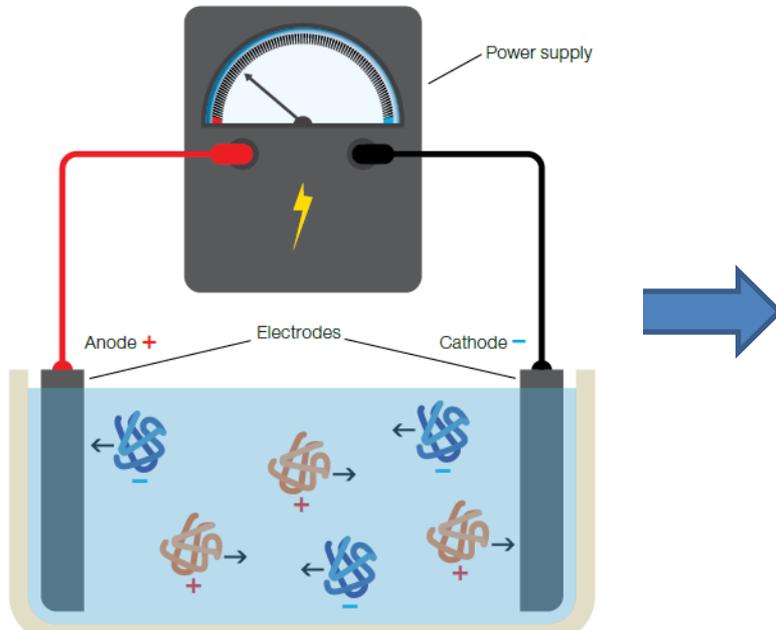


Elettroforesi

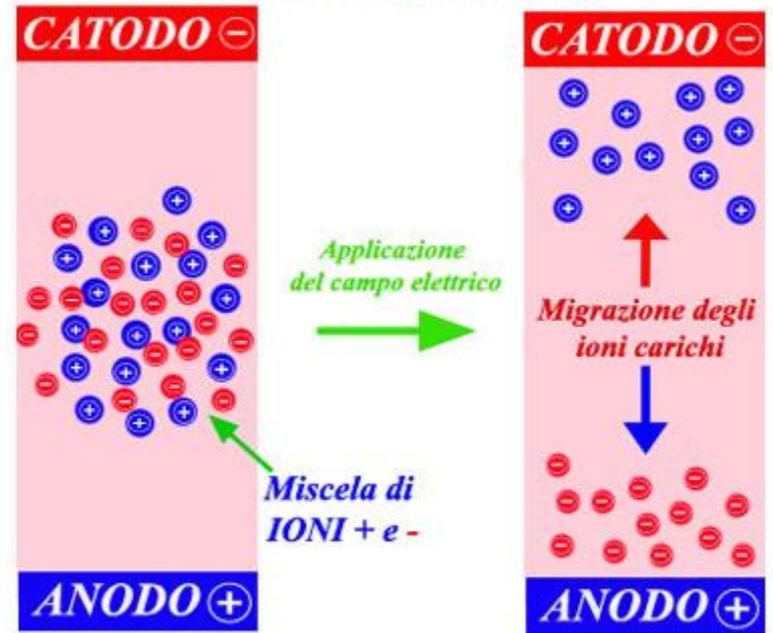
Tecniche che permettono di separare diverse macromolecole cariche tramite l'applicazione di un campo elettrico.

Apparato elettroforesi



Fonte: Internet

ELETTROFORESI



Utilizzata in biochimica e biologia molecolare per lo studio di proteine ed acidi nucleici (DNA ed RNA).

Metodica sia **qualitativa** che **quantitativa**.

Principi Generali

Una molecola carica si sposta in un campo elettrico con una velocità proporzionale alla sua densità di carica, dimensione e forma secondo la legge:

$$v = \frac{E * q}{f}$$

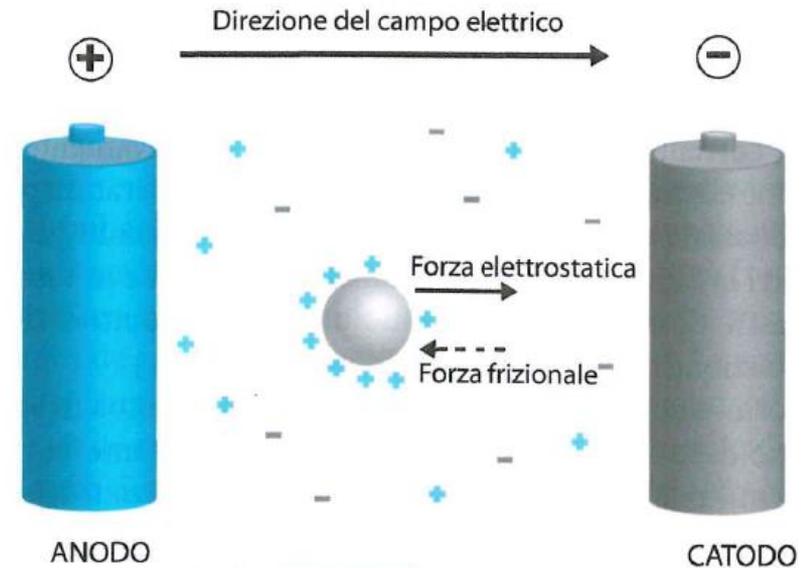
In cui:

v = velocità

E = gradiente di potenziale

q = carica

f = coefficiente di frizione →
dipende da dimensioni e forma
della molecola e dalla
viscosità/costante dielettica del
mezzo



In genere, al posto della velocità si usa la mobilità elettroforetica:

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{f}$$

Esprime *la tendenza di una molecola carica a muoversi all'interno di un campo elettrico applicato*.

Dipende da:

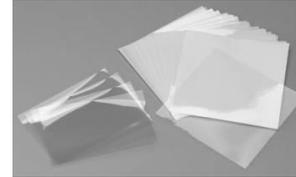
- Carica;
- Dimensione;
- Viscosità del mezzo.

In condizioni definite, la mobilità elettroforetica è una proprietà intrinseca di una molecola → si può utilizzare per analizzare molecole diverse.

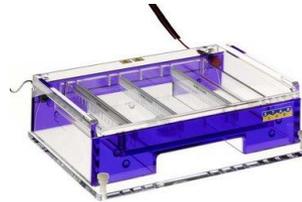
Supporti usati in elettroforesi:

Fonte: Internet

- Acetato di cellulosa



- Gel di agarosio



- Gel di poliacrilammide (PAGE)

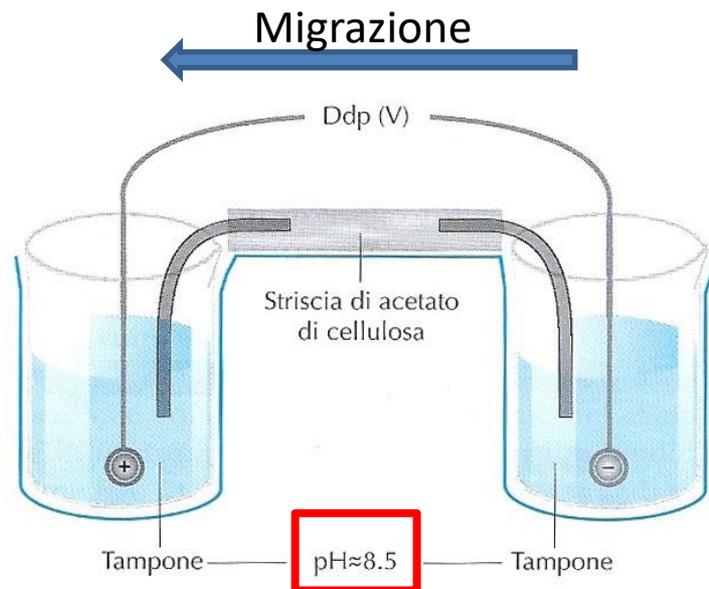


Agiscono da setacci molecolari!!!

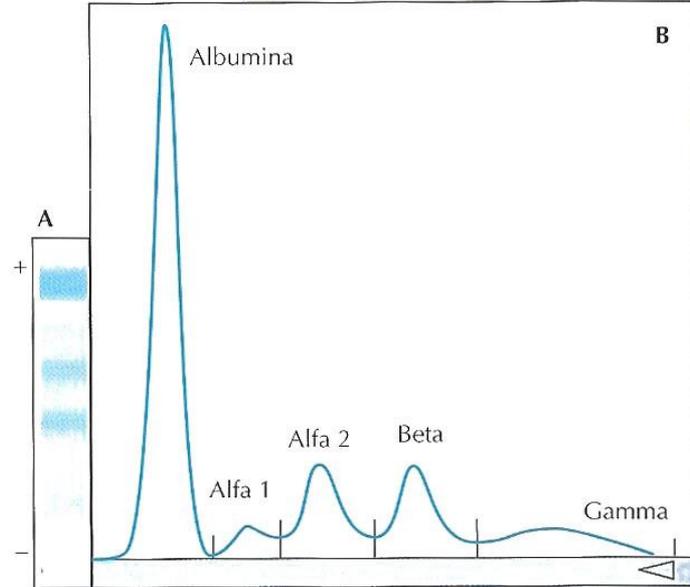
Acetato di Cellulosa

Matrice inerte superiore alla semplice cellulosa, perché non presenta fenomeni di adsorbimento.

Utilizzato soprattutto in **ambito clinico** per la separazione delle proteine del siero (porzione liquida del sangue dopo eliminazione parte corpuscolata e proteine coagulazione).



ESEMPIO DI TRACCIATO ELETTROFORETICO DELLE PROTEINE DEL SIERO



Frazione elettroforetica	Intervallo di riferimento
Albumina	52.0÷69.0%
Alfa-1-globuline	1.0÷6.0%
Alfa-2-globuline	4.5÷14.0%
Beta-globuline	7.0÷14.0%
Gamma-globuline	9.0÷20.0%
Rapporto albumina/globuline	1.22÷2.23

Fonte: Biochimica Applicata, Edises, 2012

Primo picco: Albumina

Secondo picco: α 1-globuline (alfa-1-antitripsina)

Terzo picco: α 2-globuline (alfa-2-macroglobulina, aptoglobina)

Quarto picco: β -globuline (transferrina, complemento frazione C3)

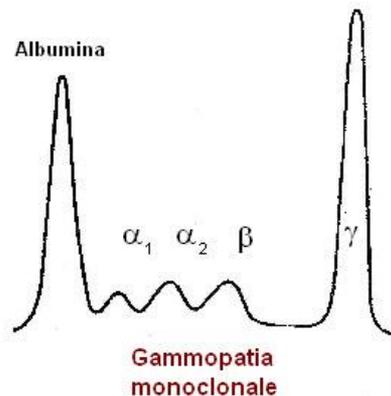
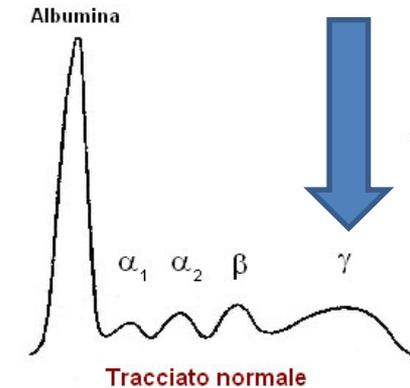
Quinto picco: γ -globuline (IgG, IgA, IgM)

L'elettroforesi può essere impiegata a scopo diagnostico....

Esempio: Le immunoglobuline (banda γ) migrano come una banda diffusa ed omogenea.

Può comparire una banda netta \rightarrow **componente monoclonale**.

Queste componenti possono essere associate a patologie: gammopatie monoclonali, mieloma, amiloidosi.

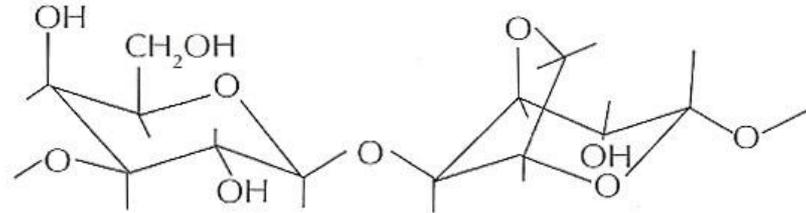


Fonte: Internet

Proteina	Concentrazione g/l
Albumina	35-52
Alfa-1 glicoproteina acida	0.5-1.2
Alfa-1 antitripsina	0.9-2
C3	0.9-1.8
C4	0.1-0.4
Ceruloplasmina	0.2-0.6
Proteina C-reattiva	<0.5
Aptoglobina	0.3-2
IgA	0.7-4
IgG	7-16
IgM	0.4-2.3
Transtiretina	0.2-0.4
Alfa-2 macroglobulina	1.3-3
Transferrina	2.0-3.6
Ferritina	0.03-0.15

Gel di Agarosio

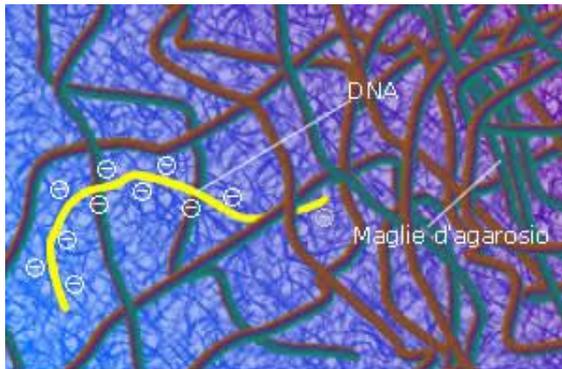
Miscela di due polimeri: **agarobiosio** e **agaropectina**.



Fonte: Internet

E' insolubile in acqua a temperatura ambiente → per scioglierlo bisogna aumentare la temperatura fino all'ebollizione.

Gelificazione → formazione di legami idrogeno tra le diverse catene polisaccaridiche.



Campo elettrico
- ————— +

Fonte: Internet

Durante la gelificazione, si formano dei «pori» nel gel (invisibili) la cui dimensione è **inversamente proporzionale alla concentrazione di agarosio**.

Utilizzato per l'analisi di macro-complessi proteici ed ***acidi nucleici***.

- Ottimo metodo per la separazione delle proteine del siero → buona risoluzione della regione gamma.
- DNA ed RNA a $\text{pH} > 4$ hanno carica negativa → hanno mobilità anodica e perciò si separeranno solo in base alla dimensione.

Metodi di visualizzazione (DNA ed RNA):

DNA (doppio filamento) ed RNA nativo → etidio bromuro (intercalante delle basi accoppiate, fluorescente)

Gel di Poliacrilammide

Diversi **vantaggi**:

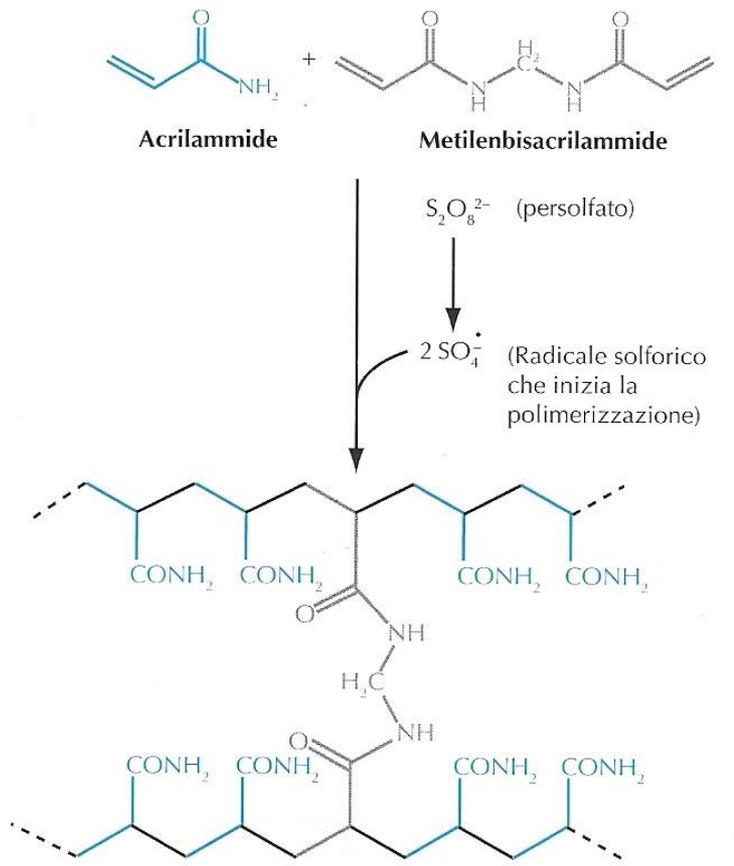
- Elevato potere di risoluzione di proteine ed acidi nucleici di piccole/medie dimensioni.
- Minime interazioni con la matrice delle molecole.
- Buona stabilità fisica del gel.
- Studio di proteine in conformazione *nativa* o *denaturante*.

Sfrutta sia la diversa mobilità elettroforetica che «*l'effetto setaccio*» del gel (separazione per peso molecolare).

Come si ottiene un gel di poliacrilammide?!?!?

Polimerizzazione di **acrilammide** ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) con **N,N'-metilen-bisacrilammide** ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$), responsabile della formazione di legami crociati.

Segue uno schema di **polimerizzazione radicalica**: attivazione – propagazione – terminazione.



Fonte: Biochimica Applicata, Edises, 2012

Ammonio persolfato → catalizzatore
TEMED (N,N,N,N-tetrametiletilendiammina)
→ iniziatore.

Il TEMED decompone lo ione persolfato con formazione del radicale solforico ($\text{SO}_4^{\cdot -}$)
[**Attivazione**].

Il radicale trasferisce l'elettrone spaiato sulla catena nascente di acrilammide, diventando radicale → innesca il processo di polimerizzazione [**Propagazione**].

La reazione termina con l'accoppiamento di 2 catene polimeriche in crescita
[**Terminazione**].

La porosità del gel varia in base alla concentrazione di acrilammide e metilen-bisacrilammide.

Gel a bassa %acrilammide → pori grandi, meno restrittivi per proteine grandi.

Gel ad alta %acrilammide → pori piccoli, difficile entrata proteine grandi; buona separazione proteine piccole.

%T	Range di pesi molecolari (Da) di proteine che possono essere separate
5	da 25 000 a 300 000
10	da 15 000 a 100 000
15	da 12 000 a 50 000

Gel a **gradiente di concentrazione**: concentrazione acrilammide da 5% a 25% → dimensione dei pori diminuiscono progressivamente.

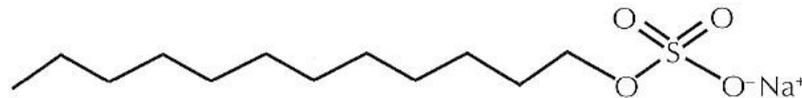
Migliore risoluzione proteine a basso PM.

Elettroforesi su gel di Poliacrilammide in presenza di SDS (SDS-PAGE)

SDS-PAGE: PolyAcrilammide Gel Electrophoresis in SDS

Uno dei metodi più usati per separare le proteine in base al peso molecolare e determinare il loro PM apparente.

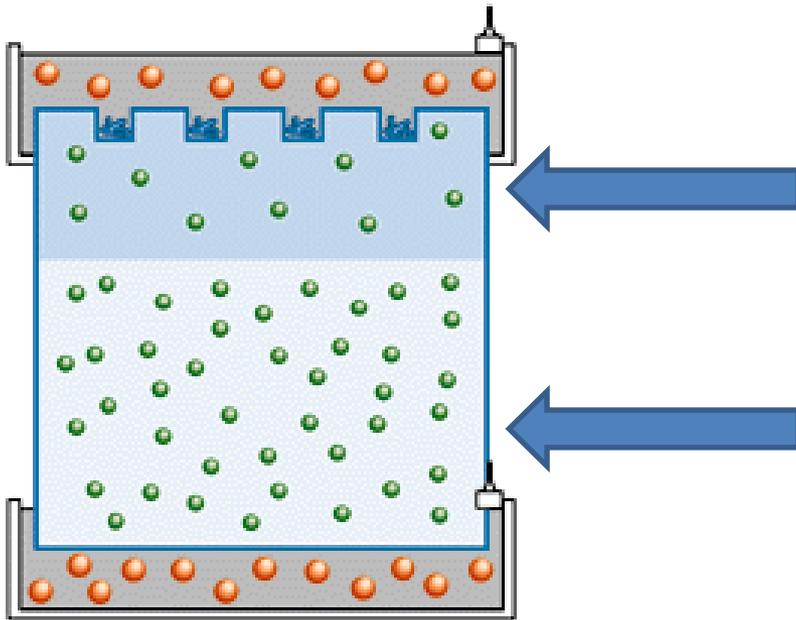
SDS: Sodio Dodecil Solfato, detergente anionico (denaturante).



Fornisce alla proteine una carica negativa costante per unità di massa.

Due tipi di gel:

- *Stacking gel*
- *Running gel*



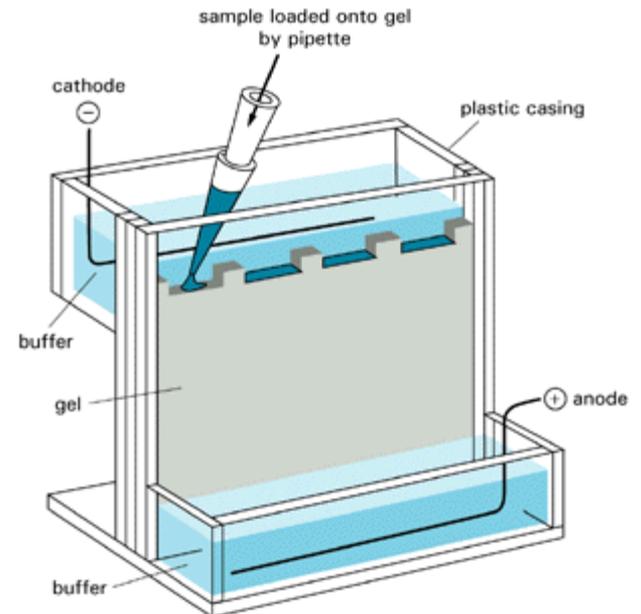
Fonte: Internet

Stacking gel: gel di impaccamento. Concentrazione di acrilamide inferiore a quello di corsa (5%); tampone a pH 6.8.
Funzione: concentra i campioni in bande.

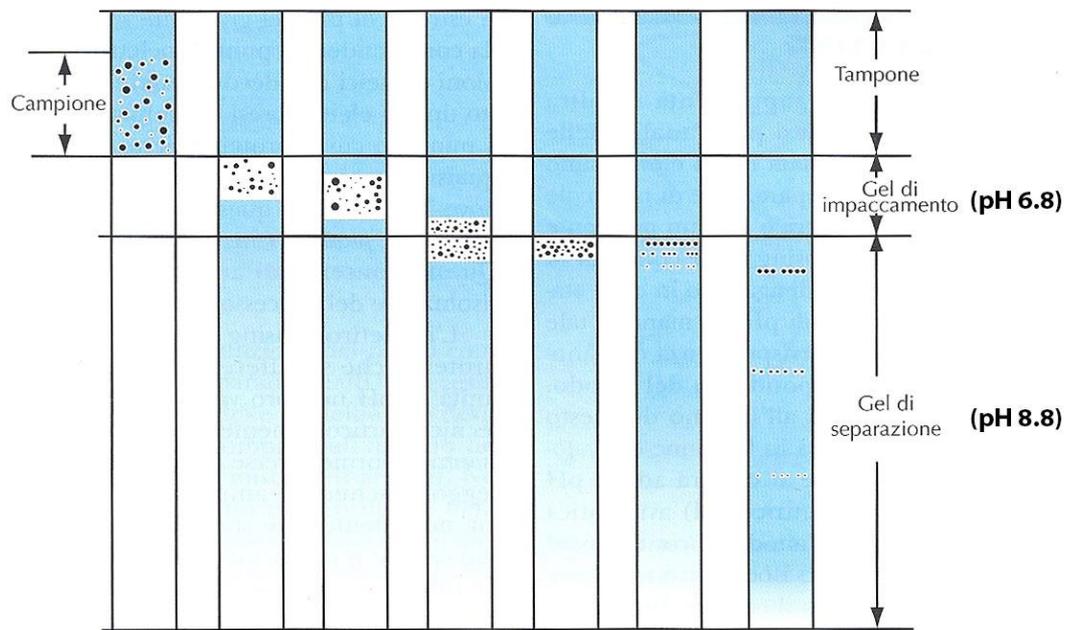
Running gel: gel di corsa. Concentrazione di acrilamide variabile; tampone a pH 8.8.
Funzione: separare i campioni

Loading buffer: Tris-HCl pH 6.8 + Glicerolo + β -mercaptoetanolo (o DTT) + SDS + blu bromofenolo.

Tampone di corsa: Tris-Glicina-SDS pH 8.3.



Fonte: Internet

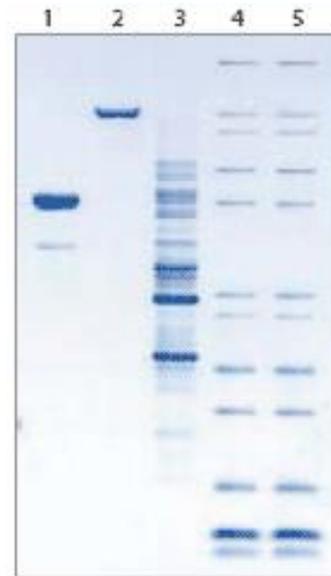


Fonte: Biochimica Applicata, Edises, 2012



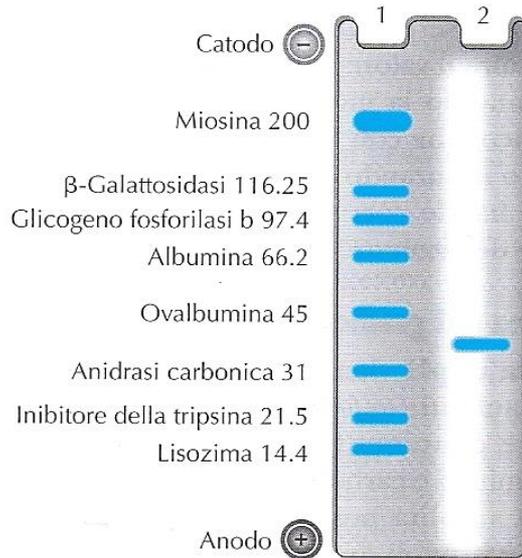
Colorazione

- Blue di Coomassie
- Nitrato d'Argento
- Coloranti fluorescenti



Fonte: Internet

Determinazione peso molecolare apparente



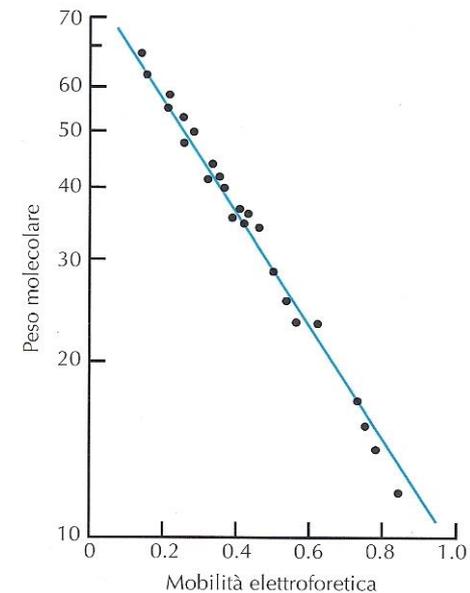
Fonte: Internet

Apparente? Le proteine possono migrare in modo anomalo a causa di modifiche post-traduzionali o in base a loro caratteristiche.

Il PM si determina utilizzando proteine standard (marker) a PM noto.

Esiste una relazione **lineare** tra **logaritmo del PM** e **mobilità elettroforetica relativa**.

Mobilità elettroforetica relativa: «calcolata» dal rapporto tra distanza percorsa dalla proteina incognita e del tracciante.



Fonte: Biochimica Applicata, Edises, 2012

Isoelettrofocusing

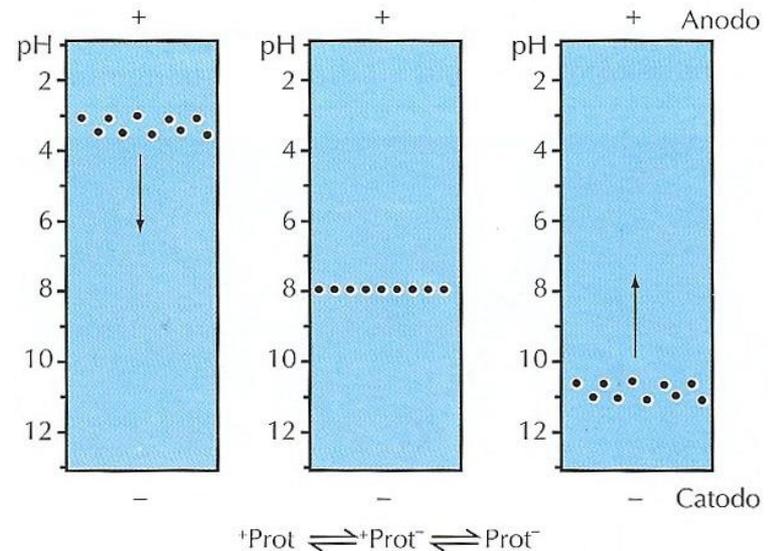
Sfrutta la separazione di molecole all'interno di un campo elettrico e di un gradiente di pH.

Viene utilizzata per separare le proteine in base al **punto isoelettrico** → pH a cui le proteine hanno una carica netta pari a **zero**.

$\text{pH} > \text{pI} \rightarrow$ carica negativa

$\text{pH} < \text{pI} \rightarrow$ carica positiva

$\text{pH} = \text{pI} \rightarrow$ carica = 0, la proteina non migra.



Permette la separazione di proteine differenti ma simili in peso molecolare.

Western Blotting

Permette di trasferire proteine da un gel ad una membrana immobilizzante (nitrocellulosa o PVDF [PolyVinylDiFluoride]) → le proteine si legano alla membrana per interazioni idrofobiche o elettrostatiche.

Mediante reazione con un anticorpo specifico è possibile identificare una determinata proteina.

