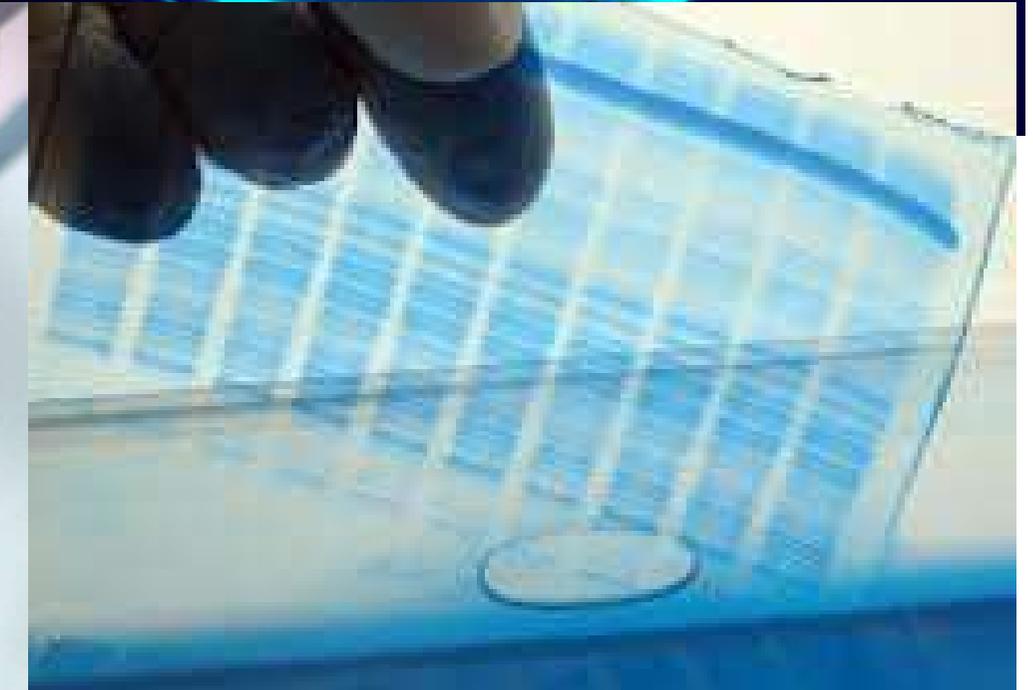
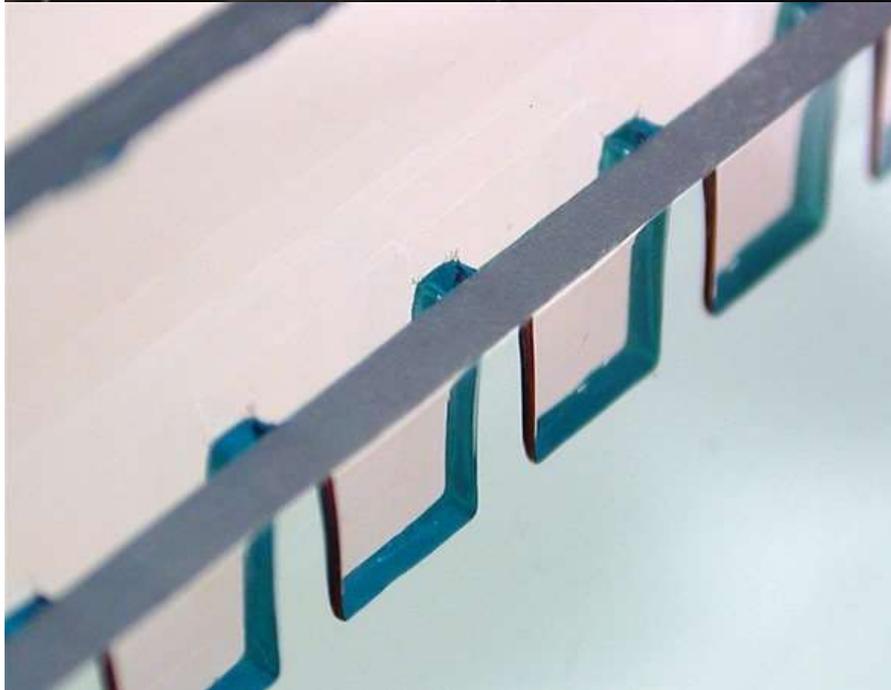
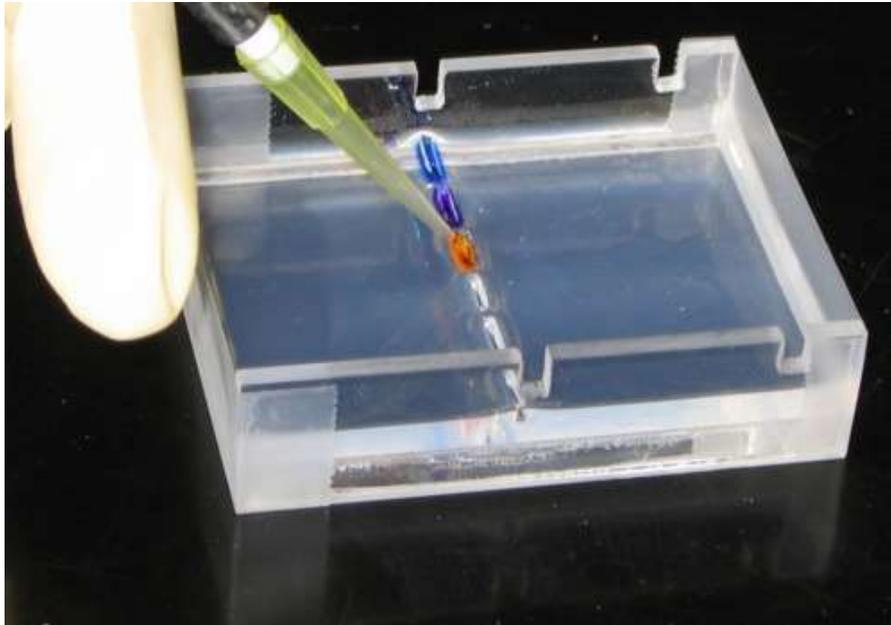


ELETTROFORESI



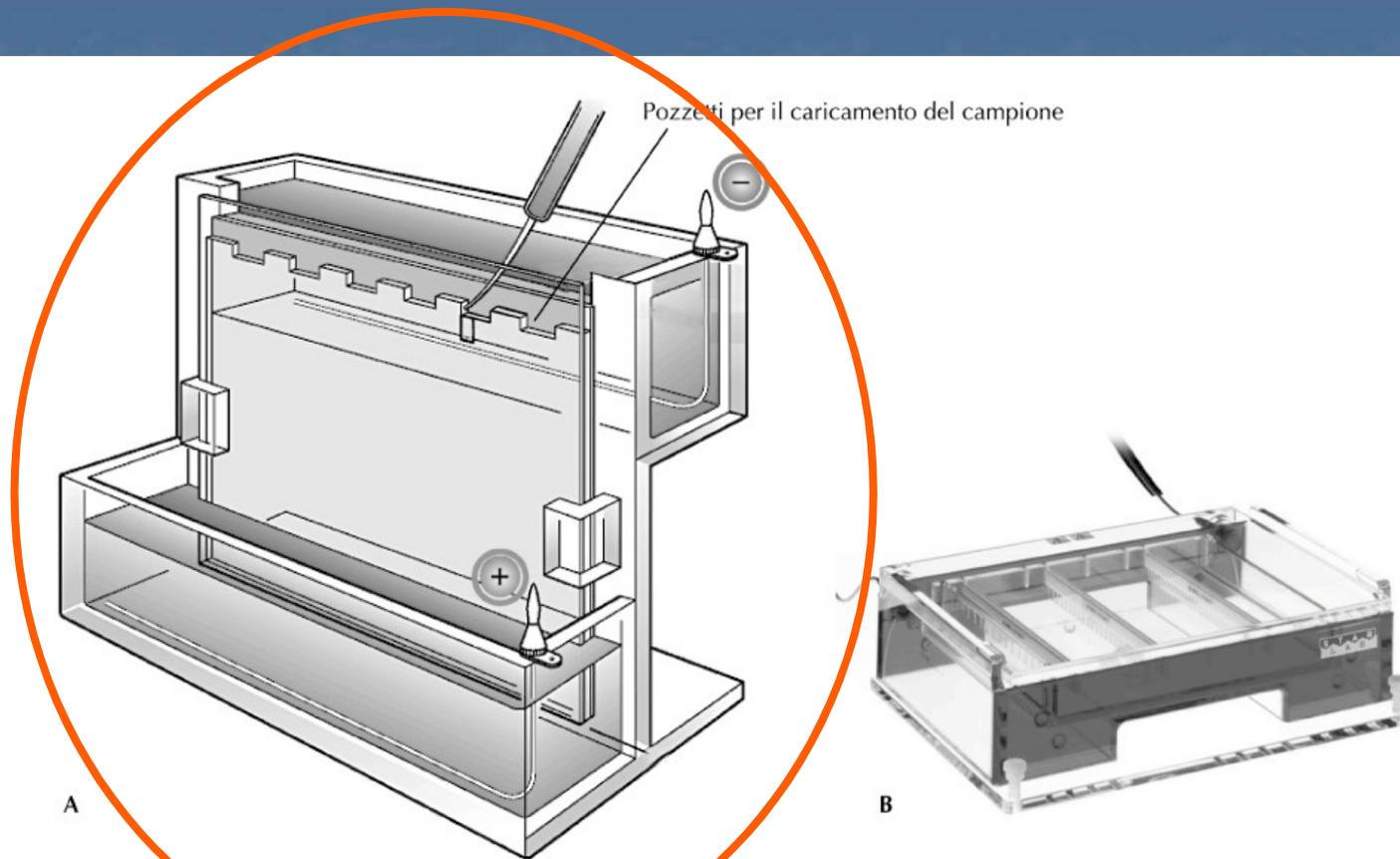
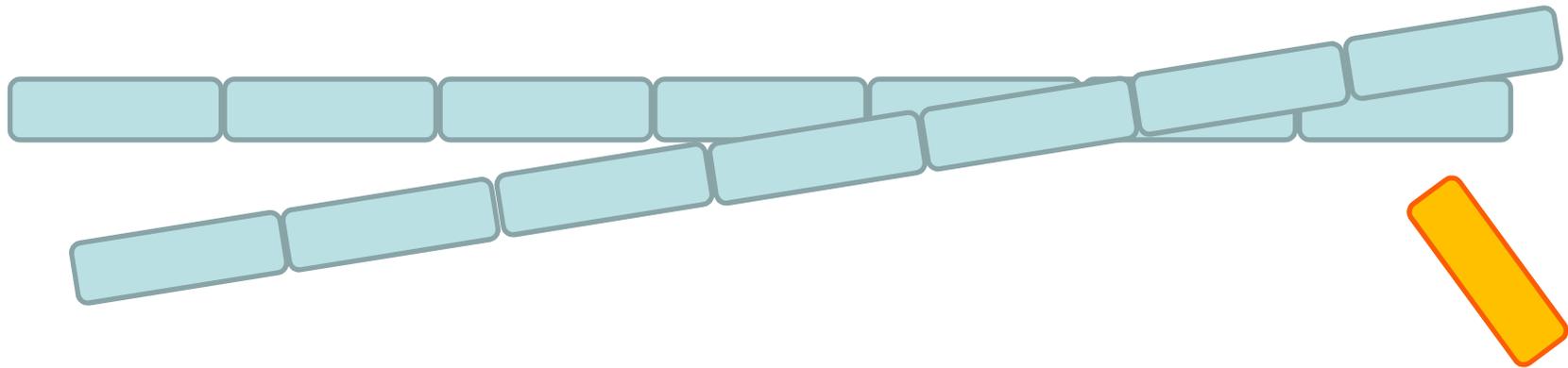


Figura 9.1 ▶ Celle elettroforetiche verticali (A) e orizzontali (B).

GEL DI POLIACRILAMIDE (PAA)

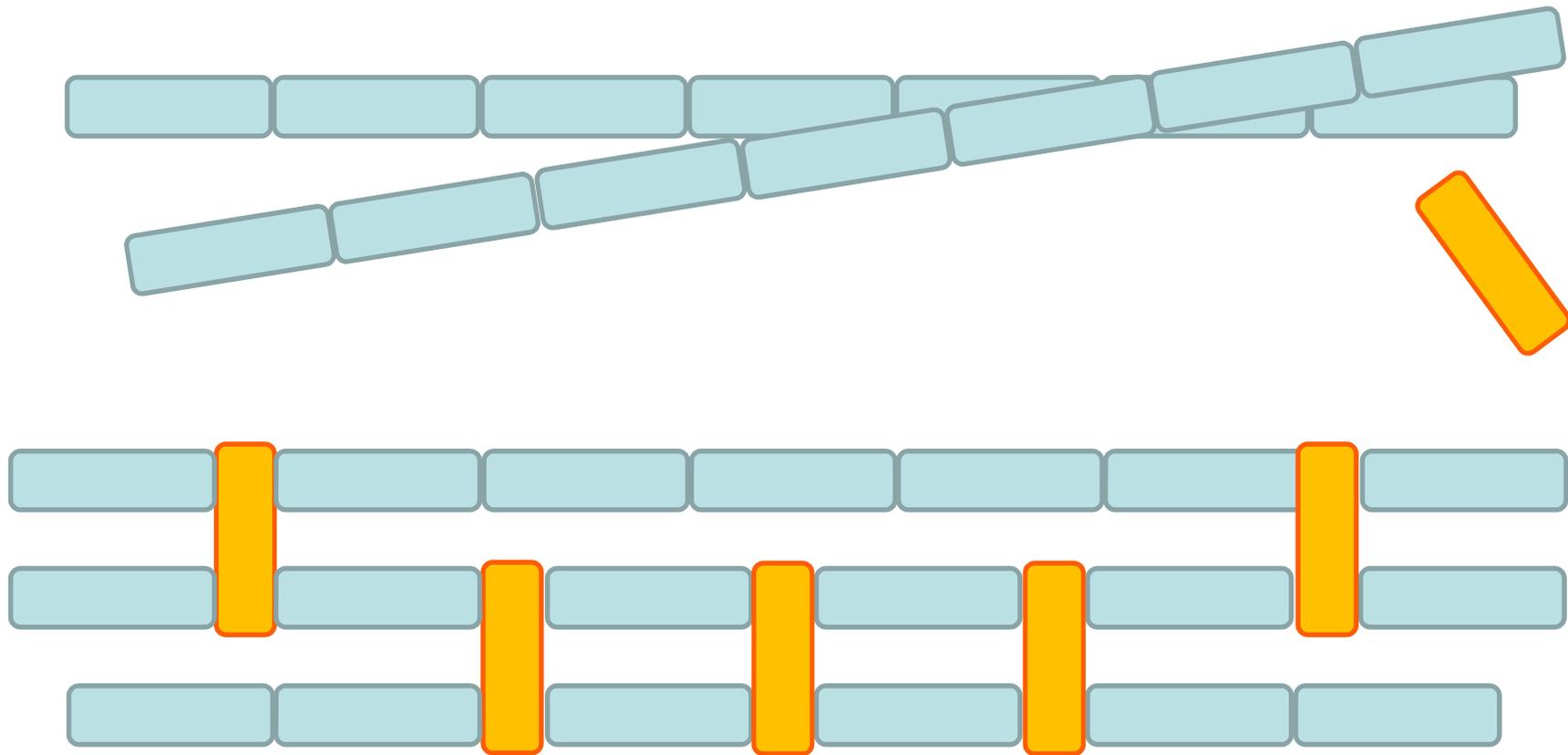
L'**acrilamide** è un **monomero** ($\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$) che viene fatto polimerizzare con un agente in grado di stabilire **legami crociati** in presenza di un **catalizzatore** e di un **iniziatore**.



Si formano **legami covalenti** tra i monomeri → **polimerizzazione**.

GEL DI POLIACRILAMIDE (PAA)

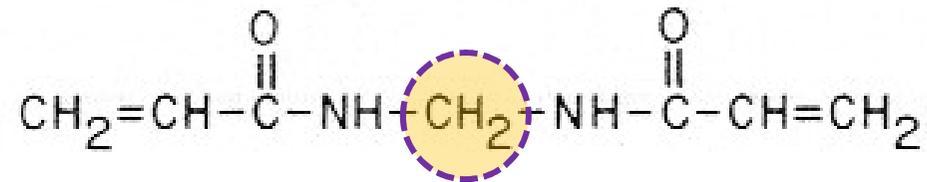
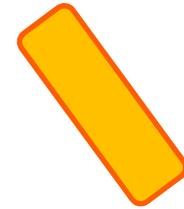
L'**acrilamide** è un **monomero** ($\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$) che viene fatto polimerizzare con un agente in grado di stabilire **legami crociati** in presenza di un **catalizzatore** e di un **iniziatore**.



Si formano **legami covalenti** tra i monomeri → **polimerizzazione**.

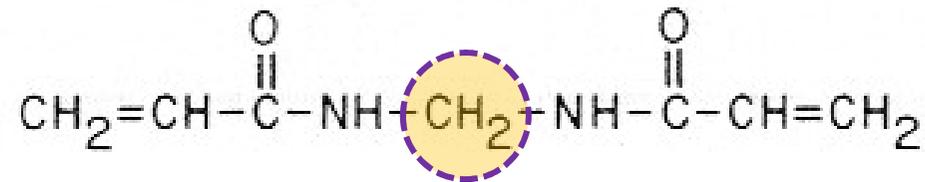
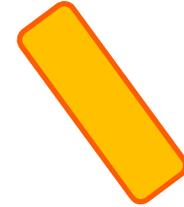
ELEMENTI INDISPENSABILI PER LA POLIMERIZZAZIONE

Agente cross-linker: N,N'-metilenbisacrilamide

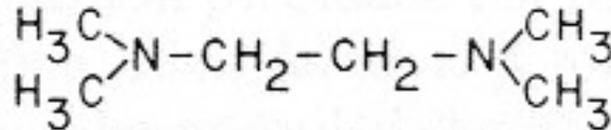


ELEMENTI INDISPENSABILI PER LA POLIMERIZZAZIONE

Agente cross-linker: N,N'-metilenbisacrilamide

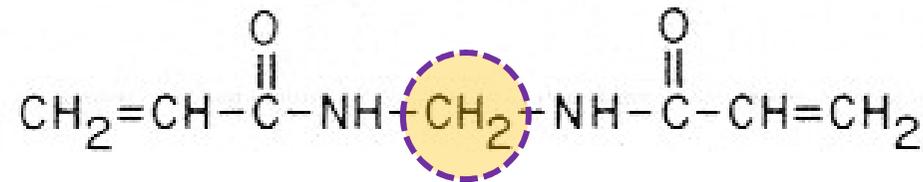
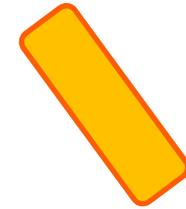


Catalizzatore: TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina)



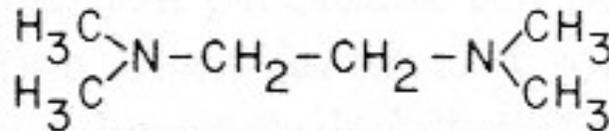
ELEMENTI INDISPENSABILI PER LA POLIMERIZZAZIONE

Agente cross-linker: N,N'-metilenbisacrilamide



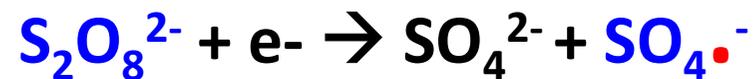
Catalizzatore: TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina)

Catalizza la decomposizione dello ione persolfato e formazione del radicale libero

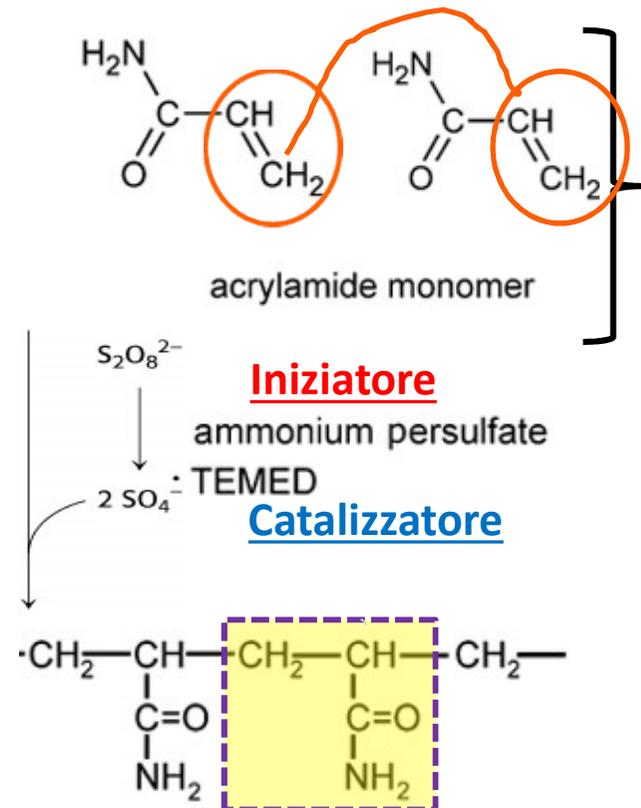


Iniziatore: ammonio persolfato (APS)

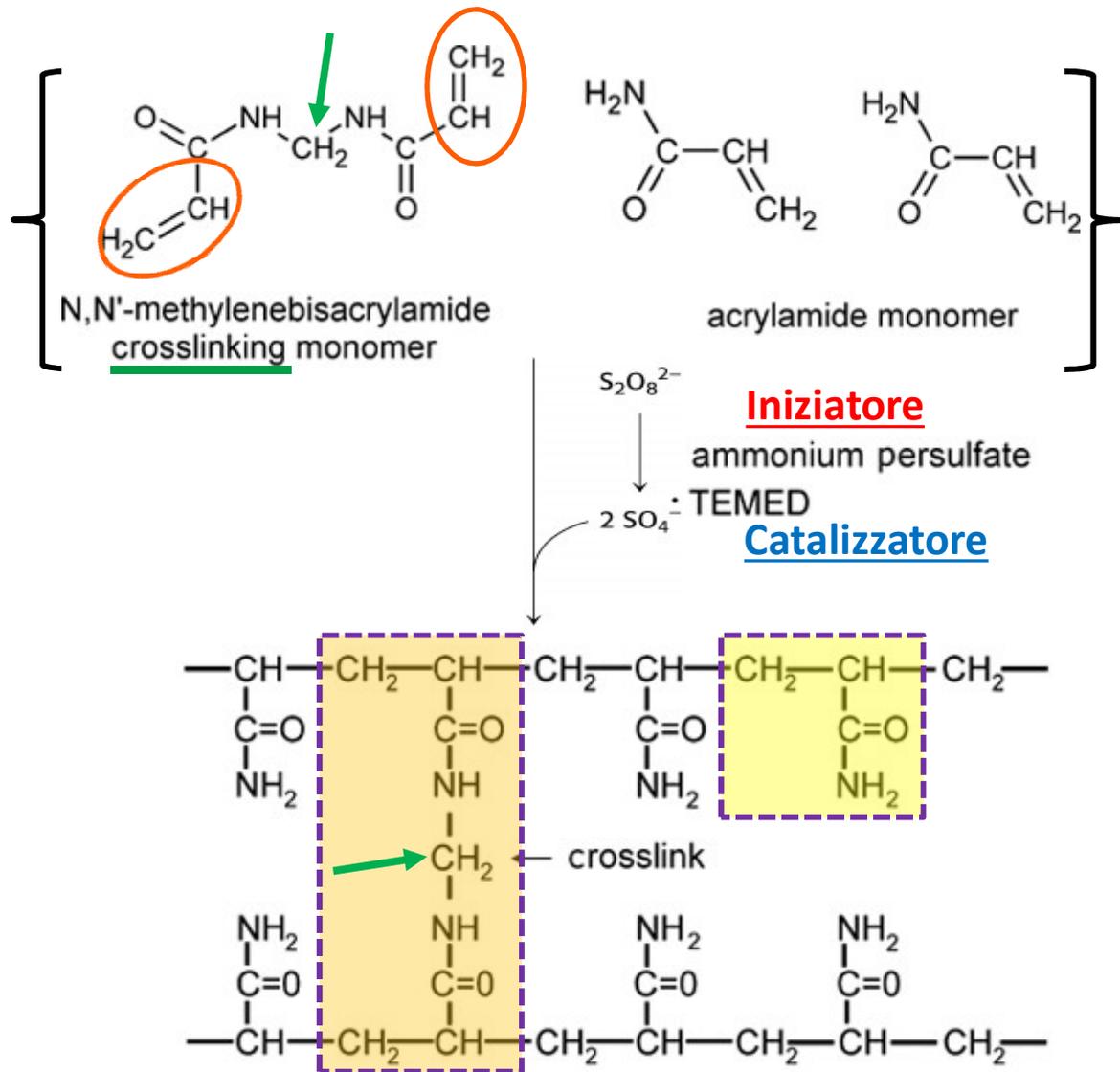
omolisa rapidamente a radicali liberi.



L'acrilamide genera un polimero

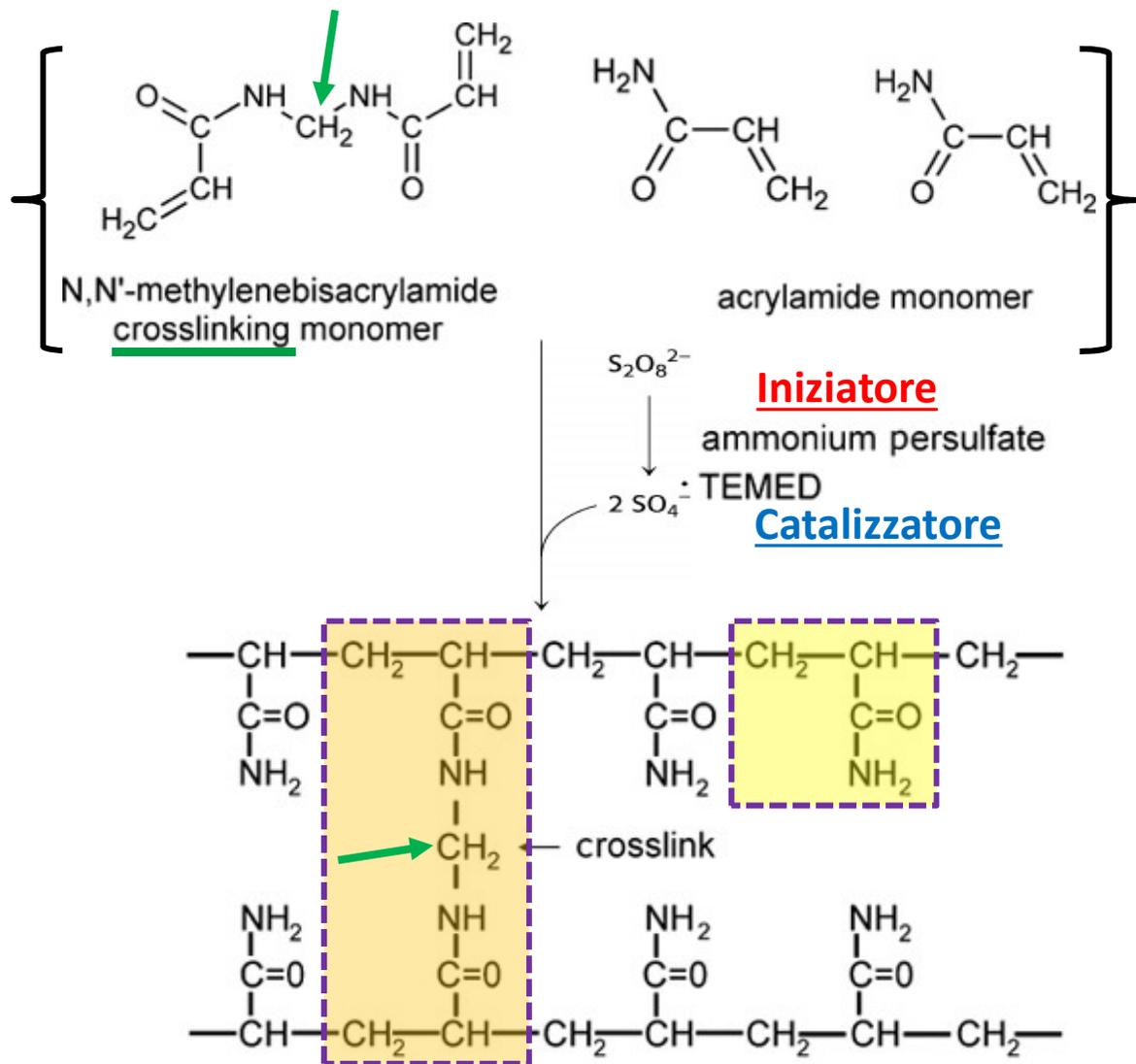


L'acrilamide genera un polimero poroso

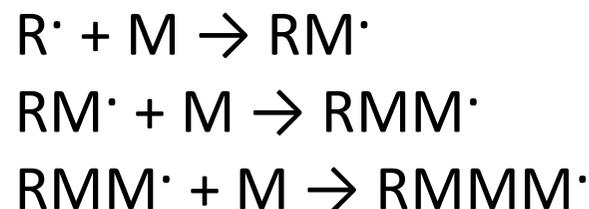


Indispensabile l'**agente cross-linker** per la formazione del reticolo tridimensionale

L'acrilamide genera un polimero poroso



Reazione a catena:
 i monomeri di acrilamide
 polimerizzano a formare
 lunghe catene.



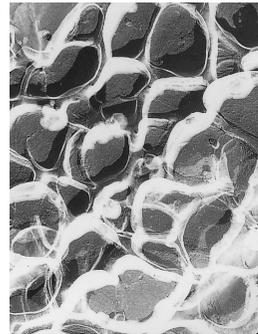
Indispensabile l'**agente cross-linker** per la
 formazione del reticolo tridimensionale

CARATTERISTICHE

Porosità del gel:

dipende dalle concentrazioni di acrilamide e di metilenbisacrilamide.

3 - 30% di acrilamide →



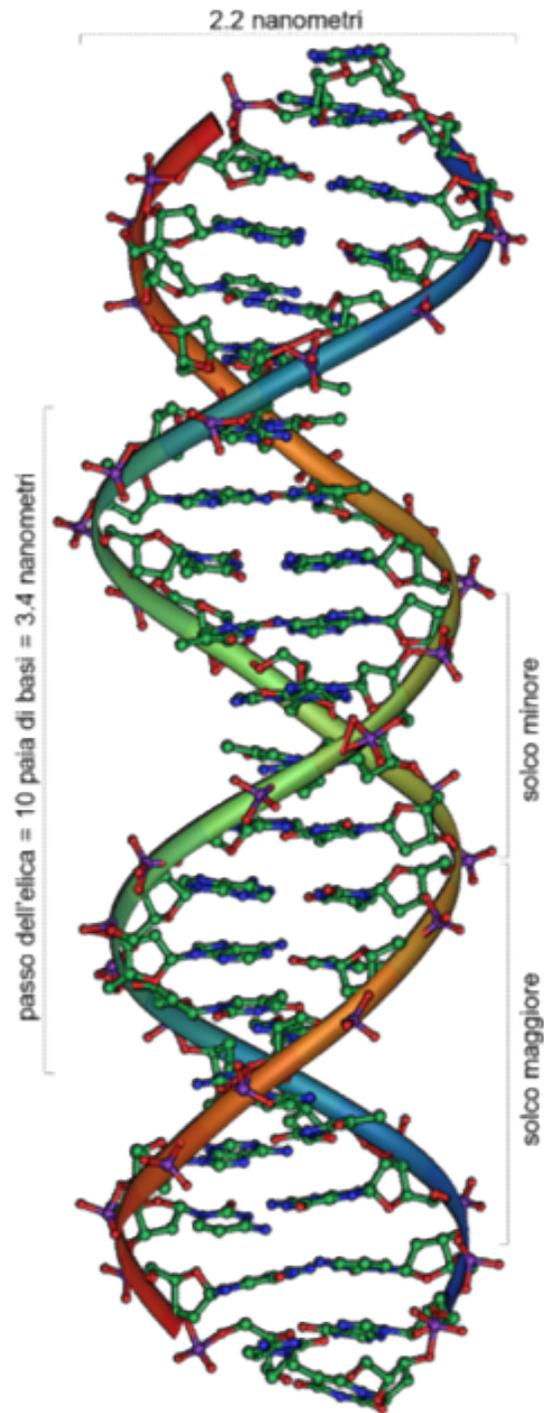
Diametro pori:

Da 0.5 a 2 nm

Gel di agarosio:

Da 50 a >200 nm

ddp applicabile (8 Volt/cm)

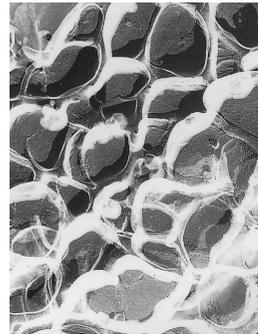


CARATTERISTICHE

Porosità del gel:

dipende dalle concentrazioni di acrilamide e di metilenbisacrilamide.

3 - 30% di acrilamide →



Diametro pori:
Da 0.5 a 2 nm

Gel di agarosio:
Da 50 a >200 nm

Tampone TBE:

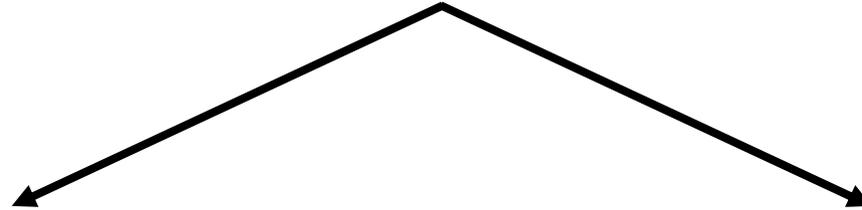
Tris, acido borico, EDTA.

> potere tamponante e > ddp applicabile (8 Volt/cm)

- Campione caricato assieme a **traccianti** (xilen-cianolo + **blu di bromofenolo**), per fornire indicatori di corsa, e **addensante** (glicerolo) per facilitare l'entrata nei pozzetti del campione.



La natura dei legami chimici che permettono la formazione dei gel.



Agorosio



Ponti **H** tra
i **polimeri**

Poliacrilamide



Legami **covalenti** tra
i **monomeri** a
formare il polimero

VANTAGGI

- **Maggiore efficienza** nel separare **piccoli frammenti di DNA**
- **Elevato potere risolutivo**
- Possibilità di analizzare maggiori quantità di DNA senza perdite significative di risoluzione,
- Possibilità di ottenere DNA estremamente puro.



SVANTAGGI

- Neurotossicità dell'acrilamide, che può essere assorbita dalla pelle (ma non come gel)
- Preparazione più lunga e laboriosa del gel di agarosio.

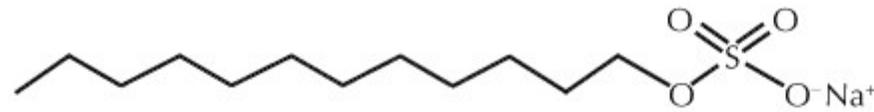


Figura 9.9 ► Formula di struttura dell' SDS.



Stoppini, Bellotti
Biochimica applicata
EdiSES

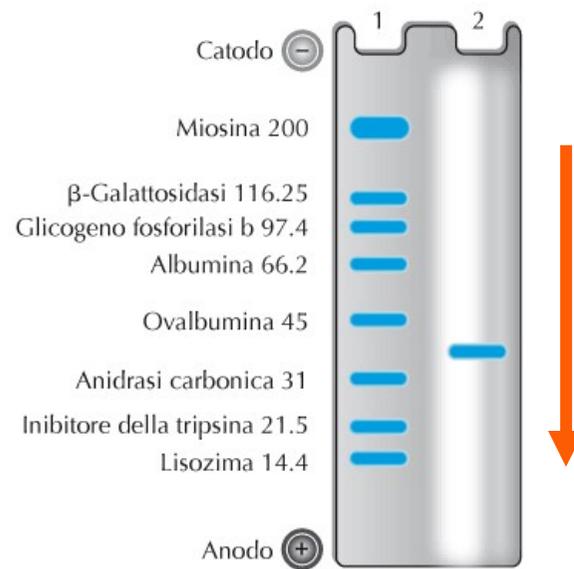


Figura 9.12 Separazione elettroforetica in SDS-PAGE discontinua di una miscela di proteine standard (linea 1) e di una proteina di cui si vuole determinare il PM (linea 2). Il PM delle proteine standard, riportato a lato del gel, è espresso in kDa.

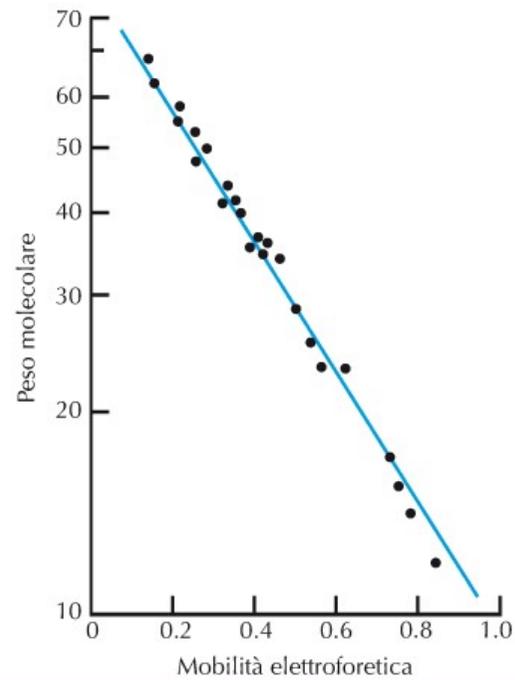
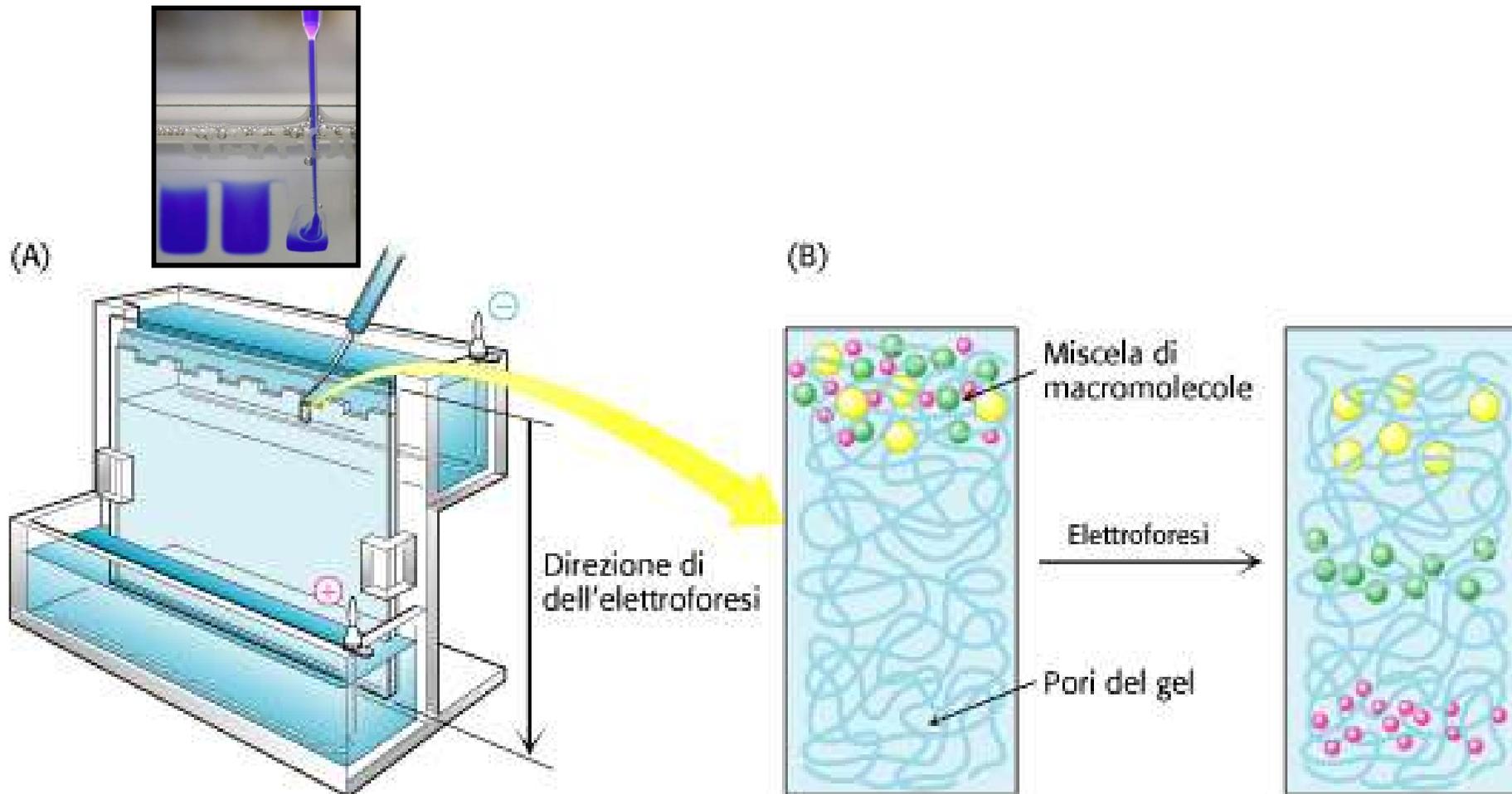


Figura 9.13 ► Grafico che illustra la relazione lineare tra la mobilità elettroforetica delle proteine e il log del loro PM.

DIFFERENZE PRATICHE (rispetto al gel di agarosio)

- Corse elettroforetiche in **verticale**.



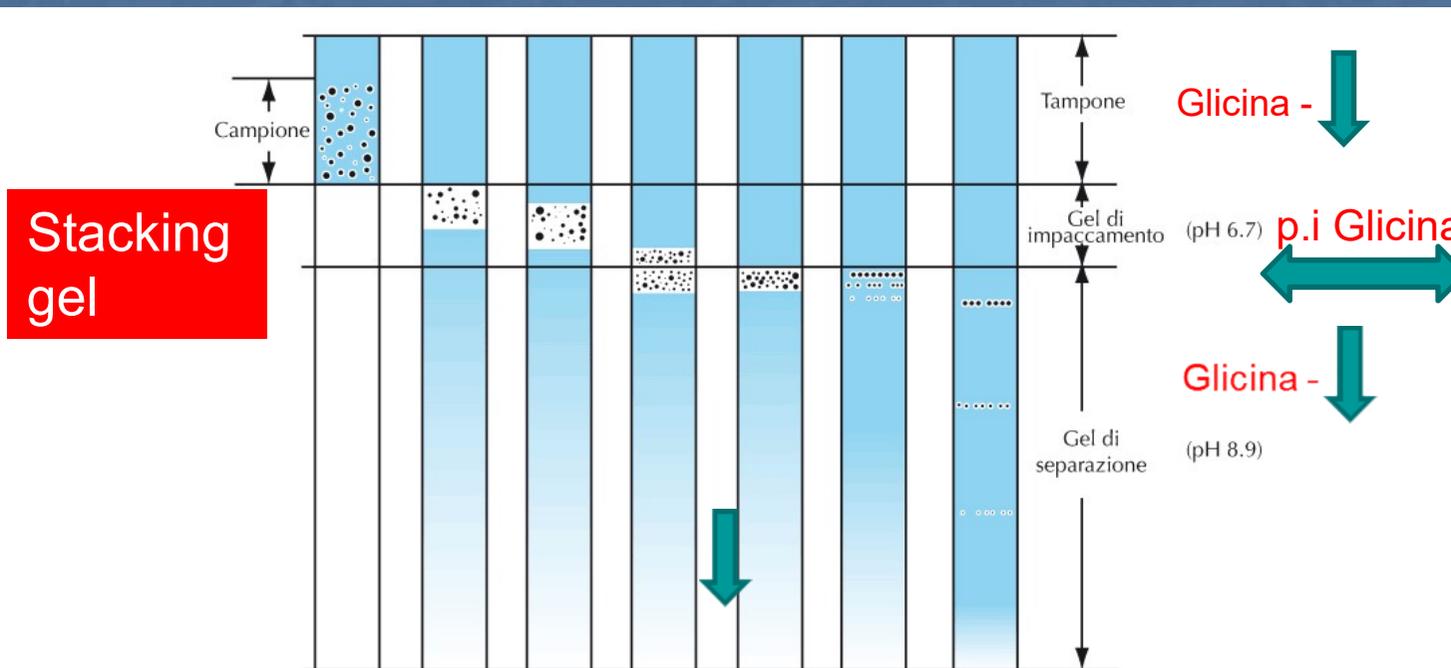


Figura 9.11 Schema di una elettroforesi con buffer discontinui. I tamponi utilizzati in questo tipo di elettroforesi hanno una diversa composizione: il tampone che si trova in corrispondenza dell'elettrodo dove viene caricato il campione contiene glicina (colore di fondo più scuro), mentre i gel di impaccamento e di separazione contengono ioni Cl^- (colore di fondo più chiaro). Quando viene applicato il voltaggio gli ioni cloro migrano molto velocemente verso l'anodo, mentre la glicina, entrando all'interno del gel di impaccamento, si viene a trovare ad un valore di pH pari al suo punto isoelettrico e quindi si muove molto lentamente. In queste condizioni, tra la glicina e gli ioni cloro si forma una zona priva di ioni in cui si posizionano le molecole proteiche che si concentrano in una banda sottile. In corrispondenza del gel di separazione la glicina assume carica negativa e quindi si muove più velocemente e supera il campione proteico. A questo punto le proteine si muoveranno in funzione delle loro dimensioni.

DIFFERENZE PRATICHE (rispetto al gel di agarosio)

- Corse elettroforetiche in **verticale**.
- L'aria (bolle nel gel) non solo ostacola il passaggio della corrente, **impedisce** anche la **polimerizzazione**.
- Necessario un **lavaggio** dei pozzetti per eliminare residui di acrilamide
- **Spessore** del gel.
- Tampone **TBE** (Tris-acido borico-EDTA)
- Utilizzo del bromuro di etidio **successivo** alla elettroforesi.
Possibile perché il gel è di **0.8/1 mm**, contro **1 cm** per il gel di agarosio.

VISUALIZZAZIONE DEL DNA SIA SU AGAROSO, SIA SU PAA

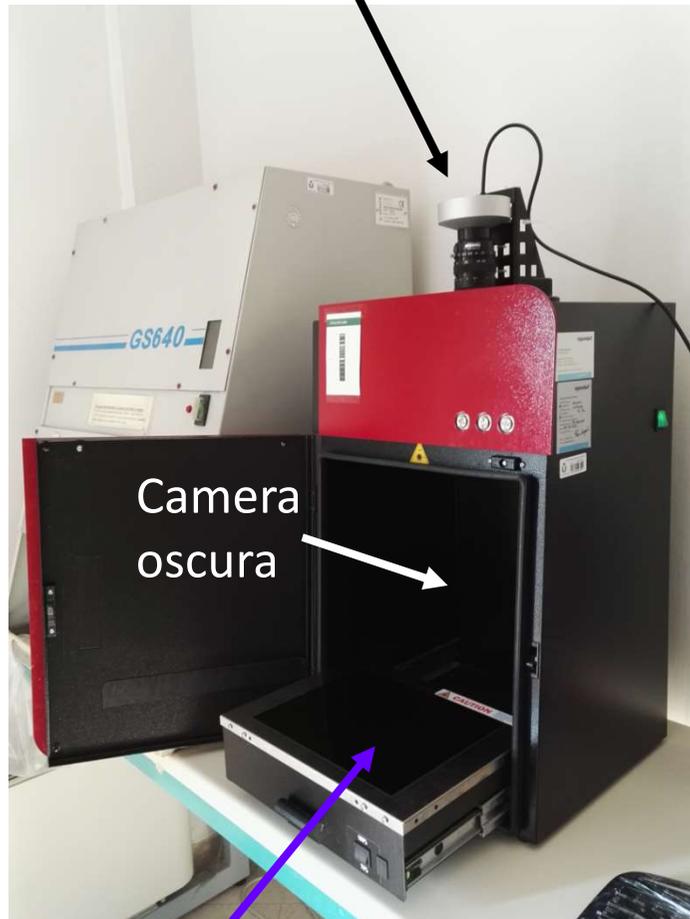
TRANSILLUMINATORE CLASSICO



Schermo
trasparente
agli UV

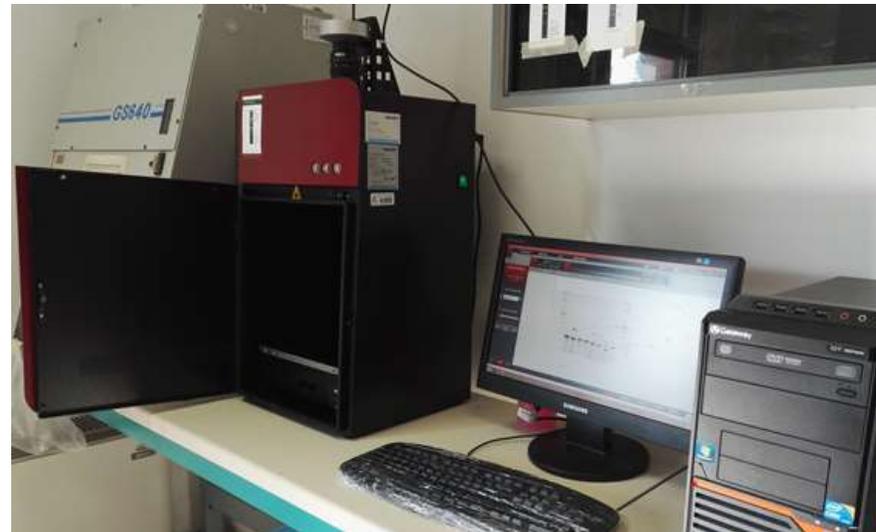
VISUALIZZAZIONE DEL DNA

Fotocamera



Sorgente U.V.

TRANSILLUMINATORI MODERNI



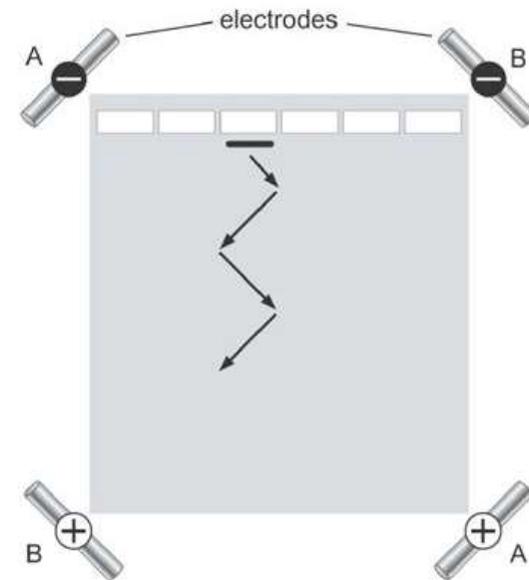
Provvisto di sistema per la rilevazione
e **fotografia** delle bande.

ELETTROFORESI A INTERMITTENZA DI CAMPO (PFGE, Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

Separa DNA anche di **2.000.000 bp** (cromosomi!). Gli altri metodi max ~50.000 bp.
Consente di superare la "mobilità limitante" dei frammenti molto grandi

Su **agaroso**, con 2 campi elettrici, applicati con angoli diversi ed alternativamente.

Campo elettrico (**field**) periodicamente cambiato (**pulsed**) in direzione e forza



ELETTROFORESI A INTERMITTENZA DI CAMPO (PFGE, Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

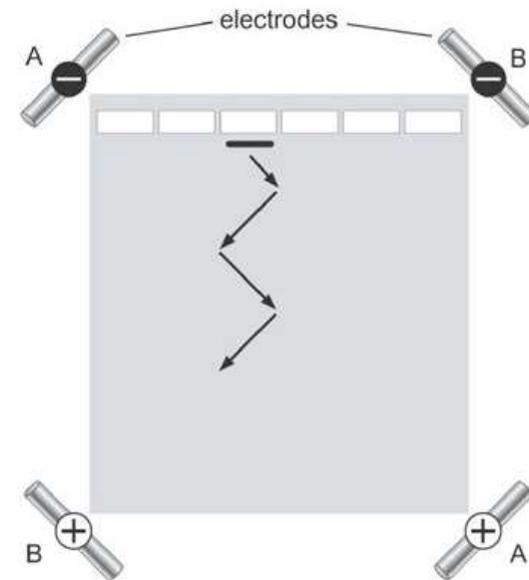
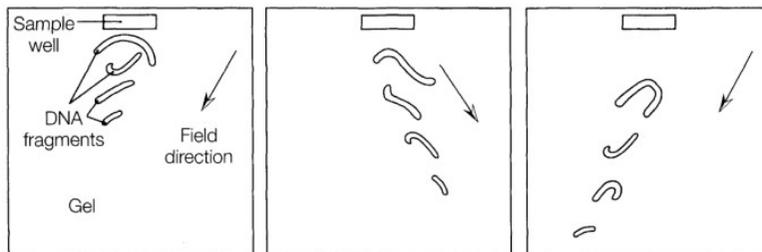
Separa DNA anche di **2.000.000 bp** (cromosomi!). Gli altri metodi max ~50.000 bp.
Consente di superare la "mobilità limitante" dei frammenti molto grandi

Su **agaroso**, con 2 campi elettrici, applicati con angoli diversi ed alternativamente.

Campo elettrico (**field**) periodicamente cambiato (**pulsed**) in direzione e forza



Cambio di **conformazione** del DNA,
"forzato" a passare attraverso i pori del gel



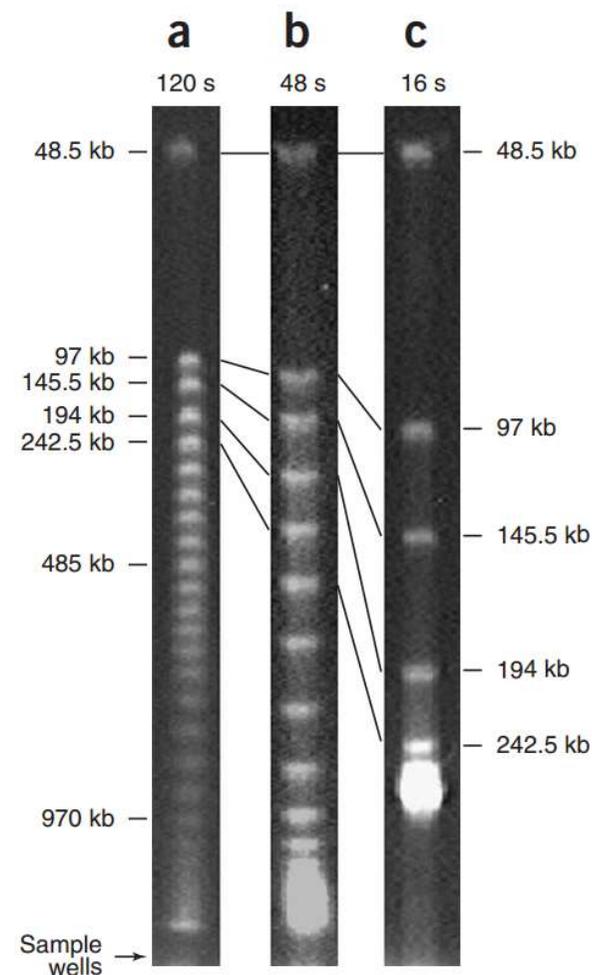
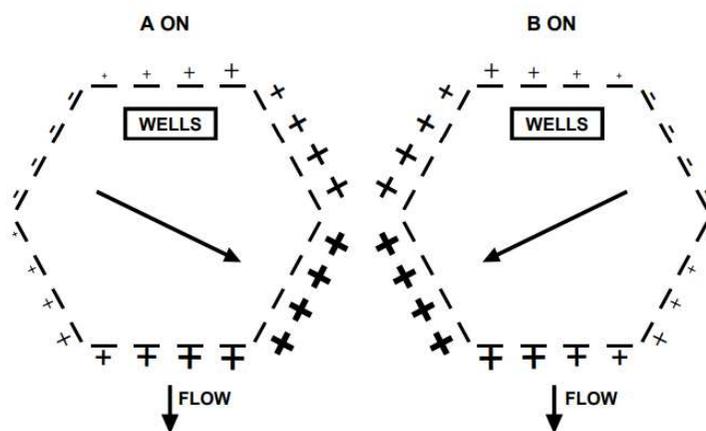
- Diversa risposta dei campioni ai campi elettrici e in tempi diversi:
DNA più piccoli si **riallineano** prima al nuovo campo e migrano + velocemente
- DNA più grandi possono anche risultare immobili.

Es.: Comunemente usato agarosio 1% per molecole di DNA di 2 Mb (cromosoma di lievito)

ELETTROFORESI A INTERMITTENZA DI CAMPO (PFGE, Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

Direction of **electrical field** is **periodically altered**, requiring electrophoresing molecules to assume **new orientations** for productive motion through the gel matrix. Roughly, the amount of **time required** for completion of **orientation** process **scales with DNA size**, and temporally, **maximum** electrophoretic **mobility** is achieved only **when molecules are fully orientated** with a given direction of applied field. Accordingly, the net electrophoretic mobility strongly correlates, in a **size-dependent way**, with the frequency of the applied electrical fields.

(Ref: Herschleb J et al. Pulsed-field gel electrophoresis. Nat Protoc. 2007;2(3):677-84.

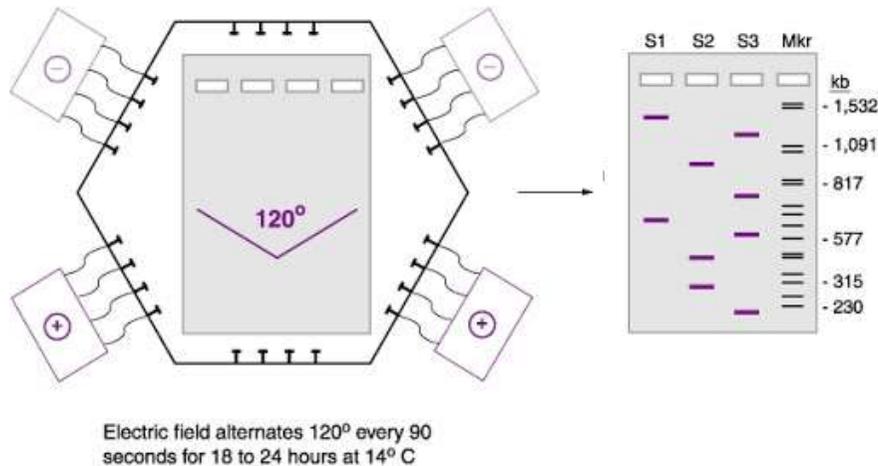


Applicazioni: analisi a livello di genomi, molto usato per fingerprinting di organismi patogeni (es. analisi di pazienti affetti, cibo contaminato, ecc.)

Info in più: PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>)

ELETTROFORESI A INTERMITTENZA DI CAMPO (PFGE, Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

Direction of **electrical field** is **periodically altered**, requiring electrophoresing molecules to assume **new orientations** for productive motion through the gel matrix. Roughly, the amount of



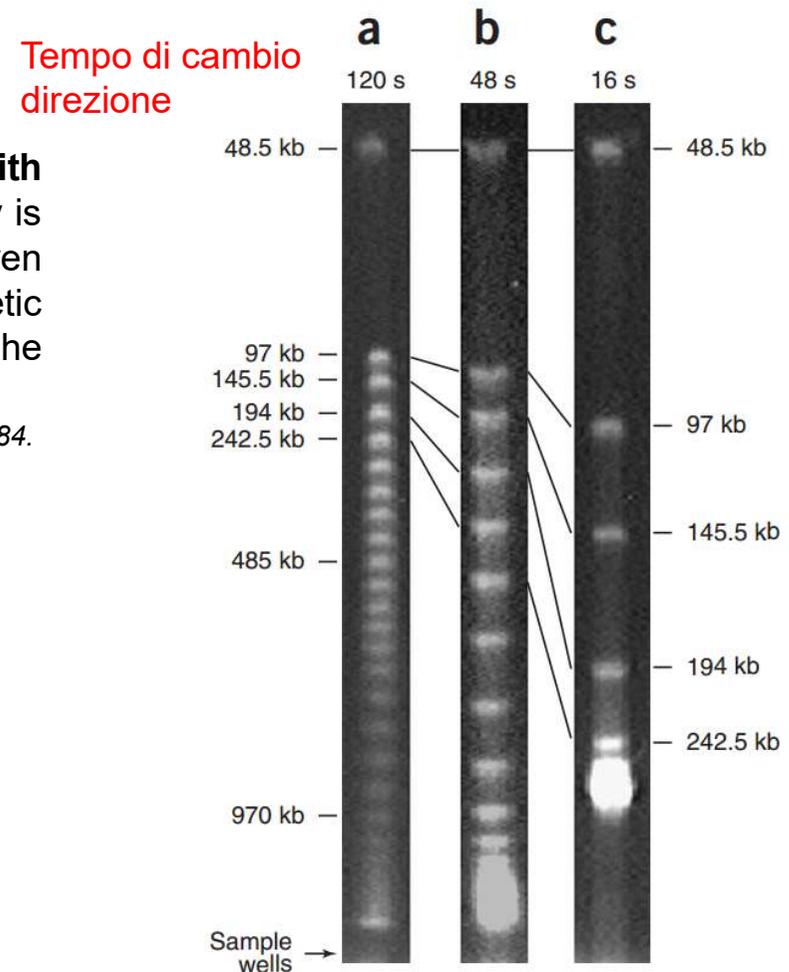
Applicazioni: analisi a livello di genomi, molto usato per fingerprinting di organismi patogeni (es. analisi di pazienti affetti, cibo contaminato, ecc.)

Info in più: PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>)

ELETTROFORESI A INTERMITTENZA DI CAMPO (PFGE, Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

time required for completion of orientation process scales with DNA size, and temporally, **maximum electrophoretic mobility** is achieved only **when molecules are fully orientated** with a given direction of applied field. Accordingly, the net electrophoretic mobility strongly correlates, in a **size-dependent way**, with the frequency of the applied electrical fields.

(Ref: *Herschleb J et al. Pulsed-field gel electrophoresis. Nat Protoc. 2007;2(3):677-84.*)



ELETTROFORESI A INTERMITTENZA DI CAMPO (PFGE, Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

Condizioni sperimentali standard PFGE:

DNA < 1 Mb:

Switch time:	Up to 2 min
Voltage:	6 V cm ⁻¹
Reorientation angle:	120°
Running time:	Up to 3 days

DNA > 1 Mb:

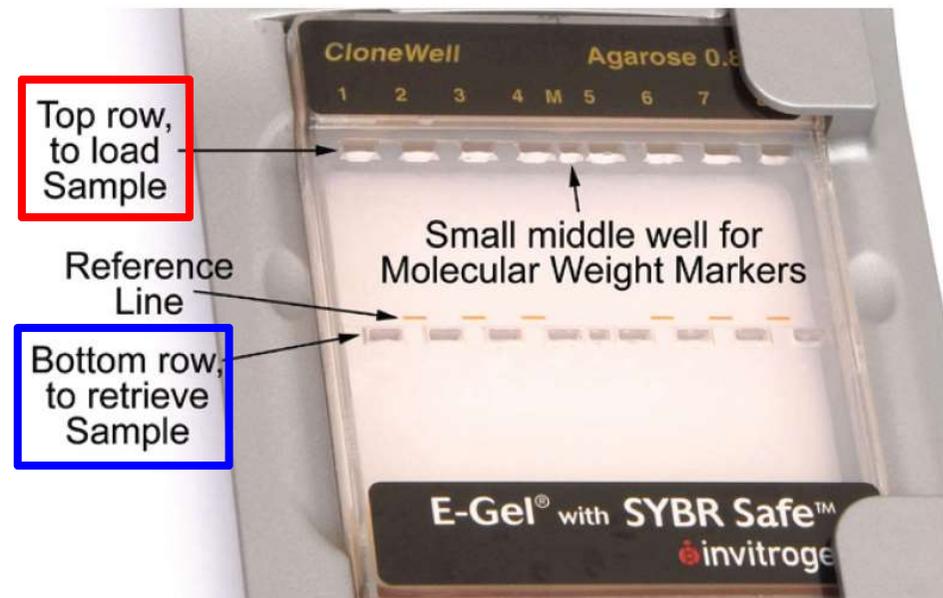
Switch time:	From 2 min up to 1 h
Voltage:	3 V cm ⁻¹
Reorientation angle:	120° (for close to 1 Mb) and 106° (for > 2 Mb)
Running time:	Up to 5 days



E-gel CloneWell

Sistema elettroforetico per acidi nucleici che consente il recupero dei campioni SENZA excisione e purificazione da gel

- Due file di pozzetti
 - ↳ SOPRA: caricamento
 - ↳ SOTTO: recupero campione



E-gel CloneWell

Sistema elettroforetico per acidi nucleici che consente il recupero dei campioni SENZA excisione e purificazione da gel

-Due file di pozzetti ↙ **SOPRA: caricamento**
↘ **SOTTO: recupero campione**

-**NON** utilizza bromuro di etidio per visualizzare il DNA

Tempi di esecuzione:

Band Size	Run Time to Reference Line	From Ref. Line to Collection Well
200 bp	14–18 minutes	1–2 minutes
400 bp	15–19 minutes	1–2 minutes
800 bp	17–21 minutes	1–2 minutes
1000 bp	19–23 minutes	1–2 minutes
2000 bp	21–25 minutes	1.5–2.5 minutes
3000 bp	24–28 minutes	1.5–2.5 minutes
4000 bp	28–32 minutes	2–3 minutes
6000 bp	32–36 minutes	2–3 minutes

