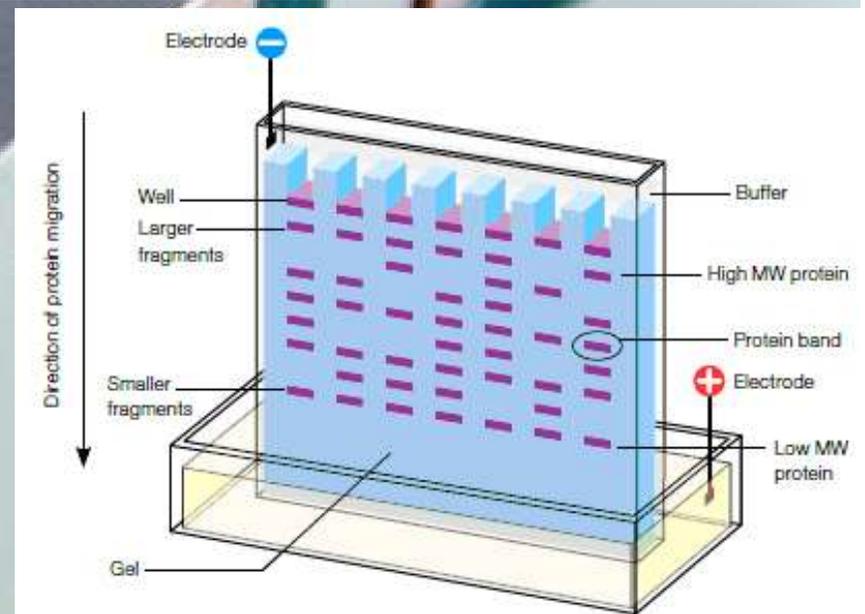


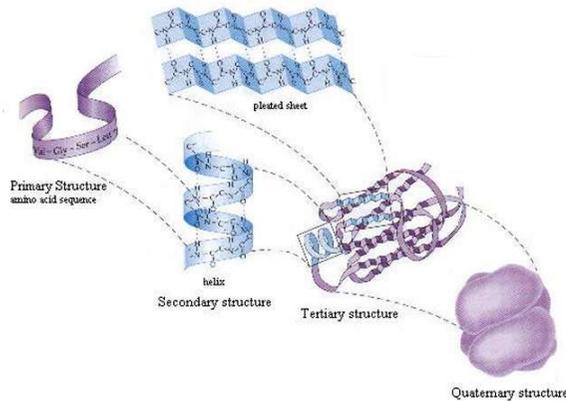
Elettroforesi di proteine



ELETTROFORESI DI PROTEINE

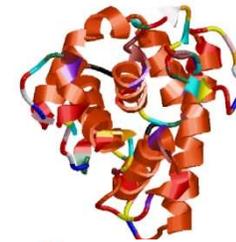
Molto più complessa della separazione elettroforetica di DNA.

Fortissime variazioni { forma delle proteine
cariche delle proteine

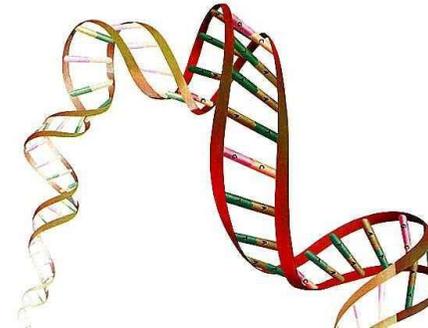


La > parte dei campioni di **PROTEINE**

è più piccola di un campione di **DNA** perciò i gel di PAA risultano i migliori sistemi di separazione (pori di dimensioni < rispetto ai gel di agaroso).

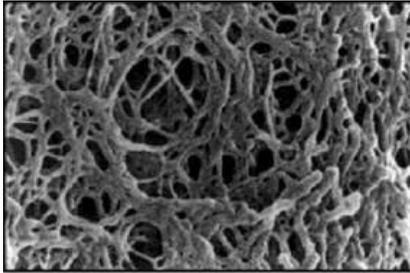


Aa medio:
110 Da

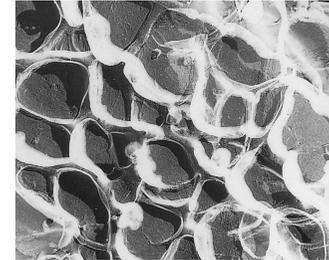


Paio di
nucleotidi
medio:
650 Da

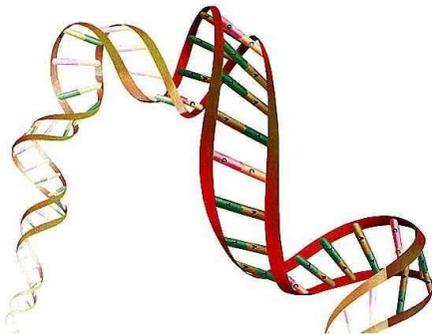
AGOROSO vs POLIACRILAMIDE



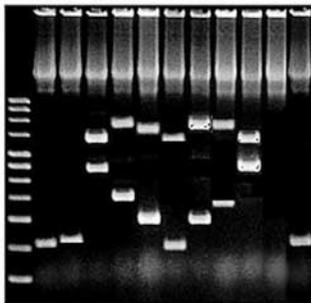
Diametro pori:
Da 50 a >200 nm



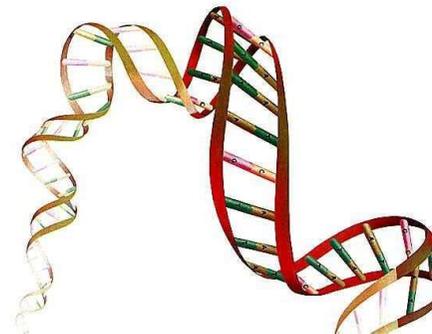
Diametro pori:
Da 0.5 a 2 nm



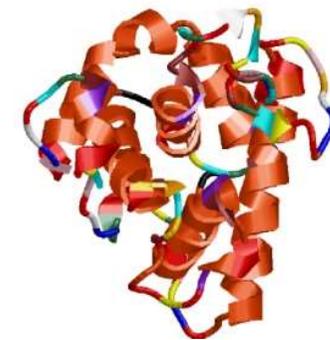
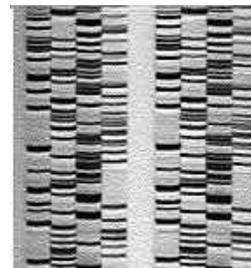
es. PCR



Paio di
nucleotidi
medio:
650 Da



es. seq DNA



Aa medio:
110 Da

DENATURAZIONE

Denaturazione

Calore

Detergenti ionici

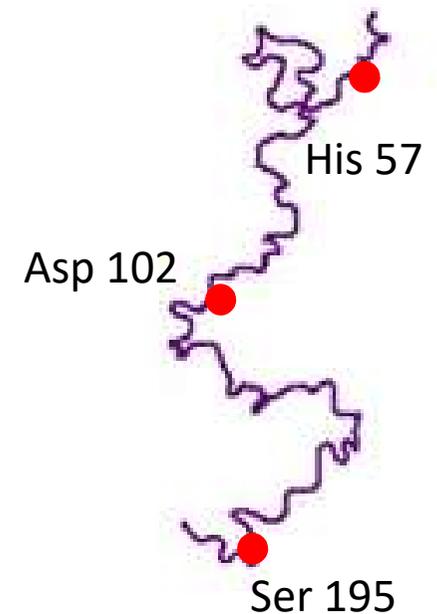
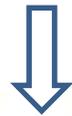
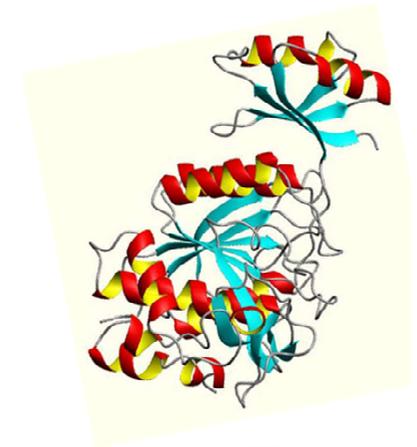
Agenti riducenti

Congelamento

Alte [] saline

Processo che porta a:

- perdita di funzione di una proteina,
- riduzione della sua solubilità,
- > suscettibilità alla degradazione proteolitica.



SDS-PAGE - Effetto della Temperatura

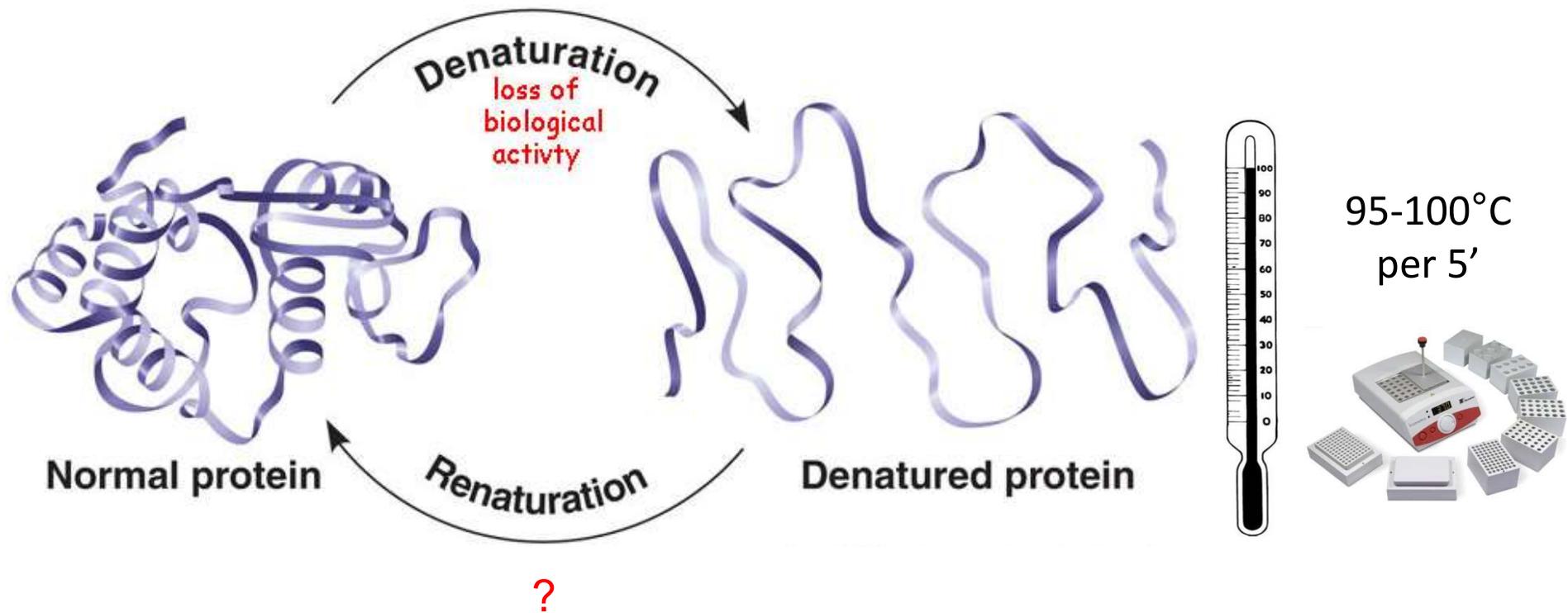
SDS-PAGE = Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

- **Temperatura (5' a 95-100°C)**
 - accelera la denaturazione completa
- **SDS** Detergente anionico che denatura le proteine conferendovi la stessa densità di carica (negativa).
- **β-Mercaptoetanololo** $\text{HS-CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
 - Rompe eventuali legami disolfuro, riducendoli.

SDS-PAGE - Effetto della Temperatura

SDS-PAGE = Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

- **Temperatura (5' a 95-100°C)**
 - accelera la denaturazione completa



SDS-PAGE - Effetto dell'SDS

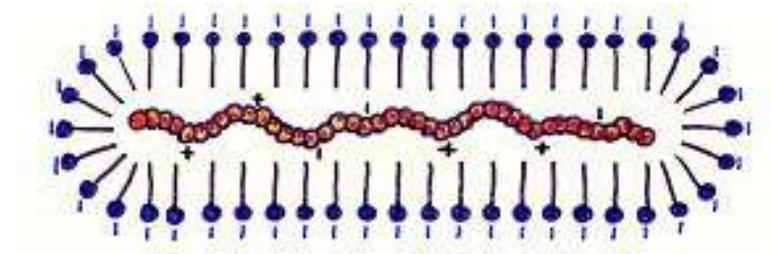
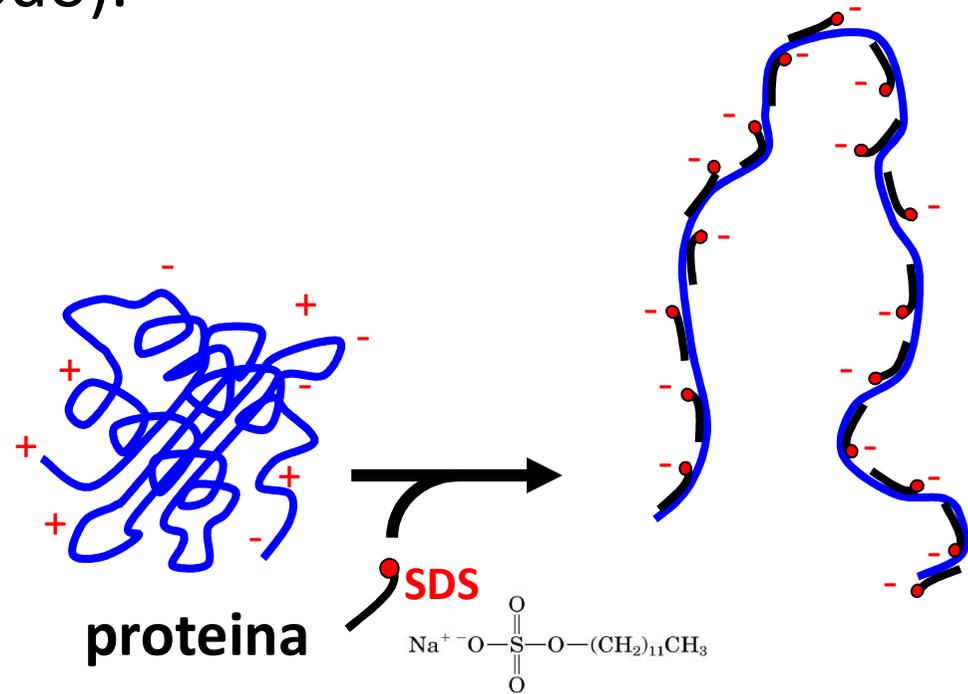
- I complessi **proteina-SDS** sono altamente carichi e **tutti negativi** (migrano verso l'anodo).

- Separano solo in base alla **dimensione** (n° aa, porzioni glicoproteiche).

- L'SDS solubilizza quasi tutte le proteine (anche idrofobiche).

- Le proteine hanno tutte lo **stesso rapporto carica/massa**

- Permanenza della **struttura filamentosa** per repulsione.

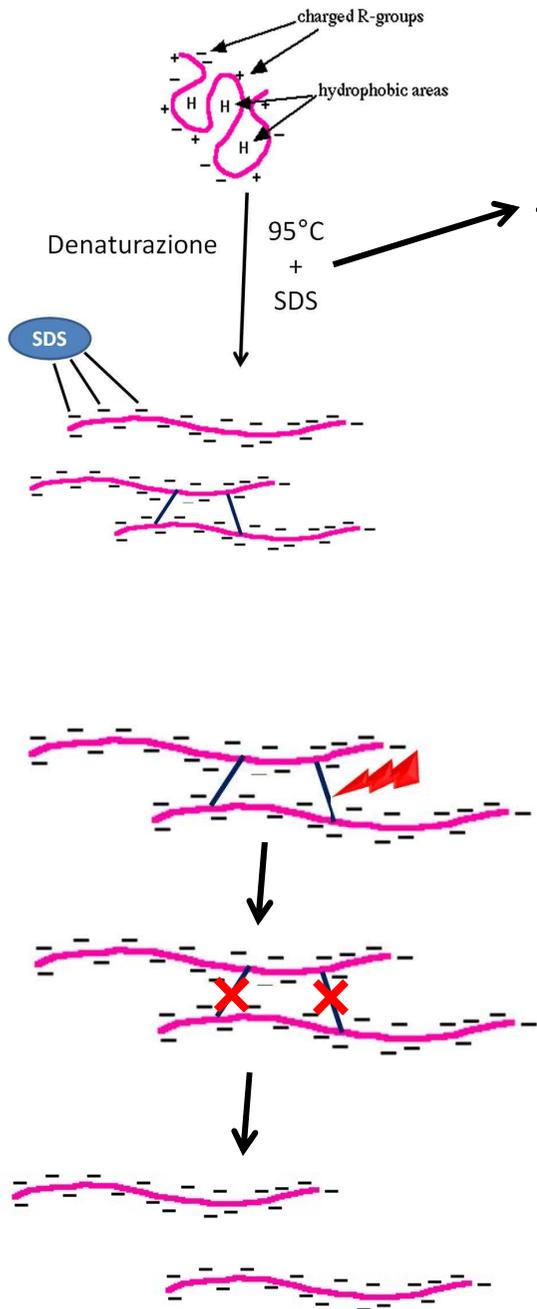


ELETTROFORESI DI PROTEINE - SDS-PAGE

SDS-PAGE = Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

- Temperatura (5' a 95-100°C)
 - accelera la denaturazione completa
- SDS Detergente anionico che denatura le proteine conferendovi la stessa densità di carica (negativa).
- **β -Mercaptoetanolo** **HS-CH₂CH₂OH**
 - Rompe eventuali legami disolfuro, riducendoli.

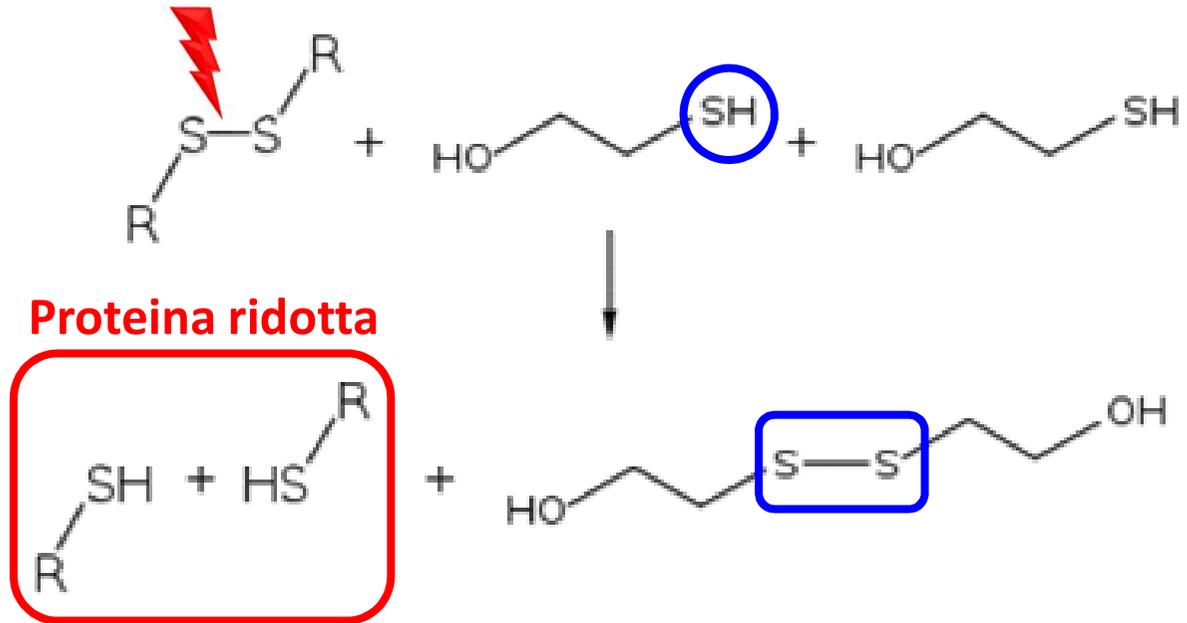
SDS-PAGE - Effetto del β -Mercaptoetanololo



+ agente riducente (es β -mercaptoetanololo)

Proteina con ponte disolfuro

Agente riducente



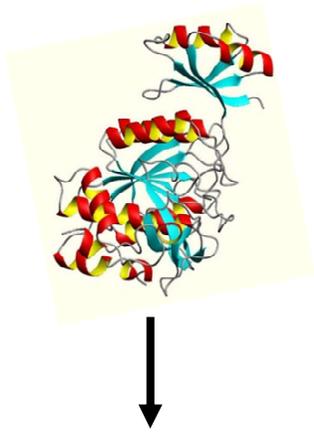
ELETTROFORESI DI PROTEINE - SDS-PAGE

SDS-PAGE = Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

- **Temperatura (5' a 95-100°C)**
 - accelera la denaturazione completa
- **SDS** Detergente anionico che denatura le proteine conferendovi la stessa densità di carica (negativa).
- **β -Mercaptoetanololo** **HS-CH₂CH₂OH**
 - Rompe eventuali legami disolfuro, riducendoli.

Proteine così trattate assumono struttura **filamentosa**

IL TAMPONE PER LA PREPARAZIONE DEL CAMPIONE



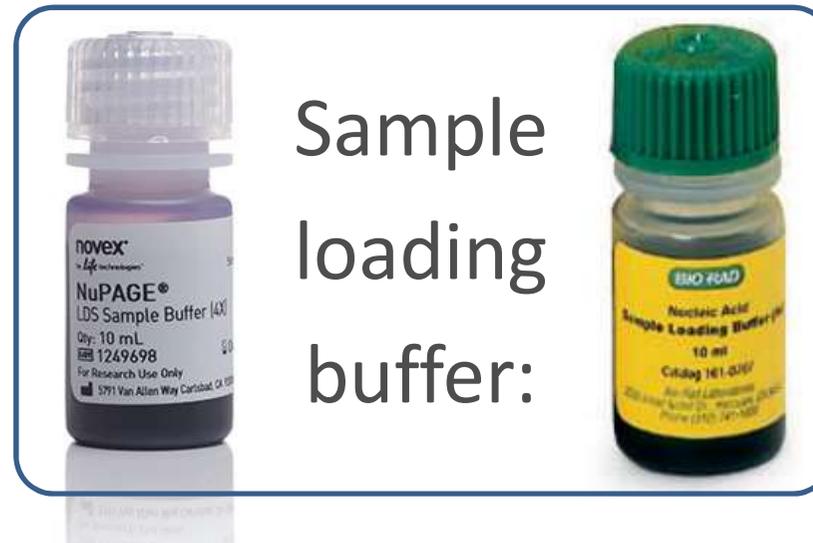
Tris-HCl a pH 6.8

SDS

addensante

riducente

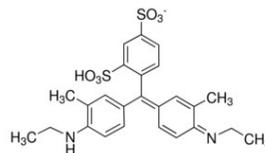
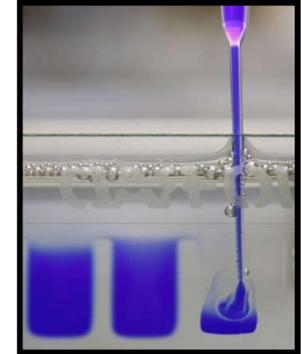
traccianti



[Saccarosio o glicerolo]

[β -mercaptoetanol]

[Xilene Cianolo-Blu di Bromofenolo]

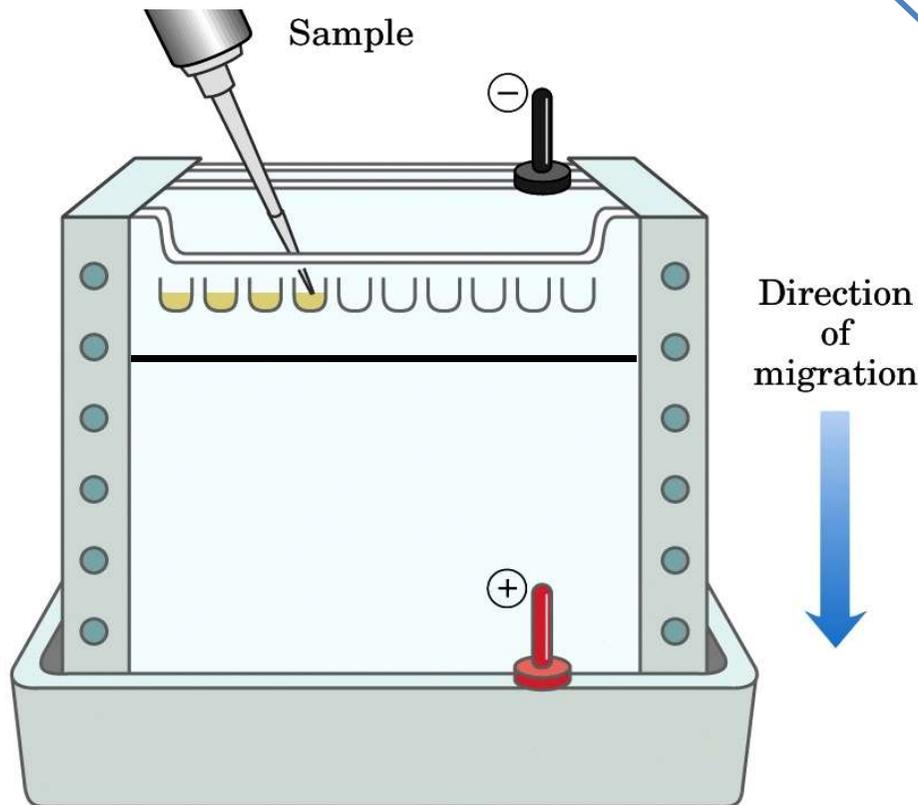


SDS-PAGE IN PRATICA

Le proteine **non** entrano subito nel gel per la corsa

(l' SDS-PAGE è definita anche **elettroforesi discontinua**)

2 gel di PAA sovrapposti



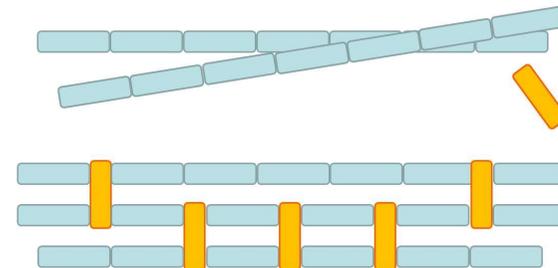
gel di impaccamento
("stacking" gel)

(concentrazione delle proteine)

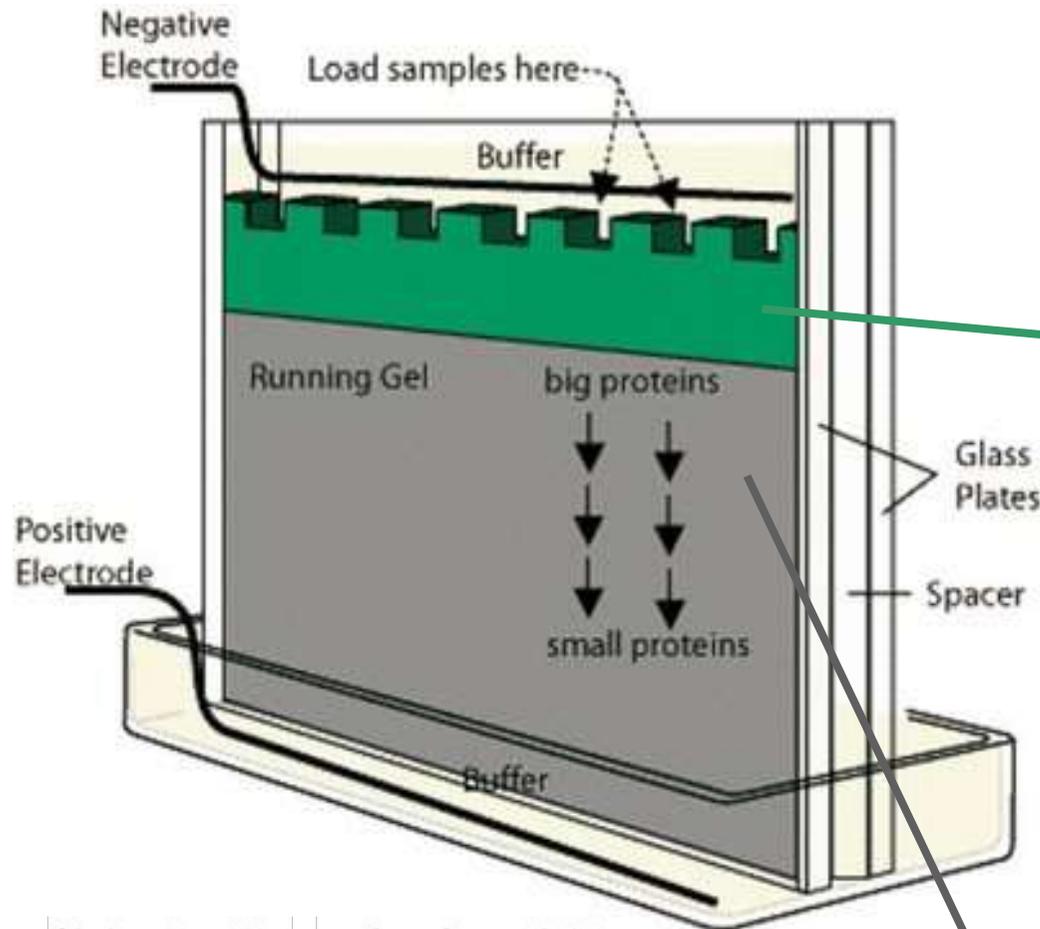
gel per la corsa

("running" o "resolving" gel)

(separazione delle proteine in base al loro PM)



I DUE GEL



Gel di impaccamento

- PAA **4%**
- SDS 10%
- Tris-HCl 1.0 M pH **6.8**

% Acrylamide | molecular weight

5%	36-200
7.5%	24-200
10%	14-200
12.5%	14-100
15%	14-60

Gel per la corsa

- PAA **12%**
- SDS 10%
- Tris-HCl 1.5 M pH **8.8**

TAMPONI IN USO

Tampone di corsa:

Tris-HCl **pH 8.3** 25 mM
SDS 3.5 mM
Glicina 190 mM

Tampone del campione:

Tris-HCl **pH 6.8**
SDS
Addensante
Riducente
Traccianti

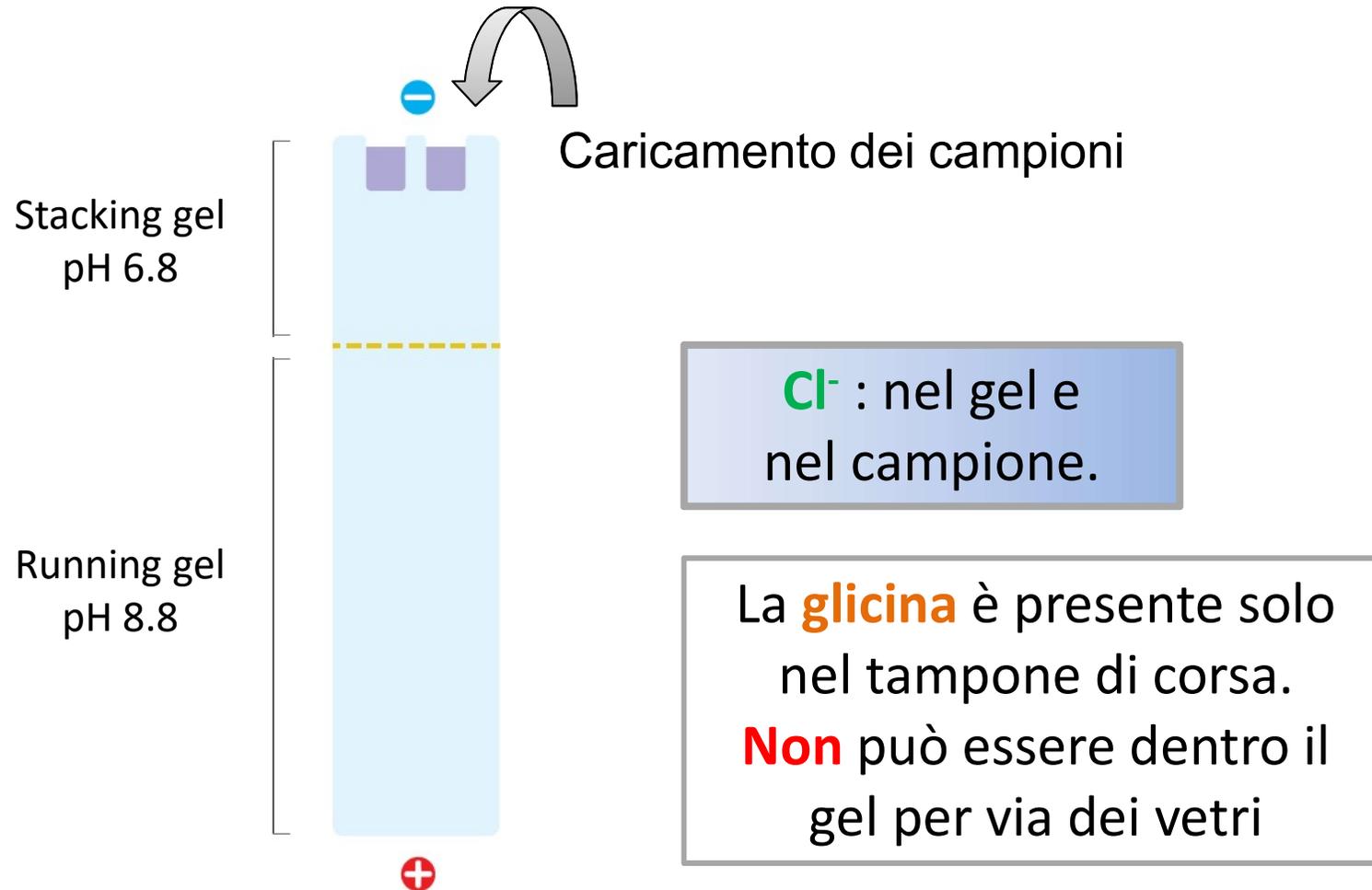
Gel per la corsa

- PAA **12%**
- SDS 10%
- Tris-HCl 1.5 M **pH 8.8**

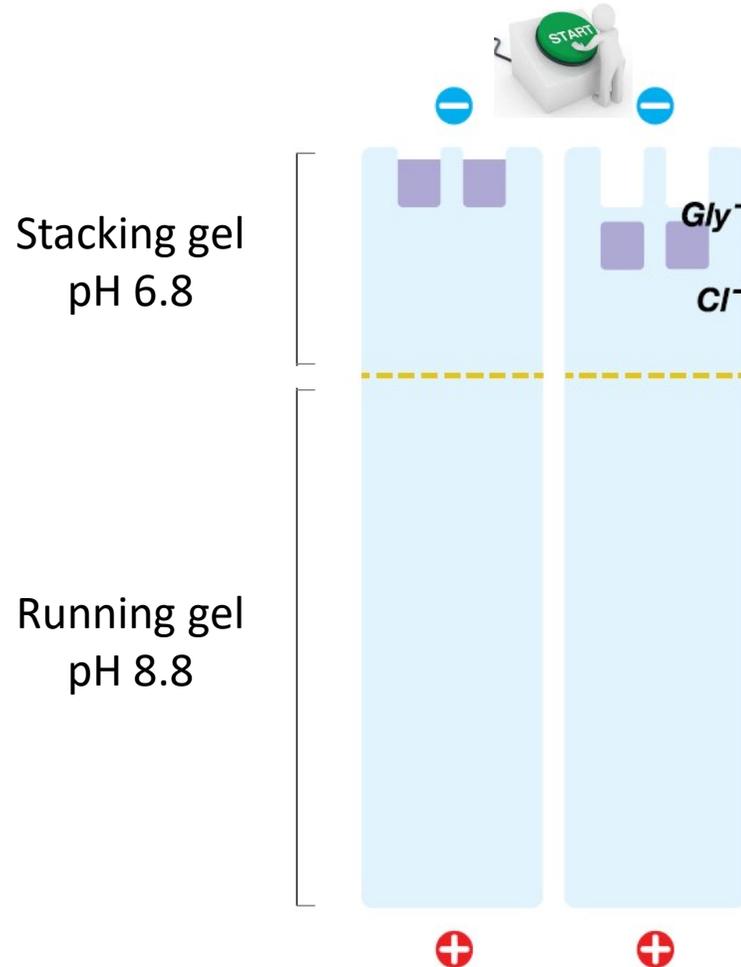
Gel di impaccamento

- PAA **4%**
- SDS 10%
- Tris-HCl 1.0 M **pH 6.8**

SDS-PAGE, INIZIO DELL'ESPERIMENTO



FUNZIONE DELLO STACKING GEL: ISOTACOFRESI



Ione glicinato (-, $pI = 6.06$)

Il **punto isoelettrico (pI)** è il valore di pH a cui una molecola non possiede alcuna carica netta elettrica e dunque nemmeno mobilità elettroforetica.



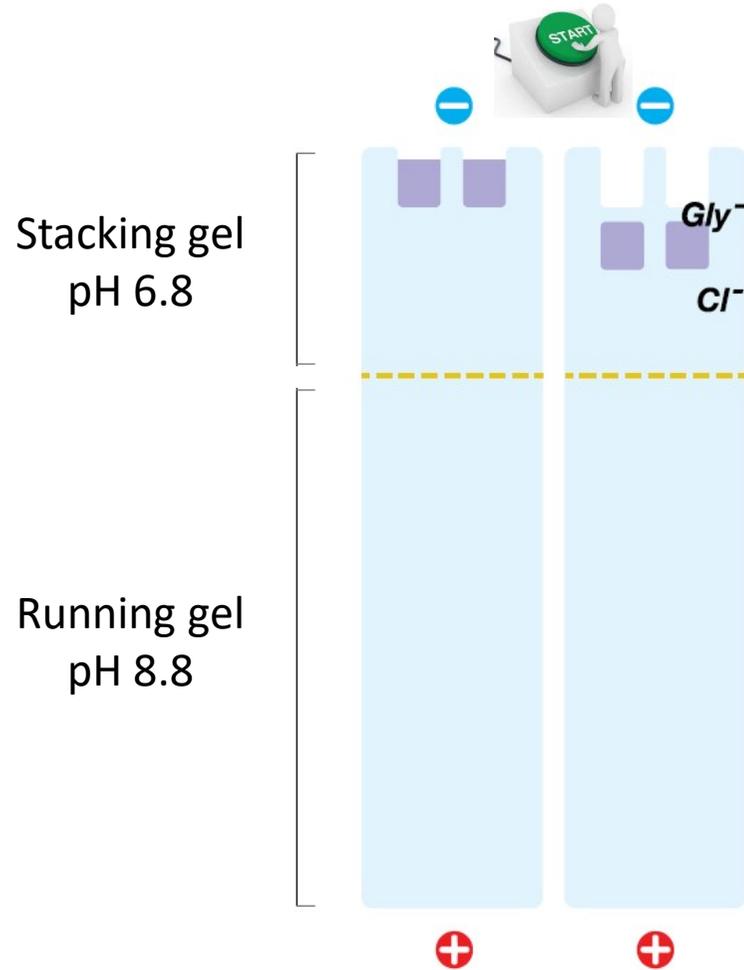
Bassa mobilità del glicinato

Applicazione ddp: i campioni entrano nello stacking gel

Ione Cl^- → "**leading ion**" → fronte di ioni davanti a **proteine-SDS**

Ione **glicinato** → "**trailing ion**" → fronte di ioni dietro a **proteine-SDS**

FUNZIONE DELLO STACKING GEL: ISOTACOFRESI



Ione glicinato (-, pI = 6.06)

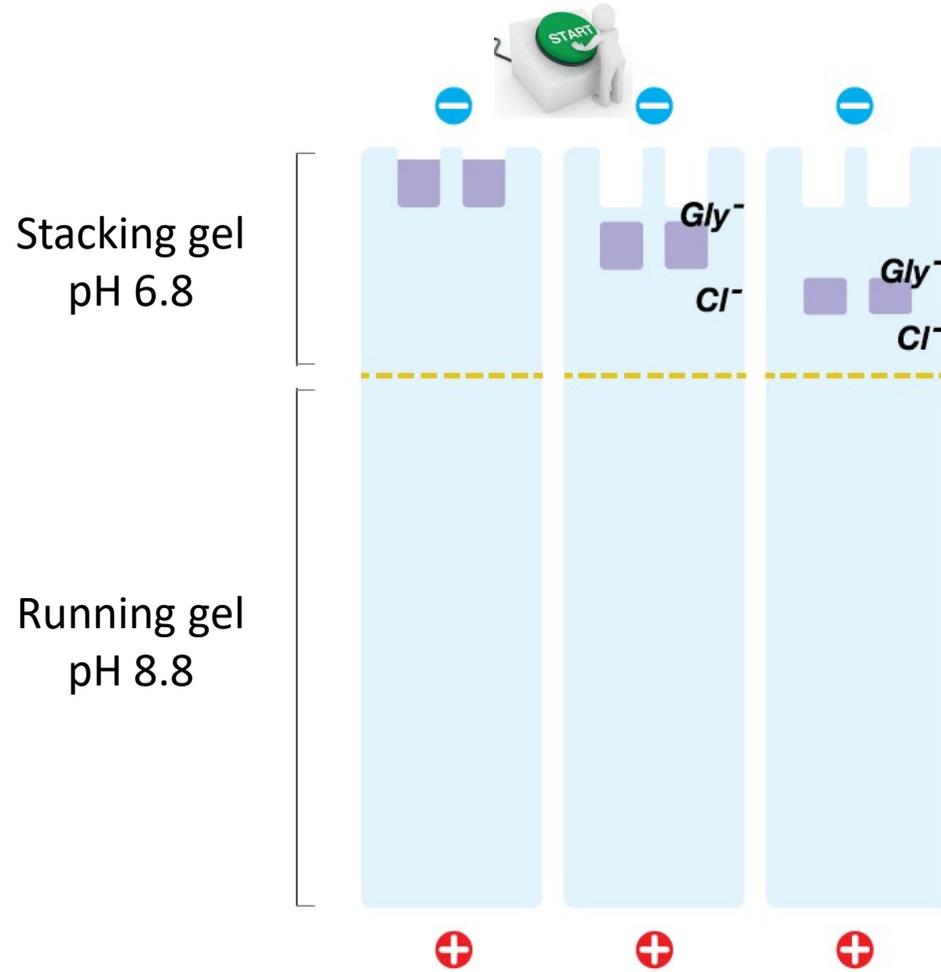
Il **punto isoelettrico (pI)** è il valore di pH a cui una molecola non possiede alcuna carica netta elettrica e dunque nemmeno mobilità elettroforetica.



Bassa mobilità del glicinato

μ : **Cl⁻** > **proteine-SDS** > **glicinato**

FUNZIONE DELLO STACKING GEL: ISOTACOFRESI



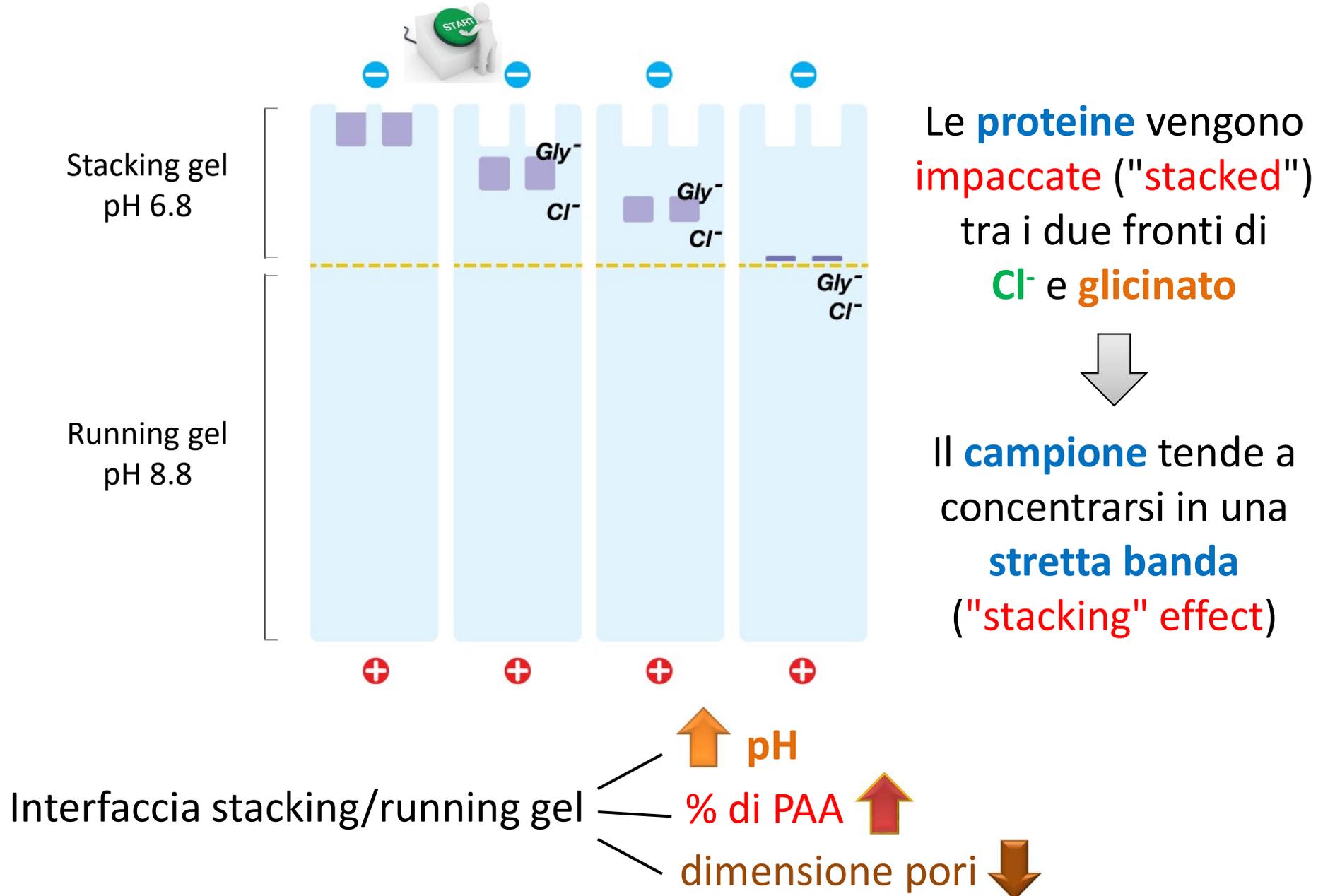
I complessi **proteine-SDS** vengono progressivamente schiacciati tra **Cl⁻** e **glicinato**

f ↓
(gel 4% PAA)

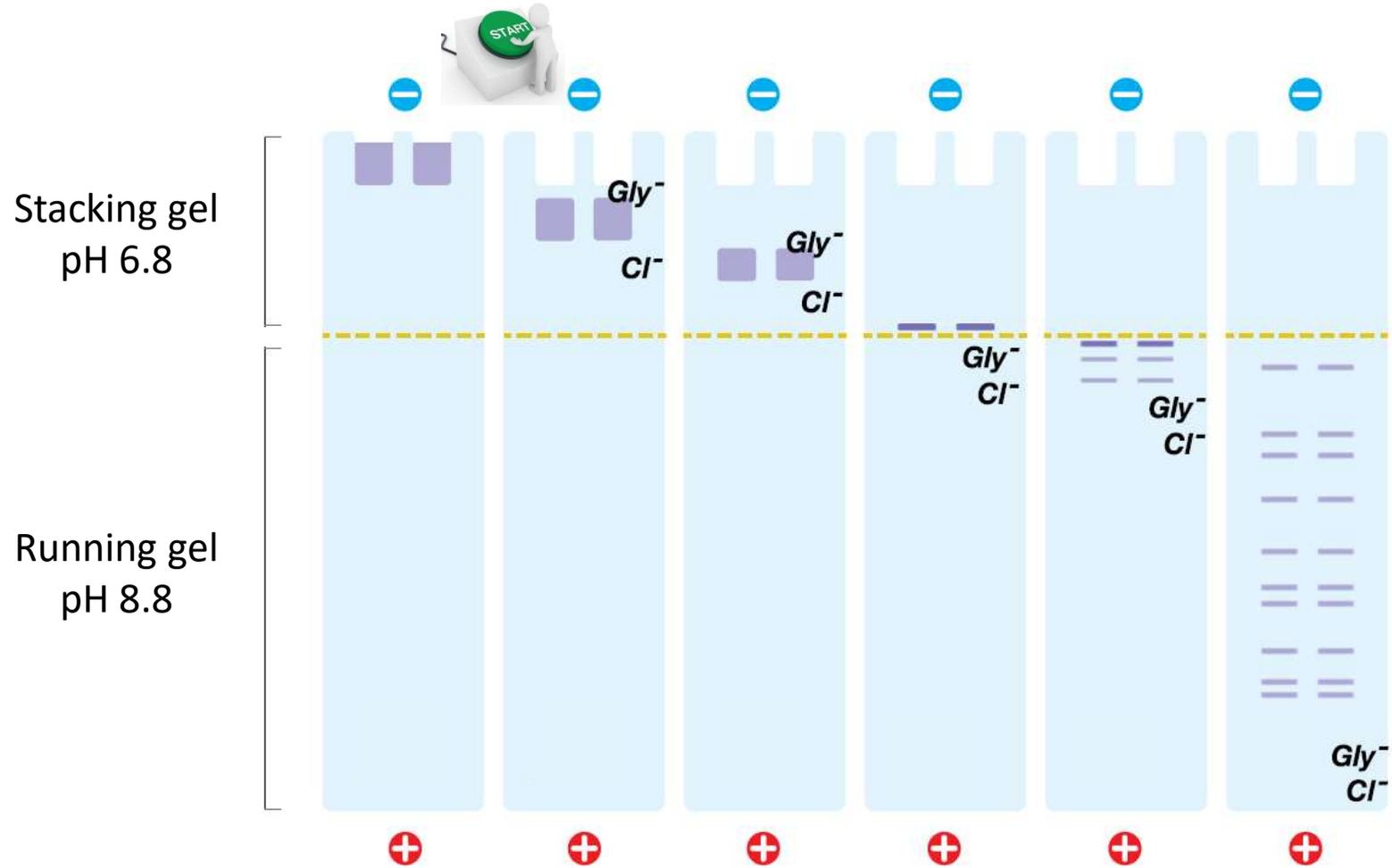
μ : Cl⁻ > proteine-SDS > glicinato

La **mobilità** dipende dalla **carica netta** **NON** dalla **dimensione**
(gel 4% PAA, pori grandi)

FUNZIONE DELLO STACKING GEL: ISOTACOFRESI



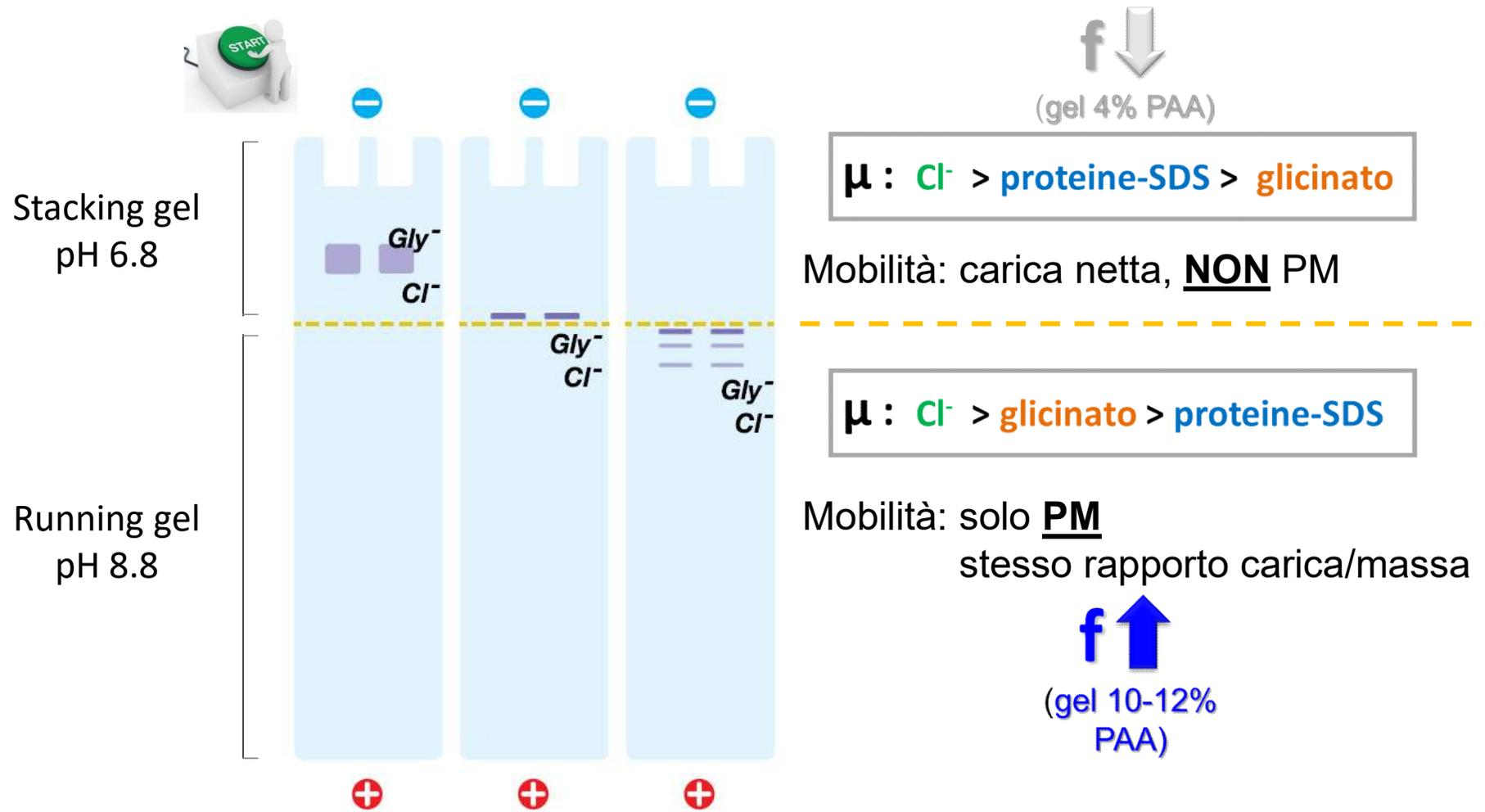
FUNZIONE DELLO STACKING GEL: ISOTACOFRESI



Nel **running gel** la separazione delle **proteine** (complesstate con l'SDS) dipende solo dal **PM**

Stesso rapporto
carica/massa

RIASSUMENDO.....



“Stacking” effect: la mobilità dipende dalla **carica netta NON** dalla **dimensione**.

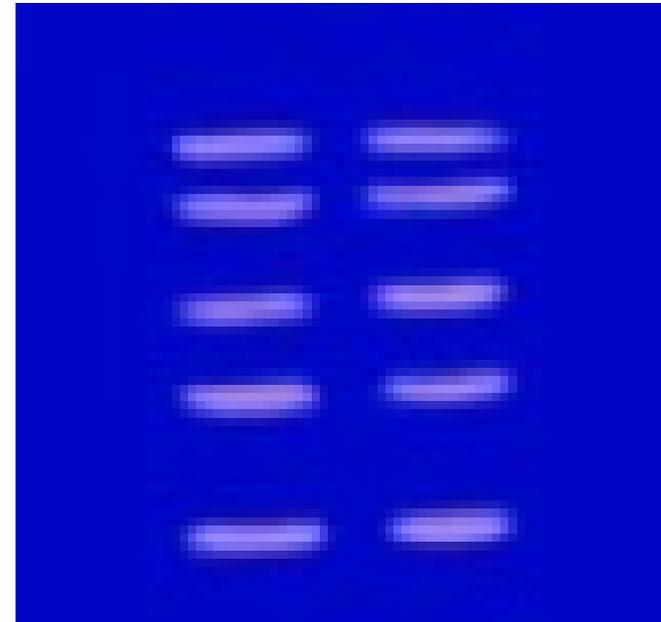
Nel **gel di corsa**, le proteine si muovono verso l’anodo a velocità costante fino a raggiungere il gel di corsa → **separazione per PM**

IN ULTIMA ANALISI, A COSA SERVONO IL GEL DI IMPACCAMENTO E L'ISOTACOFORESIS?

Senza gel di impaccamento



Con gel di impaccamento



Ad aumentare la **risoluzione** delle bande.

COLORAZIONI DI PROTEINE SU GEL

COLORAZIONI DI PROTEINE SU GEL

BLUE COOMASSIE

Sensibilità **50 ng** di proteina.

Usato tipicamente **su gel**.

- Colorante anionico + H₂O + acido acetico e metanolo.
- Per **decolorare** H₂O + etanolo.

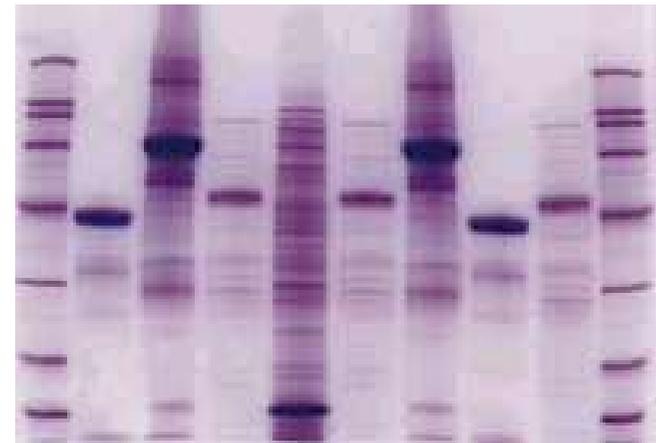
Pregi: facilità, rapidità, stabilità.

Difetti: metodo condizionato dalla presenza di **residui basici**.

Colorazione



Decolorazione



COLORAZIONI DI PROTEINE SU GEL

COLORAZIONE ARGENTICA ("Silver stain")

Sensibilità **1-0.5 ng** di proteina (10-50 volte più sensibile del Coomassie).

Presenza nel colorante di **ioni Ag⁺** che interagiscono con:

- gruppi **-SH** (Cys)
- gruppi **carbossilici** (Asp e Glu)
- gruppi **imidazolo** (His)

Si forma Ag metallico visibile
(colore **marrone-nero**)

Difetti:

Lungo, laborioso e dispendioso

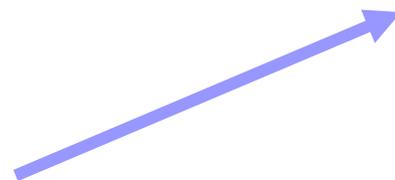


DA RICORDARE!!!

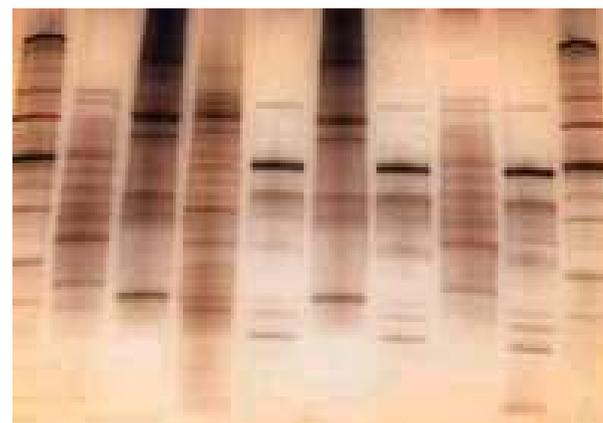
I **traccianti** della corsa elettroforetica e i **coloranti** per proteine sono **due cose ben distinte**.

Coloranti per proteine:

Coomassie Blue

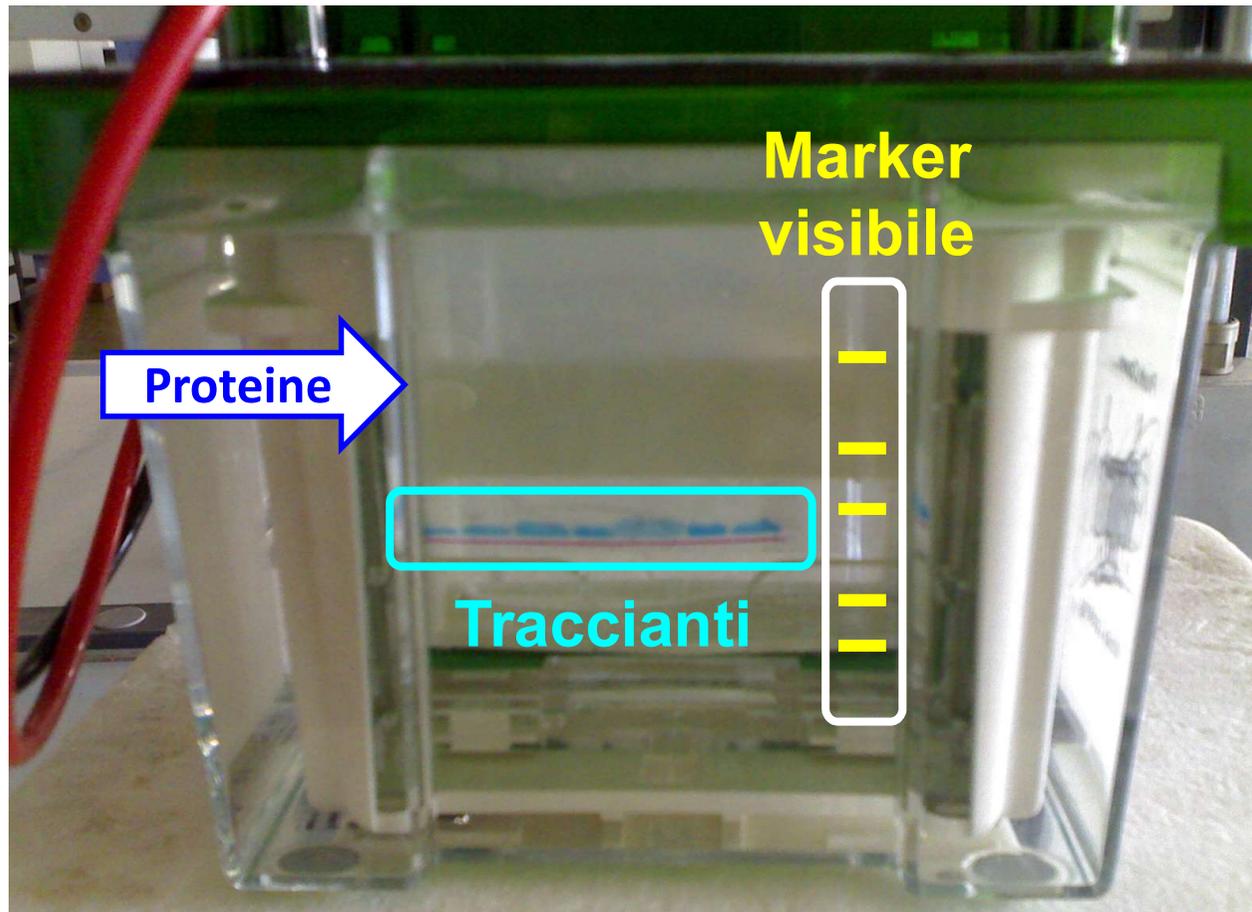


Colorazione
Argentica



TRACCIANTI ELETTROFORETICI

Danno indicazione del fronte della migrazione, migrano nel gel come una banda di piccole dimensioni insieme ai campioni ma NON vi si legano



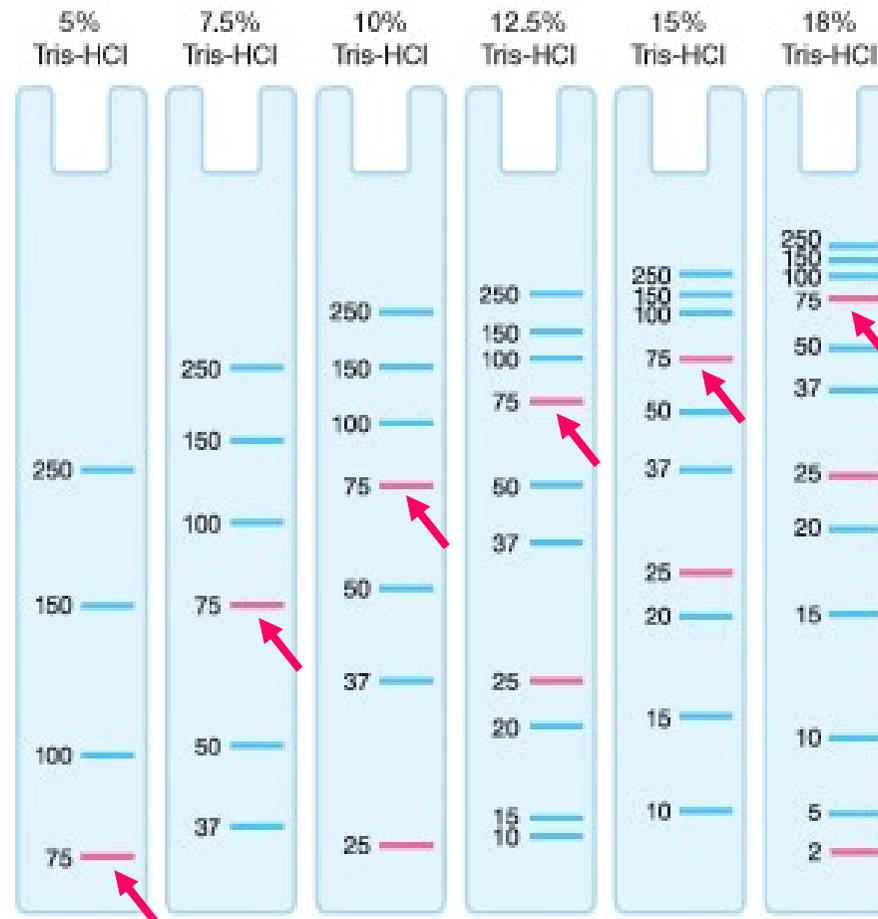
MARCATORE DI PESO MOLECOLARE (MARKER O LADDER)

Miscela di proteine avente **PM noto**

Per **controllare** la **migrazione** di una proteina (**analisi qualitative**)

Per **determinare** il **PM** di una proteina (**analisi quantitative**)

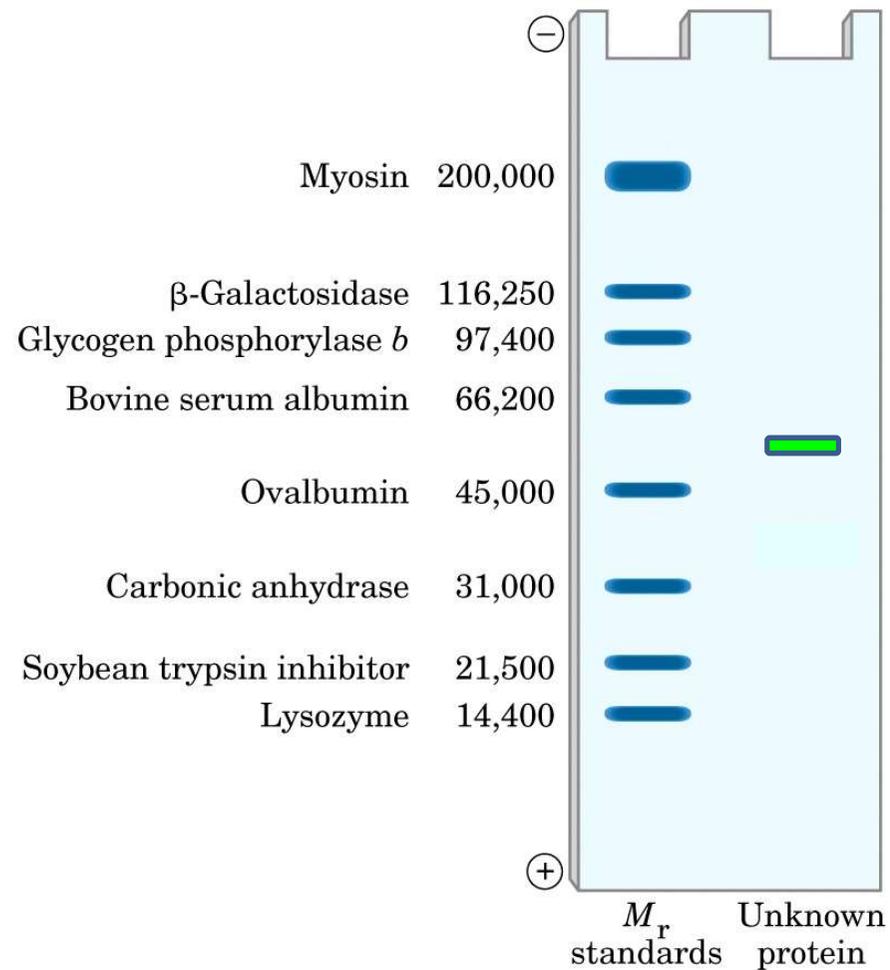
Es. di marker



SDS-PAGE PER ANALISI QUANTITATIVA

DETERMINAZIONE DEL PM DI UNA PROTEINA

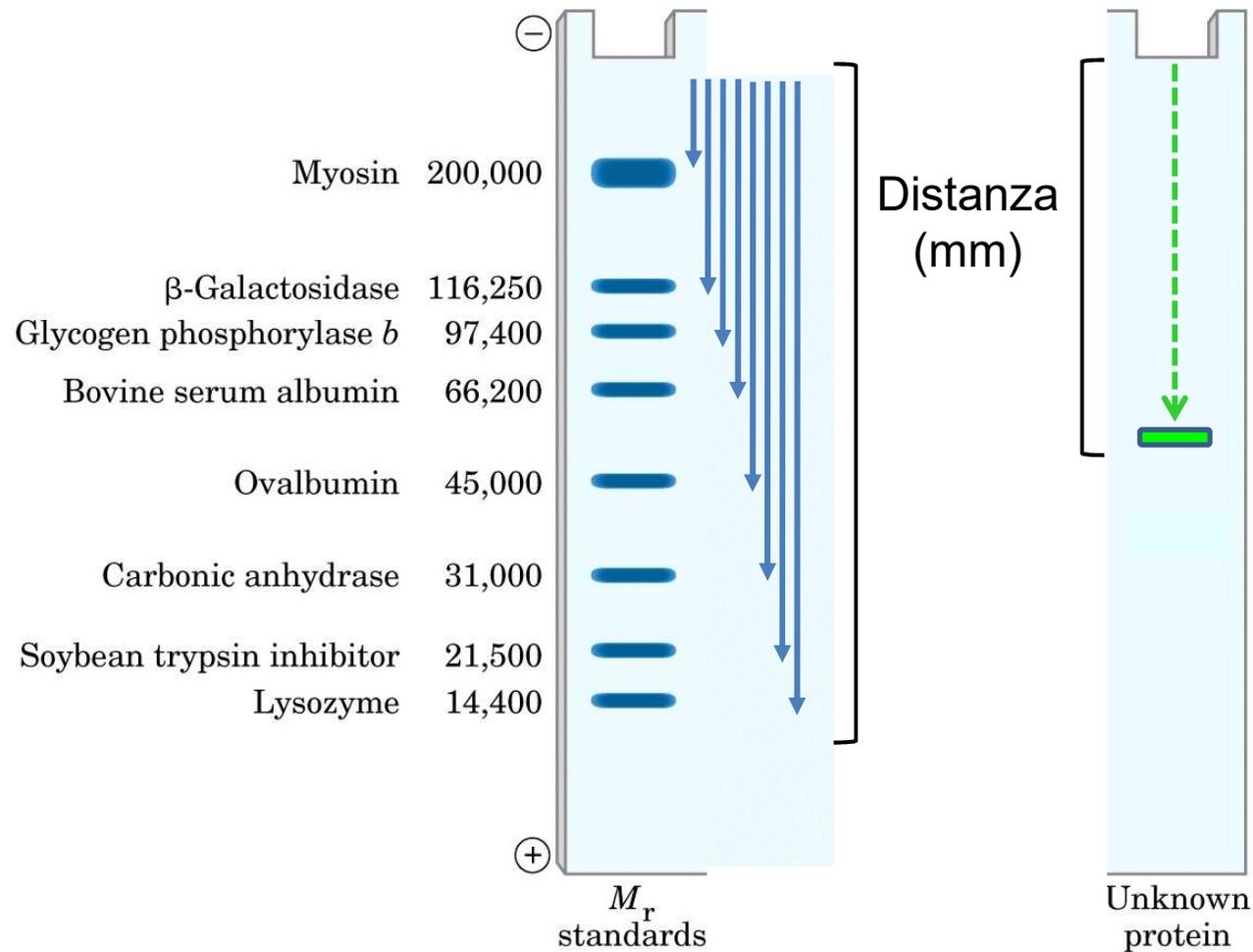
ANALISI QUANTITATIVA



SDS-PAGE PER ANALISI QUANTITATIVE

DETERMINAZIONE DEL PM DI UNA PROTEINA

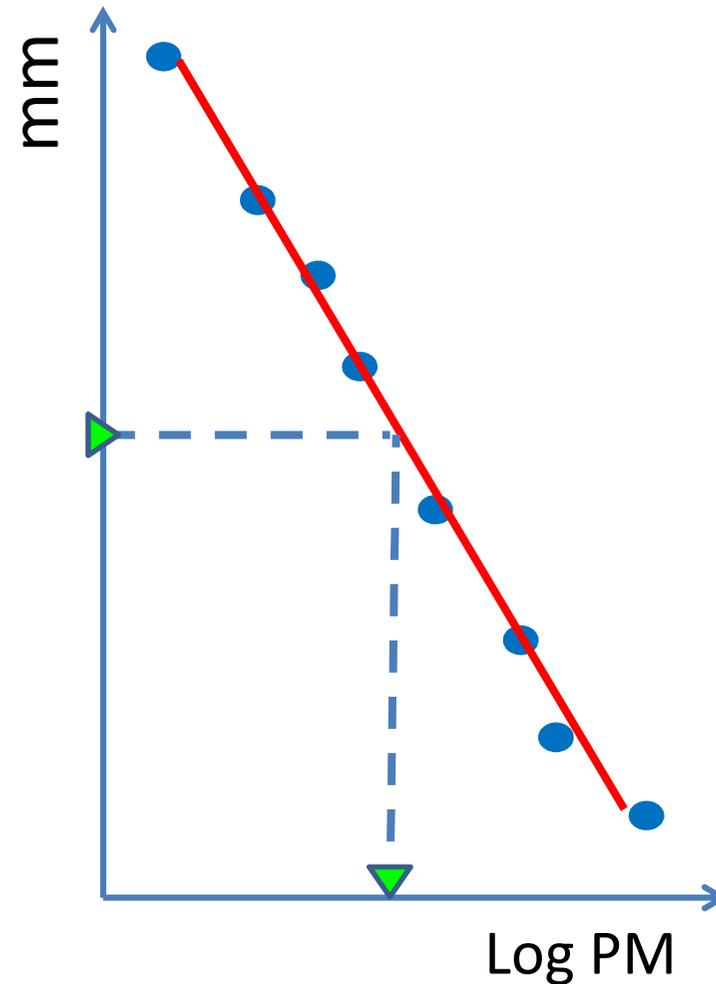
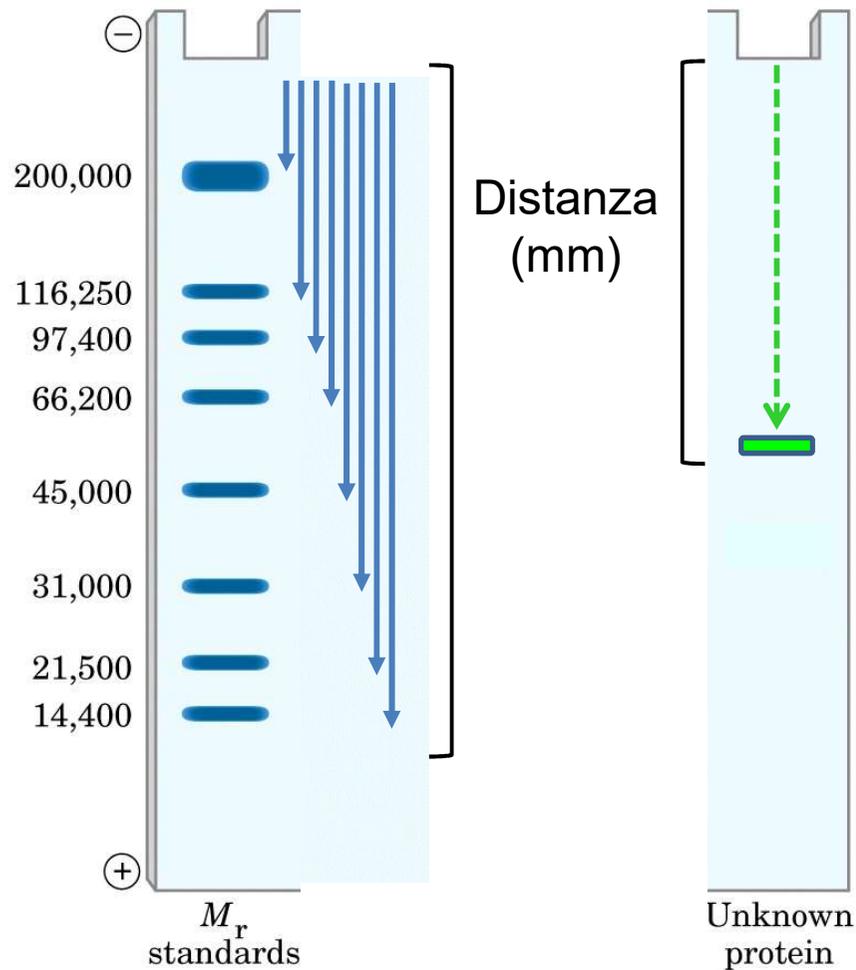
ANALISI QUANTITATIVA



SDS-PAGE PER ANALISI QUANTITATIVA

DETERMINAZIONE DEL PM DI UNA PROTEINA

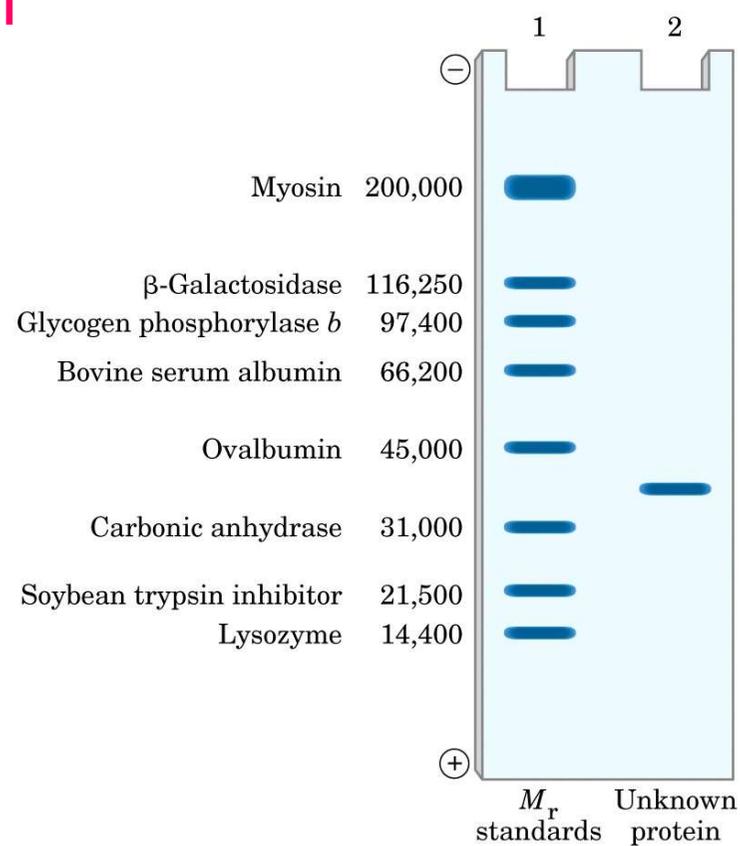
ANALISI QUANTITATIVA



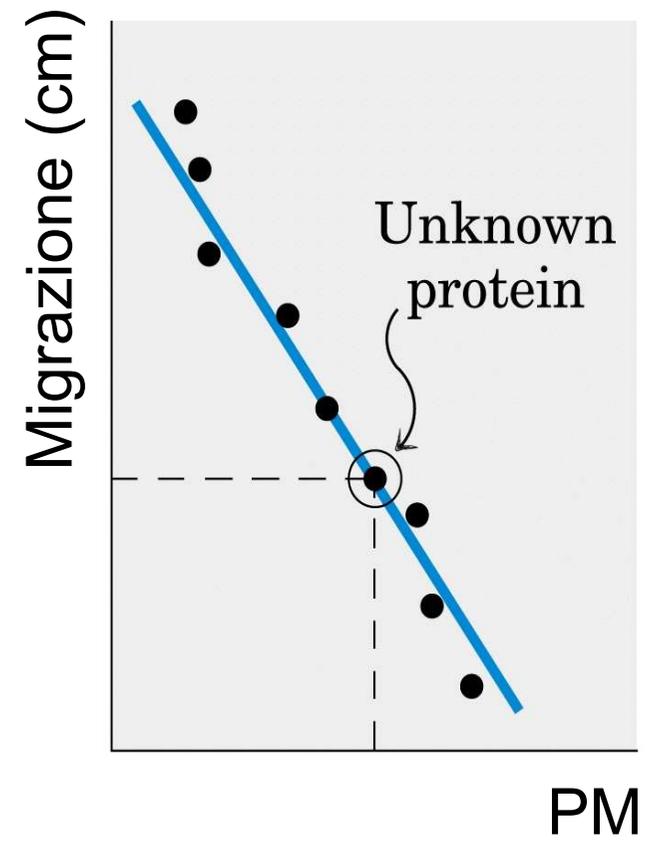
SDS-PAGE E DETERMINAZIONE DEL PM DI UNA PROTEINA

$Y = 12 \text{ cm}$

$X =$ 



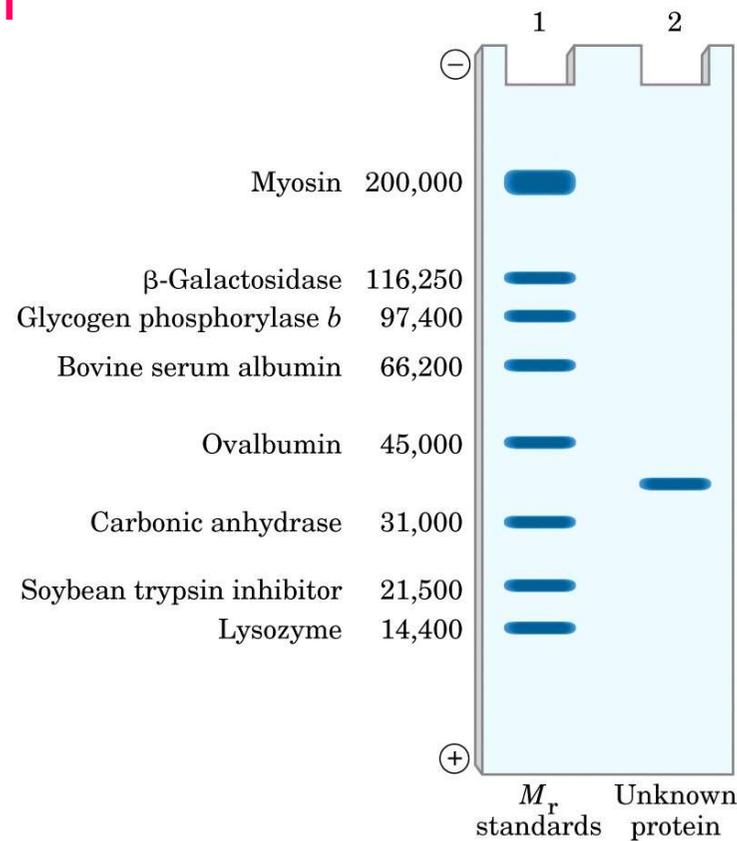
$Y = -1.3 X + 89.1$



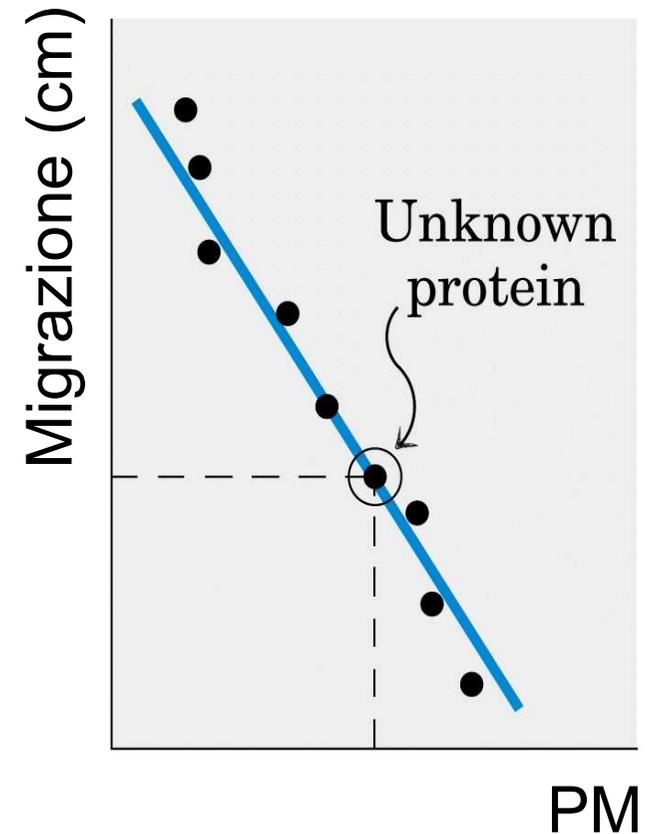
SDS-PAGE E DETERMINAZIONE DEL PM DI UNA PROTEINA

$Y = 12 \text{ cm}$

$X = 59.3$

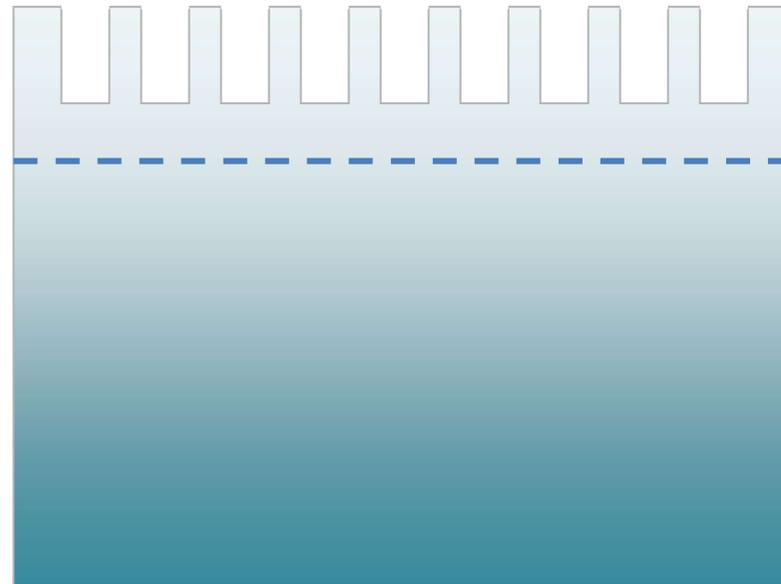


$$Y = -1.3 X + 89.1$$



GEL IN GRADIENTE DI PAA

% Acrylamide	molecular weight
5%	36-200
7.5%	24-200
10%	14-200
12.5%	14-100
15%	14-60
5-15%	14-200
5-20%	10-200
10-20%	10-150



- gradienti comuni
4-12%
4-15%

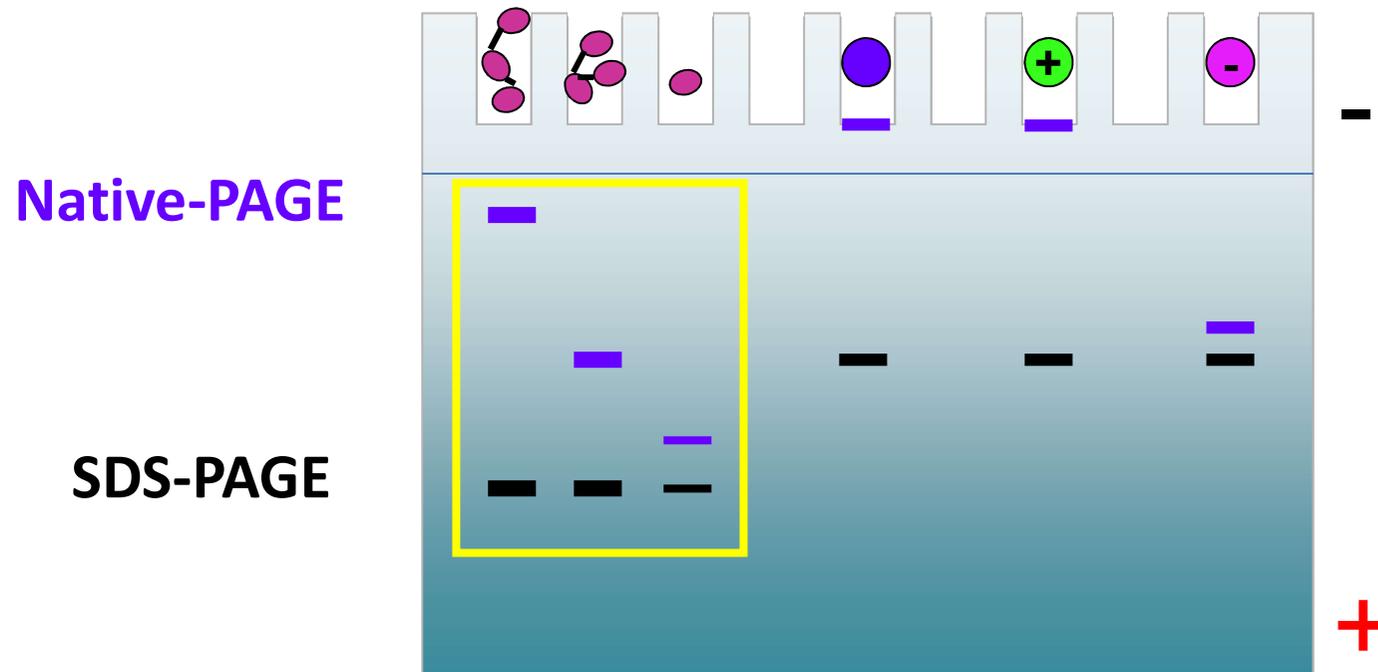
+

- Separazione di proteine con un **grande range** di **PM**.
- Migrazione **non** “infinita” (“pore size limit”)
- Permette di discriminare meglio proteine con **PM molto simili**.

SDS-PAGE vs NATIVE-PAGE

In una elettroforesi in condizioni **native** le proteine conservano la propria **conformazione**, **carica** e **forma** (separazione in funzione del rapporto carica/massa)

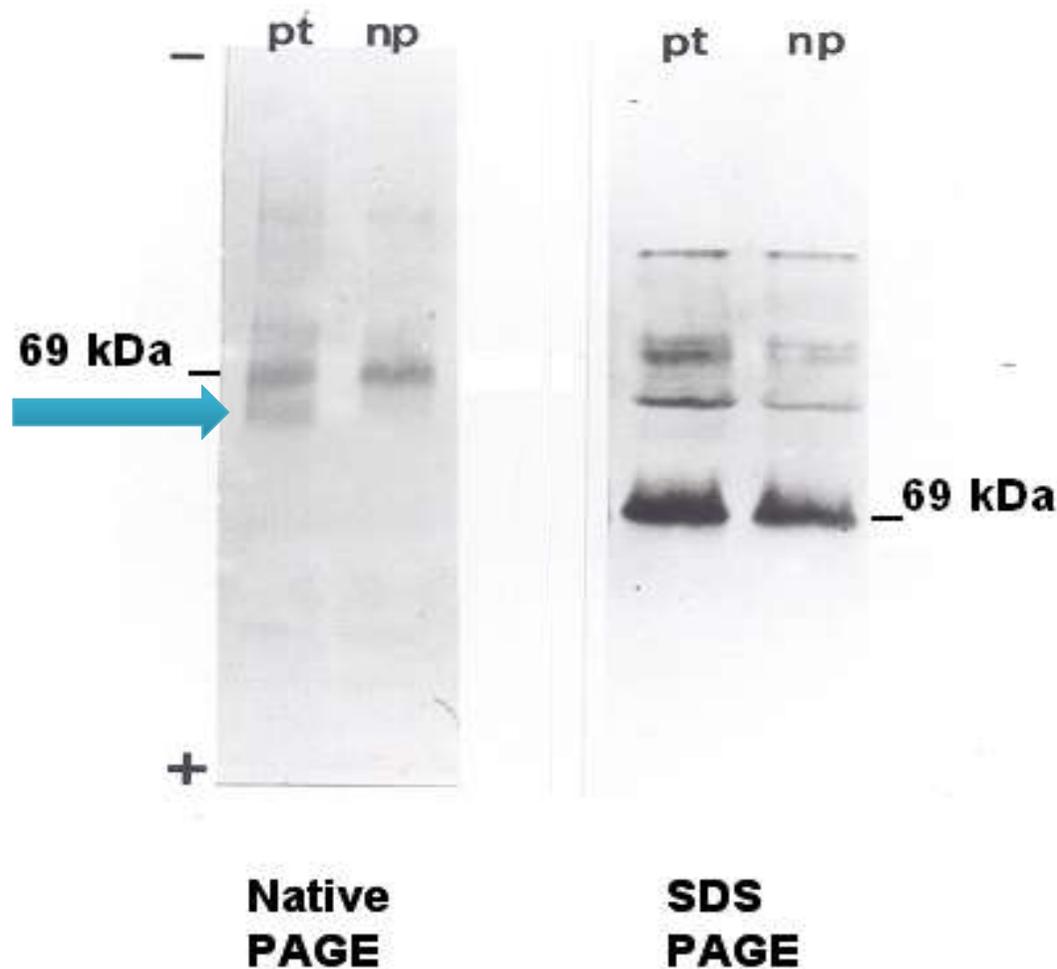
Nessun pre-trattamento dei campioni prima della Native-PAGE.



SDS-PAGE vs NATIVE-PAGE

PAGE-SDS: **solo dimensioni**

PAGE “nativa”: dimensioni, densità di carica (pI), “forma”



np = normale

pt = mutazione
in eterozigosi