

# FOCALIZZAZIONE ISOELETTRICA (IEF) E ELETTROFORESI 2-D

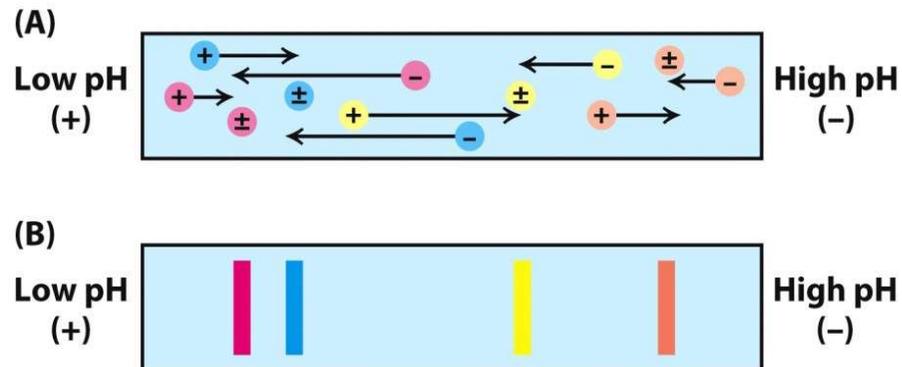
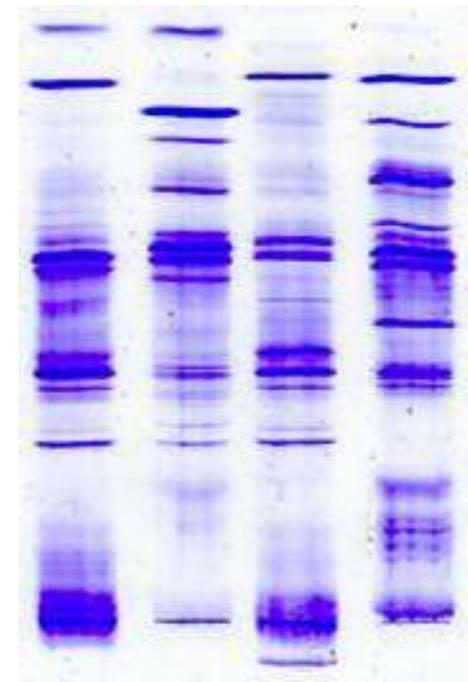
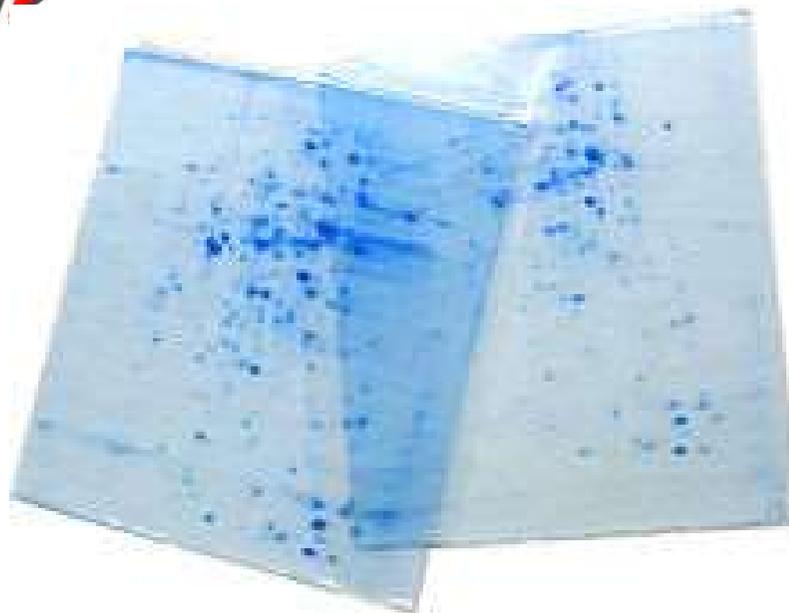


Figure 3.11  
Biochemistry, Seventh Edition  
© 2012 W. H. Freeman and Company

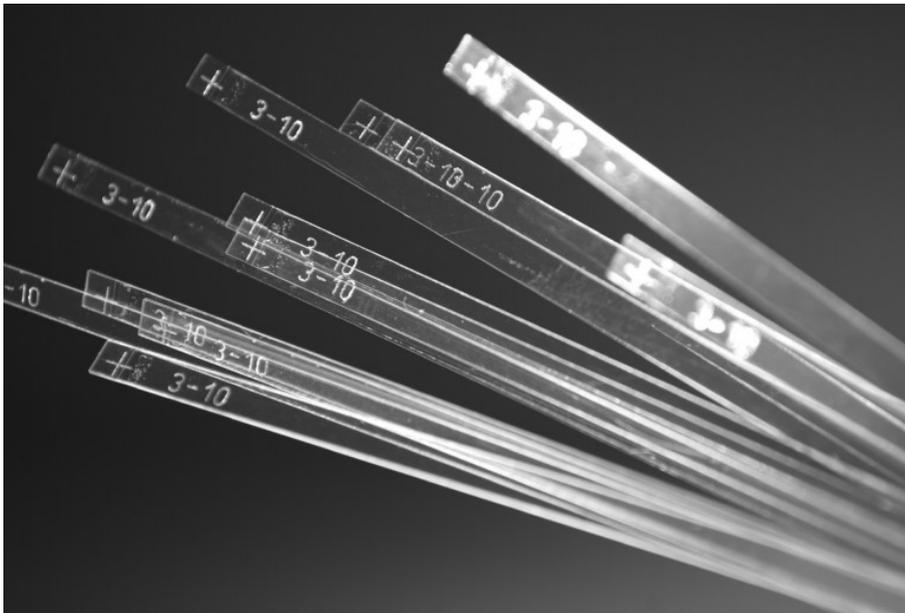


# GRADIENTI DI pH IMMOBILIZZATI

## 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):



Guidelines for choosing Immobiline DryStrip gels

pH range	2	4	6	8	10	12
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		—	—	—	—	

# 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).

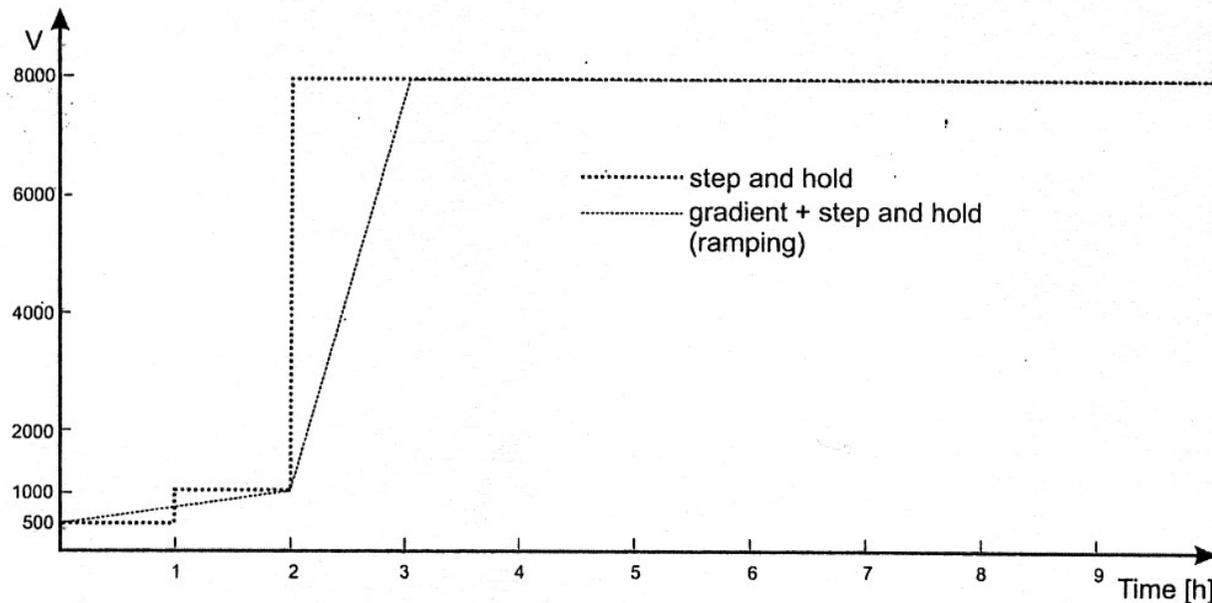
A tale scopo è utile includere nel tampone di estrazione / preparazione del campione degli inibitori di proteasi (solitamente venduti sotto forma di cocktails pronti all'uso).

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

## TERMINE DELLA IEF

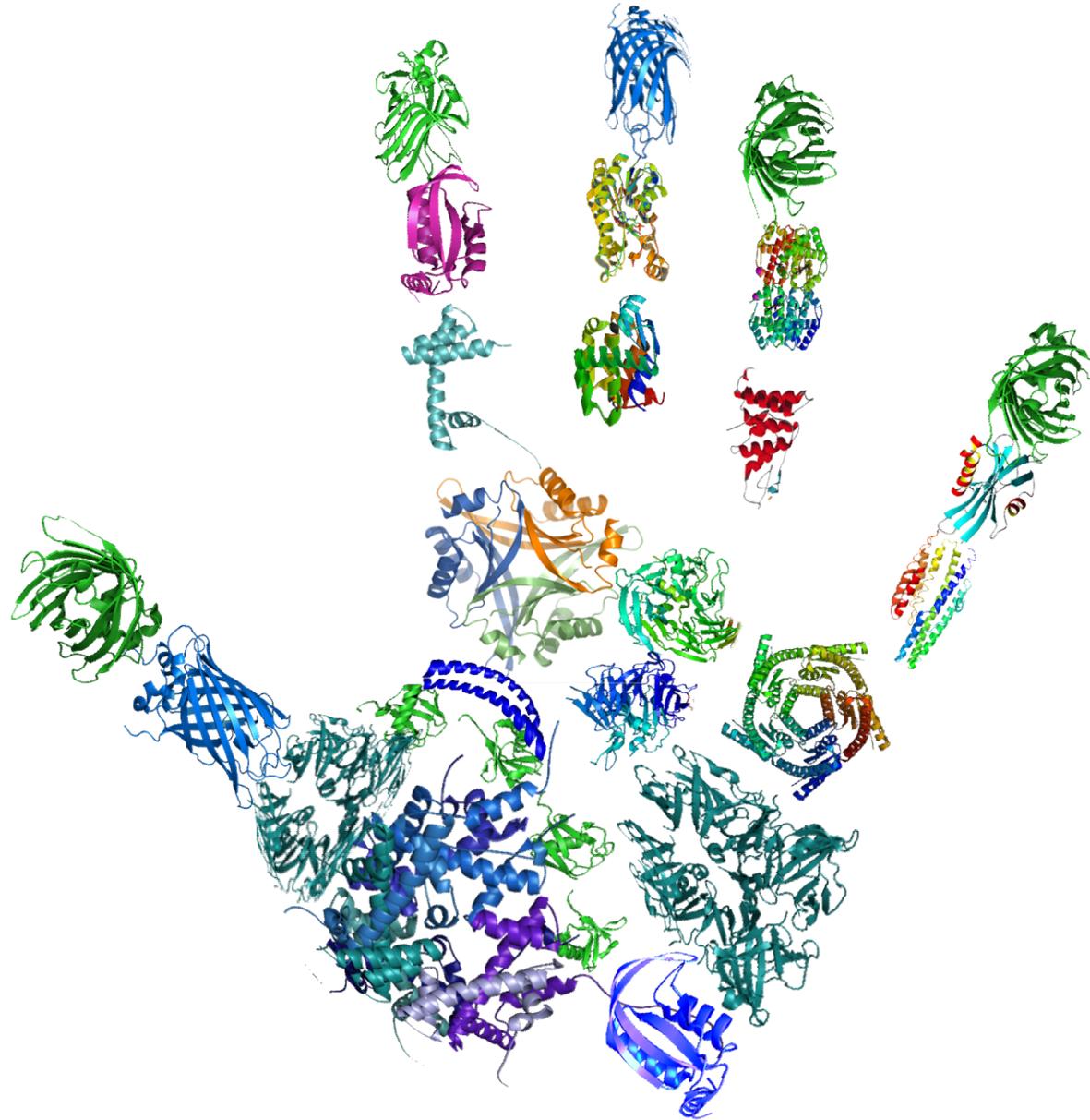
A) Possono essere trattate subito per la seconda dimensione.

B) **Congelamento**: lavaggio delle strip in H<sub>2</sub>O (immerse una decina di volte in un becker contenente H<sub>2</sub>O), scolate su un pezzo di carta e messe a congelare (-80 °C) in un contenitore ove siano appoggiate sul loro supporto di plastica.

*(la seconda dimensione può essere corsa in un altro momento)*

Anche nel caso si possano correre subito, è consigliabile **congelare sempre le strip**. Aumenta la **riproducibilità** del metodo (IMPORTANTE: STESSA OPERAZIONE PER OGNI STRIP CHE SI VUOLE CONFRONTARE!)

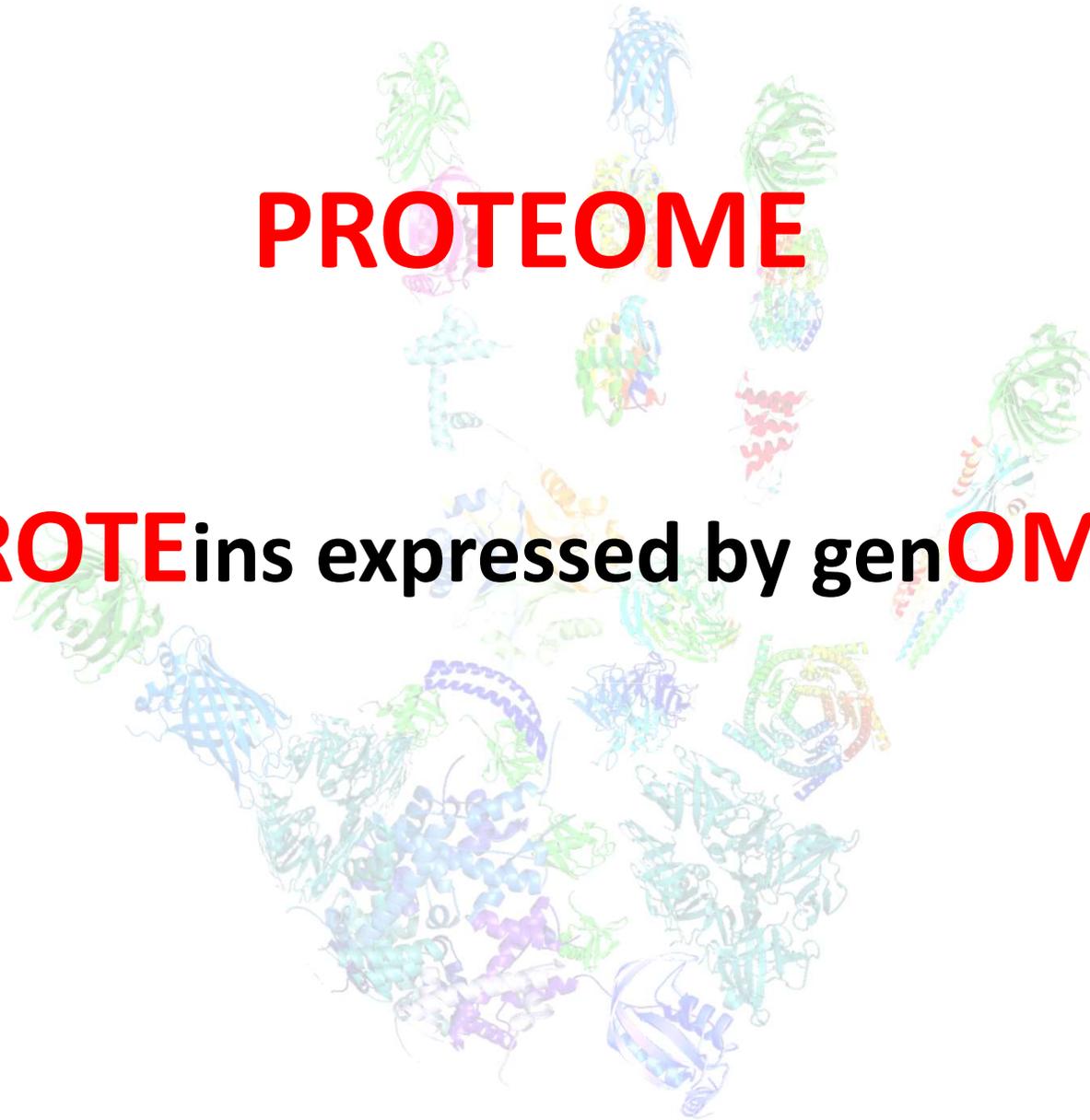
# PROTEOMICA



# PROTEOMICA

## PROTEOME

**PROTE**ins expressed by gen**OME**



# PROTEOMA E PROTEOMICA

L'approccio genomico non considera le possibili

**modificazioni post-traduzionali**

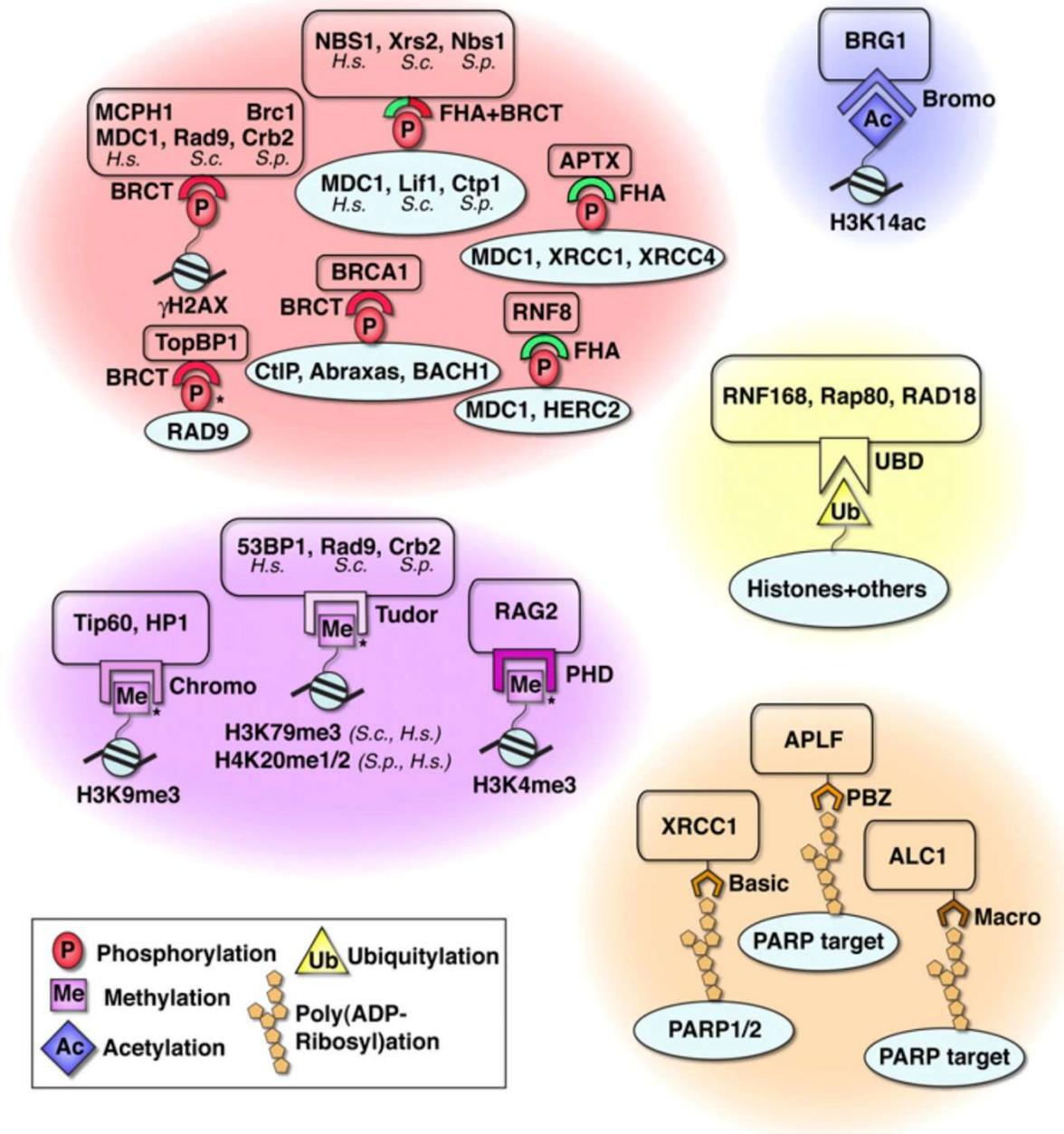
che tutte le proteine degli organismi superiori posseggono

## APPROCCIO PROTEOMICO

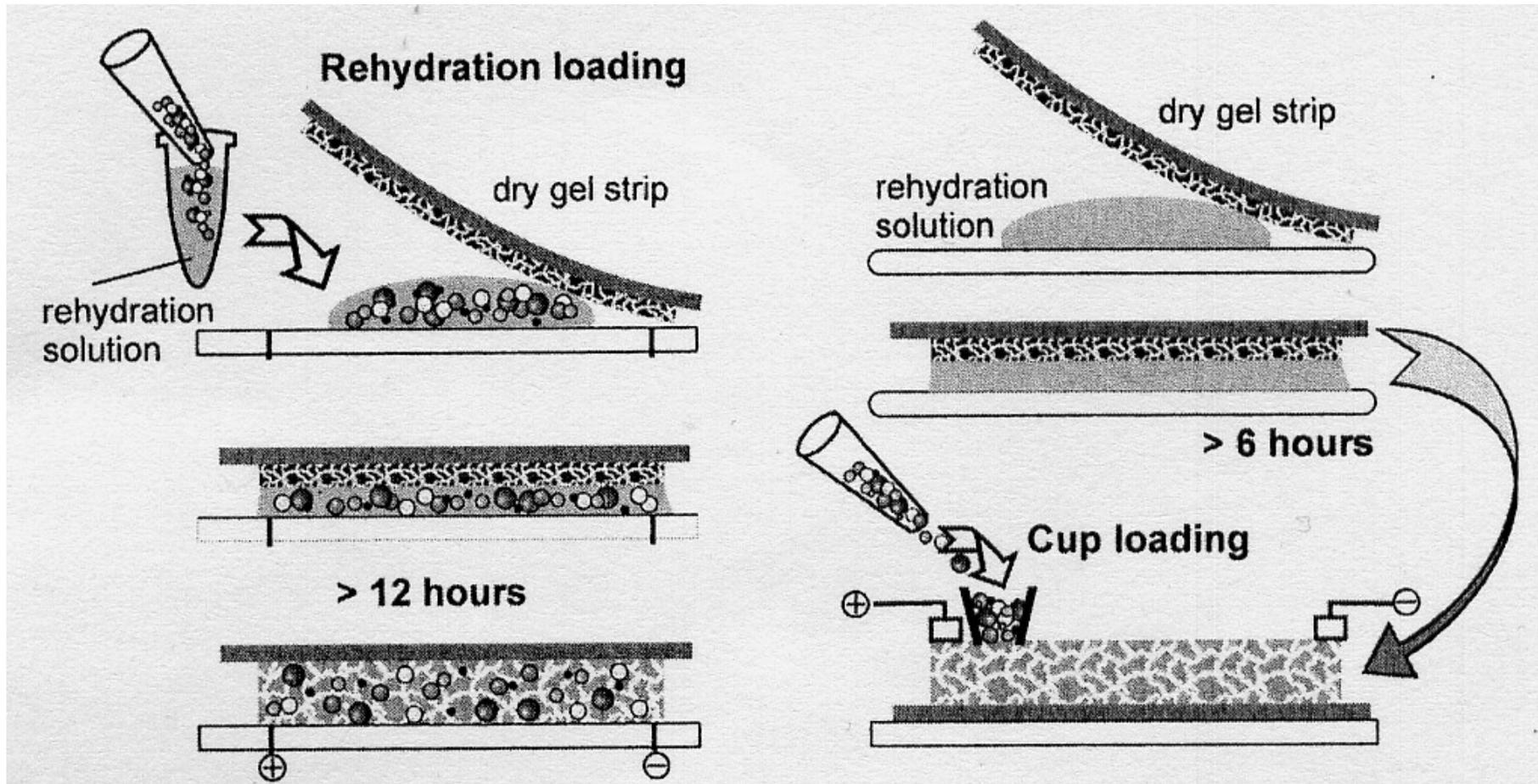
Ricerca proteine in un lisato cellulare o in estratto tissutale la cui **espressione differenziale** è determinata da fattori come

1. Processi patologici
2. Delezioni o over-espressioni geniche
3. Trattamenti farmacologici
4. Stimolazioni chimiche e fisiche
5. Rimozione di nutrienti o di ossigeno

# post-translational modifications (PTMs) induce large variation in protein migration



# 1° DIMENSIONE: IEF – Differenze nel caricamento



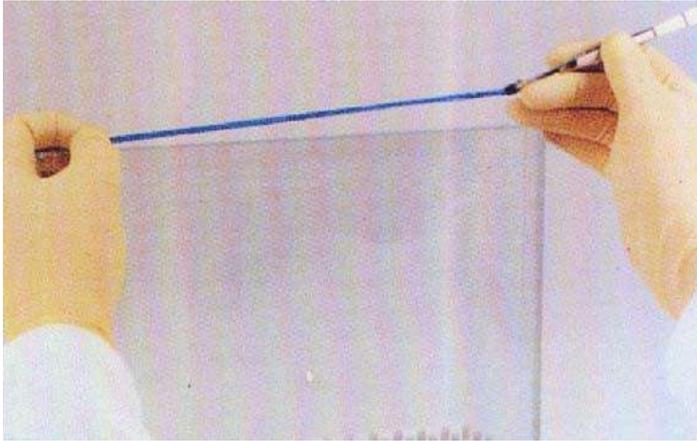
## Rehydration loading

- Campione diluito in rehydration buffer e applicato nello strip holder, dove il gel viene applicato a testa in giù per 12 h.
- Il gel, che era secco, si rigonfia alle dimensioni originarie e, nello stesso tempo, le proteine del campione, presenti in soluzione, entrano nel gel grazie ai pori larghi del gel.
- Per la corsa il gel viene coperto con un apposito olio per evitare l'evaporazione del campione.

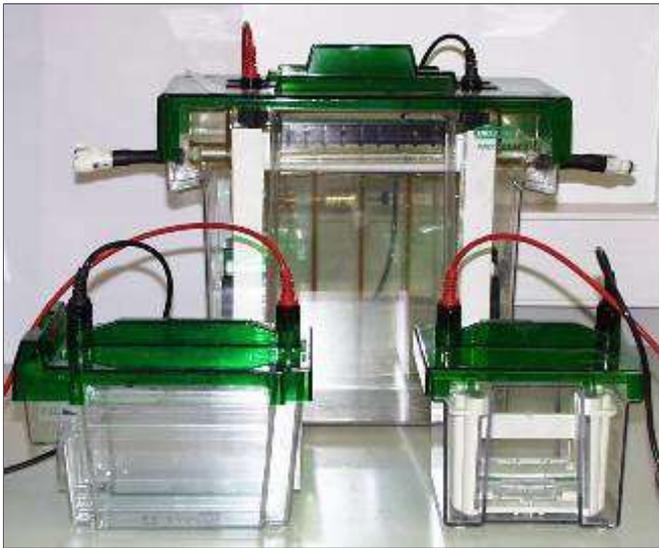
## Cup loading

- Gel reidratato con procedura analoga a quella utilizzata per il caricamento a reidratazione (con la sola differenza che non c'è campione proteico durante tale fase).
- Al termine della reidratazione, il gel viene collocato capovolto (gel verso l'alto) in un'apposita vaschetta.
- Sul gel viene collocato un apposito applicatore dentro il quale viene caricato il campione.

## 2° DIMENSIONE

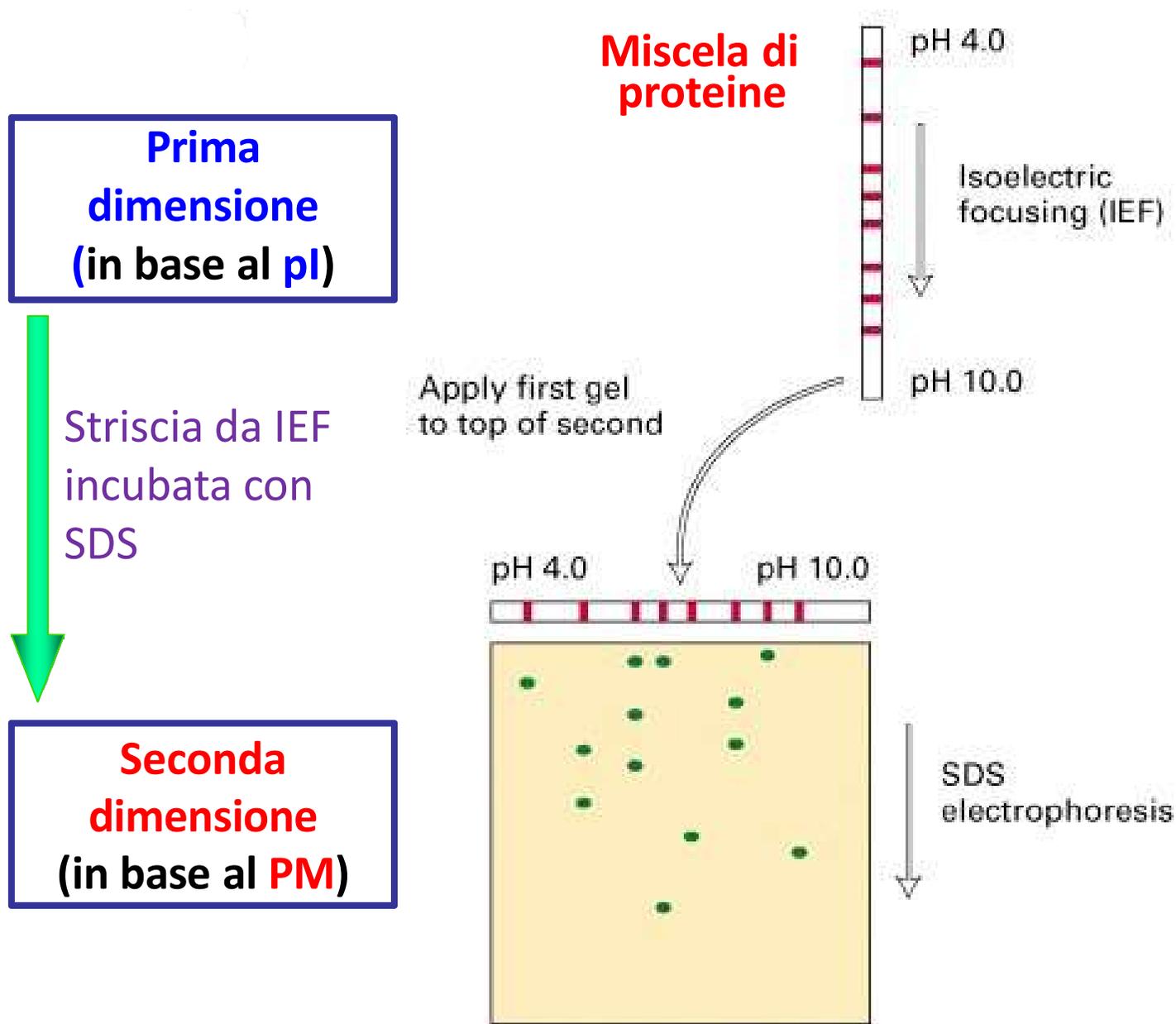


Equilibratura e  
trasferimento del gel  
per IEF sulla sommità  
del gel di PAA  
(2° dimensione)



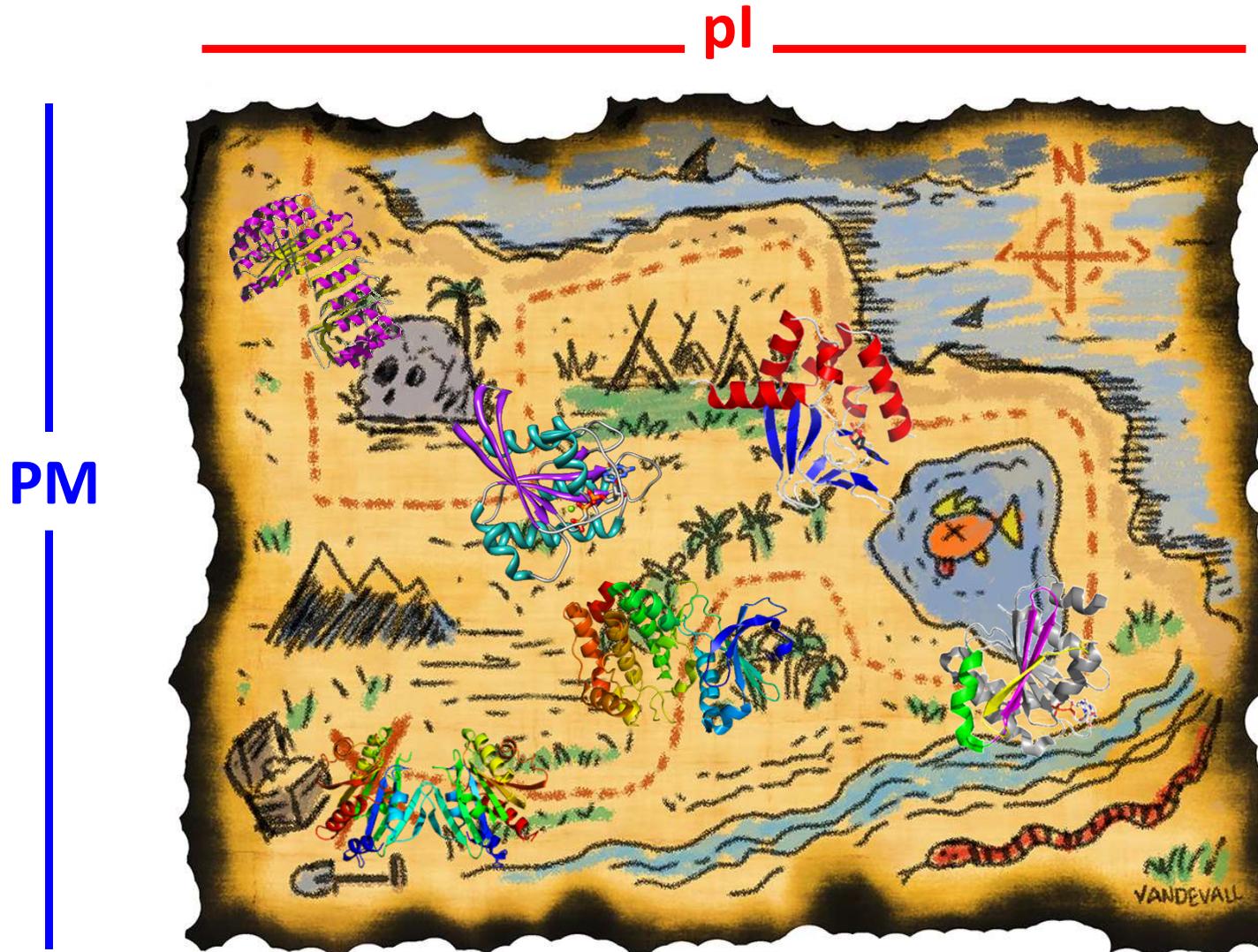
Assemblamento del gel di PAA nella camera per la 2° dimensione

# ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE O 2-D

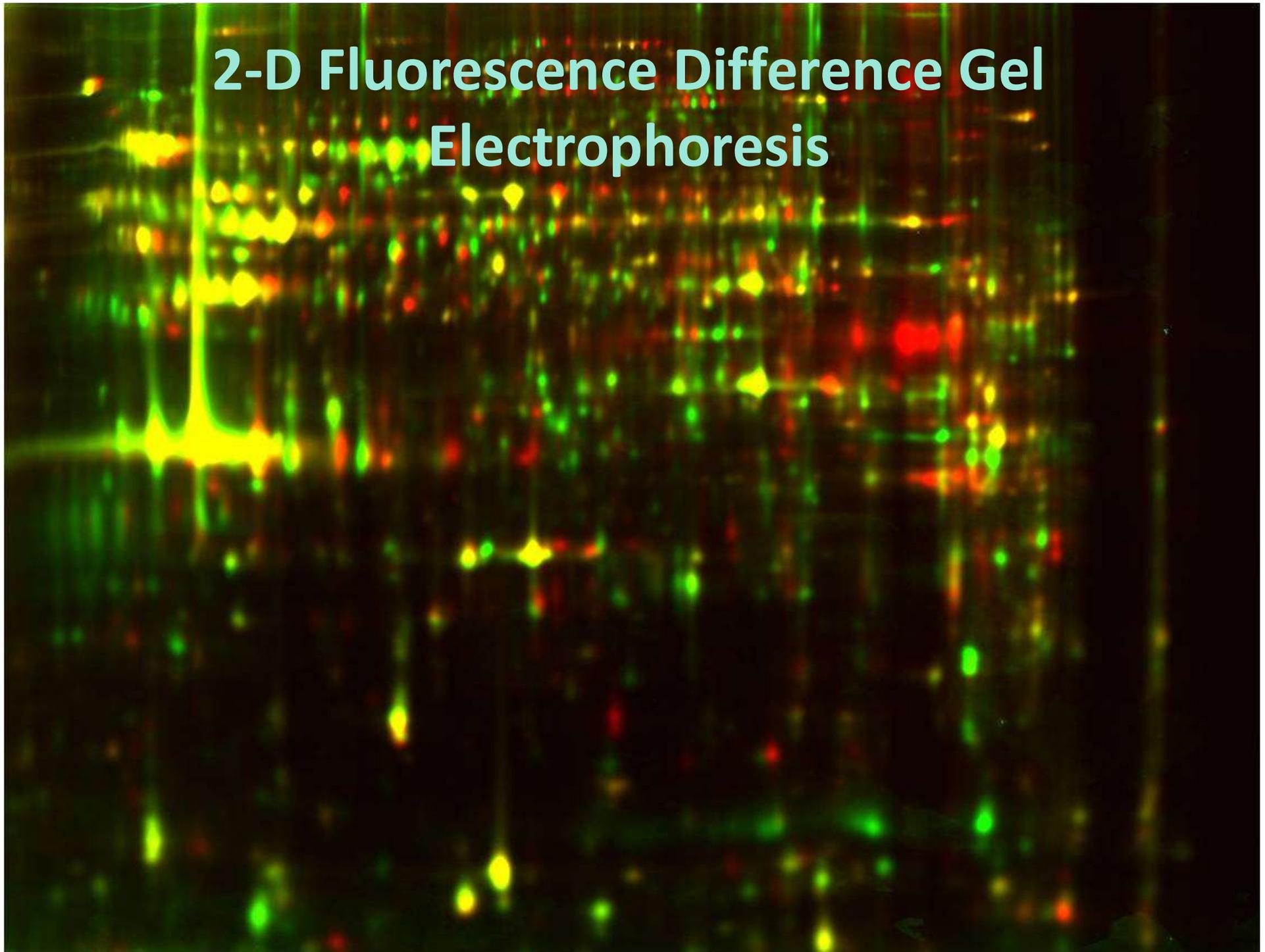


# RISULTATO DI UNA ELETTROFORESI 2-D

Il risultato è una mappa avente come coordinate **pI** e **PM**



# 2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis



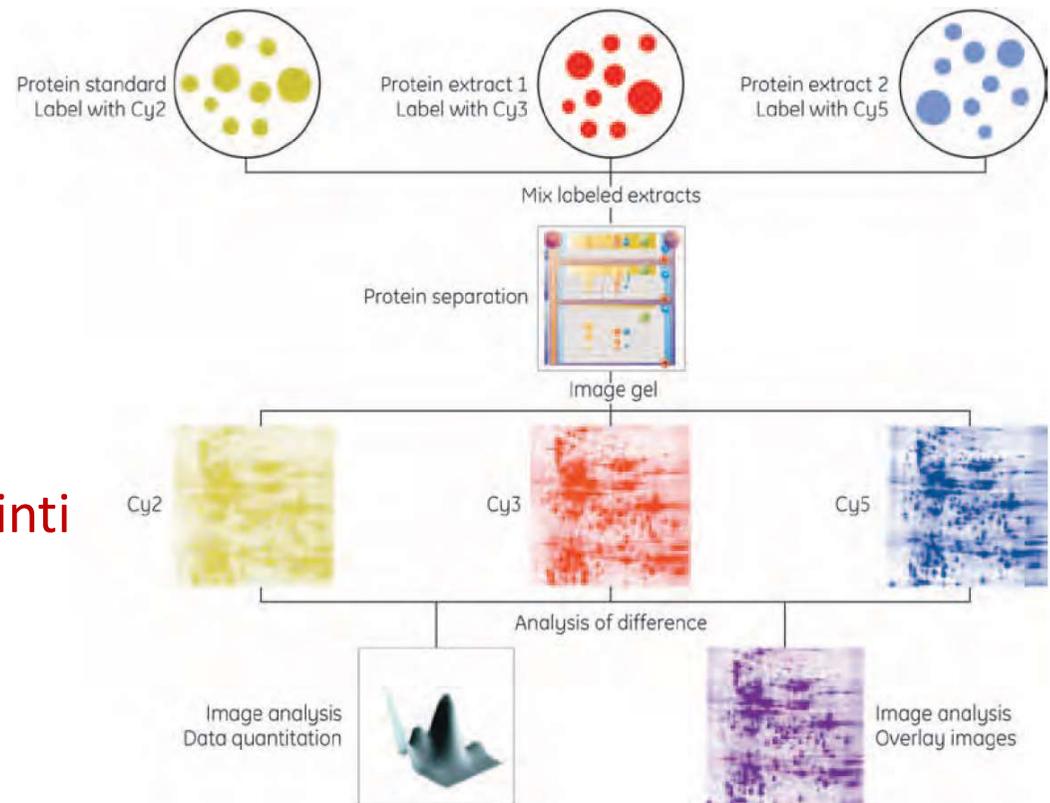
# 2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (2-D DIGE)

Possibilità di analisi in **multiplexing**

- **Marcatura** delle proteine **prima** dell'elettroforesi **2-D**.
- Analisi fino a 3 campioni (es. 2 campioni + riferimento/controllo)

## **Fluorocromi:**

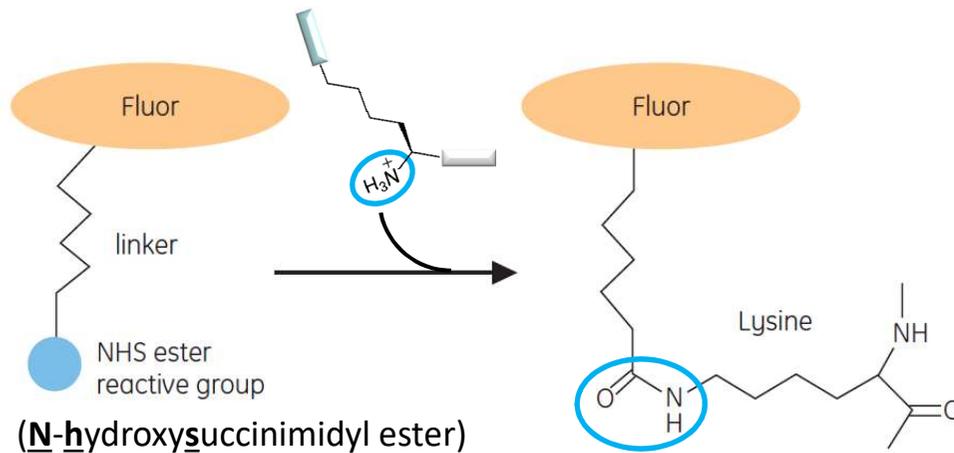
- **Spettri** (e quindi segnali) ben **distinti**
- **Insensibili** alle variazioni di **pH**
- **Fotostabili**



**Proteine identiche** migreranno nella **stessa posizione** all'interno del gel 2-D

# 2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (2-D DIGE)

## Marcatura dei campioni



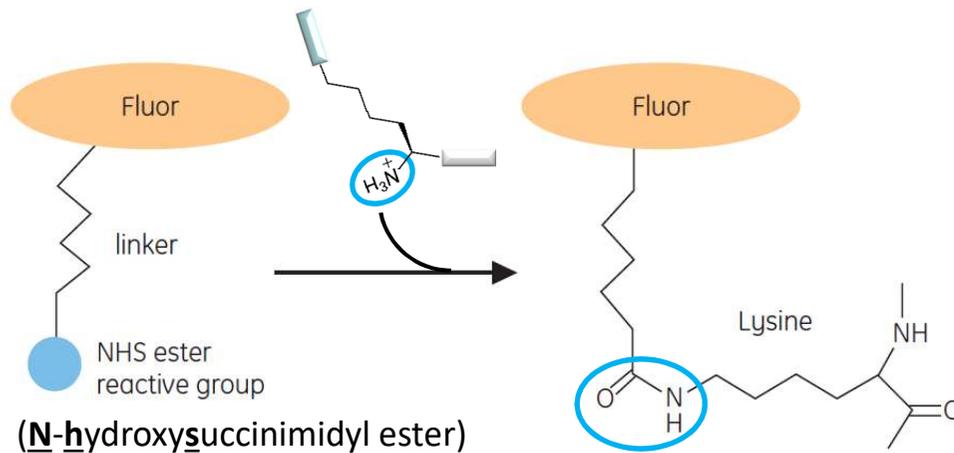
Gruppi reattivi che formano **legami covalenti** (legami amidici) con gli ammino gruppi  $\epsilon$  di **residui di lisina**

Il fluorocromo ha carica + che "bilancia" quella persa dalla lisina

→ il pI non viene modificato

# 2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (2-D DIGE)

## Marcatura dei campioni

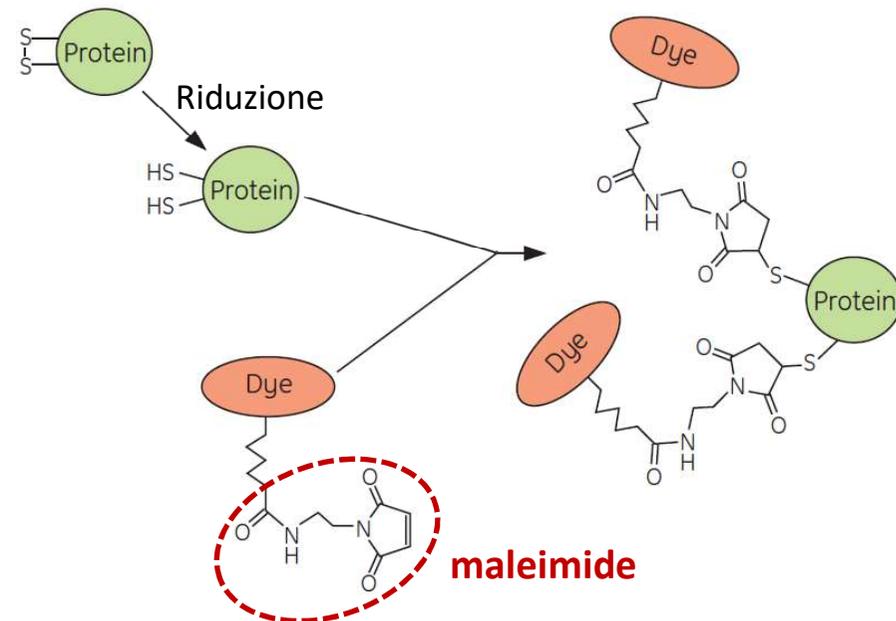


Gruppi reattivi che formano **legami covalenti** (legami amidici) con gli ammino gruppi  $\epsilon$  di **residui di lisina**

Il fluorocromo ha carica + che "bilancia" quella persa dalla lisina

→ il pI non viene modificato

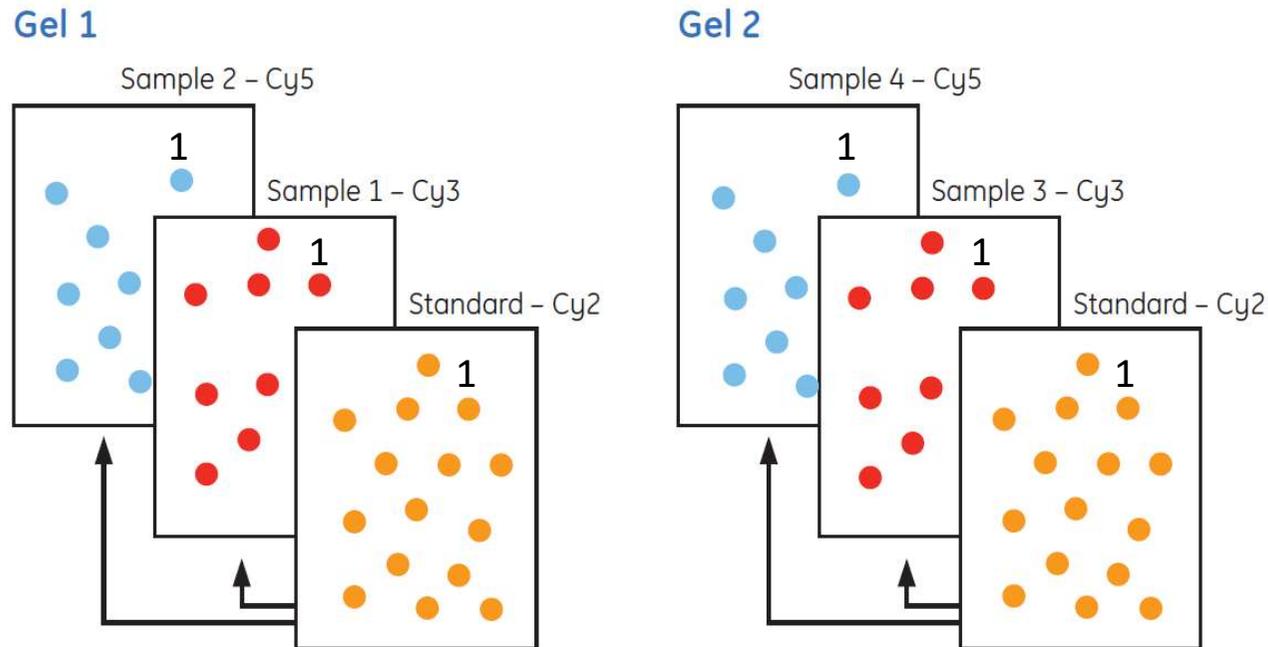
Fluorocromi coniugati con **maleimide** formano **legami covalenti** reagendo con i **tioli liberi (-SH)** di **residui di cisteina** a formare complessi proteina-fluorocromo



# 2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (2-D DIGE)

## Analisi campione-controllo

Analisi relative tra campioni in uno stesso gel e il controllo interno (standard)



Proteina 1 (campione 1) : Proteina 1 (standard)  
Proteina 1 (campione 2) : Proteina 1 (standard)

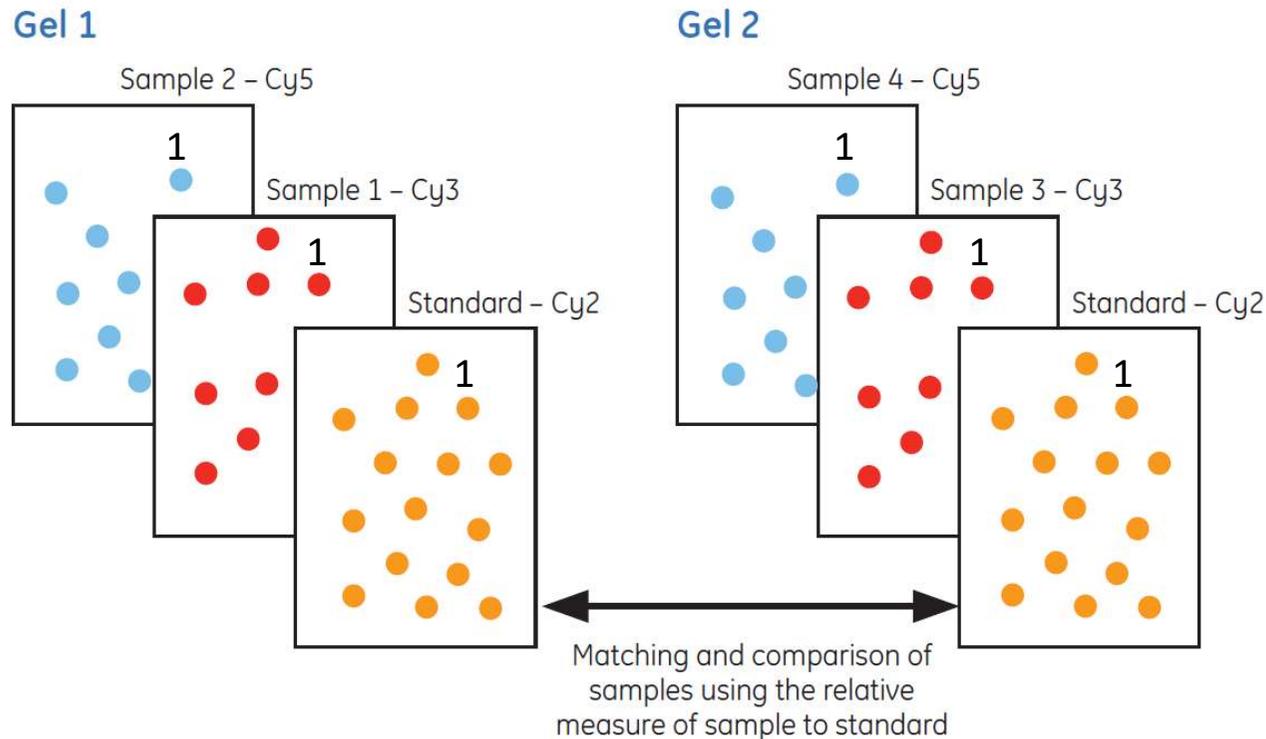
Proteina 1 (campione 3) : Proteina 1 (standard)  
Proteina 1 (campione 4) : Proteina 1 (standard)

I **livelli** di ogni singola **proteina** vengono espressi come **rapporto** relativo tra gli spot del **campione** e gli spot dello **standard** interno

# 2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (2-D DIGE)

## Analisi tra più campioni

Analisi relative tra campioni su gel diversi



Il **rapporto** tra ogni **campione** e lo **standard** interno viene utilizzato per comparare i **livelli** delle **proteine** tra campioni su **gel diversi**.