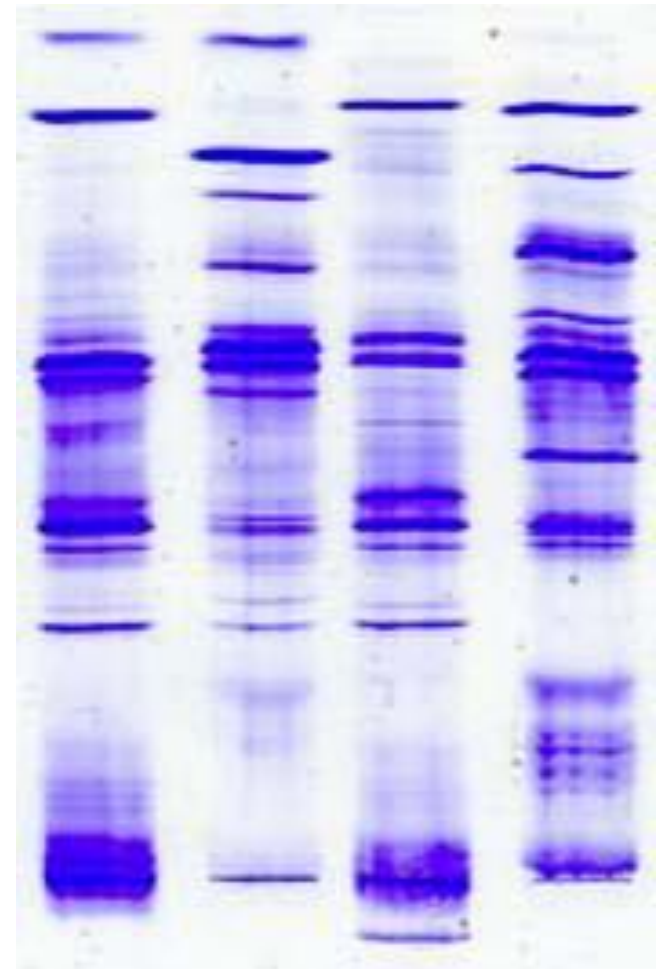


FOCALIZZAZIONE ISOELETTRICA (IEF)



ELETTROFORESI DI PROTEINE

CRITERI DI SEPARAZIONE

- PAGE “nativa” densità di carica (pI),
dimensioni, forma
- PAGE-SDS solo dimensioni
- IEF solo in base al punto
isoelettrico (pI)

FOCALIZZAZIONE ISOELETTRICA (IEF)

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

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

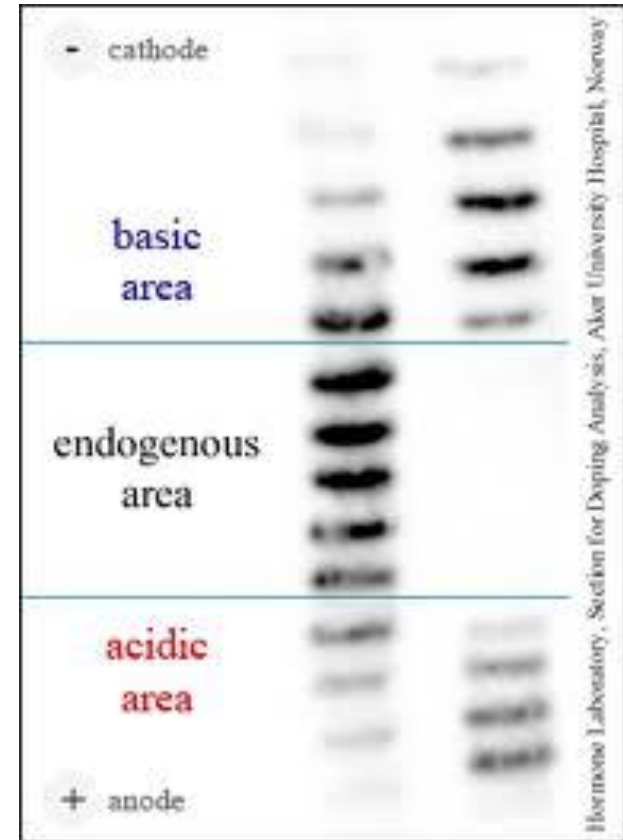
tassonomia, biochimica delle membrane,

microbiologia, identificazione di proteine plasmatiche

CARATTERISTICHE DELLA IEF

VANTAGGI

- **Risoluzione** altissima.
- **Sensibilità** elevata.
- Permette di **misurare** il pI.



SVANTAGGI

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

FOCALIZZAZIONE ISOELETTRICA (IEF)

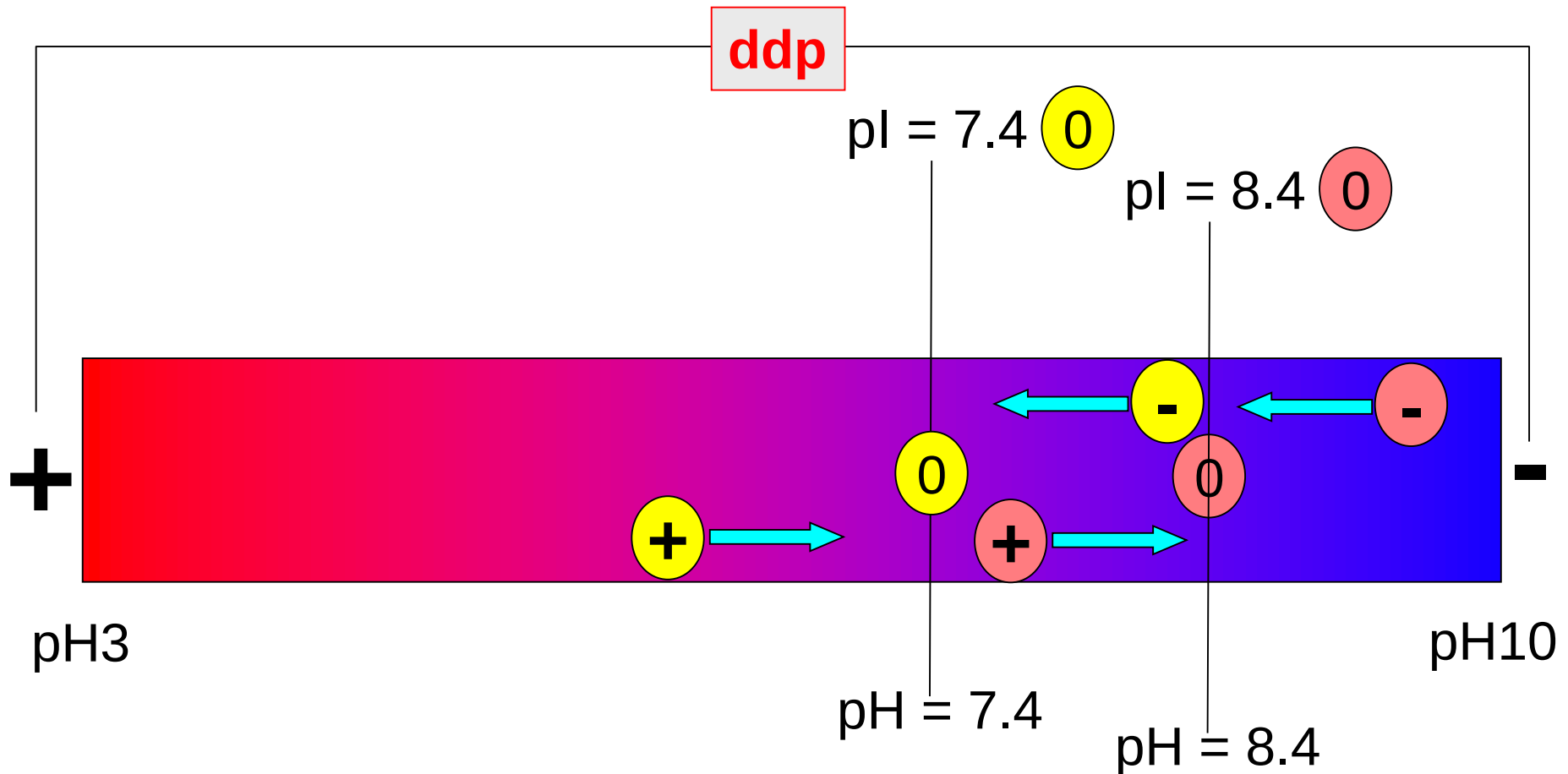
Tipico supporto



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

MIGRAZIONE DELLE MOLECOLE IN IEF

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



Catodo (-)
Basico

pI = pH 7.4

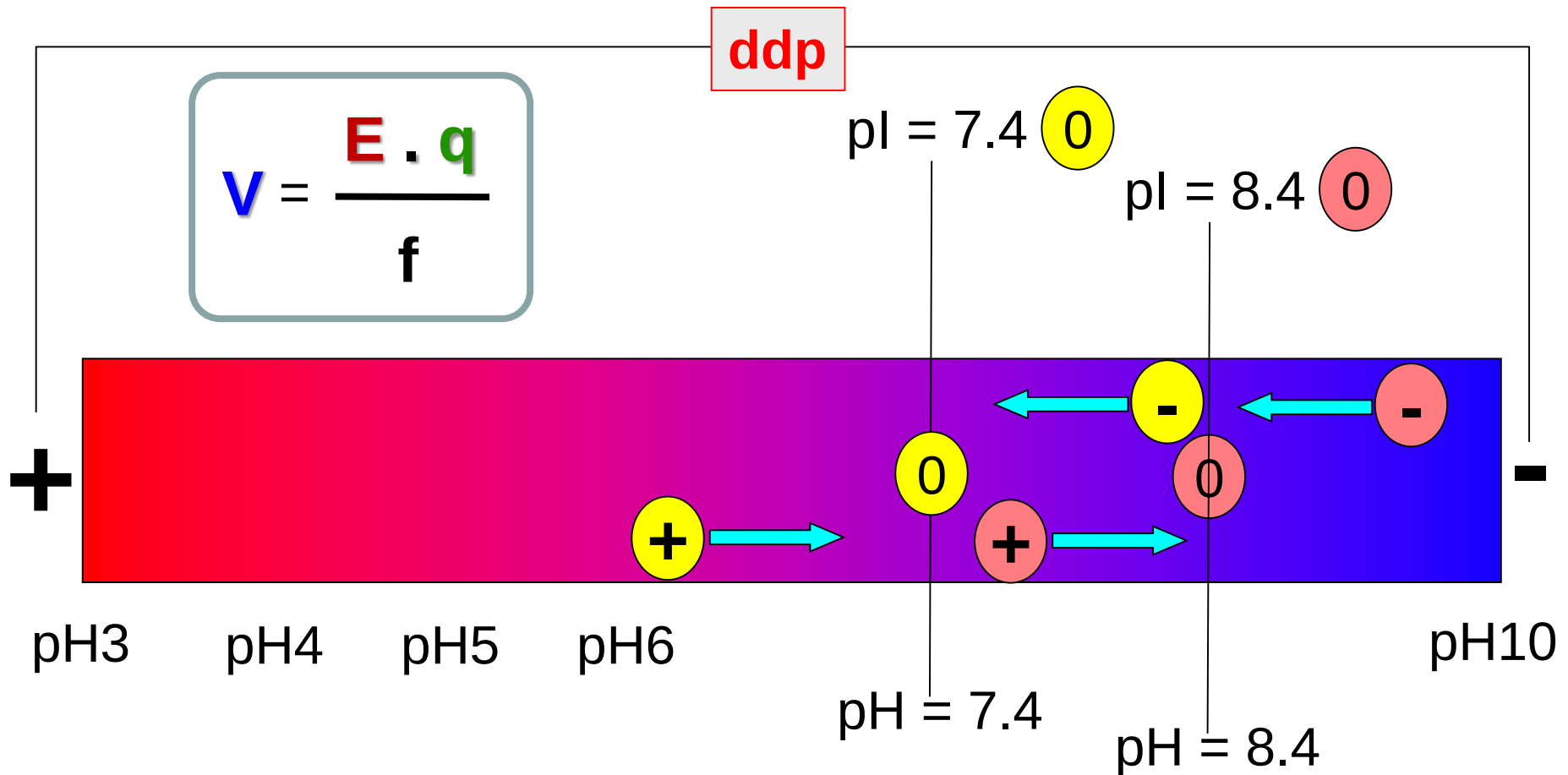
> è la distanza di una proteina dal proprio pI (in termini di pH),

> sarà la sua carica, dunque anche la sua **V**.

Anodo (+)
Acido

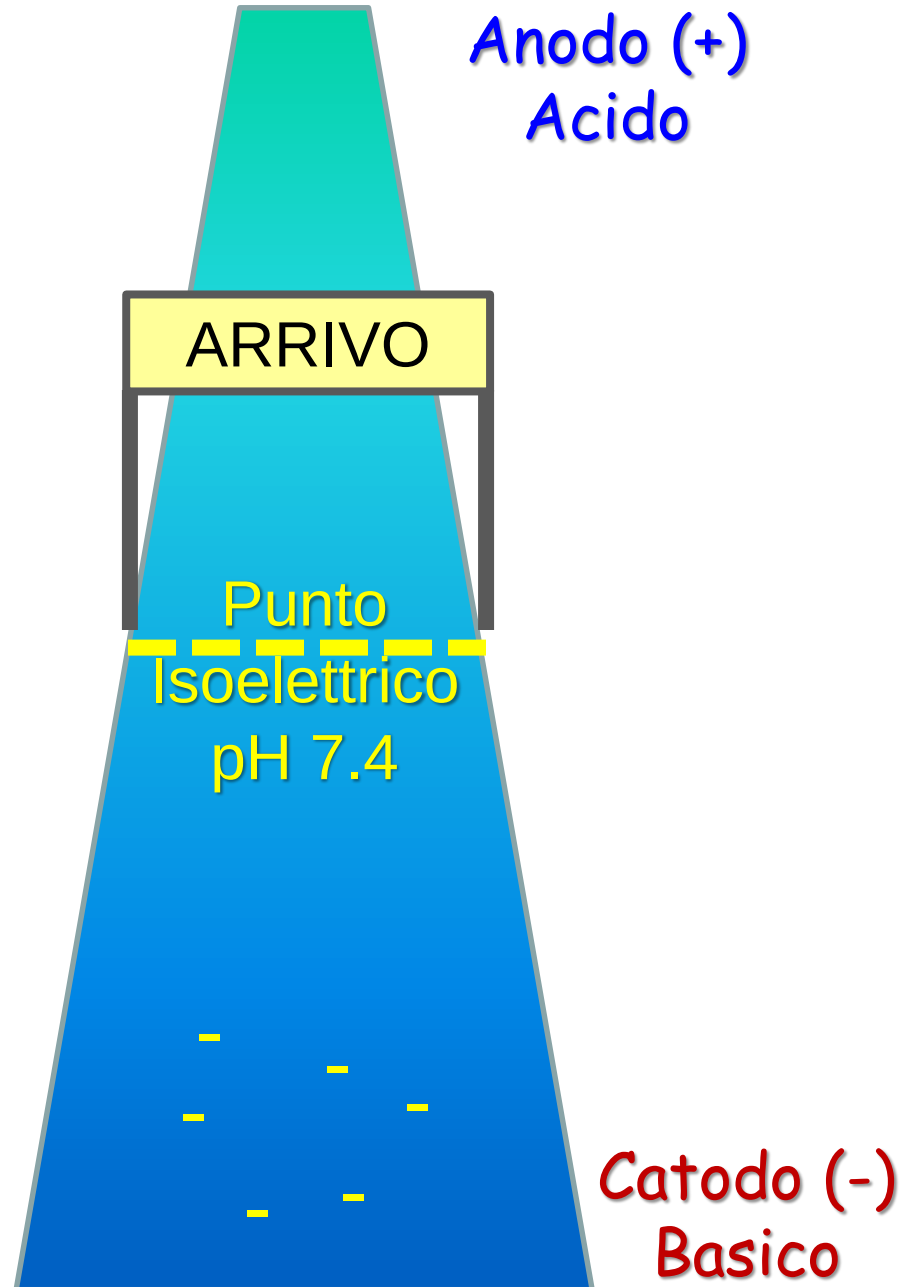


MIGRAZIONE DELLE MOLECOLE IN IEF

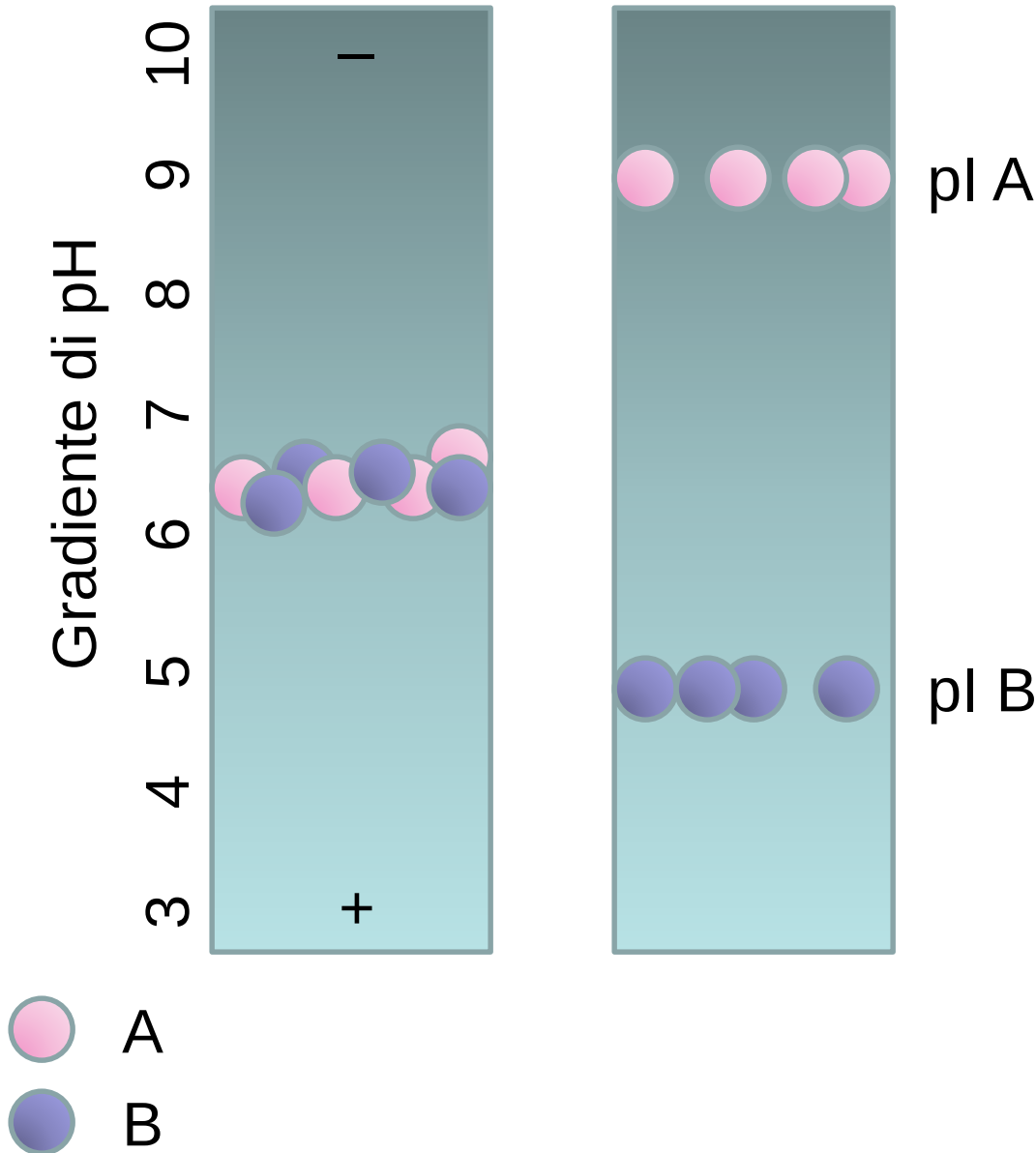


- > è la distanza di una proteina dal proprio pI (in termini di pH), > sarà la sua carica, dunque anche la sua V .

MIGRAZIONE DELLE MOLECOLE IN IEF



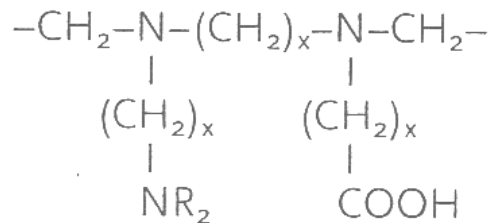
FOCALIZZAZIONE ISOELETTTRICA (IEF)



L'intervallo di pH è scelto in modo da contenere i **pl** di **TUTTI** i componenti della miscela da separare.

GRADIENTI DI pH

ANFOLITI



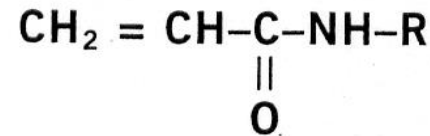
$\text{R} = \text{H}$ or $-(\text{CH}_2)_x-\text{COOH}$, $x = 2$ or 3

- Composti con n° variabile di gruppi amminici e carbossilici.
- Ciascuno ha un proprio pI
- Basso assorbimento a 280 nm
- Buona solubilità in acqua (per evitare la precipitazione)

Vantaggio: alta capacità tamponante al loro pI.

Svantaggi: gradiente non stabile e influenzabile dalle molecole che vengono analizzate.

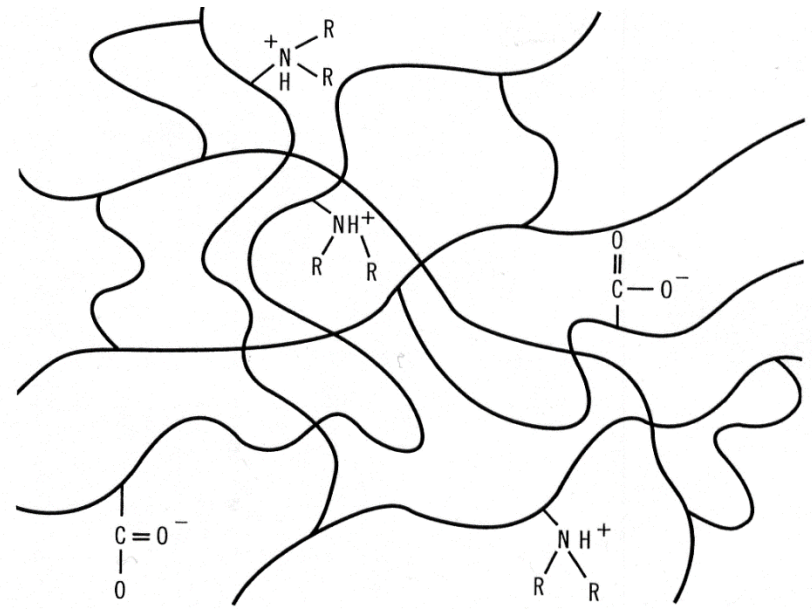
IMMOBILIZZATI



$\text{R} = \text{weakly acidic or basic buffering group}$

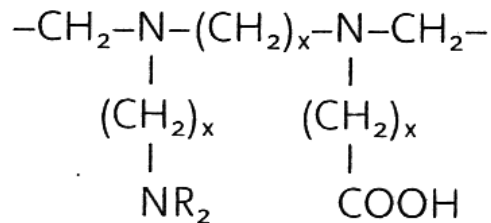
Derivati dell'acrilammide, noti come **Immobiline**.

$\text{R} =$ gruppi carbossilici od amminici (pKa da 0.8 a 4.6 / pKa da 6.2 a 12).



GRADIENTI DI pH

ANFOLITI

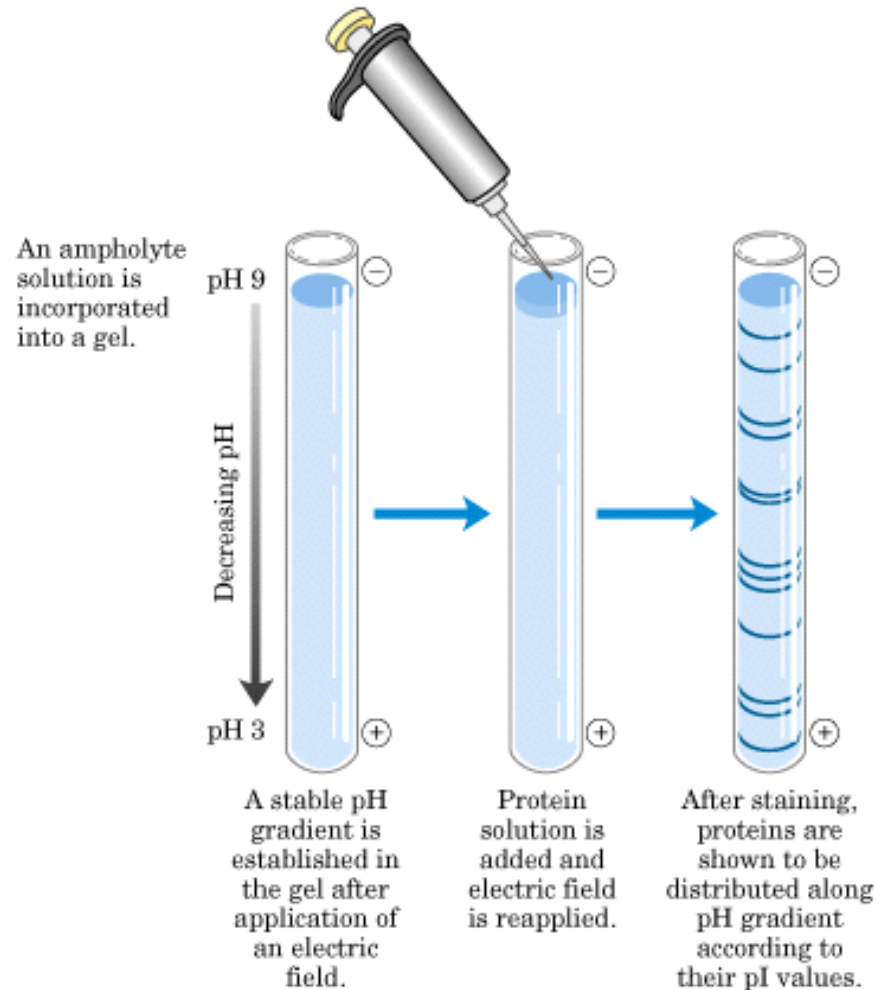


$R = \text{H}$ or $\text{--(CH}_2\text{)}_x\text{--COOH}$, $x = 2$ or 3

- Composti con n° variabile di gruppi amminici e carbossilici.
- Ciascuno ha un proprio pI.
- Basso assorbimento a 280 nm
- Buona solubilità in acqua (per evitare la precipitazione).

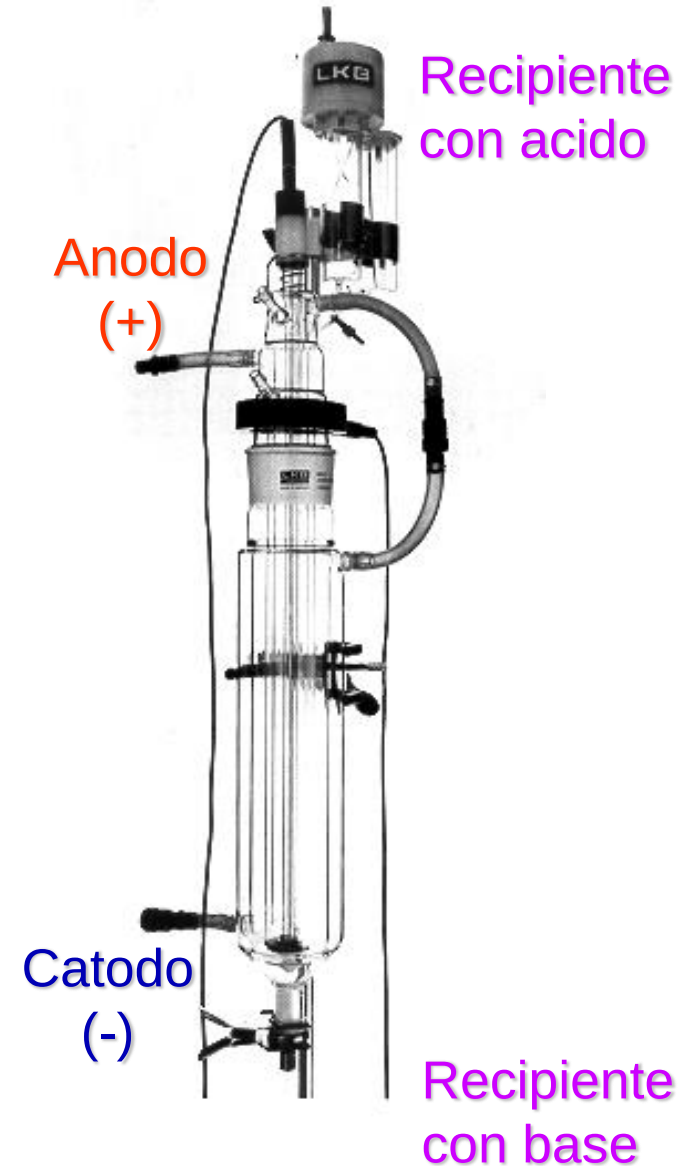
Vantaggio: alta capacità tamponante al loro pI.

Svantaggi: gradiente non stabile e influenzabile dalle molecole che vengono analizzate.



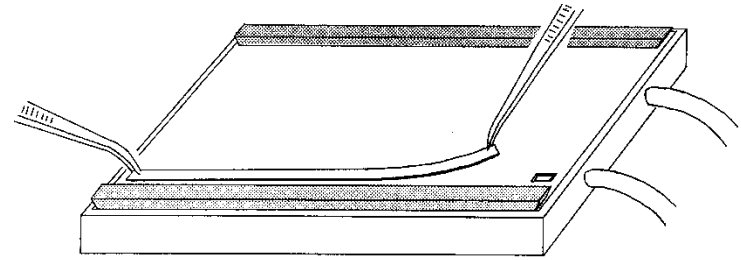
IEF VERTICALE SU COLONNA

- Colonne termostatabili di vetro
- Anfotiti disciolti in un addensante (es. saccarosio)
- Prima si crea il gradiente di pH, poi si applica una **ddp**, che fa spostare gli anfotiti, infine si inietta il **campione**.
- Separazioni in 1-2 giorni



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.

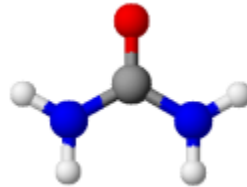
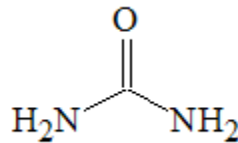
GRADIENTI DI pH IMMOBILIZZATI

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

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

TAMPONE DI REIDrataZIONE
per denaturare e solubilizzare

8 M **Urea**



0,5 - 4% **CHAPS**

0,2 – 0,8% **DTT**
(o altri agenti riducenti)

Glicerolo 10%

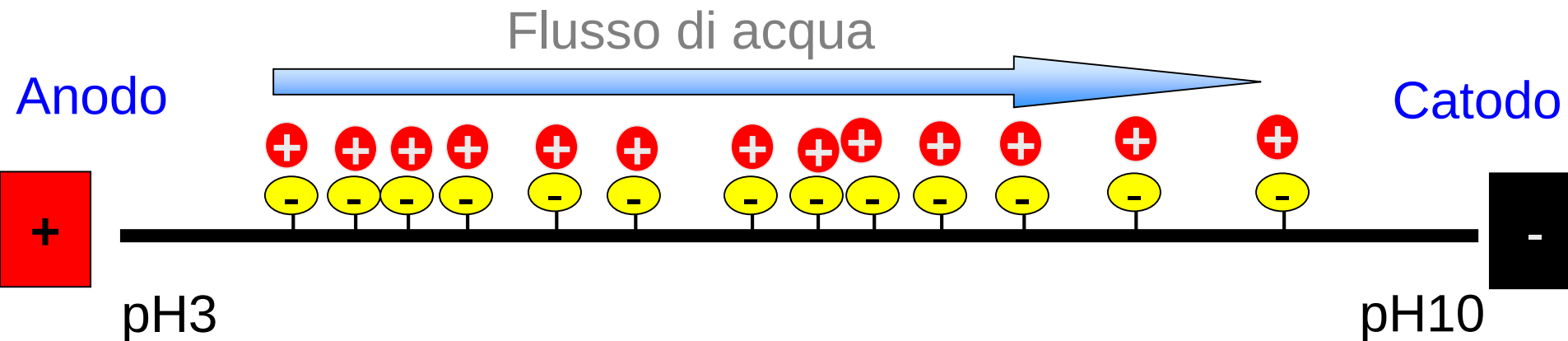
TEMPERATURA:
mantenuta attorno
a 20°C.

FLUSSO ELETTROENDOSMOTICO

In presenza di cariche **fisse** sulla matrice del gel (in particolare, **negative**) e dei loro **controioni** (**cationi** con la loro sfera d'idratazione od **H_3O^+**) che attirano acqua per osmosi e **migrano verso il catodo** creando un vero e proprio flusso.

Notevoli problemi con gradienti di pH non immobilizzati => => => distorsione/spostamento del gradiente di pH.

Il **glicerolo** , aumentando la densità del mezzo, **minimizza** questo effetto, importante anche durante il trasferimento delle proteine dalla prima alla seconda dimensione.



MODIFICAZIONI DEL FLUSSO ELETTROENDOSMOTICO

~~Tensioattivi~~

~~pH~~

Temperatura

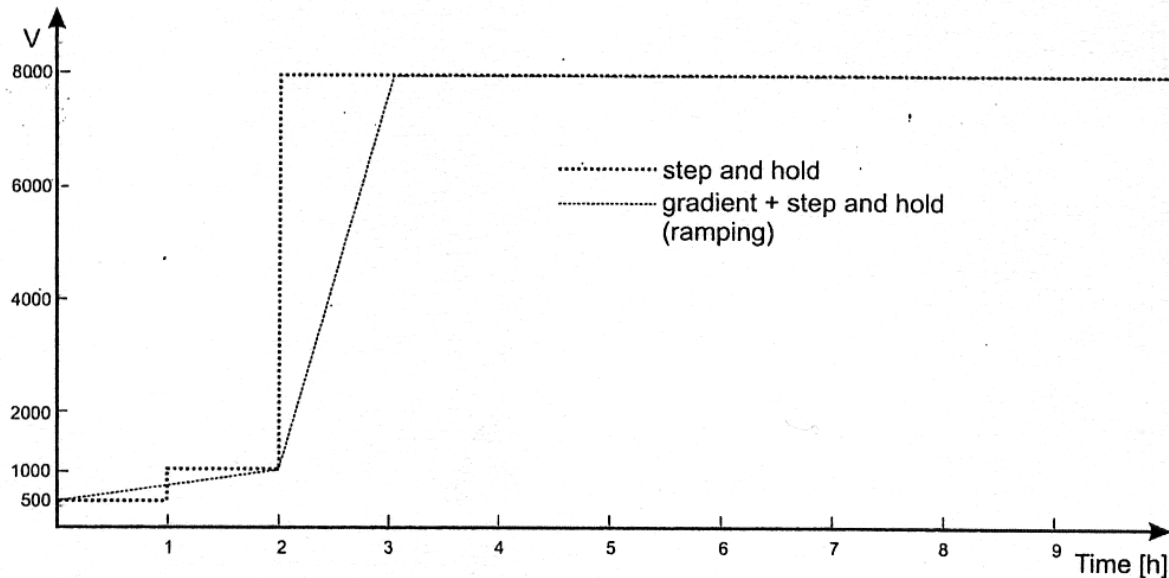
EOF

~~Forza Ionica~~

Campo elettrico

DDP APPLICATE

La ddp viene **aumentata progressivamente**



Generatori molto potenti



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

TERMINE DELLA IEF

A) Possono essere trattate subito per la seconda dimensione.

B) **Congelamento**: lavaggio delle strip H_2O (immerse una decina di volte in un becker contenente H_2O), scolate su un pezzo di carta e messe a congelare ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) 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: STESSE OPERAZIONI PER OGNI STRIP CHE SI VUOLE CONFRONTARE!)

CALCOLO DEL pI

1 Nterm
11 R
1 D
14 E
16 K
1 Cterm



Algoritmi per il
calcolo del pI

pI **misurabile** o **calcolabile**,
semplicemente sulla base della
sequenza primaria, salvo che la
proteina non sia glicosilata.

Number of amino acids: 106

Molecular weight: 11544.8

Theoretical pI: 10.31

Amino acid composition:

Ala (A) 4 3.8%

Arg (R) 11 10.4%

Asn (N) 1 0.9%

Asp (D) 1 0.9%

Cys (C) 0 0.0%

Gln (Q) 6 5.7%

Glu (E) 14 13.2%

Gly (G) 11 10.4%

His (H) 0 0.0%

Ile (I) 1 0.9%

Leu (L) 3 2.8%

Lys (K) 16 15.1%

Met (M) 0 0.0%

Phe (F) 0 0.0%

Pro (P) 13 12.3%

Ser (S) 14 13.2%

Thr (T) 8 7.5%

Trp (W) 0 0.0%

Tyr (Y) 0 0.0%

Val (V) 3 2.8%

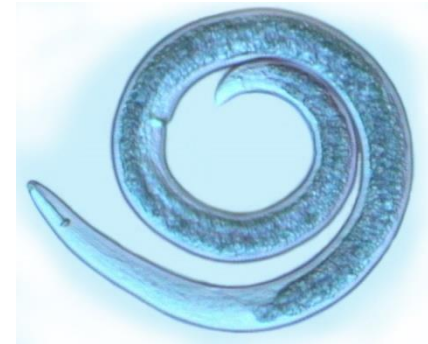
PROTEOMICA



LA COMPLESSITA' DEL GENOMA NON E' SUFFICIENTE A SPIEGARE LA COMPLESSITA' DELL'ORGANISMO



Circa 3000 geni
di differenza!



FLUSSO DELL'INFORMAZIONE

DNA



Trascritto

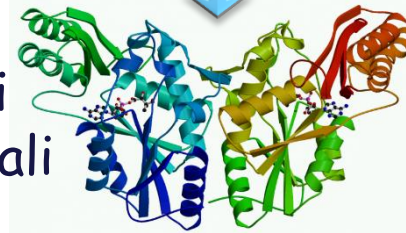


mRNA maturo



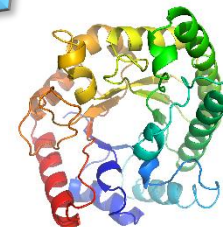
TRADUZIONE

Modificazioni
post-traduzionali



Tagli proteolitici

~20000 geni codificanti
Vs
>290000 proteine



Clivaggio

Glicosilazione

Fosforilazione

Idossilazione

Acetilazione

Metilazione

Carbossilazione

Transamidazione

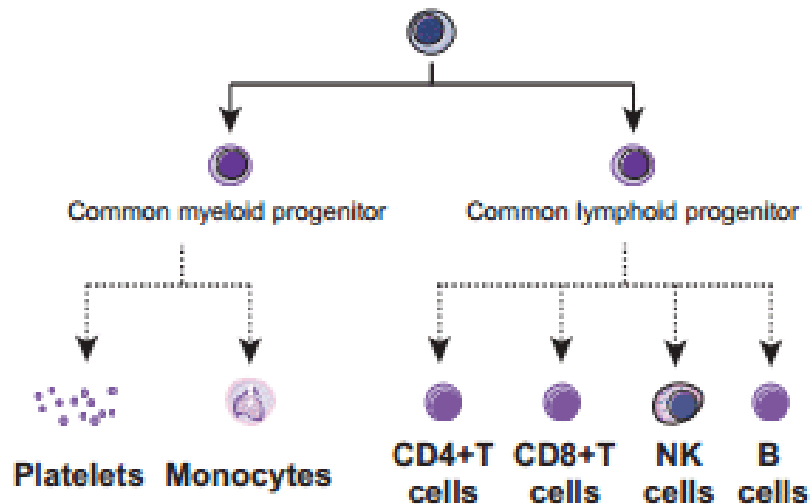
HUMAN PROTEOME

NATURE 2014

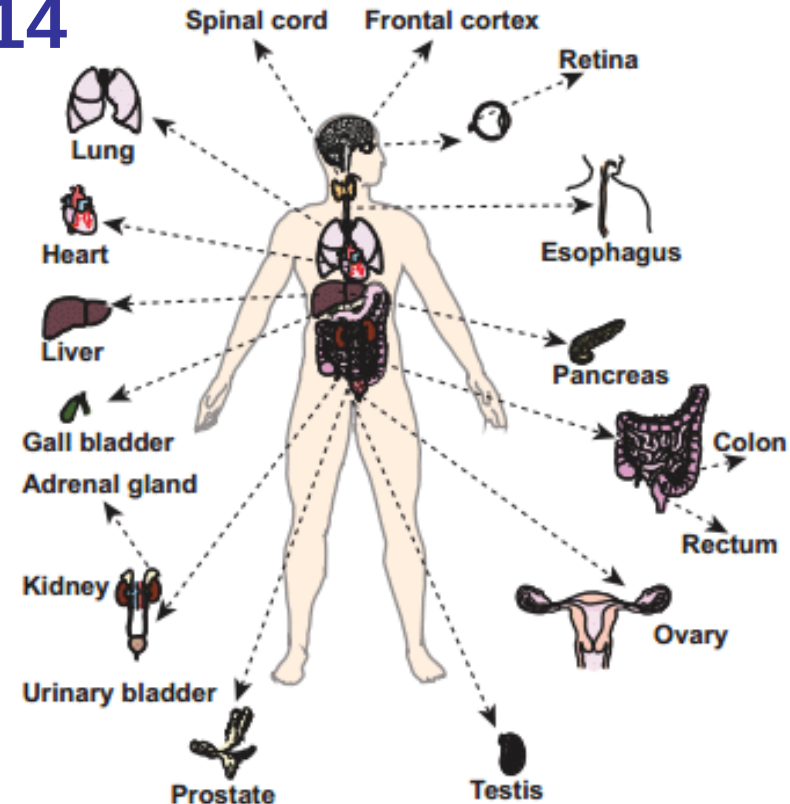
Statistics

Organs/cell types	30
Genes identified	17,294
Proteins identified	30,057
Peptide sequences	293,700
N-terminal peptides	4,297
Splice junctional peptides	66,947
Samples	85
Adult tissues	17
Fetal tissues	7
Cell types	6

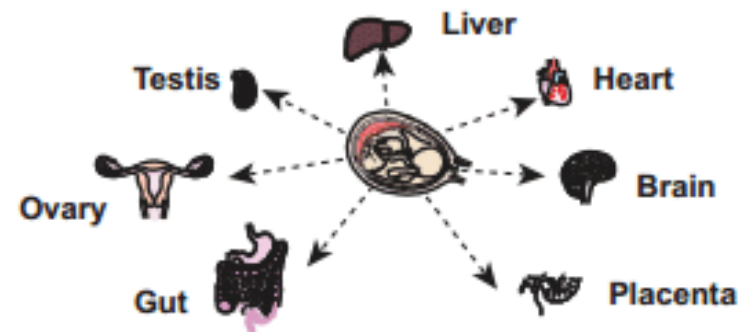
Hematopoietic cells



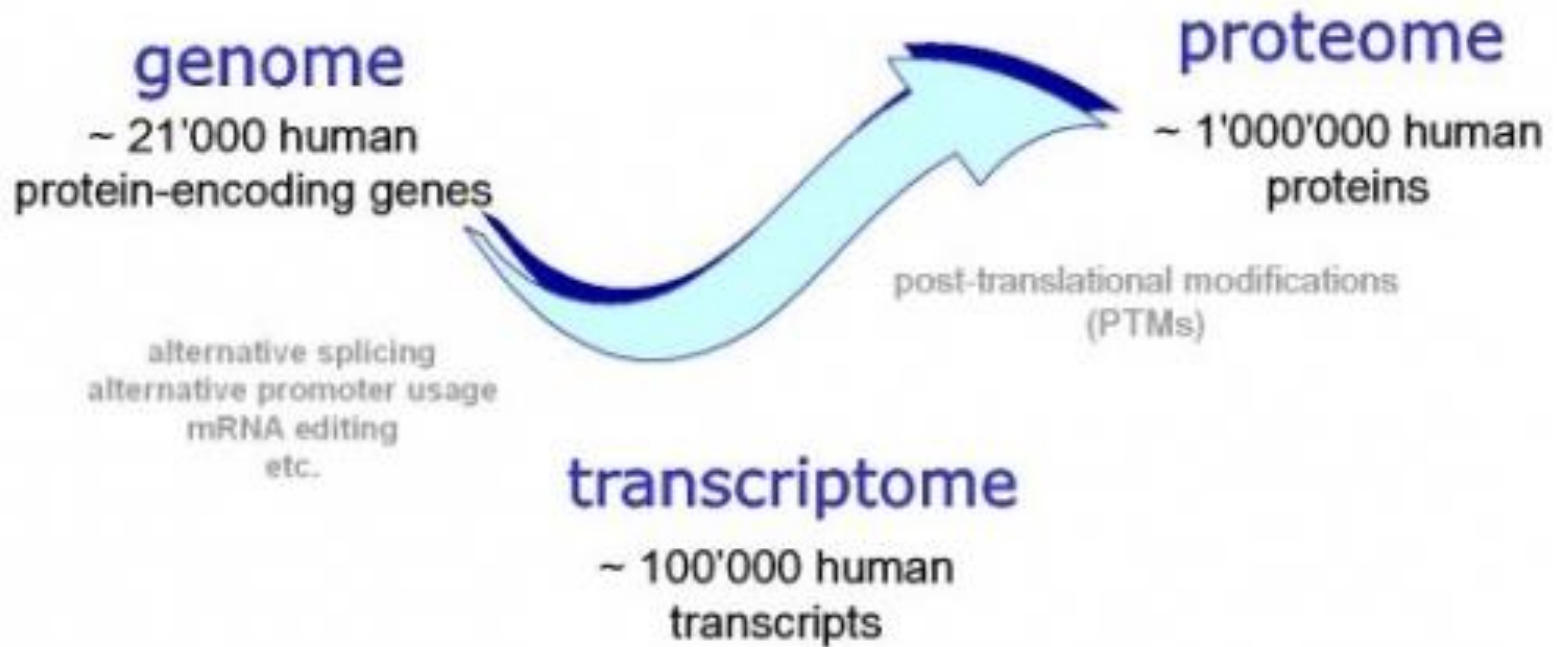
Adult tissues



Fetal tissues



OGGI



Complessità crescente

Expert Rev Proteomics. 2008 Dec;5(6):769-73. doi: 10.1586/14789450.5.6.769.

8th Siena meeting. From genome to proteome: integration and proteome completion.

Godovac-Zimmermann J¹.

+ Author information

Abstract

The biennial Siena Proteome conferences can be regarded as the cradle of the massively expanding field of proteomics. The very term 'proteome' was introduced at the 1st Siena meeting in 1994 by Marc Wilkins, and some of the most important proteomics advancements were first reported in Siena. The intervening years have seen proteomics develop into one of the most powerful approaches in biology, providing new insights into how cells, tissues and even whole organisms function at the molecular level. The 8th Siena meeting 'From Genome to Proteome: Integration and Proteome Completion' was attended by over 400 scientists. There was one Nobel lecture, eight plenary lectures, 58 invited talks and 199 posters covering virtual proteome completion, quantitative and functional proteomics, genetics and evolution, oncology, model systems, 2D gel electrophoresis, mass spectrometry methods and validation of biomarkers. As usual, the meeting was particularly fruitful in stimulating wide-ranging consideration of future perspectives.

PMID: 19086856 [PubMed - indexed for MEDLINE]

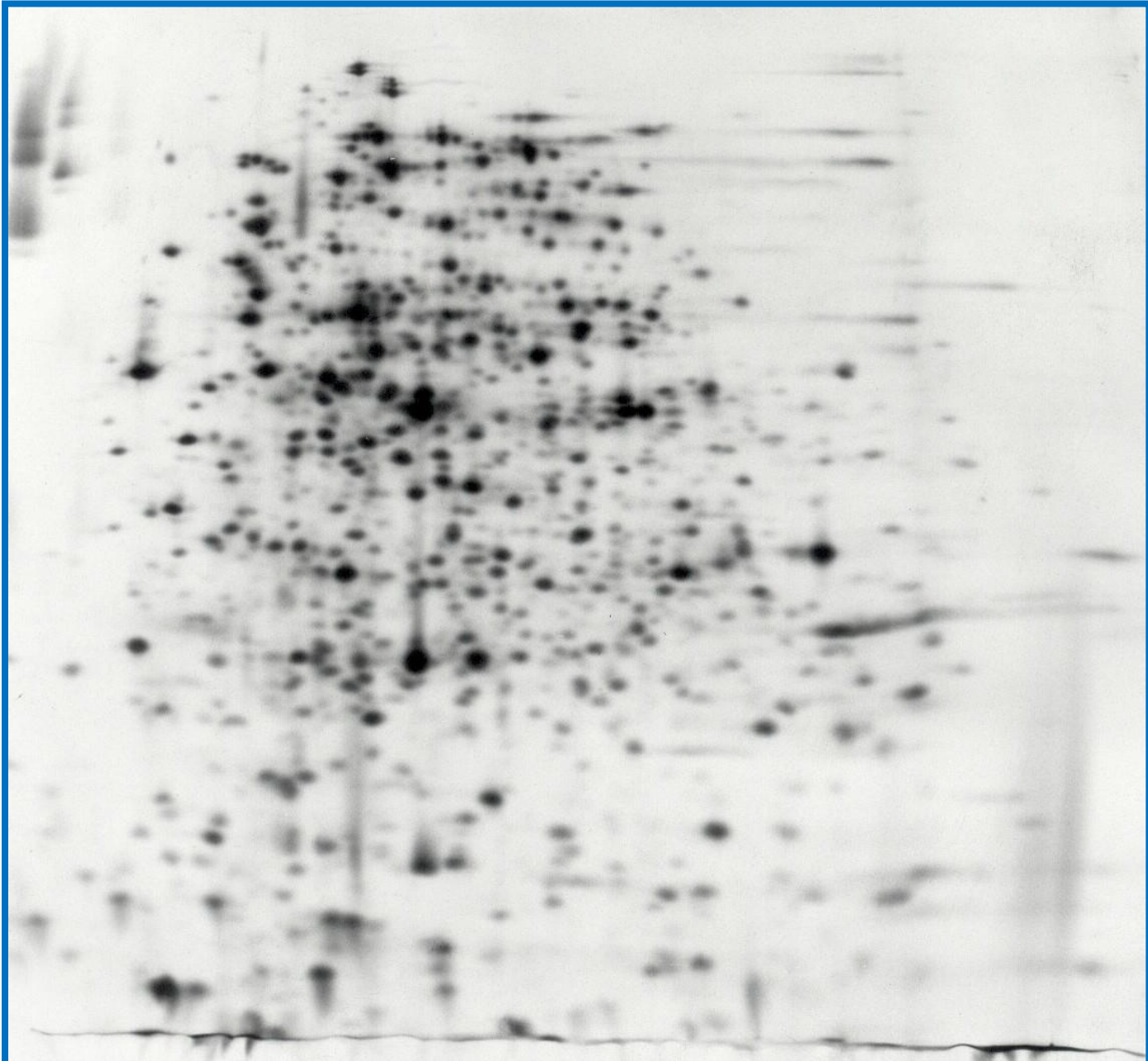
Il **proteoma** è l'insieme di tutte le proteine di un sistema biologico



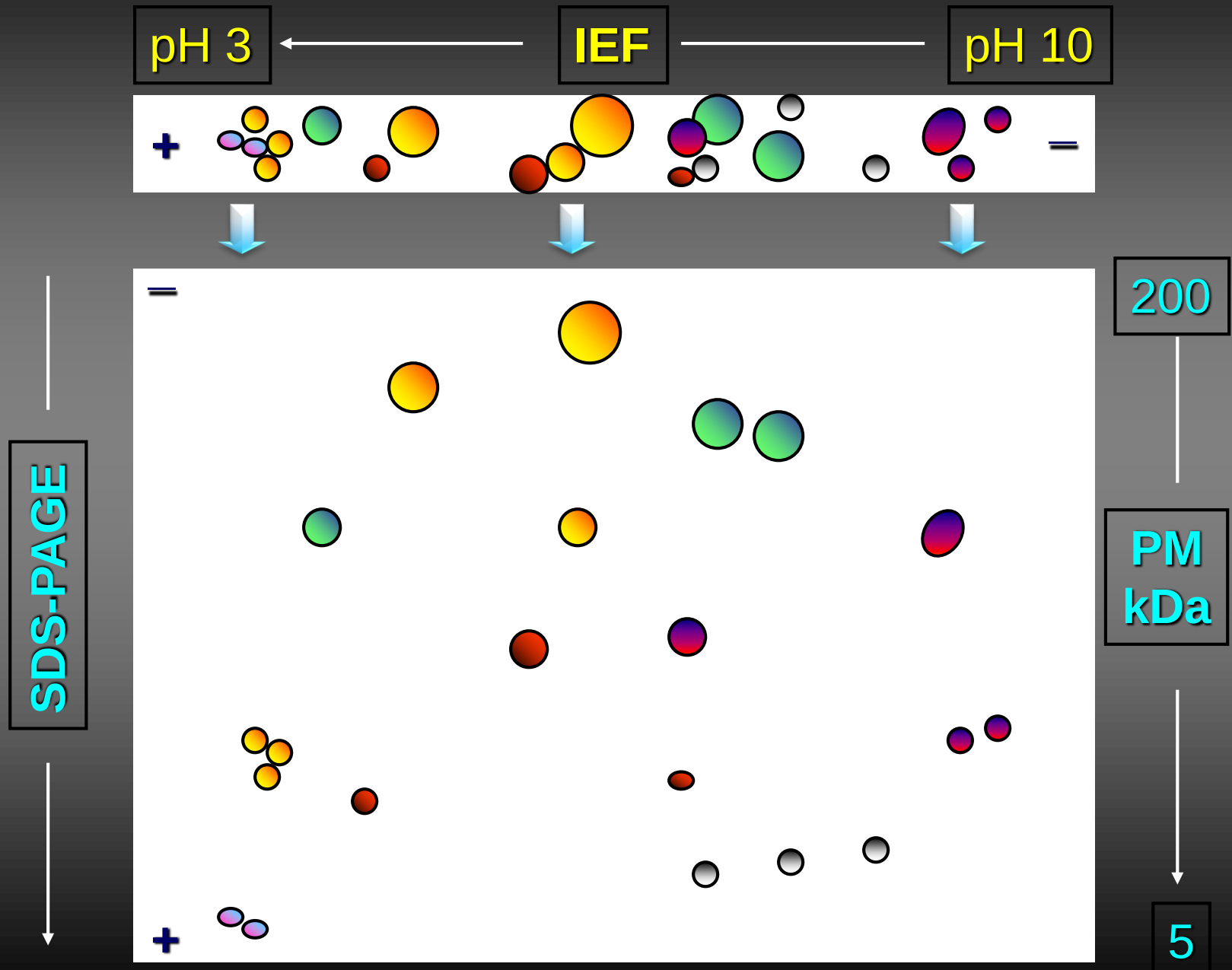
Stesso **genoma**...
diverso **proteoma** !



ANALISI DI MAPPE BIDIMENSIONALI



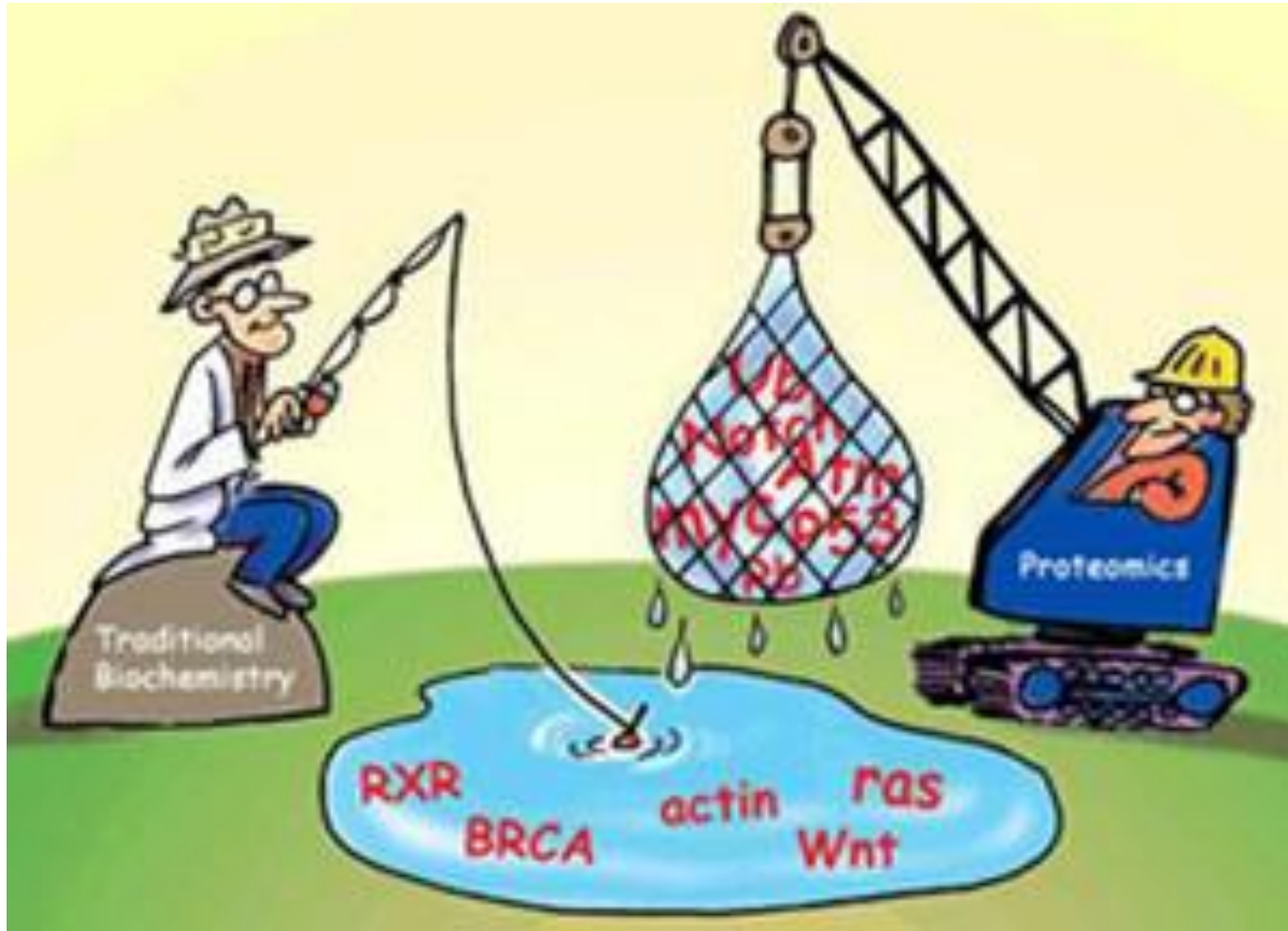
ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE o 2D



ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE o 2D

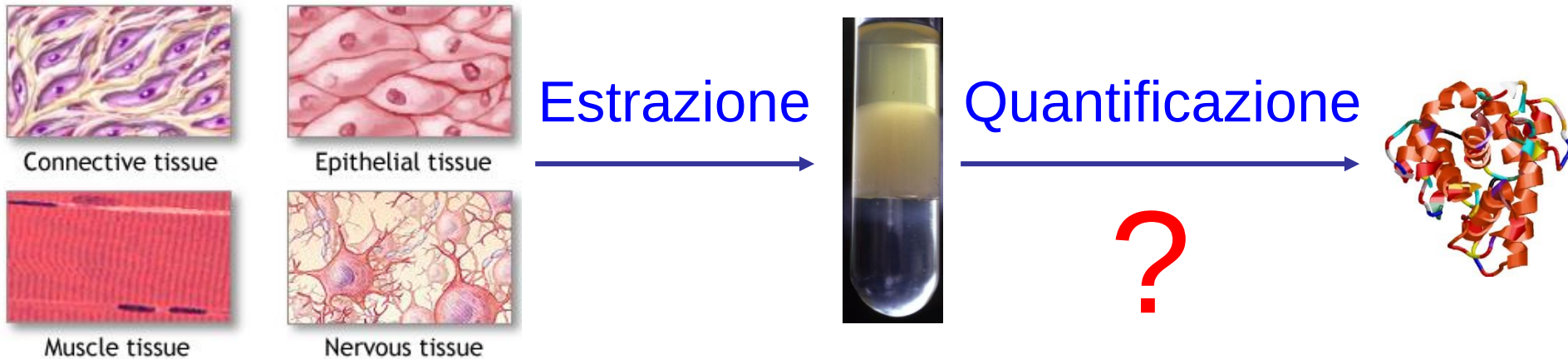
Accoppiamento di 2 metodi monodimensionali elettroforetici. Si effettua **prima** una isoelettrofocalizzazione (IEF), **poi** una SDS-PAGE.

- 1) Permette una **risoluzione** ancora > sulle proteine di una miscela complessa.
- 2) Permette di avere 2 informazioni su **migliaia** di campioni proteici (**pI** e **PM**).
- 3) Valutare meglio la **purezza** di una proteina purificata e identificare eventuali contaminanti.
- 4) Utilizzare la 2D per **purificare** proteine



Fields S. Proteomics. Proteomics in genomeland.
[Science](#) 2001 Feb 16;291(5507):1221-4.

TRATTAMENTO DEI CAMPIONI



PREPARAZIONE CAMPIONE PROTEICO

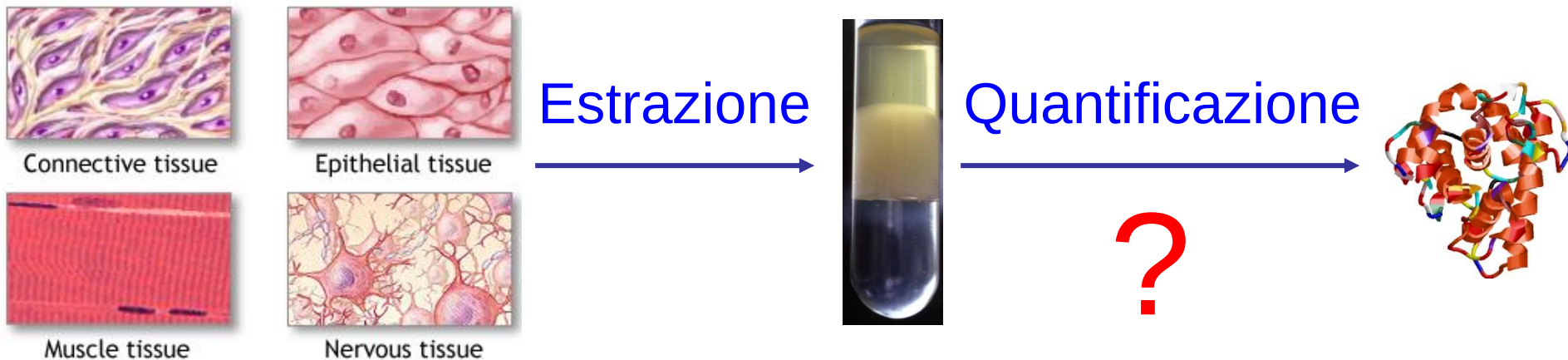
1) Aggiunta di **inibitori delle proteasi** (PMSF, EDTA, Benzamidina)

INIBIZIONE DELLE PROTEASI

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

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 $\mu\text{g/mL}$

TRATTAMENTO DEI CAMPIONI



PREPARAZIONE CAMPIONE PROTEICO

- 1) Aggiunta di inibitori delle proteasi (PMSF, EDTA, Benzamidina)
- 2) Eliminazione delle sostanze non proteiche **cariche**; interferirebbero con l' IEF

CONTAMINANTI

SALI:

- Evitare concentrazioni saline $>40\text{mM}$
- Rimozione tramite **dialisi**, **gel filtration**, **precipitazione** (TCA/Acetone)

DETERGENTI IONICI:

- **Diluire** il campione in una soluzione contenente un detergente neutro o zwitterionico (SDS $<0.25\%$, Rapporto Det.neutro/SDS 8:1)
- **Precipitazione**

ACIDI NUCLEICI:

- Potenziali artefatti dovuti al legame proteine-DNA
- Elevata viscosità "ostruisce" i pori della poliacrilamide
- **Digestione** enzimatica (1mg/ml **DNasi**, 0.25 mg/ml **RNasi**)

POLISSACARIDI:

- Ostruzione dei pori della poliacrilamide (Destrani e Mucine)
- Legami con le proteine - Artefatti
- **Precipitazione** TCA/Acetone

LIPIDI:

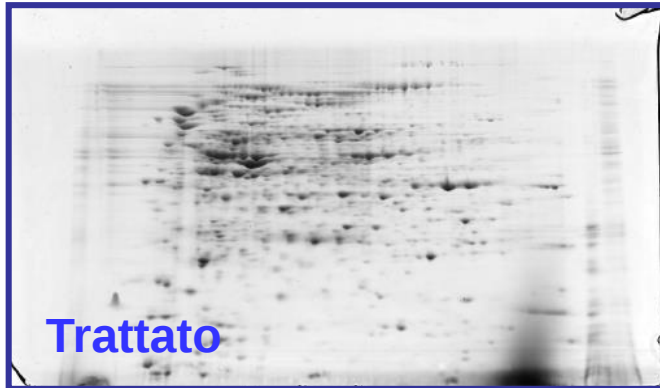
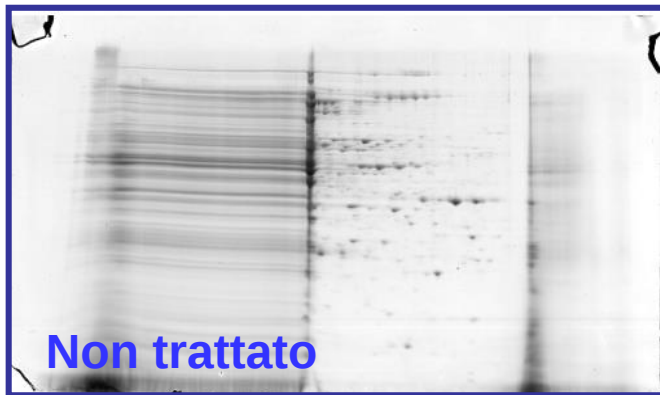
- Delipidazione con **solventi organici** (Cloroformio/Metanolo). **Precipitazione** TCA/Acetone.

COMPOSTI FENOLICI

- Presenti in tessuti vegetali. **Precipitazione** TCA/Acetone
- Trattamento con **Polivinilpirrolidone (PVP)** o **Polivinilpolipirrolidone (PVPP)** e agenti riducenti

ESEMPIO DI PULIZIA DEL CAMPIONE

ReadyPrep 2-D Cleanup Kit



E. coli cell lysates spiked with 1% SDS

Precipitazione mediante TCA

Rimuove Sali, detergenti, composti fenolici, lipidi, ioni...

Migliora la risoluzione del gel eliminando le strisce.

Elevato recupero delle proteine (>99.5% vs 70%).

Concentra campioni diluiti.

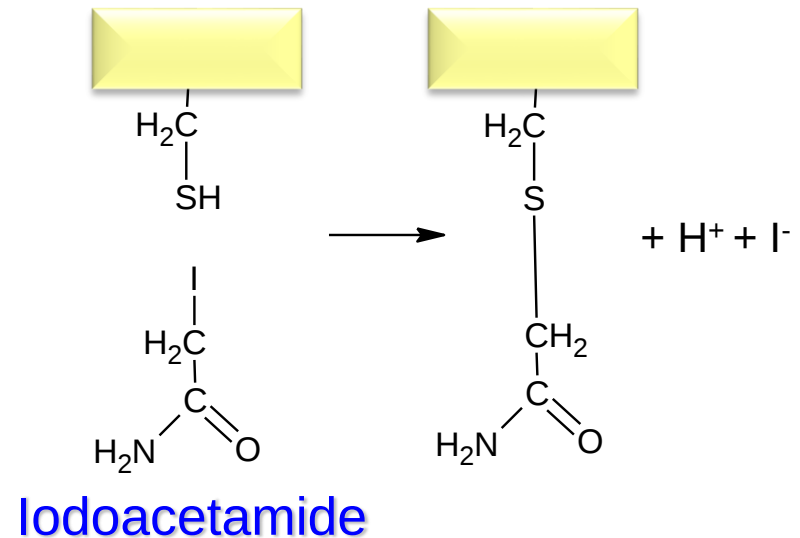
PREPARAZIONE CAMPIONE PROTEICO

- denaturanti (Urea o Tiourea **al posto dell'SDS**)

3) Aggiunta di: - **detergenti** non ionici o zwitterionici (CHAPS)

- agenti **riducenti** (DTT, DTE e TBP)

4) **Alchilazione** (IAA)



5) Aggiunta di **anfoliti**.

1° DIMENSIONE: IEF

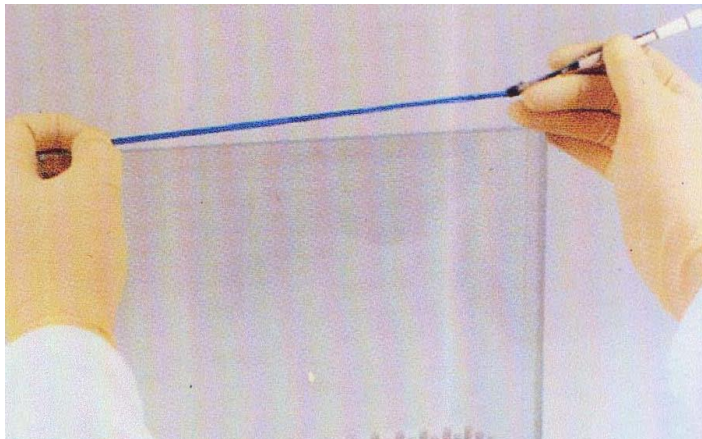


Reidratazione **passiva** od **attiva** del gel per IEF.

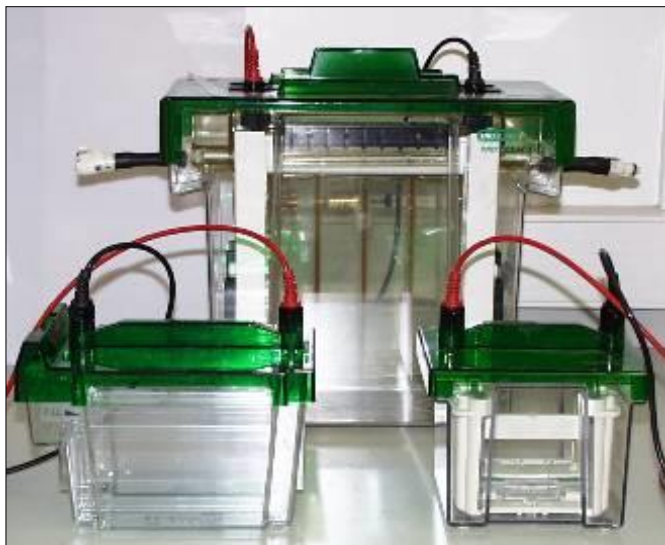


Posizionamento del gel nella camera di focalizzazione e separazione elettroforetica (IEF).

2° DIMENSIONE: IEF

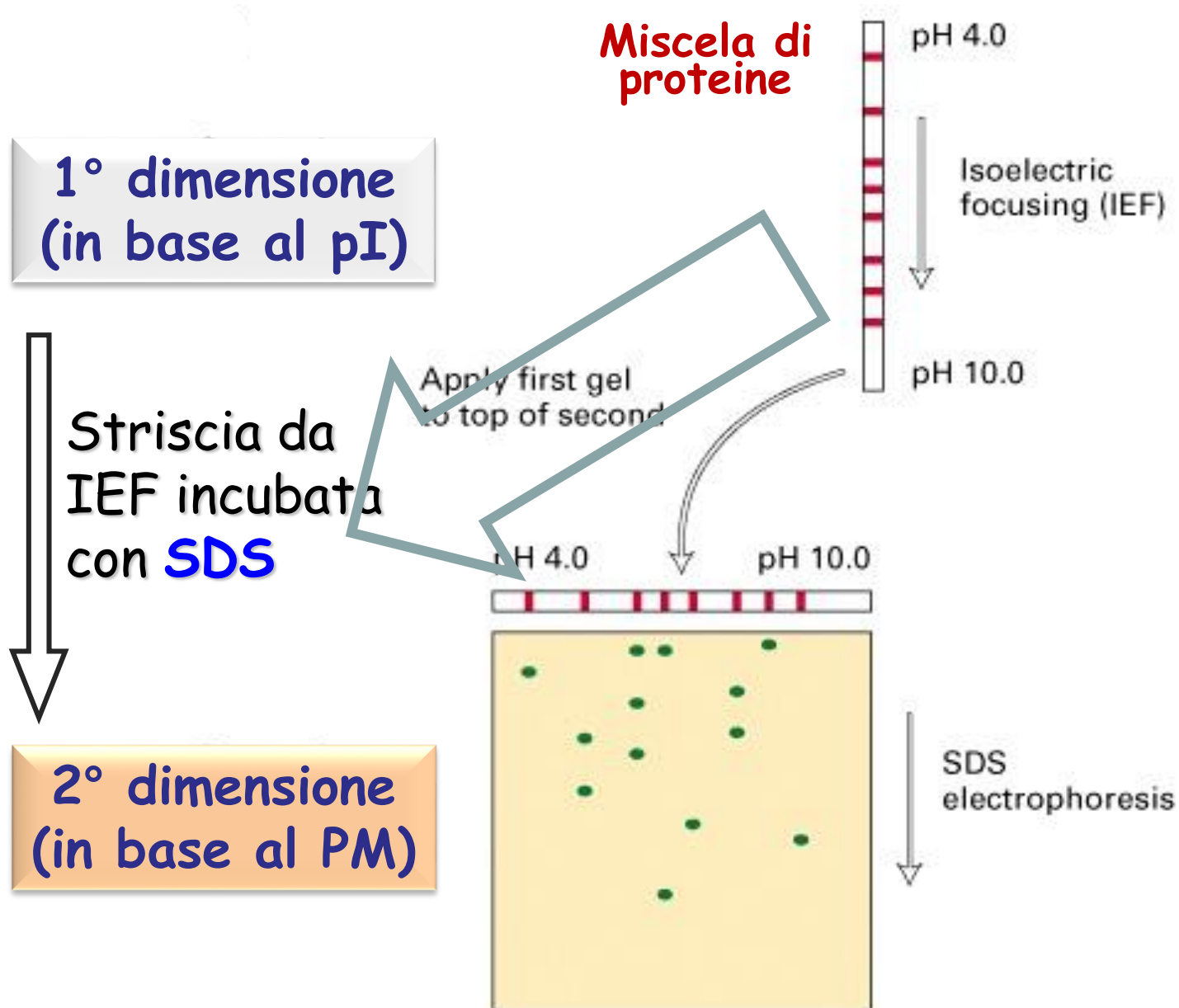


Equilibratura e trasferimento del gel per IEF sulla **sommità** del gel per l'SDS-PAGE (**2° dimensione**)

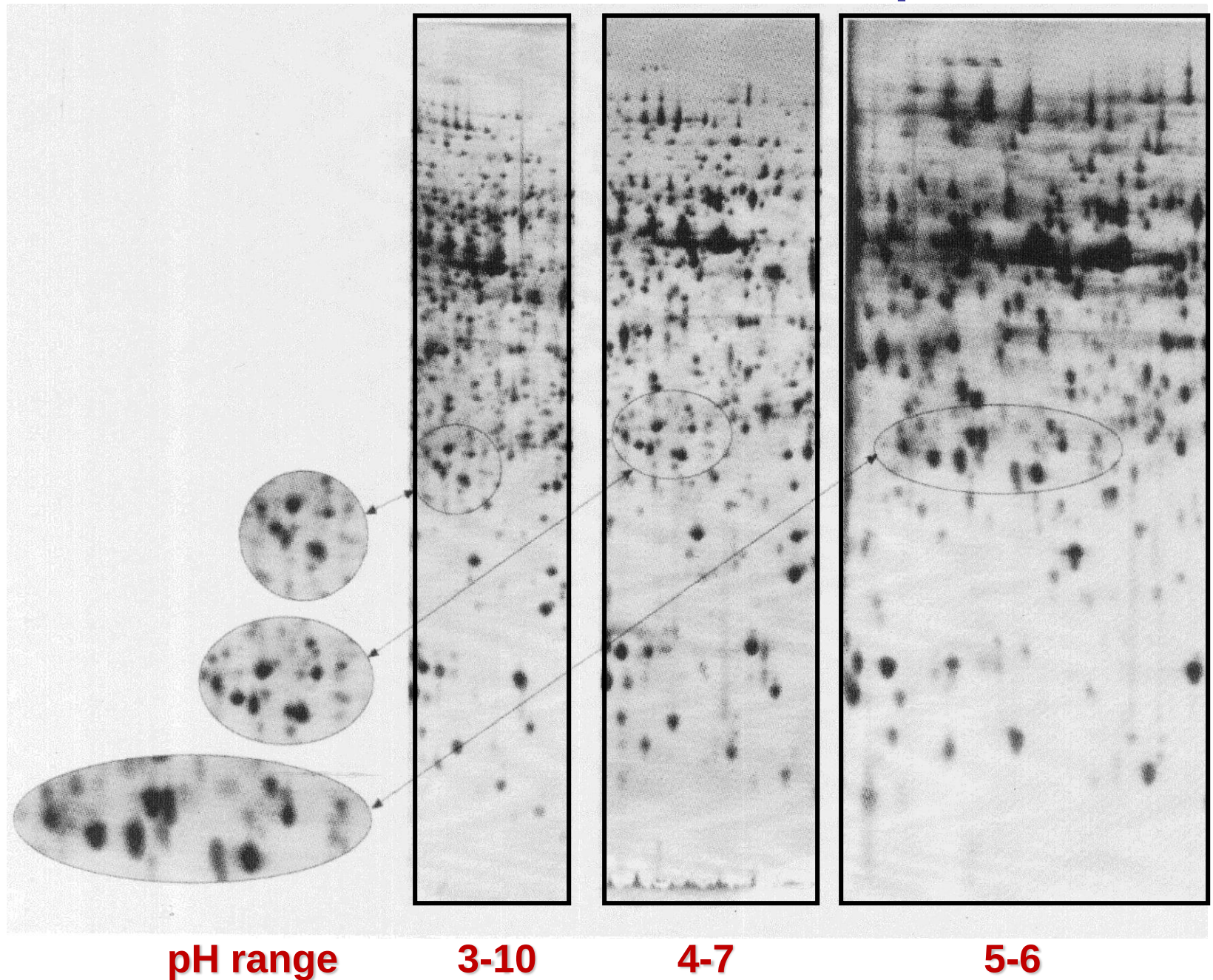


Assemblaggio del gel di PAA nella camera per la 2° dimensione

ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE o 2D



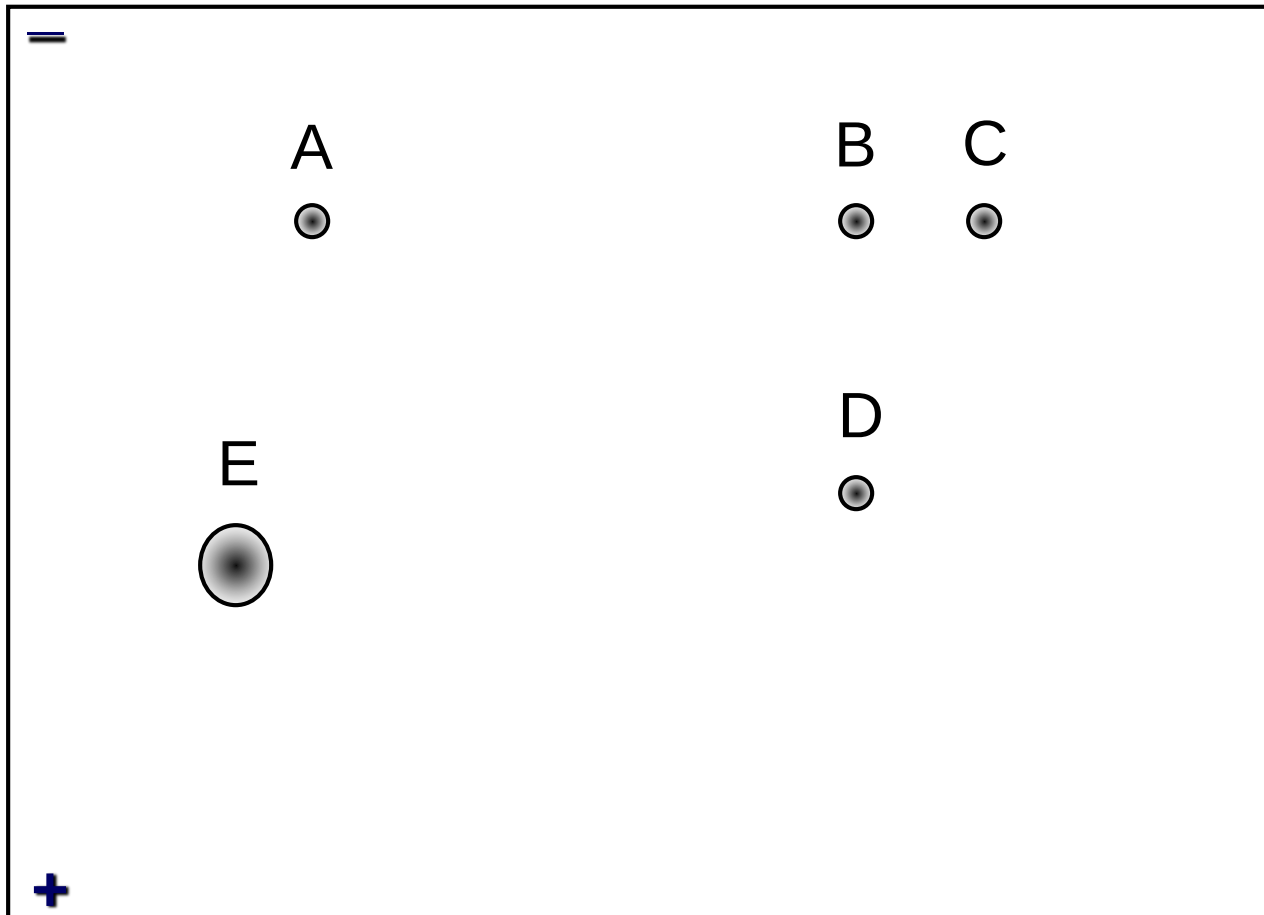
SCELTA DEL RANGE DI pH



INTERPRETAZIONE DEGLI SPOT

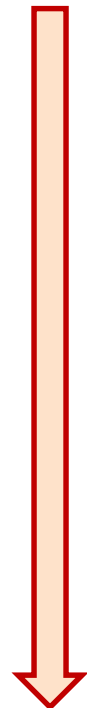
pH 3.0

pH 10.0



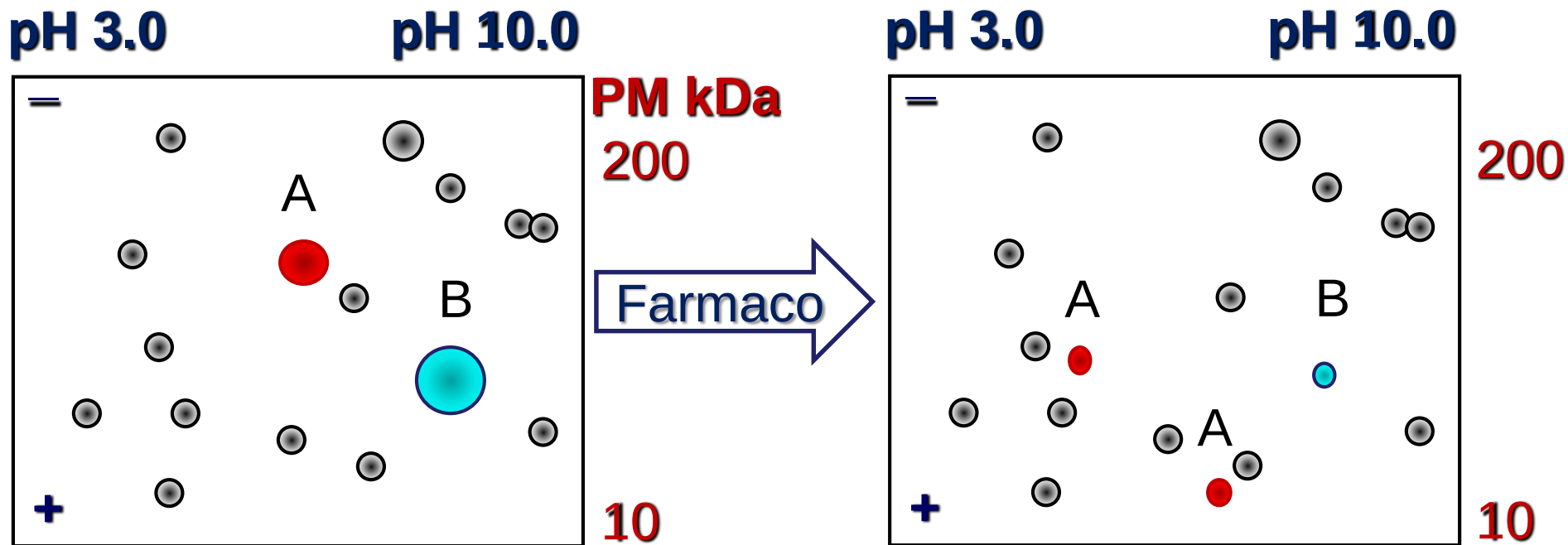
PM kDa

200



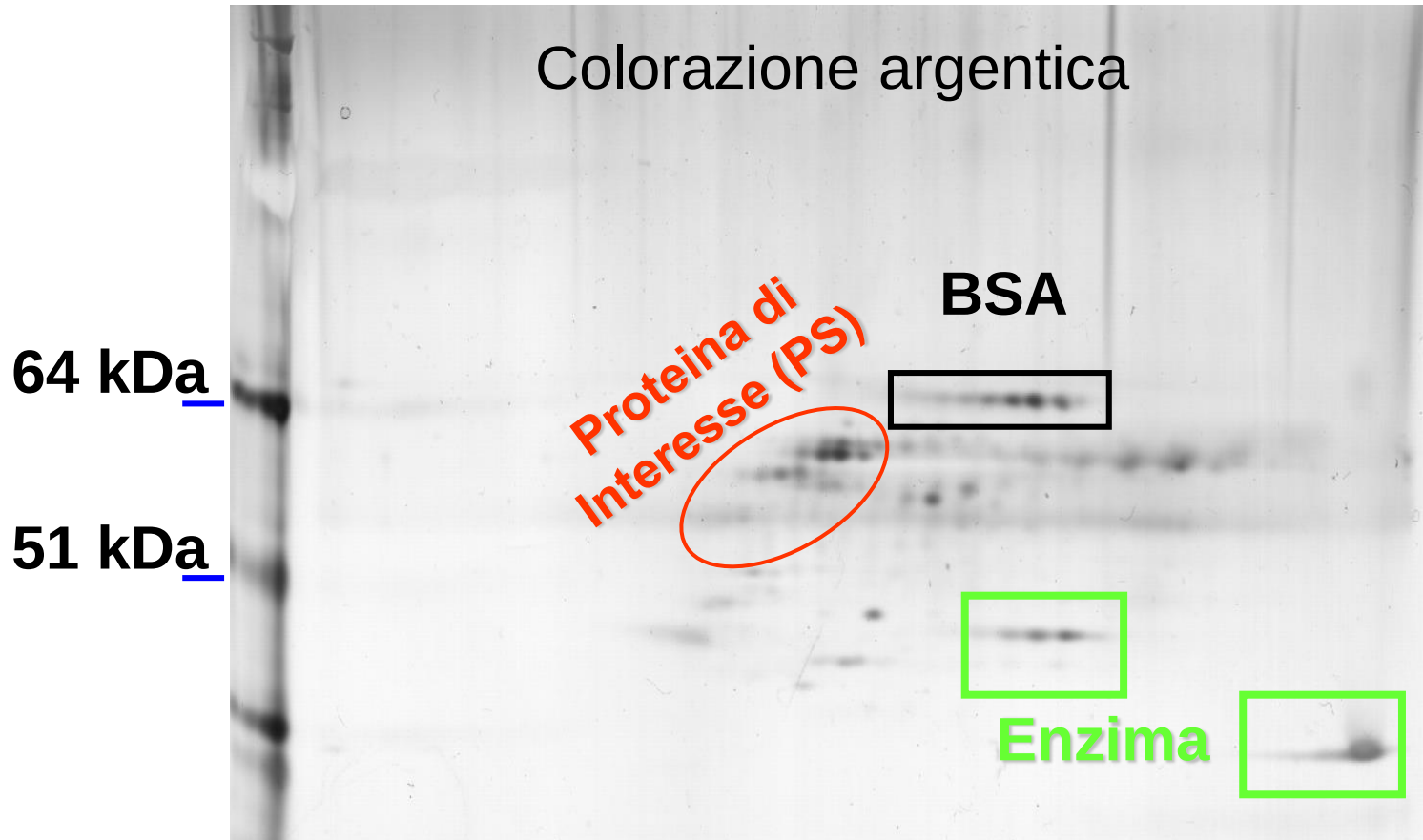
10

INTERPRETAZIONE DEGLI SPOT



Uno specifico software **quantifica** le variazioni.

2D: ESEMPIO PRATICO SU UNA PROTEINA PURIFICATA



E' evidente la **microeterogeneità** delle proteine in studio (diverse fosforilazioni, carbossilazioni...)