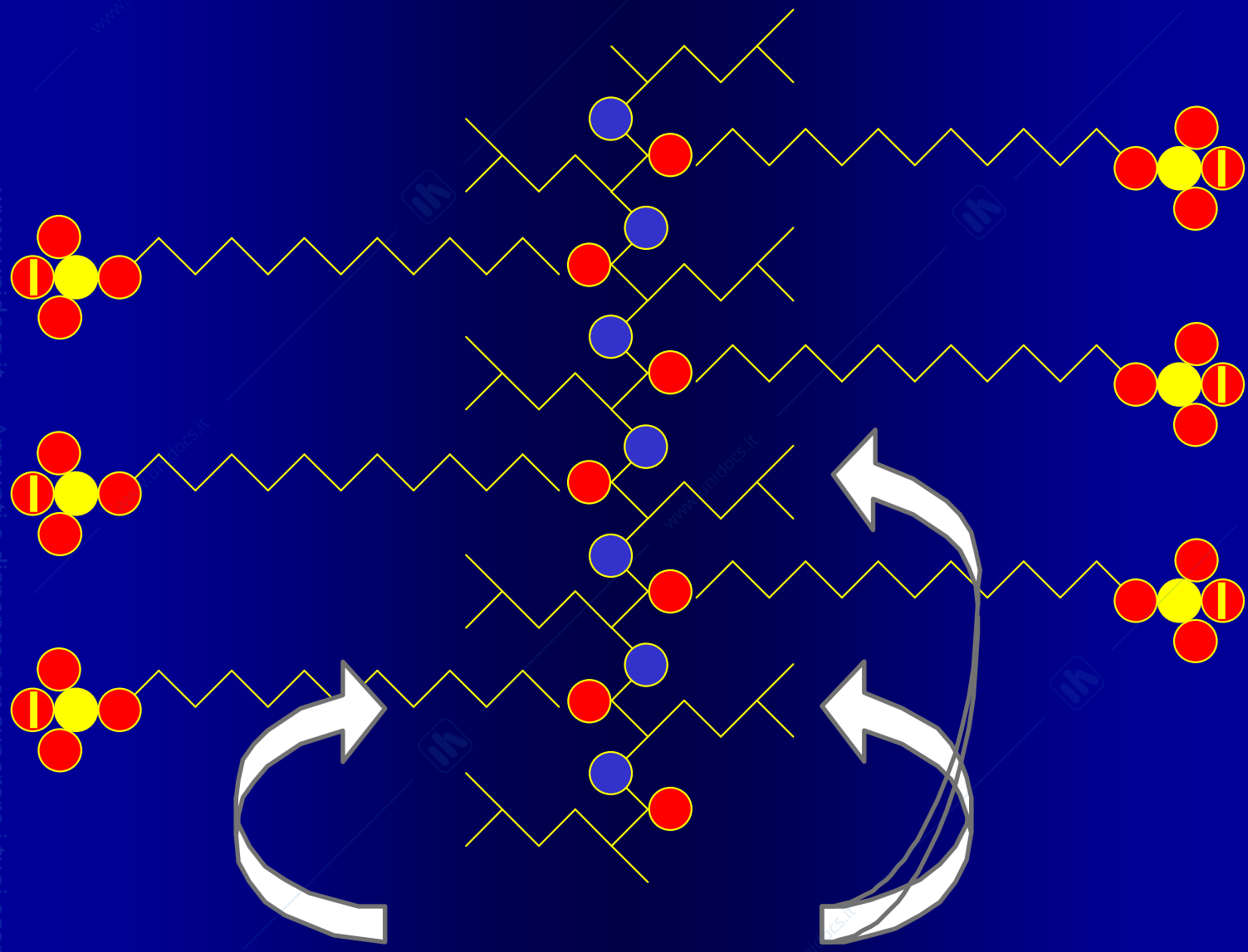
Denaturazione per
perdita di struttura secondaria e
terziaria
destrutturazione = unfolding



**Denaturazione per
perdita della struttura quaternaria:
dissociazione (β -mercaptoetanolo)**

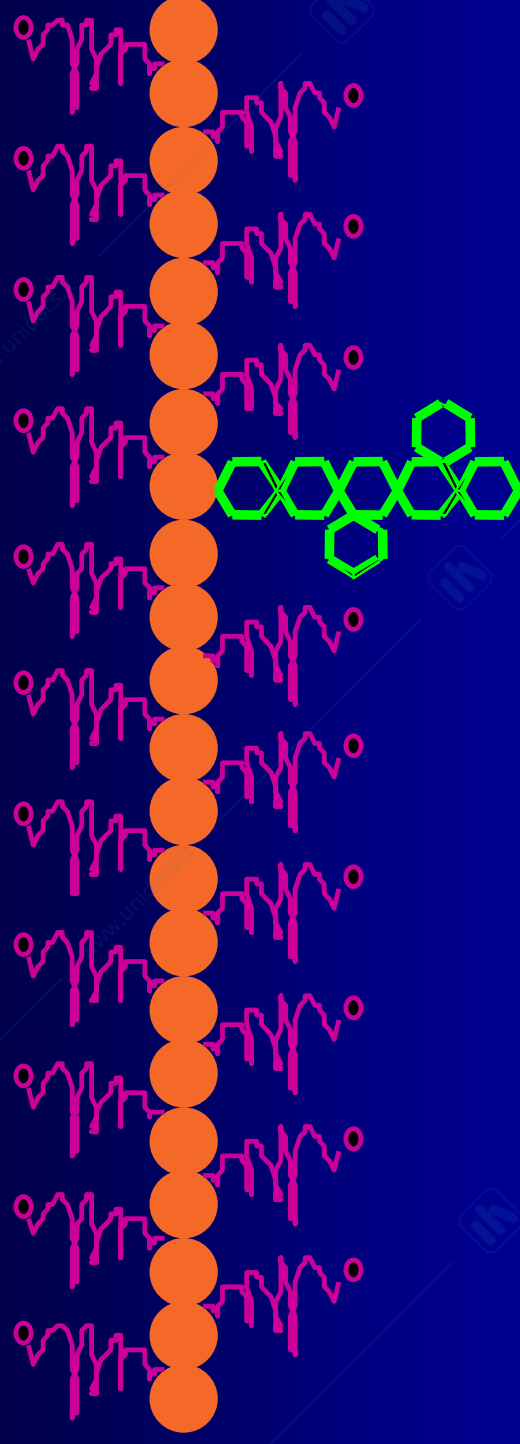


**schema
di un
polipeptide
saturato da
SDS:
1 molecola
di detergente
ogni 2 residui
di aminoacidi**



Glicoproteine

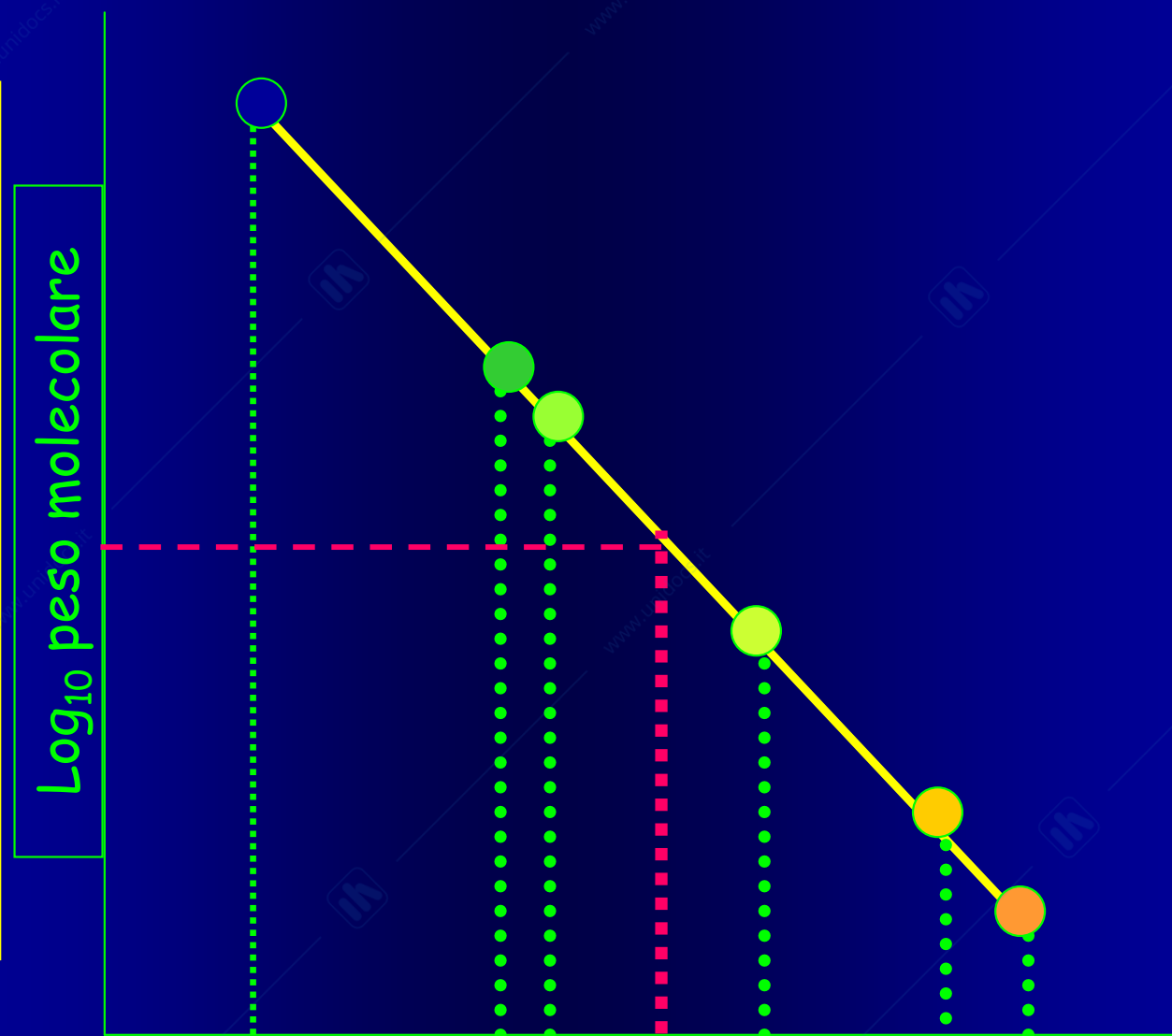
la presenza delle catene glucidiche causa una migrazione anomala



Teoria della separazione

L'SDS impartisce alla proteina una carica **uniforme** per unità di massa, pertanto la separazione avviene sulla base delle sue dimensioni molecolari

costruzione della curva di calibrazione



migrazione



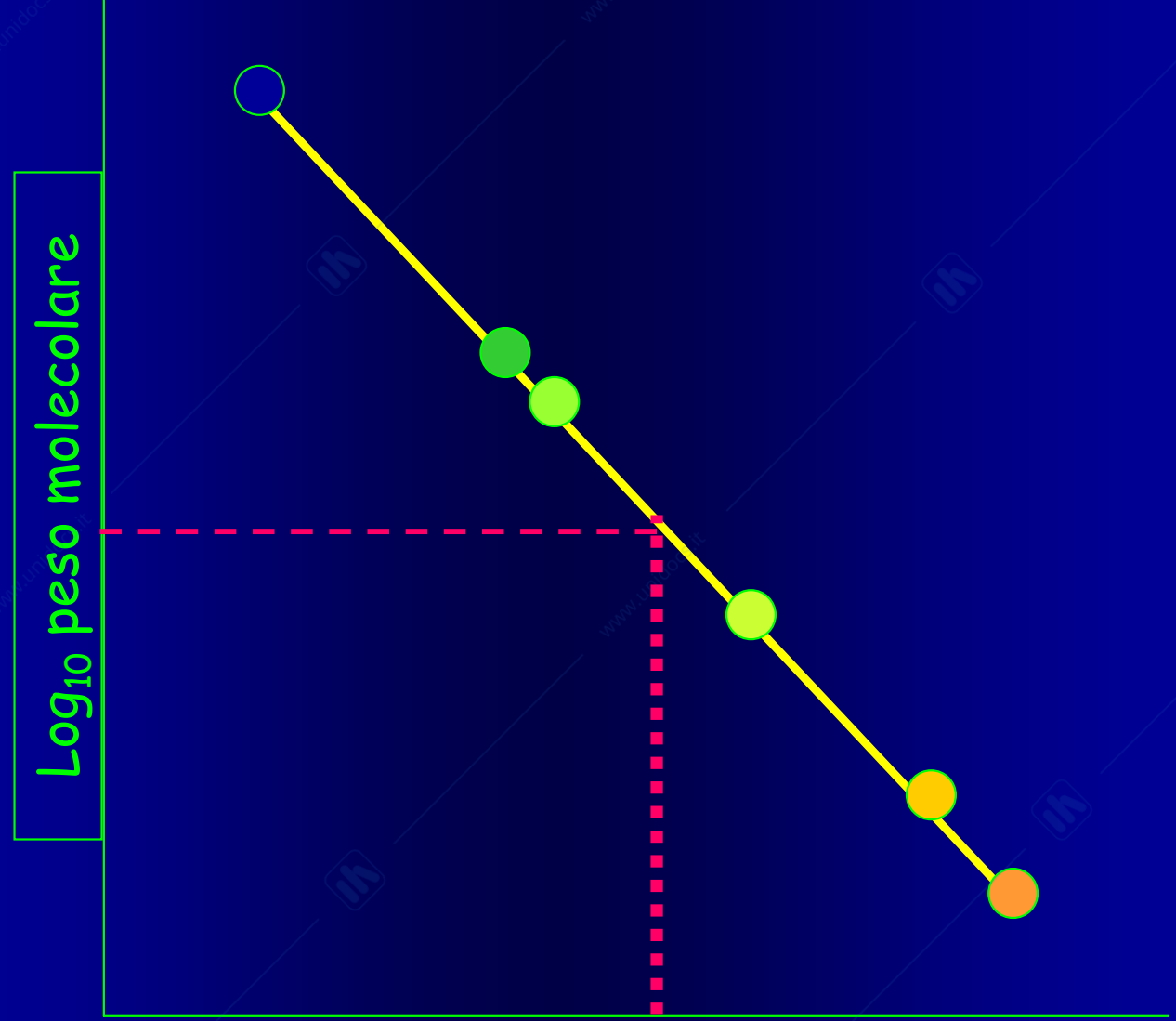
carico



carico
migrazione



distanza migrata

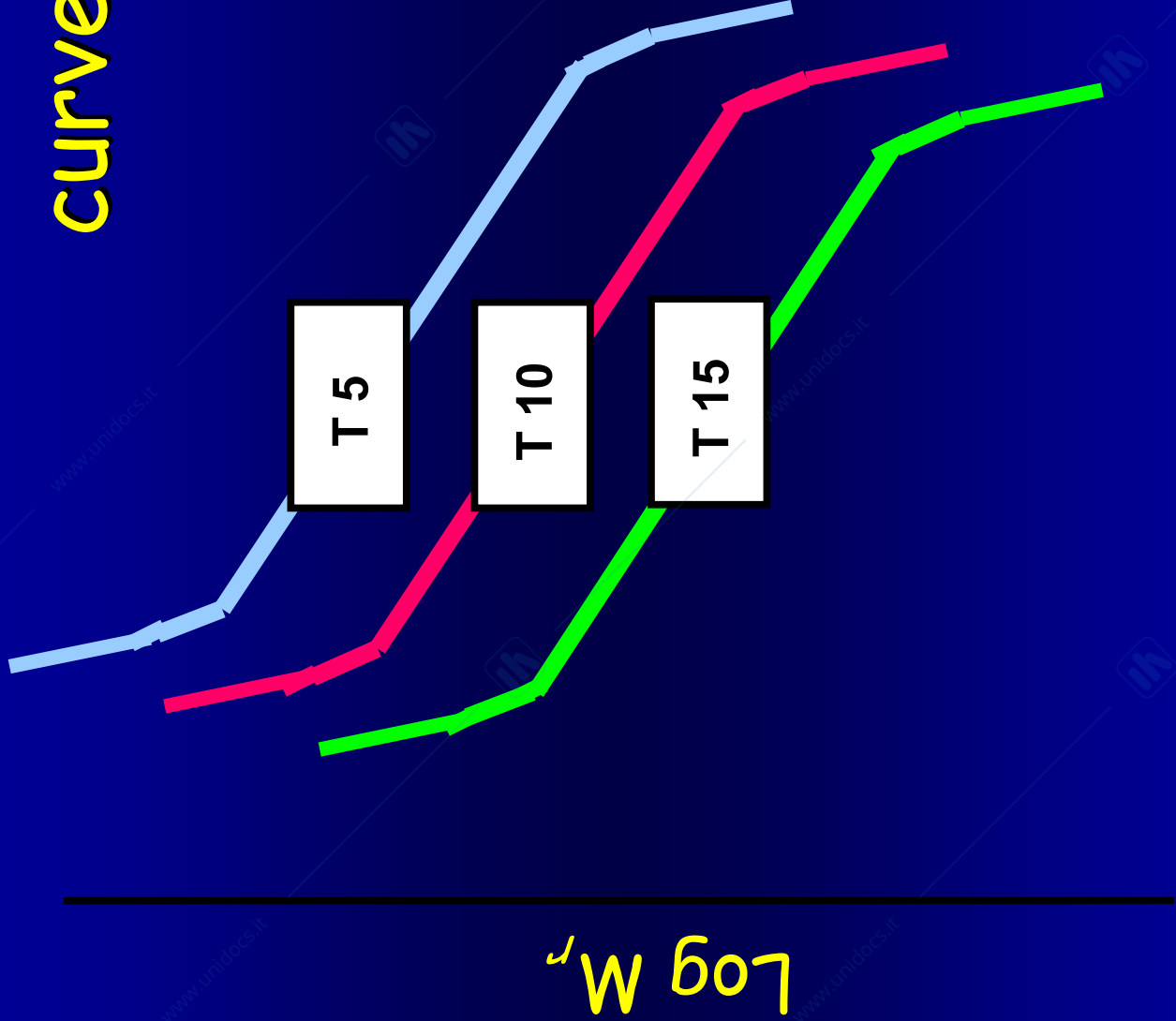


curve di calibrazione

- andamento sigmoidale

- porzione lineare

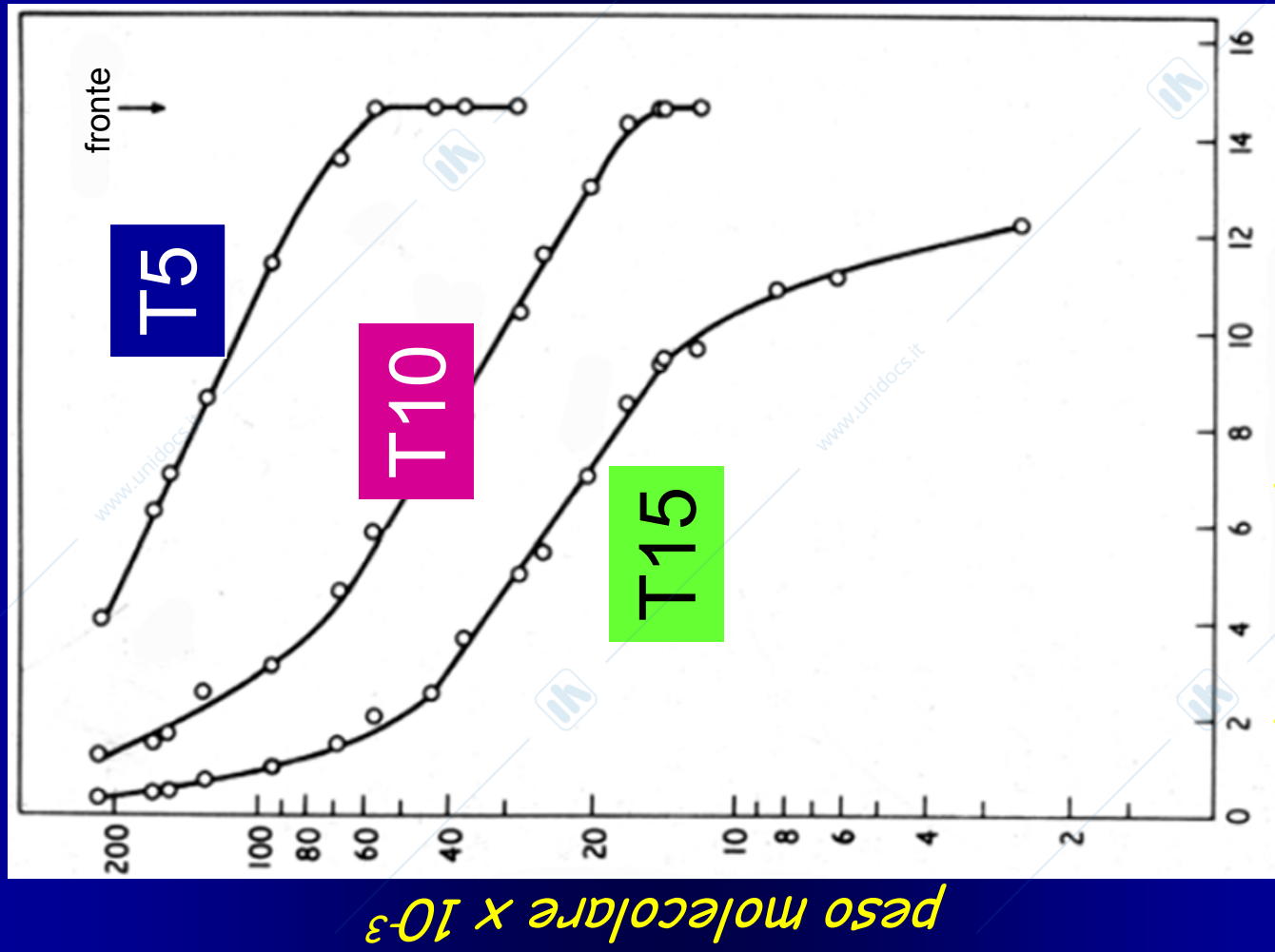
copre un range di M_r che varia in relazione alla concentrazione della matrice



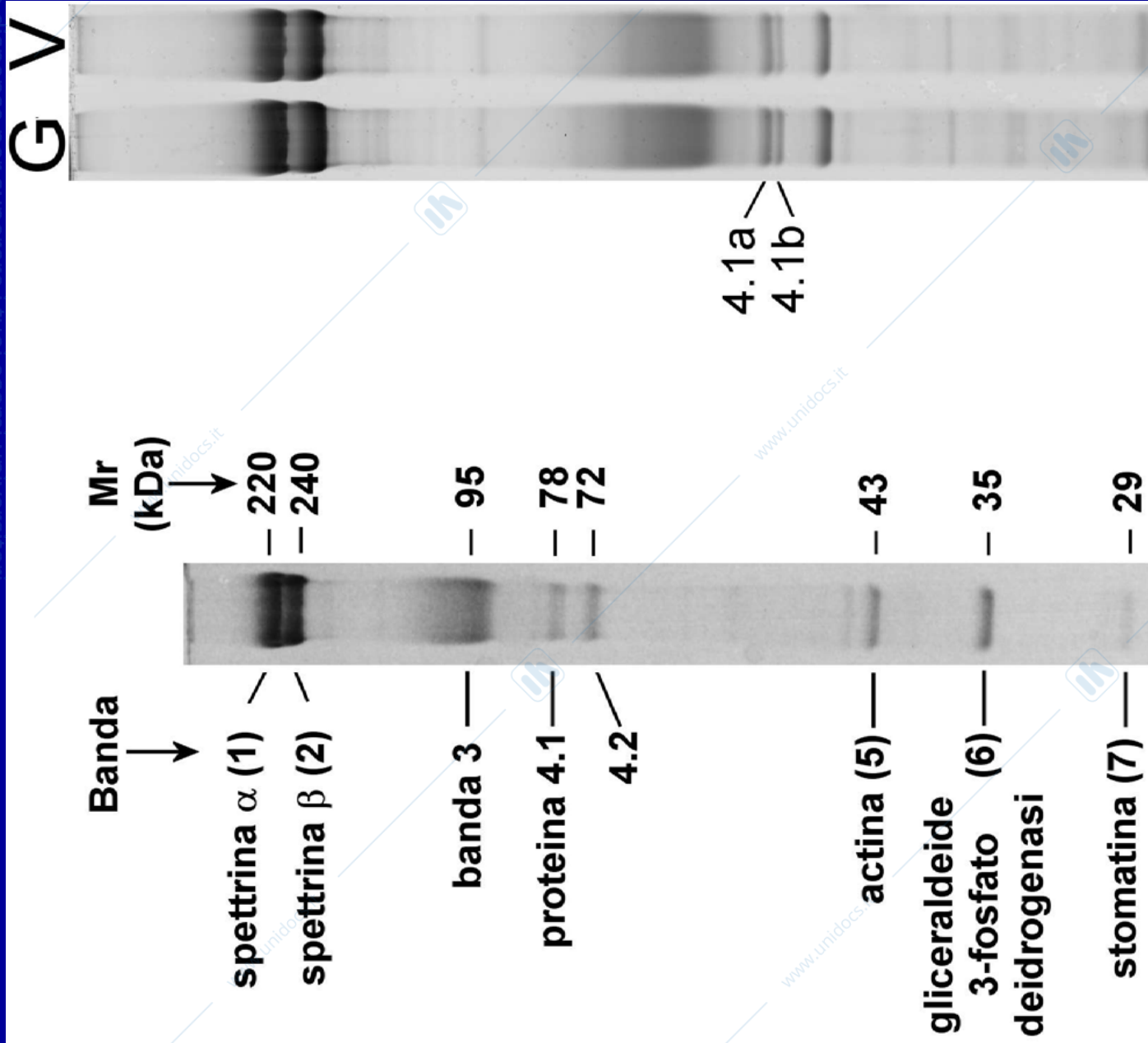
distanza

- T% = concentrazione totale dei monomeri espressa come grammi di (acrilamide+bis)/ 100 mL

esempi concreti di curve di calibrazione di SDS-PAGE su gel di PAA a diverso T%



distanza di migrazione, cm

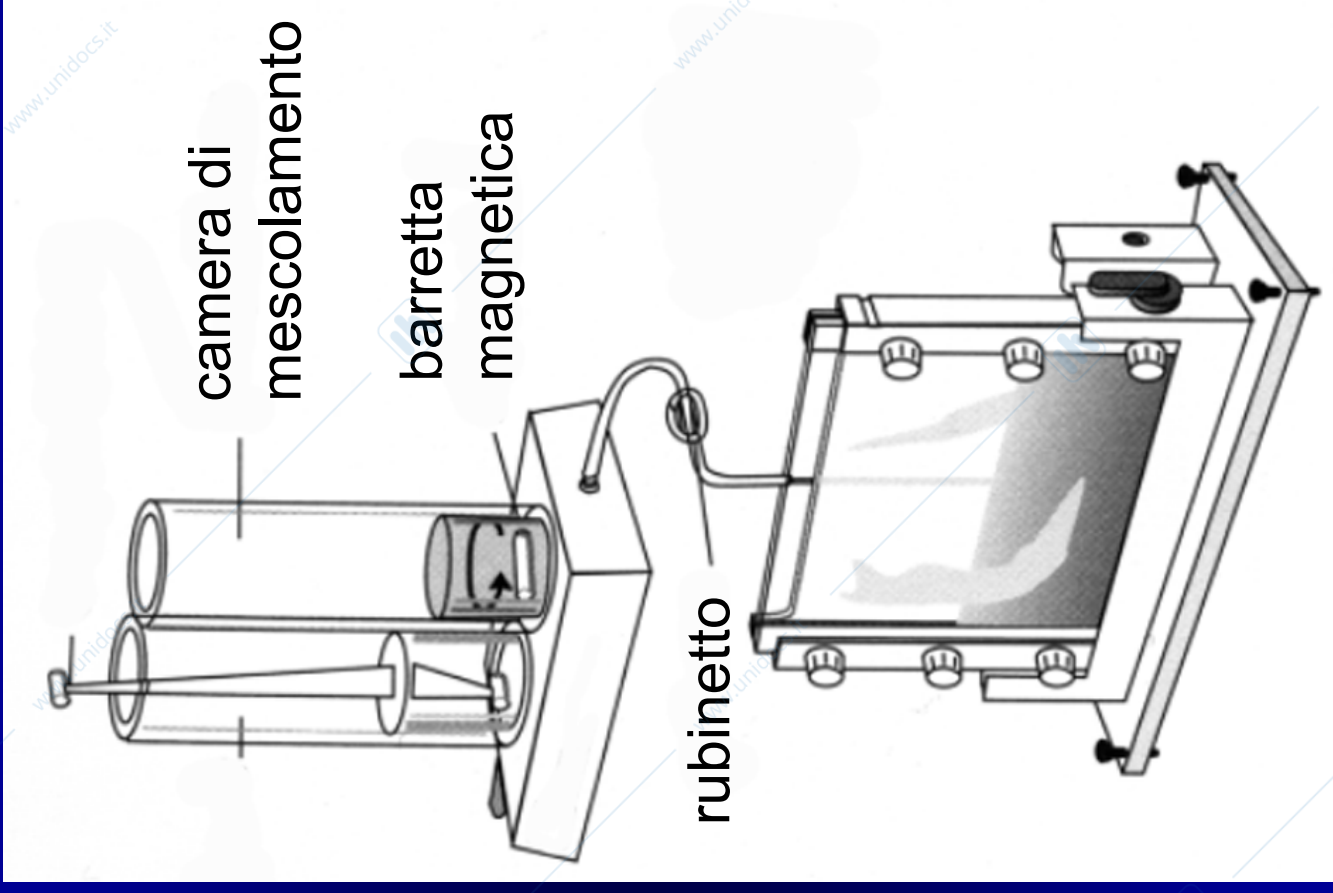


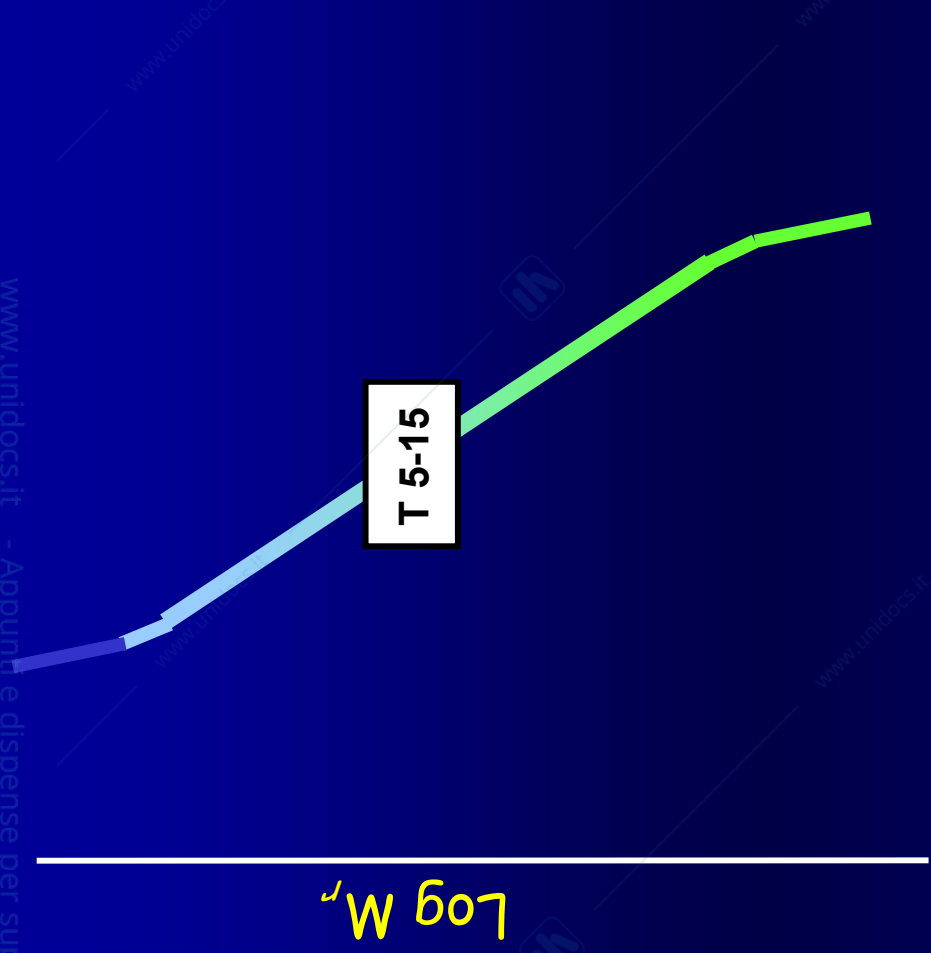
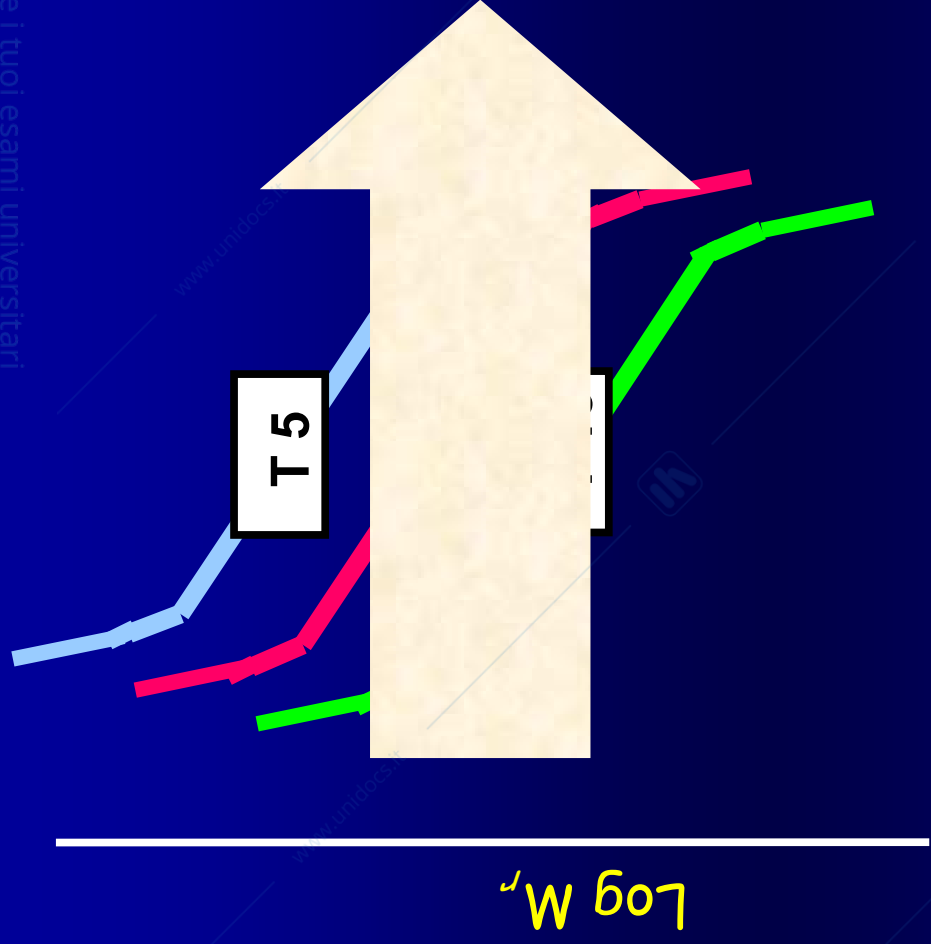
Sulla destra un esempio di corsa elettroforetica di campioni di eritrociti giovani (G) e vecchi (V), in un gel di poliaccrilamide al 7% che permette una migliore separazione delle bande 4.1a e 4.1b. Gli eritrociti di diversa età sono stati ottenuti per centrifugazione. Le cellule si separano in base alla densità di galleggiamento e quelle più dense (vecchie) sono caratterizzate, accanto ad altre proprietà biochimiche, da un aumento del rapporto tra la forma "a" e la forma "b" della proteina 4.1. La proteina 4.1b è la forma sintetizzata durante l'eritropoiesi. La forma "a" si produce per deamidazione spontanea, non enzimatica di un residuo di asparagina della sequenza originaria 4.1b. Ciò è sufficiente per modificare le proprietà di migrazione elettroforetica, e per determinare un aumento del peso molecolare apparente in SDS-PAGE. Il rapporto proteina 4.1a/4.1b è un indicatore di età del globulo rosso.

Preparazione di un gradiente di PAA per SDS-PAGE

il formatore di gradienti
è un miscelatore
a camere comunicanti

in un gradiente di PAA
le proteine attraversano
zone a potere setacciante
progressivamente
crescente

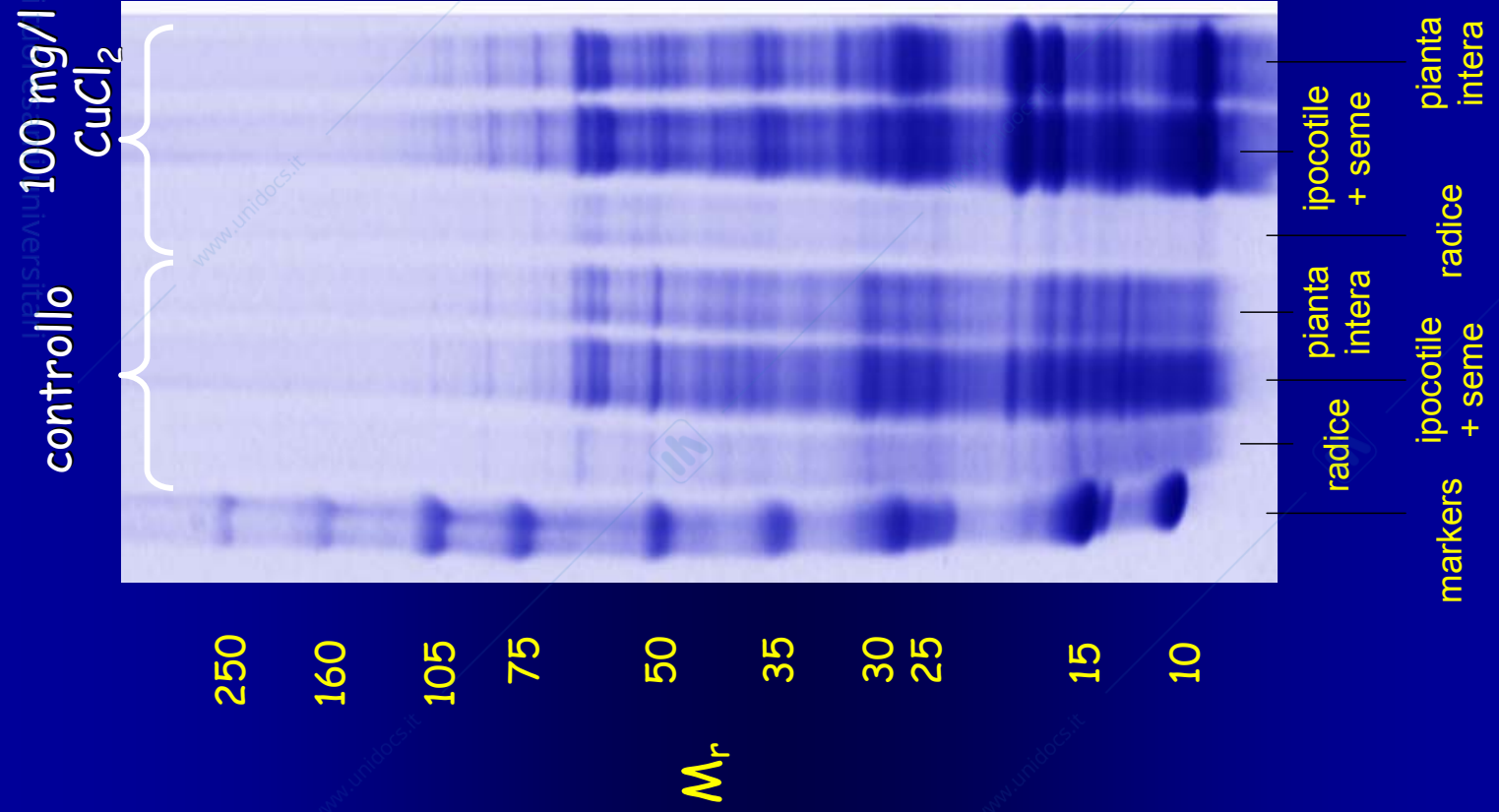




usando gradienti di PAA si ottengono separazioni su range di M_r più ampi che con gel a T costante, con una maggiore risoluzione delle bande (effetto setacciante differenziale)

separazione su PAA 4-20% di estratti da *Nasturtium officinale*

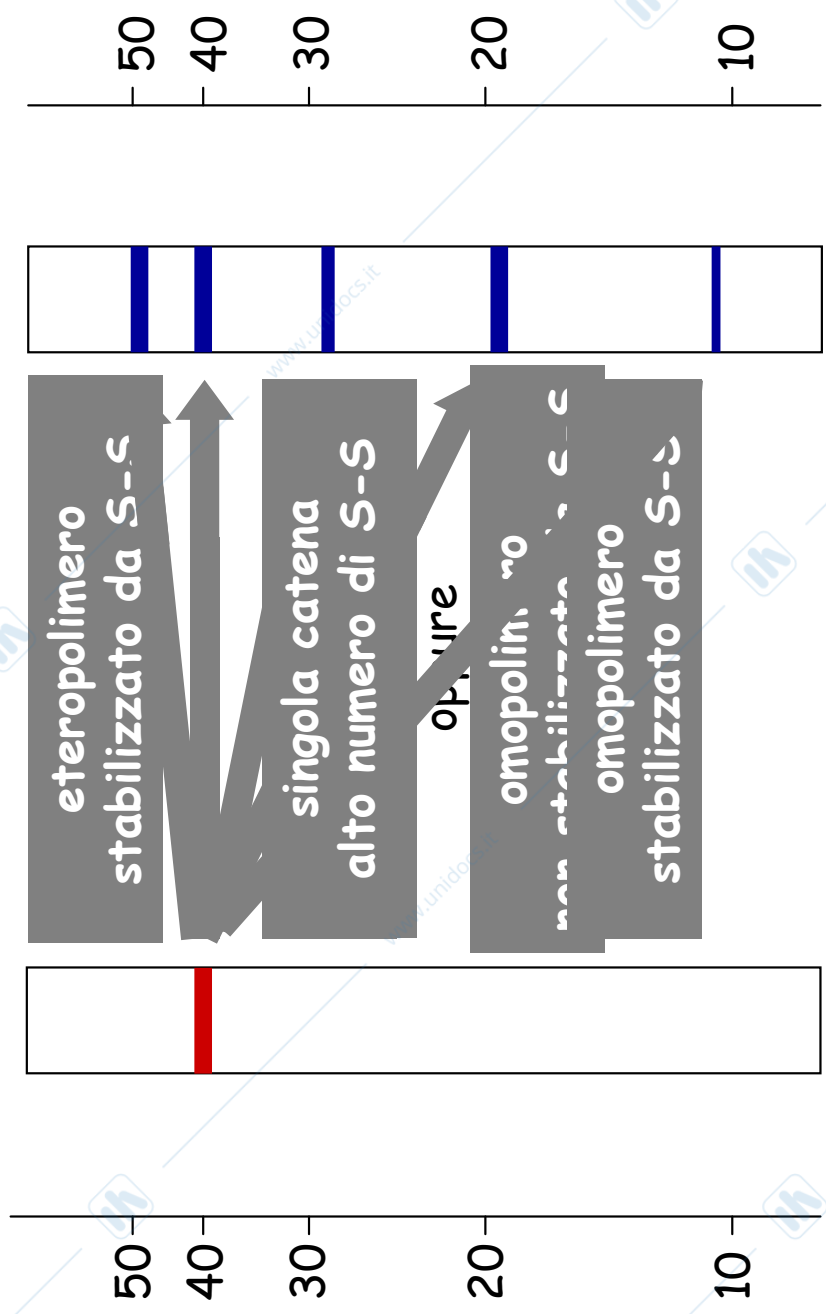
- il metallo pesante inibisce la germinazione
- si ritrovano negli estratti proteici del seme



Valutazione della presenza di cistine attraverso SDS-PAGE in condizioni riducenti vs non riducenti

campione
Cond non riducenti

campione
Cond riducenti



ISOELETTROFOCALIZZAZIONE

SESSKSSQP LASKQEKDGT EKRRGRPRK QPPVSPGTAL VGSQKEPSEV PTPKRPRGRP

KGSKNKGAAK TRKTTTTTPGR KPRGRPKKLE KEEEGISQE SSEEEQ

Number of amino acids: 106

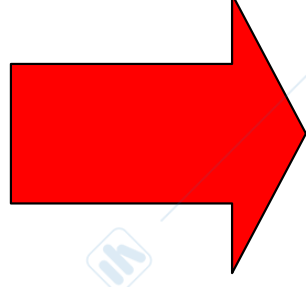
Molecular weight: 11544.8

Theoretical pI: 10.31

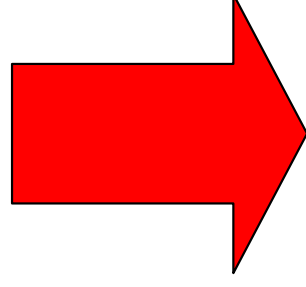
Amino acid composition:

Ala (A)	4	3.8%
Arg (R)	11	10.4%
Asn (N)	1	0.9%
Asp (D)	1	0.9%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	6	5.7%
Glu (E)	14	13.2%
Gly (G)	11	10.4%
His (H)	0	0.0%
Ile (I)	1	0.9%
Leu (L)	3	2.8%
Lys (K)	16	15.1%
Met (M)	0	0.0%
Phe (F)	0	0.0%
Pro (P)	13	12.3%
Ser (S)	14	13.2%
Thr (T)	8	7.5%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	0	0.0%
Val (V)	3	2.8%

1 Nterm + 11 R + 1 D + 14 E + 16 K + 1 Cterm



algoritmo



pI: pH al quale la carica netta della proteina = 0

Se sottoposta all'azione di un campo elettrico

non si muove

Focalizzazione - CONCENTRAZIONE

Isolettrofocalizzazione

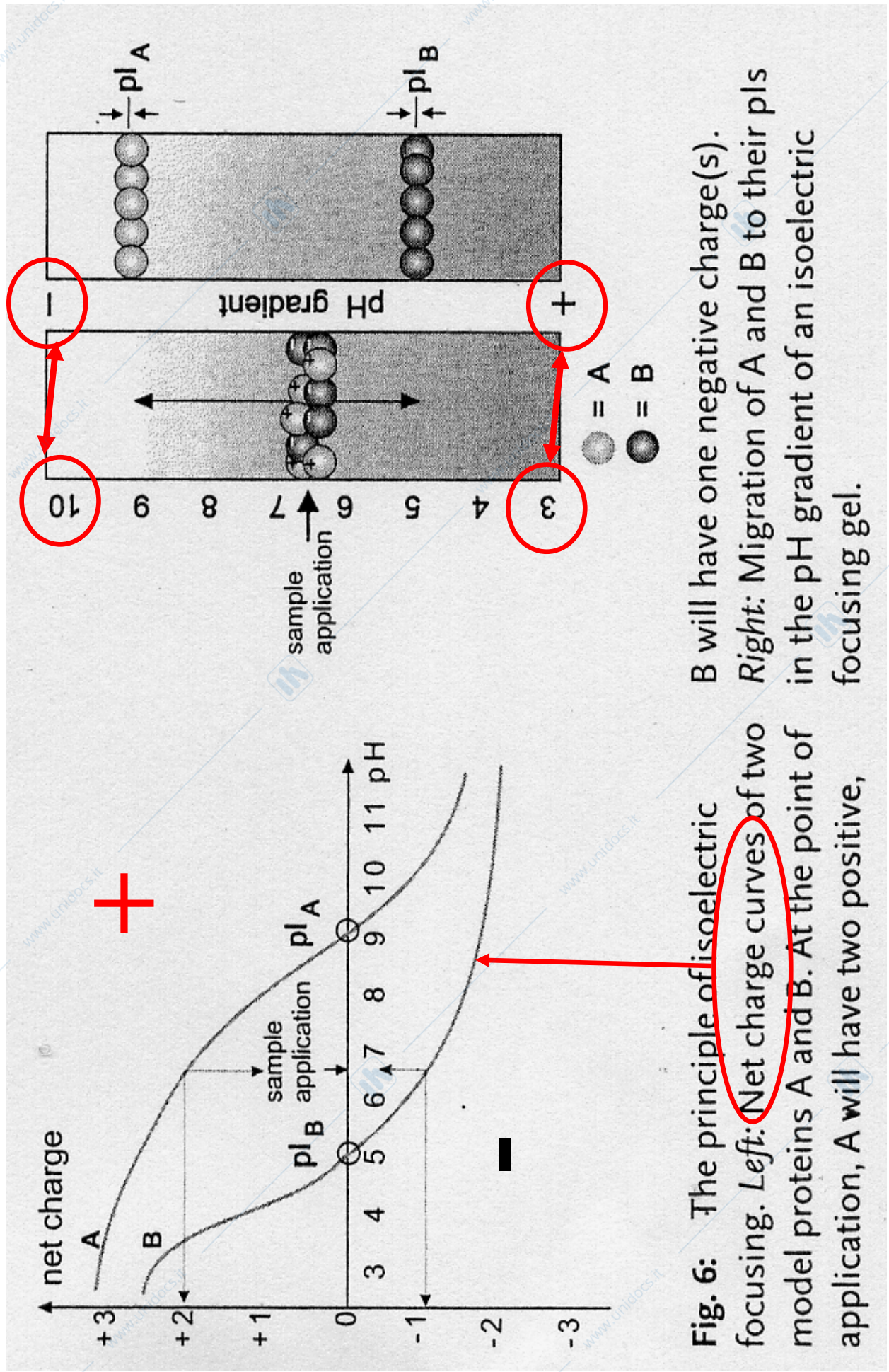
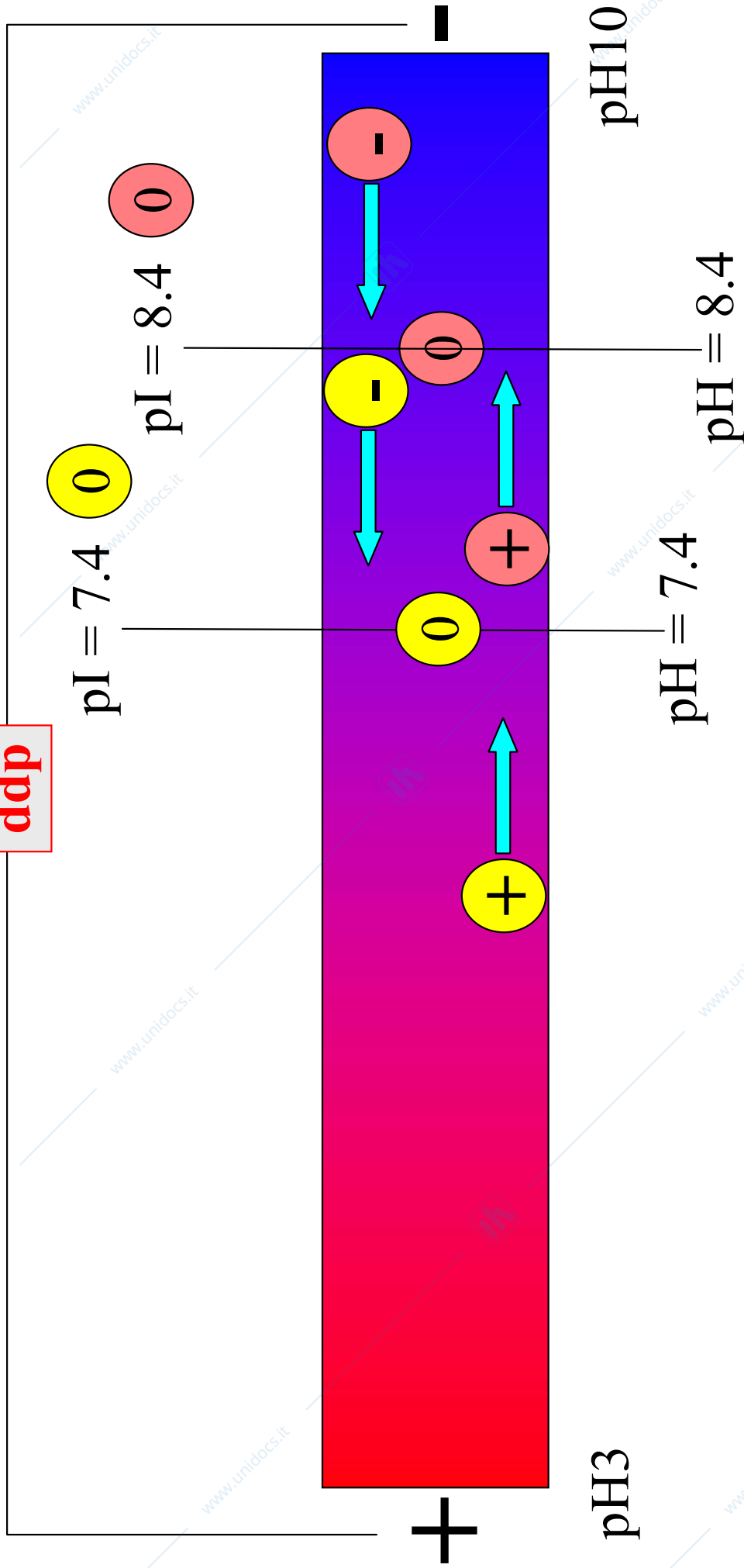
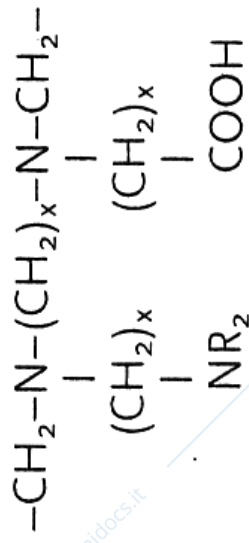


Fig. 6: The principle of isoelectric focusing. *Left:* Net charge curves of two model proteins A and B. At the point of application, A will have two positive, B will have one negative charge(s). *Right:* Migration of A and B to their pI in the pH gradient of an isoelectric focusing gel.



Una proteina dispersa in un gradiente di pH, si troverà ad avere carica netta positiva, negativa oppure nulla (se si trova già ad un pH pari al suo pI. Sottoposta all'azione di un campo elettrico **opportunitamente orientato** essa si muoverà, a seconda della carica che reca verso l'elettrodo di segno opposto, fino a raggiungere il pH pari al suo pI. In questo punto essa assume carica netta nulla e non è più sottoposta all'azione del campo elettrico. Se per una qualsiasi ragione essa si muove a dx o a sx, allontanandosi dalla regione dove $pH=pI$, essa assume carica e viene nuovamente focalizzata. => Questo conferisce l'alta risoluzione che si ha nelle analisi di isoelettrofocalizzazione. E' doveroso ricordare che più distante una proteina si trova dal suo pI (in termini di pH) maggiore sarà la sua carica e dunque anche la sua mobilità elettroforetica, mano a mano che essa si avvicina al pH pari al suo pI, la sua carica netta diminuisce e di conseguenza diminuisce anche la sua mobilità elettroforetica => il processo di focalizzazione è un processo che solitamente richiede tempi lunghi, proprio per questo fatto!

Generati da anfolti



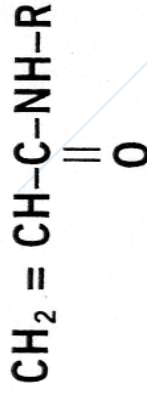
Composti contenenti un numero variabile di gruppi amminici e carbossilici. Ciascuna molecola ha un suo pI e dove sottoposte all'azione di un campo elettrico migrano a seconda della propria carica netta. [soluzione acida all'anodo (+) e basica al catodo (-)]
 Hanno la caratteristica di avere un'alta capacità tamponante al loro pI.

SVANTAGGI

Il gradiente non è stabile nel tempo (spostamento) e la forma del gradiente è influenzabile dalle molecole che vengono analizzate.



Immobilizzati



R = weakly acidic or basic buffering group

Questi derivati dell'acrilammide sono noti come *Immobilines*. I gruppi R possono essere gruppi carbossilici o amminici (pKa da 0.8 a 4.6 / pKa da 6.2 a 12).

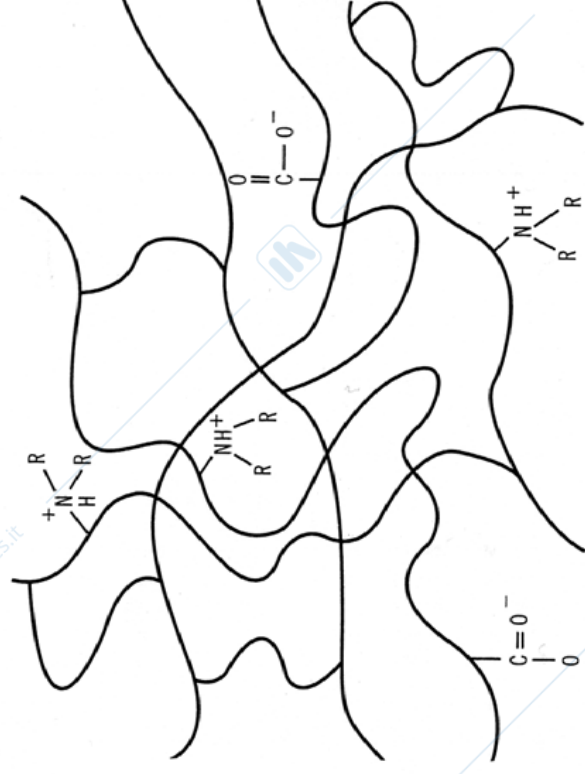


Figure 8

Vantaggi dei gradienti di pH immobilizzati

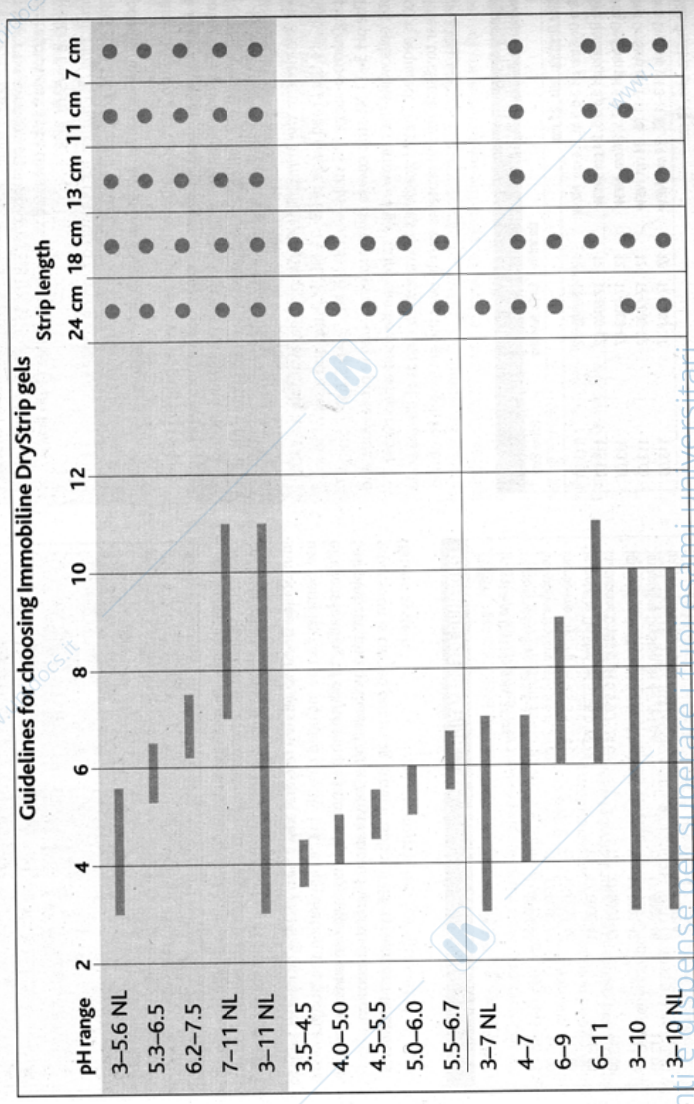
- ⇒ possibilità di reperire in commercio gel preformati - minimizza variazioni dovute alla preparazione dei gel;
- ⇒ i gel vengono preparati su una pellicola di plastica che ne facilita l'utilizzo;
- ⇒ i gradienti di pH sono stabili nel tempo e non subiscono alterazioni dovute alla presenza del campione stesso.
- ⇒ I gradienti sono praticamente continui e possono essere costruiti secondo diverse esigenze: lineari/non lineari; ampi (ad esempio pH 3-10)/molto ristretti (anche pH 4-5)

Commercialmente sono disponibili gel per isoelettrofocalizzazione con gradienti immobilizzati di diversi tipi ma per convenzione le dimensioni sono le seguenti: 3 mm larghezza - 0.5 mm spessore (dopo reidratazione). Questi gel vengono solitamente venduti deidratati, e possono essere conservati a -20 °C per periodi molto lunghi (anche 1 anno).

Immobiline DryStrip Gels (continued)

TECHNICAL SPECIFICATIONS

Gel dimensions	70 x 3 x 0.5 mm, 110 x 3 x 0.5 mm, 130 x 3 x 0.5 mm, 180 x 3 x 0.5 mm, 240 x 3 x 0.5 mm
Gel matrix	Polyacrylamide T = 4%, C = 3%
Gel backing	Polyester film
Storage	-20 °C



Gradienti di pH immobilizzati: reidratazione

I gel recanti i gradienti di pH immobilizzati sono di solito deidratati e devono essere reidratati in opportune condizioni:

Si reidratano in modo da poter condurre in seguito la corsa elettroforetica:

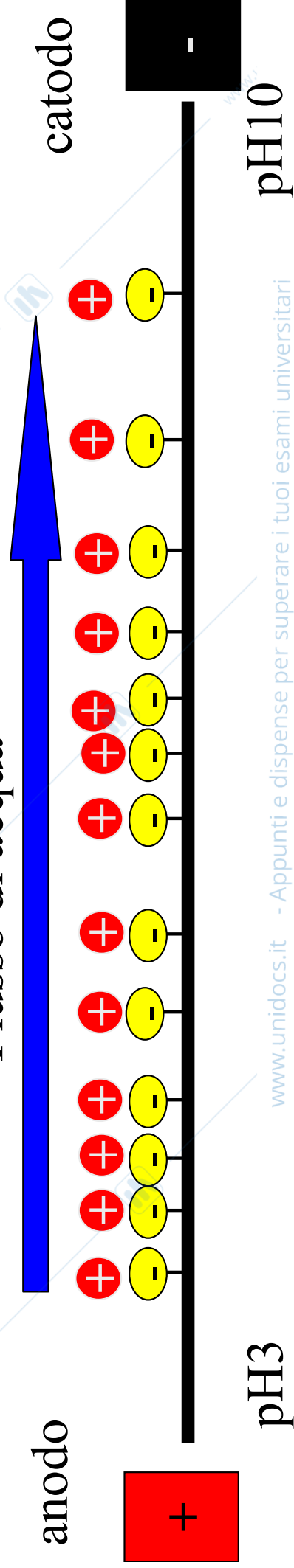
Il metodo più comunemente usato prevede che i gel vengano messi a contatto con un volume specifico (a seconda delle loro dimensioni) di una soluzione di reidratazione:

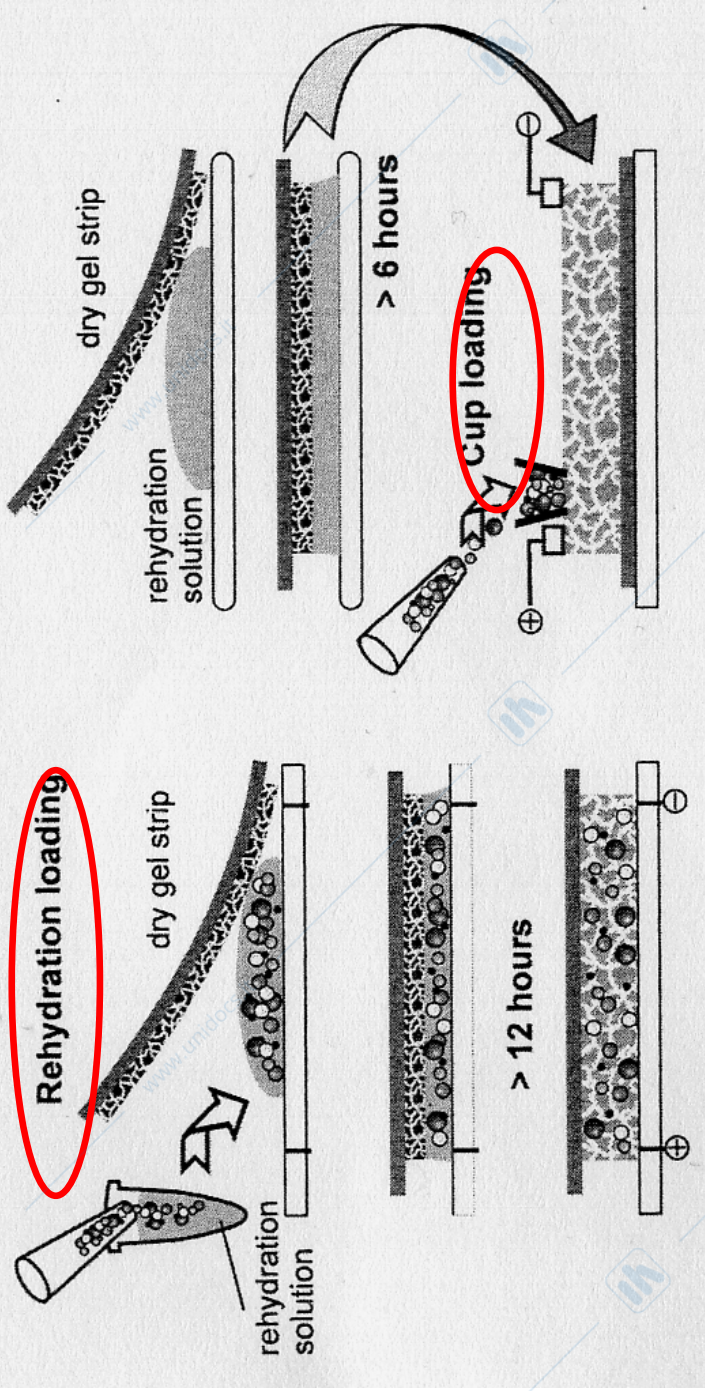
8 M Urea (o in alternativa la composizione usata per il lysis buffer), 4-0,5 % CHAPS, 0,2 % DTT (o altri agenti riducenti), 0,5% (fino a 2% nel caso di strip da 24 cm) IPG buffer, 10% glicerolo e 0,002% BBF.

Fenomeno dell' elettroosmosi:

Nel caso ci siano cariche fisse (in particolare cariche negative (-)) sulla matrice che forma il gel queste non possono migrare in un campo elettrico ma hanno solitamente dei controioni (possono essere dei cationi con la loro sfera d'idratazione o stessi H_3O^+) che migrano verso il catodo creando un vero e proprio flusso di acqua. (fenomeno che portava a dei problemi notevoli utilizzando gradienti di pH non immobilizzati => distorsione/spostamento del gradiente di pH). Il glicerolo aumentando la densità del mezzo diminuisce/minimizza questo effetto - importante anche durante il trasferimento delle proteine dalla prima alla seconda dimensione. Tale fenomeno si sfrutta in modo positivo nell'elettroforesi capillare (elettroforesi condotta in assenza di una matrice solida reticolante, ovvero in soluzione libera), dove crea un vero e proprio flusso in grado di trasportare anche molecole con carica opposta verso il catodo).

Flusso di acqua





Rehydration loading

Il campione si trova in lysis buffer e viene diluito in rehydration buffer (calcolo di μg da utilizzare nella IEF - tutti i campioni devono essere normalizzati: stessa quantità di campione e stesse porzioni di lysis buffer/rehydration buffer nel caso questi due fossero diversi). Il campione così preparato viene lasciato 1h ad equilibrare. Il campione viene applicato nello strip holder (contenitore delle stesse dimensioni della strip - minimizzare volumi - volumi predeterminati). Il gel viene applicato a testa in giù in modo che si stabilisca un contatto con gli elettrodi. Il gel viene lasciato in queste condizioni per 12 h con applicata una ddp di 50 V. Dal momento che il gel era secco, esso si rigonfia alle sue dimensioni originarie e nello stesso tempo le proteine, presenti in soluzione, vengono "aspirate" assieme al liquido. Il voltaggio favorisce l'entrata delle proteine ed il gel ha delle maglie (C e T) tali da consentire una loro agevole entrata. La corsa può avvenire sia a testa in giù nello stesso strip holder che a testa in su in uno strip holder apposito. Il gel viene coperto con un apposito olio (cover fluid) per fare in modo che durante la corsa il campione non evapori.

Cup loading

Il gel viene reidratato seguendo una procedura analoga a quella utilizzata per il caricamento a reidratazione (rehydration loading) con la sola differenza che non c'è campione proteico durante tale fase. Al termine della reidratazione, il gel viene collocato capovolto (gel verso l'alto) in un'apposita vaschetta. Sul gel, in una determinata posizione (a seconda che sia un caricamento anodico o catodico) viene collocata un apposito applicatore dentro il quale viene caricato il campione. La corsa di isoelettrofocalizzazione in questo caso viene effettuata sempre a testa in giù.

Rehydration vs cup loading

Rehydration loading

Pro

The proteins are distributed evenly over the gradient, precipitation at the sample application point cannot happen.

Rehydration, sample application and IEF can be combined to one single step, resulting in less manipulation steps.

When the sample is diluted, a higher protein load can be applied.

Voltage can be applied during rehydration, which improves the entry of high molecular weight proteins.

Con

When basic gradients like pH 6 – 11 and pH 6 – 9 are employed, rehydration loading leads to severe protein losses, because some proteins do not like basic environment.

The protein mixture is kept for many hours at room temperature, thus the danger of exposure to protease activities can increase.

Cup loading

Pro

IEF in very acidic narrow gradients and in basic pH gradients works much better with cup loading.

The sample gets immediately transported into the gel and becomes separated, thus the chances of protein interactions are reduced, for instance by proteases.

The proteins can be loaded onto both ends of the strip in order to include proteins with pIs close to the pH of their application points.

Because of mostly unknown reasons* some sample types display more spots after cup loading, which are obviously lost with rehydration loading.

Con

Proteins with isoelectric points close to the pH of the application point have low mobility and solubility, they tend to precipitate on the surface and build a streak in the second dimension gel.

Also when proteins applied on both ends, proteins precipitate at the application points. Quantification of proteins becomes a problem.

TABLE 15. REHYDRATION SOLUTION VOLUME PER IPG STRIP

IPG strip length (cm)	Total volume per strip ¹ (µl)
7	125
11	200
13	250
18	350

¹Including sample, if applied.

Volumi calcolati di liquido da applicare per la reidratazione / caricamento per reidratazione.

Volumi maggiori => entrata preferenziale di molecole a basso peso molecolare (prima acqua poi altri ioni e per ultime proteine ad alto PM).

Volumi minori: il gel non si rigonfia alle opportune dimensioni => dimensioni dei pori della matrice non sono controllati e pari a quello che dovrebbero essere (minori). Questo porta ad una difficoltà nell'analizzare proteine ad alto PM.

Rehydration loading

During the rehydration process the protein concentration outside the gel strip increases, which can lead to aggregation of proteins; those cannot enter the gel.

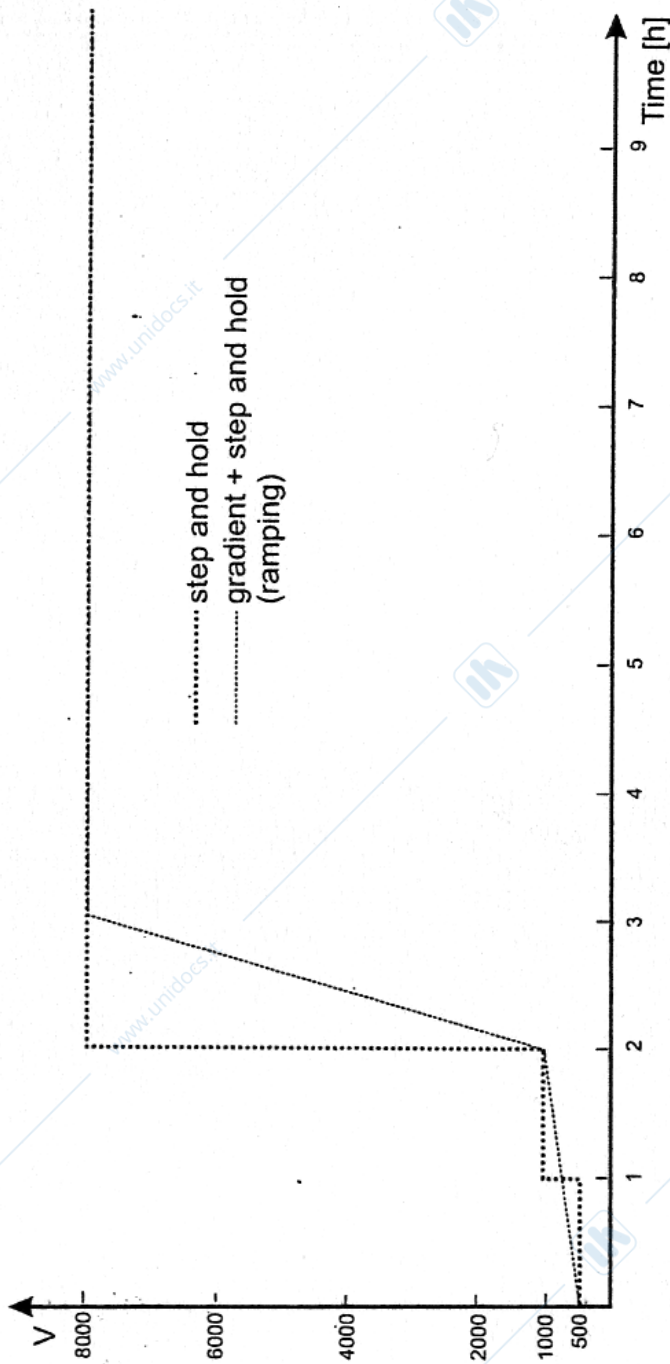
With preparative sample loads, proteins with low solubility tend to precipitate inside the gel during the run, which lead can to blurred spot pattern.

Cup loading

During the first phase of IEF the proteins become concentrated at the point of entry and can form aggregates and precipitate.

Cup loading on both ends does not always work fine, for example, when the mobilities of negatively and positively charged proteins are too different.

Incrementi voltaggi per isoelettrofocalizzazione



Il voltaggio può essere aumentato sia in modo lineare (ramping) che in modo brusco (step and hold) a seconda che si abbia effettuato un cup o rehydration loading. Importante è impostare un amperaggio massimo per ciascuna strip ($50 \mu\text{A}$ - importante impostare il n° di strip che vengono corse in parallelo poiché la corrente massima sarà diversa: 1 strip $\Rightarrow 50 \mu\text{A}$ max - 2 strip $\Rightarrow 100 \mu\text{A}$ max). Sarebbe opportuno stabilire il V_h da applicare per ottenere la migliore focalizzazione (metodo empirico - varie corse IEF e scegliere quella migliore) e non applicare ulteriormente voltaggio alla strip dopo la focalizzazione. Se la corsa finisce prima che si proceda al congelamento o alla seconda dimensione si applica per qualche minuto (15') il massimo voltaggio in modo da rifocalizzare le proteine che, in assenza di voltaggio, sono diffuse lateralmente.

Termine focalizzazione:

a) Strip possono essere lavate in acqua (immerse una decina di volte in un becker contenente acqua), scolate su un pezzo di carta e messe a congelare ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$) in un contenitore dove vengono fatte appoggiare sul loro supporto di plastica - **IMPORTANTE PER NON ROVINARE IL GEL** che è molto appiccicoso). La seconda dimensione può essere corsa in un secondo momento.

Se si prevede che a volte ci sia la necessità di effettuare la seconda dimensione in un secondo momento e quindi di adottare questo metodo di conservazione \Rightarrow anche nel caso si possano correre subito, le strip vengono sempre congelate. Aumenta la riproducibilità del metodo (**IMPORTANTE: STESSE OPERAZIONI PER OGNI STRIP CHE SI VUOLE CONFRONTARE!**)
 b) possono essere trattate per la seconda dimensione.

Non esiste un protocollo di isoelettrofocalizzazione universale => ogni singolo passo deve/può essere ottimizzato in funzione del campione in indagine. Questo vale a partire dalla scelta del lysis buffer fino ai voltaggi applicati durante la corsa di IEF.

Per quanto concerne la corsa di isoelettrofocalizzazione valgono comunque alcune regole generali:

- Temperatura: mantenuta attorno ai 20 °C: più bassa l'urea cristallizza, più alta (>37 °C) l'urea modifica le proteine.
- Sistemi per il dissipamento del calore (cella di Peltier) - Limitatori dell'ampereaggio (mantenuto al di sotto dei 50 µA) [il passaggio di corrente genera calore).
- Voltaggi vengono aumentati progressivamente (secondo particolari protocolli) per fare in modo che nelle prime fasi della IEF gli ioni presenti nel campione (ioni presenti nel campione, lysis buffer o controioni dei gruppi acidi o basici del gel) vengano trasportati al di fuori del gel (mantenere basso l'ampereaggio). [due modalità: a) step and hold; b) ramping].
- Si adotta l'integrale voltore (volthour), definito come la quantità di volt applicata in un determinato periodo di tempo (esempio: 8000 Vh = 8000 V x 1h oppure 4000 V x 2h oppure [2000 V x 2h + 4000 V x 1h]).
- Questo serve a riprodurre in modo migliore le stesse condizioni in corse effettuate separatamente poichè si compensa per eventuali variazioni nei voltaggi applicati dovute a variazioni della conducibilità.

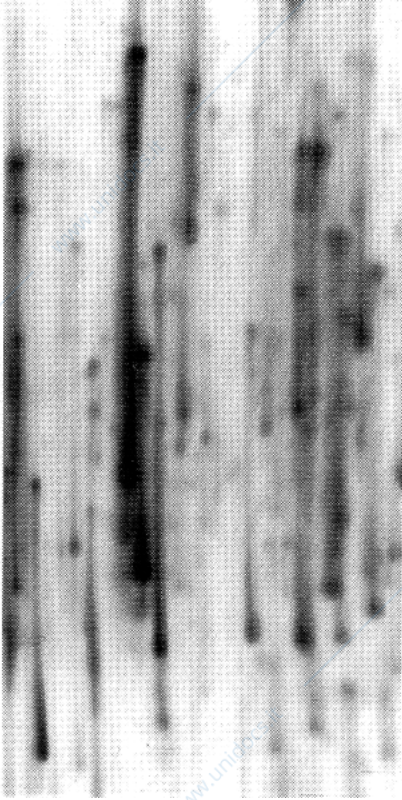
TABLE 16. IMMOBILE DRYSTRIP IEF GUIDELINES FOR IPGPHOR ISOELECTRIC FOCUSING SYSTEM

Step	Voltage	Step duration (h:min)	Volt-hours (Vh)	Gradient type
50 µA per IPG strip 20 °C for both rehydration and IEF pH gradients 4-7 L, 3-10 L, and 3-10 NL				
7 cm				
1	500	12:00 ^a	250	Step-n-hold
2	1000	0:30	500	Step-n-hold
3	8000 ^b	1:00	8000	Step-n-hold
11 cm				
1	500	12:00 ^a	500	Step-n-hold
2	1000	1:00	1000	Step-n-hold
3	8000 ^b	2:00	16000	Step-n-hold
13 cm				
1	500	12:00 ^a	500	Step-n-hold
2	1000	1:00	1000	Step-n-hold
3	8000 ^b	2:00	16000	Step-n-hold
18 cm				
1	500	12:00 ^a	500	Step-n-hold
2	1000	1:00	1000	Step-n-hold
3	8000 ^b	4:00	32000	Step-n-hold

Step	Voltage	Step duration (h:min)	Volt-hours (Vh)	Gradient type
18 cm				
1	8000 ^b	5:30	50000	Step-n-hold
2	8000 ^b	15:30	100000	Step-n-hold
3	1000	1:00	1000	Step-n-hold
1	200	1:00	200	Step-n-hold
13 cm				
3	8000 ^b	5:30	50000	Step-n-hold
2	1000	1:00	1000	Step-n-hold
1	200	1:00	200	Step-n-hold
11 cm				
3	8000 ^b	5:30	50000	Step-n-hold
2	1000	1:00	1000	Step-n-hold
1	200	1:00	200	Step-n-hold
7 cm				
3	8000 ^b	5:30	50000	Step-n-hold
2	1000	1:00	1000	Step-n-hold
1	200	1:00	200	Step-n-hold

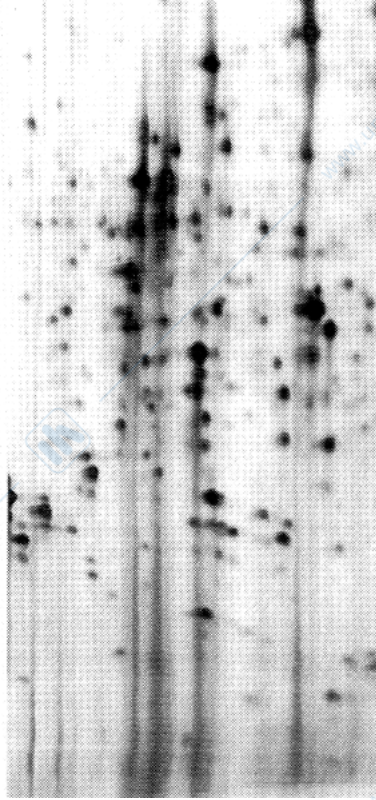
UNDER-FOCUSING:

Non è stato applicato un numero di V_h sufficiente per permettere la focalizzazione di tutti gli spots. La maggior parte degli spot mostra una coda e lo spot stesso non è ben definito, indice del fatto che non è perfettamente focalizzato.



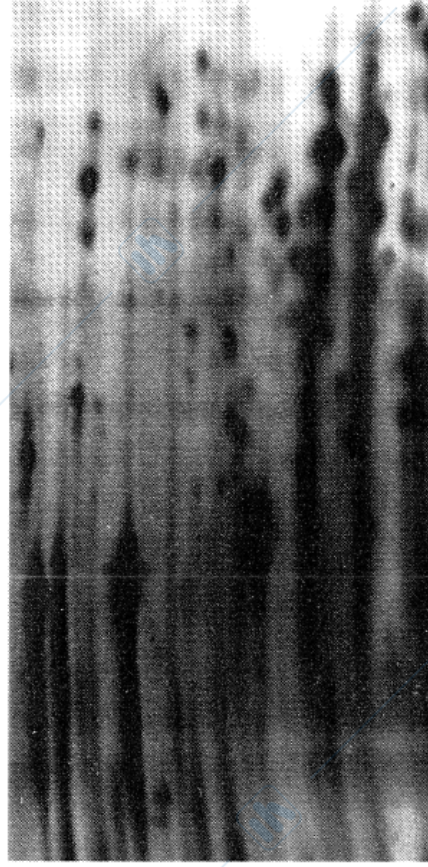
OVER-FOCUSING:

E' stato applicato un numero di V_h altamente superiore a quello necessario per permettere la focalizzazione di tutti gli spots. La maggior parte degli spot risulta focalizzata mentre alcuni, pur essendo ben focalizzati, mostrano una coda. Si distingue nettamente dal under-focusing.



PRECIPITAZIONE nella IEF

Si notano (soprattutto in una regione ben delimitata del gel) delle forti striature orizzontali, indice del fatto che la proteina è precipitata nella prima dimensione e non ha focalizzato. Durante la seconda dimensione il precipitato è stato risolubilizzato dall'SDS.



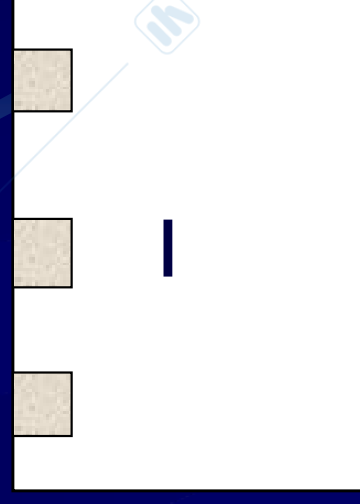
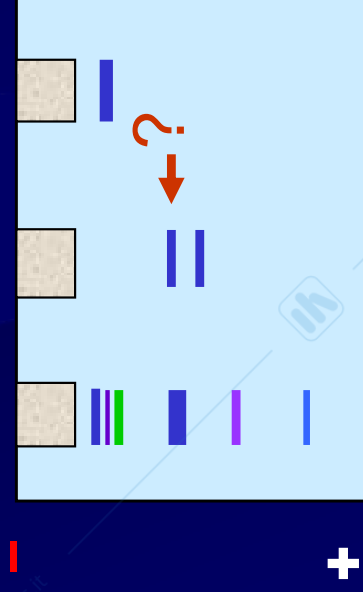
Cosa e' un Western Blot?

- Una tecnica in cui le proteine sono separate mediante elettroforesi su gel e successivamente trasferite su un supporto (membrana o filtro). Successivamente una specifica proteina viene identificata mediante la sua reazione specifica con un anticorpo.

A cosa serve il Western Blot?

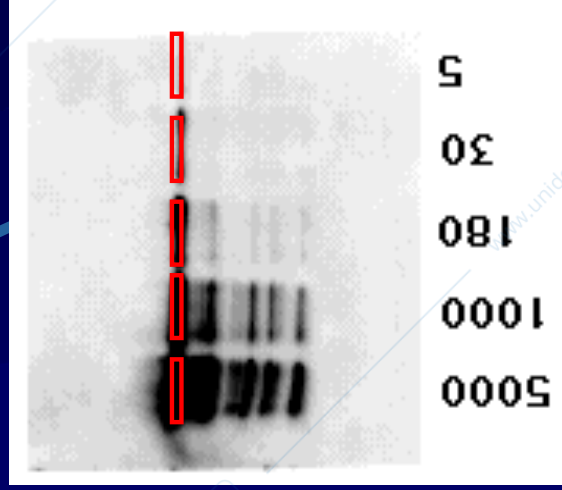
Qual e' la proteina che mi interessa?

- SDS-PAGE (non certo)
 - Si basa sul confronto di peso molecolare
- Western blot (certo)
 - Si basa su una reazione specifica antigene-anticorpo



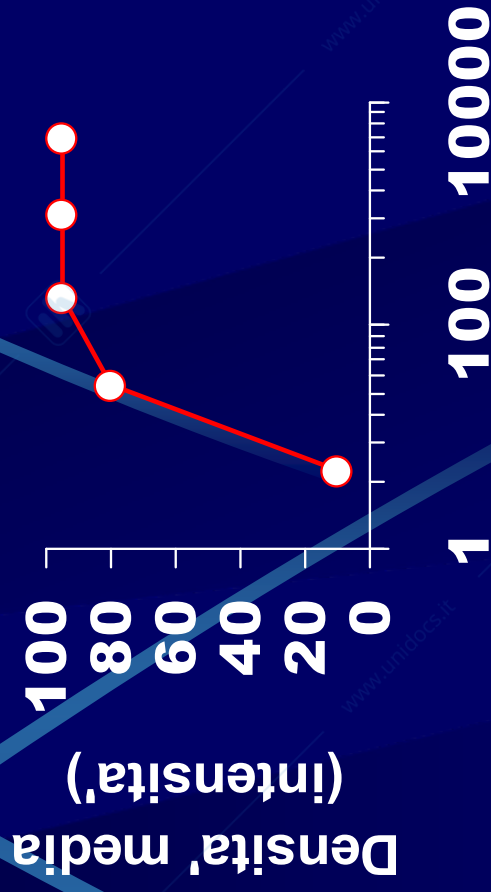
A cosa serve il Western Blot?

Quanta proteina di interesse c'è?



Proteina di interesse

Bande non specifiche



Pg di Proteina

Fasi di un Western Blot

- **Prima fase: elettroforesi su gel.**
(Le proteine del campione vengono separate su un gel in base alle loro dimensioni)
- **Seconda fase: trasferimento su membrana.**
(Le proteine nel gel sono poi trasferite su una membrana di nitrocellulosa mediante un campo elettrico)
- **Terza fase: saturazione o “blocking”.**
(La saturazione è usata per prevenire le interazioni non specifiche tra l’anticorpo e la membrana)

Fasi di un Western Blot

- **Quarta fase: legame dell'anticorpo primario.**
(L'anticorpo riconosce la proteina specifica immobilizzata sulla membrana)
- **Quinta fase: legame dell'anticorpo secondario.**
(L'anticorpo secondario, coniugato a un enzima (AP o HRP), riconosce specificamente l'anticorpo primario, già legato alla proteina sulla membrana)
- **Sesta fase: rivelazione o "detection".**
(L'enzima coniugato all'anticorpo secondario scinde un substrato che, in corrispondenza della proteina specifica, sviluppa precipitato colorato o chemiluminescenza)

Western blot: seconda fase Immobilizzazione e trasferimento

Le proteine nel gel sono ancora in soluzione

- Le bande diffondono e si confondono col tempo

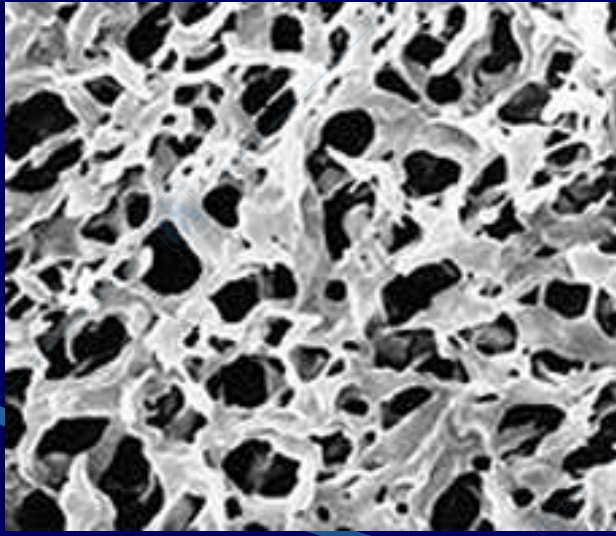
E' necessaria l'immobilizzazione per:

- Preservare in maniera permanente l'esperimento di elettroforesi
- Permettere il riconoscimento di proteine specifiche

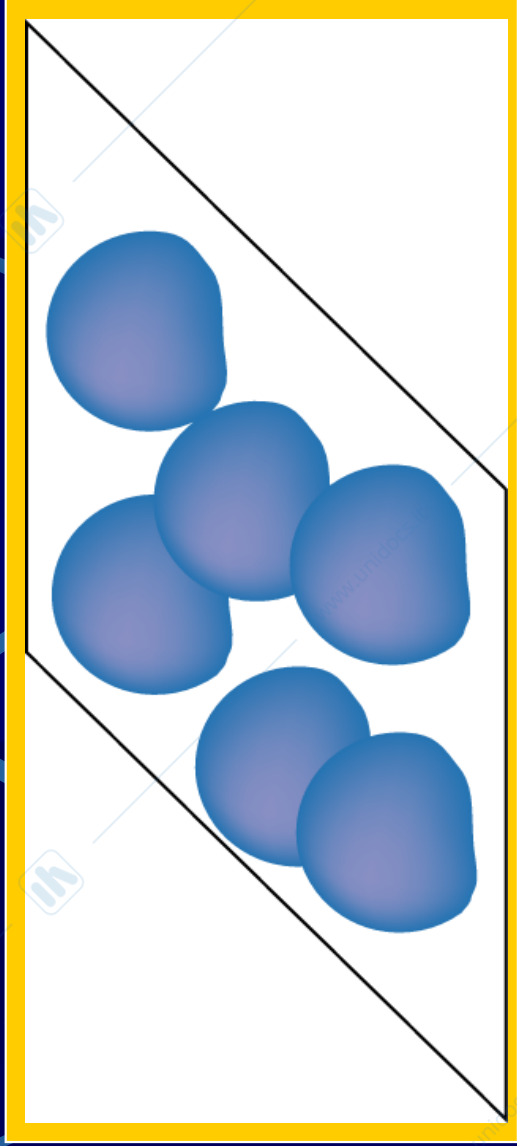
La strategia piu' comune e' il trasferimento su membrana

- Fatta di Nitrocellulosa, PVDF (Polivinilidene fluoride) o nylon
- Si usa l'elettroforesi, in un processo detto 'blotting'

Western blot: seconda fase Immobilizzazione e trasferimento



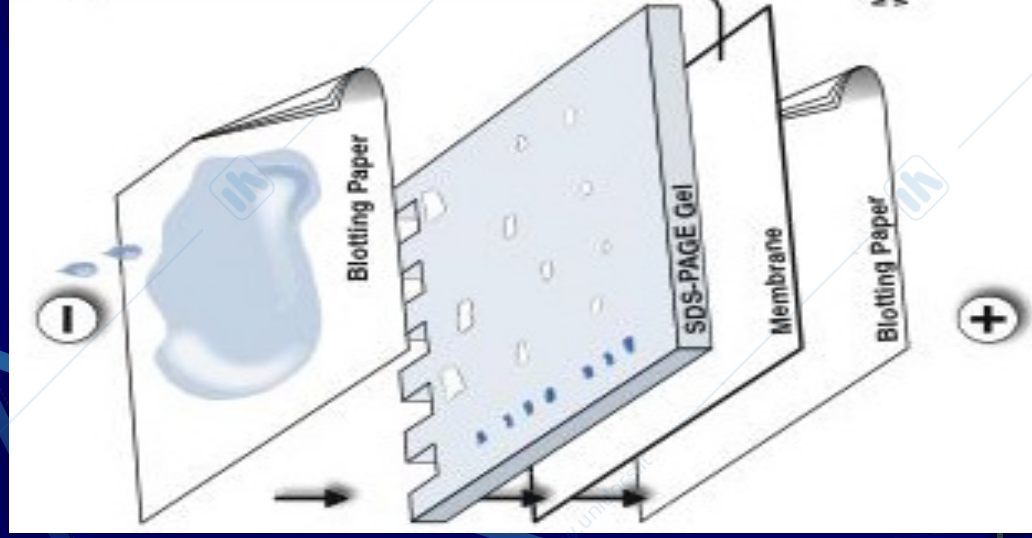
membrana



Western blot: seconda fase Immobilizzazione e trasferimento

- **Elettroblotting**
 - Apparato di trasferimento
 - Il gel e' messo tra strati di carta da filtro con la membrana a diretto contatto col gel sul lato verso l'elettrodo positivo
 - Viene applicato un campo elettrico e le proteine migrano fuori dal gel verso l'elettrodo positivo e si legano alla membrana
 - Fatto a 4°C per evitare surriscaldamento, decomposizione del tampone e degradazione delle proteine

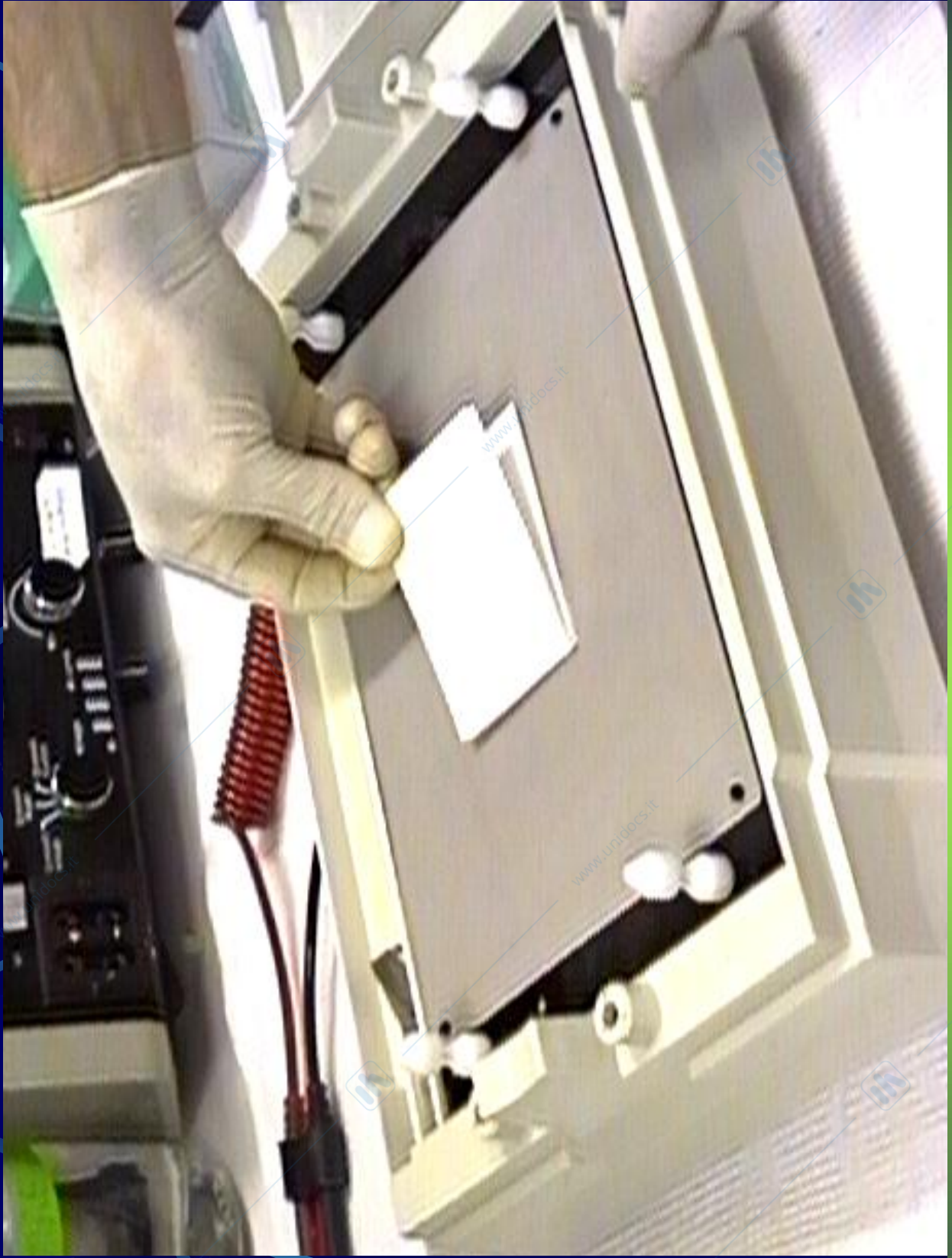
Western blot: seconda fase Immobilizzazione e trasferimento



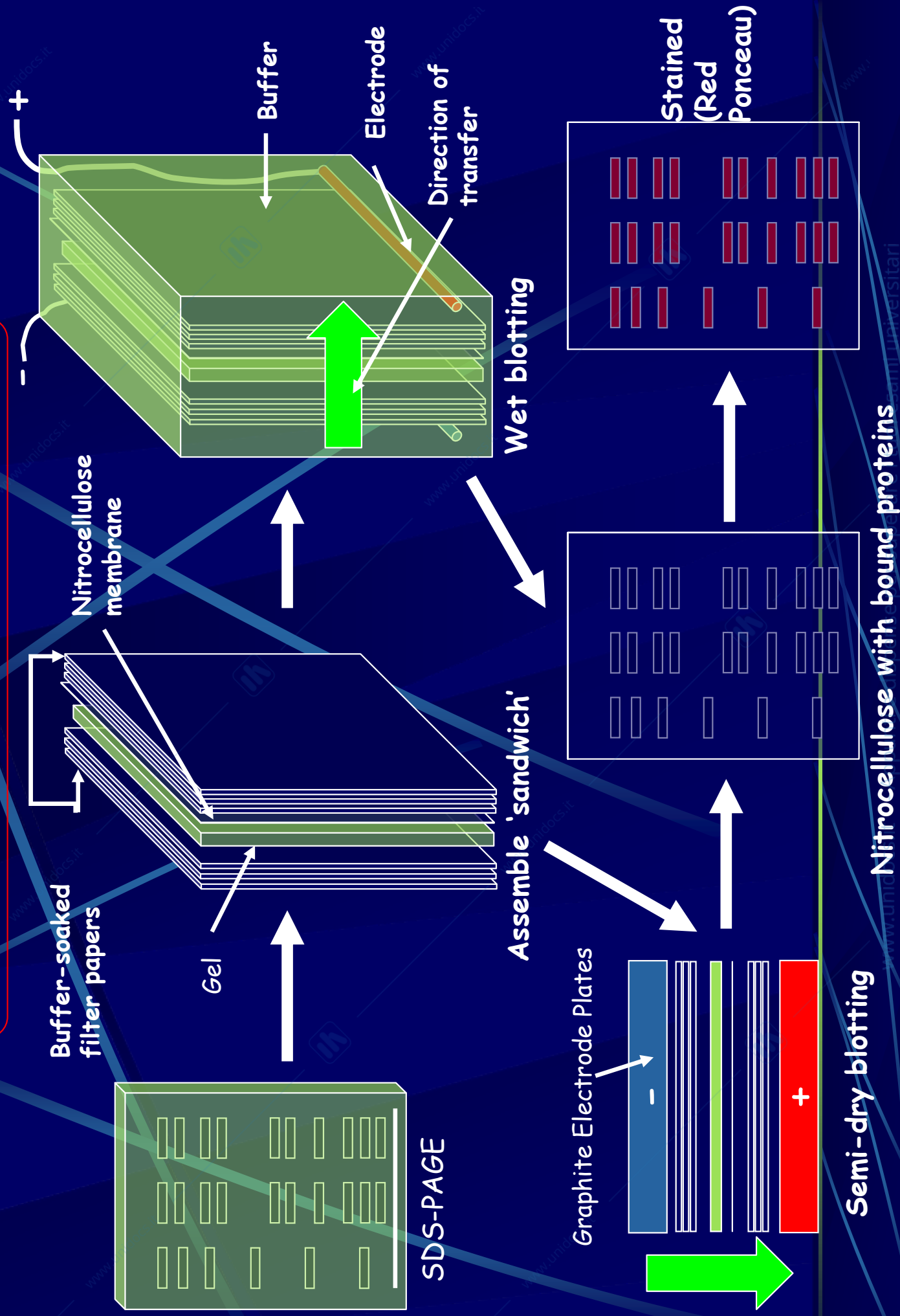
Trasferimento dal catodo
(-) all' anodo (+)

- 1) Spugnette
- 2) 3 fogli di carta da filtro imbevuti di tampone di trasferimento
- 3) Gel
- 4) Membrana
- 5) 3 fogli di carta da filtro imbevuti di tampone di trasferimento
- 6) Spugnette

Apparato per il trasferimento "Semi-dry"



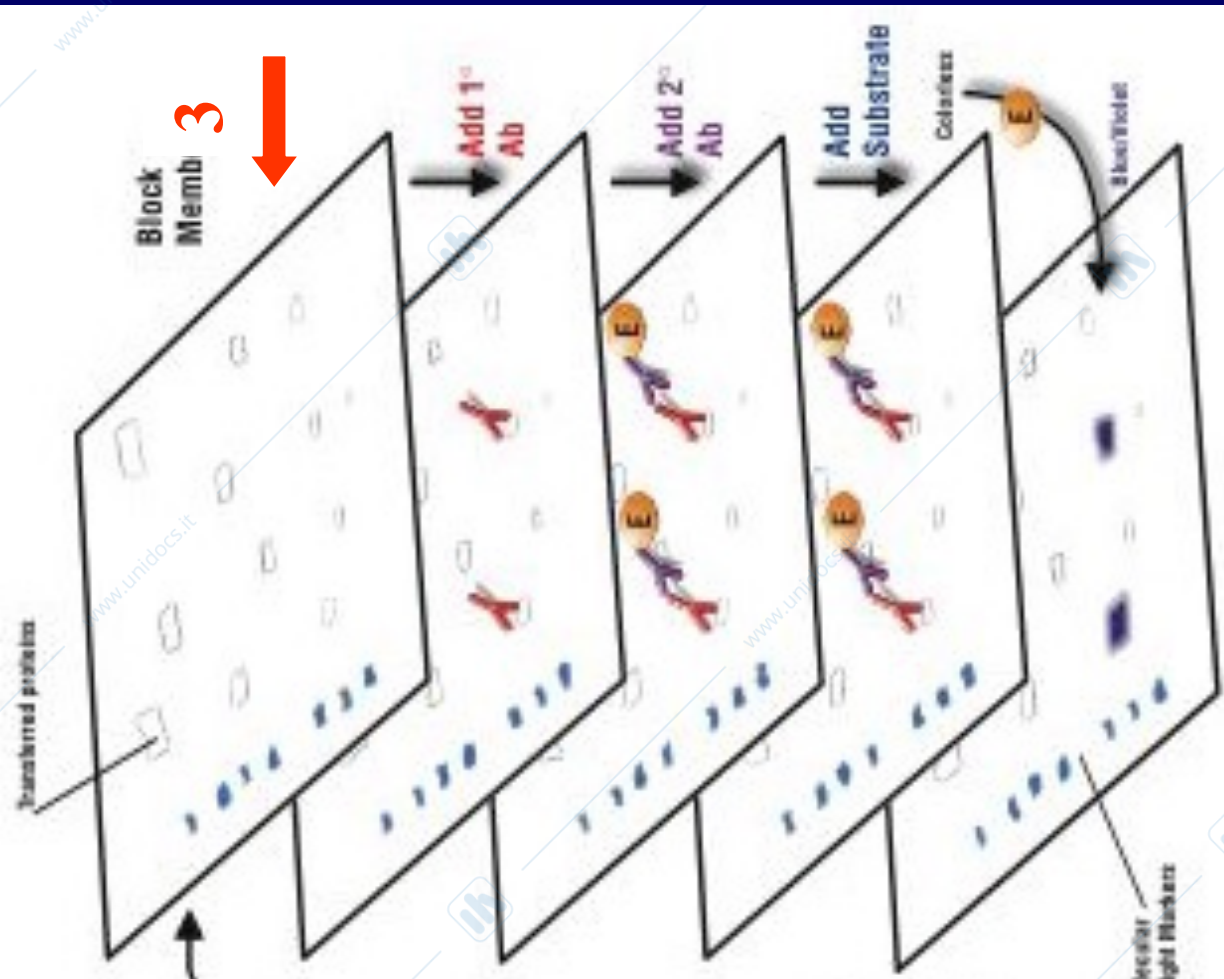
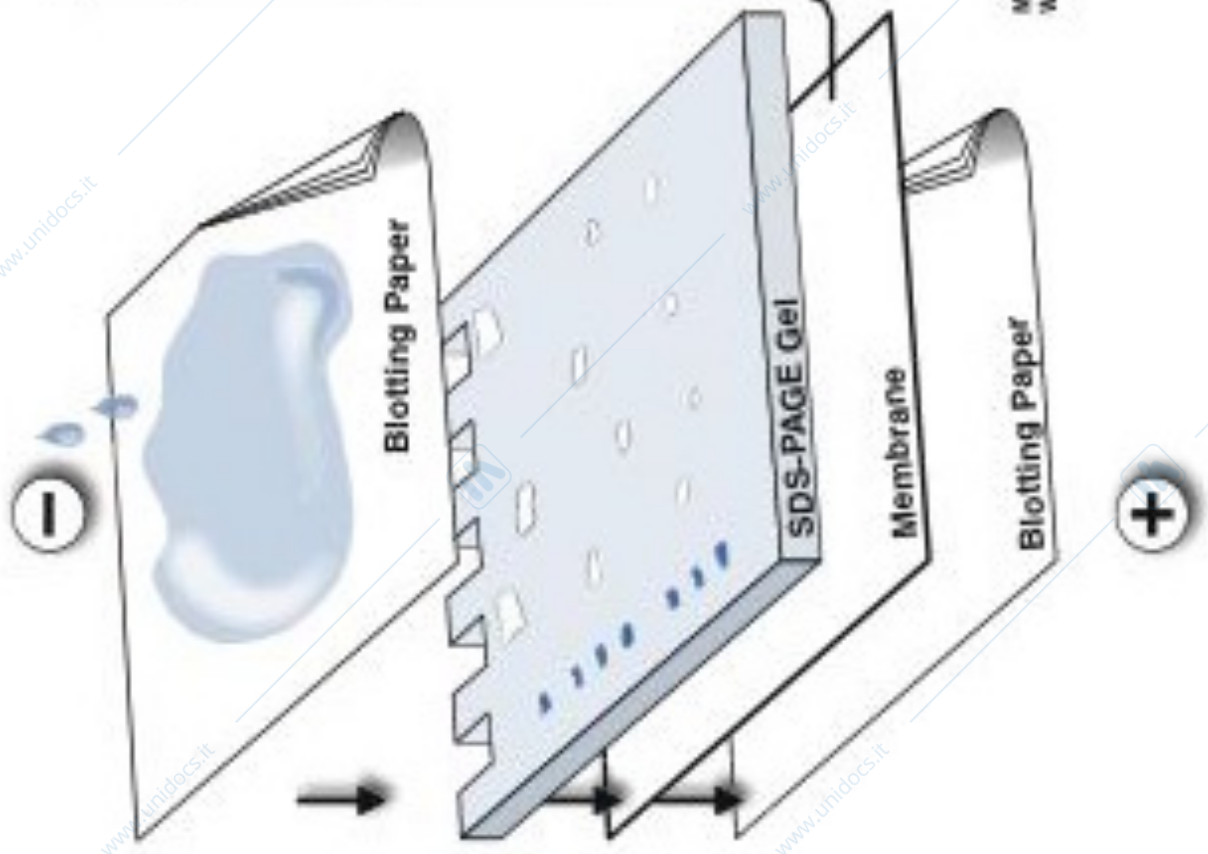
Western Blotting



Western blot: seconda fase Immobilizzazione e trasferimento

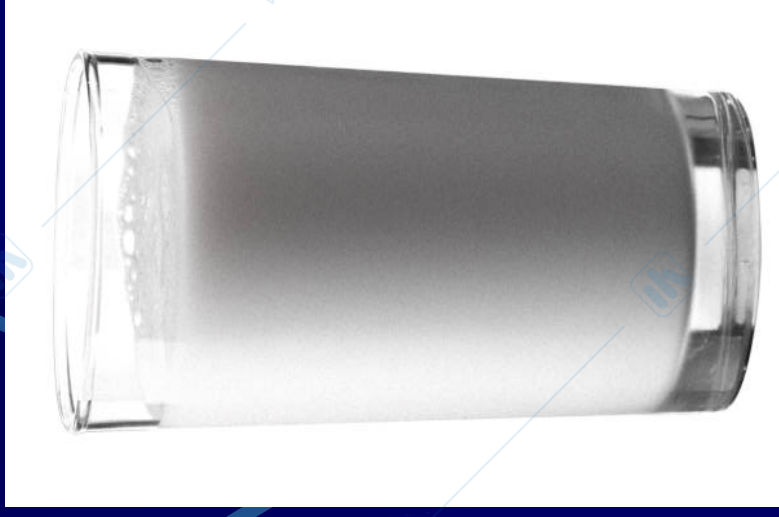
- Componenti del tampone di trasferimento:
 - 25mM Tris
 - 190mM glicina
 - 20% metanolo

Western Blotting

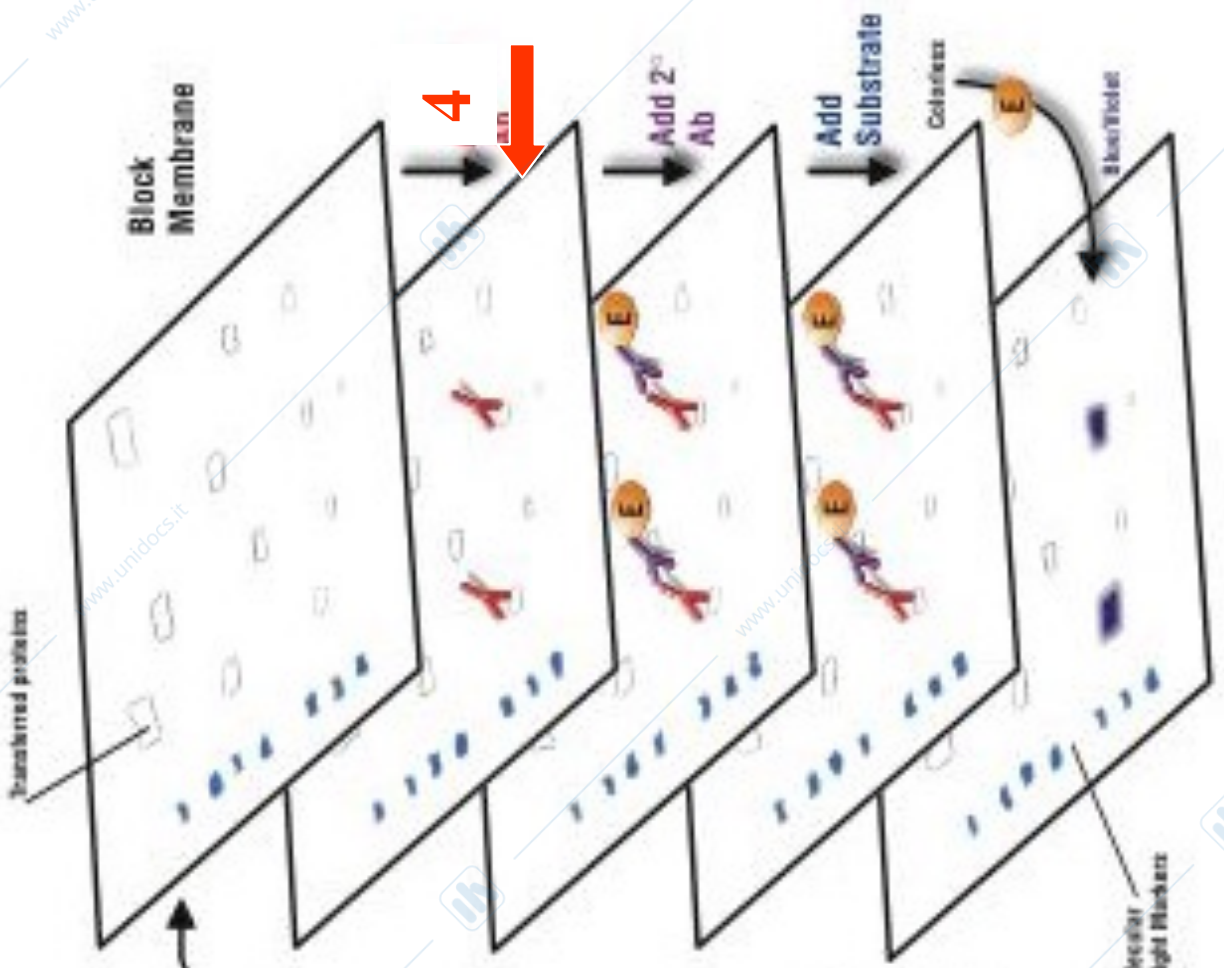
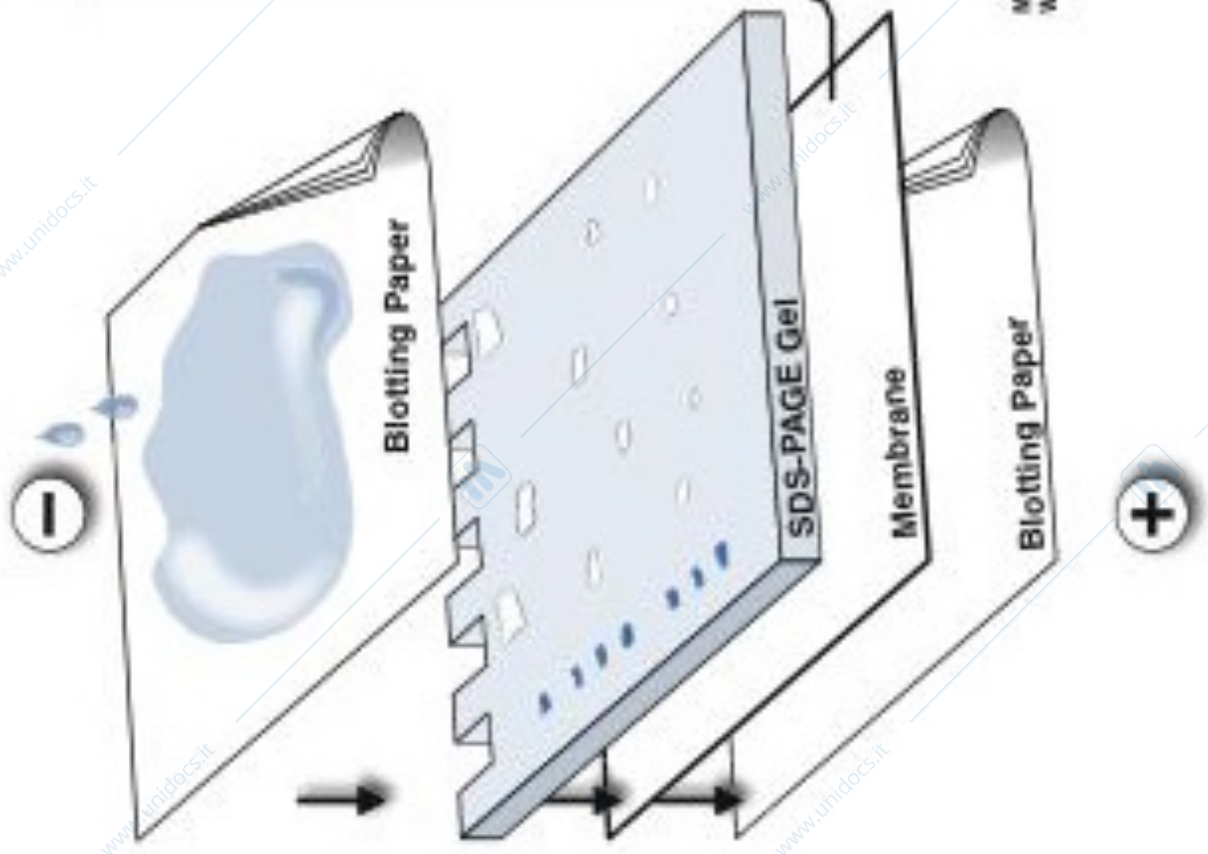


Western blot: terza fase saturazione o “blocking”

- Per saturare i siti idrofobici liberi sulla membrana
- Per prevenire il legame dell'anticorpo primario alla membrana stessa
- Latte scremato o Albumina di Siero Bovino (BSA)



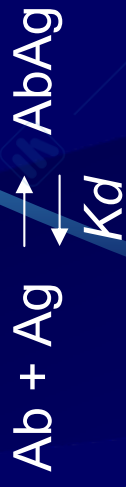
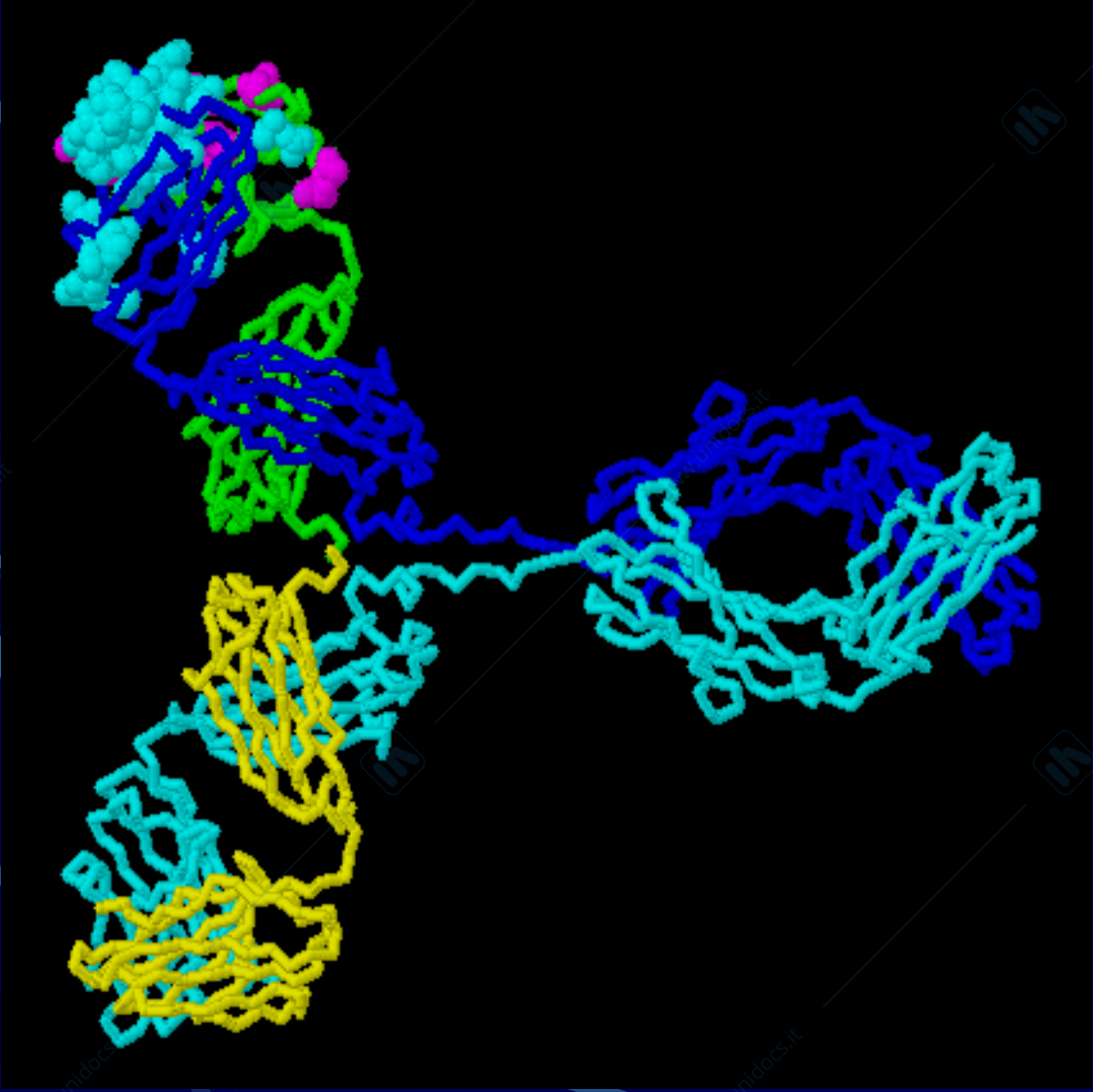
Western Blotting



Western blot: quarta fase incubazione con anticorpo primario

- L'anticorpo primario riconosce la proteina di interesse e non lega le altre proteine immobilizzate sulla membrana
- Anticorpi come sonde:
 - Molto sensibili
 - Possono essere “prodotti”
 - Immunizzando una specie diversa (anticorpi policlonali)
 - Generando anticorpi monoclonali (mAb)
 - Economici

Anticorpi

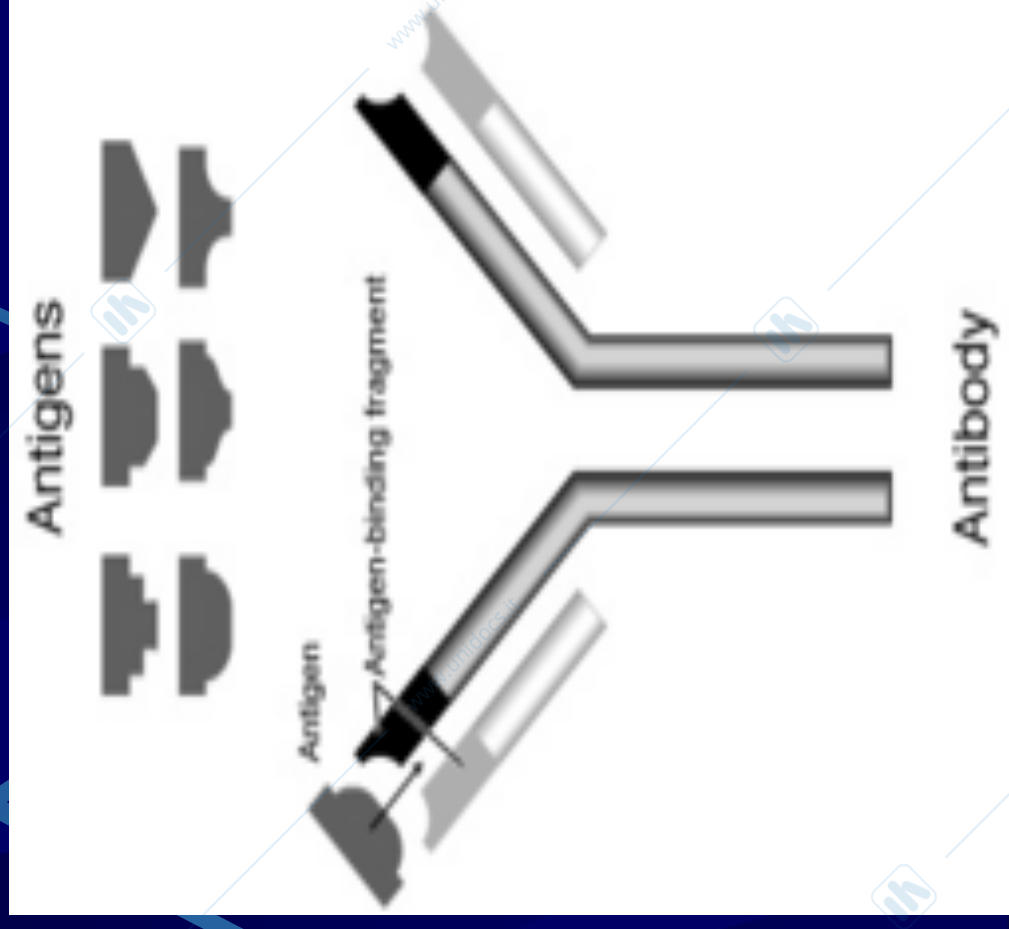


$$K_d = \frac{[\text{Ab}]}{[\text{AbAg}]} = 10^{-9} \text{ M}$$

Anticorpi

Anticorpi (immunoglobuline, Ig)

Una proteina a forma di Y secreta nel sangue in risposta ad uno specifico antigene, come un batterio o un virus, che neutralizza l'antigene legandosi specificamente ed esso e producendo una risposta immunitaria.



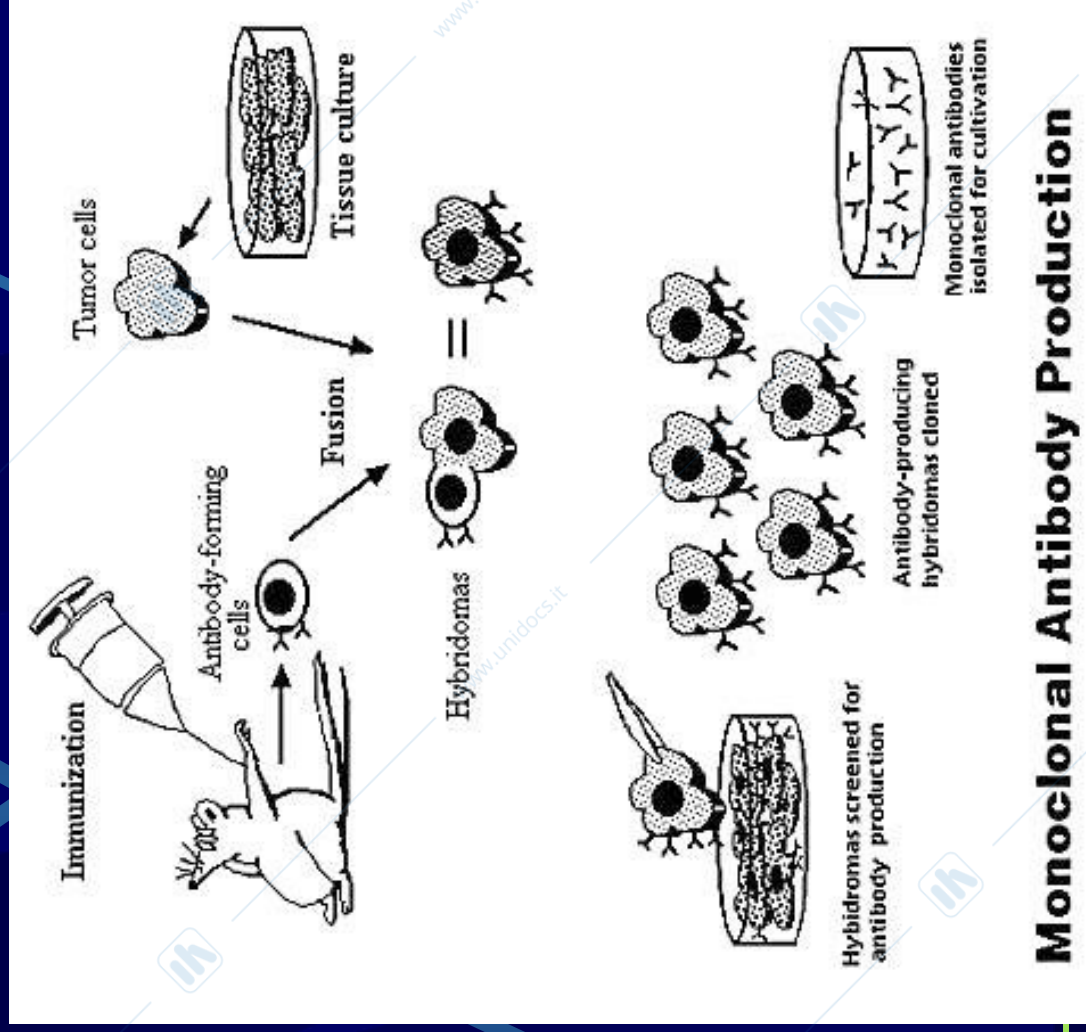
Anticorpi policlonali

Produzione

- Immunizzazione ripetuta dell'animale con l'antigene (peptide, proteina purificata o ricombinante)
- Il sangue e' prelevato nel momento di picco di produzione dell'anticorpo ed e' purificato il siero
- Il "pool" degli anticorpi riconosce molti epitopi dell'antigene usato per l'immunizzazione

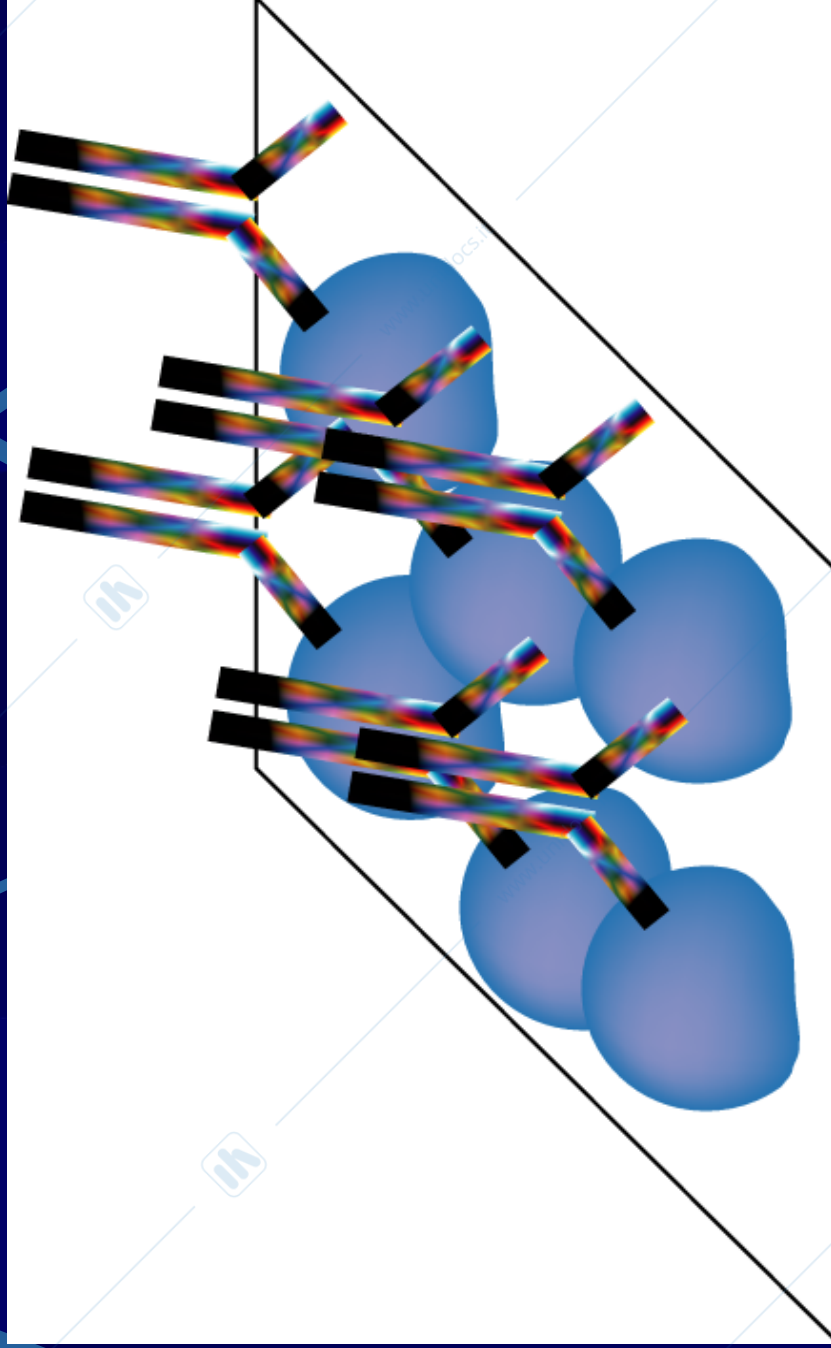
Anticorpi monoclonali

Riconoscono solo
un epitopo

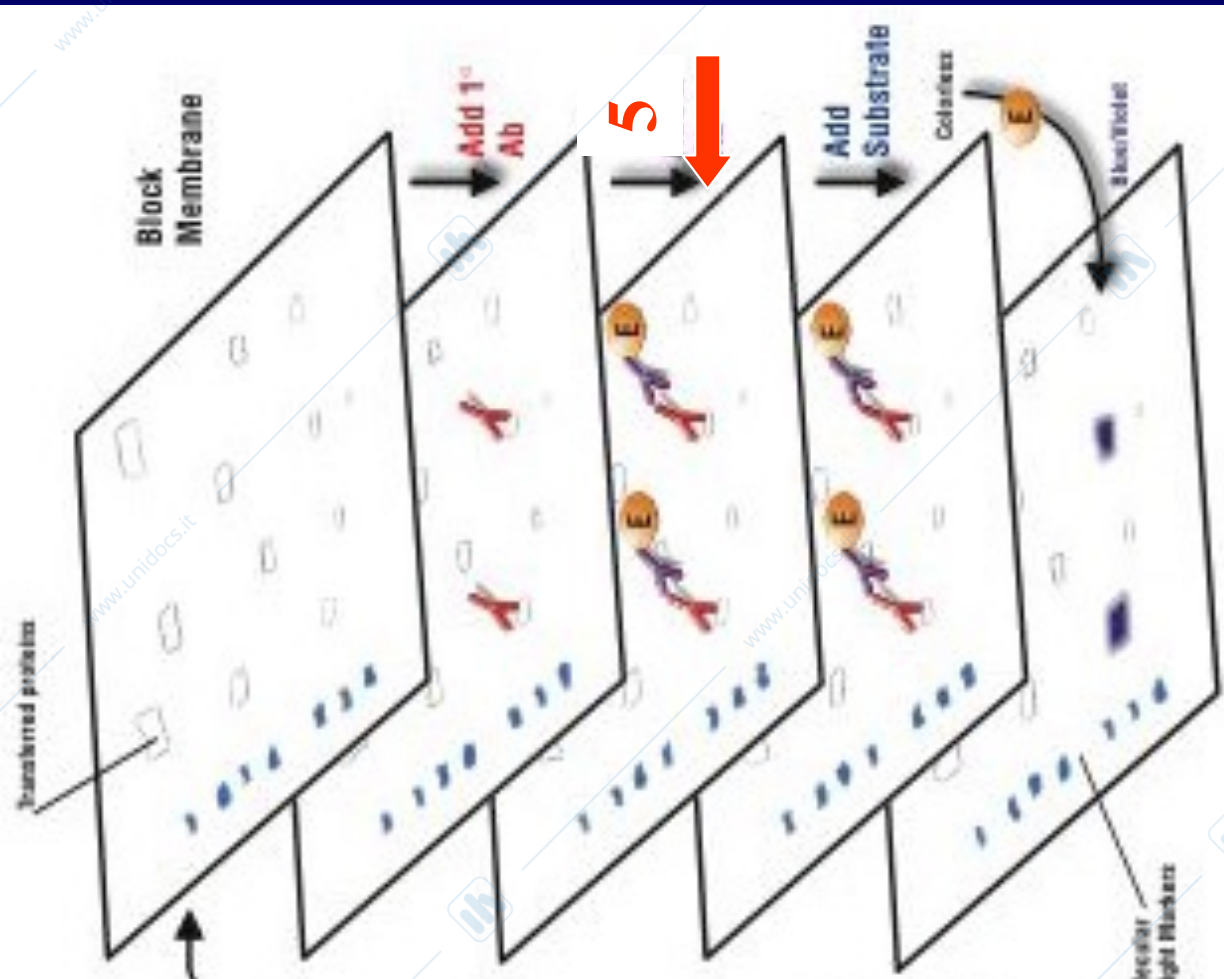
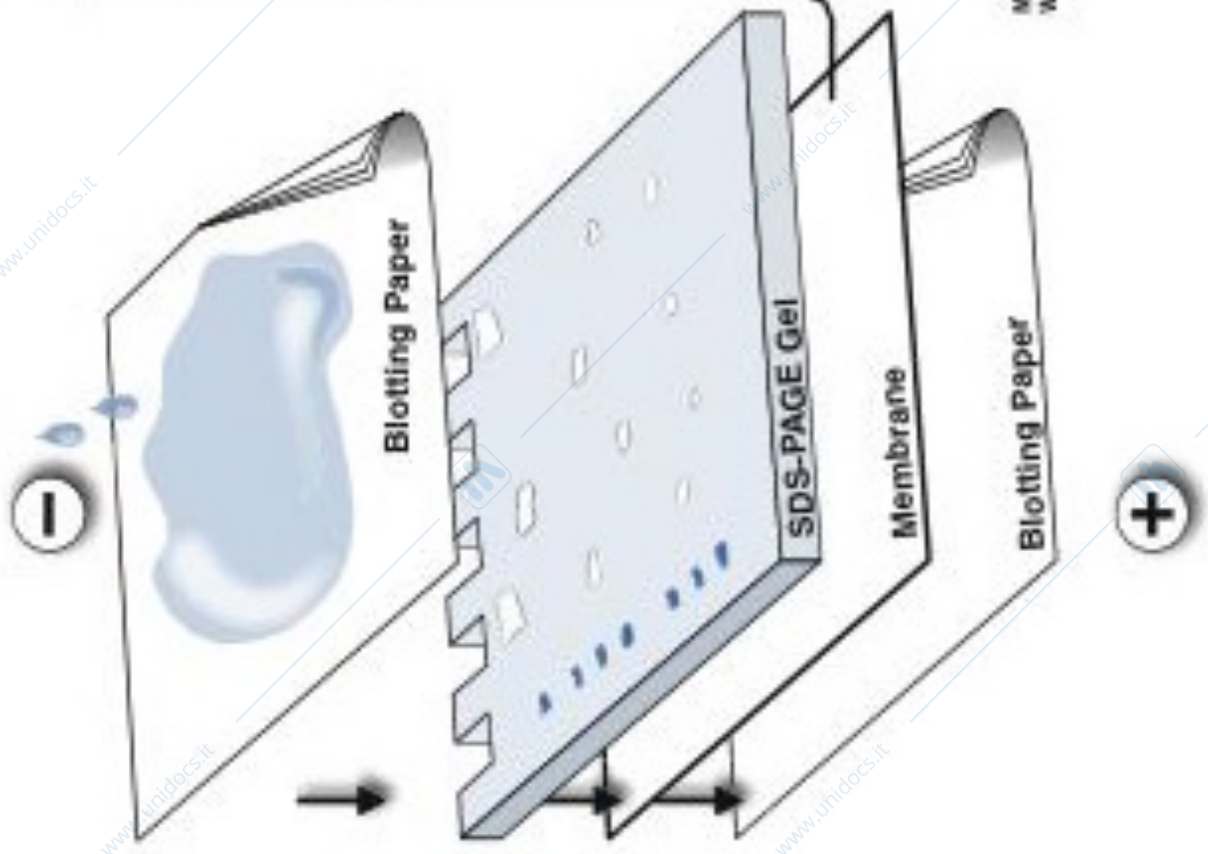


Monoclonal Antibody Production

Western blot: quarta fase incubazione con anticorpo primario



Western Blotting



Transfered proteins

Block Membrane

Add 1st Ab

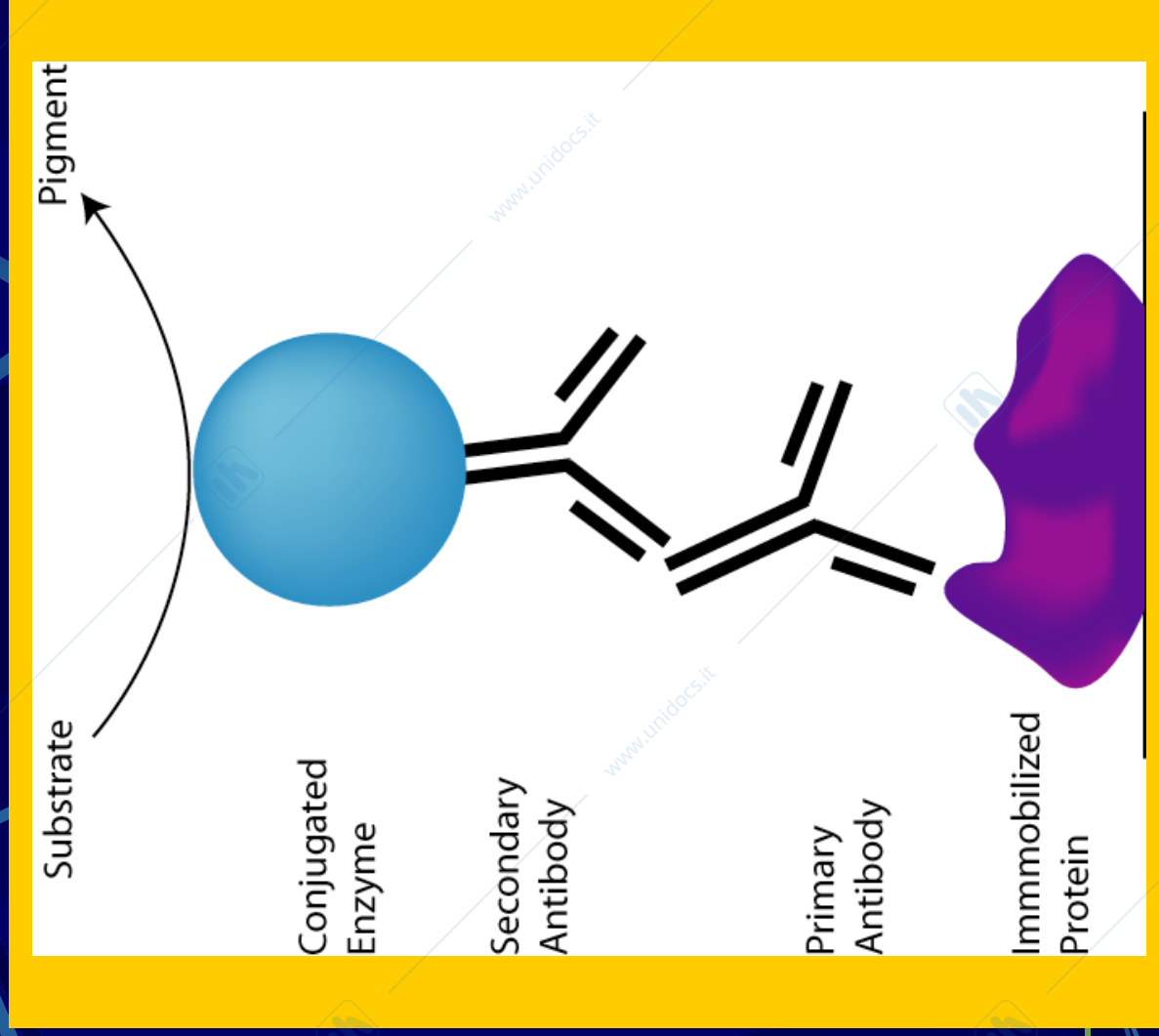
Add Substrate

Colorless

Blue/Violet

Molecular Weight Markers

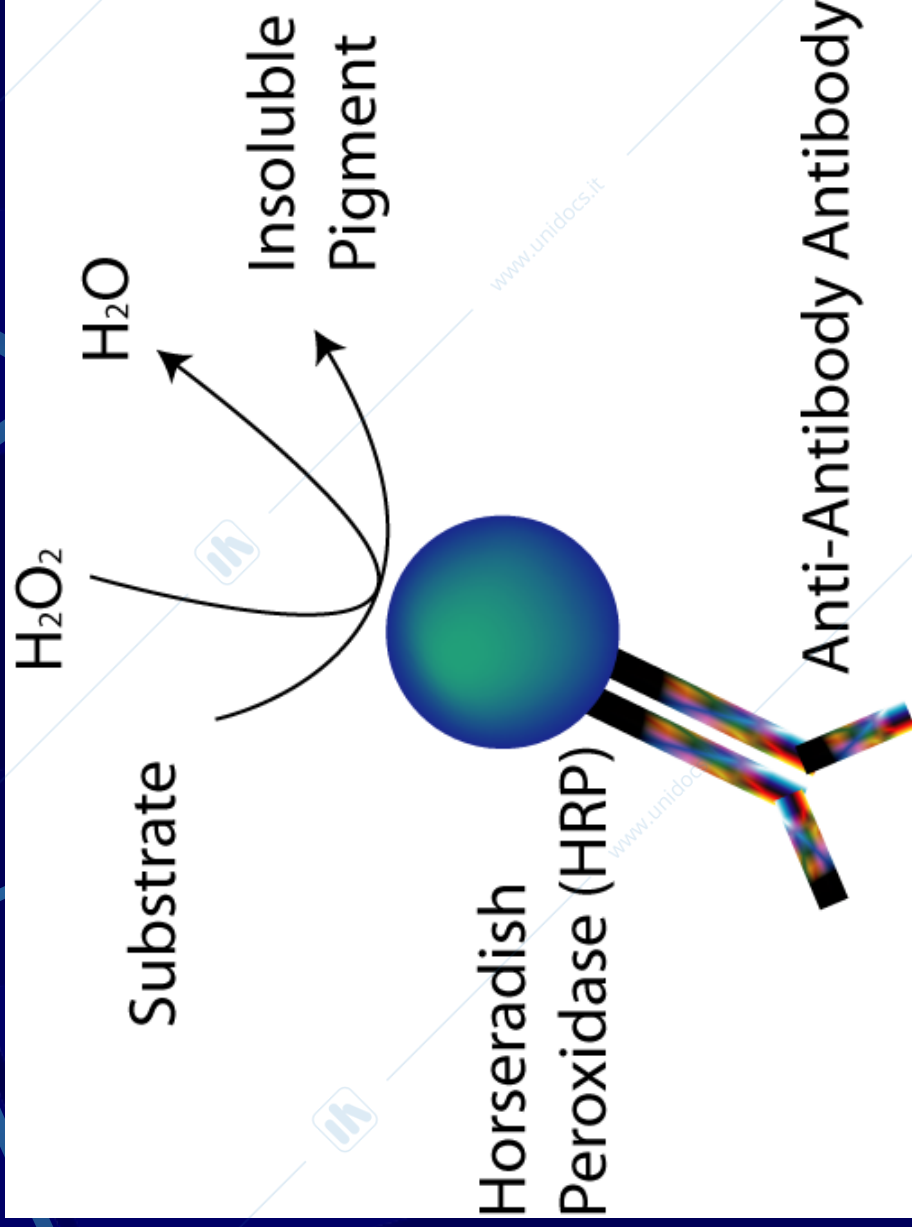
Western blot: quinta fase Incubazione con anticorpo secondario

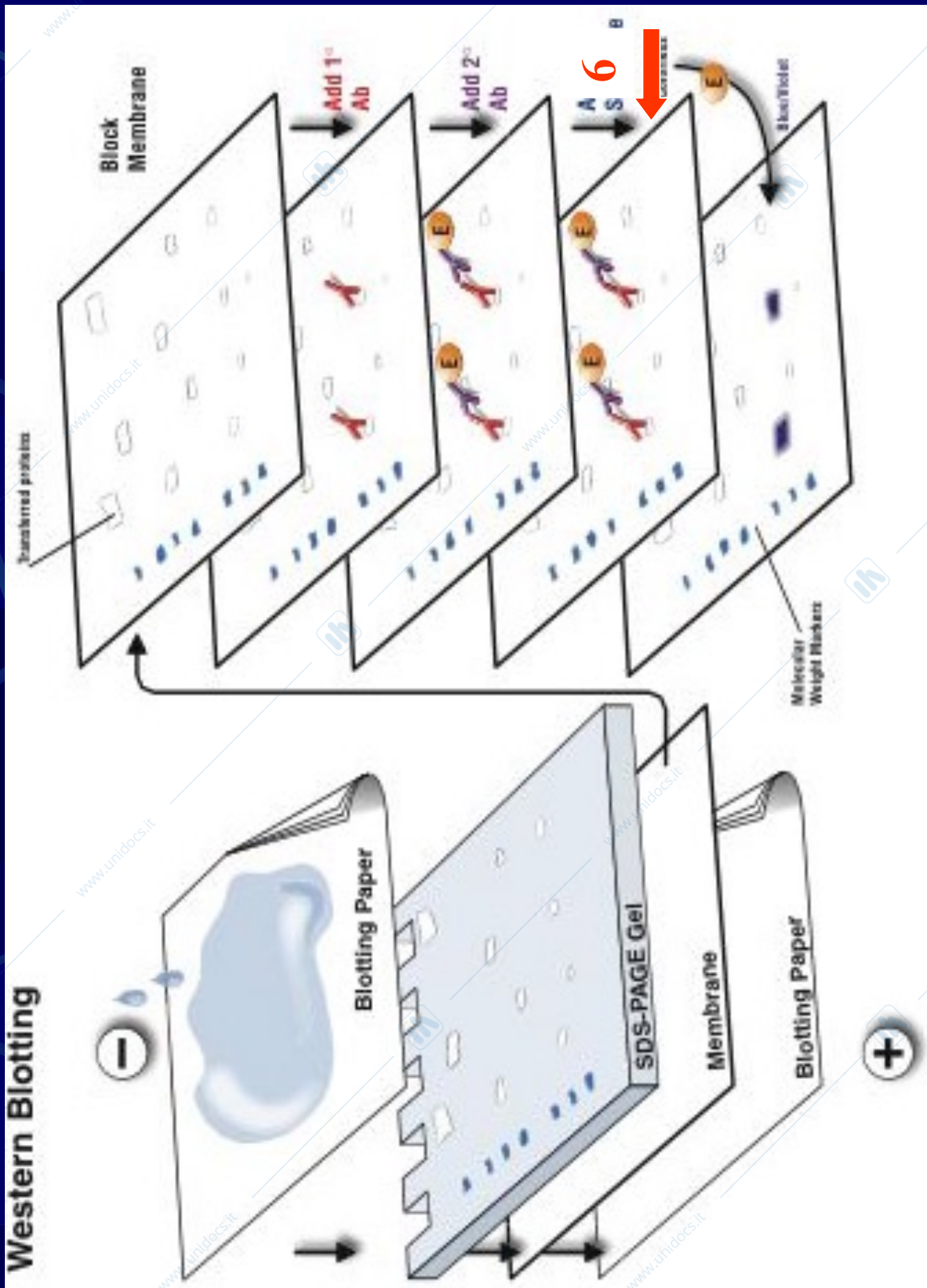


Anticorpi

- Anticorpo primario
 - Riconosce la proteina
- Anticorpo secondario
 - Lega l'anticorpo primario
 - Generalmente prodotto in una specie diversa
 - Coniugato con un enzima
 - Il substrato dell'enzima sarà convertito in un prodotto colorato
 - Può anche essere radioattivo o fluorescente

Western blot: quinta fase Incubazione con anticorpo secondario

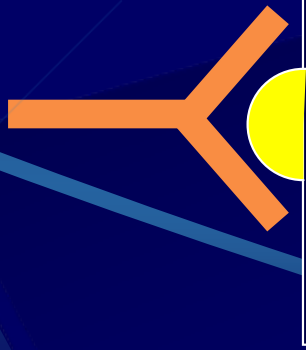




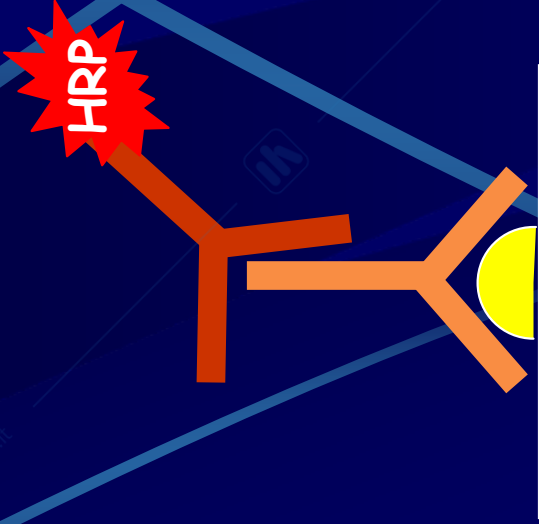
Western blot: sesta fase rivelazione o “detection”

- Fosfatasi alcalina (AP) o perossidasi del rafano (HRP: horseradish peroxidase)
 - Conversione di un substrato colorimetrico in un precipitato colorato
- Substrati Chemiluminescenti
 - Emettono luce se convertiti dall'enzima
 - Possono essere visualizzati su lastre radiografiche
- Marcatura radioattiva
- Anticorpi secondarii biotinilati

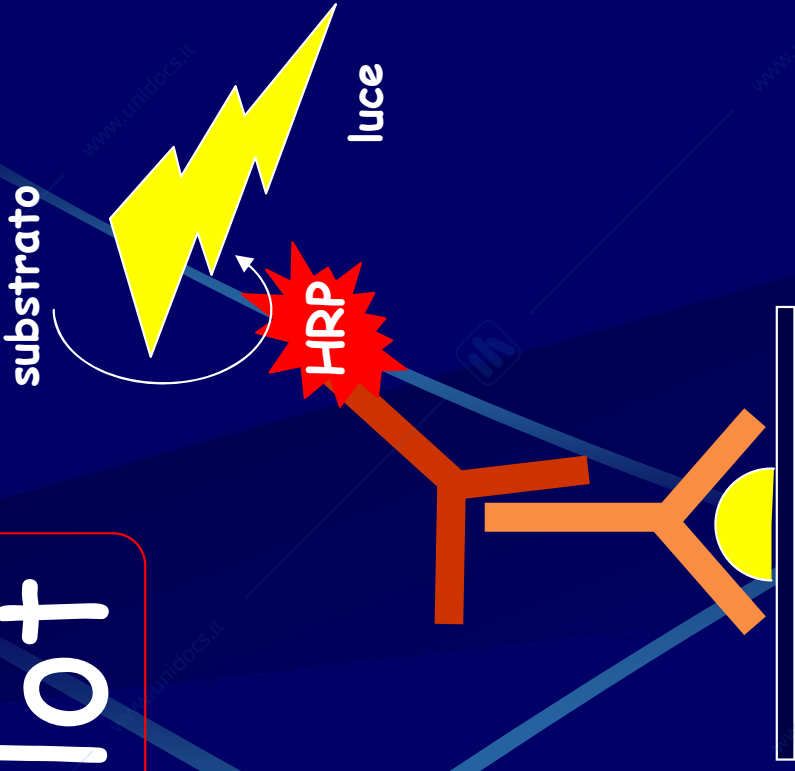
Western blot



Anticorpo primario

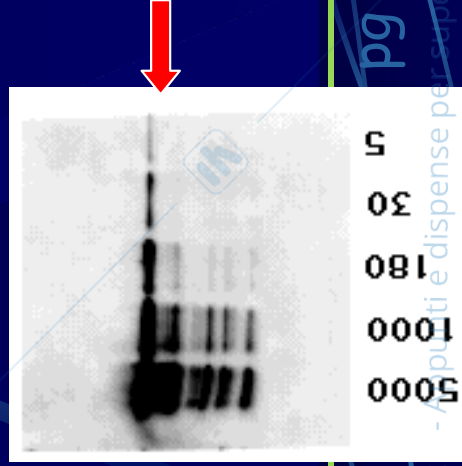


Anticorpo secondario



Rivelazione

Il substrato metabolizzato dalla perossidasi (HRP) emette luce



pg proteina