

FOCALIZZAZIONE ISOELETTRICA (IEF)

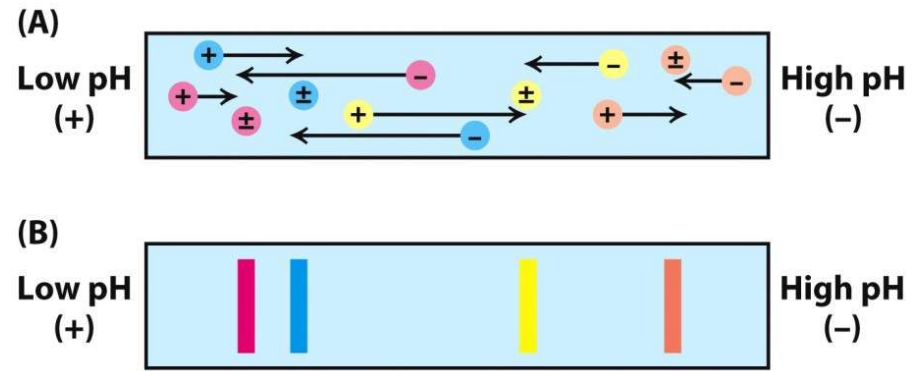
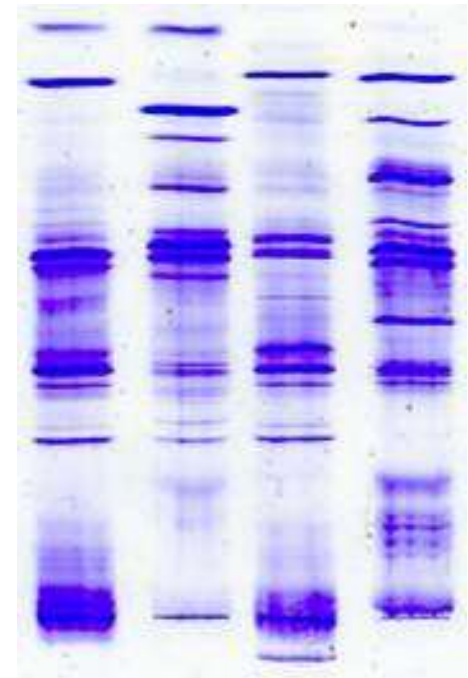


Figure 3.11
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company



ELETTROFORESI DI PROTEINE CRITERI DI SEPARAZIONE

- Native-PAGE densità di carica (pI),
dimensioni, forma
- SDS-PAGE **solo** dimensioni
- **IEF** **solo** in base al **punto**
isoelettrico (pI)

PUNTO ISOELETTRICO

pl: valore di pH al quale la **carica netta** di una proteina è **nulla**
→ sotto l'azione di un campo elettrico non si sposta.

PUNTO ISOELETTRICO

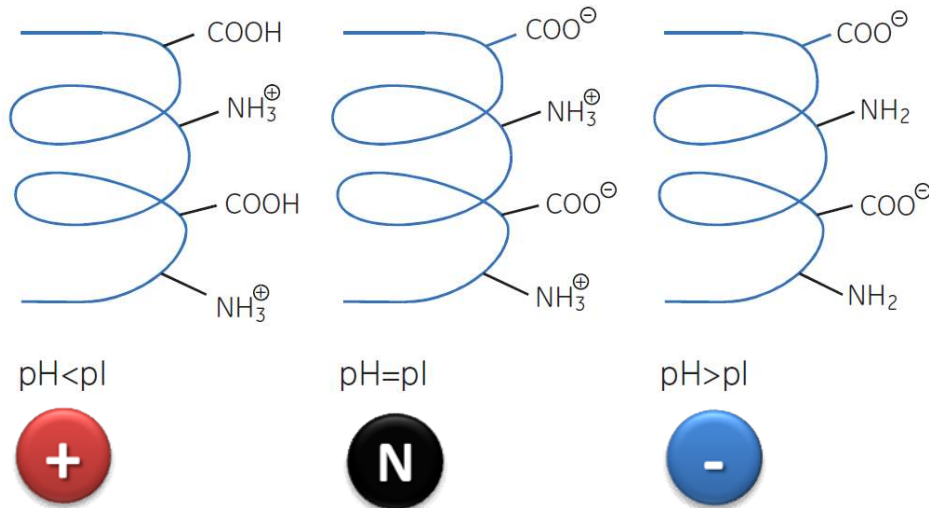
pl: valore di pH al quale la **carica netta** di una proteina è **nulla**
→ sotto l'azione di un campo elettrico non si sposta.

Le **proteine** sono molecole **anfotere**, aventi carica netta **positiva**, **negativa** o uguale a zero a seconda del pH del mezzo in cui sono immerse

PUNTO ISOELETTRICO

pl: valore di pH al quale la **carica netta** di una proteina è **nulla**
→ sotto l'azione di un campo elettrico non si sposta.

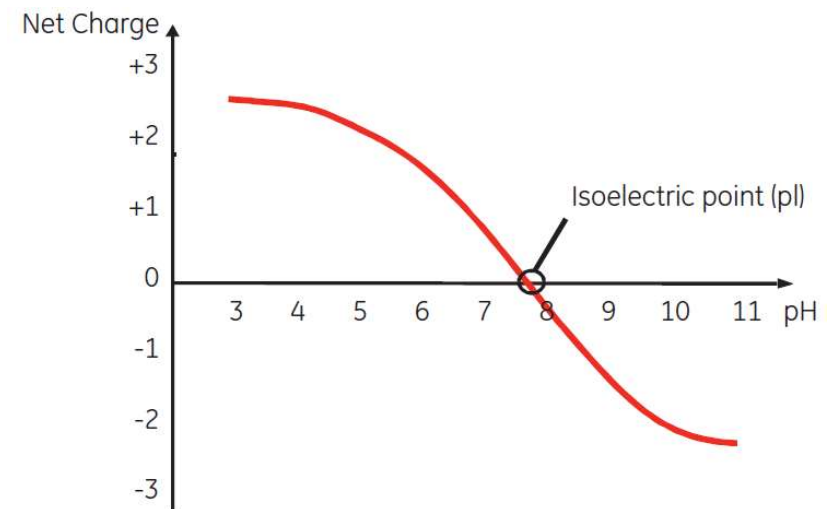
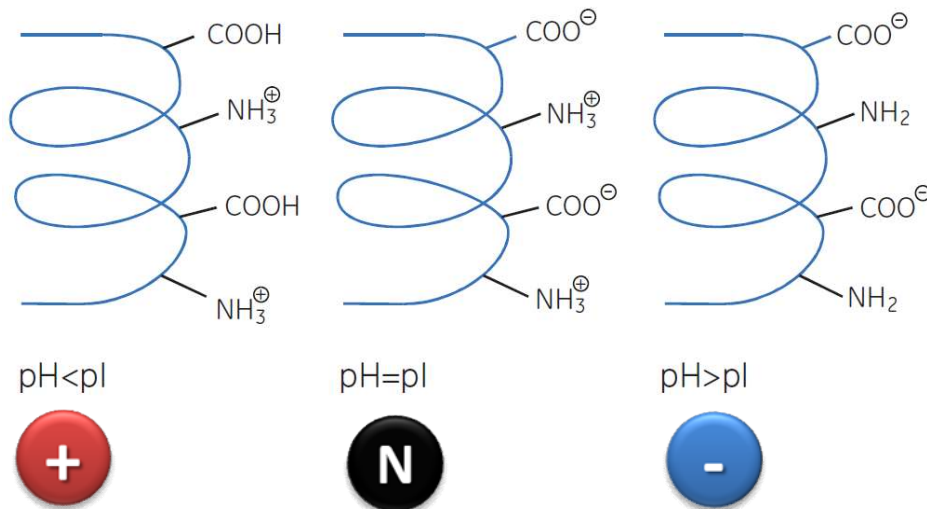
Le **proteine** sono molecole **anfotere**, aventi carica netta **positiva**, **negativa** o uguale a zero a seconda del pH del mezzo in cui sono immerse



PUNTO ISOELETTRICO

pl: valore di pH al quale la **carica netta** di una proteina è **nulla**
→ sotto l'azione di un campo elettrico non si sposta.

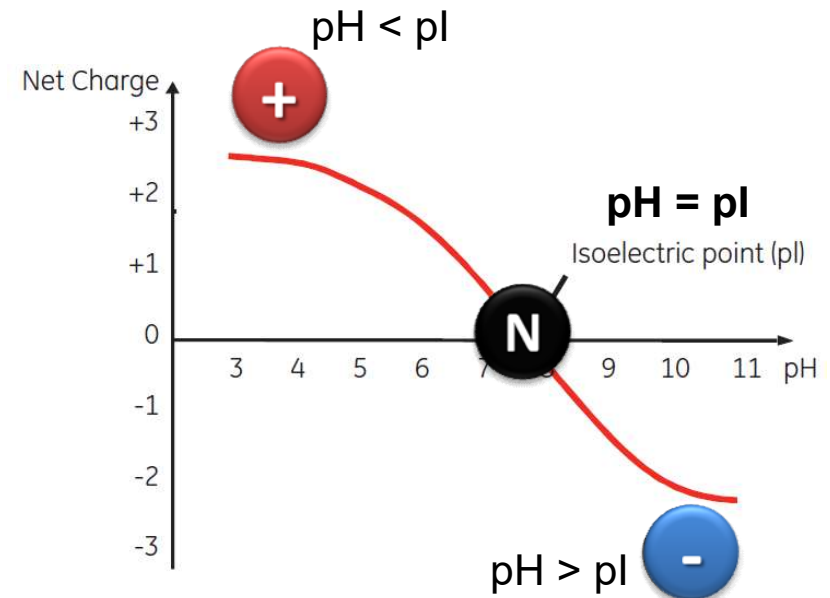
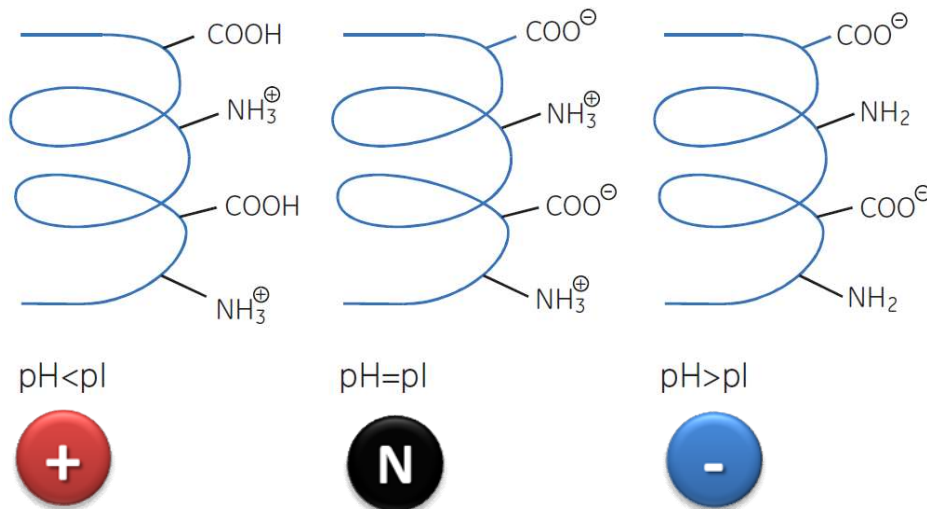
Le **proteine** sono molecole **anfotere**, aventi carica netta **positiva**, **negativa** o uguale a zero a seconda del pH del mezzo in cui sono immerse



PUNTO ISOELETTRICO

pl: valore di pH al quale la **carica netta** di una proteina è **nulla**
→ sotto l'azione di un campo elettrico non si sposta.

Le **proteine** sono molecole **anfotere**, aventi carica netta **positiva**, **negativa** o uguale a zero a seconda del pH del mezzo in cui sono immerse



CALCOLO DEL pI

pI **calcolabile** o **misurabile**, semplicemente sulla base della sequenza primaria

TABLE 3-1 Properties and Conventions Associated with the Common Amino Acids Found in Proteins

Amino acid	Abbreviation/ symbol	M_r	pK_a values			pI	Occurrence in proteins (%) ¹
			pK_1 ($-\text{COOH}$)	pK_2 ($-\text{NH}_3^+$)	pK_R (R group)		
Nonpolar, aliphatic R groups							
Glycine	Gly G	75	2.34	9.60		5.97	7.2
Alanine	Ala A	89	2.34	9.69		6.01	7.8
Proline	Pro P	115	1.99	10.96		6.48	5.2
Valine	Val V	117	2.32	9.62		5.97	6.6
Leucine	Leu L	131	2.36	9.60		5.98	9.1
Isoleucine	Ile I	131	2.36	9.68		6.02	5.3
Methionine	Met M	149	2.28	9.21		5.74	2.3
Aromatic R groups							
Phenylalanine	Phe F	165	1.83	9.13		5.48	3.9
Tyrosine	Tyr Y	181	2.20	9.11	10.07	5.66	3.2
Tryptophan	Trp W	204	2.38	9.39		5.89	1.4
Polar, uncharged R groups							
Serine	Ser S	105	2.21	9.15		5.68	6.8
Threonine	Thr T	119	2.11	9.62		5.87	5.9
Cysteine	Cys C	121	1.96	10.28	8.18	5.07	1.9
Asparagine	Asn N	132	2.02	8.80		5.41	4.3
Glutamine	Gln Q	146	2.17	9.13		5.65	4.2
Positively charged R groups							
Lysine	Lys K	146	2.18	8.95	10.53	9.74	5.9
Histidine	His H	155	1.82	9.17	6.00	7.59	2.3
Arginine	Arg R	174	2.17	9.04	12.48	10.76	5.1
Negatively charged R groups							
Aspartate	Asp D	133	1.88	9.60	3.65	2.77	5.3
Glutamate	Glu E	147	2.19	9.67	4.25	3.22	6.3

CALCOLO DEL pI

pI **calcolabile** o **misurabile**, semplicemente sulla base della sequenza primaria

TABLE 3-1 Properties and Conventions Associated with the Common Amino Acids Found in Proteins

Amino acid	Abbreviation/ symbol	M_r	pK_a values			pI	Occurrence in proteins (%) ¹
			pK_1 (—COOH)	pK_2 (—NH ₃ ⁺)	pK_R (R group)		
Nonpolar, aliphatic R groups							
Glycine	Gly G	75	2.34	9.60		5.97	7.2
Alanine	Ala A	89	2.34	9.69		6.01	7.8
Proline	Pro P	115	1.99	10.96		6.48	5.2
Valine	Val V	117	2.32	9.62		5.97	6.6
Leucine	Leu L	131	2.36	9.60		5.98	9.1
Isoleucine	Ile I	131	2.36	9.68		6.02	5.3
Methionine	Met M	149	2.28	9.21		5.74	2.3
Aromatic R groups							
Phenylalanine	Phe F	165	1.83	9.13		5.48	3.9
Tyrosine	Tyr Y	181	2.20	9.11	10.07	5.66	3.2
Tryptophan	Trp W	204	2.38	9.39		5.89	1.4
Polar, uncharged R groups							
Serine	Ser S	105	2.21	9.15		5.68	6.8
Threonine	Thr T	119	2.11	9.62		5.87	5.9
Cysteine	Cys C	121	1.96	10.28	8.18	5.07	1.9
Asparagine	Asn N	132	2.02	8.80		5.41	4.3
Glutamine	Gln Q	146	2.17	9.13		5.65	4.2
Positively charged R groups							
Lysine	Lys K	146	2.18	8.95	10.53	9.74	5.9
Histidine	His H	155	1.82	9.17	6.00	7.59	2.3
Arginine	Arg R	174	2.17	9.04	12.48	10.76	5.1
Negatively charged R groups							
Aspartate	Asp D	133	1.88	9.60	3.65	2.77	5.3
Glutamate	Glu E	147	2.19	9.67	4.25	3.22	6.3

CALCOLO DEL pI - Strumenti bioinformatici

<http://web.expasy.org/protparam/>

Calcolo teorico di pI , PM e altre caratteristiche



ProtParam tool

ProtParam ([References](#) / [Documentation](#)) is a tool which allows weight, theoretical pI , amino acid composition, atomic composition

Please note that you may only fill out **one** of the following fields :

Enter a Swiss-Prot/TrEMBL accession number (AC) (for example

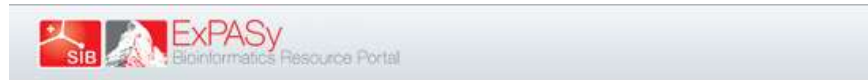
Or you can paste your own amino acid sequence (in one-letter c

RESET

Compute parameters

http://web.expasy.org/compute_pi/

Calcolo teorico del pI e del PM



Compute pI/Mw tool

Compute pI/Mw is a tool which allows the computation of the theoretical pI

[Documentation](#) is available.

Compute pI/Mw for Swiss-Prot/TrEMBL entries or a user-entered sequence

Please enter one or more UniProtKB/Swiss-Prot protein identifiers (ID) (e.g theoretical pI and Mw (molecular weight) will then be computed.

Or upload a file from your computer, containing one Swiss-Prot/TrEMBL ID/

Resolution: Average or Monoisotopic

[Click here to compute \$pI/Mw\$](#) | Reset

CALCOLO DEL pI - Strumenti bioinformatici

<http://web.expasy.org/protparam/>

Calcolo teorico di pI, PM e altre caratteristiche



ProtParam tool

ProtParam ([References](#) / [Documentation](#)) is a tool which allows weight, theoretical pI, amino acid composition, atomic composition

Please note that you may only fill out **one** of the following fields :

Enter a Swiss-Prot/TrEMBL accession number (AC) (for example

Or you can paste your own amino acid sequence (in one-letter code)

Sequenza aminoacidica in "1-letter code"

RESET

Compute parameters

Risultato:

Theoretical pI: 9.10

Amino acid composition:

Ala (A)	23	11.0%
Arg (R)	10	4.8%
Asn (N)	6	2.9%
Asp (D)	8	3.8%
Cys (C)	6	2.9%
Gln (Q)	5	2.4%
Glu (E)	11	5.2%
Gly (G)	26	12.4%
His (H)	2	1.0%
Ile (I)	6	2.9%
Leu (L)	25	11.9%
Lys (K)	15	7.1%
Met (M)	3	1.4%
Phe (F)	10	4.8%
Pro (P)	9	4.3%
Ser (S)	15	7.1%
Thr (T)	8	3.8%
Trp (W)	2	1.0%
Tyr (Y)	0	0.0%
Val (V)	20	9.5%

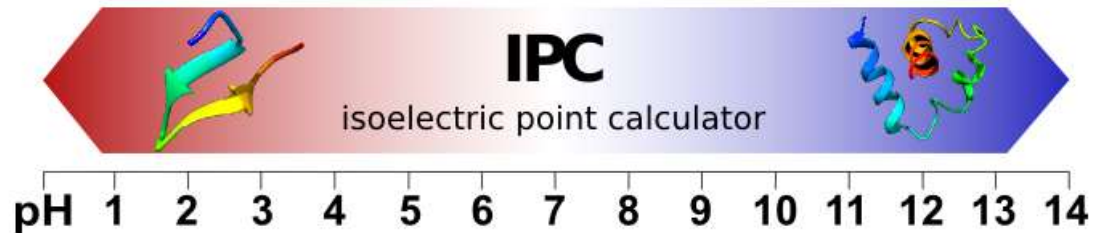
Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 19

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 25

CALCOLO DEL pI - Strumenti bioinformatici

<http://isoelectric.ovh.org/>

Protein isoelectric point calculator



Isoelectric point, the pH at which a particular molecule carries no net electrical charge, is a critical parameter for many analytical biochemistry and proteomics techniques, especially for 2D gel electrophoresis (2D-PAGE), capillary isoelectric focusing (cIEF), X-ray crystallography and liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS)

Below is the text area where you can paste amino acid sequence of analyzed protein (peptide) or multiple sequences in fasta format

Calculate

Load Example

Load Example2

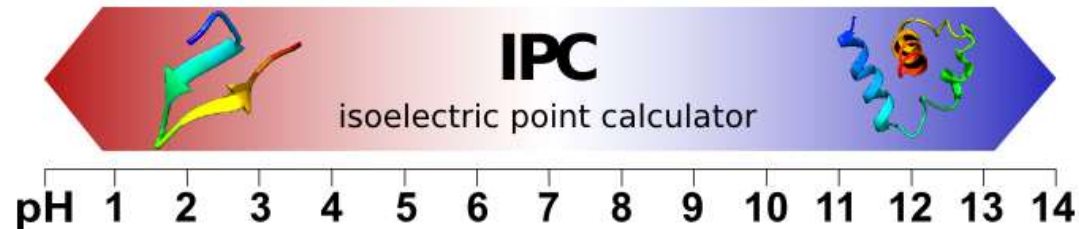
Note:

- Input should be ONE sequence in plain text or MULTIPLE sequences in FASTA format (limit is set to 50,000 chars)
- Input should be in one letter amino acid code, input can be upper or lower case.
- Alphabet allowed: VXCDBFMOLNYIQTGHWESKPAUR.
- All non-amino acid characters will be removed from the sequence.
- For big datasets use standalone version or split your input into 50k chunks.

Input example: for Ala-Pro-Lys-His-Ala-Tyr peptide, please enter **APKHAY**

CALCOLO DEL pI - Strumenti bioinformatici

Protein isoelectric point calculator



Isoelectric point, the pH at which a particular molecule carries no net electrical charge, is an critical parameter for many analytical biochemistry and proteomics techniques, especially for 2D gel electrophoresis (2D-PAGE), capillary isoelectric focusing (cIEF), X-ray crystallography and liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS)

Below is the text area where you can paste amino acid sequence of analyzed protein (peptide) or multiple sequences in fasta format

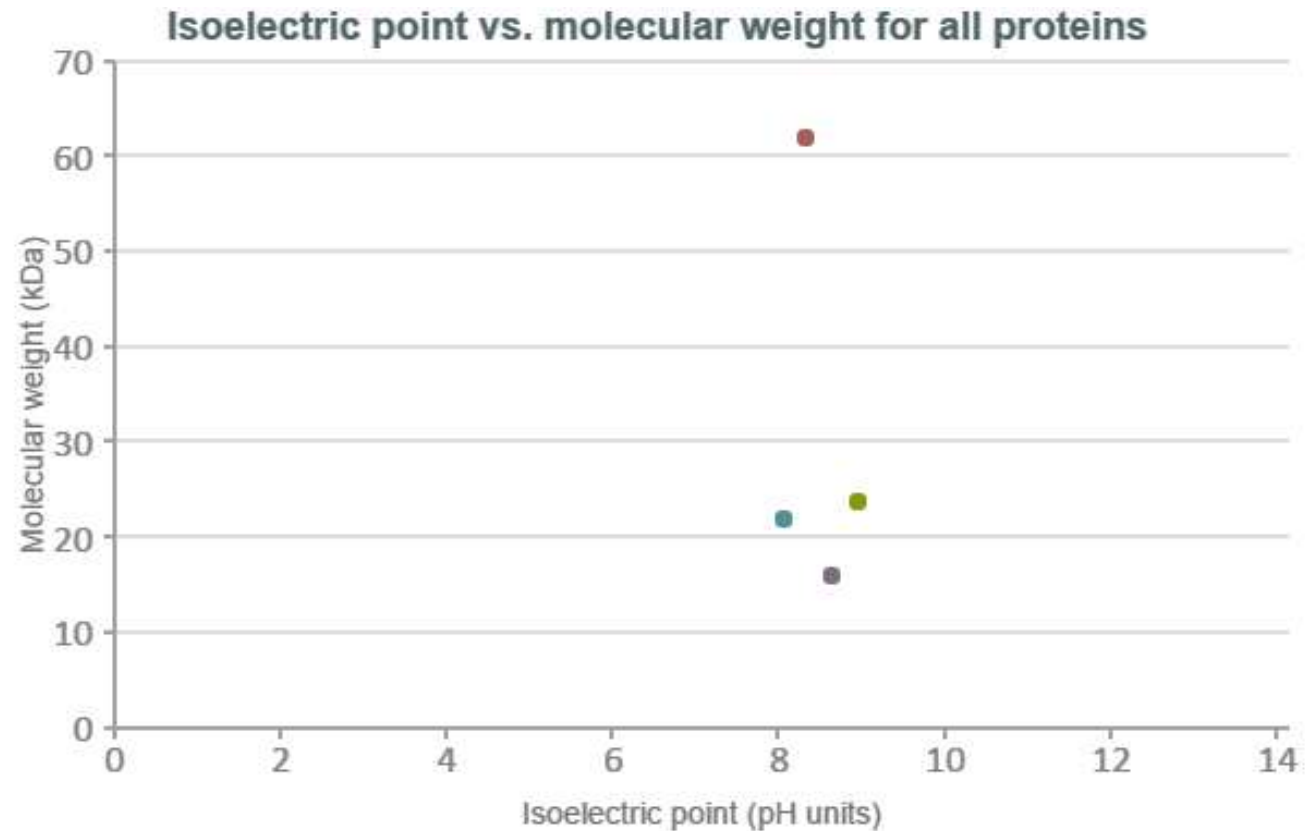
```
>Proteina 1
MLQLGLRVLGCKASSVLRASCLAGRAGRKEAGWECGGARSFSSSAVTMAPIKVGDAIPSEVEFEGEPGKKVNLAEFLKGGKGVLFVPGAFTPGCSKTHLPGFVEQAG
ALKAKGAQVVAQLSVNDVFVIEEWGRAHQAEGKVRLLADPTGAFGKATDLLLDDSLVSLFGNRRLLKRFSMVIDNGIVKALNVEPDGTGLTCSLAPNLSQL
>Proteina 2
MFLRNSVLRTAPVLRGGITTLTPVSTKLAPPAASYSQAMKANNFVYVSGQIPYTPDNKPVQGSISEKAEQVFQNVKNILAESNSSLDNIVKVNVLADMKNFAEFNSVYAKH
FHTHKPARSCVGVASLPLNVDLEMEVIAVEKN
>Proteina 3
MASMGGLHGASPAVLEGLSLKINGSSRLNGSGRVAQAQRSLVVRAQQSEETSRSSVIGLVAAGLAGGSFVQAVLADAIKVGPPPAPSGGLPAGTDNSDQARDFALAKD
RFYLQPLPPTPEAAARAKESAKDIINVKPLIDRKAWPYVQNDLRSKASYLRYDLNTIISSEKPKDEKSKLDLTTKLFDTIDNLDYAAKKKSPSQAEKYAETVSALNEVLAKLG
>Proteina 4
MKRPKLLKASKRMTCHKRYKIQQKVRHHRKLRKEAKKRGHKKPRKDPGVPNSAPFKEALLREAE LRKQRLEELKQQQKLD RQKELEKRRKLETNPDIKPSNVEPMEKEF
GLCKTENKAKSGKQNSKKLYCQELKKVIEASDVVLEVL DARDPLGCRCPQVEEIVQSGQKLVLILNKSDLPKENLESWLNLYLKKELPTVVFRASKPKDKGKITKRVKAK
KNAAPFRSEVCFGKEGLWKLLGGFQETCSKAIRVGVIGFPNVGKSSIINSLKQEQMCMNVGSMGLTRSMQVPLDKQITIIDSPSFIVSPLNSSSALALRSPASIEVVKPMEAA
SAILSQADARQVVLKYTVPGYRNSLEFFT VLAQRRGMHQKGGIPNVEGAAKLLWSEWTGASLAYYCHPPTSWTPPPYFNESIVVDMKSGFNLEELEKNNAQSIKRAIKGPHL
ANSILFQSSGLTNGIIEEKDIHEELPKRKRKQEEERDDKSDQETVDEEVDENSSGMFAAEETGEALSEETTAGEQSTRSFILDKIIEEDDAYDFSTDYV
```

Calculate

Load Example

Load Example2

CALCOLO DEL pI - Strumenti bioinformatici



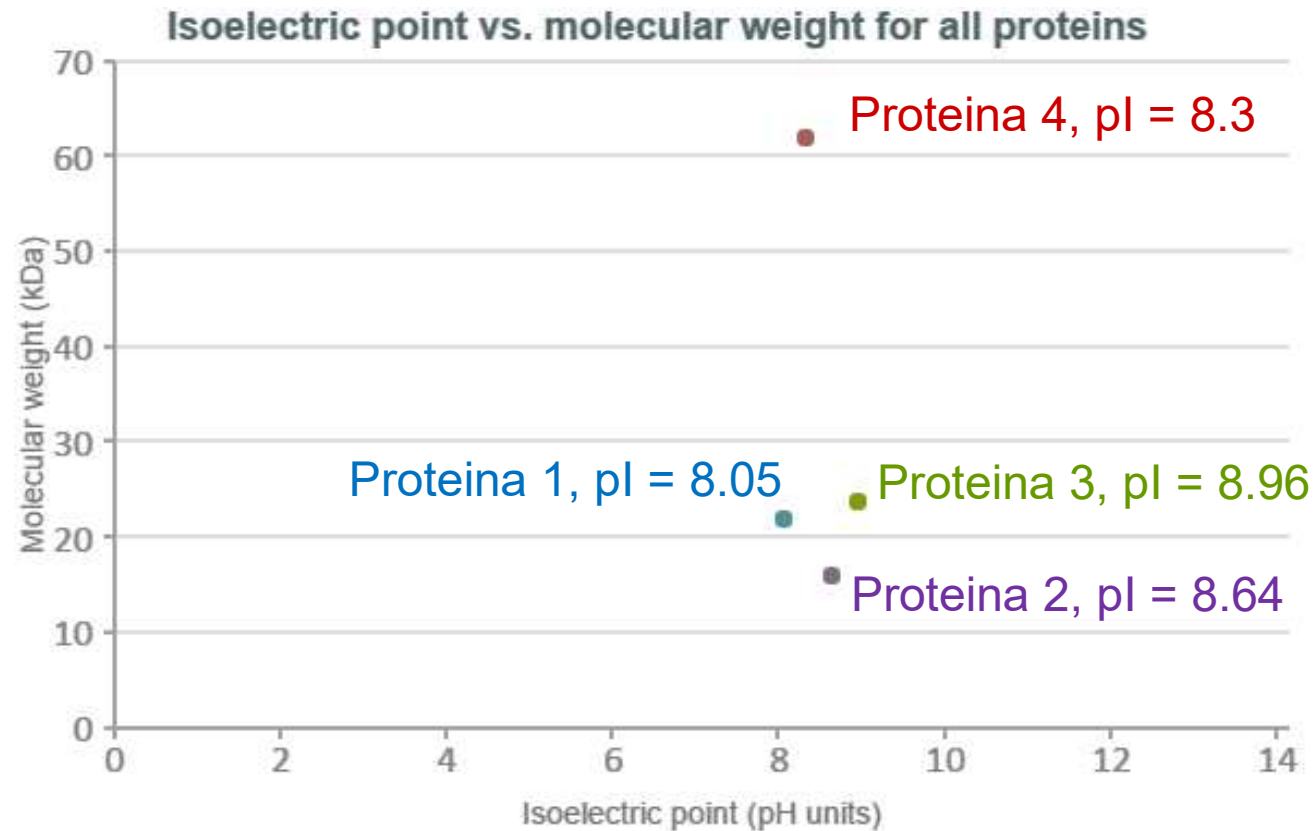
Your protein (peptide) has 210 amino acids.

Ala 23	Phe 10	Val 20	Cys 6	Ser 15	Asp 8	Lys 15
Met 3	Gly 26	Trp 2	Asn 6	Thr 8	Glu 11	Arg 10
Pro 9	Ile 6	Leu 25	Gln 5	Tyr 0	Sec 0	His 2

- Restituisce il valore di **pI teorico** calcolato sulla base della sequenza aminoacidica

- Possibilità di valutare sequenze multiple

CALCOLO DEL pI - Strumenti bioinformatici



Your protein (peptide) has 210 amino acids.

Ala 23	Phe 10	Val 20	Cys 6	Ser 15	Asp 8	Lys 15
Met 3	Gly 26	Trp 2	Asn 6	Thr 8	Glu 11	Arg 10
Pro 9	Ile 6	Leu 25	Gln 5	Tyr 0	Sec 0	His 2

- Restituisce il valore di **pI teorico** calcolato sulla base della sequenza aminoacidica

- Possibilità di valutare sequenze multiple

FOCALIZZAZIONE ISOELETTRICA

IsoElectric Focusing (IEF)

Fra le migliori tecniche **separative** per proteine / peptidi.

CAMPI DI UTILIZZO

lab. di ricerca,

lab. clinici,

lab. di medicina legale e genetica umana,

industrie alimentari ed agricole.

Ricerche di enzimologia, immunologia, citologia e tassonomia,

biochimica delle membrane, microbiologia, identificazione di

proteine plasmatiche

FOCALIZZAZIONE ISOELETTRICA

IsoElectric Focusing (IEF)

VANTAGGI

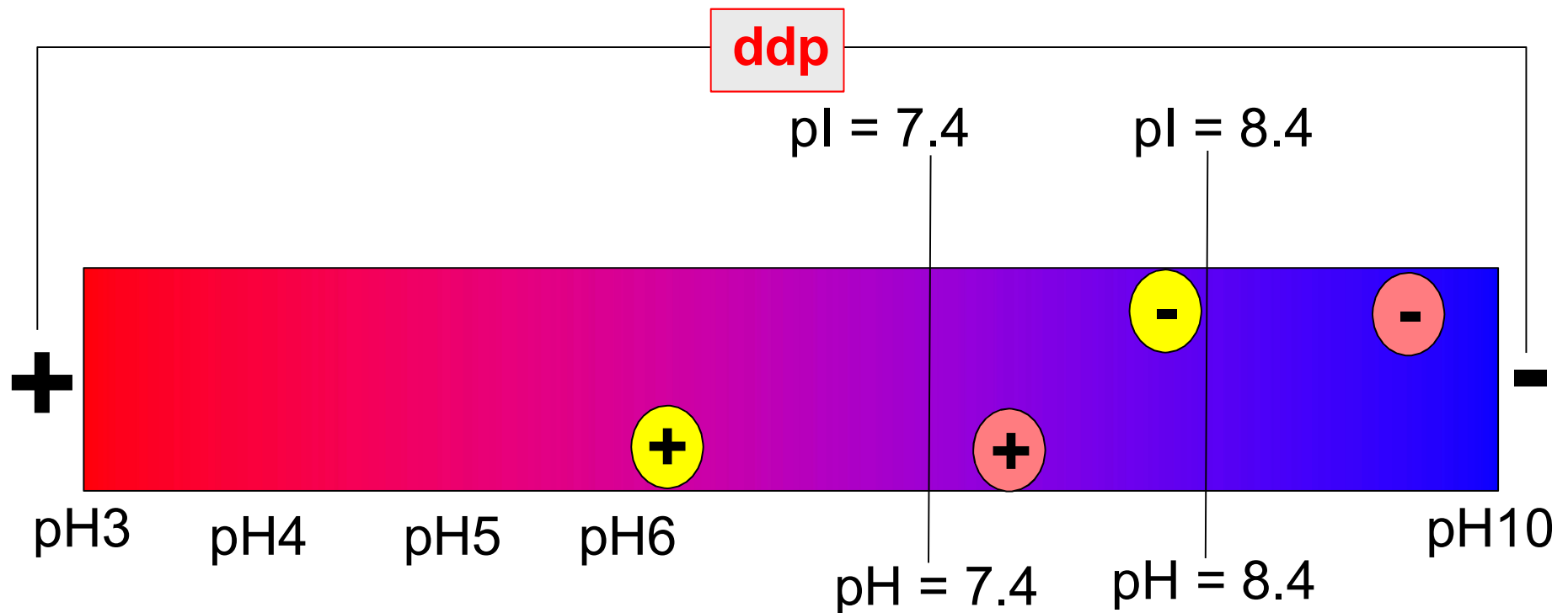
- **Eccellente risoluzione** (differenze di pI pari a 0.01 unità di pH)
- Bande molto nette, **sensibilità elevata**
- Tecnica di **equilibrio**
- Permette di **misurare** il pI di proteine

SVANTAGGI

- Tecnica laboriosa (ore di lavoro)
- Costi elevati (apparecchiatura e materiali)
- Applicabilità solo a molecole **anfotere**.

FOCALIZZAZIONE ISOELETTRICA o ISOELETTROFOCALIZZAZIONE (IEF)

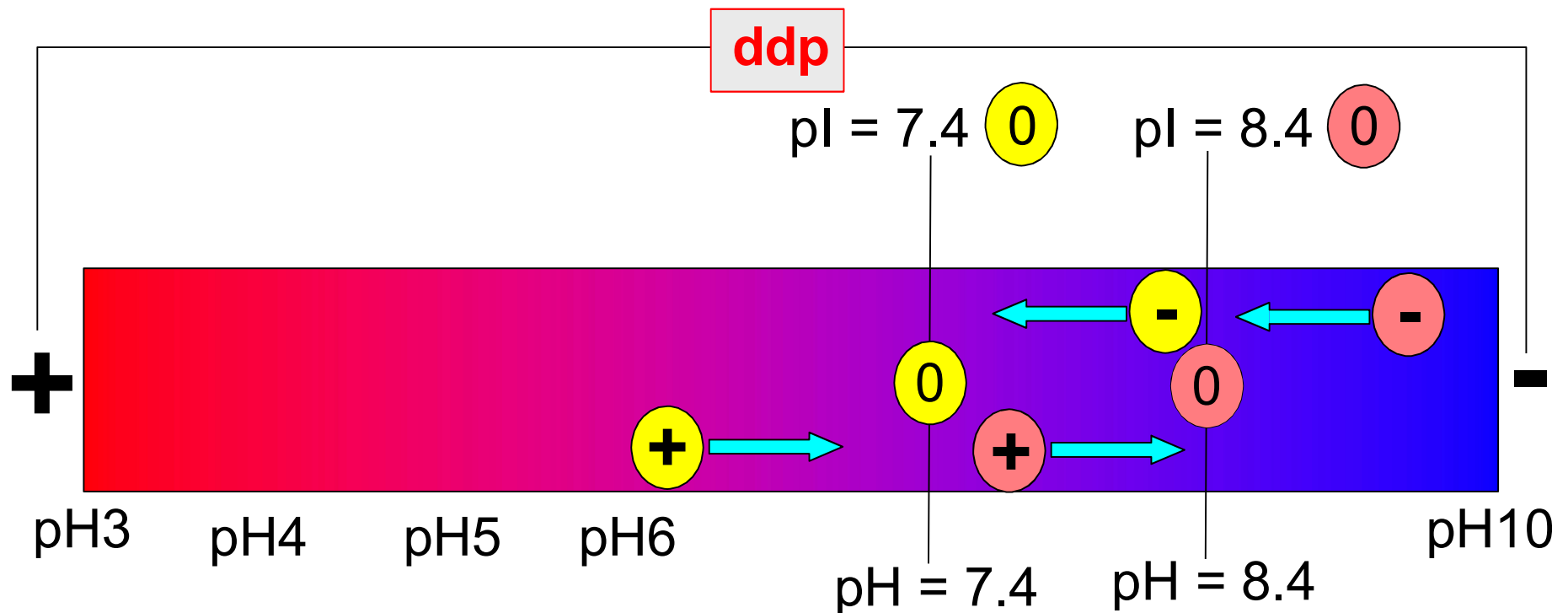
Separazione elettroforetica, nel cui campo elettrico, oltre al gradiente di potenziale, vi sia un **gradiente costante di pH**



Il gradiente di pH è tale da avere un pH più acido in corrispondenza dell'anodo e un pH più alcalino in corrispondenza del catodo.

FOCALIZZAZIONE ISOELETTRICA o ISOELETTROFOCALIZZAZIONE (IEF)

Separazione elettroforetica, nel cui campo elettrico, oltre al gradiente di potenziale, vi sia un **gradiente costante di pH**

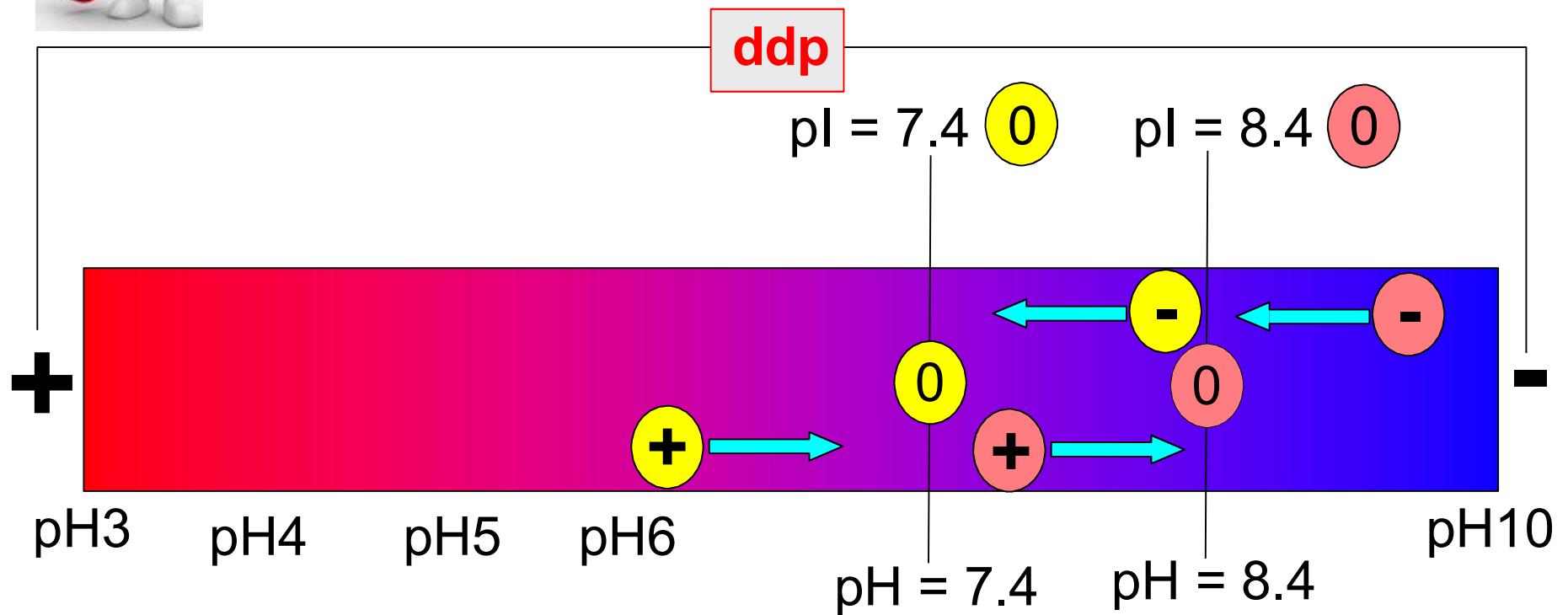


Il gradiente di pH è tale da avere un pH più acido in corrispondenza dell'anodo e un pH più alcalino in corrispondenza del catodo.

FOCALIZZAZIONE ISOELETTRICA o ISOELETTROFOCALIZZAZIONE (IEF)



Dove viene caricato il campione?



FOCALIZZAZIONE ISOELETRICA (IEF)

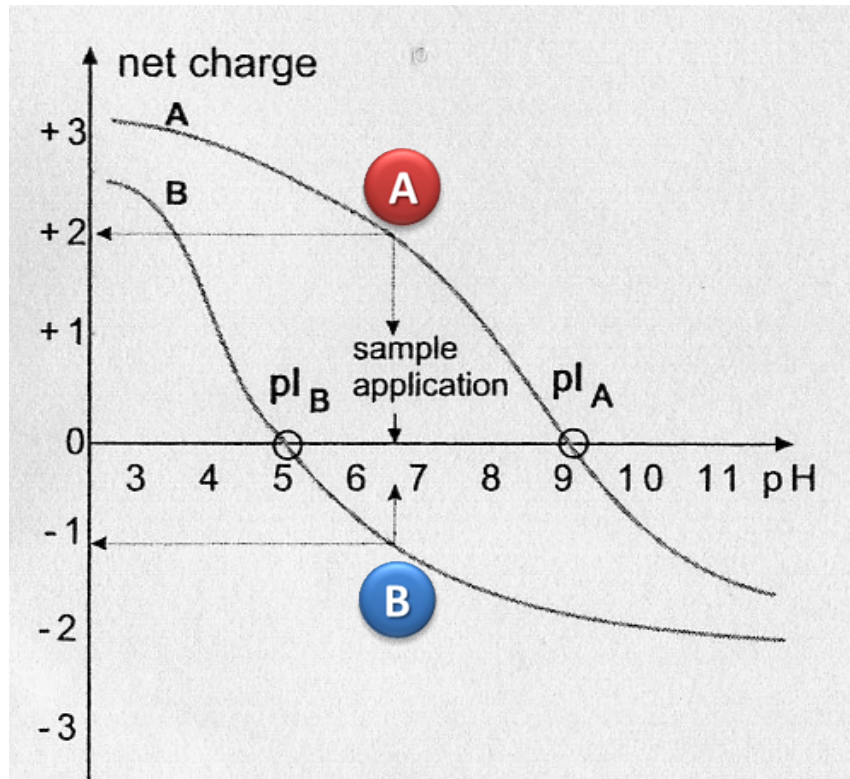


Fig. 6: The principle of isoelectric focusing. *Left:* Net charge curves of two model proteins A and B. At the point of application, A will have two positive, B will have one negative charge(s).

FOCALIZZAZIONE ISOELETRICA (IEF)

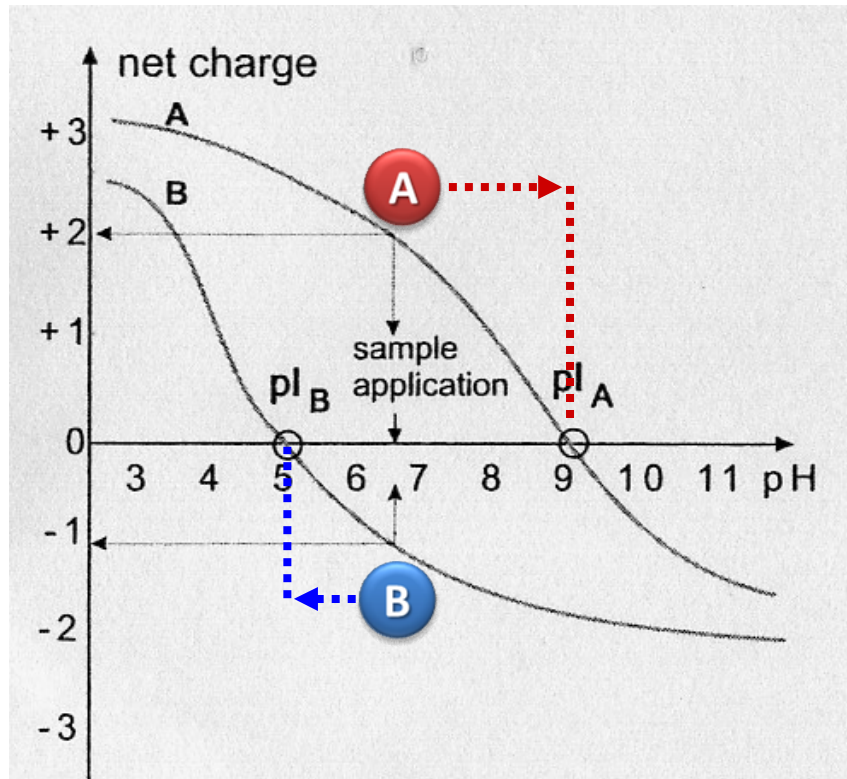
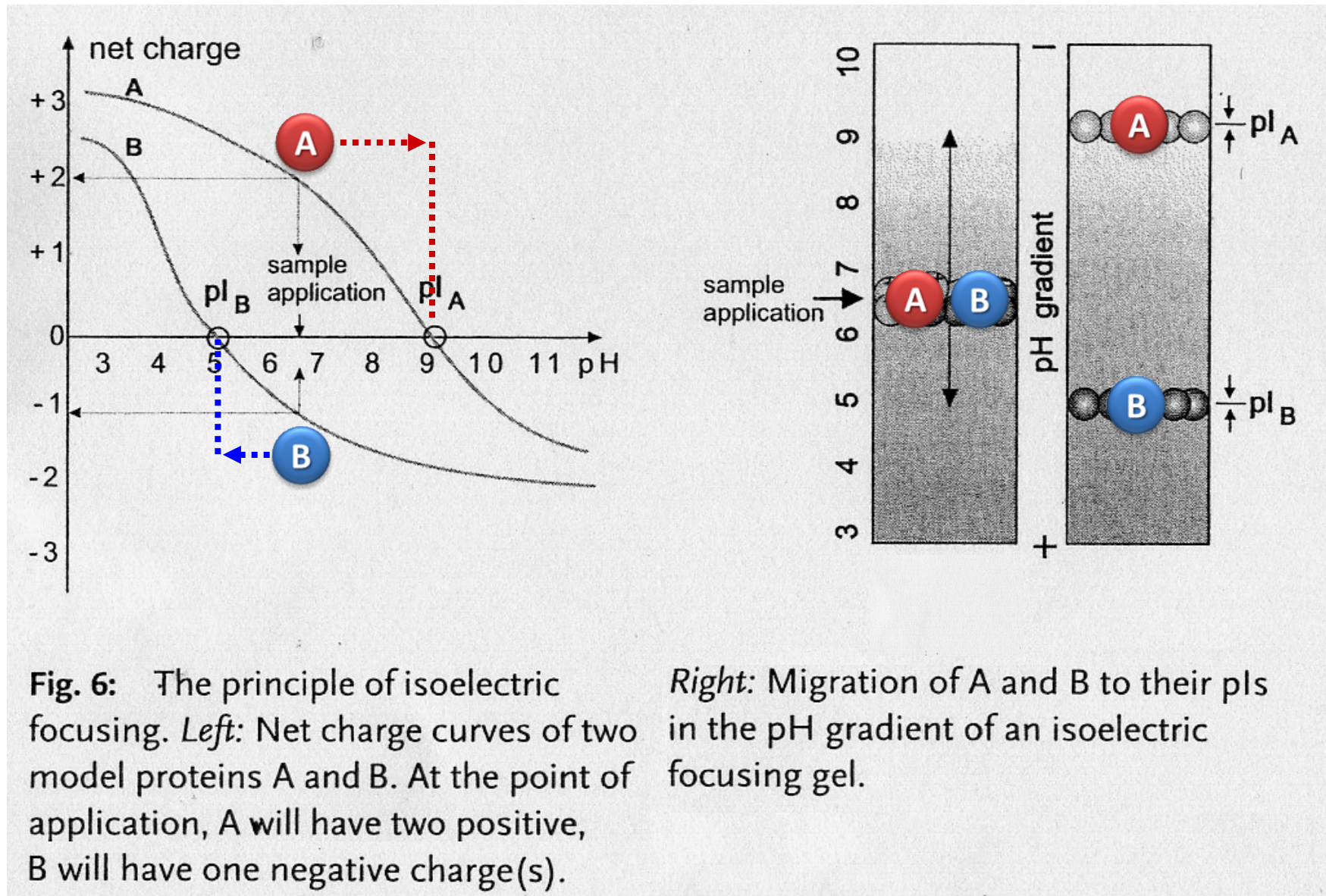


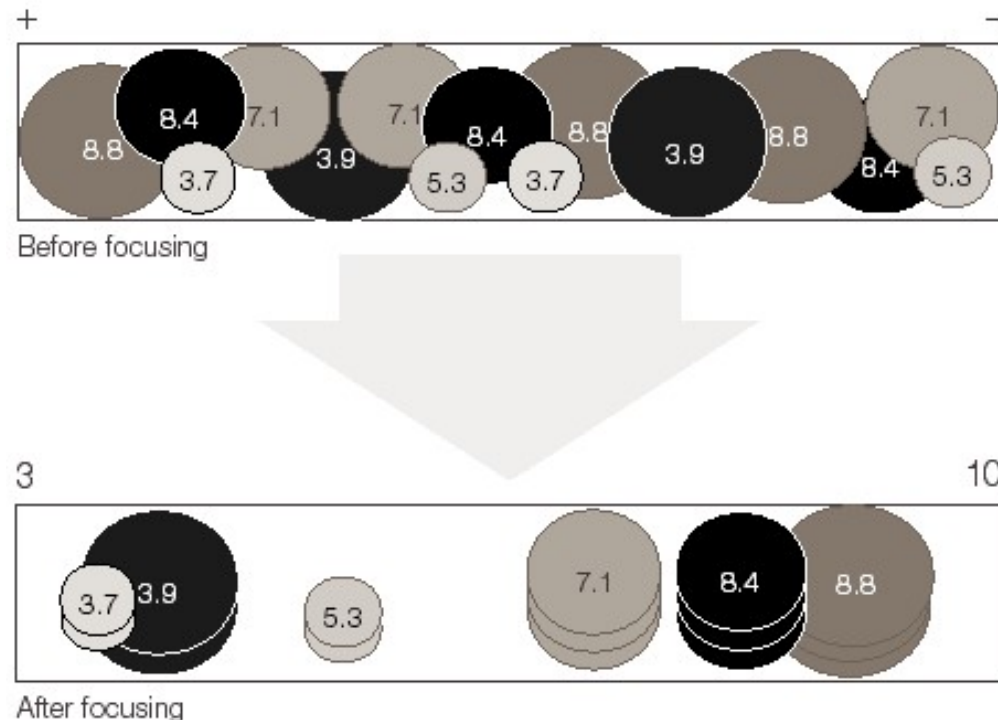
Fig. 6: The principle of isoelectric focusing. *Left:* Net charge curves of two model proteins A and B. At the point of application, A will have two positive, B will have one negative charge(s).

FOCALIZZAZIONE ISOELETRICA (IEF)



MIGRAZIONE DELLE PROTEINE IN IEF

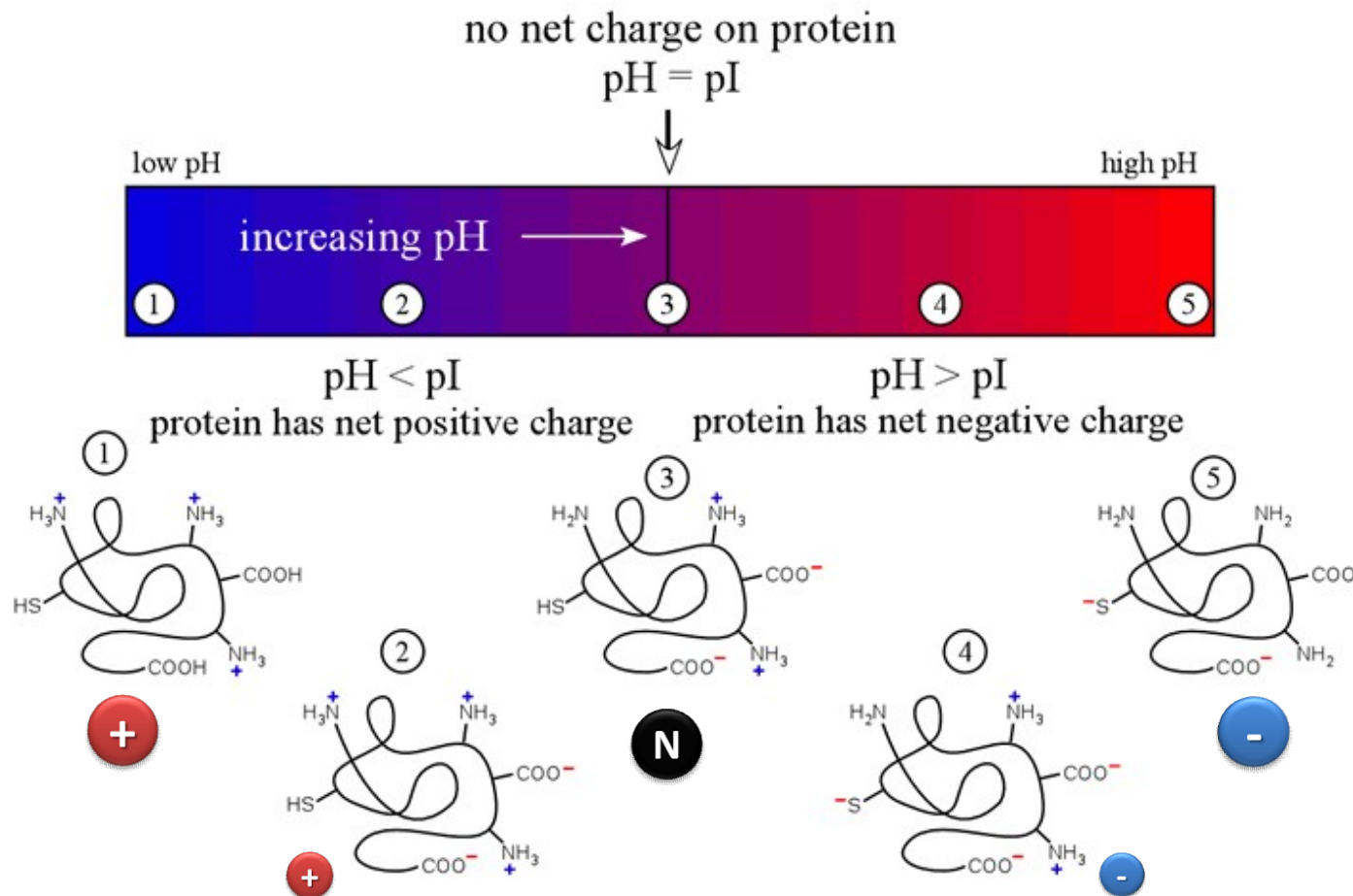
The presence of a pH gradient is critical to the IEF technique. In a pH gradient and under the influence of an electric field, a protein will move to the position in the gradient where its net charge is zero. A protein with a net positive charge will migrate toward the cathode, becoming progressively less positively charged as it moves through the pH gradient until it reaches its pI. A protein with a net negative charge will migrate toward the anode, becoming less negatively charged until it also reaches zero net charge. If a protein should diffuse away from its pI, it immediately gains charge and migrates back. This is the focusing effect of IEF, which concentrates proteins at their pIs and allows proteins to be separated on the basis of very small charge differences.



"Focusing effect": le proteine focalizzano (si concentrano) in una banda molto ristretta nel punto in cui $\text{pH} = \text{pI}$

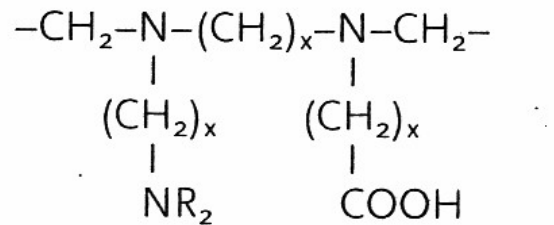
MIGRAZIONE DELLE PROTEINE IN IEF

The presence of a pH gradient is critical to the IEF technique. In a pH gradient and under the influence of an electric field, a protein will move to the position in the gradient where its net charge is zero. A protein with a net positive charge will migrate toward the cathode, becoming progressively less positively charged as it moves through the pH gradient until it reaches its pI. A protein with a net negative charge will migrate toward the anode, becoming less negatively charged until it also reaches zero net charge. If a protein should diffuse away from its pI, it immediately gains charge and migrates back. This is the focusing effect of IEF, which concentrates proteins at their pI and allows proteins to be separated on the basis of very small charge differences.



GRADIENTI DI pH

Generati da ANFOLITI

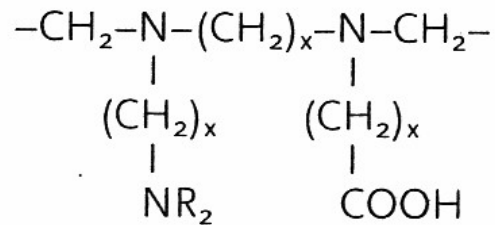


R = H or $\text{---(CH}_2\text{)}_x\text{---COOH}$, x = 2 or 3

- Composti con n variabile di gruppi amminici e carbossilici.
- Ciascuno ha un proprio pl, e quindi si muove fino alla zona in cui $\text{pH}=\text{pl}$
→ formazione del gradiente di pH
- **Vantaggio**: alta capacita tamponante al loro pl.
- **Svantaggi**: gradiente non stabile e influenzabile dalle molecole in analisi

GRADIENTI DI pH

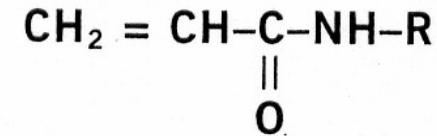
Generati da ANFOLITI



R = H or $\text{---(CH}_2\text{)}_x\text{---COOH}$, x = 2 or 3

- **Composti con n variabile di gruppi amminici e carbossilici.**
- Ciascuno ha un proprio pI, e quindi si muove fino alla zona in cui $\text{pH}=\text{pI}$
→ formazione del gradiente di pH
- **Vantaggio:** alta capacita tamponante al loro pI.
- **Svantaggi:** gradiente non stabile e influenzabile dalle molecole in analisi

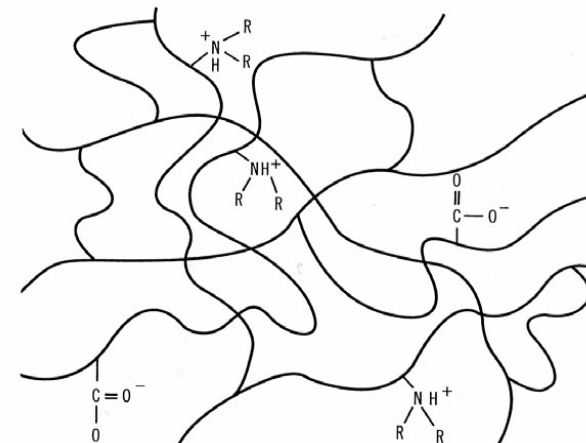
IMMOBILIZZATI



R = *weakly acidic or basic buffering group*

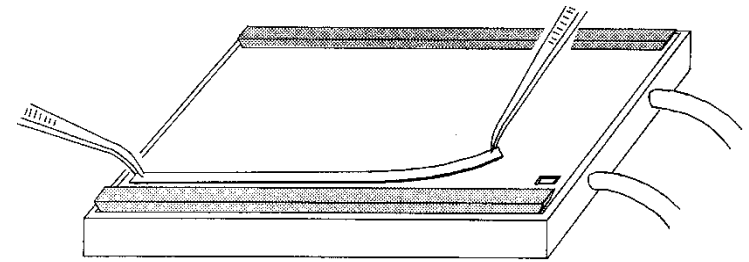
- Derivati dell'acrilamide (**Immobiline**)
- Generano **gradienti stabili** di pH grazie a gruppi R carichi legati in modo covalente a monomeri di acrilamide.

R = gruppi carbossilici od amminici (pKa da 0.8 a 4.6 / pKa da 6.2 a 12).



IEF ORIZZONTALE SU GEL

Tecnica di elezione per la IEF: sottili lastre di gel vengono montate su vetro o plastica.



Il gel (**bassa []**) deve presentare un gradiente di pH.

Dopo la corsa le proteine vengono rivelate per **colorazione**.



Prima occorre **lavare** e **contemporaneamente** precipitare le proteine con un **fissante** (10% acido tricloroacetico **TCA**).

Colorazione (es. blu di Coomassie).

FOCALIZZAZIONE ISOELETTRICA (IEF)

Tipico supporto

IPG strip: **I**mmobilized **pH** **G**radient



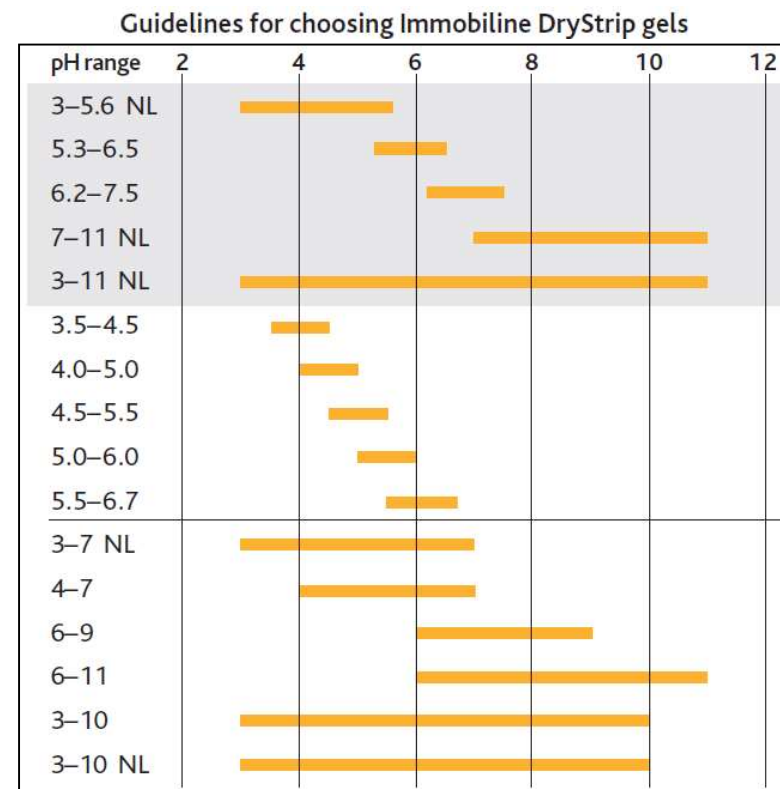
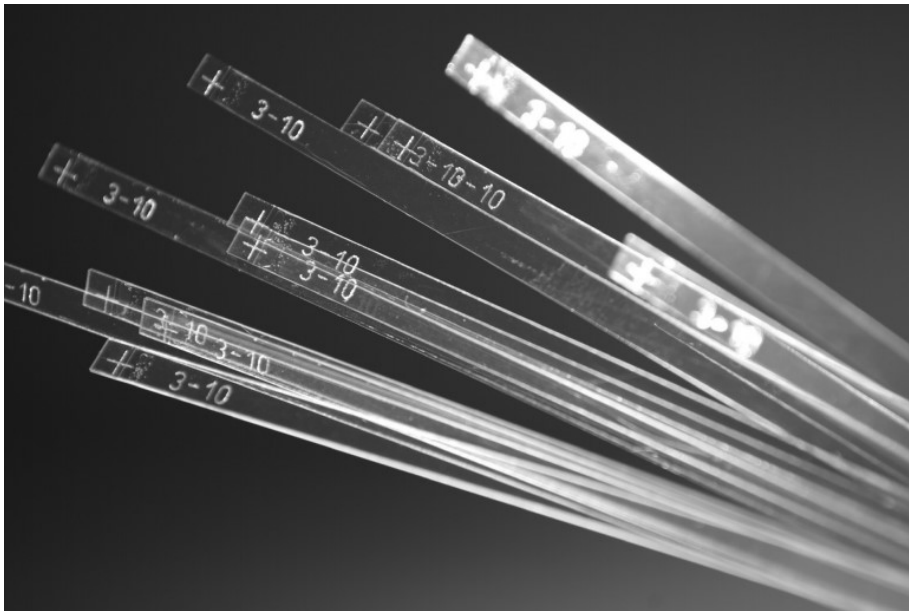
Tipica **strip** di un gel di PAA.

GRADIENTI DI pH IMMOBILIZZATI

Immobilized pH Gradient (IPG)

I gel recanti i gradienti di pH immobilizzati sono di solito disidratati e **devono essere reidratati** in opportune condizioni.

I gel vengono messi in contatto con una **soluzione di reidratazione** (con o senza **campione** all'interno):



SOLUZIONE DI REIDRATAZIONE E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Soluzione di reidratazione (rehydration solution o rehydration buffer):

- 8 M Urea**
(agente denaturante) Solubilizza e denatura le proteine rompendo i ponti idrogeno intra- e inter-molecolari
Denaturazione → ogni proteina ha una sola ed unica conformazione.
- 0.5-4% CHAPS**
(Detergente) Detergente zwitterionico usato per solubilizzare le proteine (in particolare idrofobiche), rompere interazioni idrofobiche e incrementare la solubilità proteica al relativo punto isoelettrico.
- 20-100 mM DTT**
(Agente riducente) Agente riducente necessario per rompere i ponti disolfuro S-S e mantenere le proteine in forma ridotta.
- Anfoliti carrier** Per assicurare uniformità nel campo elettrico e mantenere in soluzione le proteine, soprattutto a livello del pI.

Temperatura: mantenuta attorno ai 20 °C, a + alta T (>37 °C)
l'urea modifica le proteine, a + bassa T l'urea cristallizza.

SOLUZIONE DI REIDRATAZIONE E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Soluzione di reidratazione (rehydration solution o rehydration buffer):

Solo nel tampone di preparazione dei campioni

Inibitori di Proteasi:

Anche se le condizioni utilizzate per la preparazione del campione sono denaturanti, alcuni enzimi proteolitici riescono a rimanere attivi (degradazione durante le fasi che precedono la corsa elettroforetica).

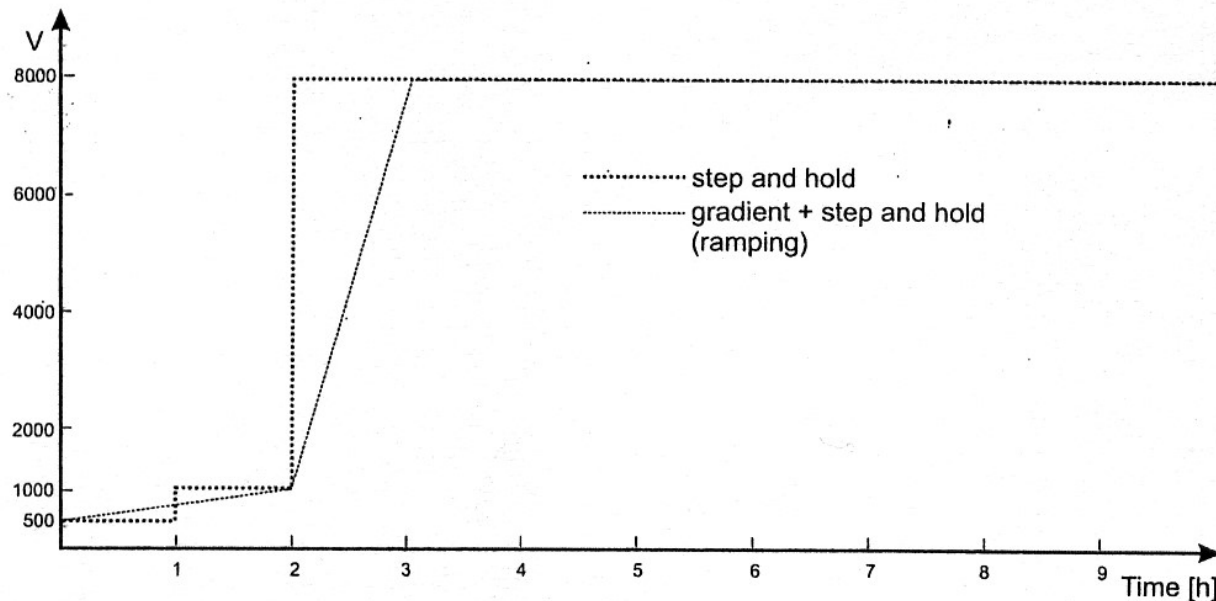
A tale scopo è utile includere nel tampone di estrazione / preparazione del campione degli inibitori di proteasi (solitamente venduti sotto forma di cocktails pronti all'uso).

Protease inhibitor	Target	Recommended working concentration
APMSF	Plasma serine proteases	10–20 μM
Aprotinin	Serine proteases	0.01–0.3 μM
Bestatin	Aminopeptidases	40 $\mu\text{g/mL}$
Dichloroisocoumarin	Serine proteases	1–43 $\mu\text{g/mL}$
Disodium EDTA	Metalloproteases	100 μM
E-64	Thiol proteases	1.4–2.8 μM
Leupeptin	Serine and thiol proteases	1 μM
Pepstatin	Acidic proteases	1 μM
PMSF	Serine proteases	100–1000 μM
Phosphoramidon	Thermolysin Collagenase Metalloendoproteases	7–569 μM
TLCK.HCl	Trypsin Thiol proteases	37–50 $\mu\text{g/mL}$
TPCK	Chymotrypsin Thiol proteases	70–100 $\mu\text{g/mL}$

Per evitare la degradazione proteolitica del campione si aggiungono **cocktails di inibitori**.

DDP APPLICATE

La ddp viene **aumentata progressivamente**



Generatori molto potenti



Necessario perché nelle prime fasi della IEF vengano trasportati al di fuori del gel gli **ioni** presenti nel campione (e nei tamponi) o **contro-ioni** dei gruppi acidi o basici del gel.