

***Laboratorio di Biochimica***

# **Elettroforesi di proteine**



Alessio Branchini

8 marzo 2012

# Turni di laboratorio di Biochimica

*Date primo laboratorio (marzo):*

- lunedì 12 (gruppo 1)
- martedì 13 (gruppo 2)
- mercoledì 14 (gruppo 3)
- giovedì 15 (gruppo 4)
- venerdì 16 (gruppo 5)



**PORTARE IL  
CAMICE!!!!**

*Dove:*

- Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare
- 3° piano
- Laboratorio Didattico “Biotech”

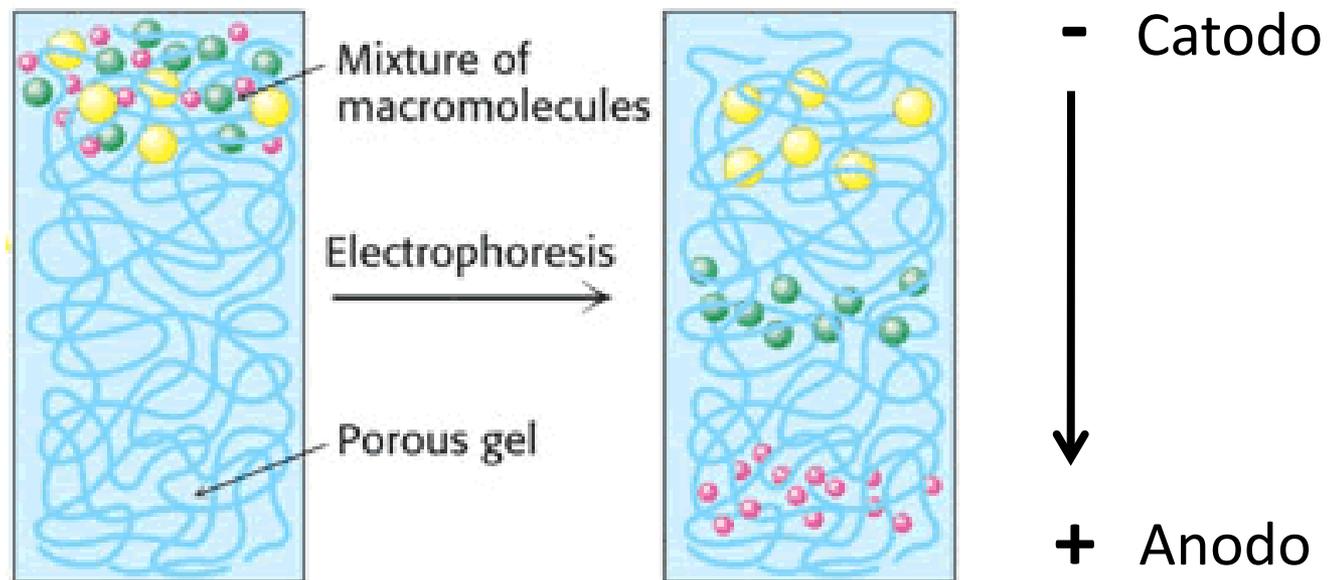
Orari e turni scaricabili all'indirizzo:

<http://www.unife.it/scienze/biologia/allegati/studiare/Orari>

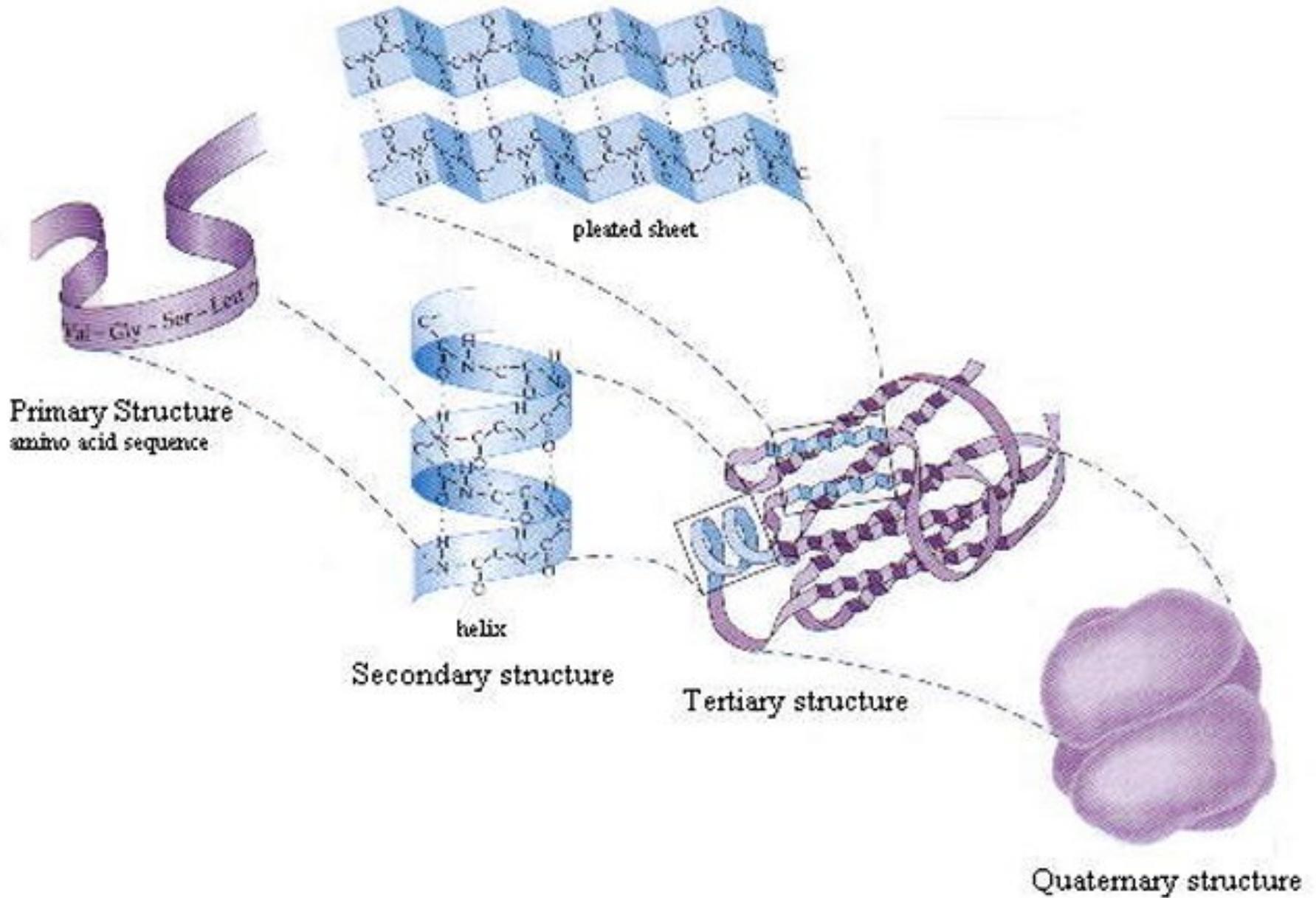
**Elettroforesi:** Separazione di molecole cariche mediante applicazione di un campo elettrico

Utilizzo di un supporto poroso (gel) che permette la separazione per dimensione agendo come un setaccio

Il setaccio è costituito da un polimero di **acrilamide**, la cui concentrazione influisce sulla dimensione dei pori

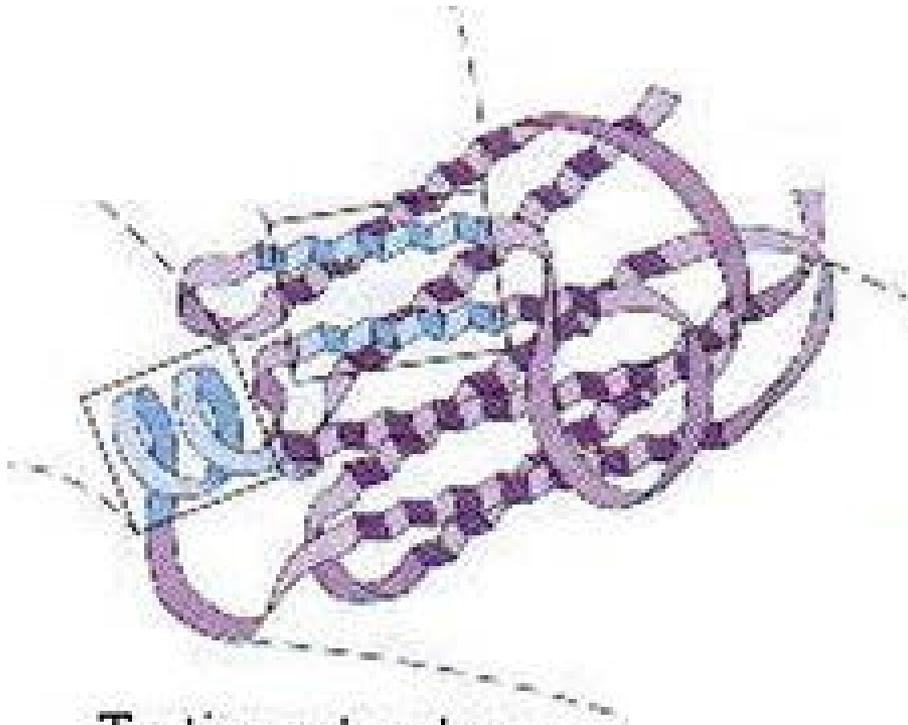


# Strutture di una proteina

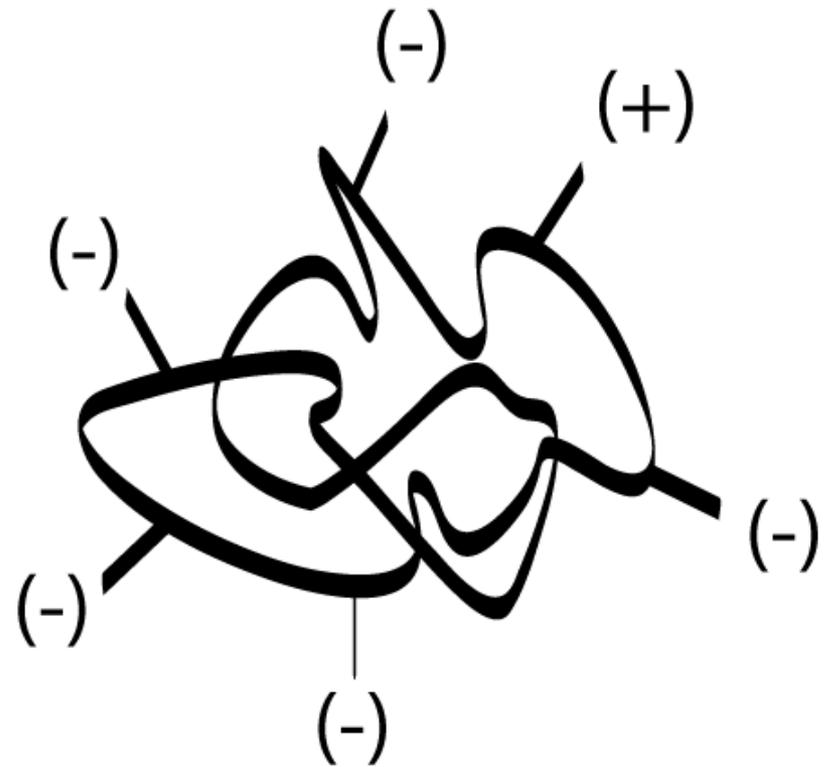


# Elettroforesi di proteine

## Condizioni denaturanti



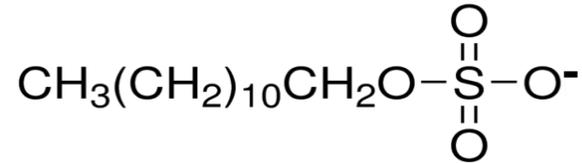
Tertiary structure



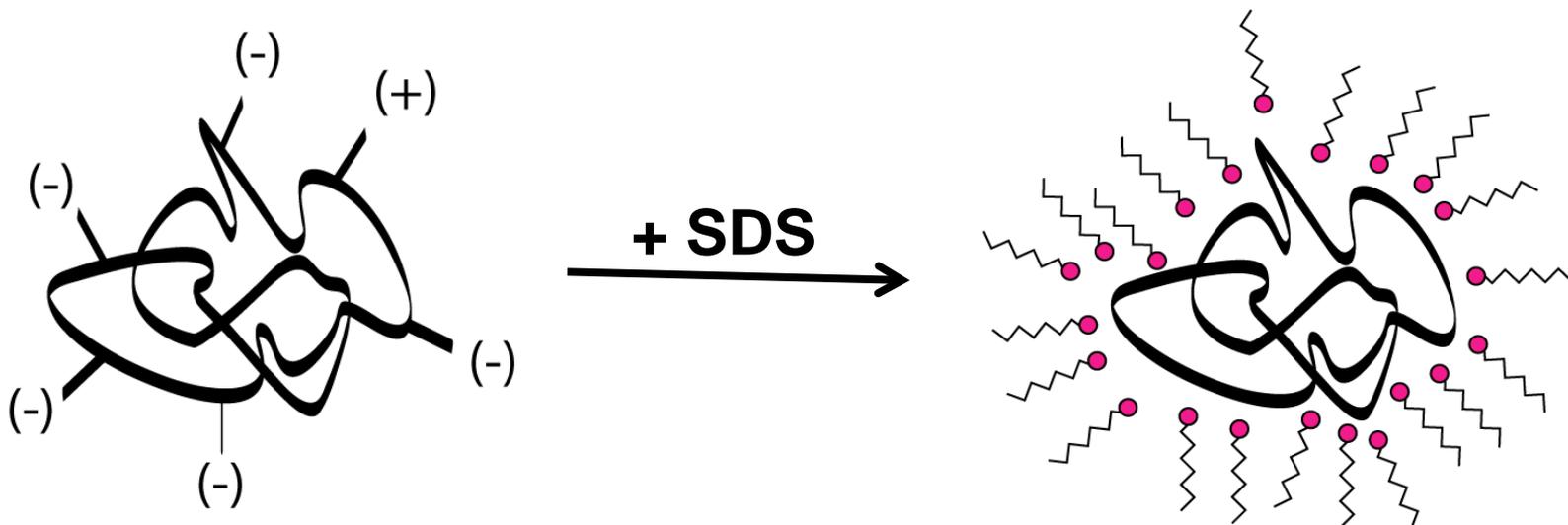
# Elettroforesi di proteine

## Condizioni denaturanti

- Le proteine sono trattate con SDS (**Sodio Dodecil Solfato**, detergente anionico)



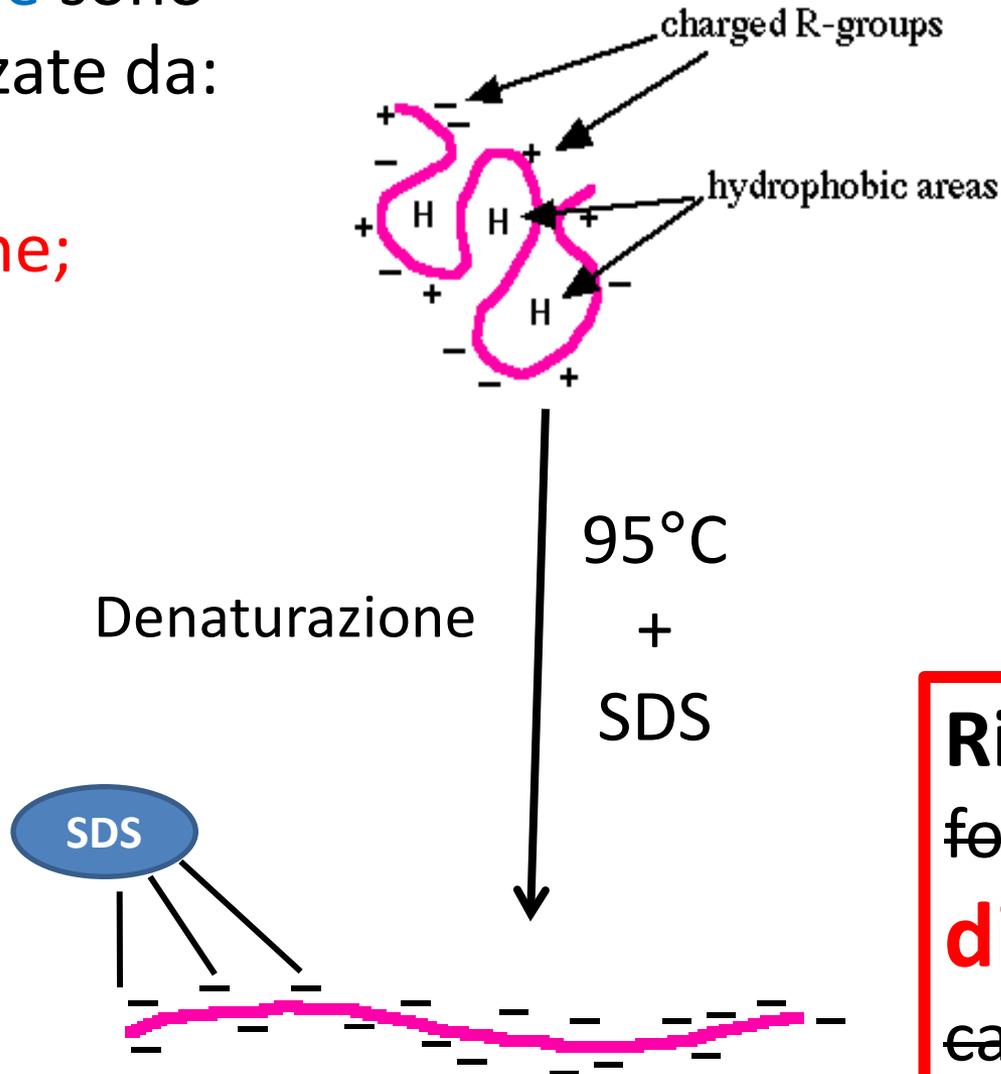
- Le molecole di SDS si legano alle proteine
- Le proteine perdono la loro normale forma
- Le proteine hanno tutte lo stesso rapporto carica/massa**
- Le proteine vengono separate esclusivamente sulla base delle loro dimensioni**



# Preparazione del campione:

Le **proteine** sono caratterizzate da:

**forma;**  
**dimensione;**  
**carica.**



**Risultato:**

**forma;**

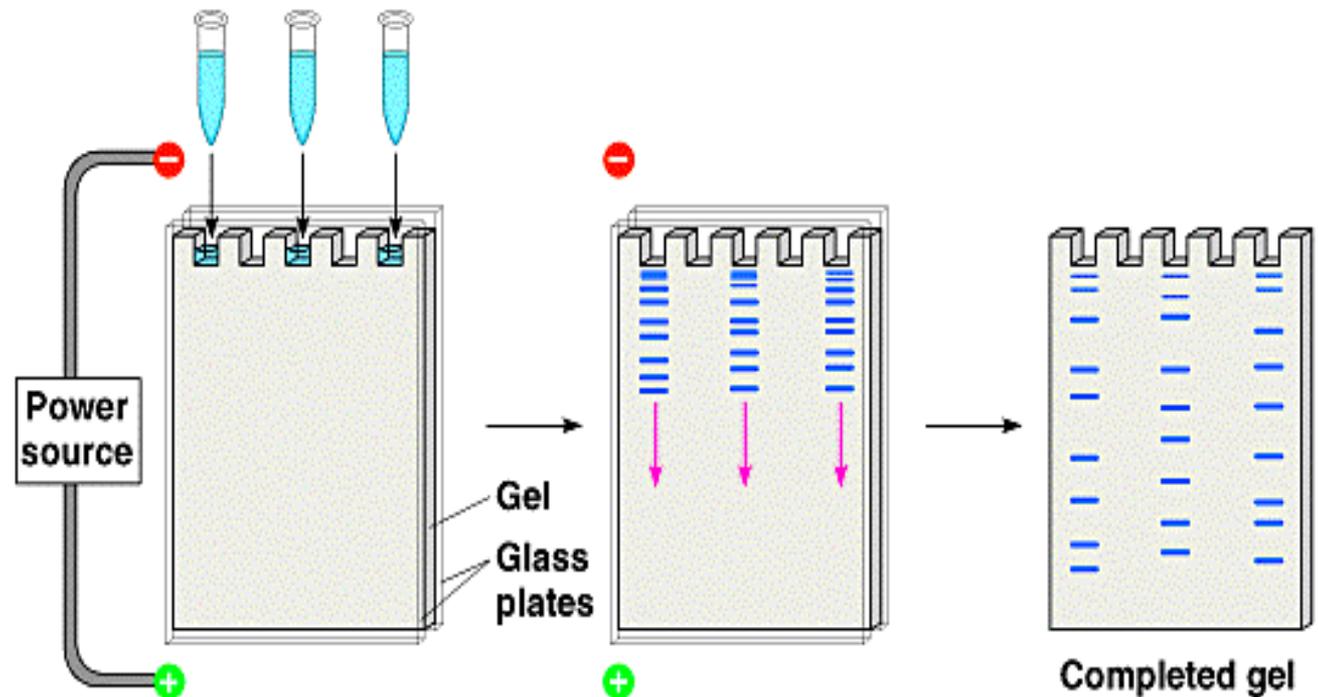
**dimensione;**

**carica.**

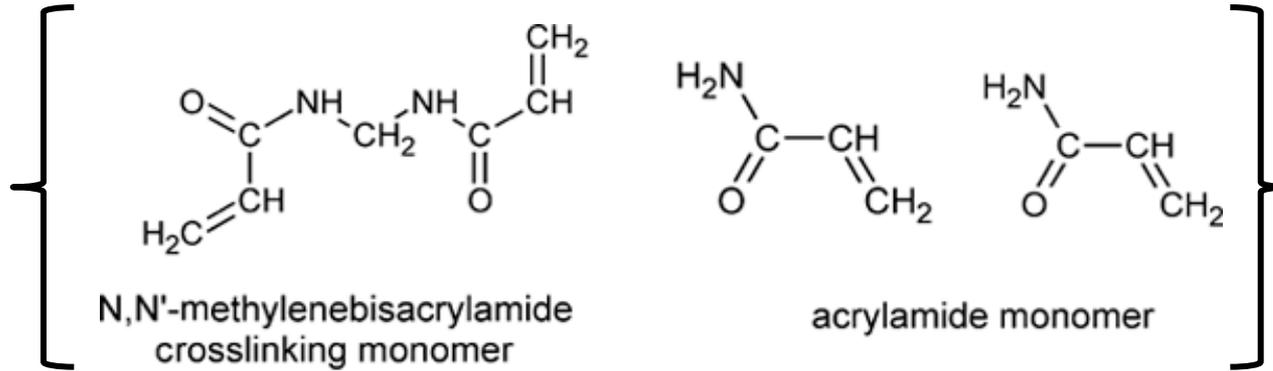
# SDS-PAGE

## (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

- Le proteine cariche negativamente si muovono verso l'elettrodo positivo
- Proteine più piccole si muovono più velocemente
- Le proteine si separano per dimensione

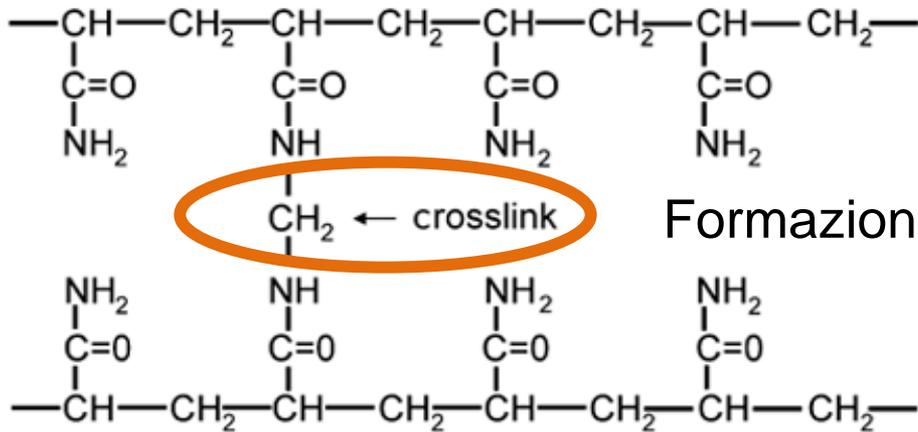


# La polimerizzazione genera una rete tridimensionale



**Poliacrilamide:**  
miscela di monomeri di Acrilamide e Metilenebisacrilamide

Iniziatore  
Catalizzatore



Formazione di legami covalenti

polyacrylamide

La concentrazione di **acrilamide** influisce sulla dimensione dei pori del setaccio

% di acrilammide  
consigliata

Dimensioni delle  
proteine

8%

40-200 kDa

10%

21-100 kDa

12%

10-40 kDa

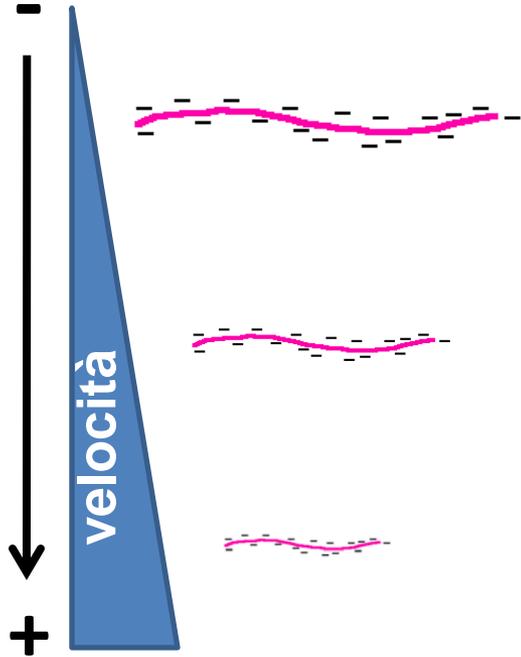
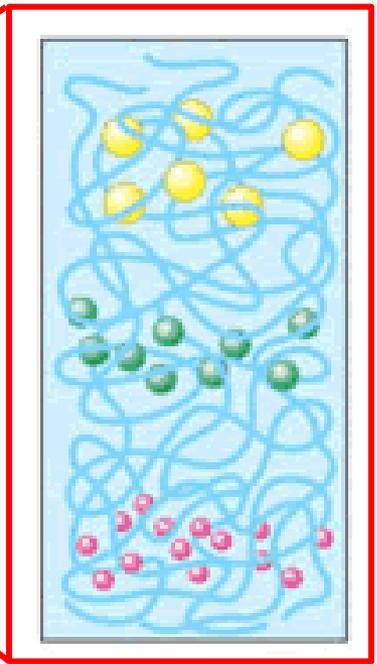
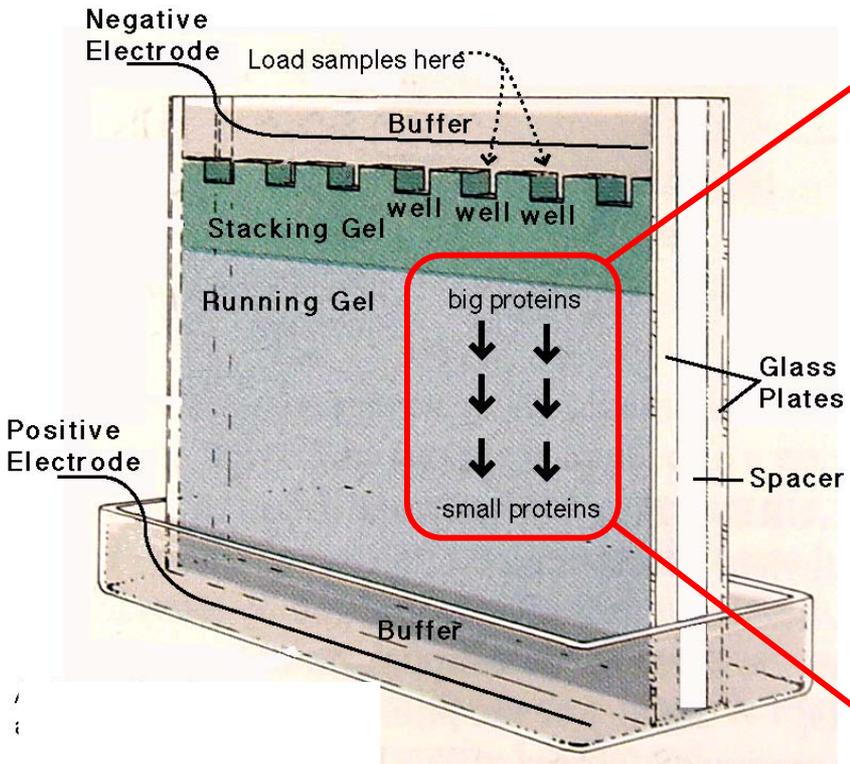
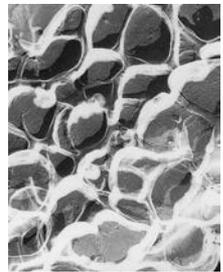
# Preparazione del gel:

Componenti:

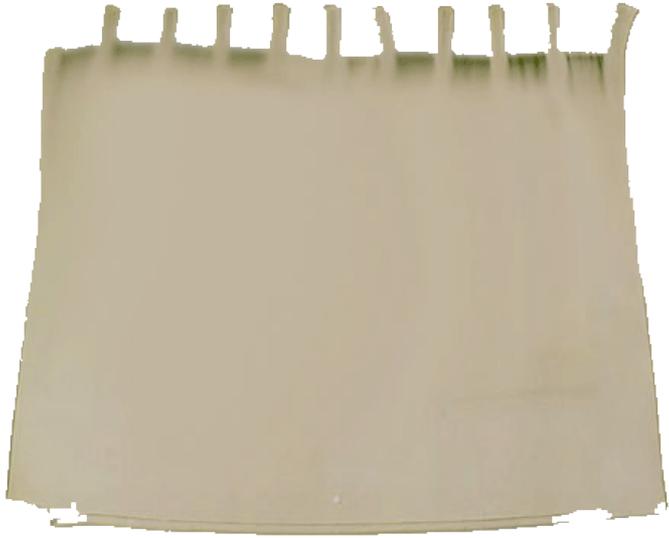
- Buffer
- PAA
- **Iniziatore**
- **Catalizzatore**



Polimerizzazione  
(reazione a catena)



# Colorazione con Blue Coomassie



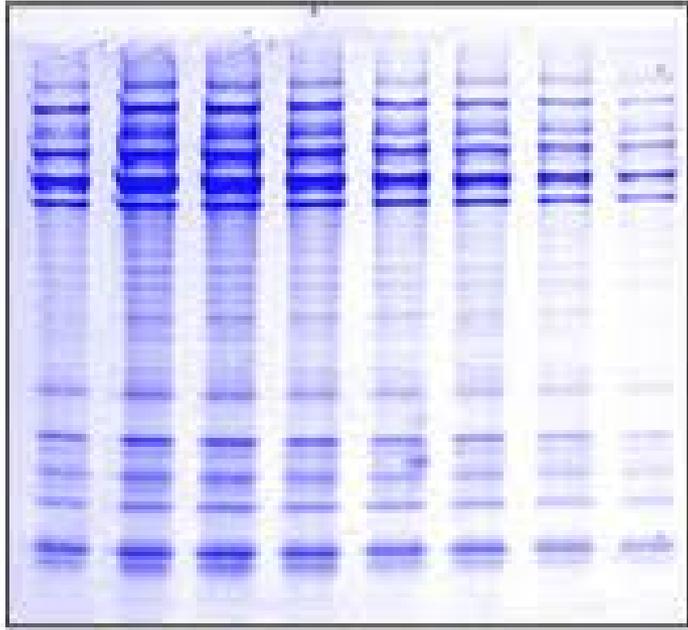
Colorante che lega i **residui basici**

Usato direttamente **su gel**

Lega **tutte** le proteine

**Bassa sensibilità**

# Colorazione con Blue Coomassie



Colorante che lega i **residui basici**

Usato direttamente **su gel**

Lega **tutte** le proteine

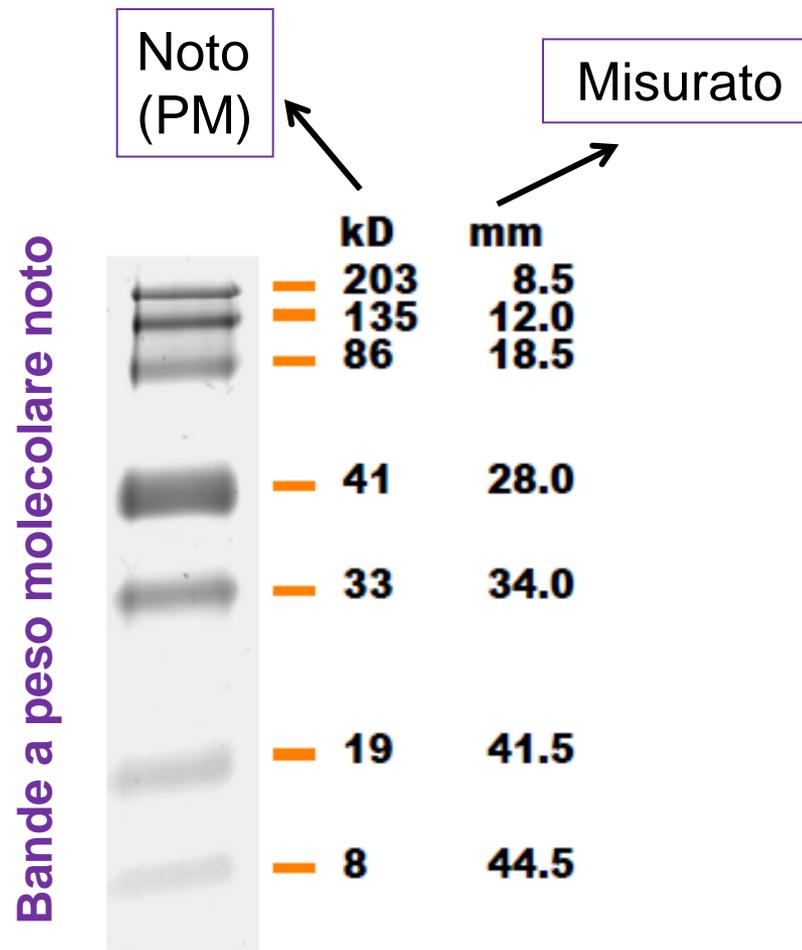
**Bassa** sensibilità

Come fare:



# Determinazione del PM

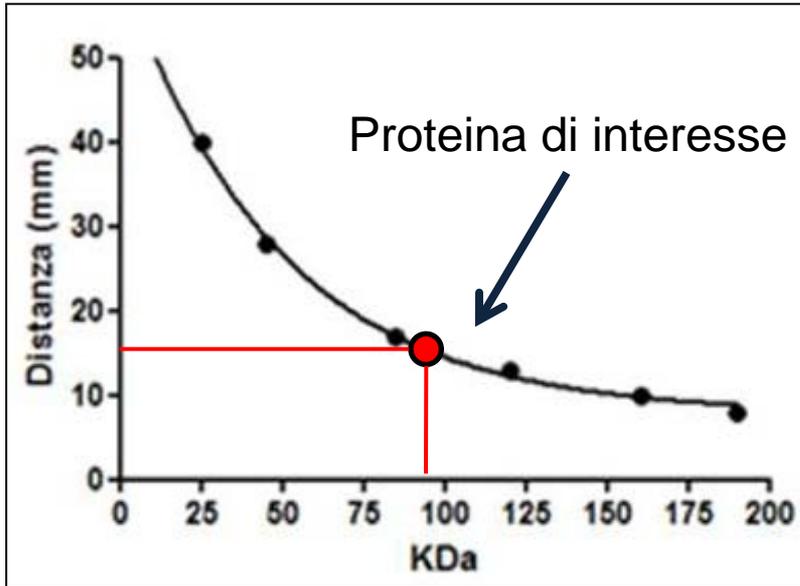
Possiamo calcolare il peso molecolare di una proteina di interesse misurando la migrazione di bande di dimensione nota



# Determinazione del PM

Possiamo calcolare il peso molecolare della nostra proteina di interesse misurando la migrazione di bande di dimensione nota

Migrazione (mm) in funzione del **PM**

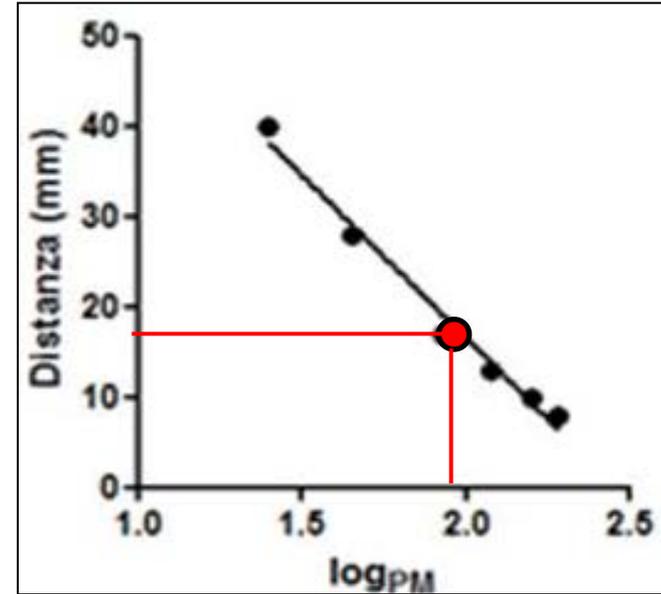


## RISULTATO:

Grafico **non lineare**;  
dai mm percorsi dalle proteine (asse y)  
si ricava il **PM** (asse x)

*Es: proteina 90 KDa*

Migrazione (mm) in funzione del **logPM**



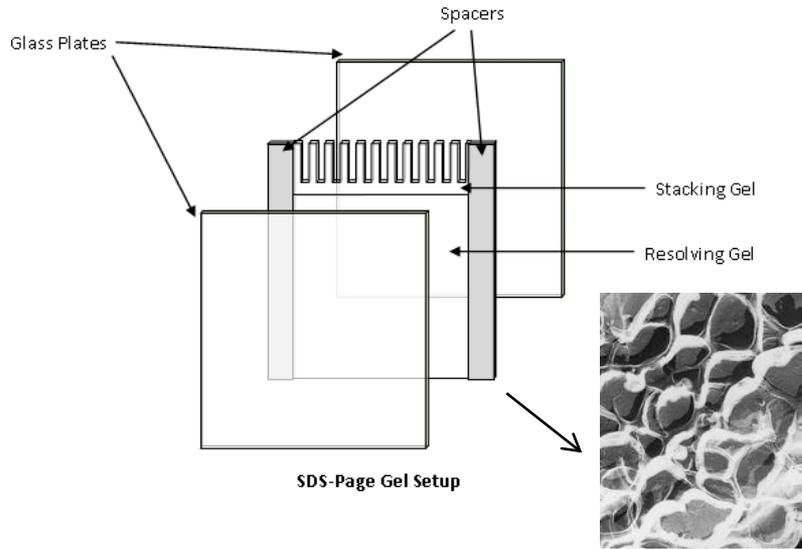
## RISULTATO:

Grafico **linearizzato**;  
dai mm percorsi dalle proteine (asse y)  
si ricava il **logPM** (asse x)

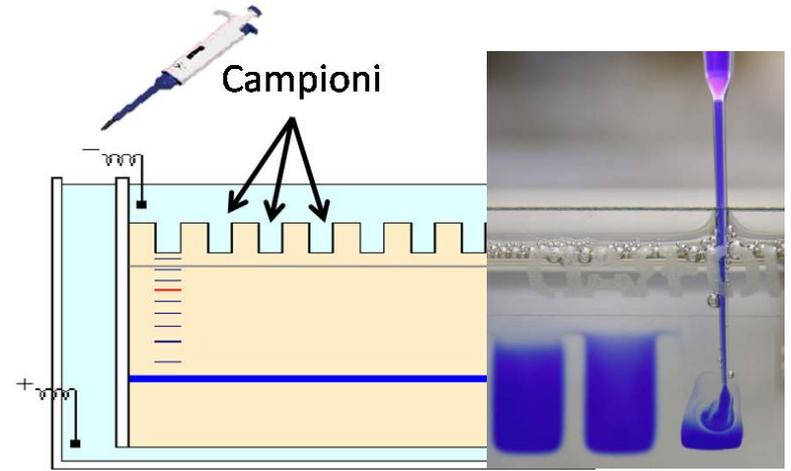
*Es: proteina 90 KDa (logPM = 1,95)*

# Esperienza di laboratorio

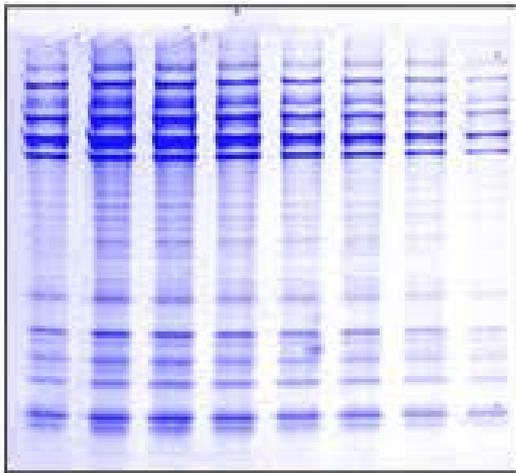
## 1) Preparazione del gel



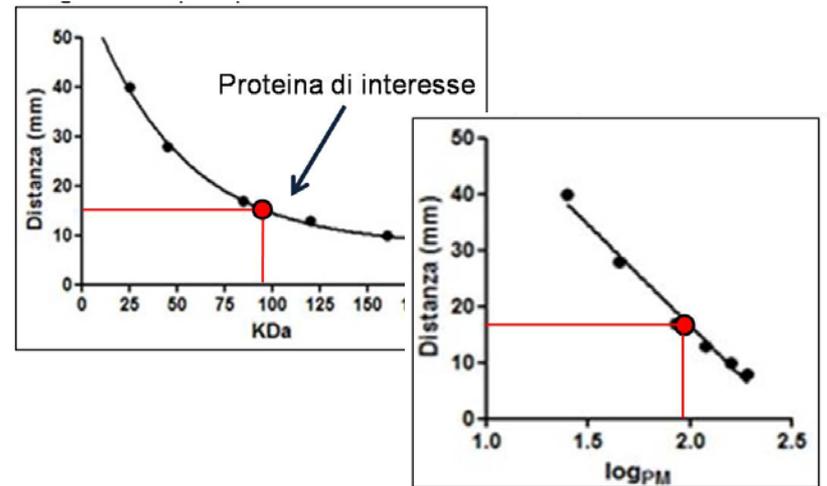
## 2) Preparazione dei campioni, caricamento e elettroforesi



## 3) Colorazione con Blue Coomassie



## 4) Determinazione del PM



# Preparazione del gel

## Stacking gel:

Acrilamide/Bis-Acrilamide (3%)

1 M Tris (pH 6,8)

SDS

Ammonio persolfato (APS)

TEMED

H<sub>2</sub>O

## Running gel:

Acrilamide/Bis-Acrilamide (10%)

1,5 M Tris (pH 8,8)

SDS

Ammonio persolfato (APS)

TEMED

H<sub>2</sub>O

