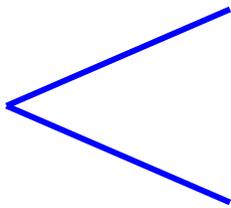
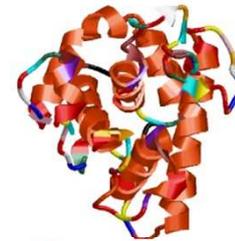


ELETTROFORESI DI PROTEINE

Molto più complessa della separazione elettroforetica di DNA.

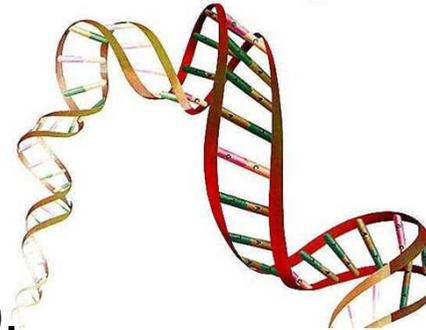
fortissime variazioni  forma delle proteine
cariche delle proteine

La > parte dei campioni di **PROTEINE**



Aa medio:
110 Da

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).

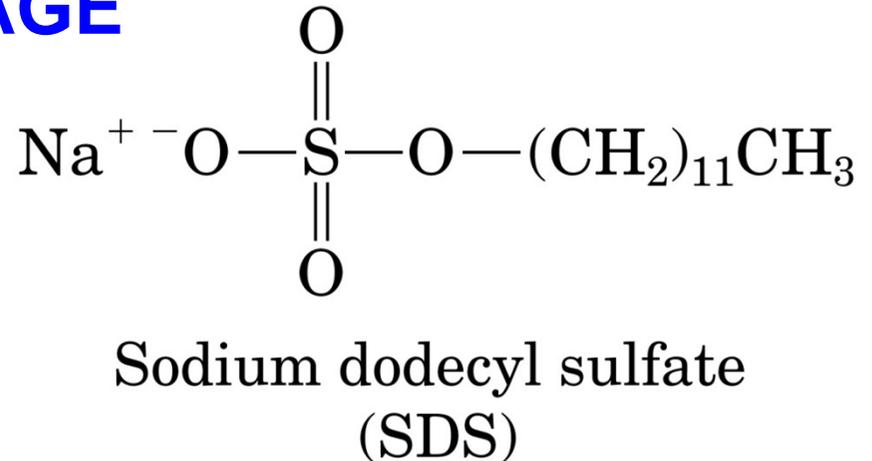


Paio di
nucleotidi
medio:
650 Da

ELETTROFORESI DI PROTEINE

SDS-PAGE

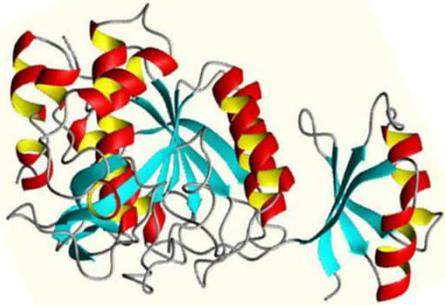
SDS = Detergente anionico
che denatura le proteine
conferendovi la stessa
densità di carica (negativa)



- **β -Mercaptoetanol** **HS-CH₂CH₂OH**
 - rompe eventuali legami disolfuro, riducendoli.
- **Temperatura (5' a 100 °C)**
 - accelera la denaturazione completa

Proteine così trattate assumono struttura filamentosa

DENATURAZIONE



Denaturazione

Calore

Agenti riducenti

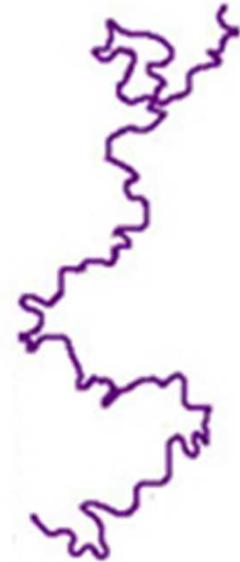
Detergenti ionici

Congelamento

Alte concentrazioni saline

Processo che porta a:

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

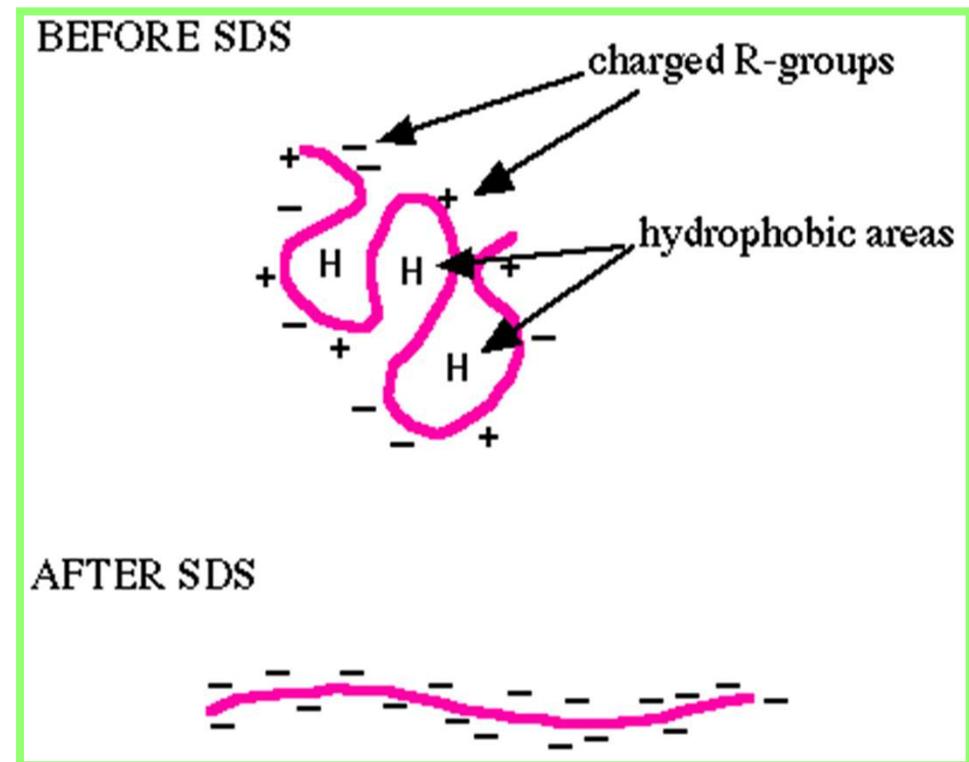


VANTAGGI DELLA SDS-PAGE

- I **complessi proteina-SDS** sono altamente carichi e **tutti negativi** (vanno all'anodo).

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

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



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

SDS-PAGE IN PRATICA

2 gel di PAA sovrapposti

gel di impaccamento

(concentrazione delle proteine)

gel di corsa

(separazione delle proteine in base al loro PM)

Sample buffer:

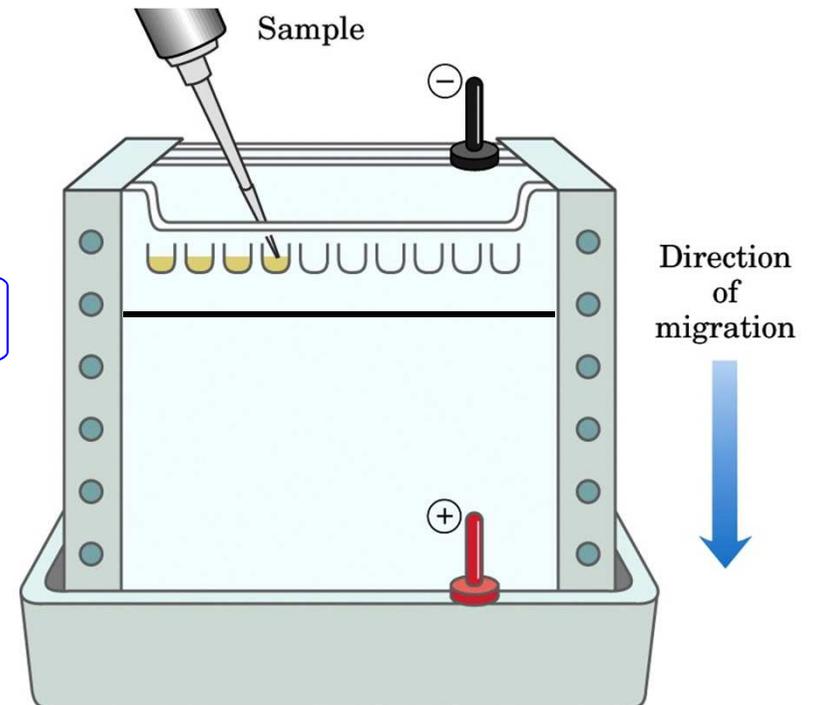
Tris-HCl a pH 6.8

SDS

addensante [Saccarosio o glicerolo]

tracciante [Blu di bromofenolo]

riducente [β -mercaptoetanololo]

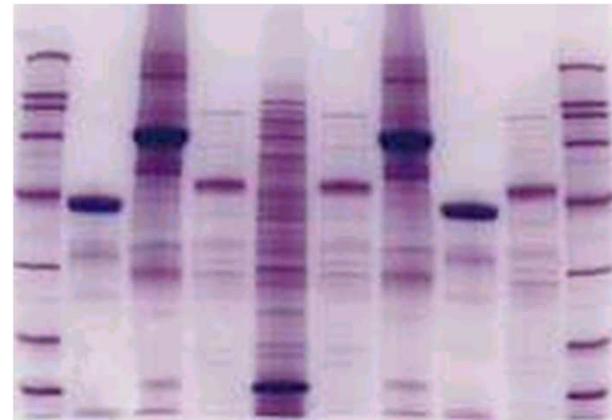


NOTA BENE

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

Coloranti per proteine:

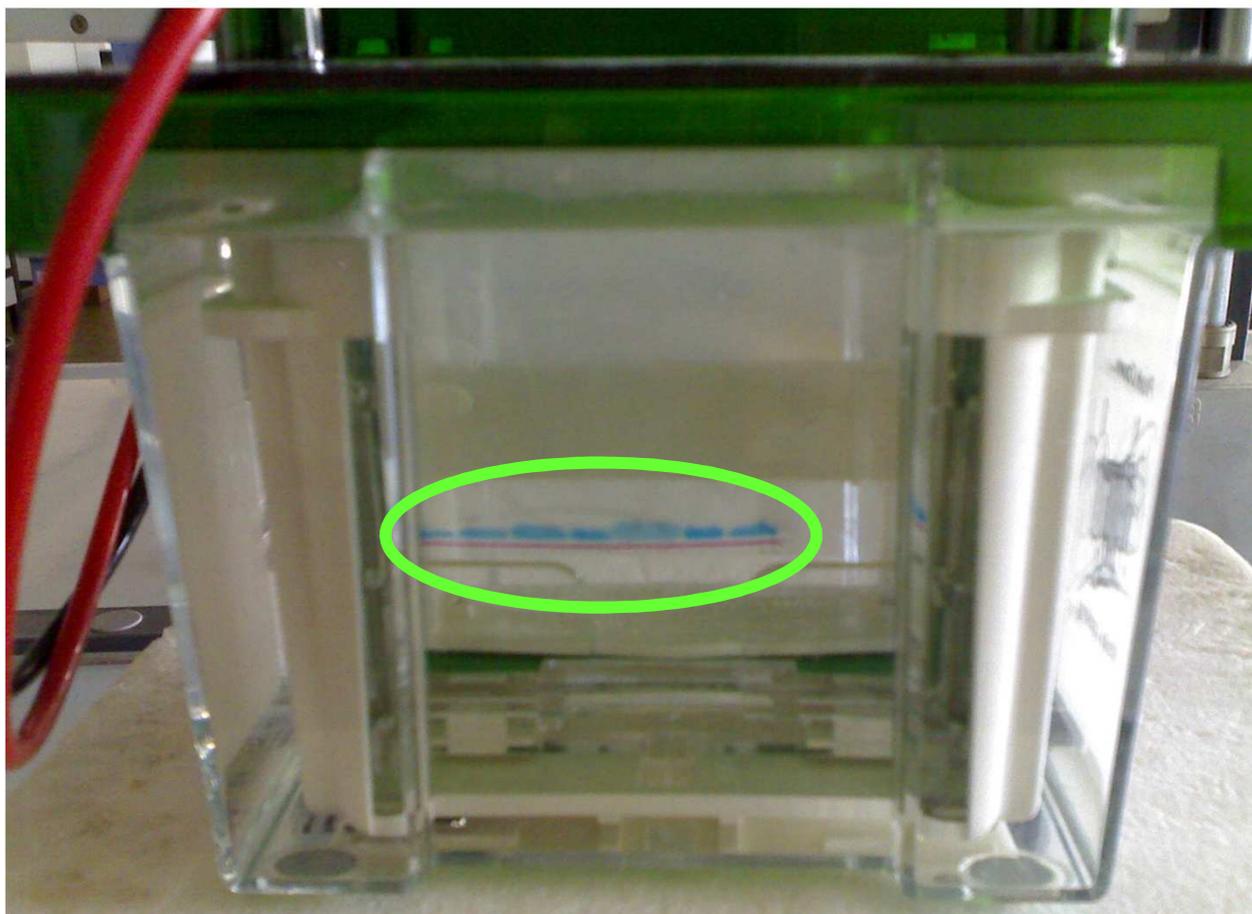
– Coomassie Blue



– Argento



TRACCIANTI ELETTROFORETICI



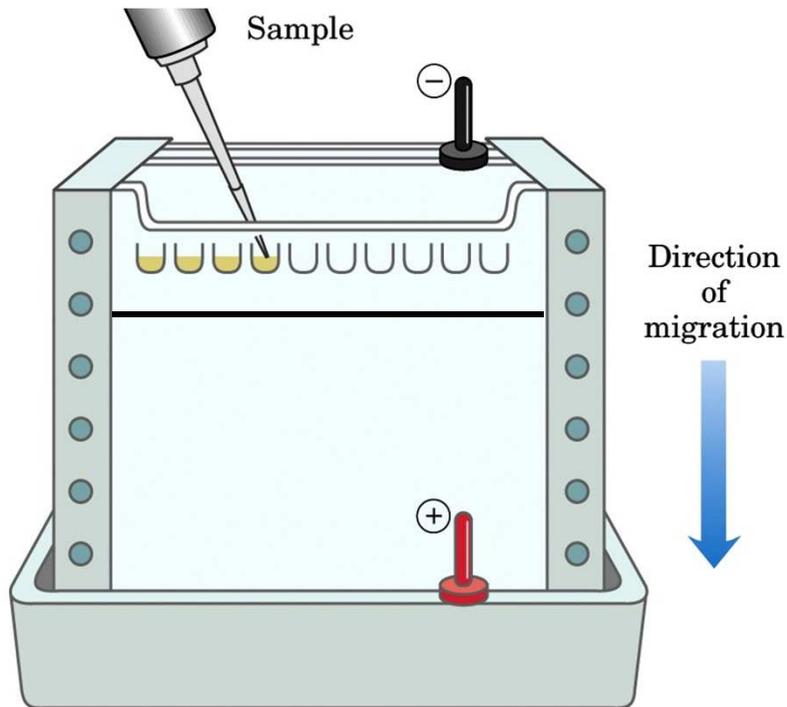
Tampone di corsa:

Tris 25 mM

SDS 3.5 mM

Glicina 190 mM

SDS-PAGE: I 2 GEL



Gel di impaccamento

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

Gel di corsa

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

ISOTACOFRESI

ione glicinato (-, PI = 6.06):
presente nel tampone
elettroforetico.

Cl⁻: nel gel e nel campione.

μ :

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

Al passaggio di corrente tutte le specie ioniche devono migrar con **uguale velocità**;
le tre specie variano le loro concentrazioni in modo che:

[Cl⁻] > **[proteine-SDS]** > **[glicinato]**

ISOTACOFRESI

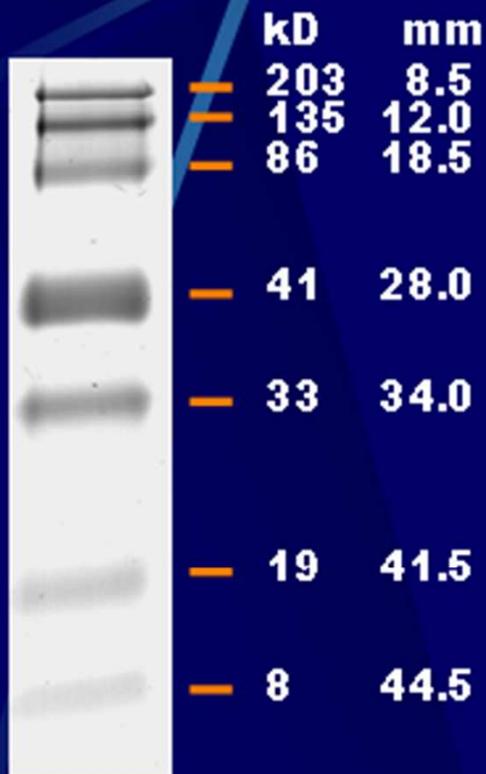
E' una tecnica elettroforetica eseguita su un gel con porosità elevata 4% acrilammide che permette alle proteine di muoversi liberamente e di concentrarsi e di impaccarsi sotto l'effetto di un campo elettrico. Si utilizza ad esempio un tampone tris-glicina HCl ad un pH 6,8 in cui la glicina è poco mobile (a causa della vicinanza al suo punto isoionico circa 6). L'effetto assottigliamento è dovuto agli ioni di glicinato (carichi negativamente) che hanno una mobilità elettroforetica inferiore sia al campione che all'Cl⁻ più veloce che nella corsa elettroforetica sarà in testa.

Quando viene applicata la corrente, tutte le specie ioniche devono migrare alla stessa velocità altrimenti si verifica l'interruzione del "circuito" elettrico. La separazione avviene in funzione della mobilità elettroforetica della particella, i più mobili in questo fronte uniforme staranno davanti. Questa tecnica permette di avere le frazioni ben definite e schiacciate.

Gli ioni glicinato possono muoversi alla stessa velocità dei Cl⁻ solo se sono in una regione con un campo elettrico più forte.

L'intensità del campo è inversamente proporzionale alla conduttività, che a sua volta è proporzionale alla concentrazione. Il risultato è che le tre specie di interesse (Cl⁻, proteine, Glicinato) variano la propria concentrazione in modo che Cl⁻ > proteina > Glicinato. Poiché le proteine sono in piccola quantità, tendono a concentrarsi in una banda molto stretta tra glicinato e Cl⁻.

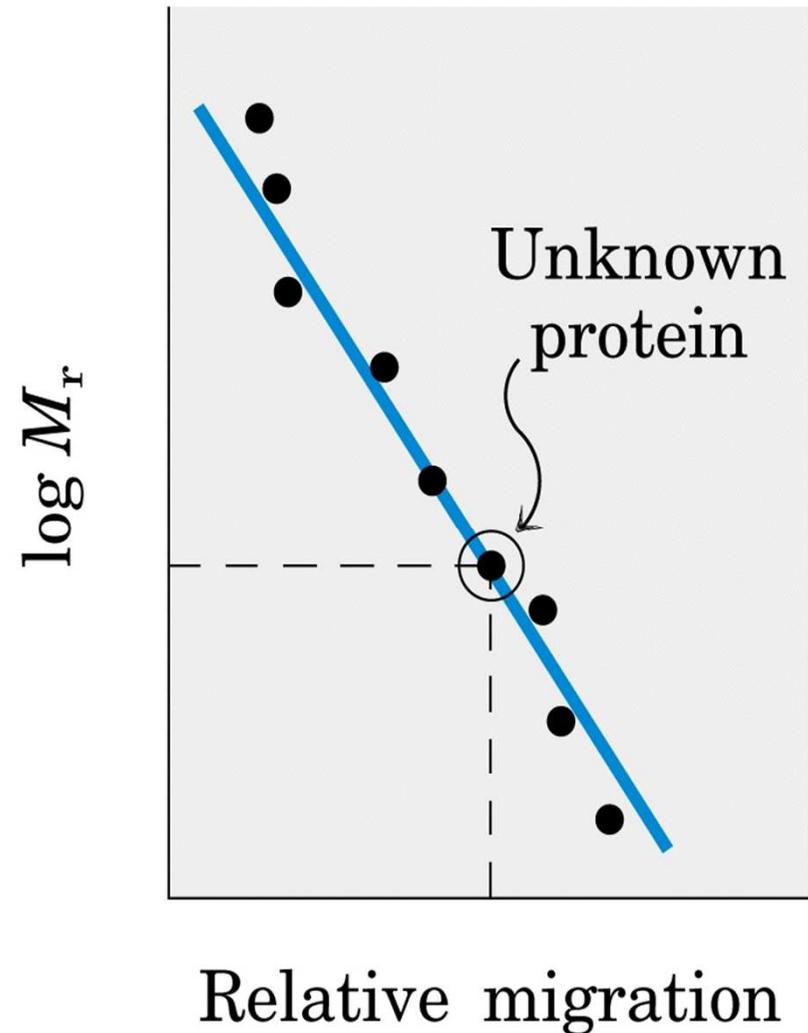
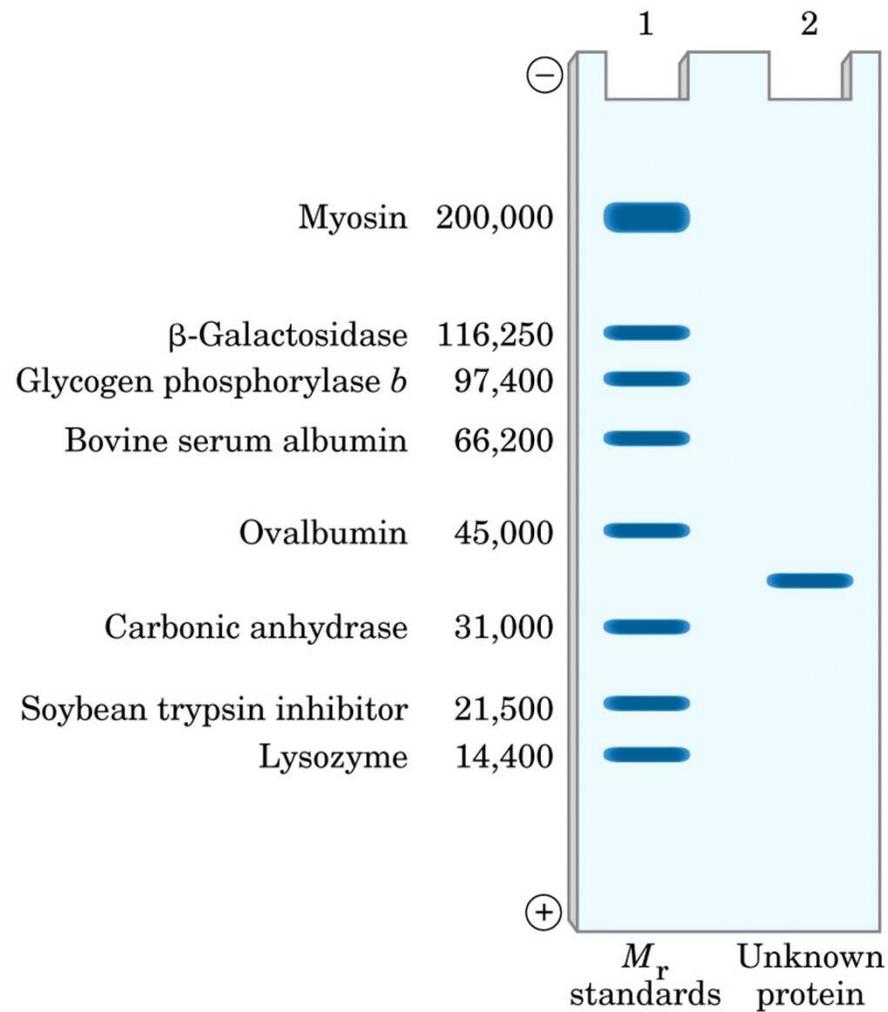
SDS-PAGE E DETERMINAZIONE DEL PM DI UNA PROTEINA



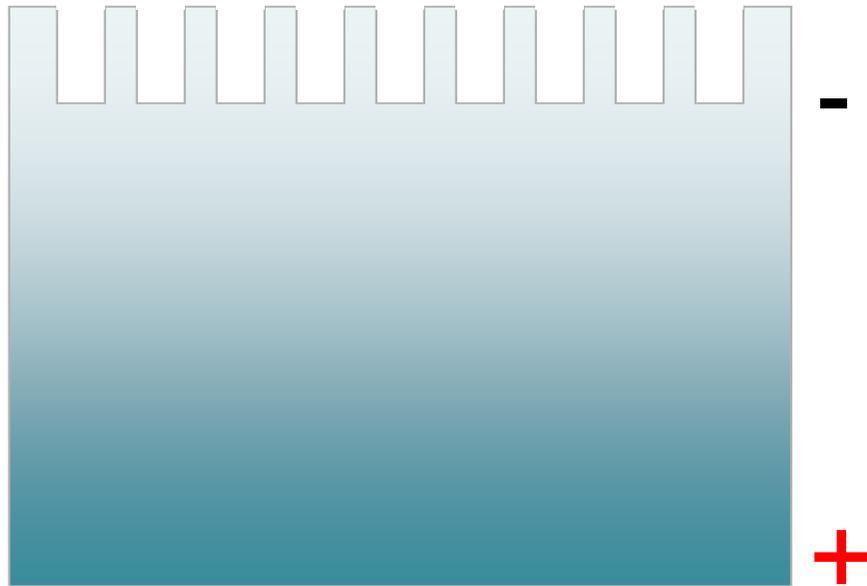
Dimensioni in kDa



SDS-PAGE E DETERMINAZIONE DEL PM DI UNA PROTEINA



GEL IN GRADIENTE DI PAA



Facile da creare in laboratorio od acquistabile con il gradiente desiderato (comune il 4-12%).

VANTAGGI

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

Condizioni sperimentali

PAA: 8% (15 mL)

Campione: 10 μ L + 1 μ L coloranti

Ingresso campioni: 50 Volt

Corsa: 150 Volt (0.020 A)

Durata: 40 min

TBE 5X	→ 1X	3.00 mL
Acril/bisAcril 40%	→ 8%	3.00 mL
APS	→ 0.66%	100 μ L
TEMED	→ 0.066%	10 μ L
H ₂ O		8.89 mL
		<hr/>
		15 mL

Colorazione

100 mL di TBE e 5 μ L di Bromuro di Etidio a T amb.

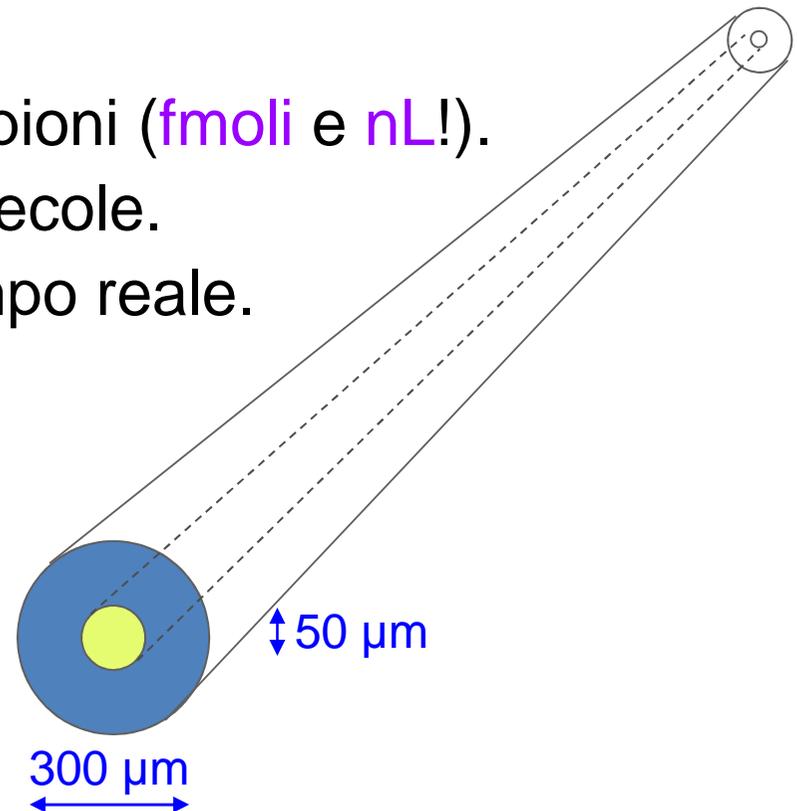
ELETTROFORESI CAPILLARE

Elettroforesi condotta in tubi di \varnothing interno di pochi μm (capillari)

VANTAGGI

- Uso di **quantità molto ridotte** di campioni (**fmoli** e **nL!**).
- **Applicabilità** a molte tipologie di molecole.
- **Velocità** di analisi, rilevazione in tempo reale.
- **Alto** rapporto superficie/volume.
- Migrazione in fase libera.
- Elevata **sensibilità**.

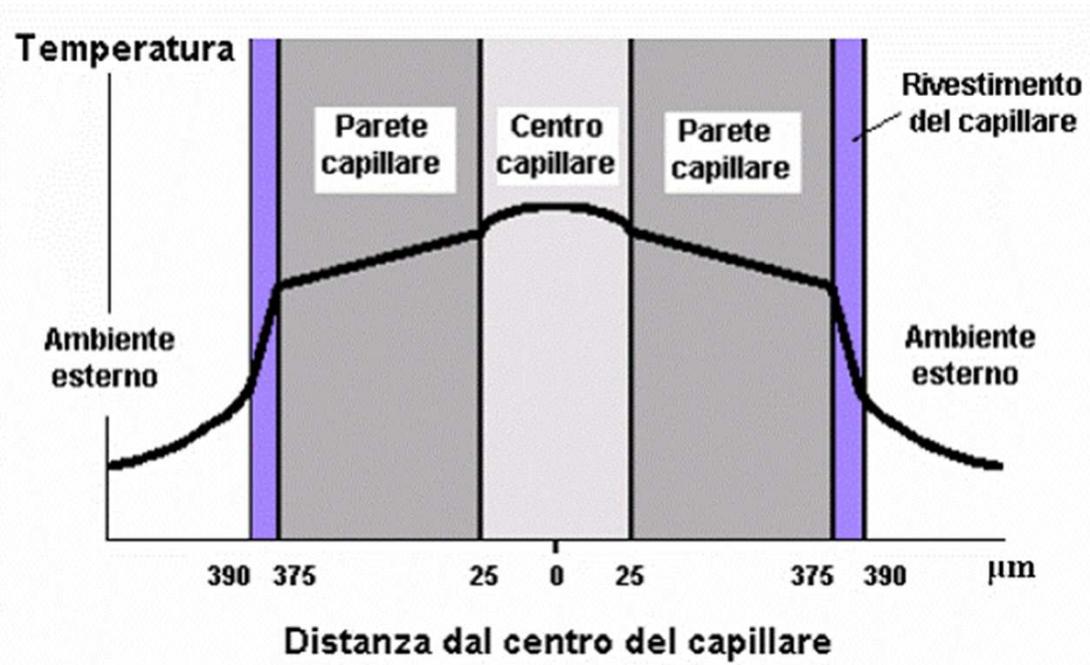
$$t = \frac{L^2}{\mu V}$$



SVANTAGGI E LIMITI

- **Elevate ddp** applicate (10000-50000 Volt).
- Per **dissipare il calore** prodotto i capillari non possono essere inferiori a 50-100 cm.

GRADIENTE DI TEMPERATURA IN UN CAPILLARE

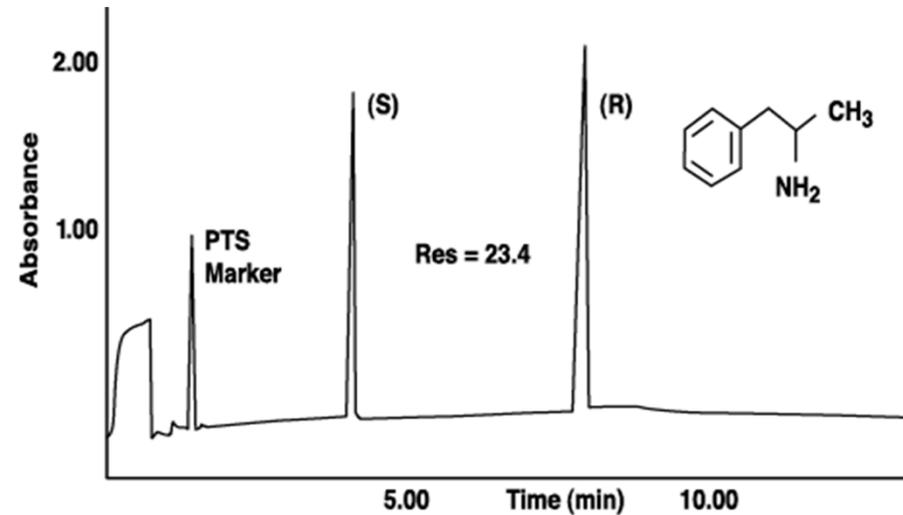


Calore dissipato solo alle estremità

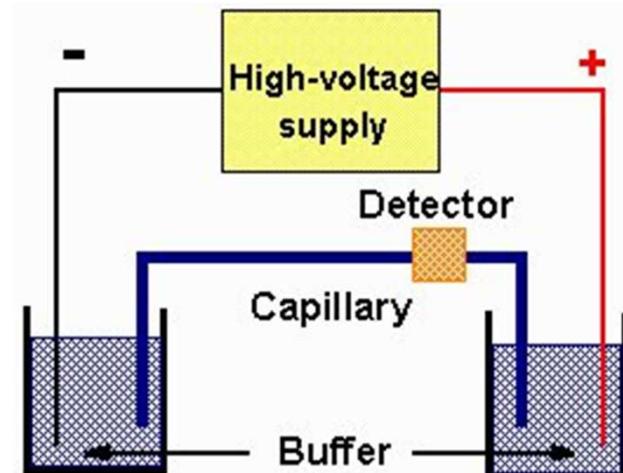
Tali gradienti originano locali differenze di **viscosità** nel tampone e dunque una migrazione **non** uniforme.

STRUMENTAZIONE

- Serbatoi del tampone e del campione.
- Generatore di ddp.
- **Tube capillare.**
- Riveltore.



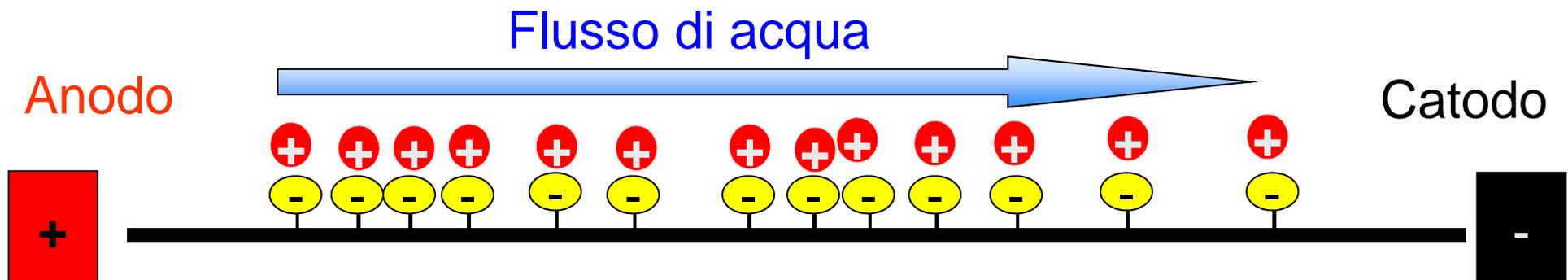
Campione introdotto **sempre**
all'estremità anodica.



FLUSSO ELETTROENDOSMOTICO (EOF) PER ELETTROFORESI CAPILLARE

Movimento di fluido in un capillare immerso in un campo elettrico agevolato dall'applicazione di alto voltaggio.

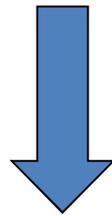
- I gruppi silanolici (-) della parete interna del capillare attirano uno strato di controioni positivi del tampone creando un **doppio strato** diffuso.
- All'applicazione di tensione, le cariche positive del doppio strato **migrano in direzione del catodo** trasportando molecole d'acqua.



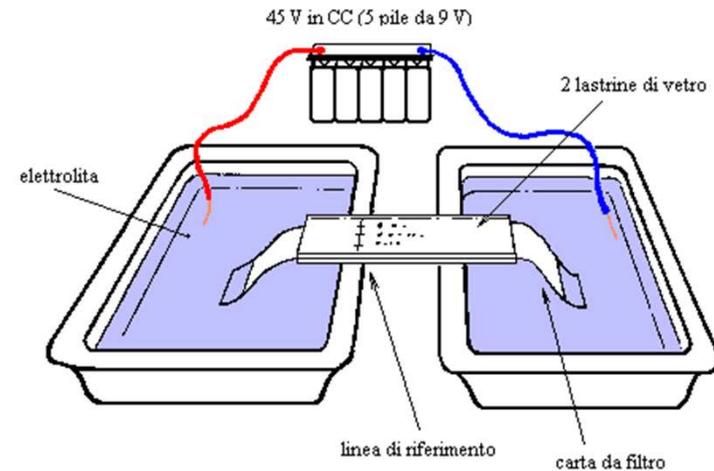
FLUSSO ELETTROENDOSMOTICO (EOF)

In soluzione libera

Diffusione convettive
Correnti semplice



Carta,
Acetato di cellulosa,
Silice,
Allumina
Agar



- L'uso di un tampone neutro o basico, rende il EOF più forte del campo elettrico così da **trascinare tutte le proteine (e in generale gli ioni) verso il catodo (-)**.

Come migran
dunque gli analiti?

ELETTROFORESI SU MICROCHIP

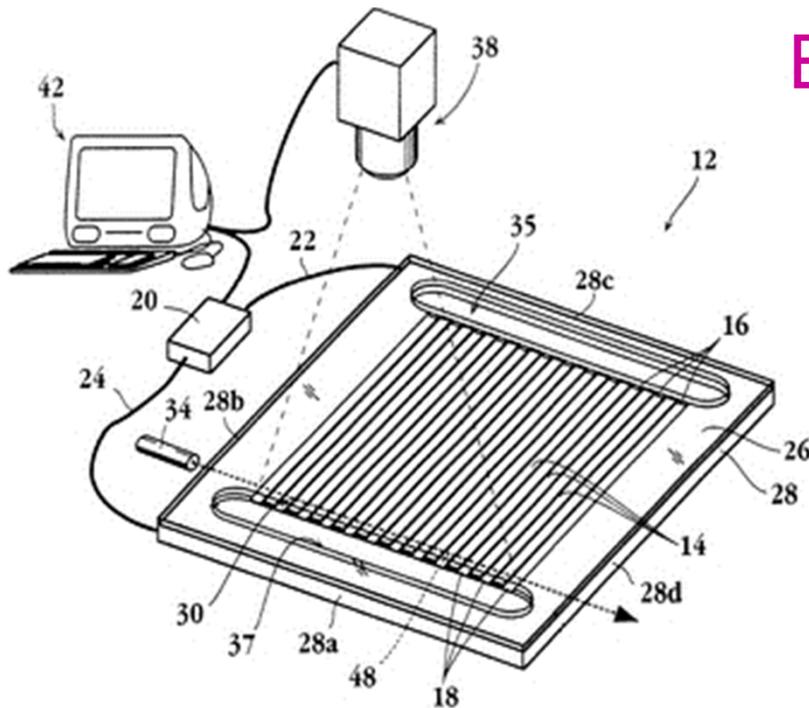
Miniaturizzazione dei sistemi elettroforetici capillari.

Velocità di analisi elevate

Basse ddp

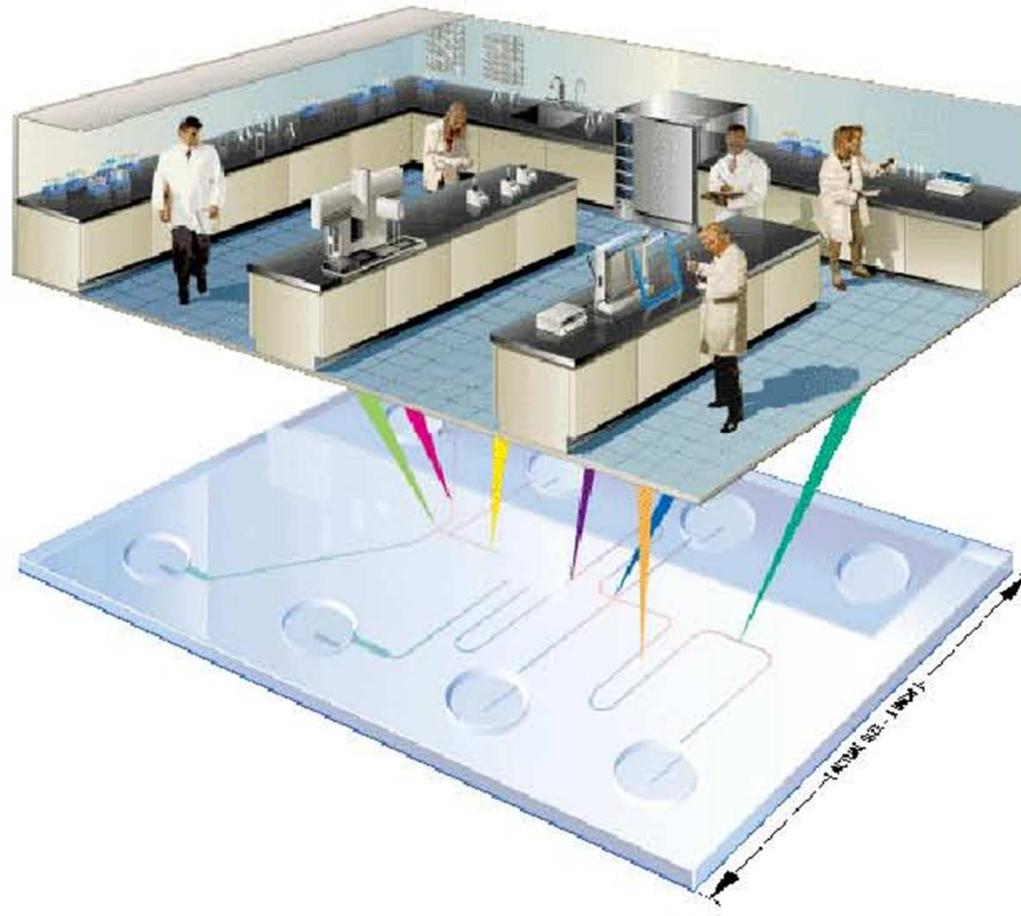
Riduzione dei volumi di campione da utilizzare

Elevatissima sensibilità



LAB ON A CHIP

Experion Automate Electrophoresis System



EXPERION



Automated
Electrophoresis
Station



Priming Station



Vortex Station

EXPERION

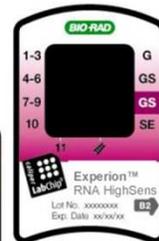
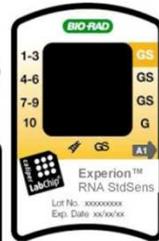
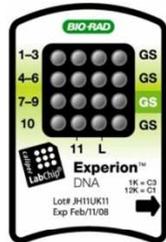
Per analisi di DNA, RNA e proteine denaturate

RNA HighSens Chip

RNA StdSens Chip

Pro260 Chip

DNA Chip



Analysis Reagents



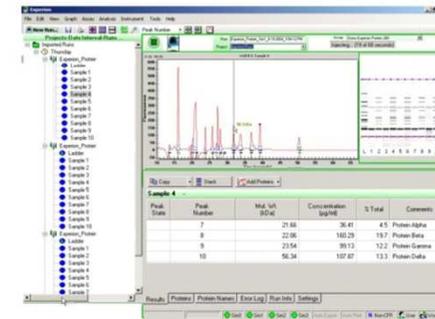
Automated Electrophoresis Station



Priming Station

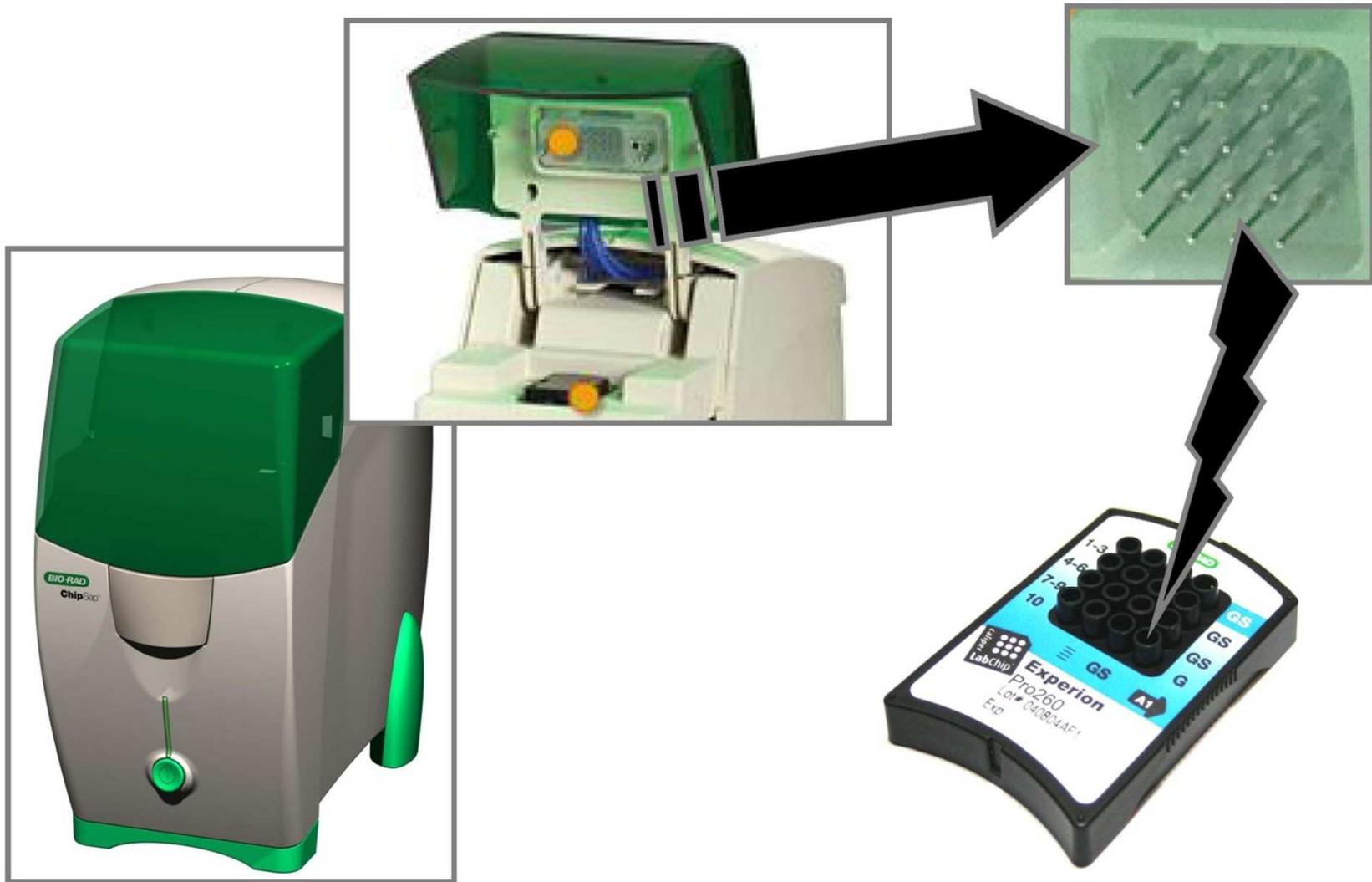


Vortex Station



Data Analysis Software

EXPERION



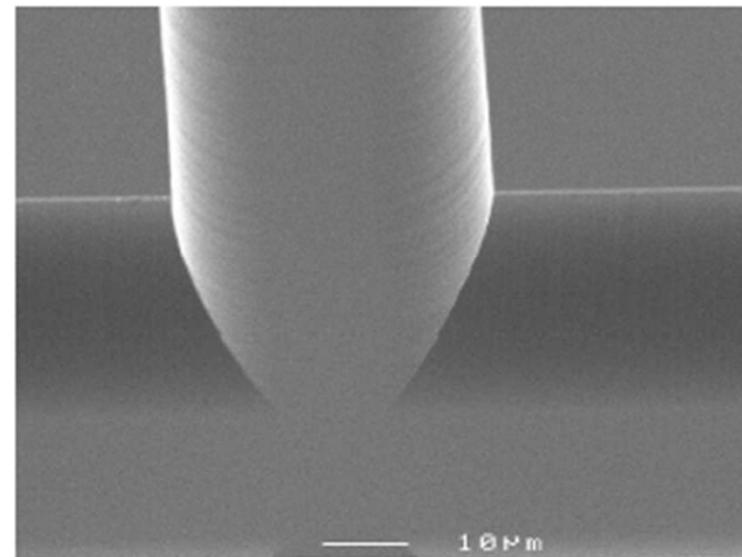
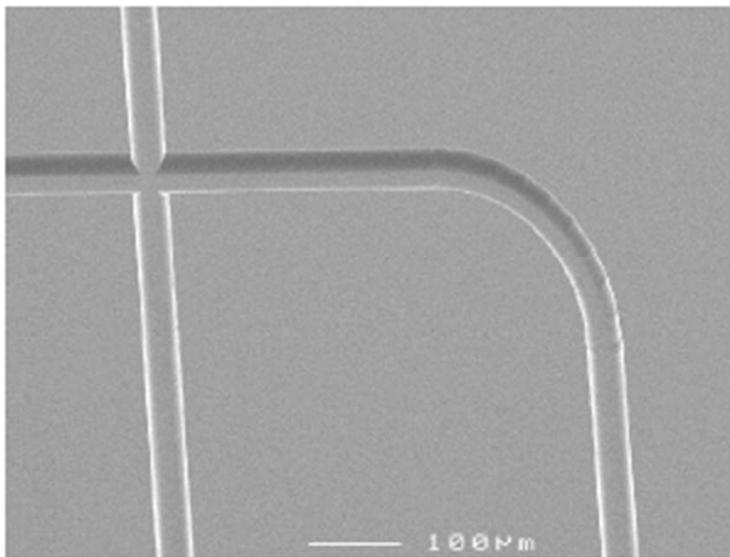
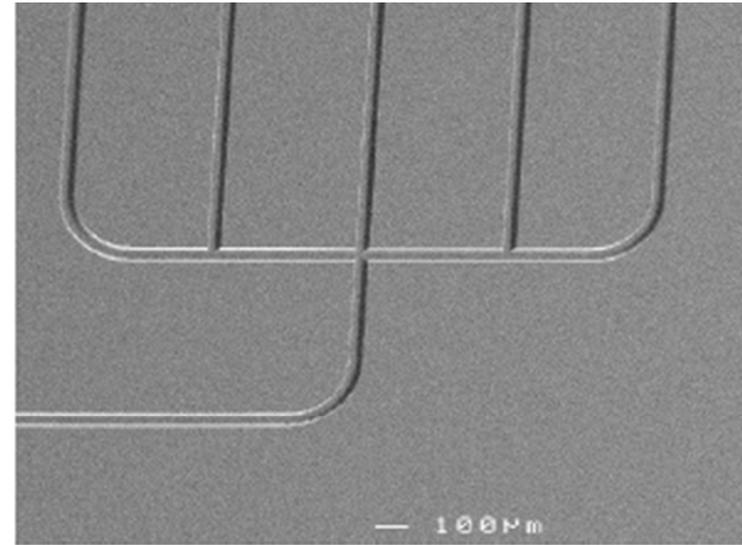
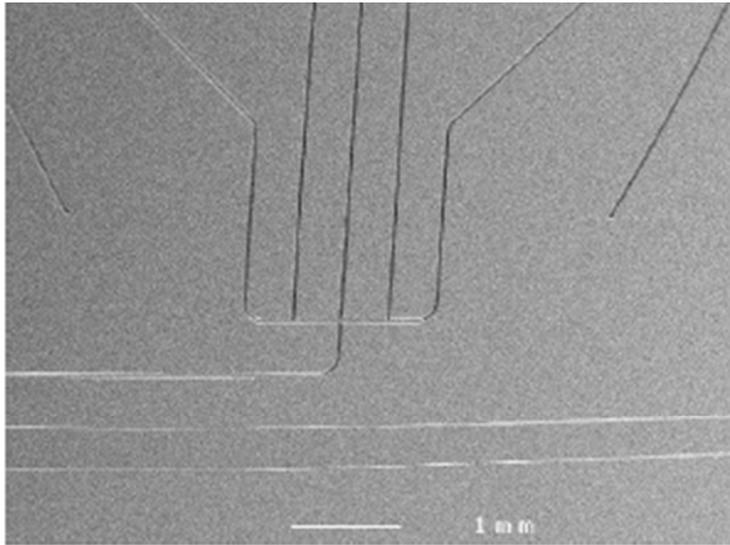
Chip Experion

Chip di vetro all'interno di un supporto di plastica

La plastica crea i pozzetti in cui caricare i campioni/reagenti

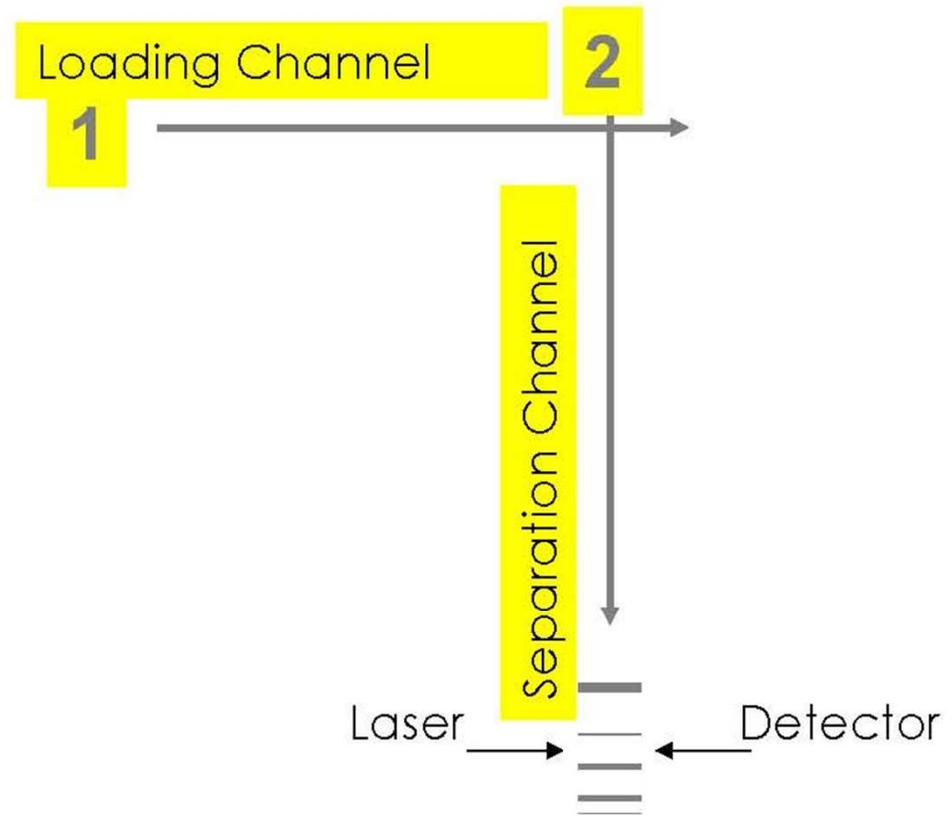
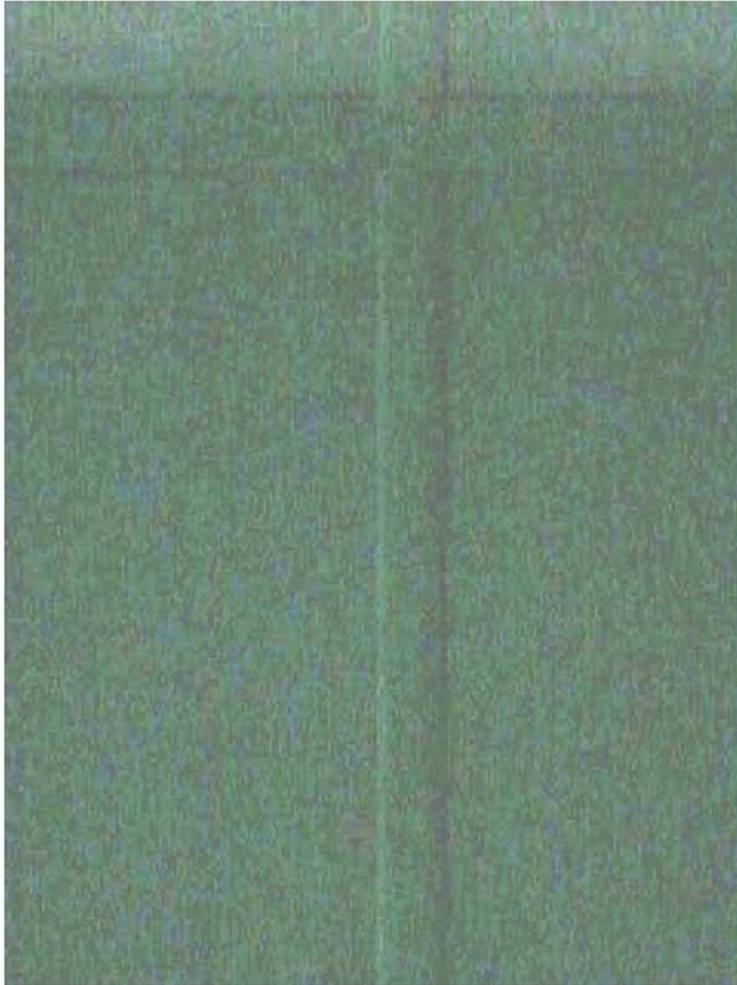


Chip Experion

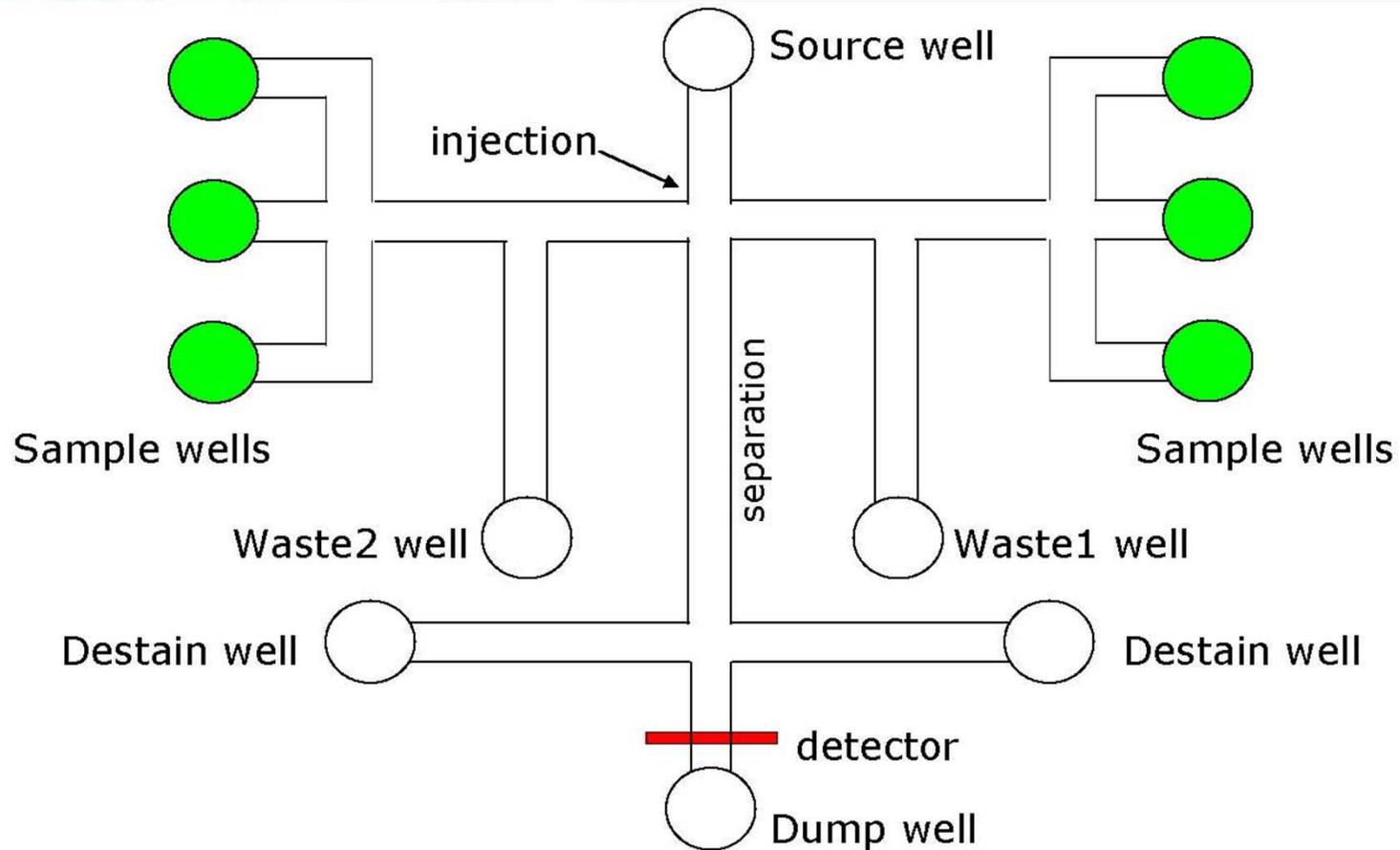


SEM images of etched channels

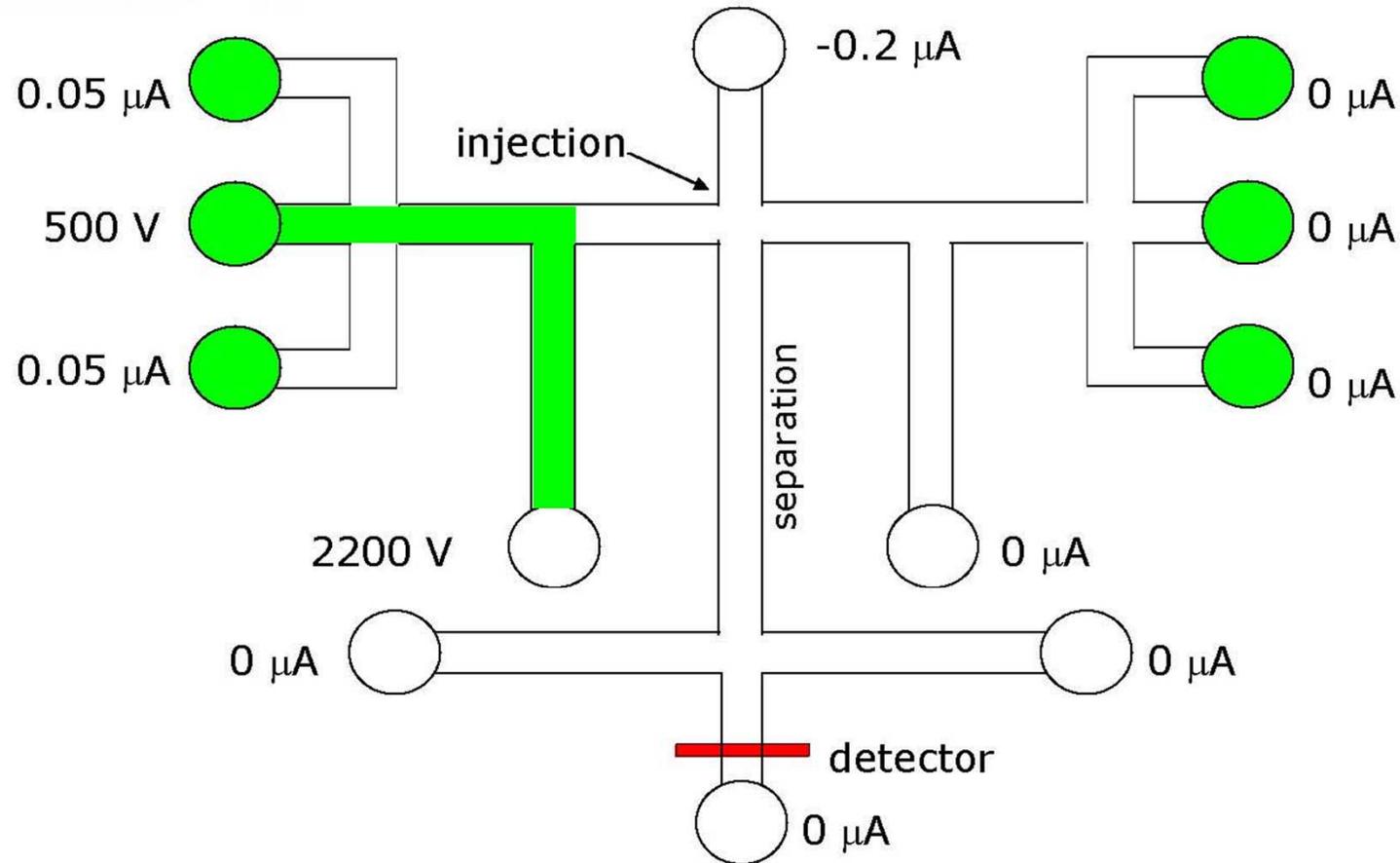
Chip Experion



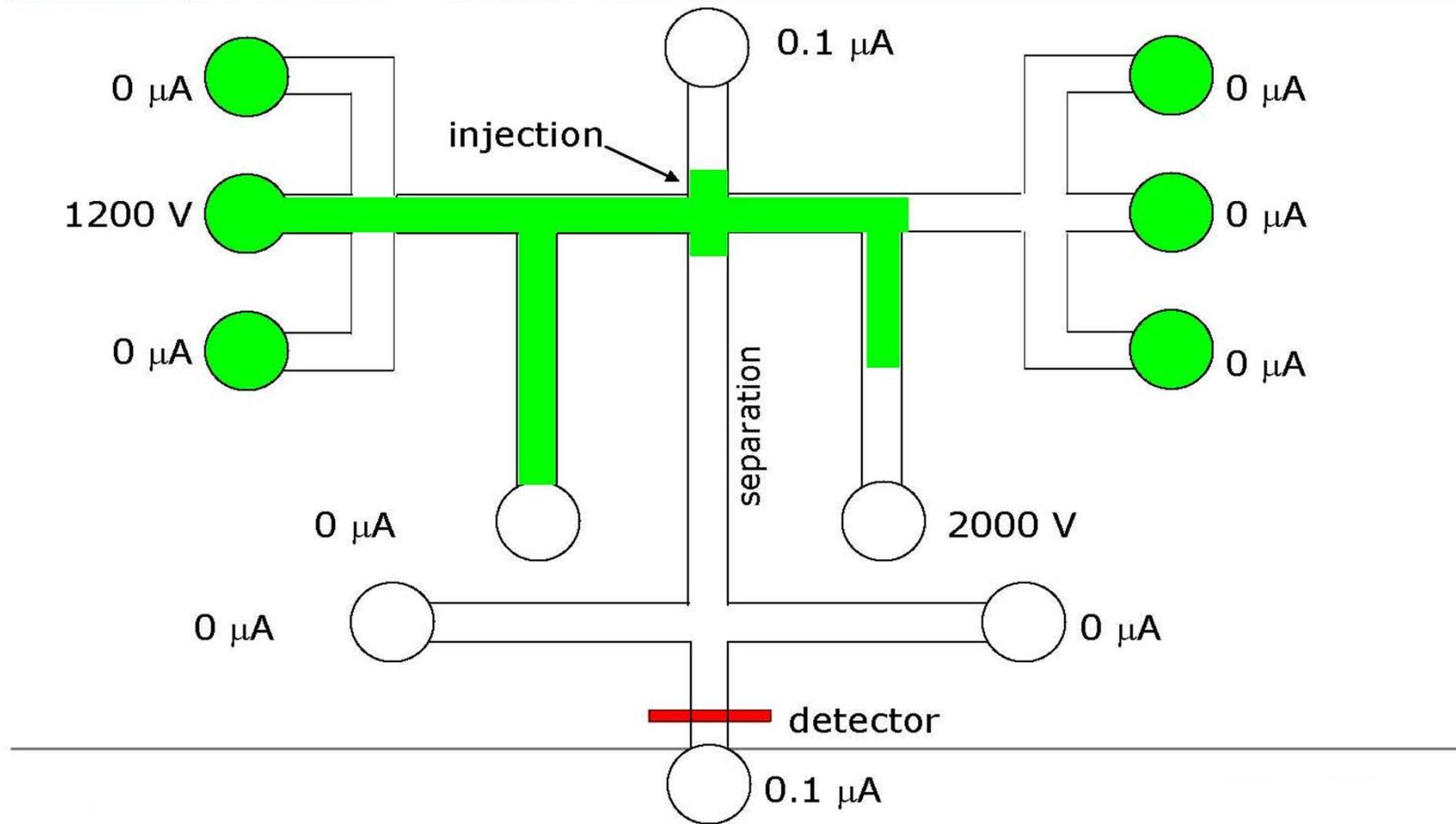
Movimento dei campioni



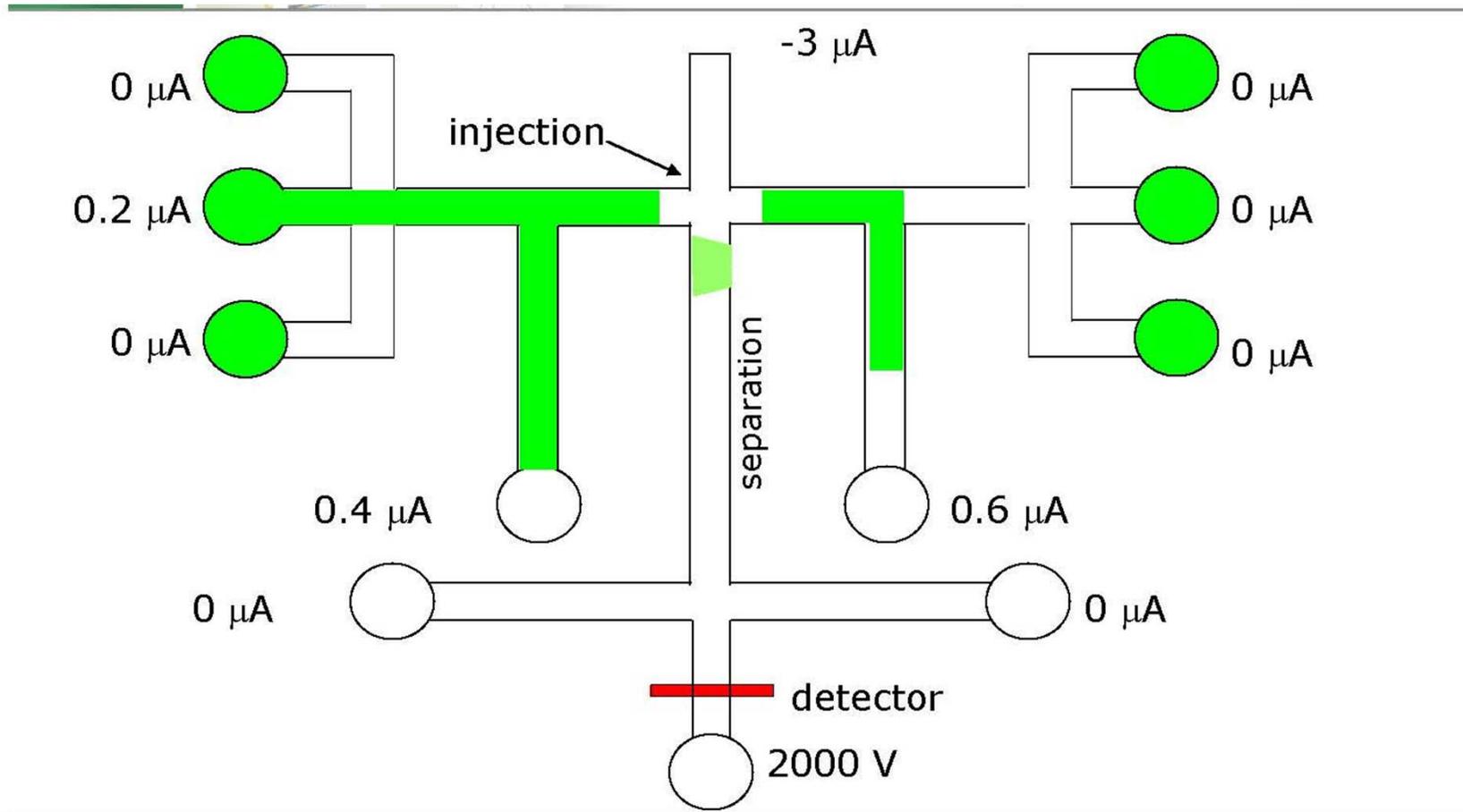
Movimento dei campioni



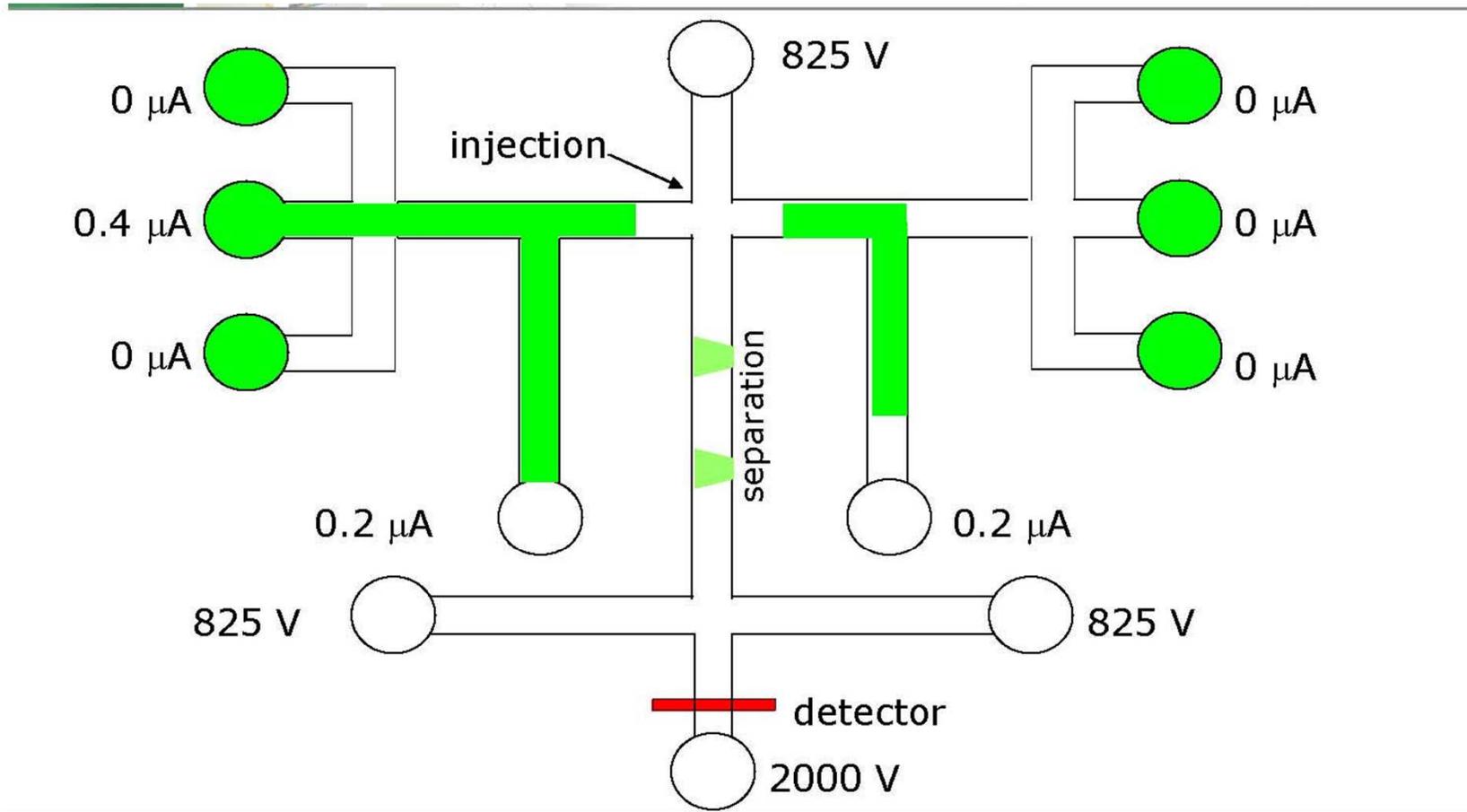
Movimento dei campioni



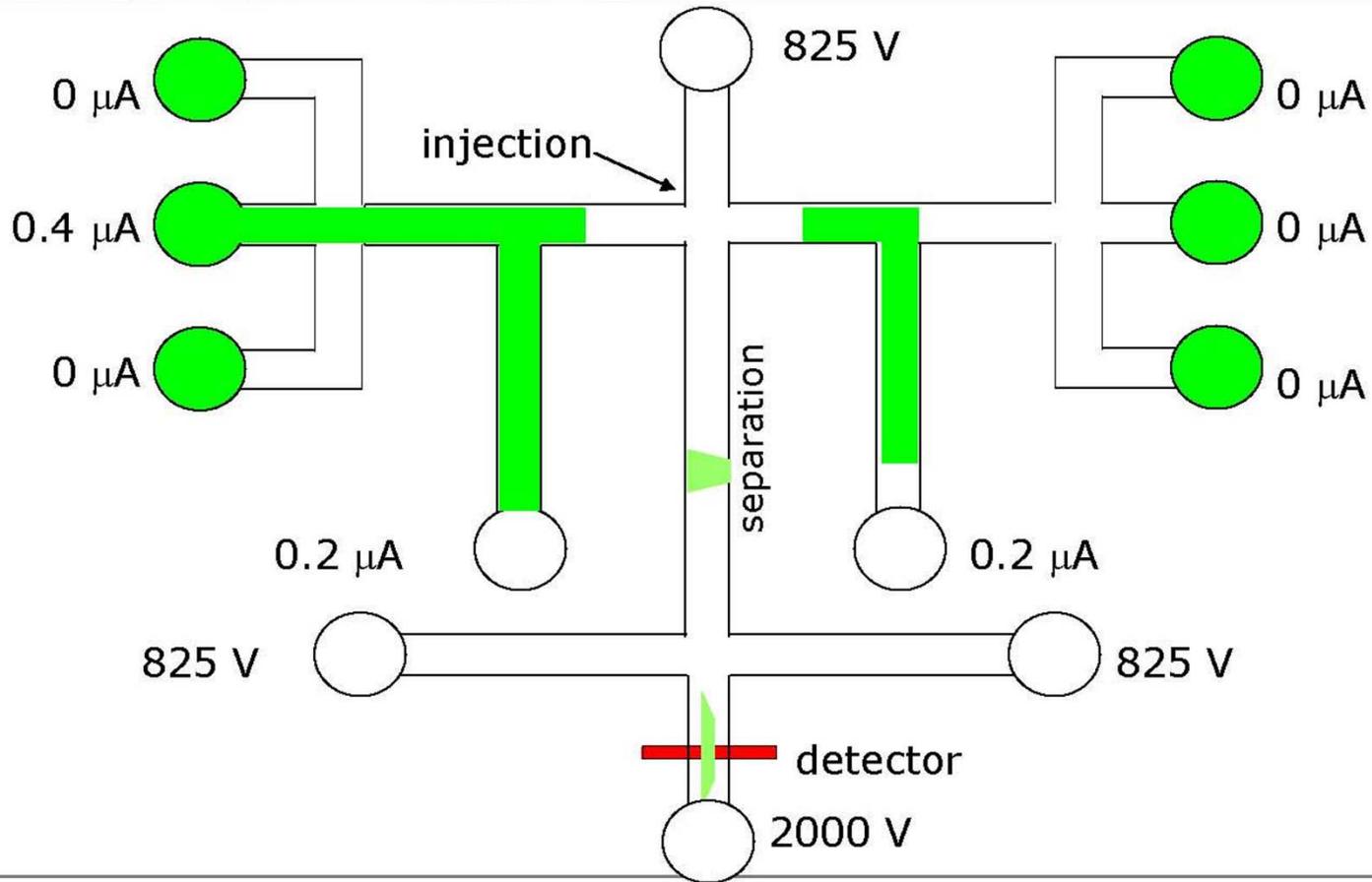
Movimento dei campioni



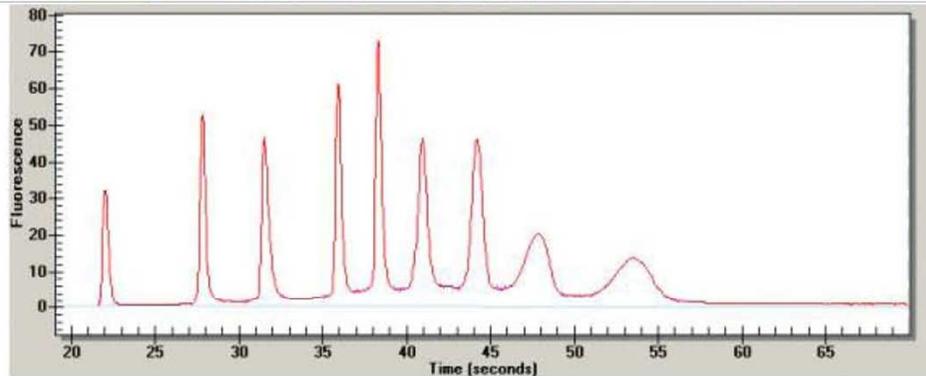
Movimento dei campioni



Movimento dei campioni

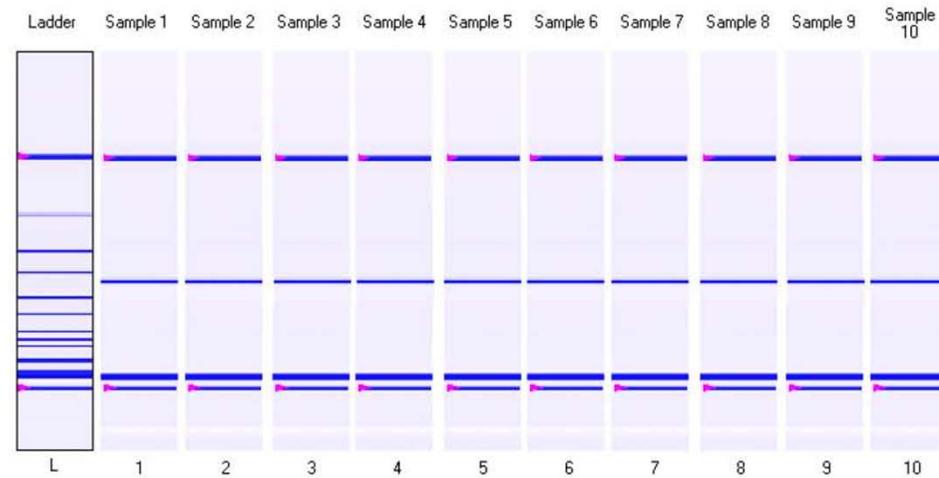


Risultato di una analisi



Elettroferogramma

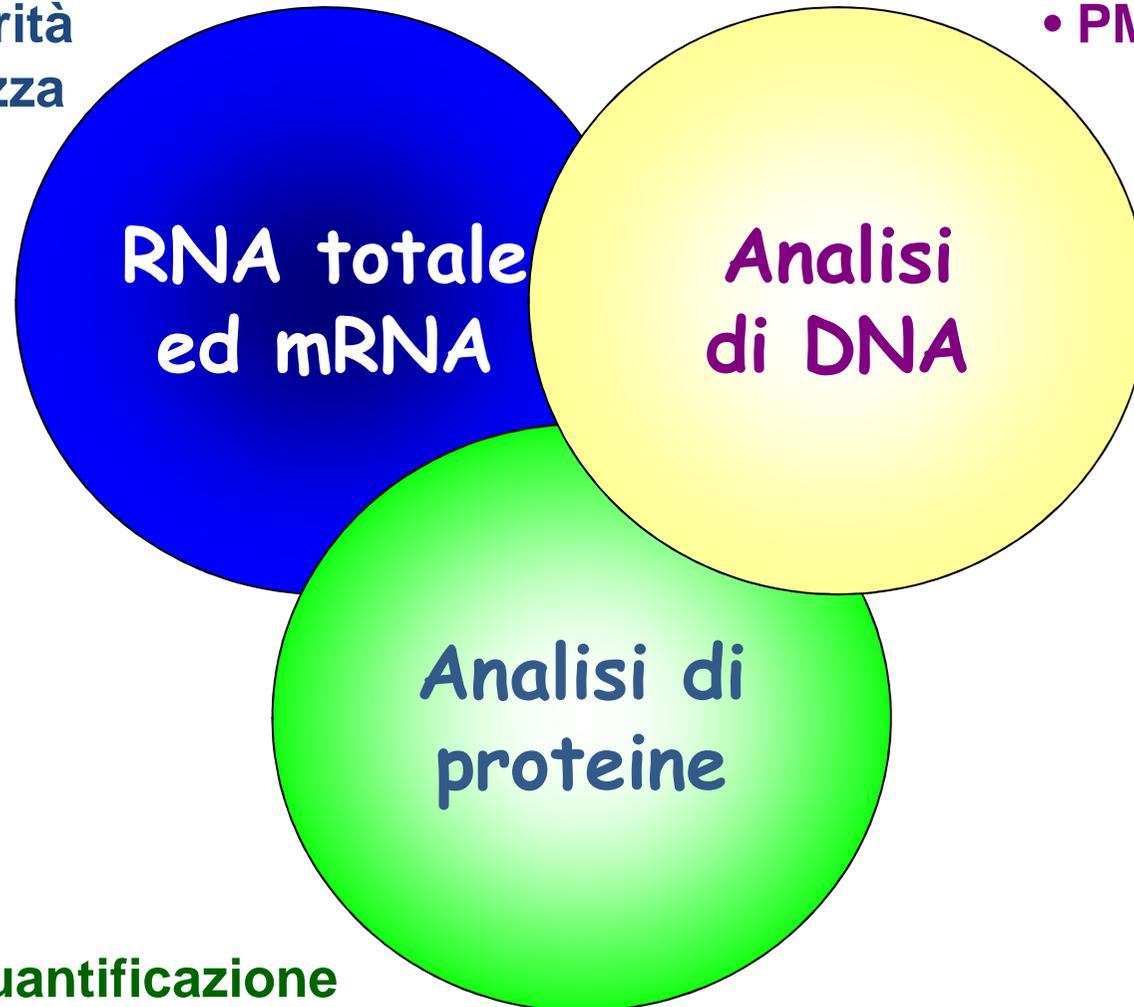
Visualizzazione
a gel (virtuale)



Risultati e informazioni

- RNA totale di lievito
- Integrità
- Purezza

- Concentrazione del DNA
- PM del DNA
- Purezza



- Quantificazione
- Determinazione del PM
- Determinazione dell'Rf

Applicazioni sull'RNA

Analisi su RNA totale ed mRNA

- costruzione di librerie di cDNA
- sintesi di cDNA
- RT-PCR
- Northern Blotting
- Microarrays
-

Applicazioni sulle proteine

Analisi 1-D di proteine

- Purezza di una purificazione cromatografica
- Precedente a studi di struttura cristallografica
- Determinazione del PM di proteine ricombinanti
-

Applicazioni sul DNA

DNA 1K Assay e DNA 12K Assay

- analisi di piccoli o grandi prodotti di PCR
- analisi di digestioni di piccoli plasmidi
-

Kit utilizzabili

Protein Analysis Kits

- 10 or 25 protein chips
- 1 Electrode cleaner chip
- Reagents and supplies

Protein Reagents

- Protein Gel
- Protein Ladder
- Protein Stain
- Loading Buffer
- Spin Filters



RNA Analysis Kits

- 10 or 25 RNA standard and high sensitivity chips
- 2 Electrode cleaner chips
- Reagents and supplies

RNA Reagents

- RNA Gel
- RNA Ladder
- RNA Stain
- Loading Buffer
- Spin Filters
- Sensitivity Enhancer
(included in high sensitivity kit only)

DNA Analysis Kits

- 10 DNA chips
- 1 Electrode cleaner chip
- Reagents and supplies

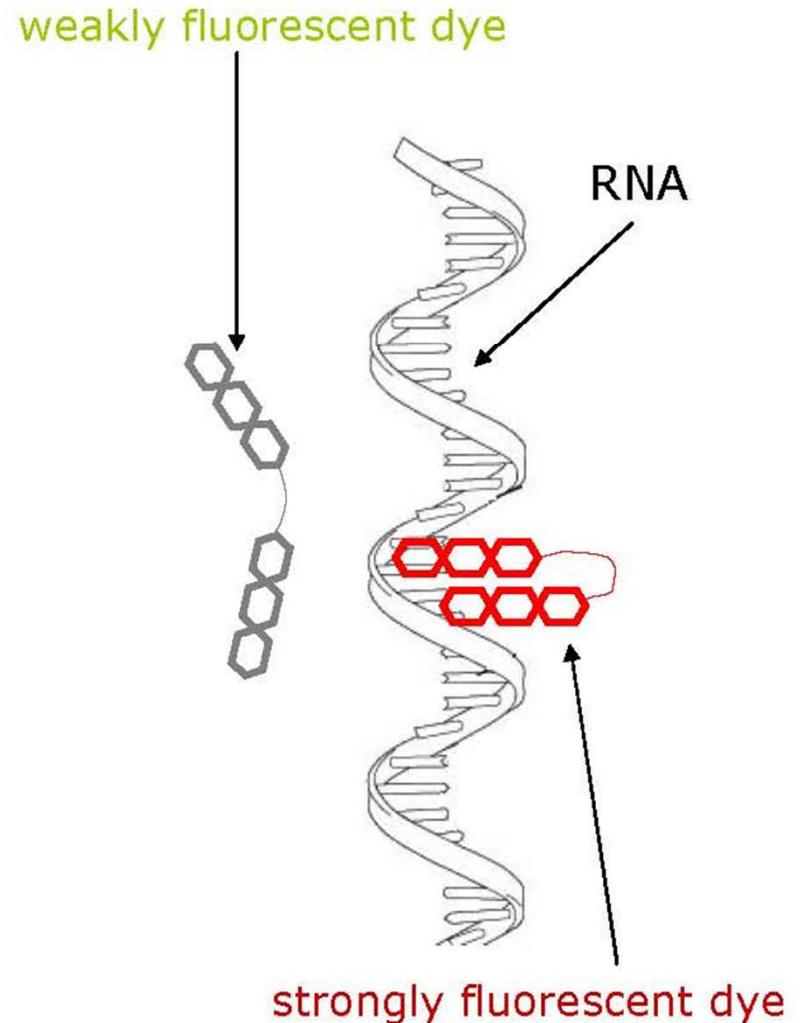
DNA Reagents

- DNA Gel
- DNA Ladder
- DNA Stain
- Loading Buffer
- Spin Filters



Kit per analisi su RNA

- RNA Ladder: 8 Ladder Fragments
Quantitation and Sizing
- Loading Buffer: Lower Marker
Sample Alignment to Ladder
- Sensitivity Enhancer:
Only in HighSens Kit
- Gel:
Sieving Polymer Matrix
- Stain:
Dye for Sample Detection



Kit per analisi su RNA

RNA StdSens

Assays: Eukaryote Total RNA
Prokaryote Total RNA
mRNA

RNA HighSens

Eukaryote Total RNA
Prokaryote Total RNA
mRNA

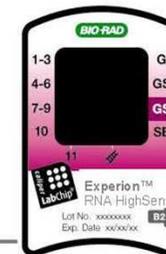
Range: 25 - 500 ng/ μ L
25 - 250 ng/ μ L

100 - 5000 pg/ μ L
500 - 5000 pg/ μ L

Capacity:



12 wells
1 μ L/well



11 wells
1 μ L/well

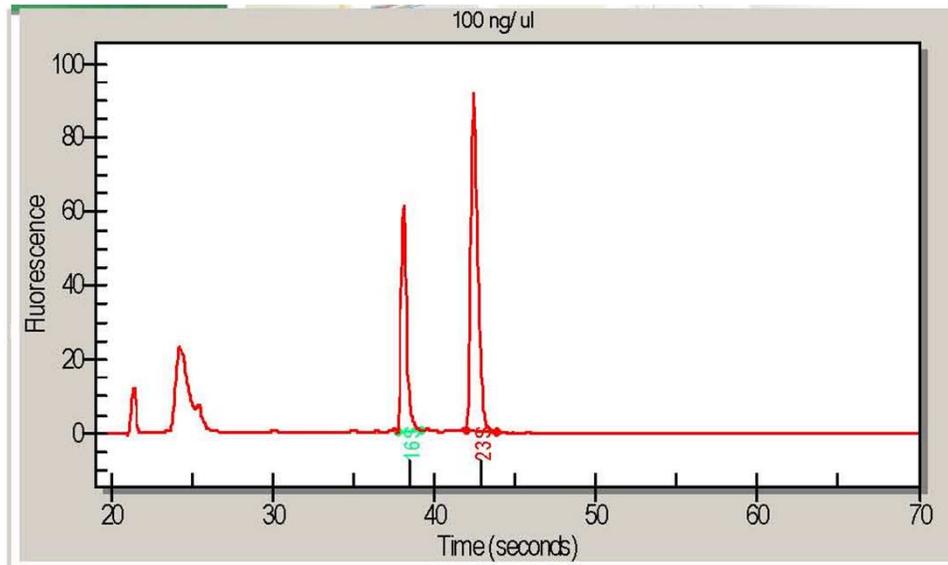


Kit per analisi su RNA CONFRONTO

RNA Integrity and Quantity Assessment Methods

Method	Detection	Assess RNA Integrity?	Quantify RNA?	RNA Sample Amount	Dynamic Range	Detect gDNA?	Sensitive to contaminants?	Time Required
Experion Automated Electrophoresis System	Fluorescence	Yes	Yes	1 μ L	100 pg/ μ L - 500 ng/ μ L	Yes	No	30 minutes
Nondenaturing and Denaturing Agarose Gels	EtBr Staining	Yes	No	Depends on user	As low as 10 ng (EtBr)	Yes	Yes	2 - 5 hours
UV Spectrophotometry	Absorbance	No	Yes	Volume required for dilution	A260 reading between 0.1 - 1.0	Yes	Yes	5 - 10 minutes
<u>NanoDrop UV-Vis Spectrophotometer</u>	Absorbance	No	Yes	1 - 2 μ L of sample	2 - 3000 ng/ μ L	Yes	Yes	1 minute

Esempio di analisi sull'RNA totale



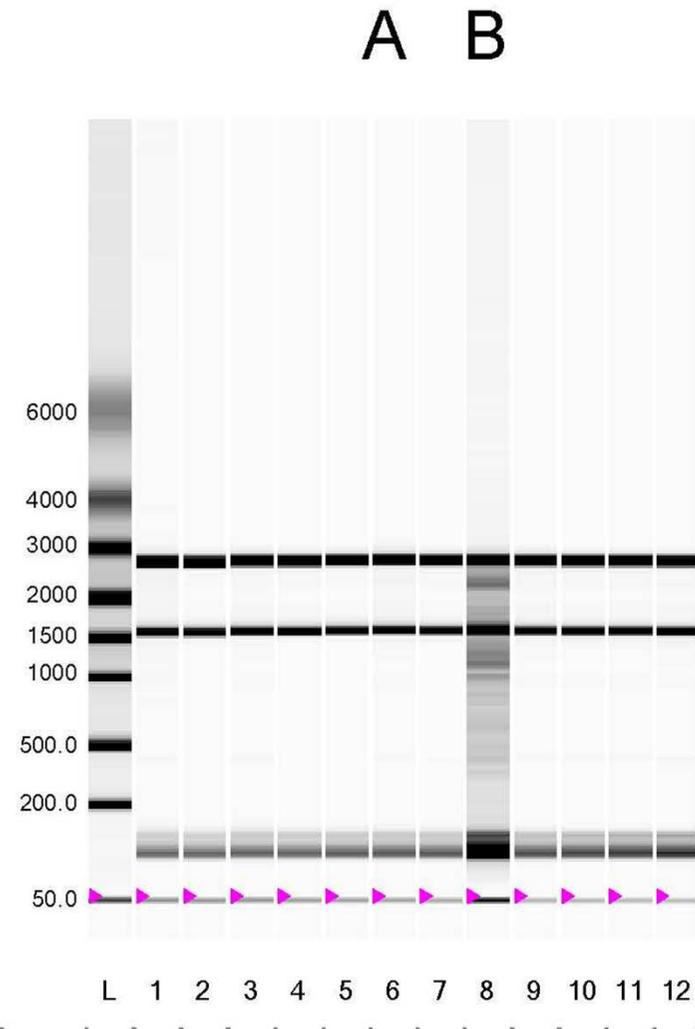
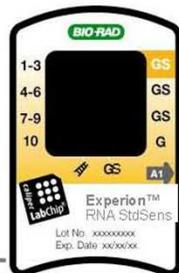
Assay: Prok Total RNA StdSens

Sample: E. coli Total RNA

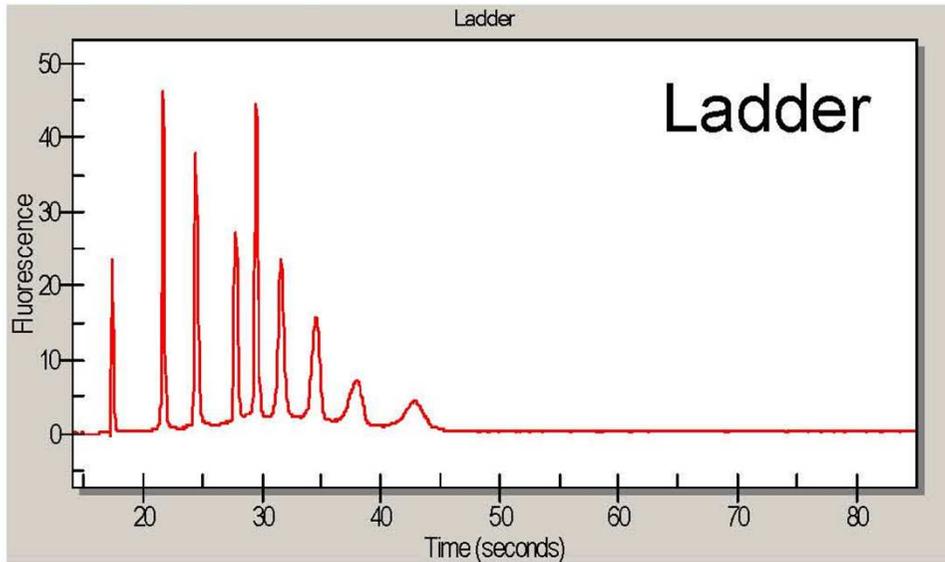
100 ng/ μ L

1.65 23S/16S Ratio in "A"

1.04 23S/16S Ratio in "B"



Esempio di analisi sull'mRNA

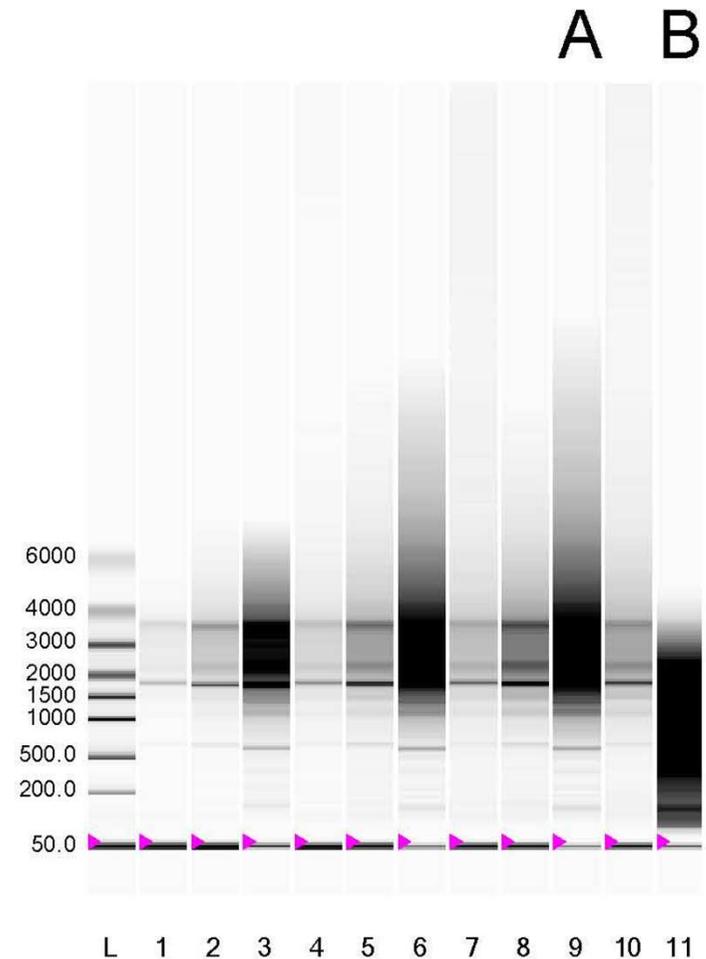
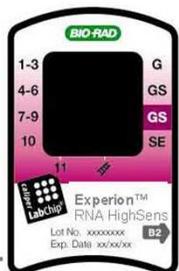


Assay: mRNA HighSens

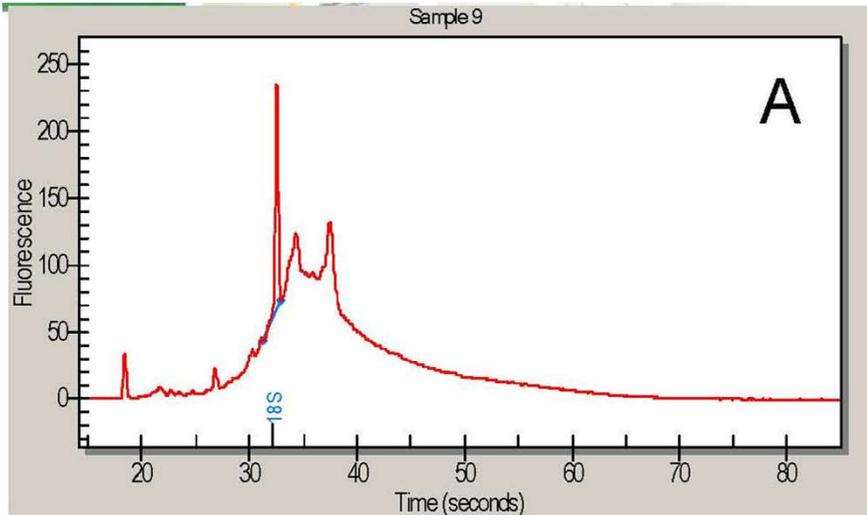
Sample: Rat Brain polyA+ mRNA

5000 pg/ μ L

4.6 % rRNA Contamination
in Sample "A"



Esempio di analisi sull'mRNA

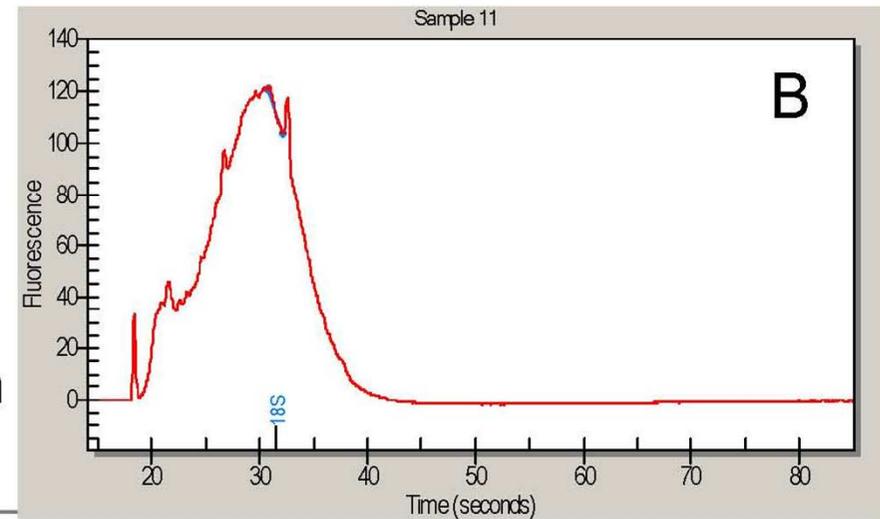
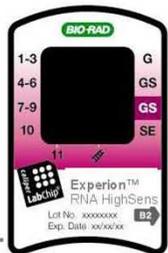


Assay: mRNA HighSens

Sample: Rat Brain polyA+ mRNA

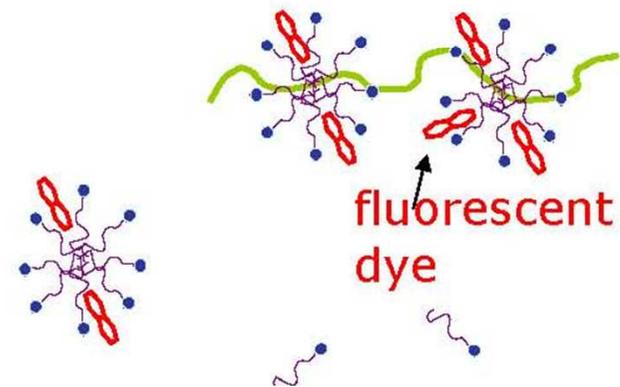
5000 pg/ μ L

4.6 % rRNA Contamination
in Sample "A"



Kit di analisi delle proteine

- Protein Ladder: 8 ladder fragments & Upper Marker (260kD)
Molecular Weight Sizing
- Sample Buffer: Lower and Upper Marker
LM & UM – Sample Alignment
UM – Quantitation
- Gel:
Sieving Polymer Matrix
- Stain:
Dye for Sample Detection

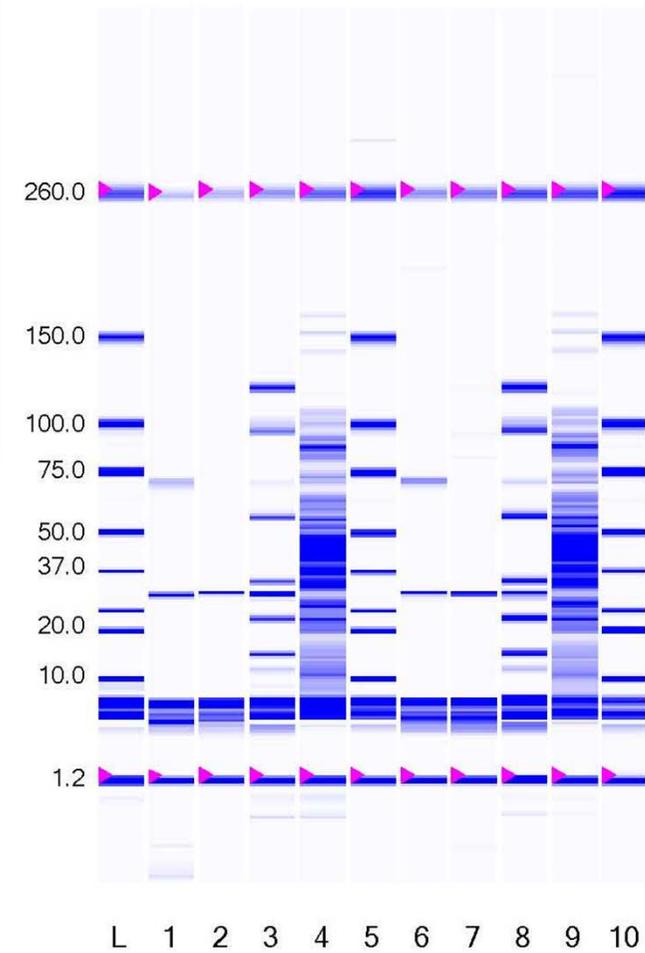
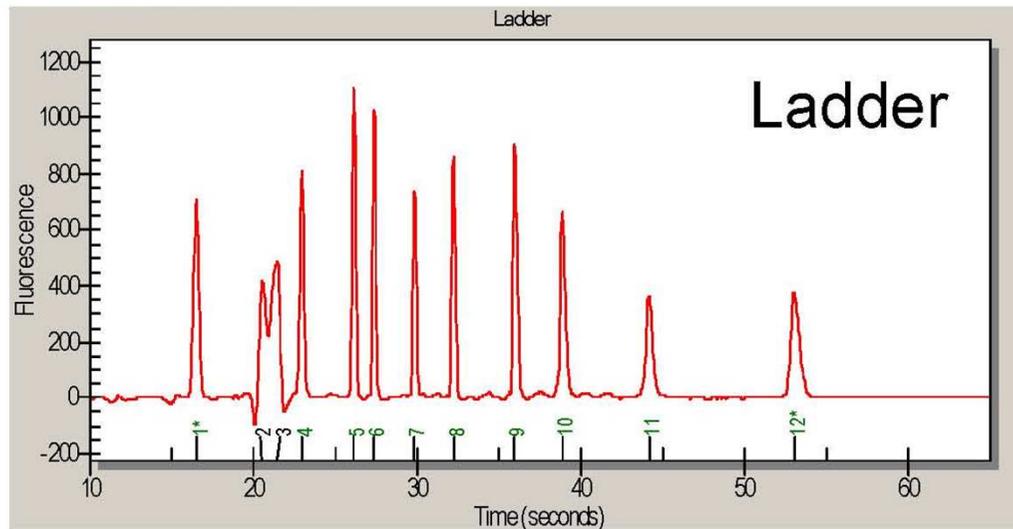


Kit di analisi delle proteine

Molecular Weight Range:	10 – 260 kD
Sensitivity:	2.5 ng/ μ L Bovine Carbonic Anhydrase 10 ng total/well in 1x PBS

- **Resolution and Sensitivity:** Experiencing performance compared to a 4 – 20% SDS-PAGE gel using colloidal Coomassie Blue stain
- **Resolution:** # of E. coli lysate peaks ≥ 30
- **Sensitivity:** Limit of Detection = 2.5 ng/ μ L Carbonic Anhydrase
Signal to Noise ≥ 3
- **Linear Dynamic Range:** $r^2 \geq 0.97$
Dilution series 2.5 – 2000 ng/ μ L
Carbonic Anhydrase in 1x PBS

Esempio di analisi delle proteine



Assay: Pro260

Sample: "A" = E. coli lysate



"B" = Carbonic Anhydrase + BSA

"C" = Protein mix 14 – 117 kD

Information: % of Total/Conc

Kit per analisi su DNA

- DNA Ladder: 11 Ladder Fragments
- Loading Buffer:
 - Lower/Upper Marker
 - Sample Alignment to Ladder
 - Upper Marker
 - Quantitation
- Gel: Sieving Polymer Matrix
- Stain: Dye for Sample Detection

Procedura per analisi

1. Pulizia elettrodi
2. Filtrazione del gel e aggiunta del colorante
3. Preparazione del chip (priming)
4. Caricamento dei campioni e omogenizzazione con vortex
5. Analisi
6. Pulizia elettrodi

Risultato previsto

