

Tecniche Elettroforetiche: tecniche di separazione che sfruttano la migrazione di molecole provviste di carica elettrica sotto l'influsso di un campo elettrico

Molecole di interesse biologico:

- Aminoacidi
- Proteine
- Nucleotidi
- Acidi nucleici

Anche altri composti come **carboidrati** (composti non ionici)
se trasformati chimicamente

Obiettivo: Valutare il grado di purezza dei composti e loro dimensioni

Molecole cariche sottoposte ad un campo elettrico???

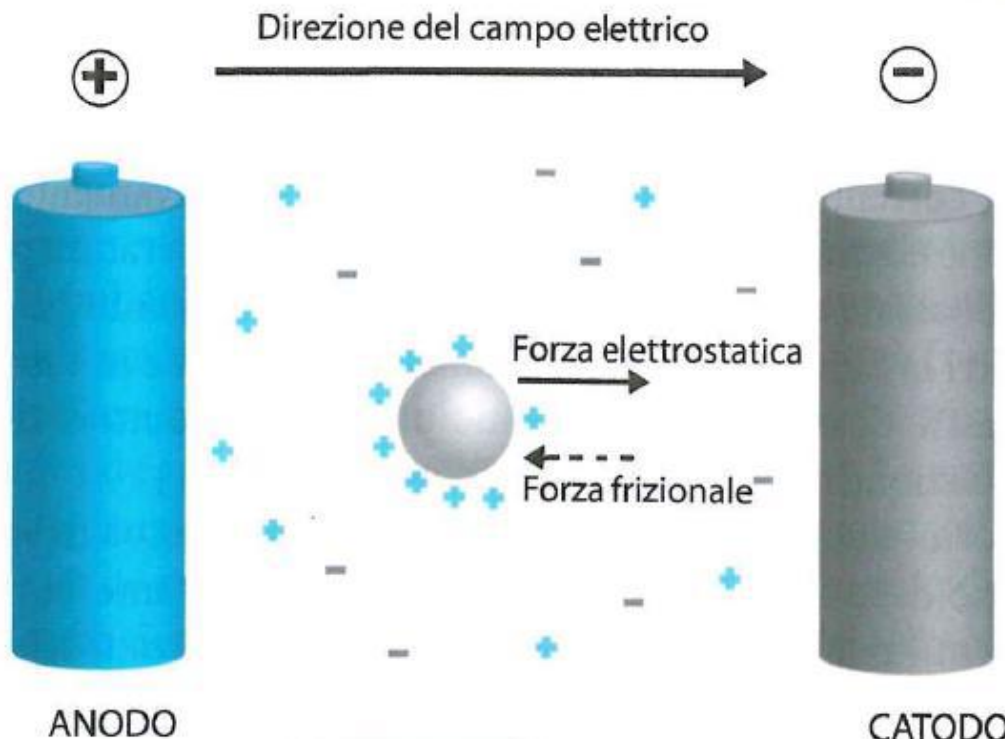
Applicando una **ddp (V)** tra due elettrodi si genera un campo elettrico (E) che dipende dalla distanza tra i **due elettrodi**

Il campo elettrico induce la mobilita della molecola di carica (**q**) verso l'elettrodo di carica opposta con una velocità di migrazione **v**.

$$F_{1spinta} = q \cdot E$$

$$F_{2frenante} = v \cdot \text{f}$$

Coefficiente frizionale che tiene in considerazione:
-dimensione e forma dello IONE
-porosità del supporto



$$F_{1\text{spinta}} = q \cdot E$$

$$F_{2\text{frenante}} = v \cdot f$$

Coefficiente frizionale che tiene in considerazione:
-dimensione e forma dello IONE
-porosità del supporto

In un campo elettrico costante le 2 forze si bilanciano

$$F_1 = F_2 \quad q \cdot E = v \cdot f \quad v = q \cdot E / f$$

introduciamo il parametro **mobilità elettroforetica** $\mu = v/E = q/f$

Velocità in cm/sec in un campo elettrico UNITARIO

dal momento che **f** dipende molto dalle dimensioni

$$\mu = q/m$$

$\mu = 0$ per proteine a $\text{pH} = \text{pI}$

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

Principali metodologie elettroforetiche nella ricerca e nella diagnostica biomedica

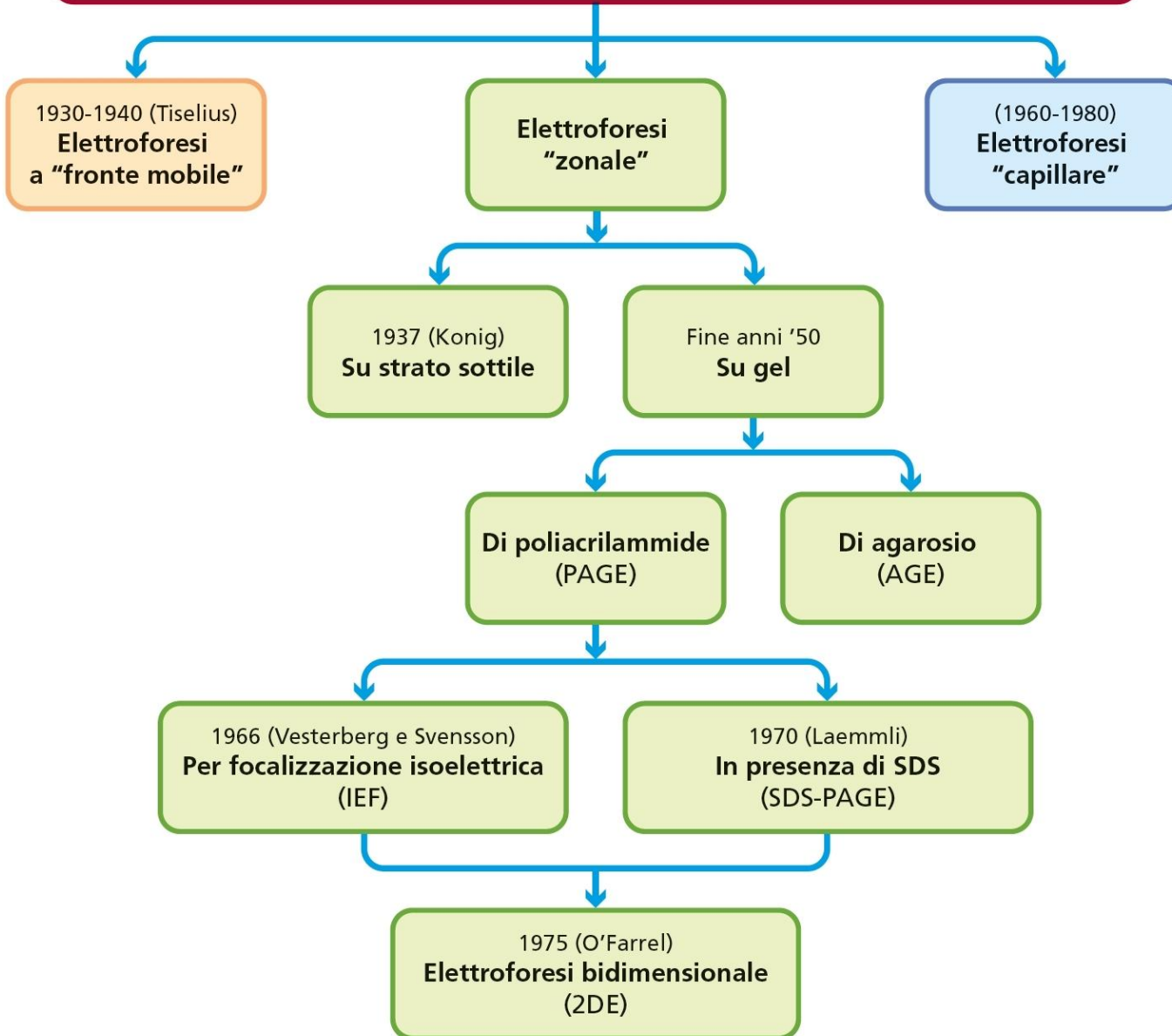
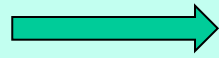


Figura 8.2

Classificazione delle tecniche elettroforetiche in base al tipo di mezzo in cui avviene la migrazione delle specie ioniche.

Elettroforesi:

1930 Arne Tiselius (premio Nobel Chimica nel 1948)



Elettroforesi in fase libera

Processi di diffusione



Elettroforesi su supporti solidi

Elettroforesi zonale: uso di supporti per la separazione

Supporti

carta da filtro

acetato di cellulosa

gel di poliacrilamide
gel di agarosio

risultati accettabili x molecole di piccole dimensioni

notevole aumento di risoluzione per effetto setaccio del gel

Elettroforesi zonale

Alimentatore

(genera un flusso di corrente)



Cella elettroforetica
(orizzontale o verticale)

Cationi migrano
verso il catodo (-)

Anioni migrano
verso l'anodo (+)

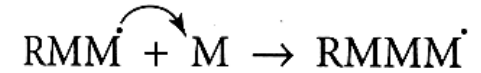
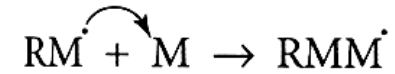
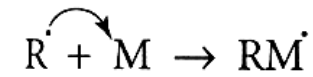
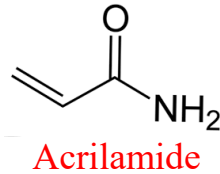
Tampone: necessario per la conduzione della corrente e per mantenere
Lo stato di ionizzazione del campione.



PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (PAGE):

utilizza un supporto di poliacrilamide

$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COOH}$
Acido acrilico
Acido 2-propenoico



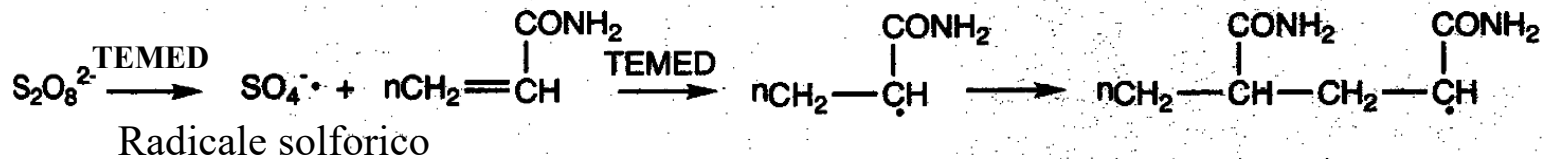
reazione di polimerizzazione radicalica richiede:

Ammonio Persolfato (AP)
 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ **(Ione Persolfato)**

TEMED $(\text{CH}_3)_2\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$
 N,N,N',N' tetrametil-etilendiamina

Catalizzatore

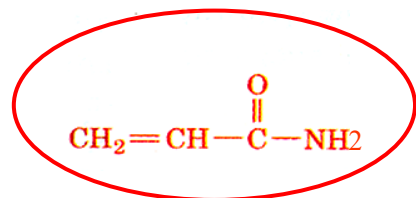
Iniziatore radicalico



Il processo di polimerizzazione dell'acrilammide avviene per catalisi radicalica ed inizia con l'aggiunta di ammonio persolfato (iniziatore) e della base N,N,N',N'-tetrametilendiammina (TEMED, catalizzatore). Il TEMED decompone lo ione persolfato dando origine al radicale libero $\cdot\text{SO}_4^-$, che innesca la polimerizzazione:

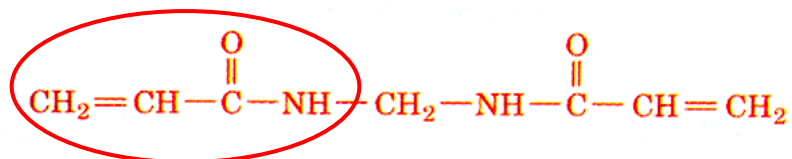
Polimero lineare è una soluzione acquosa viscosa non un gel

PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (PAGE): utilizza un gel di poliacrilamide

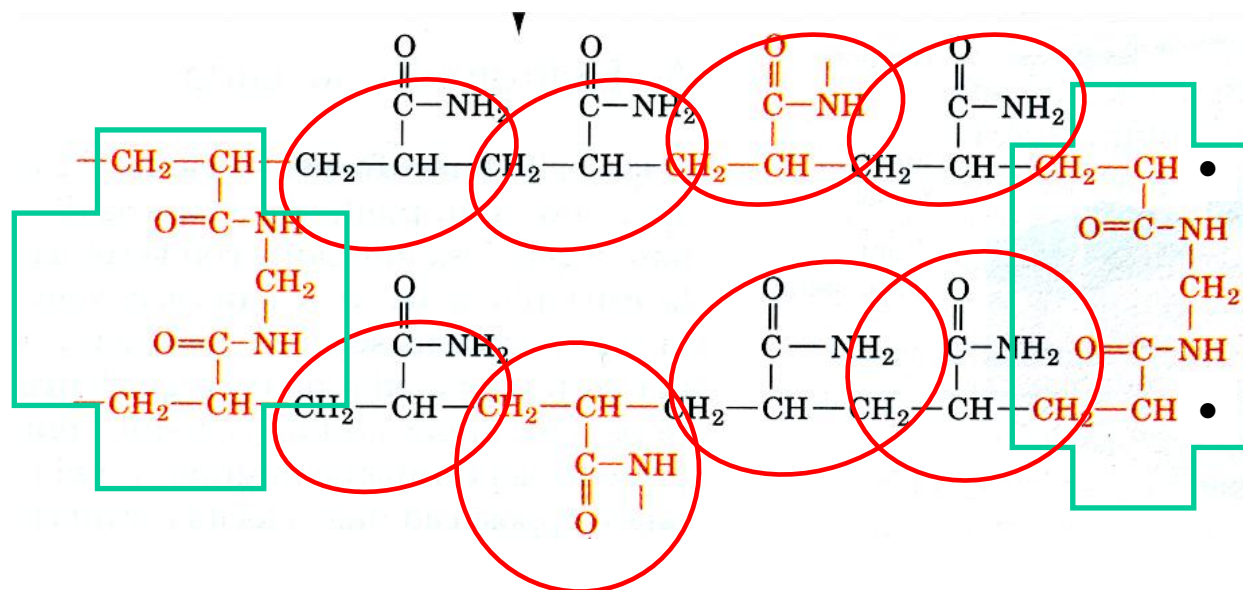


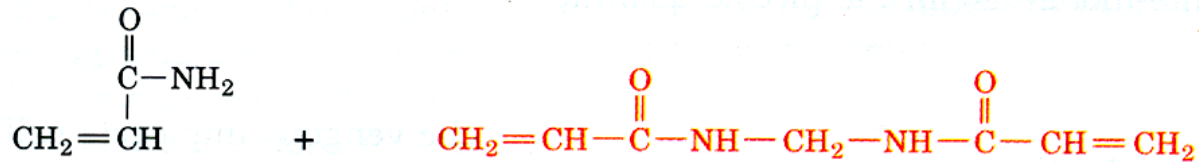
Acrilamide

+

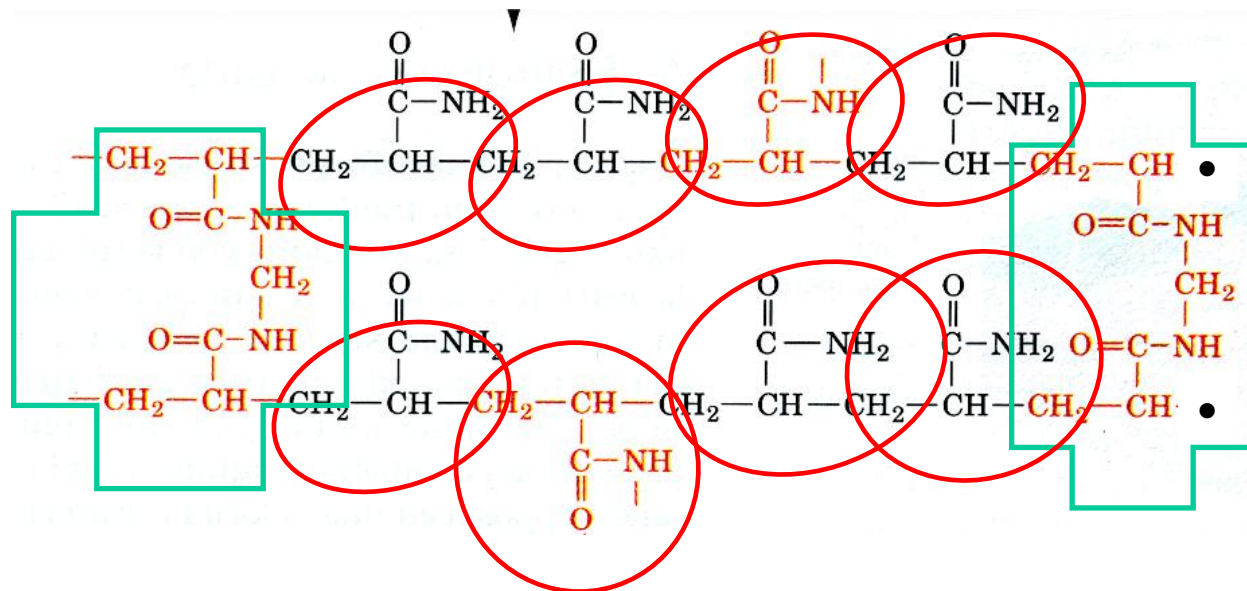


N,N'-metilen bisacrilamide





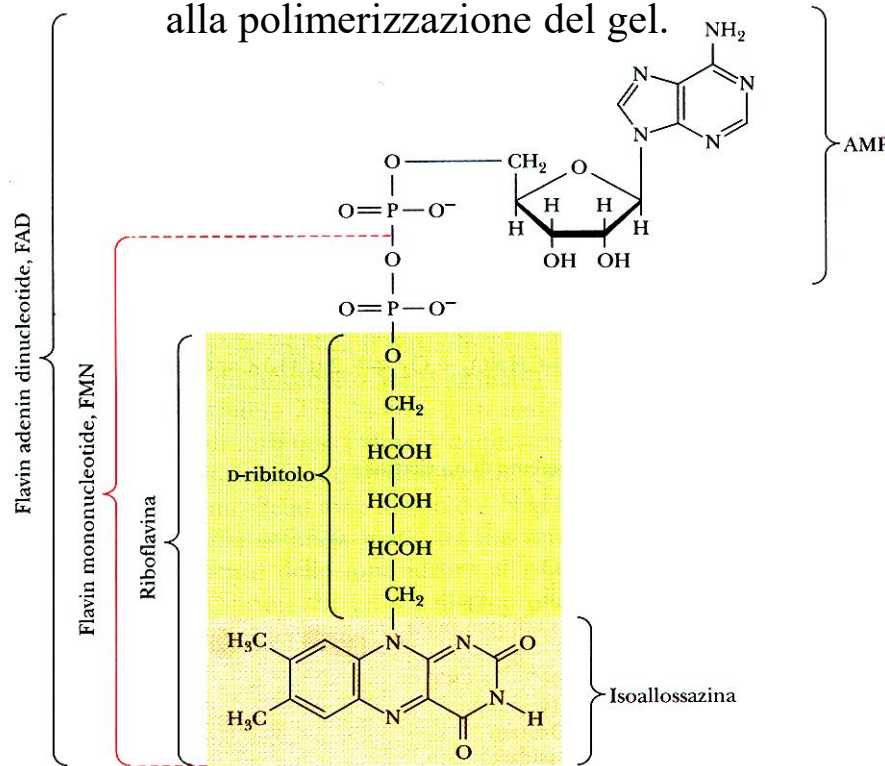
Attenzione:
 Monomeri di acrilamide e bis-acrilamide sono tossici
 (per contatto e inalazione),
 vanno quindi maneggiati indossando gli appositi DPI



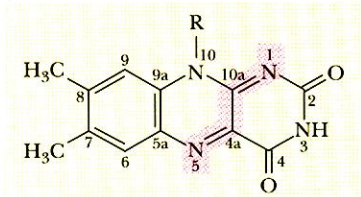
Si forma una maglia che offre un effetto setaccio per la separazione delle molecole

Riboflavina = catalizzatore radicalico x fotopolimerizzazione

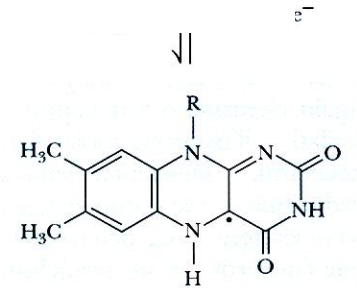
Si prepara la soluzione e poi la si irradia per due o tre ore con luce UV. La fotodecomposizione della riboflavina produce radicali liberi che danno inizio alla polimerizzazione del gel.



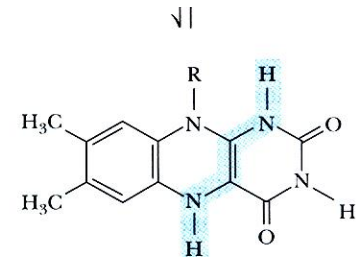
Forma ossidata
 $\lambda_{\max} = 450 \text{ nm}$
(giallo)



Forma semichinonica
 $\lambda_{\max} = 570 \text{ nm}$
(blu)



Forma ridotta
(incolore)



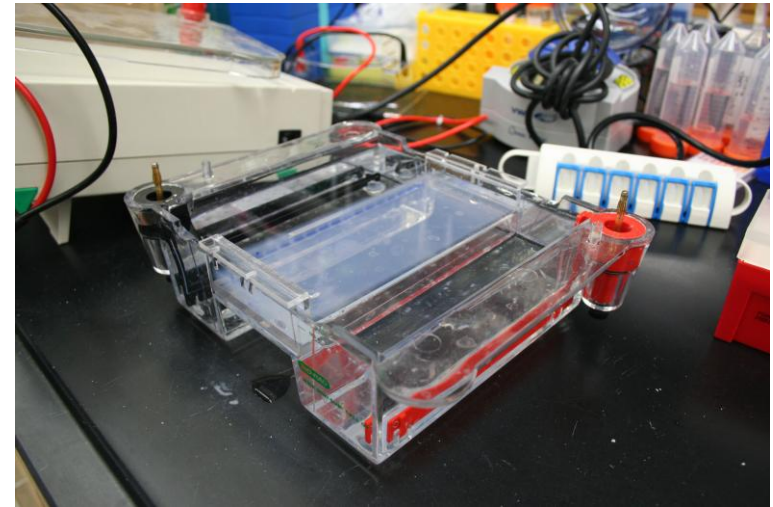
E' un'alternativa all'ammonio persolfato

Camere elettroforetiche:

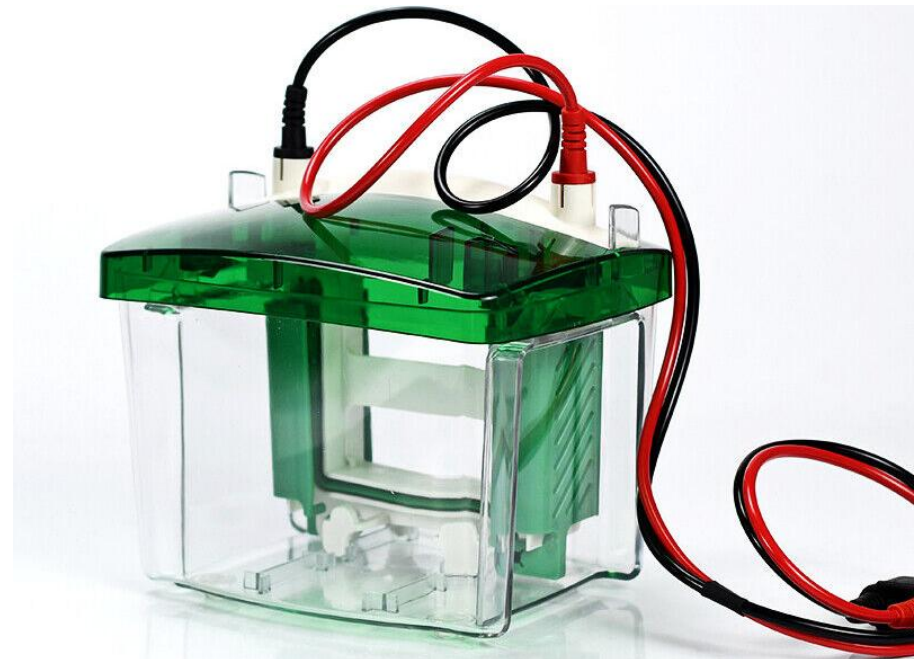
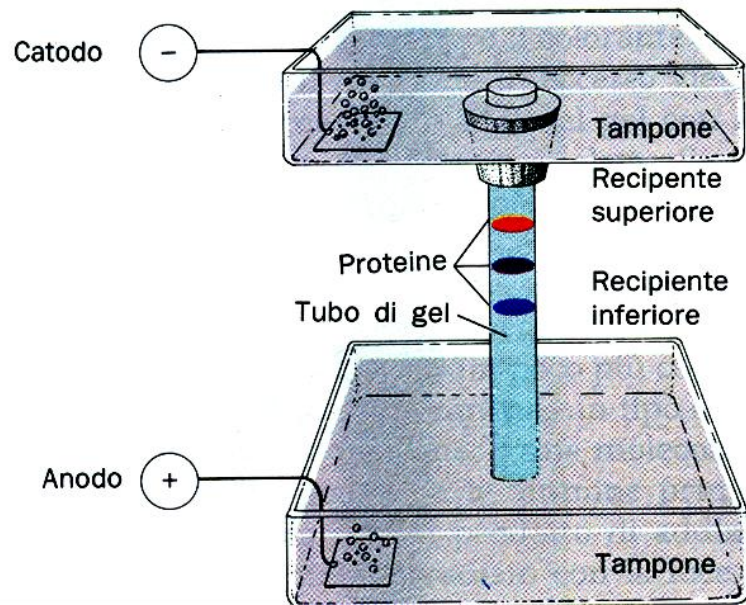
Elettroforesi su carta e su acetato di cellulosa



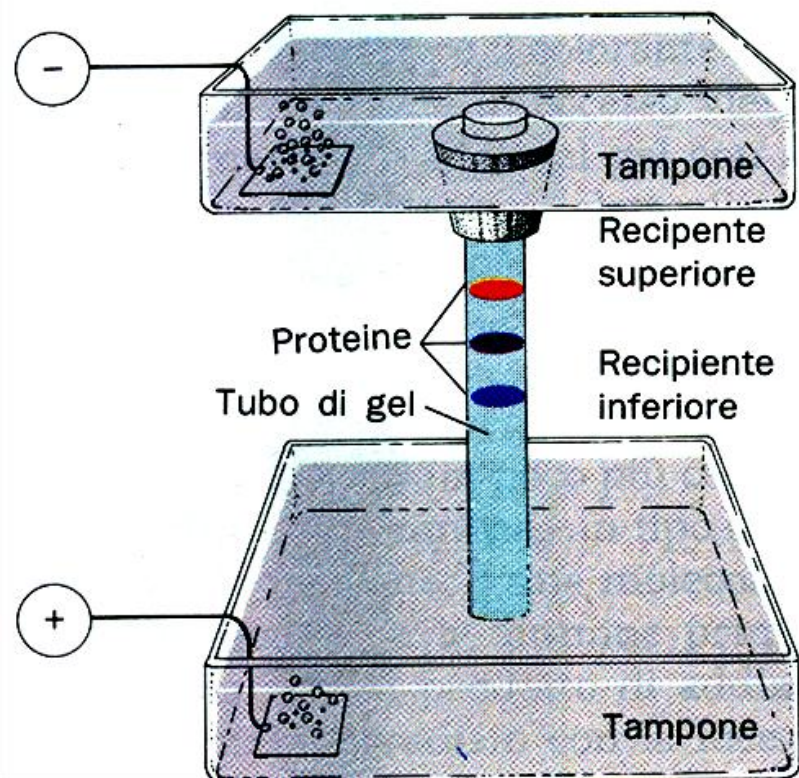
Elettroforesi su gel di agarosio



Elettroforesi su gel di poliacrilamide



Gel elettroforesi su tubicino

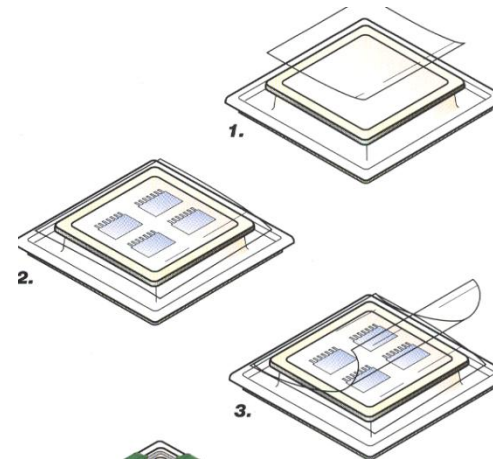
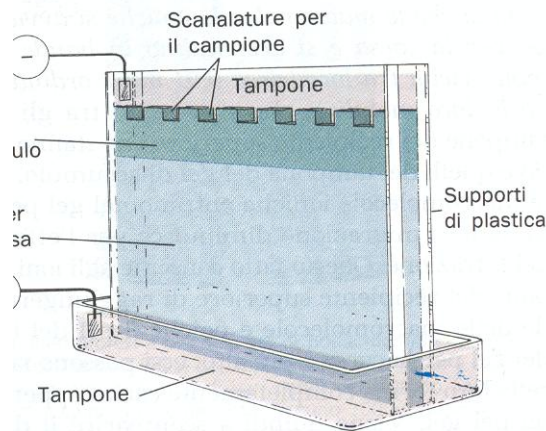


Gel elettroforesi su lastrina



FASI della SEPARAZIONE ELETTROFORETICA

- Preparazione del gel
- Preparazione e Caricamento campioni
- Corsa Elettroforetica
- Interruzione Campo Elettrico
- Colorazione e Decolorazione
- Conservazione del gel



Allestimento delle lastrine

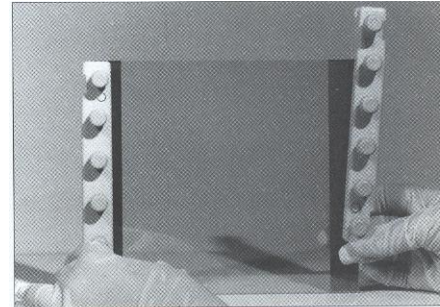
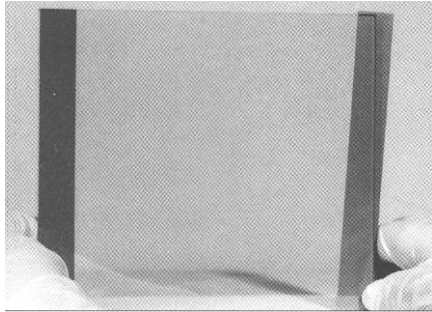


Figure 2.2B. Attaching the clamp

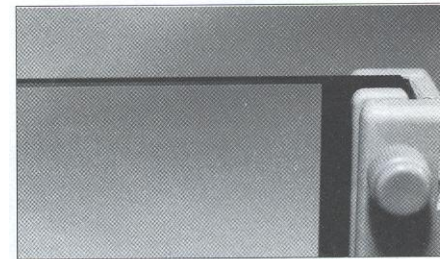


Figure 2.2C. Properly assembled gel sandwich. Glass plates and spacer are flush with the raised ribs on the end of the clamp.

pettine

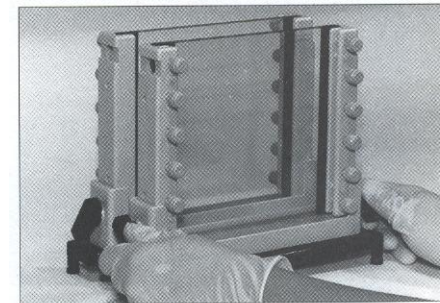
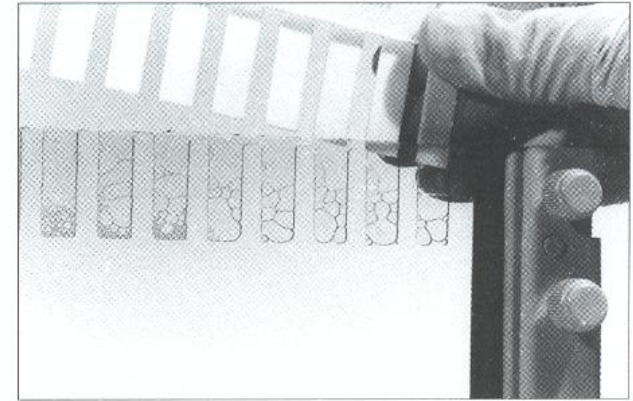
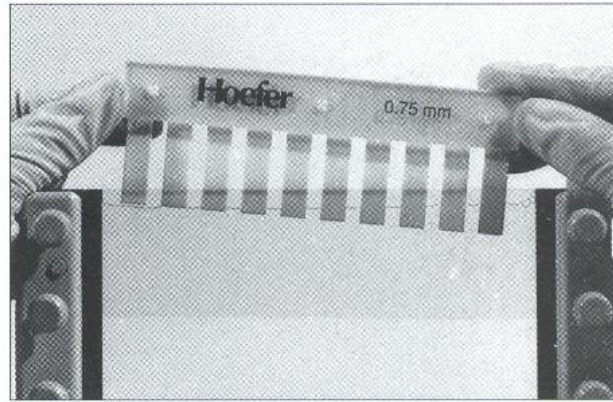
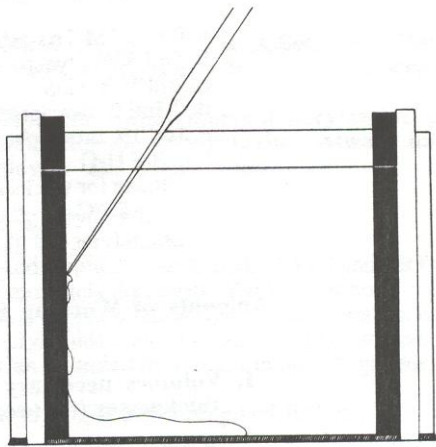
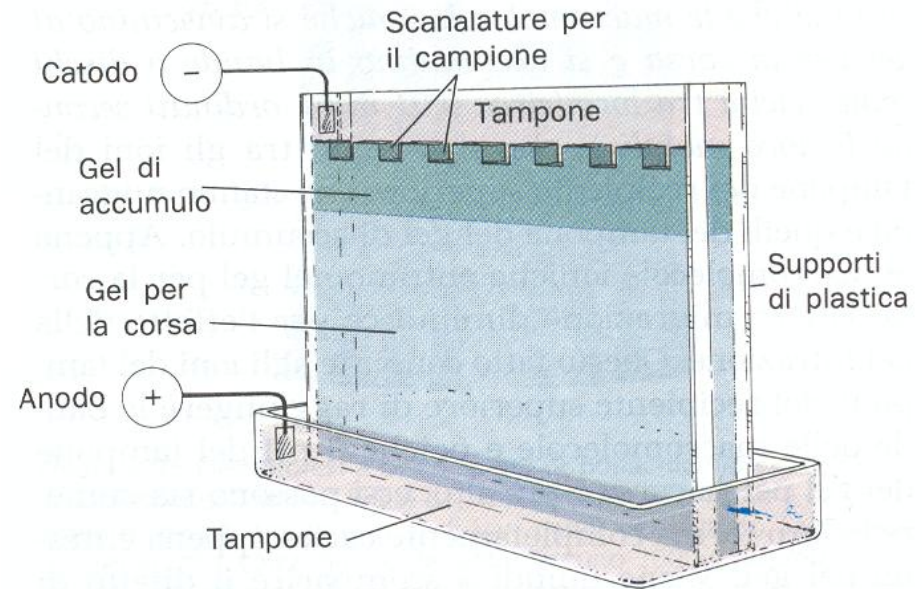


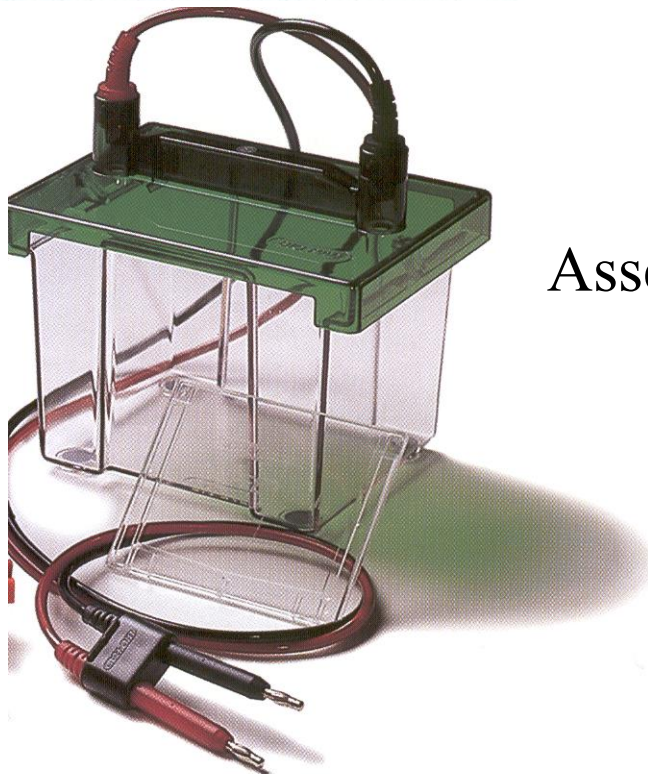
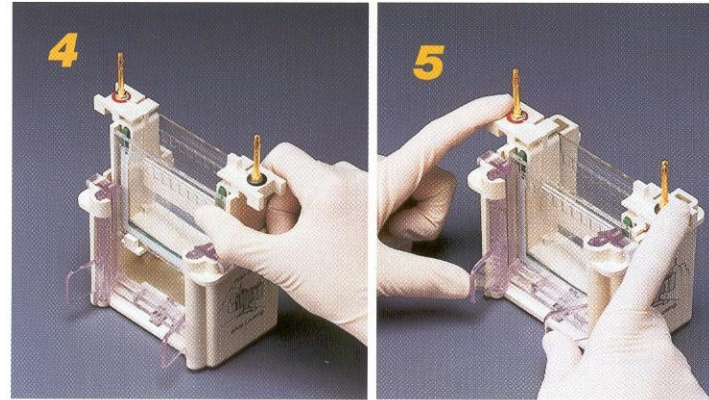
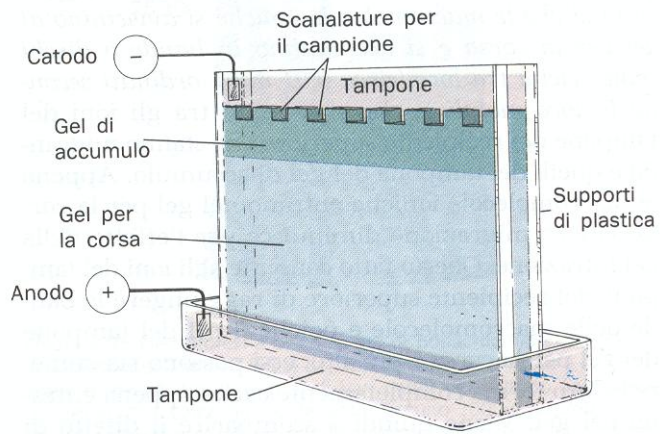
Figure 2.2D. Assembling the gel casting stand (step 1). The black cams are turned to seal the bottom surface of the sandwich into the casting stand gasket.

<https://www.youtube.com/watch?v=Tvqv0IR8q28>



Preparazione del gel: •Pozzetti





Assemblaggio della camera elettroforetica

Per preparare un gel di poliacrilamide (x PAGE nativa) occorre:

- Soluzione acquosa contenente i monomeri di acrilamide e bisacrilamide
- Soluzione tampone
- Catalizzatori

$$\%T = \frac{\text{acrilamide (g)} + \text{bis acrilam (g)}}{\text{volume (ml)}} \times 100$$

$$\%C = \frac{\text{bis acrilam (g)}}{\text{acrilamide (g)} + \text{bis acrilam(g)}} \times 100$$

I gel di poliacrilamide possono essere facilmente preparati in laboratorio scegliendo opportunamente il valore di T più corretto (può variare tra 3 e 18%)

T ↑ = maglie strette → molecole rallentate in base alle loro dimensioni

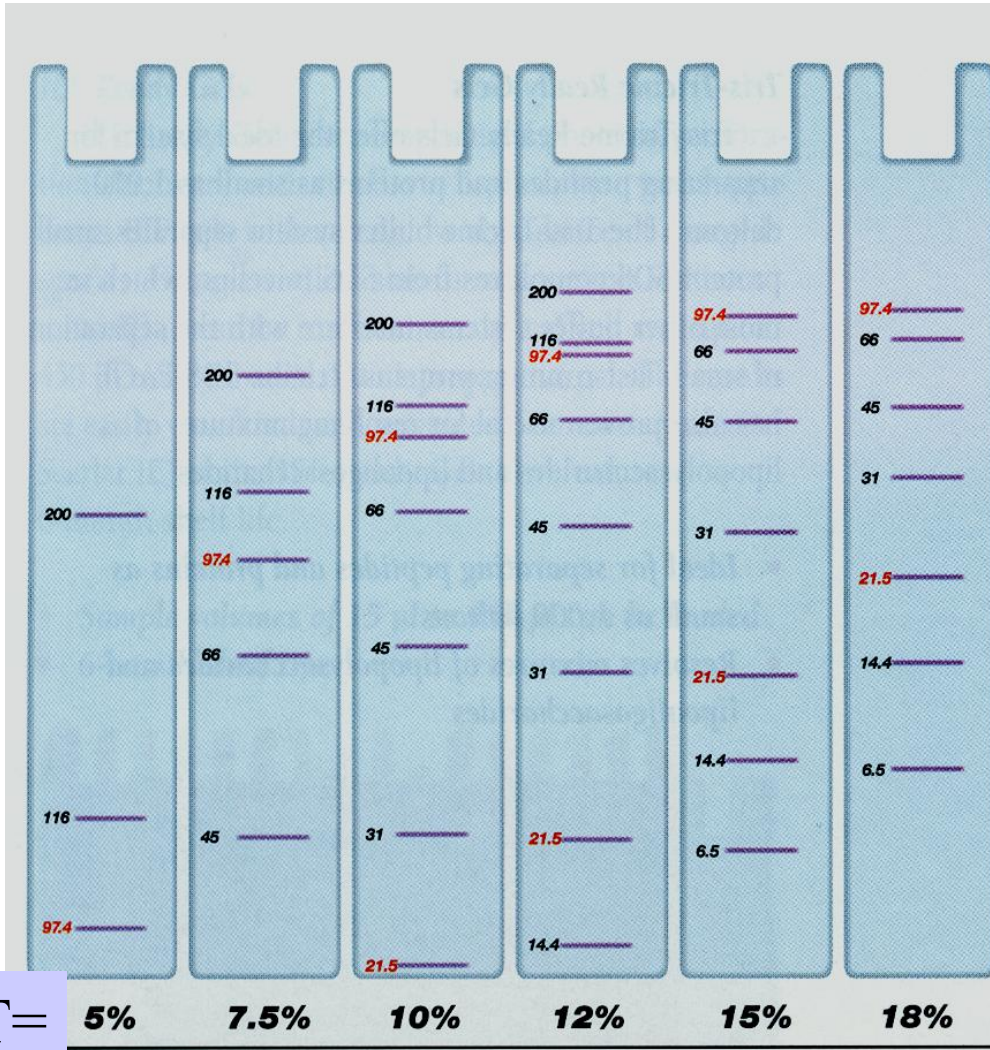
T ↓ = maglie larghe → rallenta solo le molecole più grandi

La gel elettroforesi è molto risolutiva perché separa le molecole cariche sfruttando l'effetto frizionale

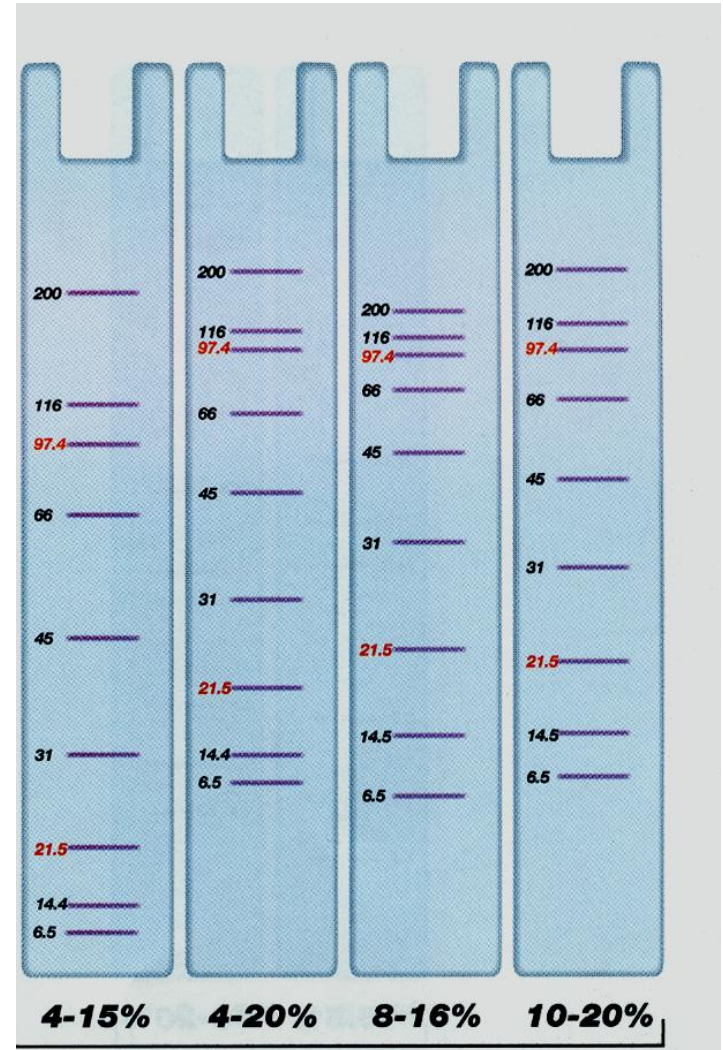
$$\mu = q/f$$

Nell'elettroforesi su carta l'effetto frizionale è minimo, la separazione avviene principalmente in base alla carica,
Può essere usata per molecole piccole

T costante



T in gradiente



T=

FASI della SEPARAZIONE ELETTROFORETICA

- Preparazione del gel
- Preparazione e Caricamento campioni
- Corsa Elettroforetica
- Interruzione Campo Elettrico
- Colorazione e Decolorazione
- Conservazione del gel

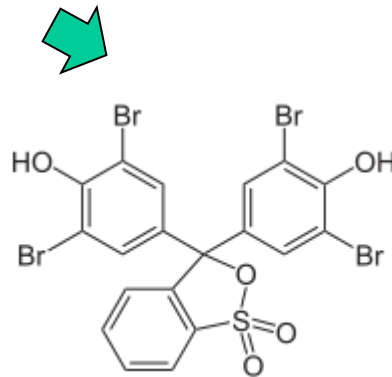


Preparazione campioni proteici:

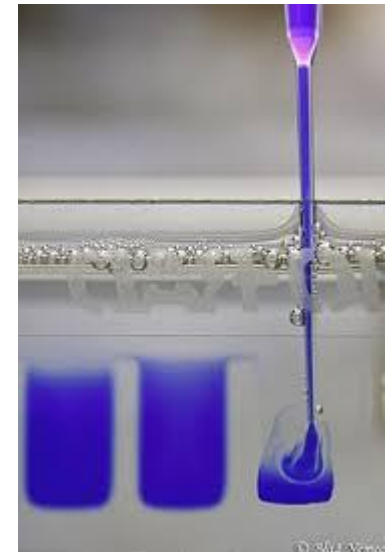
- soluzione tampone (a pH opportuno)
- glicerolo (per aumentarne la densità)
- tracciante p.es. blue di bromofenolo



- carica (-)
- colorata
- basso PM



MW= 669.96



FASI della SEPARAZIONE ELETTROFORETICA

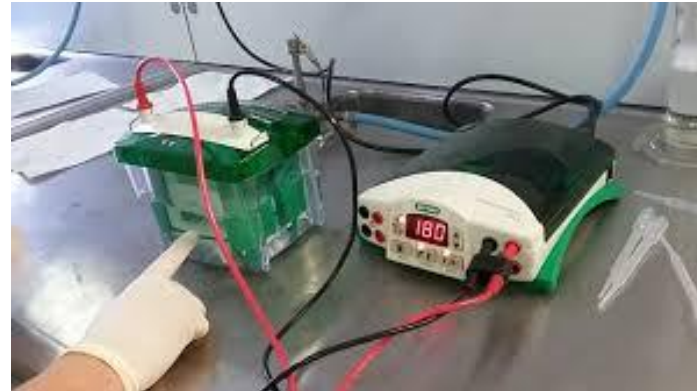
- Preparazione del gel
- Preparazione e Caricamento campioni
- **Corsa Elettroforetica**
- **Interruzione Campo Elettrico**
- Colorazione e Decolorazione
- Conservazione del gel

Durata ?

proteine non sono visibili

Interrompiamo l'applicazione della corrente quando il tracciante arriva alla fine del gel

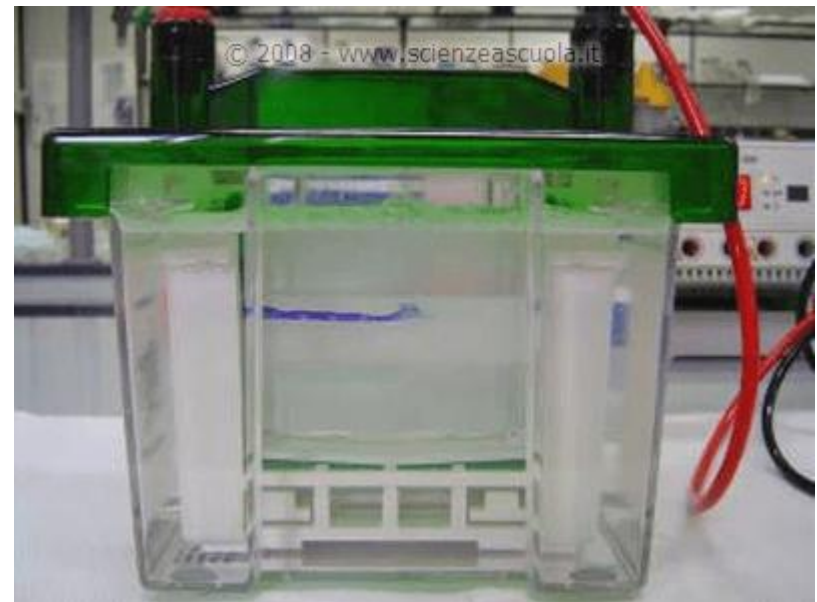
Perché siamo sicuri che le proteine, che hanno una mobilità elettroforetica $<$ rispetto al tracciante (PM $>$), non sono fuoriuscite dal gel



Perché ?

Tracciante:

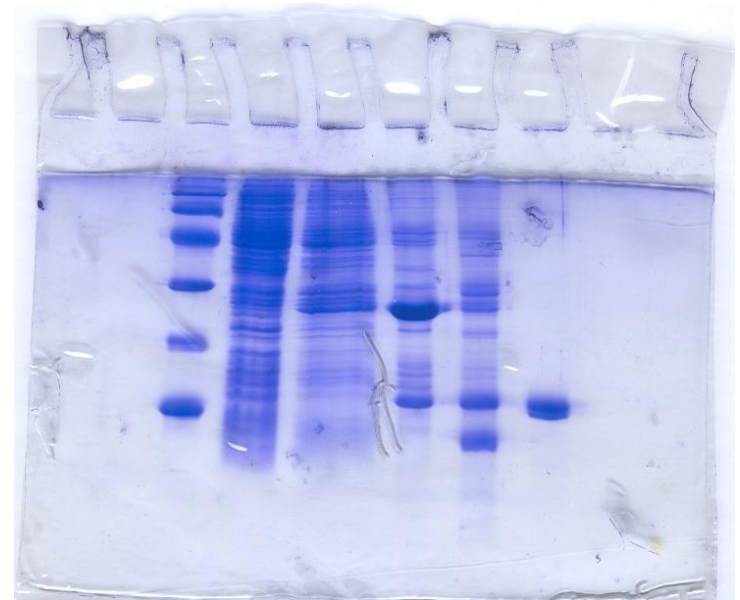
- carica (-)
- colorata
- basso PM



FASI della SEPARAZIONE ELETTROFORETICA

- Preparazione del gel
- Preparazione e Caricamento campioni
- Corsa Elettroforetica
- Interruzione Campo Elettrico
- Colorazione e Decolorazione
- Conservazione del gel

- 1) Fissaggio proteine
- 2) Colorazione



si può fare 1+2

colorante x proteine p.e. (Coomassie Brilliant Blue)

in soluzione **alcolica/acida**

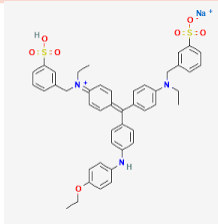
(dobbiamo denaturare le proteine x fissarle al gel)



Staining Polyacrylamide Gels

Coomassie Blue Stain-
can usually detect a
10-50 ng protein per
band

- Requires an acidic water/alcohol fixing solution
- Binds preferentially tyrosins
- Compatible with MS
- Requires destaining to remove aspecific binding of the dye from the gel



Blue Safe Stains
Similar to Coomassie.
Destaining optional or
water rinse. (8
ng/band)

- BioSafe Blue
- SimplyBlue
- InstantBlue-
destaining not
recommended

**Silver Staining- 50
times more sensitive
than Coomassie Blue.
(0.3ng/BAND)**

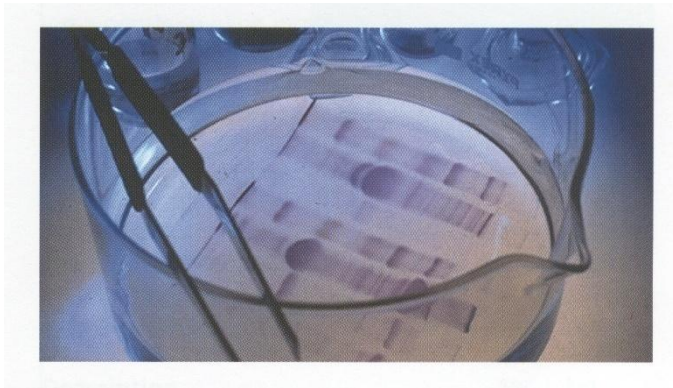
- Fixation [Acetic acid-
methanol]
- Stain with silver
solution and rinse
with water
- Develop with
formaldehyde and
carbonate followed
by stopping with
Glacial acetic
- Not compatible with
MS

**Fluorescent Stains –
almost as sensitive as
Silver but requires
excitation source**

- Flamingo Fluorescent
Gel Stain
- Deep Purple* Total
Protein Stain
- SYPRO* Ruby Protein
Gel Stain
- Krypton Protein Stain
- IR stains
- Stain-free: allow
immediate
visualization of
proteins without the
time, mess, and cost
associated with
traditional gel
staining and
destaining.

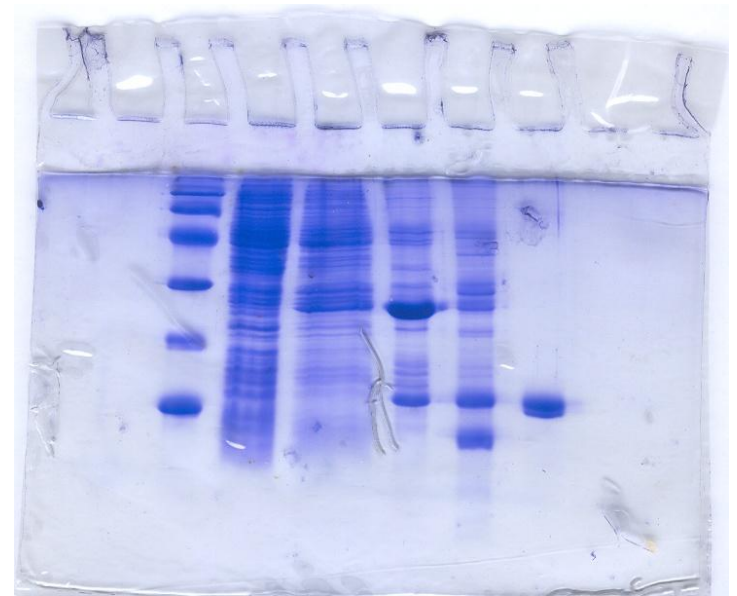
3) Decolorazione

una serie di lavaggi del gel con la soluzione alcolica/acida
per allontanare il colorante legato in maniera aspecifica alle
porzioni del gel che non contengono proteine



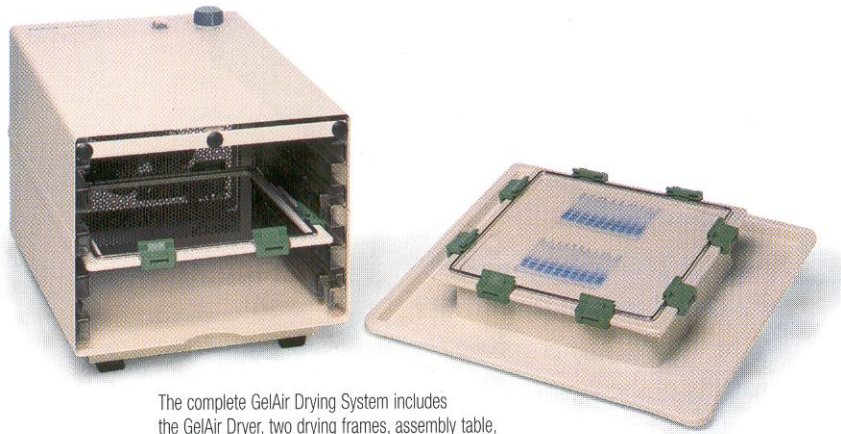
Coomassie BioSafe:

↓ Conc soluzione alcolica/acida
Decolorazione in acqua

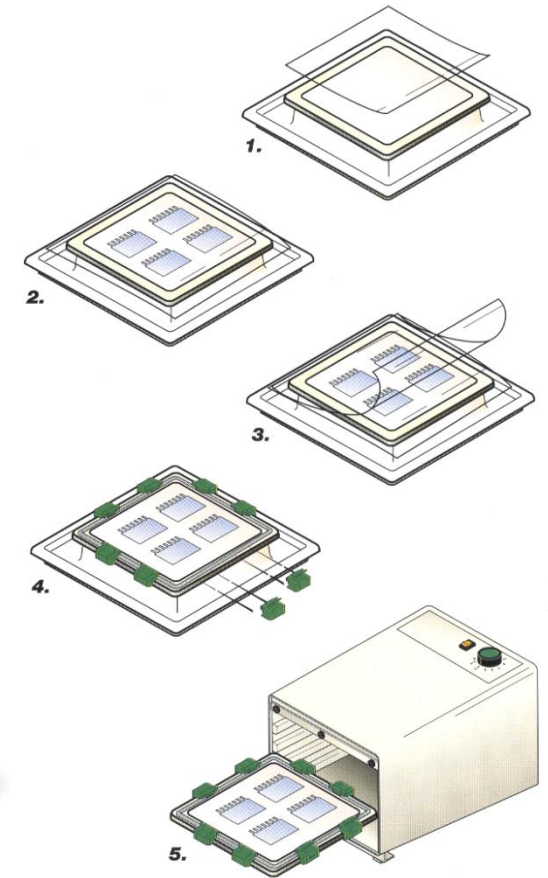


FASI della SEPARAZIONE ELETTROFORETICA

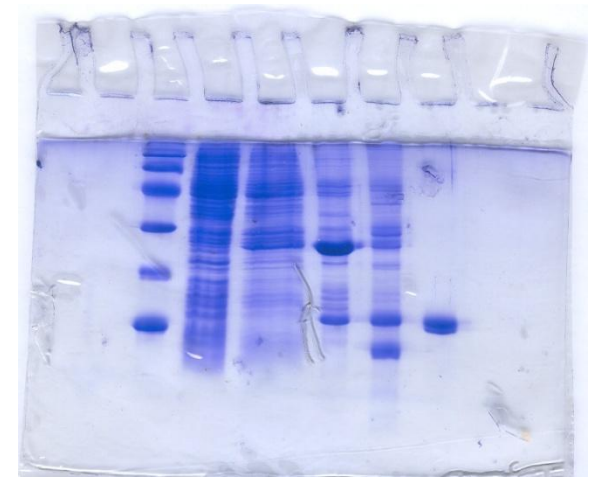
- Preparazione del gel
- Preparazione e Caricamento campioni
- Corsa Elettroforetica
- Interruzione Campo Elettrico
- Colorazione e Decolorazione
- Conservazione del gel



The complete GelAir Drying System includes the GelAir Drying System, two drying frames, assembly table, cellophane, and Gel Drying Solution.



- x la conservazione a lungo termine
i gel vengono essiccati fra due fogli di
cellophane
- all'aria
 - incubatore a temperatura $>$ ambiente



Tecniche elettroforetiche **su gel di poliacrilamide:**

1) In condizioni native (PAGE nativa)

2) **In condizioni denaturanti in presenza del detergente ionico SDS (SDS-PAGE)
separa le proteine unicamente in base al PM**

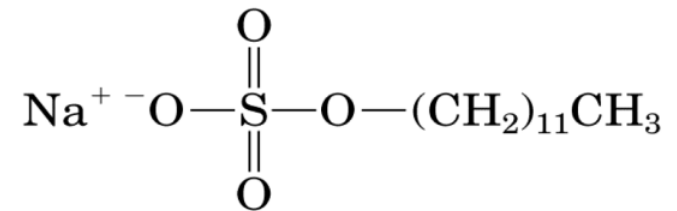
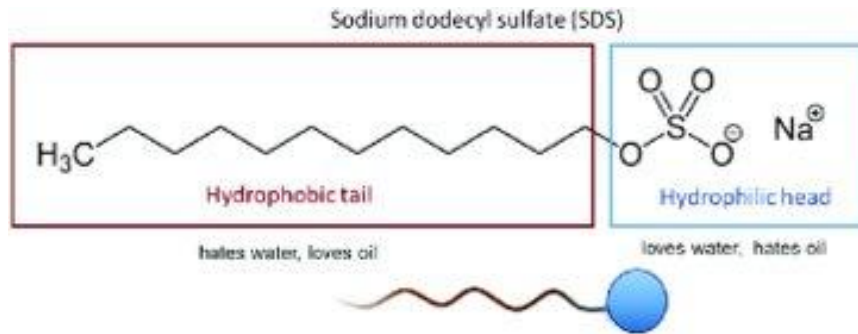
3) **In gradiente di pH (Isoelettrofocalizzazione: IEF)
separa le proteine unicamente in base al pI**

4) Elettroforesi in condizioni denaturanti (AUT-PAGE)

5) **Elettroforesi Bidimensionale (2D-PAGE)= IEF e SDS
separa le proteine in base al pI e al PM**

SDS-PAGE

Elettroforesi su gel di poliacrilamide in presenza di **sodio dodecil solfato (SDS)**

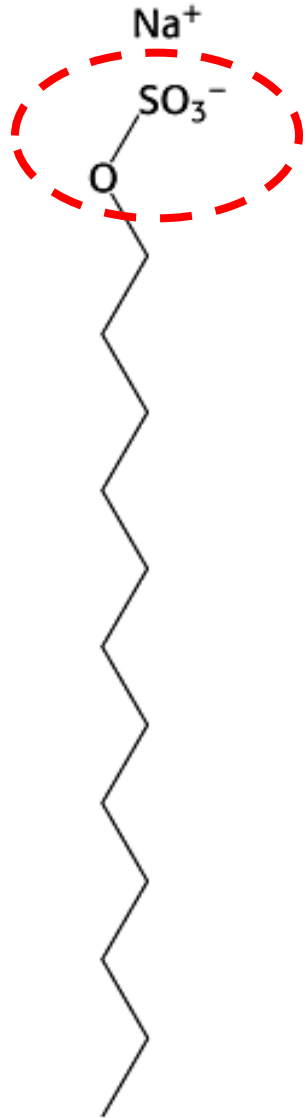


Il **detergente ionico** SDS interagisce con le proteine con un rapporto costante:

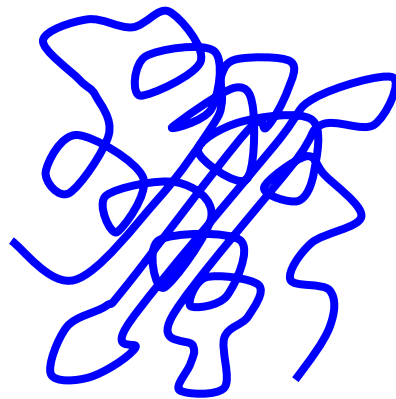
1 molecola di SDS ogni 2 residui aminoacidici

(1,4 g SDS/g proteina)

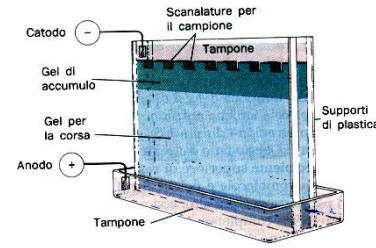
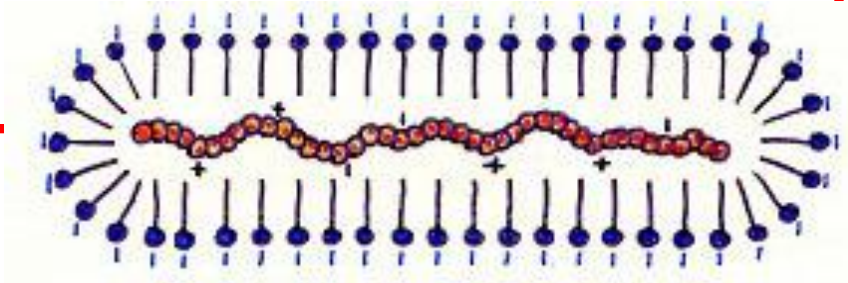
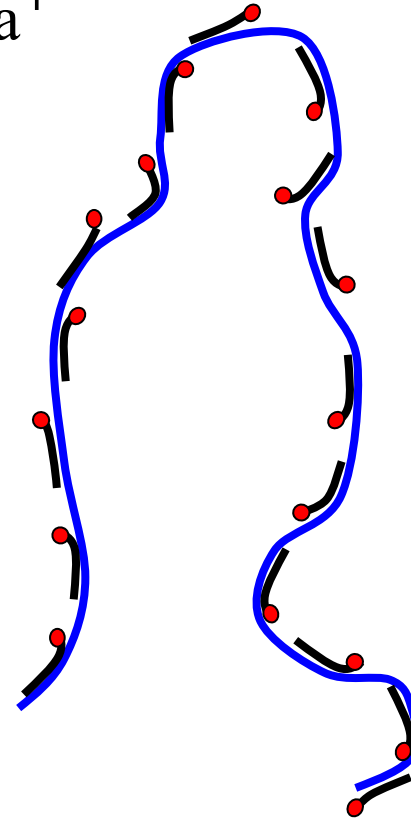
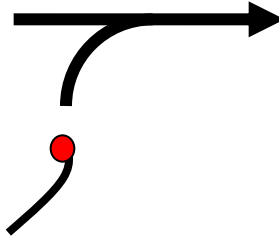
Sodio Dodecil Solfato



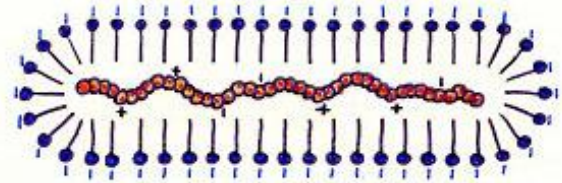
Sodio dodecil solfato (SDS)



proteina



La carica nativa della proteina viene mascherata:
tutti i complessi SDS-proteine sono carichi negativi



l'intensità di carica q dei complessi
SDS-proteine?

dipende dalle dimensioni molecolari della proteina

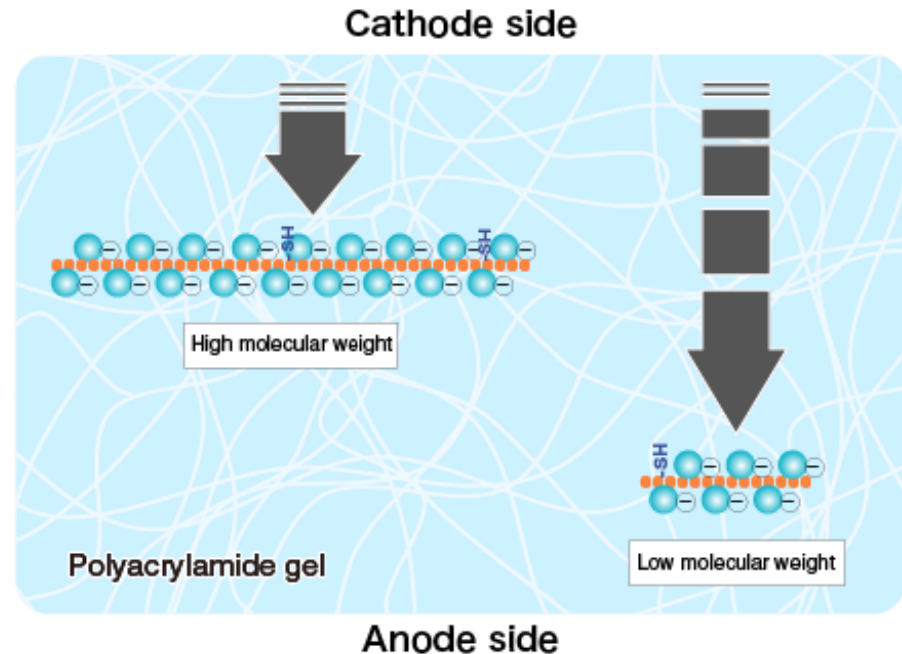
> **PM** > intensità di carica -

Carica/massa (q/m) dei complessi
SDS-proteine?

è uguale per tutte le proteine
(1 molecola SDS ogni 2 aa)

In SDS-PAGE le proteine si
separano per l'effetto setaccio
del gel
di poliacrilamide in funzione
delle loro dimensioni
molecolari.

Proteins are separated based on their polypeptide chain length by electrophoresis in a polyacrylamide gel with an appropriate mesh size.



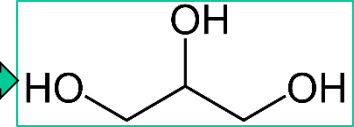
$$\mu = q/m$$

SDS-PAGE

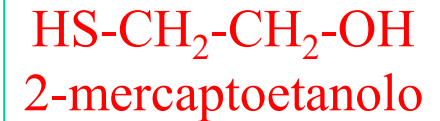
condizioni
denaturanti

Preparazione campioni proteici:

- + soluzione tampone (a pH opportuno)
- + glicerolo (per aumentare la densità)
- + tracciante (blue di bromofenolo)

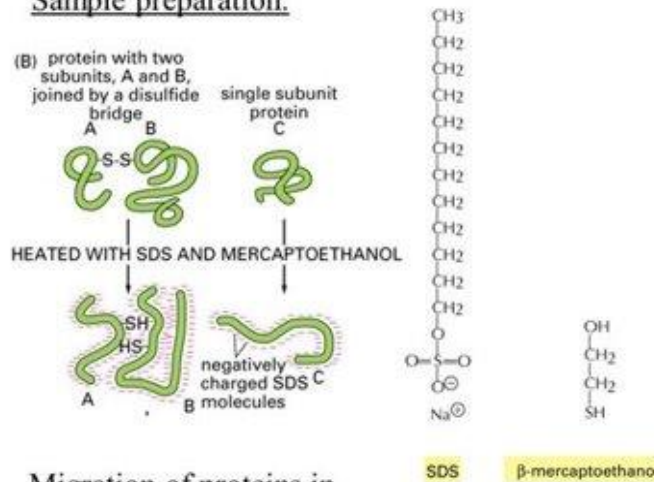


- + SDS (detergente ionico denaturante)
- + 2-mercaptoetanol (x rompere i ponti S-S)



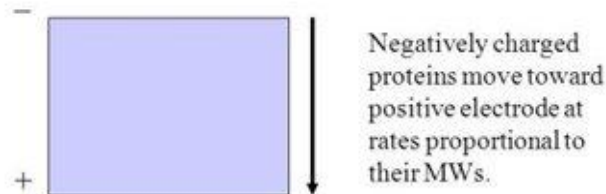
Reminder: how SDS-PAGE works

Sample preparation:



incubazione a 100°C x 5 minuti (denaturazione al calore, ma la proteina non precipita per la presenza del detergente che ne aumenta la solubilità!)

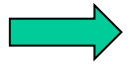
Migration of proteins in the gel:



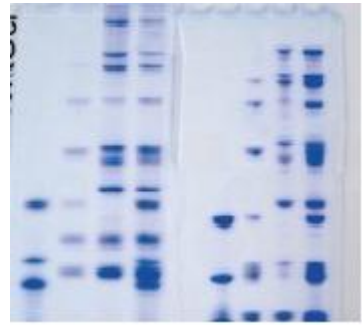
Applicazioni dell' SDS-PAGE



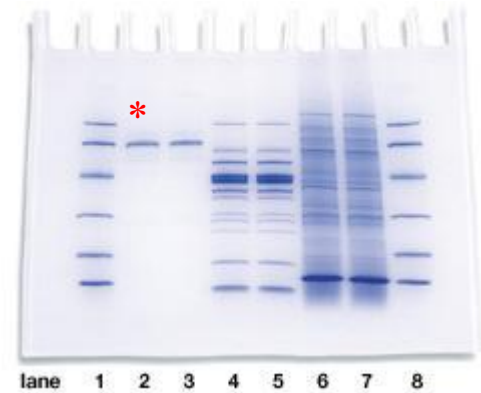
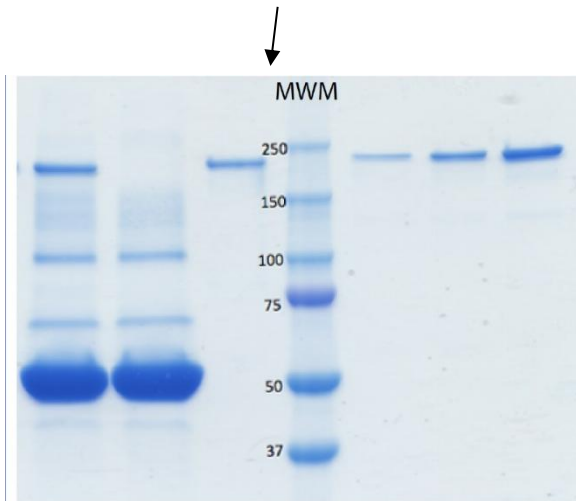
•Analisi di miscele proteiche



•Valutazione purezza di una proteina



•Determinazione PM



Proteine a PM noto

Protein	MW
Myosin	200,000
β-galactosidase	116,250
Phosphorylase b	97,400
Serum albumin	66,200
Ovalbumin	45,000
Carbonic anhydrase	31,000
Trypsin Inhibitor	21,500
Lysozyme	14,400
Aprotinin	6,500

acrilamide (g) + bis acrilam (g)

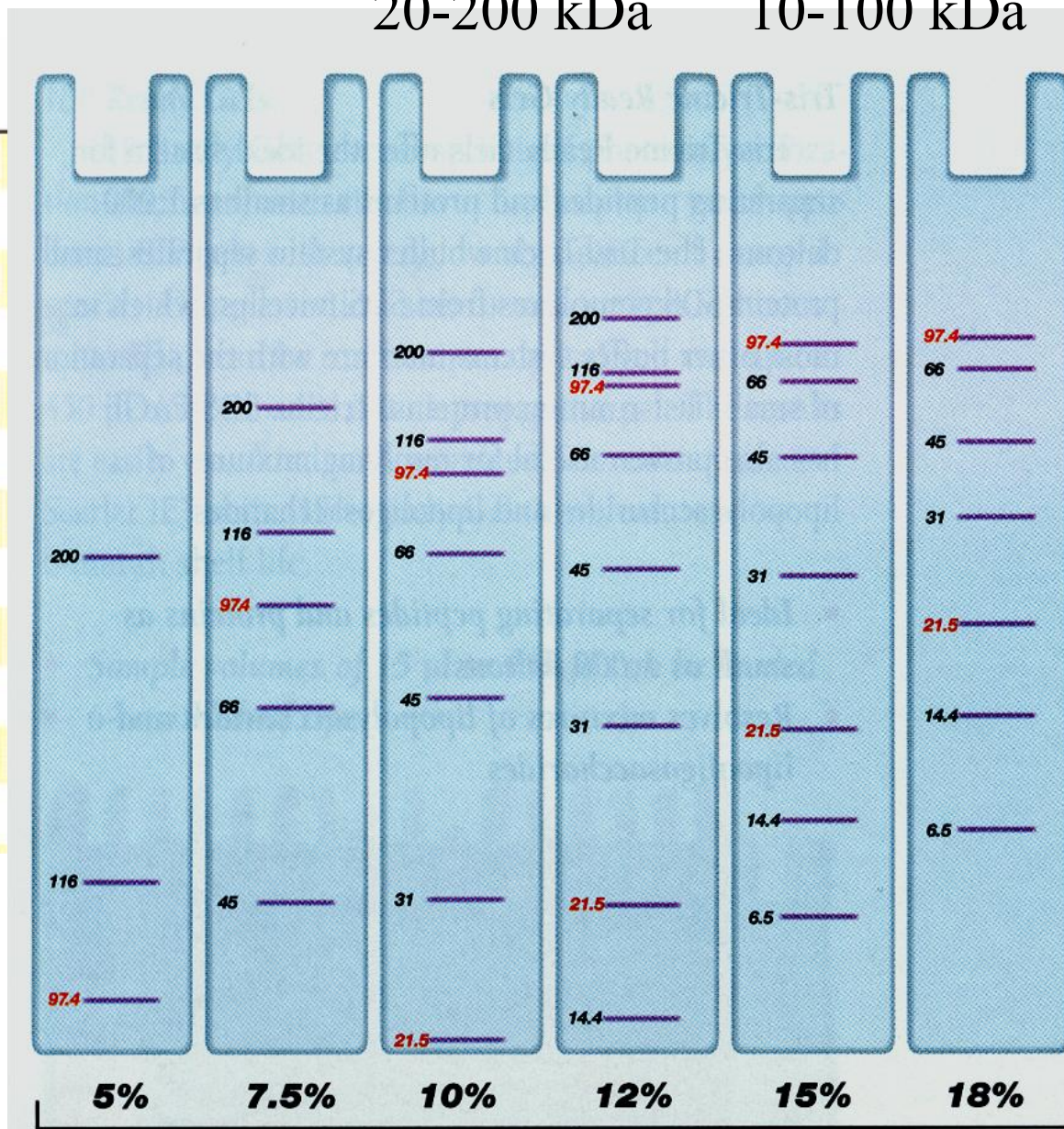
$$T = \frac{\text{acrilamide (g) + bis acrilam (g)}}{\text{volume (ml)}} \times 100$$

T=

SDS-PAGE

20-200 kDa

10-100 kDa

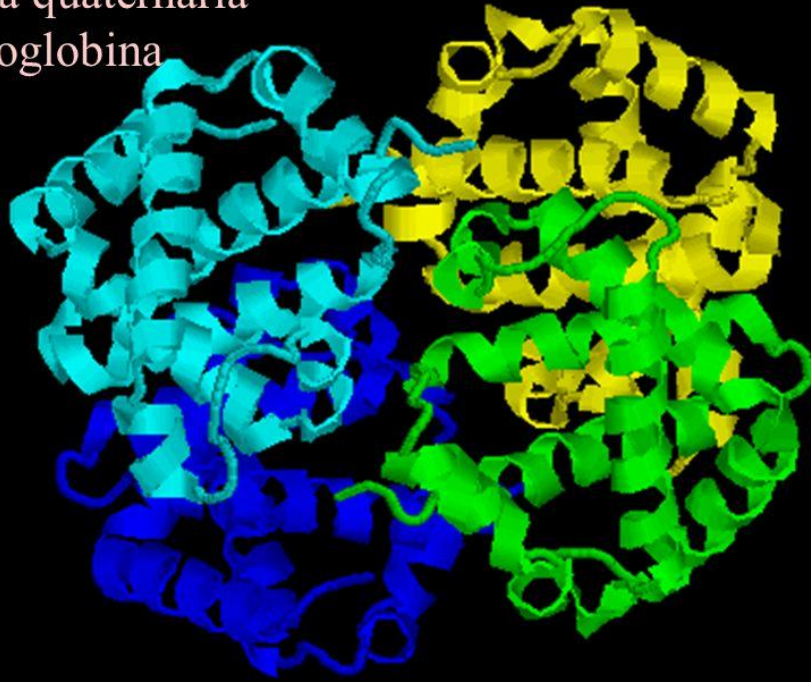


ATTENZIONE:

Si lavora in condizioni denaturanti :

le proteine pure con struttura IV possono presentare più di 1 banda

Struttura quaternaria
dell'emoglobina

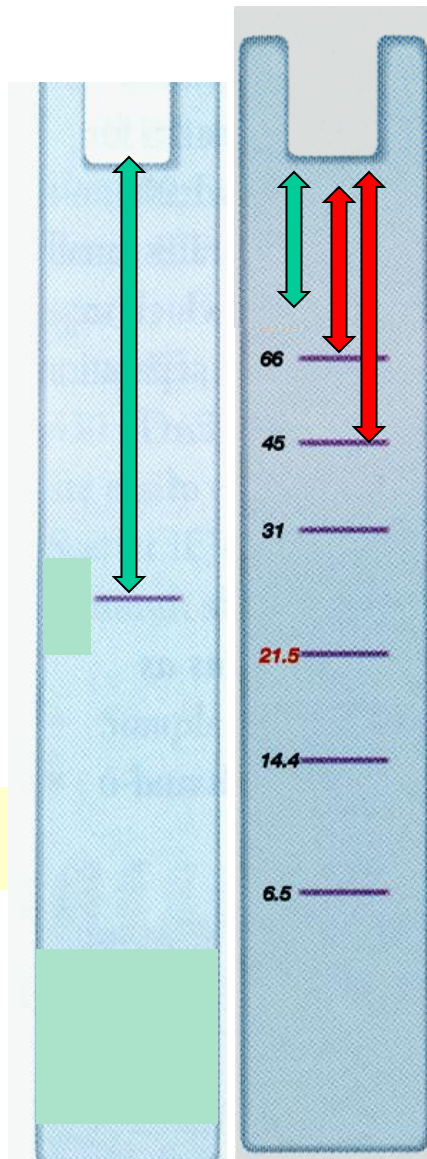


Determinazione PM mediante SDS-PAGE

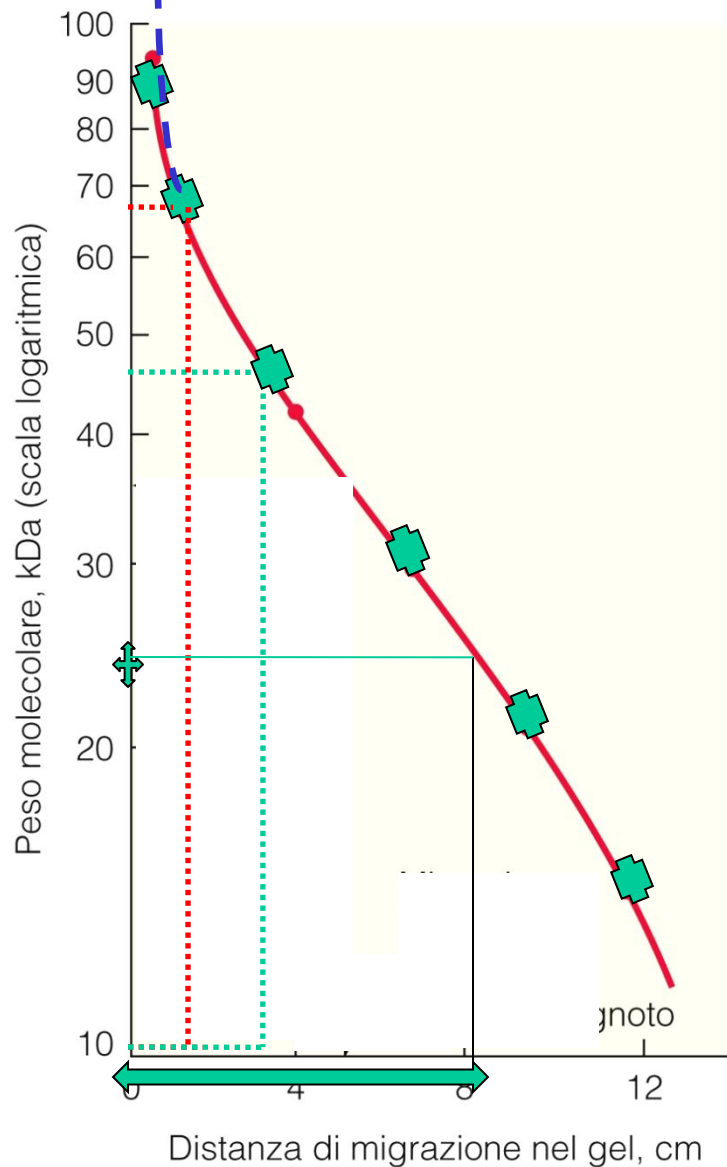
Condizioni denaturanti: PM delle subunità

Proteine a PM noto

Protein	MW
Phosphorylase b	97,400
Serum albumin	66,200
Ovalbumin	45,000
Carbonic anhydrase	31,000
Trypsin Inhibitor	21,500
Lysozyme	14,400
Aprotinin	6,500



Curva standard



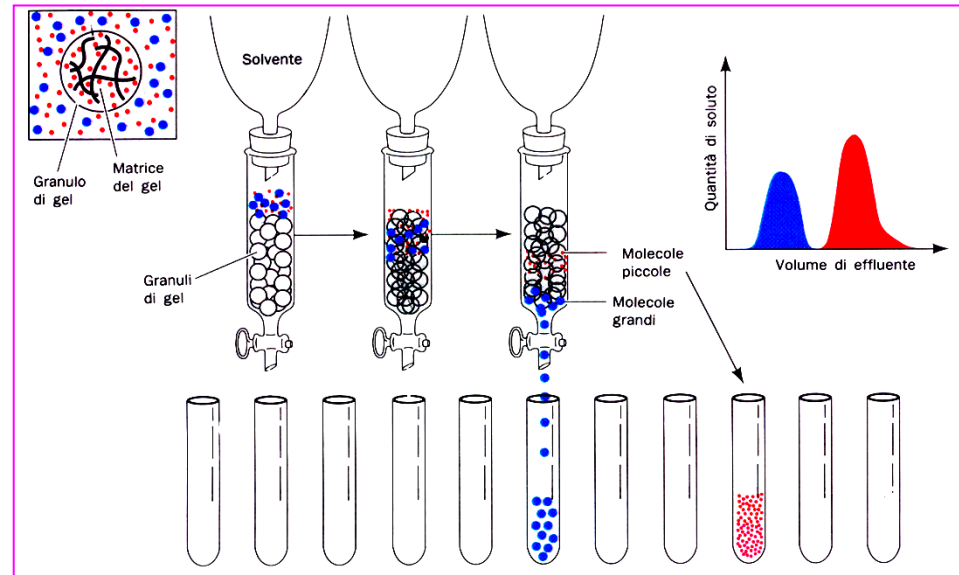
SDS-PAGE:

Condizioni denaturanti → PM subunità

Effetto setaccio: rallenta le molecole più grandi



Nella cromatografia x gel-filtrazione:



- Condizioni native → PM proteina con struttura quaternaria intatta
- Le molecole più grandi si muovono più velocemente

Ci aspettiamo di ottenere lo stesso PM dalla determinazione effettuata per una data proteina con le due tecniche?

I PM ottenuti per la stessa proteina con le due tecniche esaminate sono sempre coincidenti?

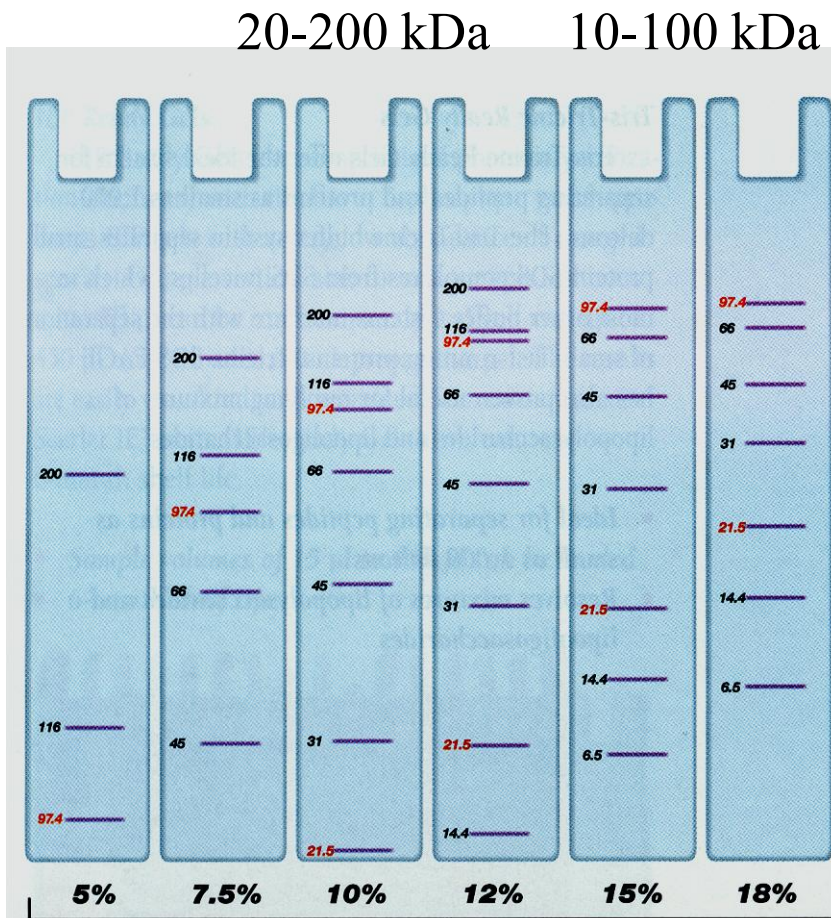
Nel caso di una proteina con struttura IV i valori di PM ottenuti con le due tecniche sono diversi

Nel caso di una proteina priva di struttura IV il PM ottenuto mediante gel cromatografia è simile al PM ottenuto mediante SDS-PAGE

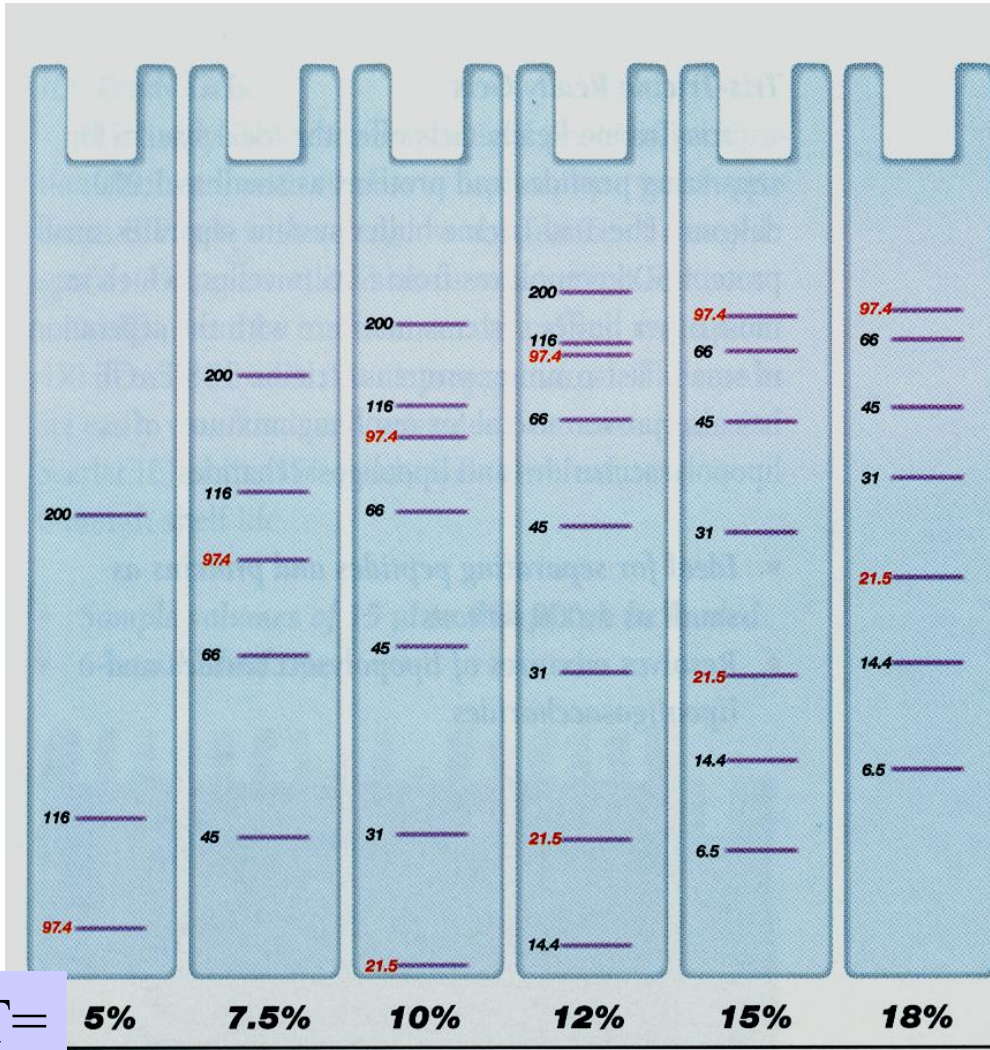
(ogni tecnica ha un suo errore sperimentale)

Per migliorare il potere risolutivo della PAGE:

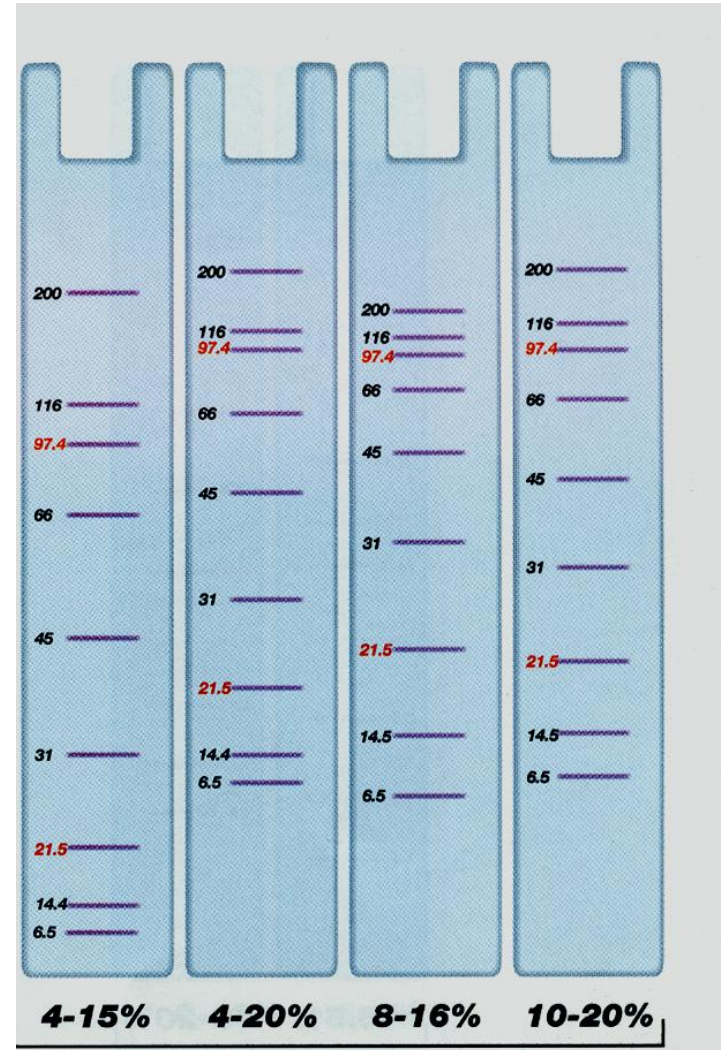
- Gel con T costante: Scegliere opportunamente il valore di T
- Gel con T in gradiente
- Gel discontinuo



T costante

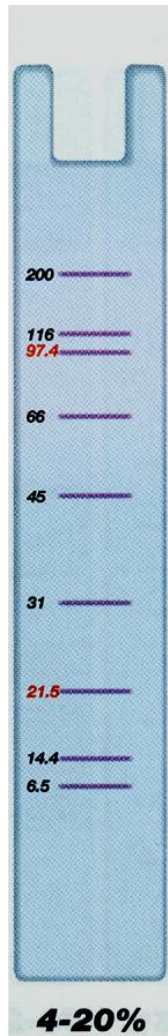


T in gradiente



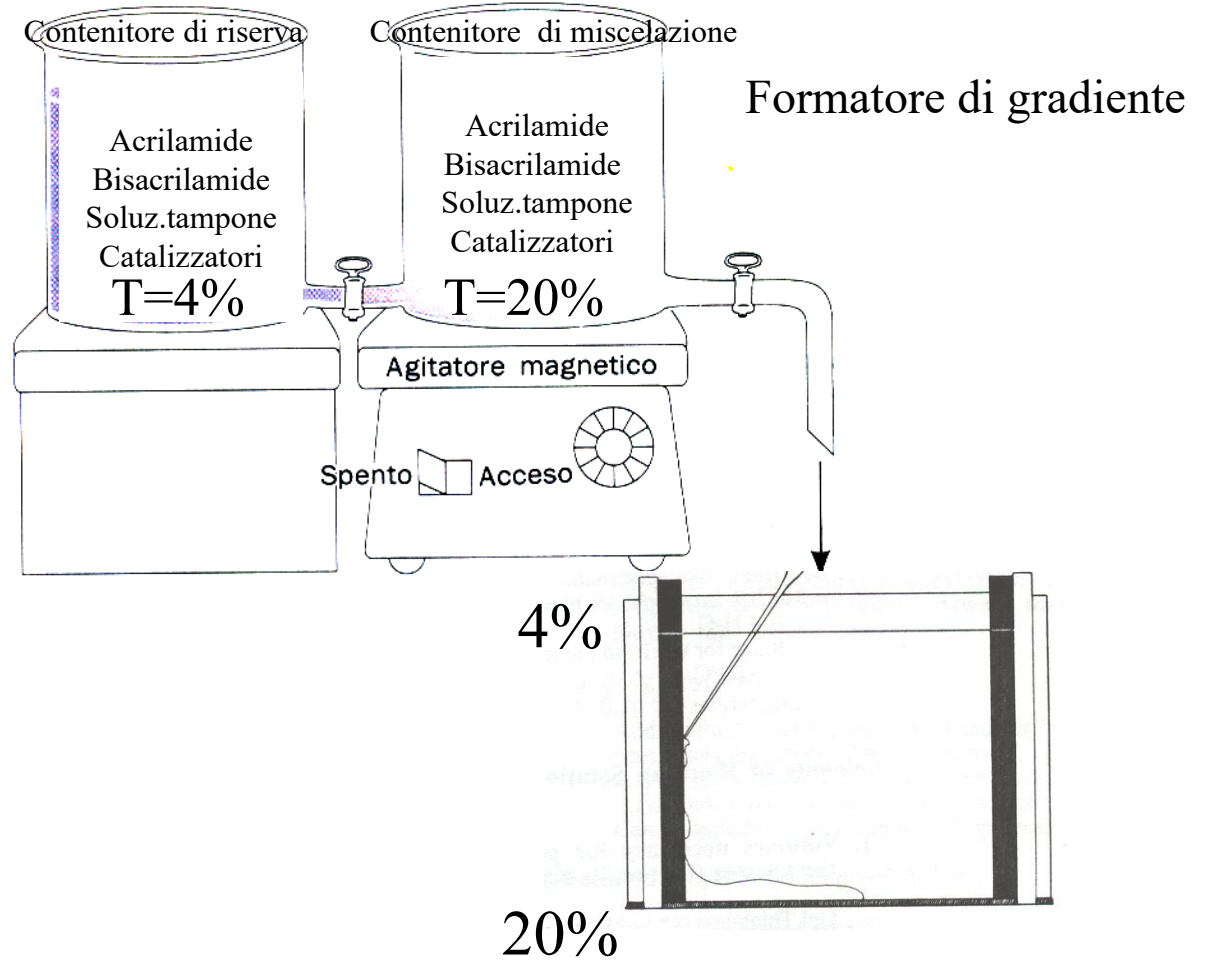
T=

Gel in gradiente di concentrazione di acrilamide



4%

20%

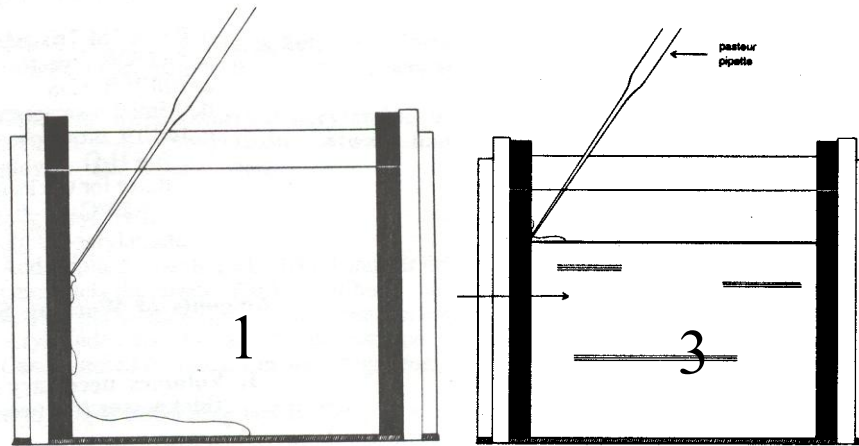


Per migliorare il potere risolutivo dell'elettroforesi: PAGE discontinua

Tampone della cella: Tris-glicina + SDS pH 8.3

- Gel inferiore
- Gel di separazione
- Running gel

T > 4% (7-18%)
Tris-HCl pH 8.8

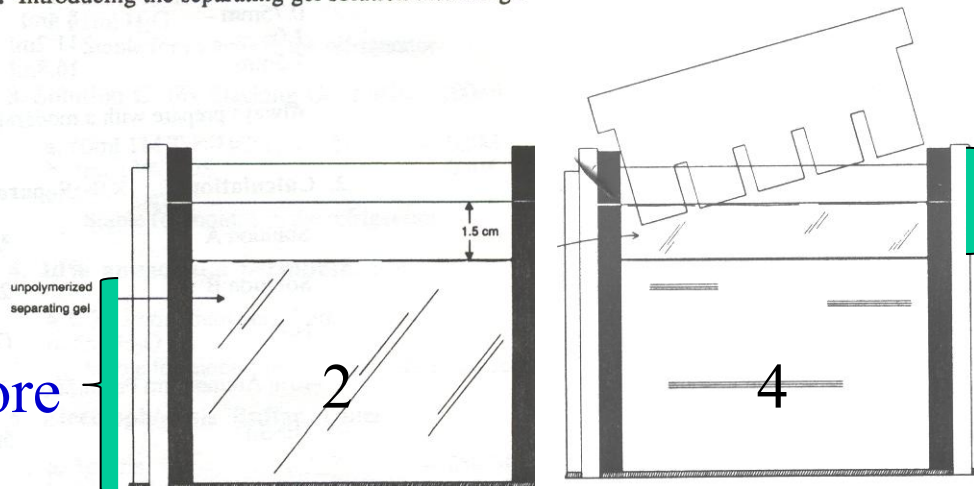


- Gel superiore (Gel di impaccamento) (Stacking gel)

T = 4%
Tris-HCl pH 6.8

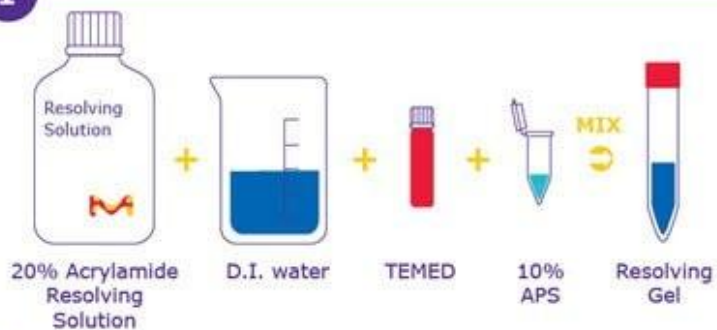
Figure 5.2. Introducing the separating gel solution into the gel

- Gel inferiore



- Gel superiore

1



Prepare Resolving Gel Solution

- Dilute to desired percentage
- Add APS and TEMED; mix

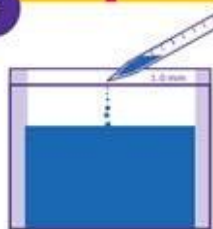
2



Prepare Stacking Gel Solution

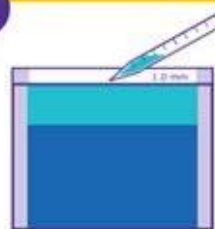
- Dispense required volume
- Add APS and TEMED; mix

3



Add resolving gel solution to gel casting device

4



Add stacking gel solution to gel casting device

5

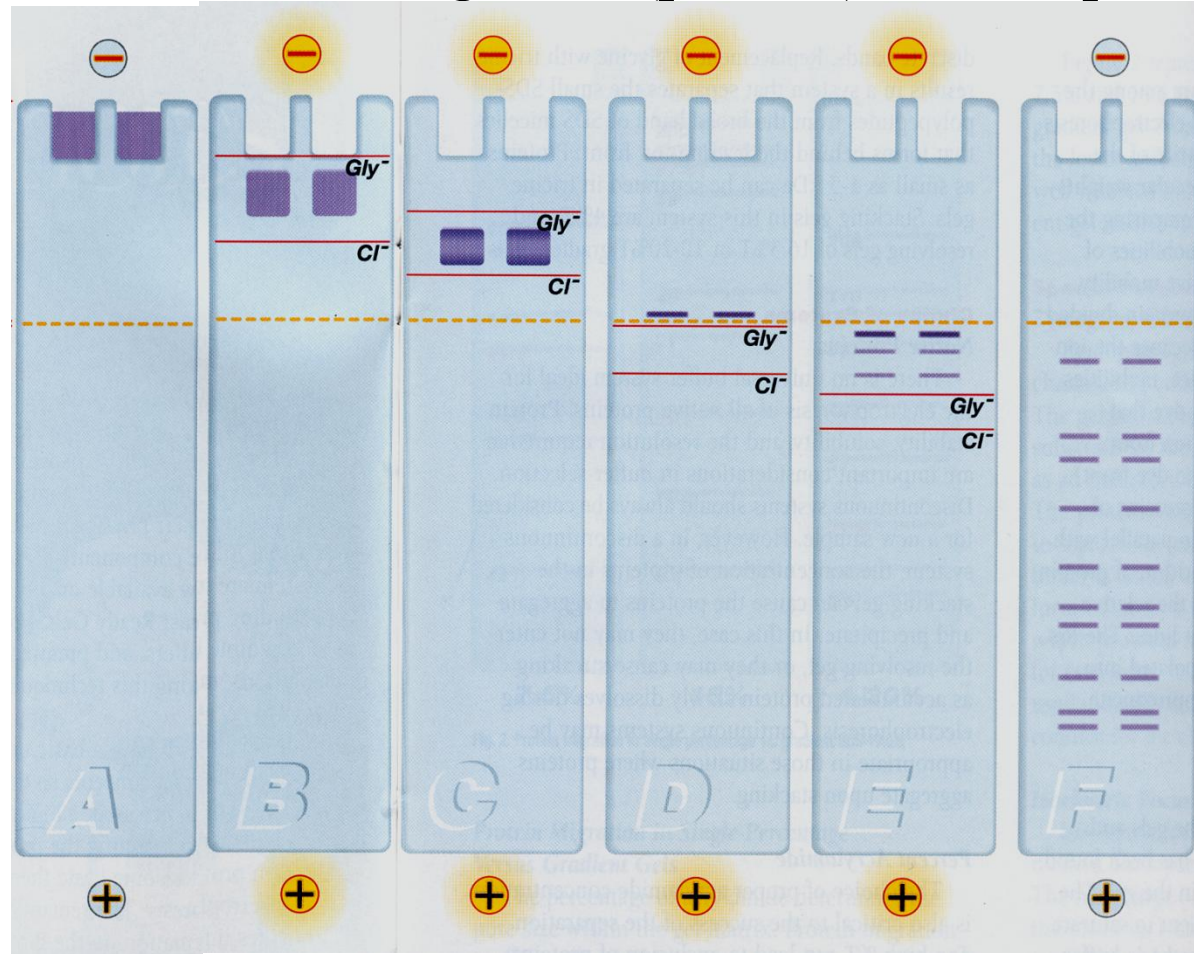


Insert comb and allow gel to polymerize

Tampone della cella: Tris-glicina (pI =5.9) + SDS pH 8.3

T = 4%
Tris-HCl pH 6.8

T = 7 -18%
Tris-HCl pH 8.8

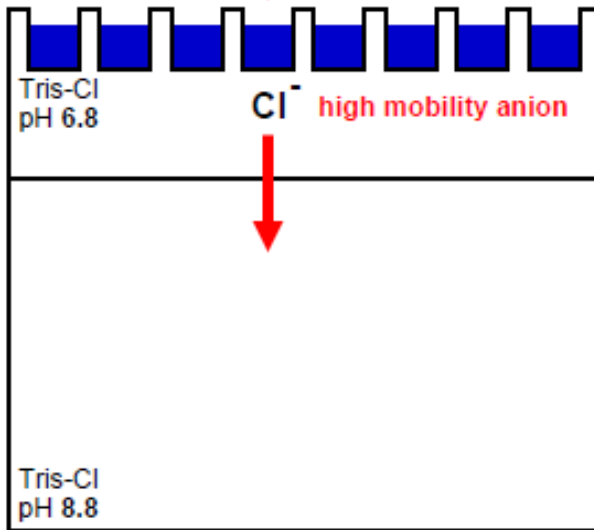
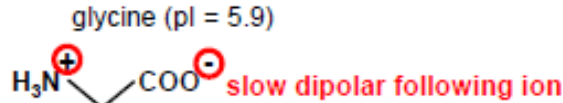


Le due specie ioniche che trasportano la corrente all'interno del gel (Cl⁻ e ioni glicina) si separano ampiamente nel gel superiore creando una zona di bassa conducibilità (e alta resistenza) in cui si trovano i complessi SDS-proteine. E' come se l'intero voltaggio applicato fosse concentrato in questa zona. Di conseguenza i complessi SDS-proteine si muovono molto velocemente e formano una banda molto stretta = si concentrano.

Laemmli gel:

Cathode buffer:

25 mM Tris, 192 mM **glycine**, 0.1% SDS, pH 8.3



Anode buffer:

25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3

Laemmli UK, Nature (1970)

Running buffer

Stacking gel

Resolving gel

At pH 6.8 Glycine is in form of zwitter-ion and thus has minimal mobility. Cl⁻ ions has most mobility, so proteins stacks between glycine and Cl⁻

At pH 8.8, the zwitter ion Glycine attains negative charge and become glycinate, and mobility increase more than proteins, freeing the proteins:

pH 6.8

pH 8.8

Glycine

Proteins

Cl⁻

Leading ions

Glycine -ve charge

Discontinuous buffer system

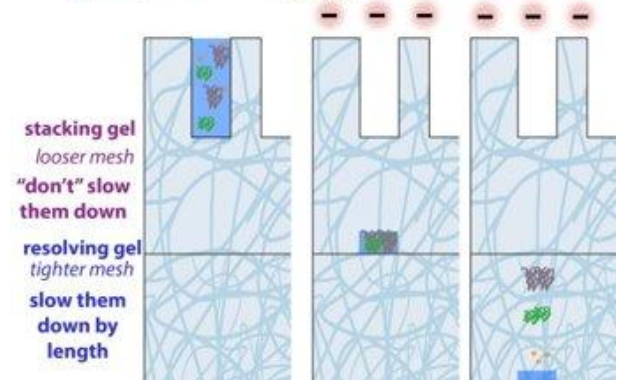
stacking gel prevents unfair advantages

note: the proteins shouldn't be shape-y at this point, since they've been denatured, but that's harder to draw...

before turning on power
proteins where you put them
"pipetting order"

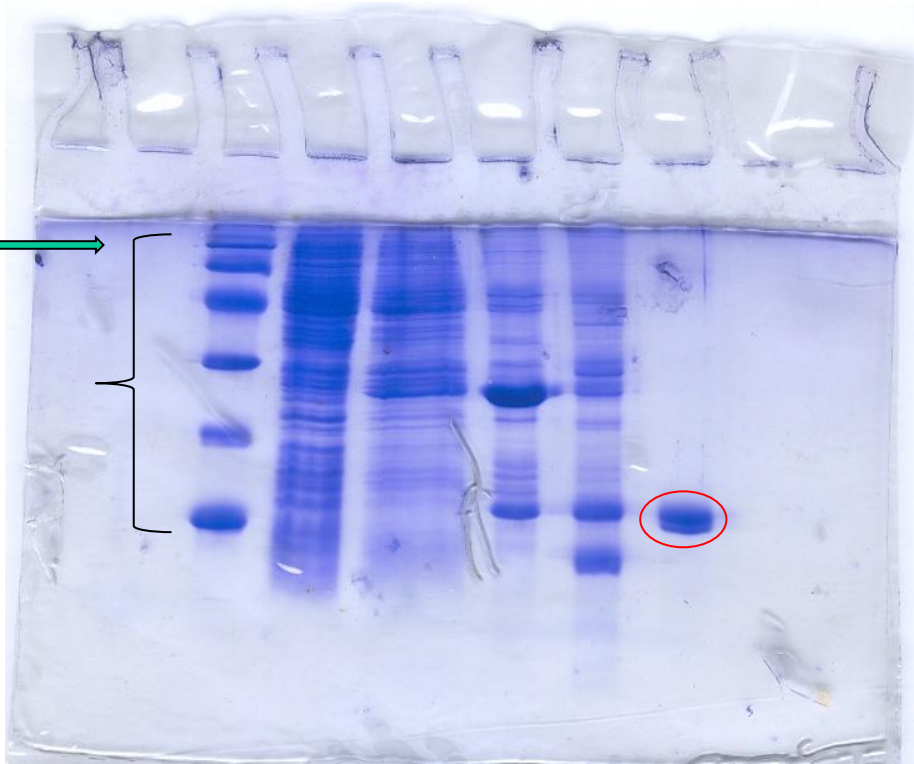
power on early
proteins line up at the starting line & enter resolving gel at the same time together
"no order"

power on later
proteins separate by length
"length order"



SDS

Standard →



Tecniche elettroforetiche **su gel di poliacrilamide:**

- 1) In condizioni native (PAGE nativa)
- 2) **In condizioni denaturanti in presenza del detergente ionico SDS (SDS-PAGE)
separa le proteine unicamente in base al PM**
- 3) **In gradiente di pH (Isoelettrofocalizzazione: IEF)
separa le proteine unicamente in base al pI**
- 4) Elettroforesi in condizioni denaturanti (AUT-PAGE)
- 5) Elettroforesi Bidimensionale (2D-PAGE)= IEF e SDS
separa le proteine in base al pI e al PM

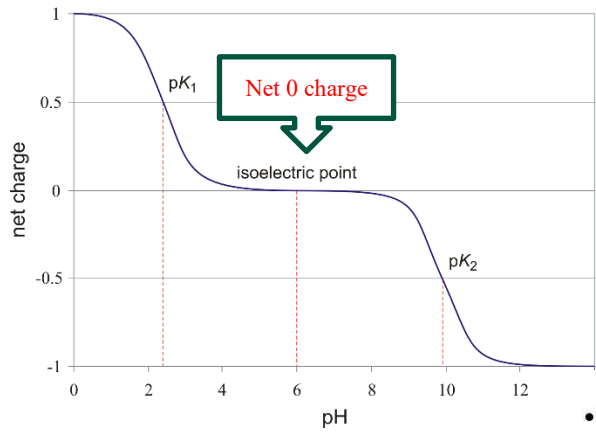
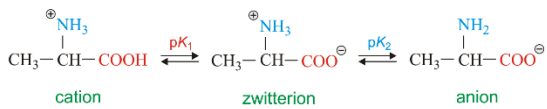
Focalizzazione isoelettrica (IEF)

Tecnica elettroforetica altamente risolutiva per la **separazione di molecole anfotere** (proteine) che vengono separate unicamente in funzione del loro **punto isoelettrico** (pI).

Richiede la presenza di un **gradiente di pH** lungo il gel (poliacrilamide o agarosio).

Può essere effettuata:

- in condizioni native
- dopo denaturazione delle proteine, ma senza alterare la carica nativa (no SDS)



Isoelectric Point (IEP)- also known as pI

pH at which a protein has a neutral charge

loss or gain of protons H+ in a pH gradient

That is to say...

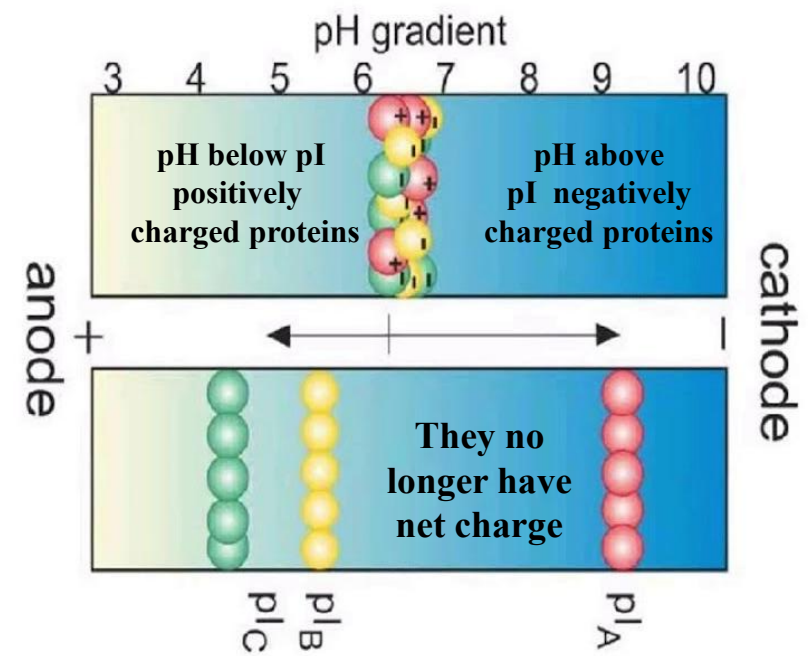
In a pH below their pI, proteins carry a net positive charge and for in a pH above their pI, they carry a net negative charge.

- A pH gradient is established in a gel before loading the sample.
- (A) The sample is loaded and voltage is applied. The proteins will migrate to their isoelectric pH, the location at which they have no net charge.
- (B) The proteins form bands that can be excised and used for further experimentation.

Dr. Nikh

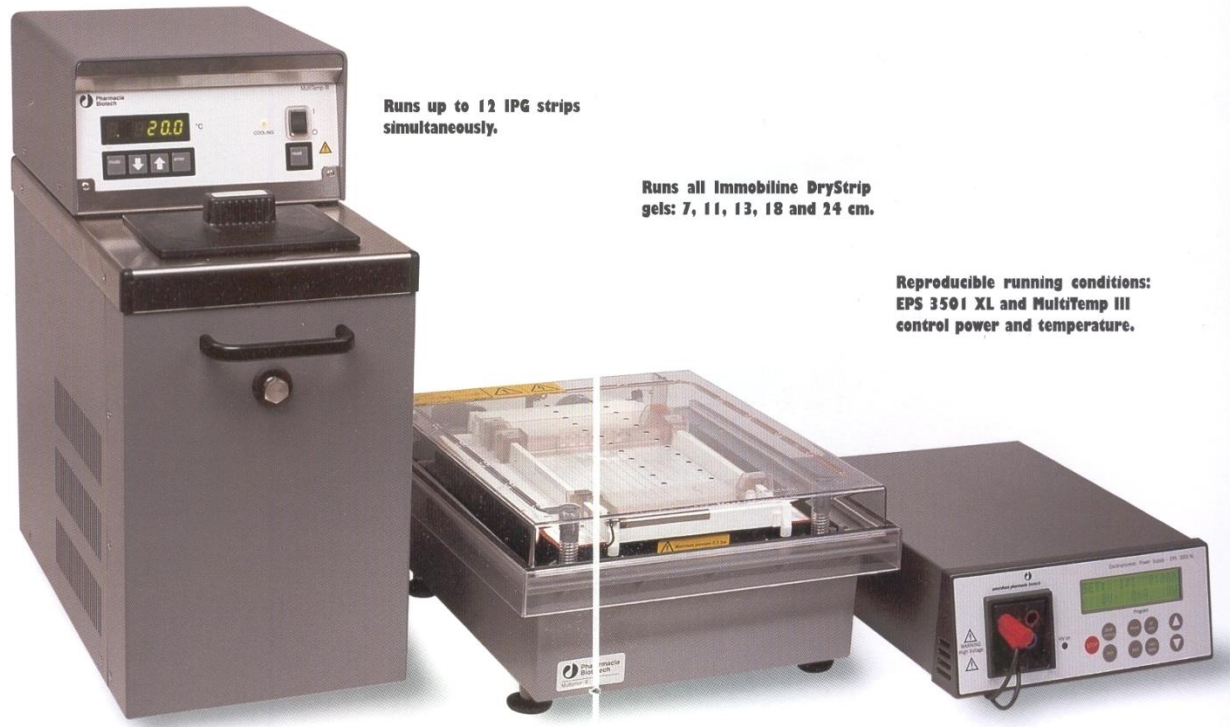
<https://www.youtube.com/watch?v=Q9mJKW>
y_Uoc

Gel-PAGE Isoelectric Focusing of Proteins



During the separation process, proteins in the sample accumulate, or "focus", in specific and predictable locations in the gel.

- si usano gel di spessore ridotto
- si utilizzano sistemi di raffreddamento (4°C)



Bagnetto refrigerante

cella elettroforetica

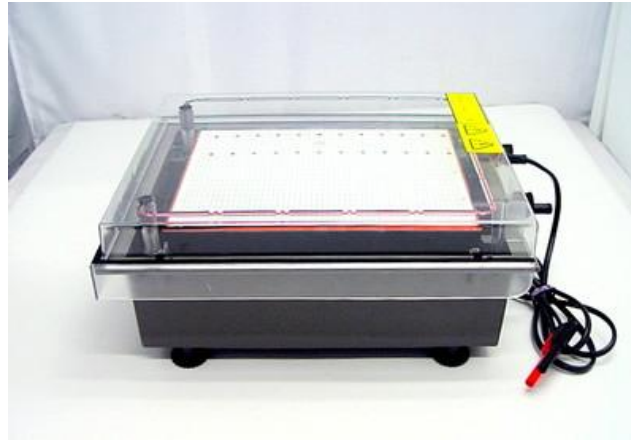
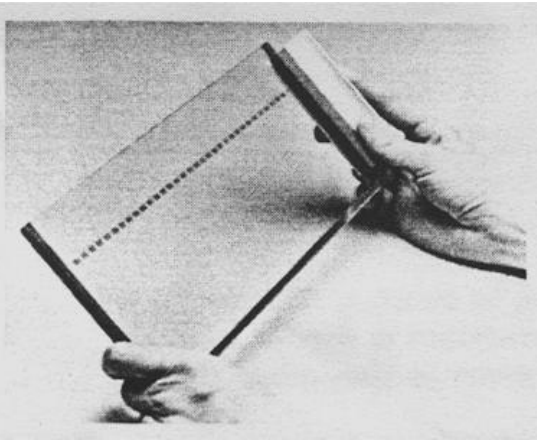
alimentatore

**La separazione deve avvenire solo in funzione del pI:
le proteine devono muoversi liberamente tra le maglie del gel**

→ **gel con maglie larghe (T= 4%)** per evitare il fenomeno del setaccio molecolare

→ **gel di spessore ridotto (0.15 mm)**

→ **corsa elettroforetica in orizzontale** (per supportare dal basso il gel sottile)

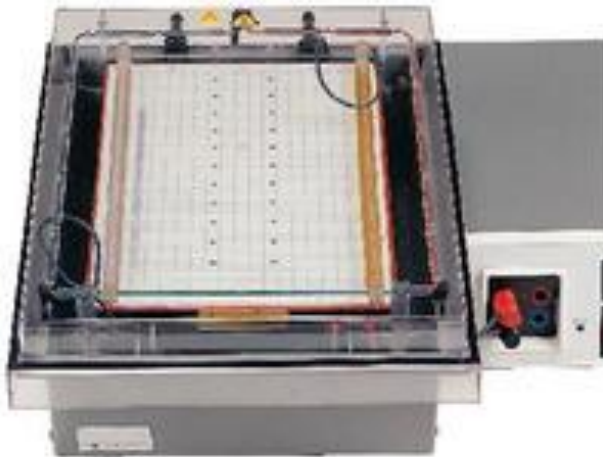


Gel polimerizzato sopra un supporto di cellophane

GEL IEF

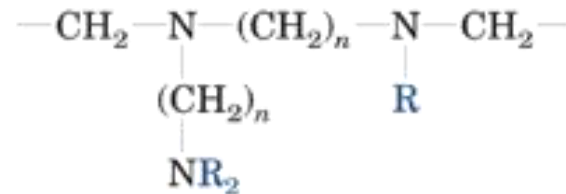
- Monomeri di acrilamide e bis acrilamide
- Agenti catalizzatori
- **no soluzione tampone**
- miscela di acidi alifatici sintetici poliamino-policarbossilici a diverso pI (**anfoliti**)

In commercio sono disponibili miscele di **anfoliti** con pI che coprono intervalli di pH ampi (p.es. 3-10) o ristretti (p.es. 7-8).



Anfoliti:

Composti a basso peso molecolare che contengono un numero variabile di gruppi aminici e carbossilici



$$n = 2 \text{ or } 3$$

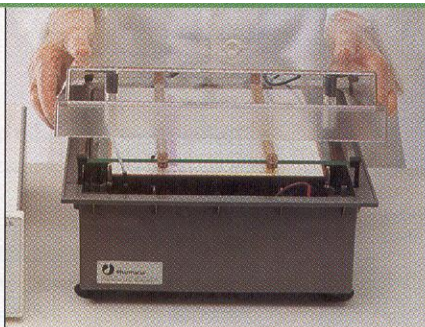
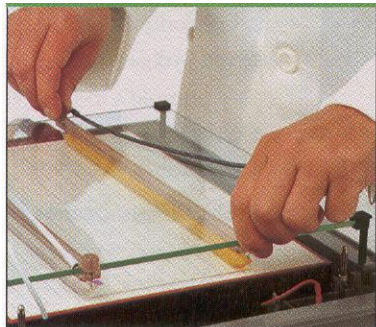


General formula of the ampholytes used in isoelectric focusing

- Alta risoluzione: differenze di pI sino a 0.01 unità di pH

Pre-elettroforesi

il gel polimerizzato viene sottoposto ad un campo elettrico
 gli anfolti migrano in base al loro pI e generano un gradiente di pH lungo il gel



+ -
 H_3PO_4 NaOH

pI Anfolti: range pH 3-10

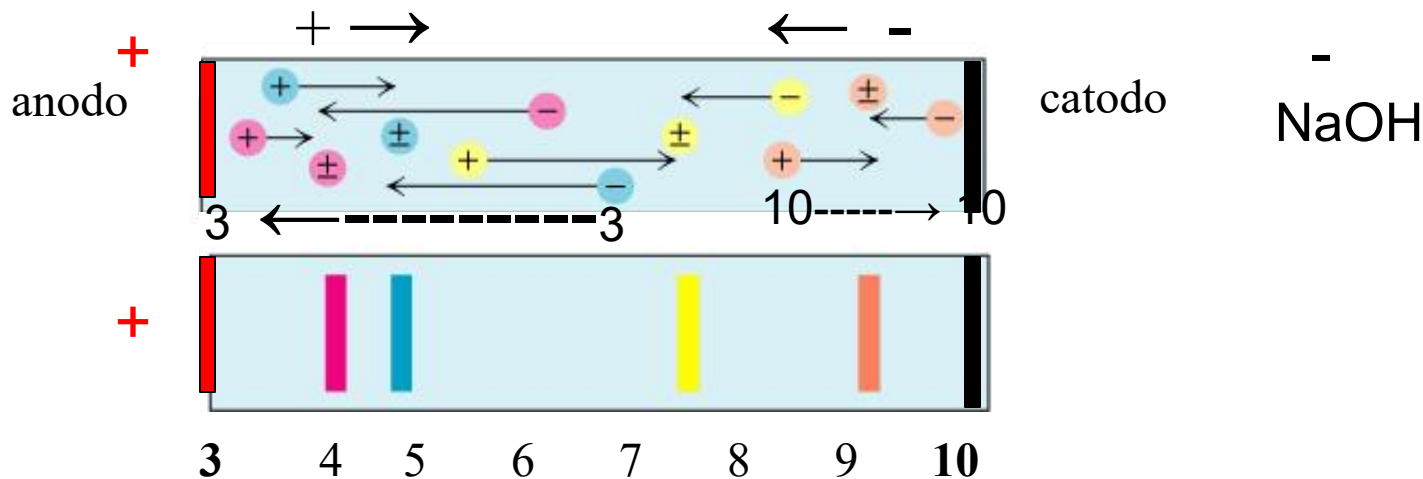
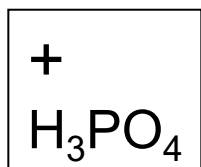
$$\text{Valore medio pH del gel} = \frac{3 + 10}{2} = 6.5$$

pH > pI (-)

pH < pI (+)

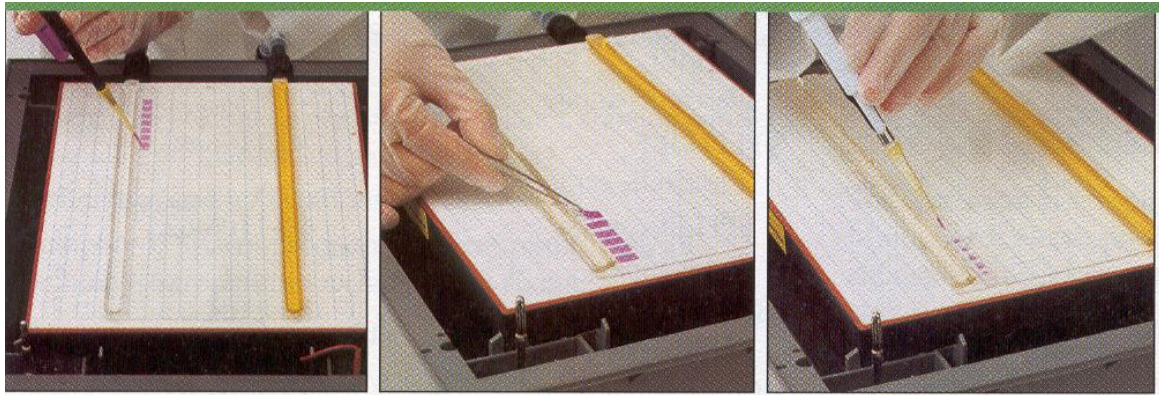
anfolti pI < 6.5 (-)

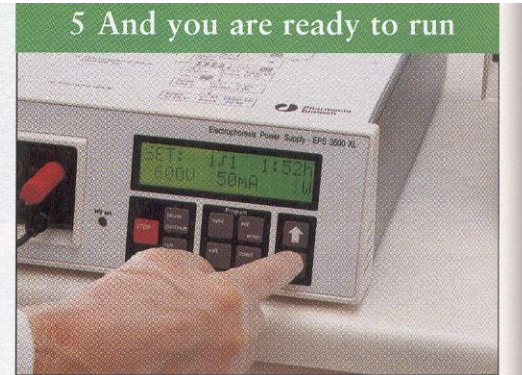
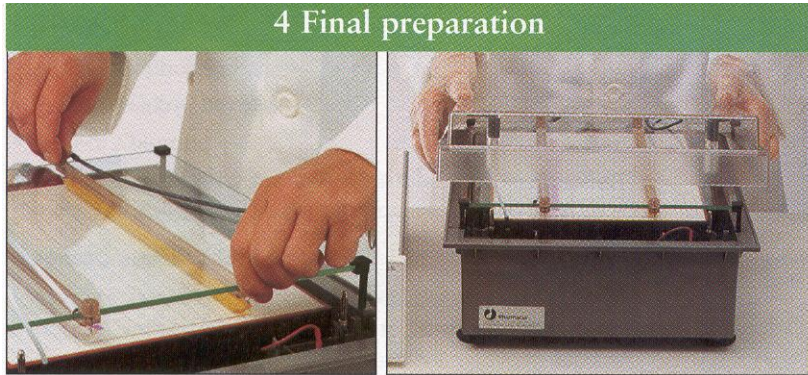
anfolti pI > 6.5 (+)



Semina dei campioni mediante:

- Pozzetti
- Quadratini di carta da filtro imbevuti di ciascun campione
- Goccia sul gel mediante pipetta

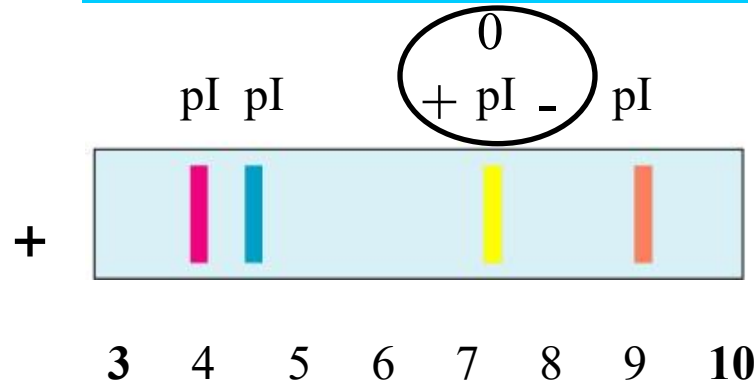
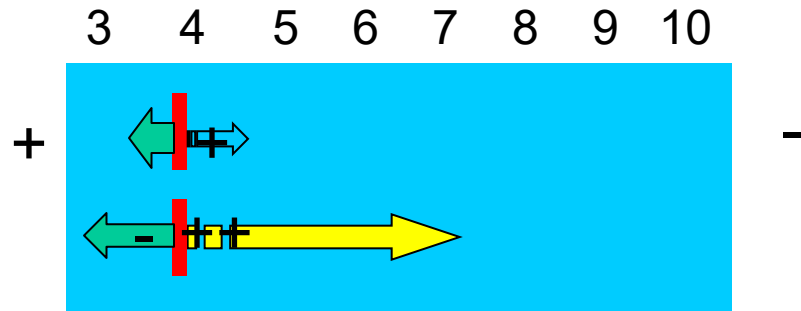




Le proteine con $pI < 4$
(-)

Le proteine con $pI > 4$
(+)

Range di pH 3-10



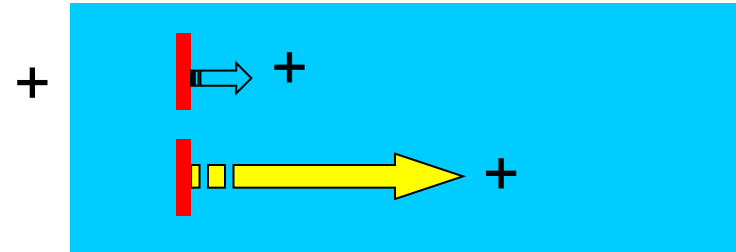
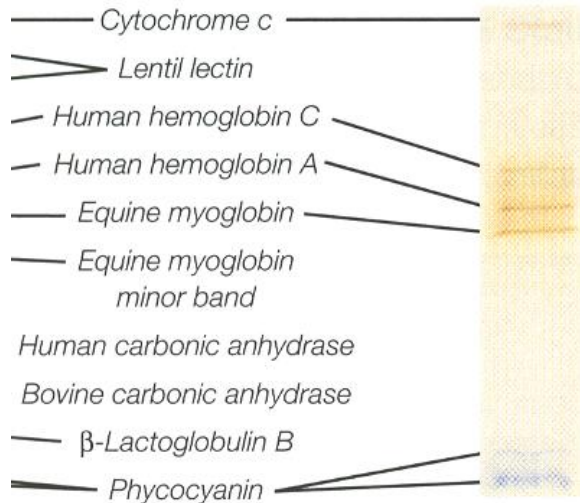
Focalizzazione
isoelettrica



Fine corsa?

~~Tracciante?~~

a) Proteine a pI noto e colorate da utilizzare come riferimento



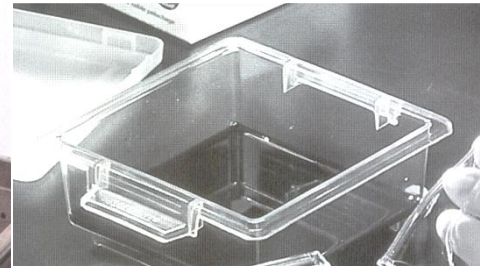
b) Se lavoriamo applicando una differenza di potenziale costante (V), quando le diverse proteine focalizzano l'intensità di corrente (Ampere) diminuisce sino a raggiungere un valore minimo costante (plateau)

Per evidenziare le proteine alla fine dell'IEF

- Fissaggio



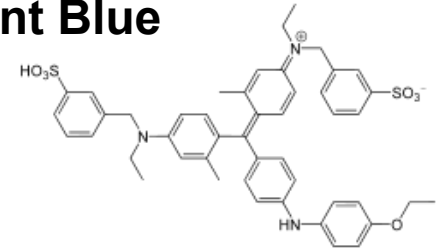
- Colorazione



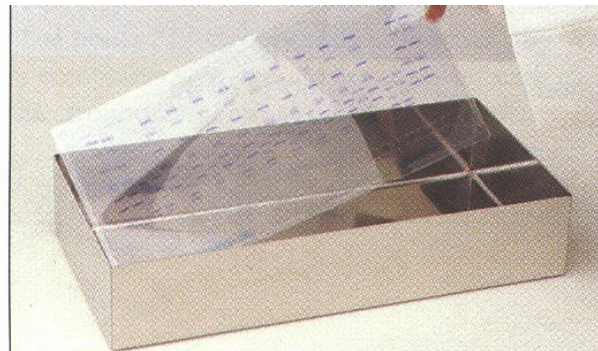
10% acido tricloracetico (TCA)

serve a lavare via gli anfolti
prima della colorazione

Coomassie Brilliant Blue

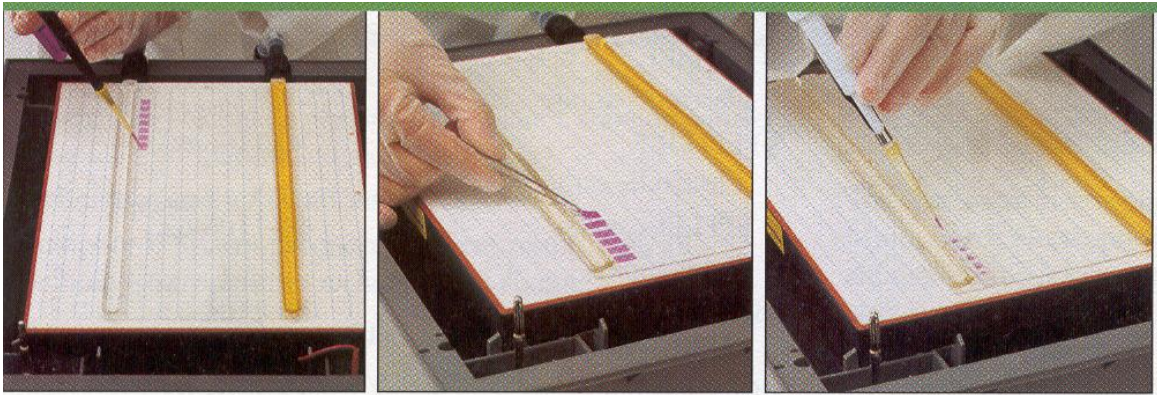


o altri coloranti specifici per le proteine



- Decolorazione

E' importante che i campioni vengano caricati tutti lungo la stessa linea?



No, in questa tecnica la focalizzazione delle diverse proteine avviene in base al loro pI: ogni proteina si arresta nel punto del gel che corrisponde al proprio pI

Non è importante il punto di applicazione: il risultato finale non varia!

Per aumentare la risoluzione nell'IEF si applicano differenze di potenziale molto elevate

- **diminuiscono i tempi di analisi (2-3 ore)**
- **aumenta la produzione di calore**

la maggior parte della potenza viene dissipata sotto forma di calore

Svantaggi della produzione di calore:

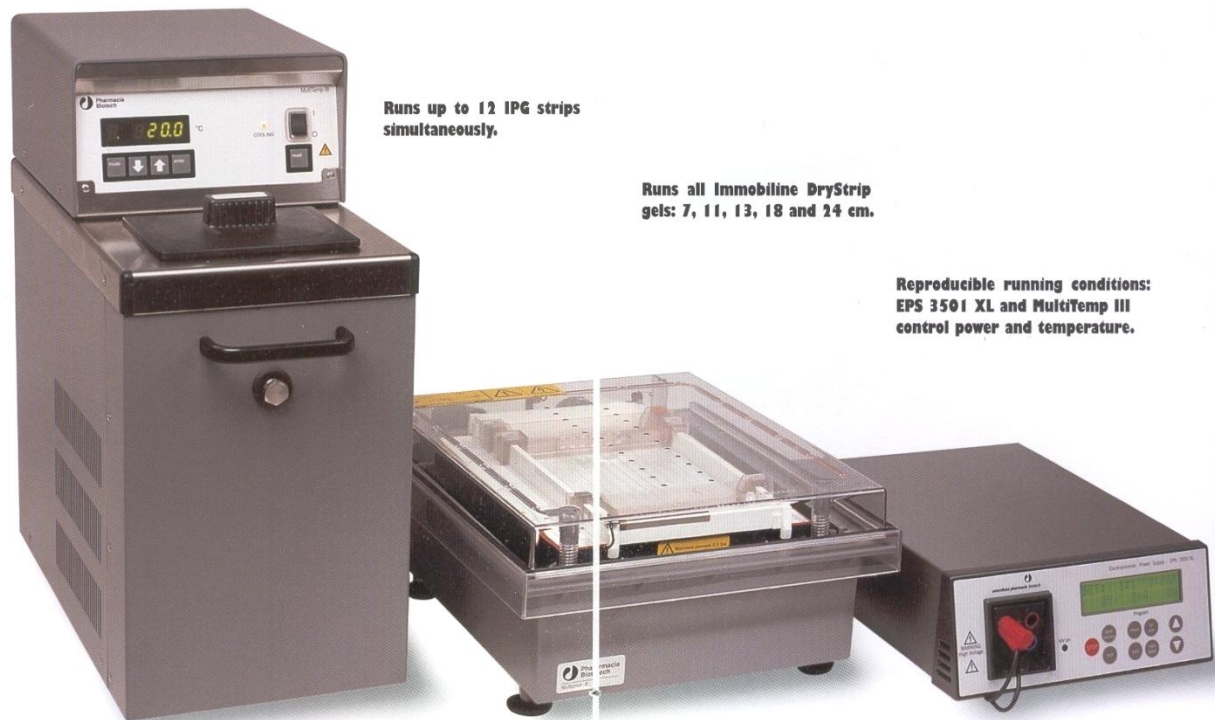
Aumento velocità di diffusione dei campioni → diminuzione di risoluzione

Comparsa correnti convettive → rimescolamento dei campioni separati

Aumento della temperatura → denaturazione proteine

Quando si applicano campi elettrici molto intensi è necessario dissipare il calore sviluppato: utilizzo di sistemi refrigerati

- si usano gel di spessore ridotto
- si utilizzano sistemi di raffreddamento
x circolazione di acqua a 4°C



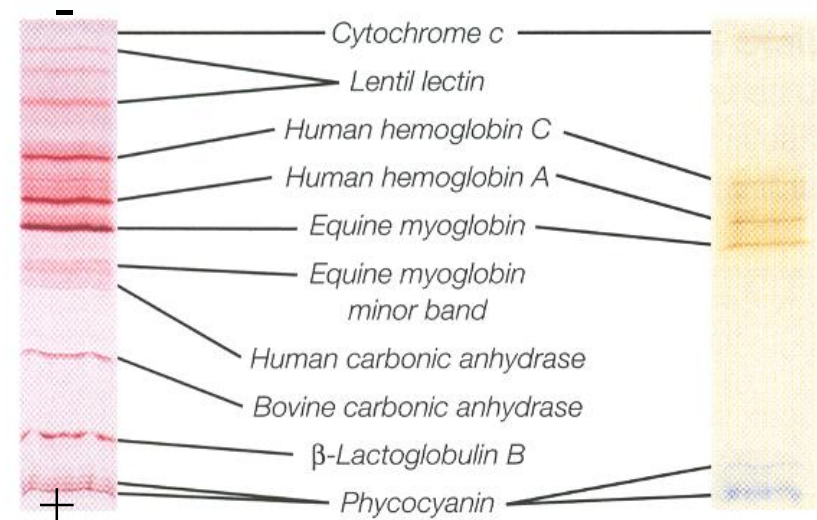
Bagnetto refrigerante cella elettroforetica alimentatore

Applicazioni dell'IEF:

- Analisi di miscele proteiche complesse
- Valutazione purezza di una proteina
- Determinazione pI
- Studio microeterogeneità di una proteina
(fosforilazioni, glicosilazioni acide, sostituzioni aminoac., etc)

Constituent Proteins of IEF Standards

Protein	Color	pI
Cytochrome c	Red	9.6
Lentil lectin (3 bands)		7.8, 8.0, 8.2
Human hemoglobin C	Red	7.50
Human hemoglobin A	Red	7.10
Equine myoglobin (2 bands)	Brown	7.00
Human carbonic anhydrase		6.50
Bovine carbonic anhydrase		6.00
β -Lactoglobulin B		5.10
Phycocyanin (3 bands)	Blue	4.45, 4.65, 4.75



gradiente di pH mediante anfoliti

L'IEF consente di separare le proteine con:

- Alta risoluzione: differenze di pI sino a 0.01 unità di pH
- Tempi rapidi: 2-3 ore
- Ampia possibilità di scelta dei range di pH: miscele di anfoliti con pH ristretti o ampi

IEF

3



10

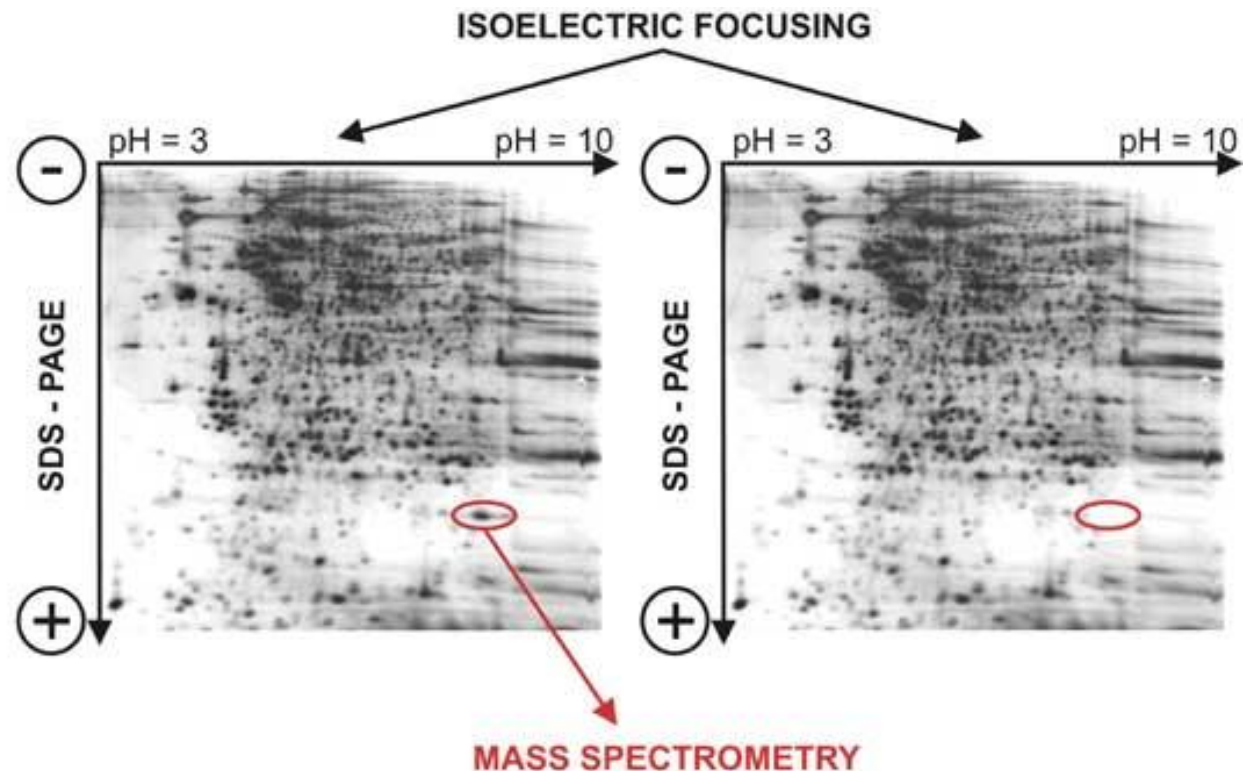
L'elettroforesi bidimensionale (2D-PAGE)
risulta dall'accoppiamento
di una separazione in base alla **carica (IEF)** e
di una separazione in base alla **massa (SDS-PAGE)**

Tecnica di élite per le analisi PROTEOMICHE

-Proteoma di una
cellula in condizioni
basali vs stress

-Proteoma di un tessuto
prima e dopo un
trattamento
farmacologico

-Proteoma di un tessuto
sano vs patologico



Why 2D Gels?

Metodo per la visualizzazione delle proteine e la proteomica,

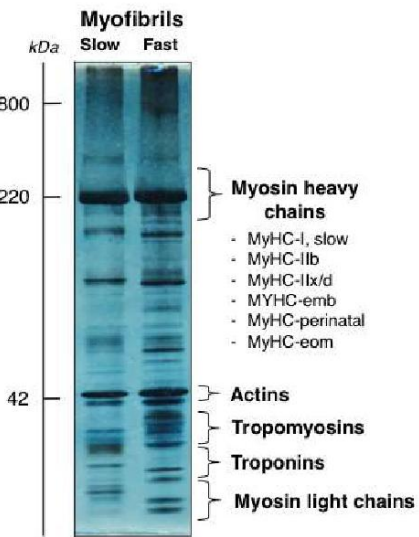
Può essere utilizzato in combinazione con Mass Spec

Consente il rilevamento, la visualizzazione, la purificazione, l'identificazione, la quantificazione, pI e MW simultanei.

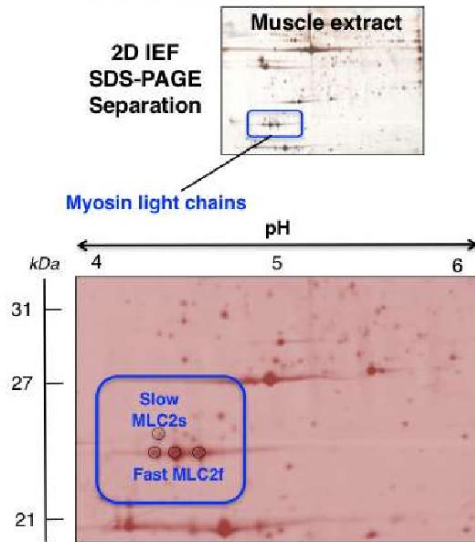
Robusto, riproducibile, semplice, economico, scalabile

Published in Proteomes 2019
[Characterization of Contractile Proteins from Skeletal Muscle Using Gel-Based Top-Down Proteomics](#)

1D Gel Electrophoresis



2D Gel Electrophoresis



- Grande capacità di separazione e risoluzione di miscele proteiche
- (2.000-3.000 proteine) ad elevato ordine di grandezza
- Risoluzione estremamente alta
- I gel 2 –DE sono collettori di frazioni proteiche molto efficienti
- Proteine sono protette all'interno della matrice del gel
- Possibilità di confronto tra i dati
- Riproducibilità e affidabilità dei dati
- Capacità di rilevazione di modificazioni post-traduzionali delle proteine
 - glicosilazione
 - fosforilazione
 - tagli proteolitici
- Possibilità di costruire o di usufruire di mappe di riferimento disponibili in rete



Sample Preparation



First-Dimension IEF



Second-Dimension SDS-PAGE

Mass Spectrometry

2-D
workflow



Blotting



Imaging and Analysis



Gel Staining

Fasi
dell'elettroforesi
2D

Preparazione del campione

La preparazione del campione è la chiave per il successo degli esperimenti su gel 2D

Deve selezionare il metodo appropriato per ottenere proteine selezionate dal compartimento cellulare di interesse

Le proteine di membrana, le proteine nucleari e le proteine mitocondriali richiedono passaggi speciali

Deve rompere tutte le interazioni proteina-proteina, proteina-DNA, proteina-lipidi non covalenti, interrompere i legami S-S

Deve prevenire la proteolisi, la fosforilazione accidentale, l'ossidazione, la scissione, ecc.

Deve rimuovere le sostanze che potrebbero interferire con il processo di separazione come sali, detergenti polari (SDS), lipidi, polisaccaridi, acidi nucleici

Deve cercare di mantenere le proteine solubili durante entrambe le fasi del processo di elettroforesi

Deve poter essere usata per quantificare le proteine



The key step of sample preparation is the Protein Solubilization:
2D electrophoresis rehydration buffer components

protein sample

2-20 mM Tris base (Carrier ampholytic buffer)

5-20 mM DTT (to reduce disulfide bonds)

8 M Urea (neutral chaotrope)

- Increases the solubility of some proteins
- Chaotropic agents interfere with stabilizing non-covalent forces (hydrogen bonds, van der Waals forces, and hydrophobic)

4% CHAPS Detergent (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)

- pH of 5-7
- Zwitterionic detergent (electronically neutral-has a both Neg and Pos useful for variable charged peptides)
- Protects the native state of proteins
- no affects on pH gradients

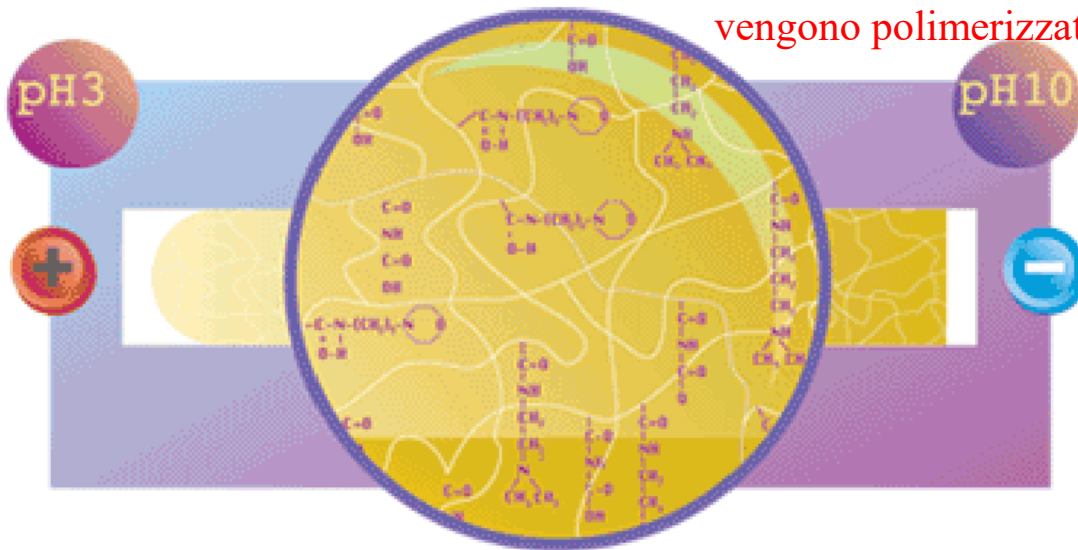
Bromophenol blue

1° Dimensione: IEF and IPG (immobilized pH Gradient)

Nel 1993 è stato sviluppato un metodo nel quale la focalizzazione viene svolta su gradienti IMMOBILIZZATI

Il gradiente è formato legando covalentemente un gradiente di molecole cariche (immobiline) nel gel

Le IMMOBILINE sono derivati della acrilammide, contenenti catene laterali con capacità tamponanti, che vengono polimerizzate nel gel insieme alla acrilammide.



Il pH in ogni punto del gel è determinato dalla mistura di immobiline che si trovano in quel punto.

IEF and IPG (immobilized pH Gradient)

Immobilized pH gradients (IPG)

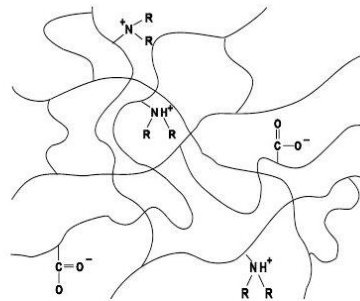
Strip of PA made by covalently integrating acrylamide and variable pH ampholytes (buffering substaces)

Separation on basis of pI, **not MW**

Available in different pH ranges

- 3-10
- 4-8
- 5-7

Requires very high voltages (5000V) and long period of time (10h)



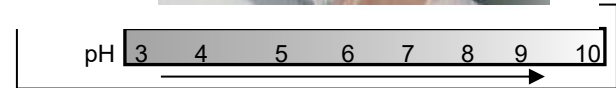
Acrylamido buffers: Immobiline®
 $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}$,
 R contains a carboxylic or a tertiary amino group

Immobiline Gels
 (0.5 mm gel layers on film supports)



Guidelines for choosing Immobiline DryStrip gels

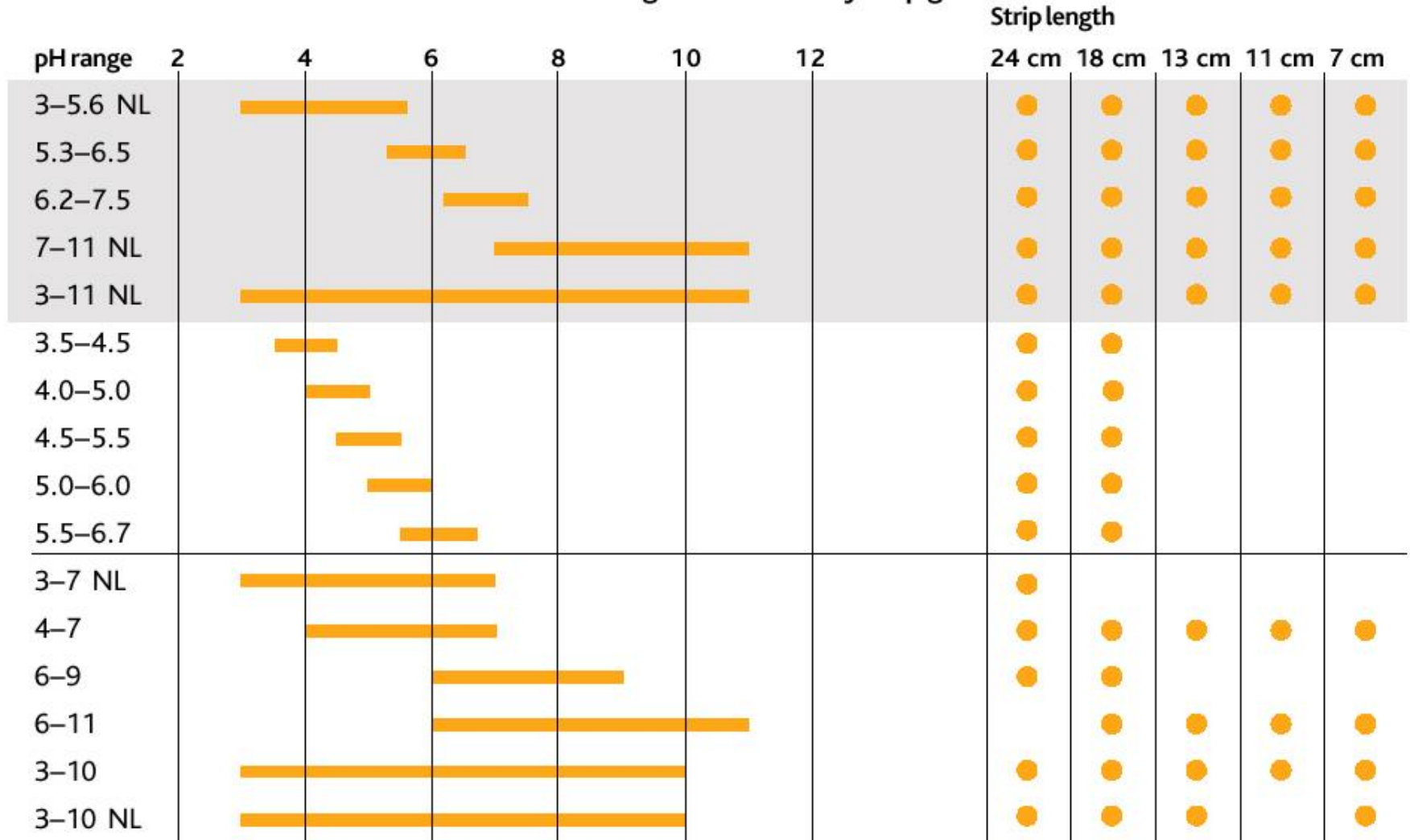
pH range	Strip length					
	24 cm	18 cm	13 cm	11 cm	7 cm	
3-5.6 NL	•	•	•	•	•	•
5.3-6.5			•	•	•	•
6.2-7.5				•	•	•
7-11 NL					•	•
3-11 NL	•	•	•	•	•	•
3.5-4.5		•				
4.0-5.0		•				
4.5-5.5		•				
5.0-6.0		•				
5.5-6.7		•				
3-7 NL	•	•				
4-7		•				
6-9			•			
6-11				•		
3-10	•	•	•	•	•	•
3-10 NL	•	•	•	•	•	•



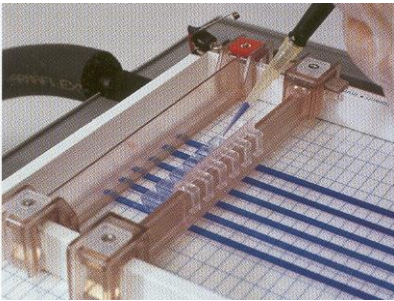
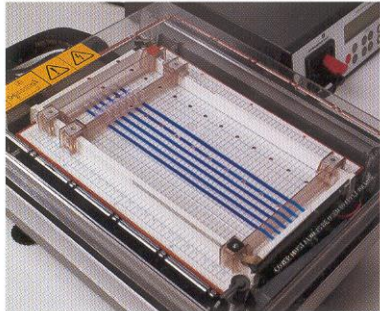
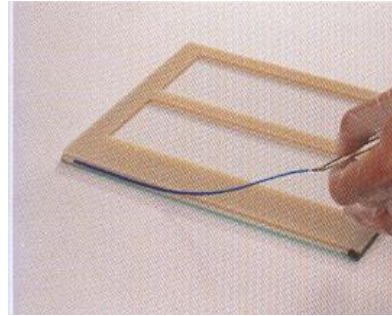
•Alta risoluzione: differenze di pI sino a 0.001 unità di pH

IPG strip disponibili

Guidelines for choosing Immobiline DryStrip gels

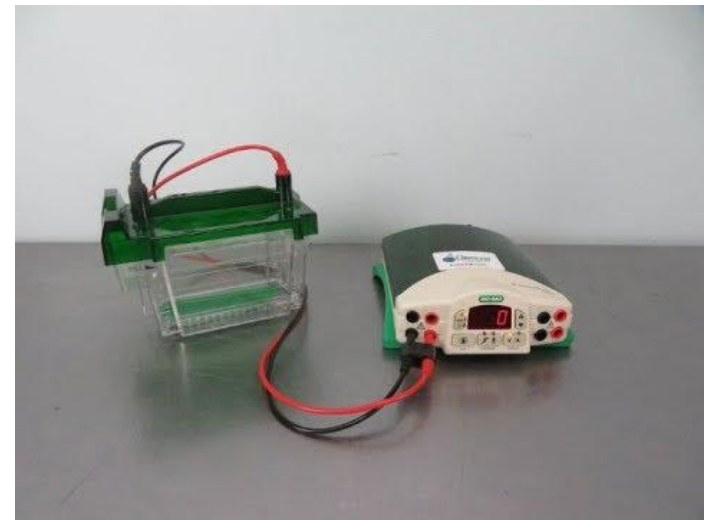
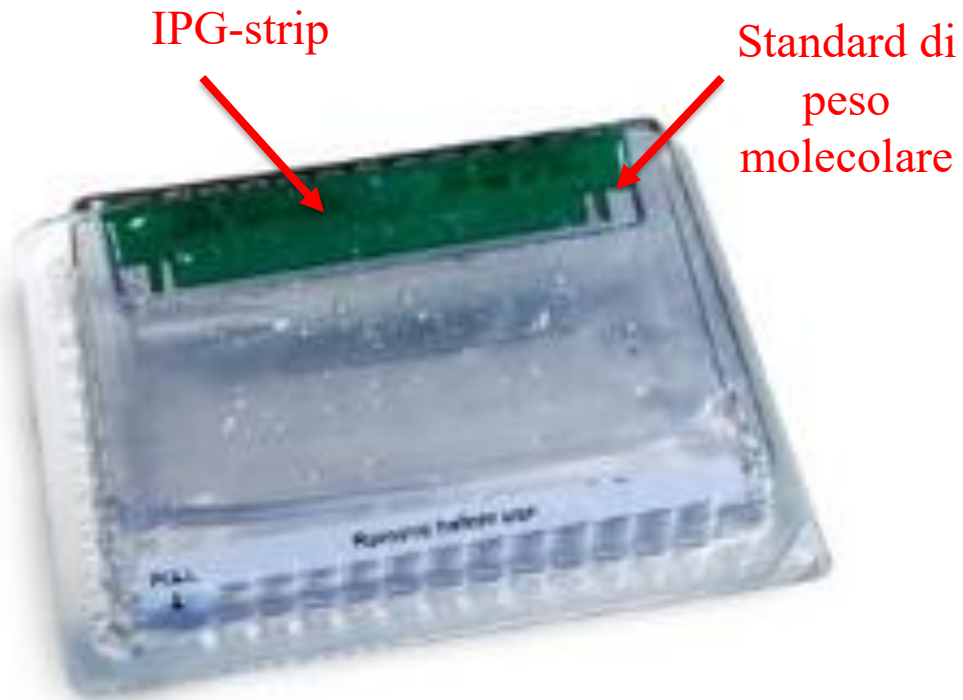


I dimensione (IEF) II dimensione (SDS-PAGE)

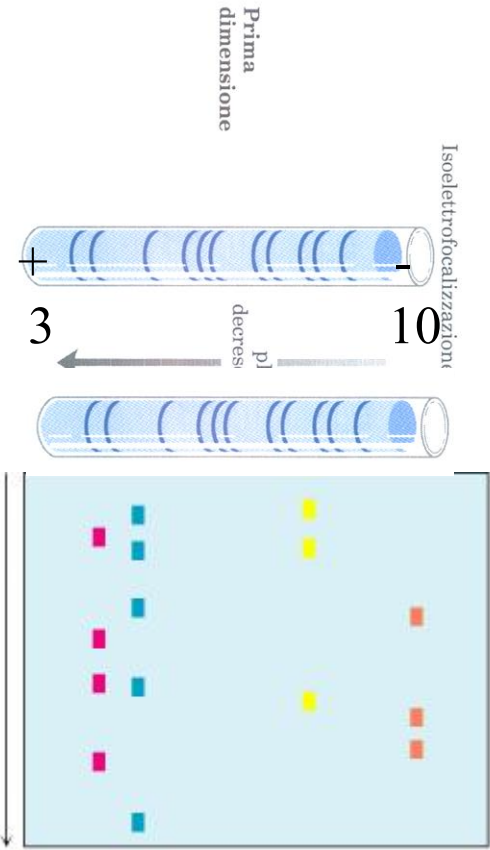
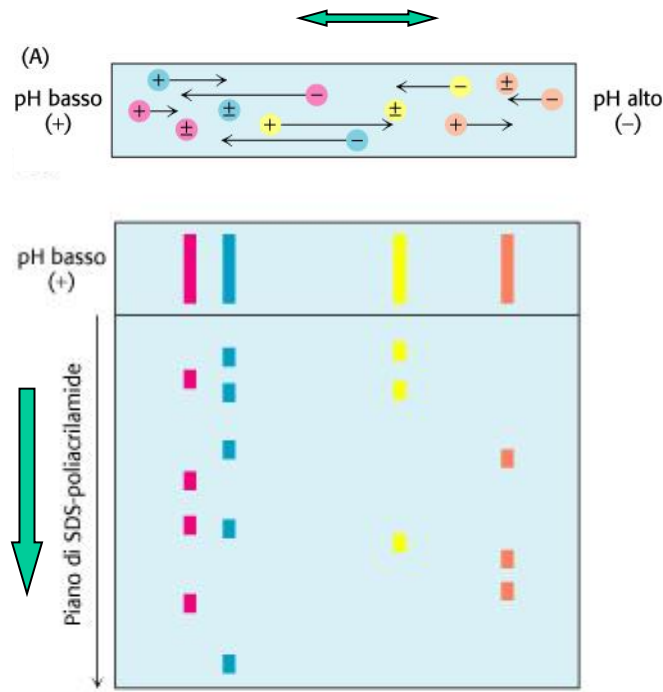


Equilibratura delle strip in SDS + agente riducente

SDS-PAGE



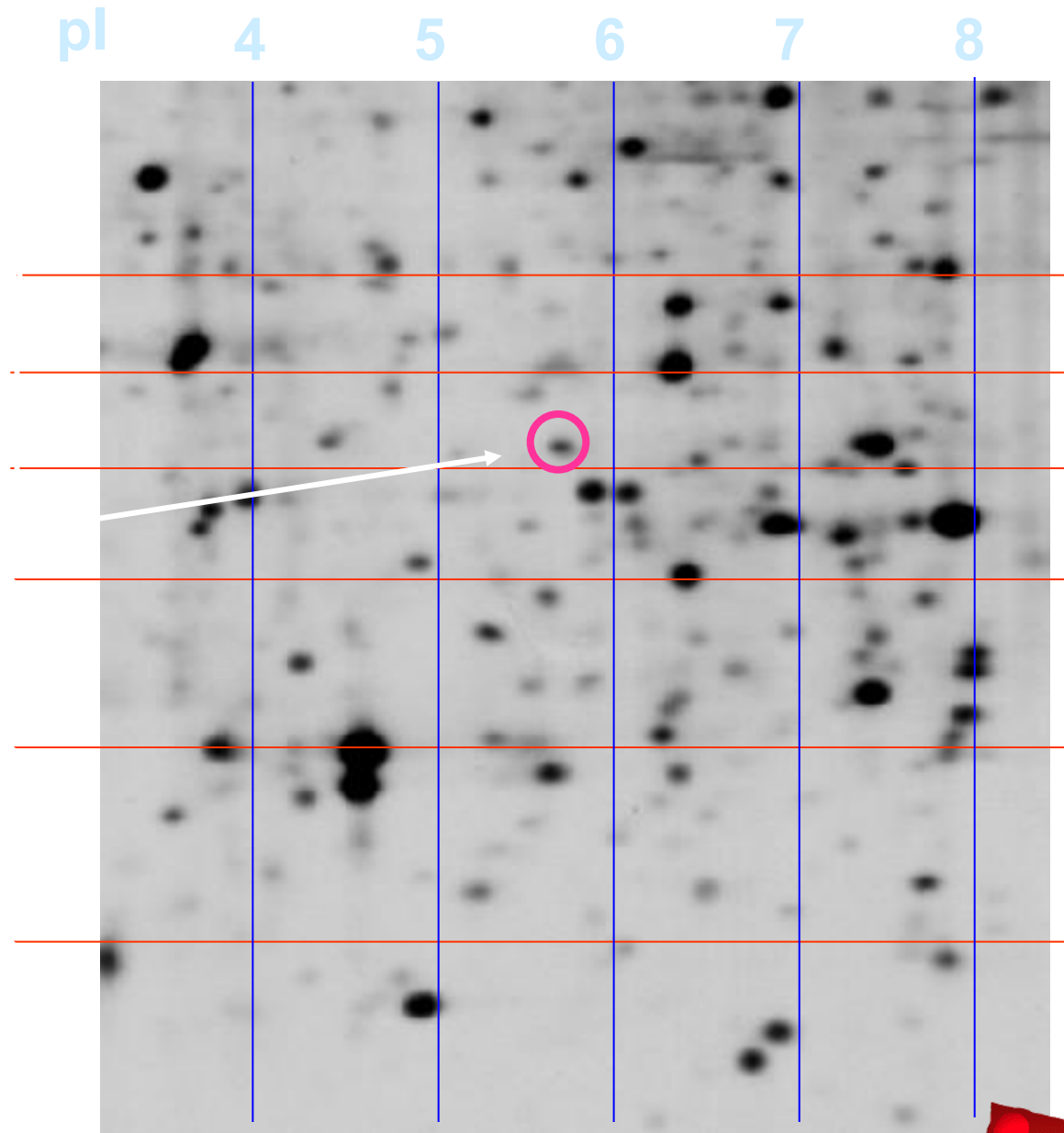
1) IEF



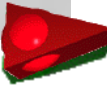
2) SDS-PAGE



SDS – 2D PAGE

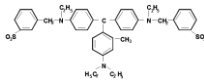


Ogni proteina (*spot*)
è caratterizzata
da **Mr** - **pI**

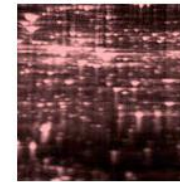


Gel Stains - Summary

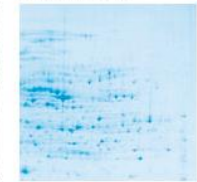
Stain	Sensitivity (ng/spot)	Advantages
Coomassie-type	5-10	Simple, fast
Silver stain	1-4	Very sensitive, laborious
Copper stain	5-15	Reversible, 1 reagent negative stain
Zinc stain	5-15	Reversible, simple, fast high contrast neg. stain
SYPRO ruby	1-10	Very sensitive, fluorescent



Flamingo



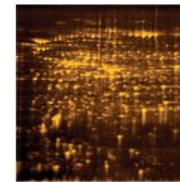
Coomassie Blue



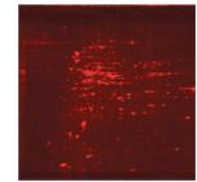
Silver



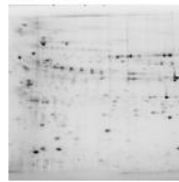
Orion

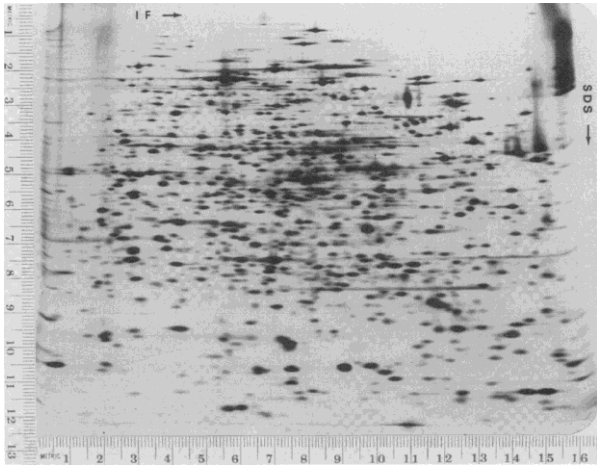


SYPRO Ruby



Stain-free





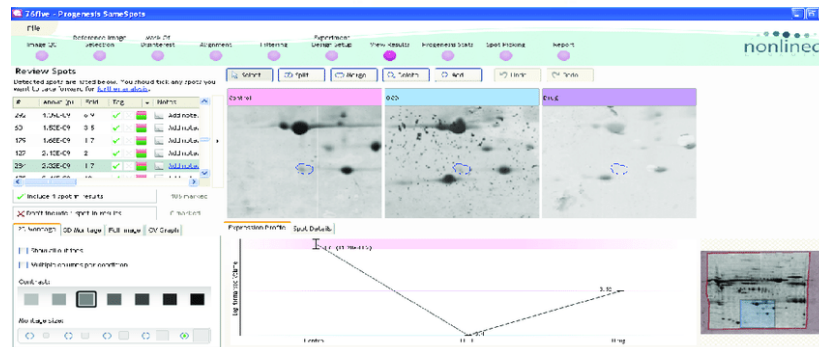
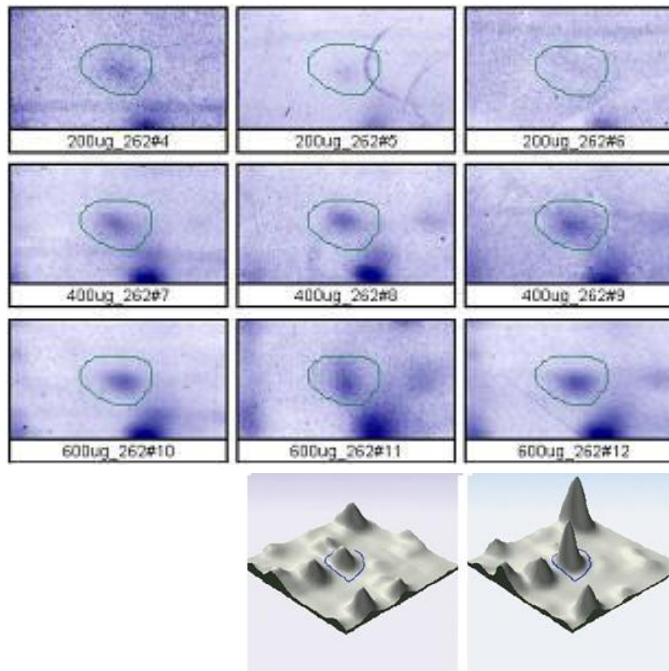
Difficoltà nel gestire le numerose informazioni ottenute mediante 2D

per **analisi qualitative/quantitative** è necessario un sistema di acquisizione dell'immagine (PC, scanner) ed un software per l'analisi delle immagini

2D Gel Post Analysis

- Compare gel images and determine what bands/spots are different
- Requires software to compare gels

Differenza apparente: è necessario estrarre la proteina dal gel per la spettrometria di massa



SameSpots™ v5 | 2D Gel Image Analysis Software

Vantaggi

- **Grande capacità di separazione e risoluzione di miscele proteiche (2.000–3.000 proteine)**
- **Riproducibilità e affidabilità dei risultati**
- **Possibilità di confronto dei dati tra laboratori differenti**
- **Capacità di rilevazione di modificazioni post-traduzionali delle proteine**
 - fosforilazione
 - glicosilazione,
- **Possibilità costruire e/o usufruire di mappe di riferimento disponibili in rete**

Svantaggi

- metodica lunga
- molto dispendiosa in termini di: tempo e costo
- bassa capacità di risoluzione delle proteine idrofobiche con limitata solubilità (rimangono adsorbite sulla strip)
- difficile separazione delle proteine molto acide o basiche
- scarsa risoluzione di proteine con PM > 150 kDa
- bassa risoluzione per le proteine poco rappresentate nel campione proteico