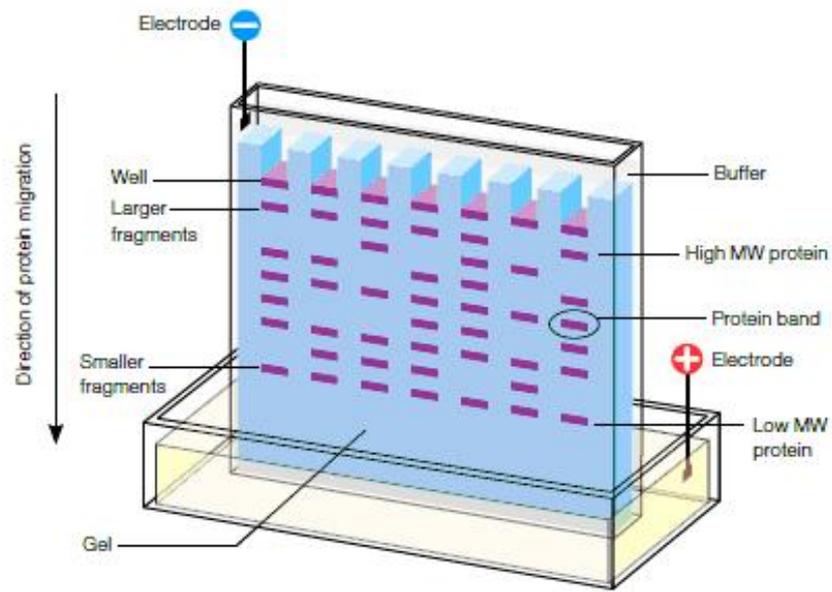
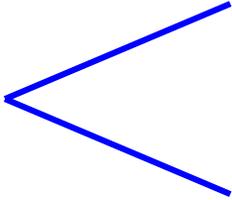


ELETTROFORESI DI PROTEINE

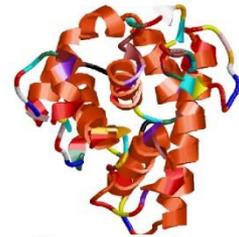


ELETTROFORESI DI PROTEINE

Molto più complessa della separazione elettroforetica di DNA.

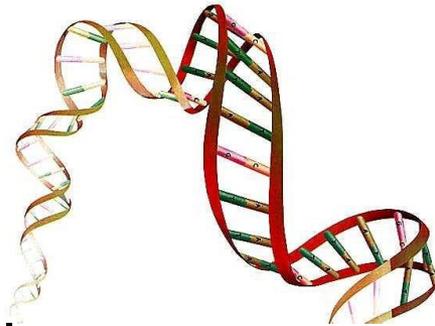
fortissime variazioni  forma delle proteine
cariche delle proteine

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).

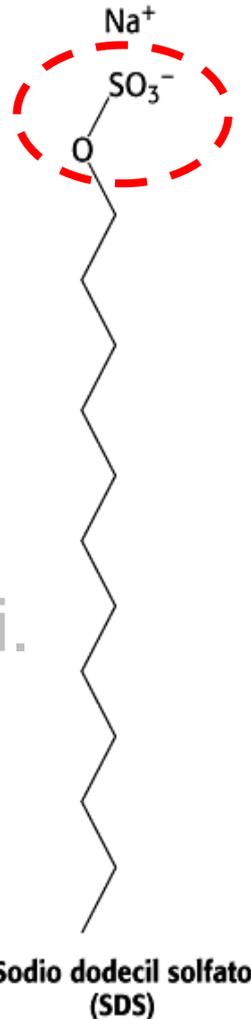


Paio di
nucleotidi
medio:
650 Da

ELETTROFORESI DI PROTEINE

SDS-PAGE

- **SDS** Detergente anionico che denatura le proteine conferendovi la stessa densità di carica (negativa).
- **β -Mercaptoetanololo** **HS-CH₂CH₂OH**
 - rompe eventuali legami disolfuro, riducendoli.
- **Temperatura (5' a 100 °C)**
 - accelera la denaturazione completa



Proteine così trattate assumono struttura filamentosa

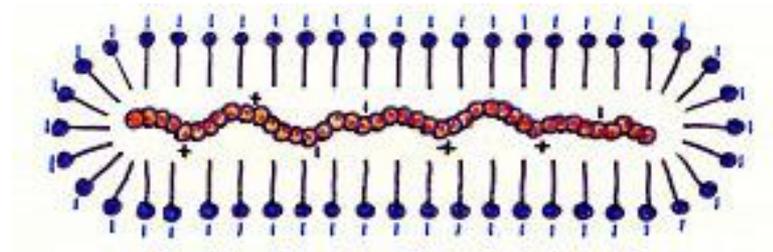
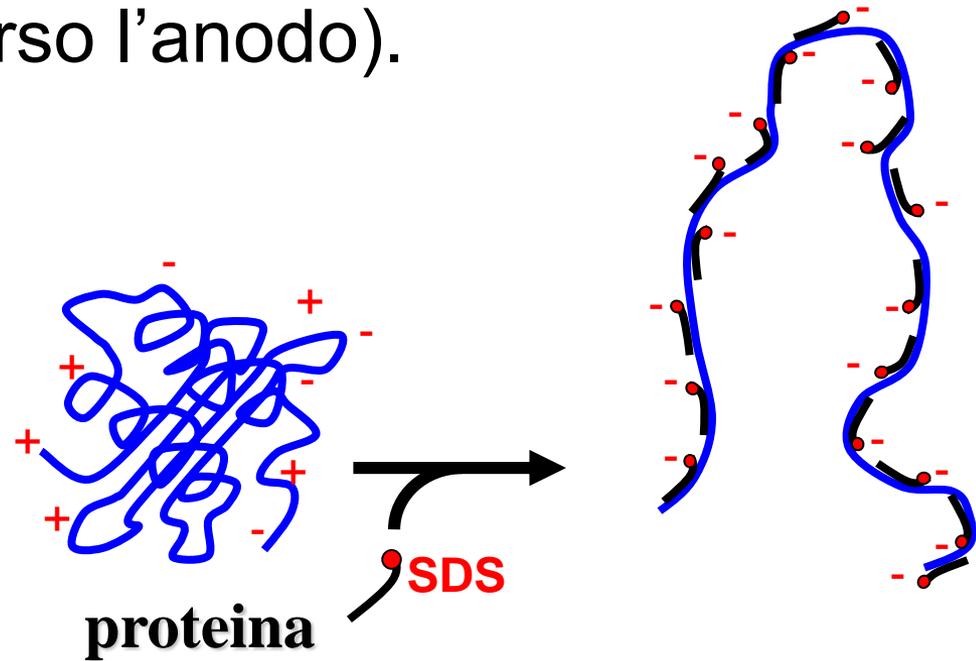
EFFETTO DELL'SDS SULLE PROTEINE

- I **complessi proteina-SDS** sono altamente carichi e **tutti negativi** (migrano verso l'anodo).

- Separano solo in base alla **dimensione** (n° aa, porzioni glico-proteiche).

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

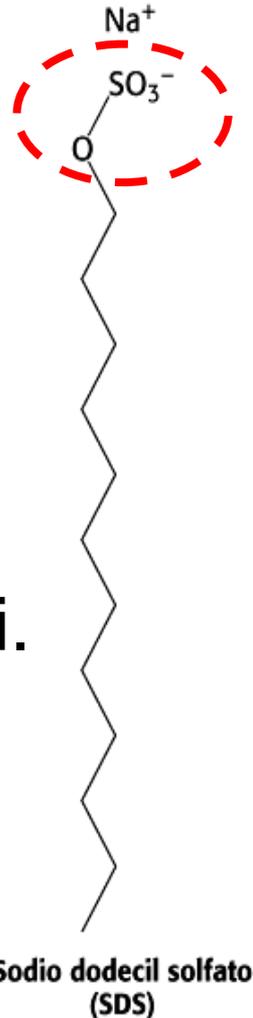
- Permanenza della **struttura filamentosa** per repulsione.



ELETTROFORESI DI PROTEINE

SDS-PAGE

- **SDS** Detergente anionico che denatura le proteine conferendovi la stessa densità di carica (negativa).
- **β -Mercaptoetanololo** **HS-CH₂CH₂OH**
 - rompe eventuali legami disolfuro, riducendoli.
- **Temperatura (5' a 100°C)**
 - accelera la denaturazione completa



Proteine così trattate assumono struttura filamentosa

DENATURAZIONE

Utile per il DNA, dannosa per le proteine

Denaturazione

Calore

Agenti riducenti

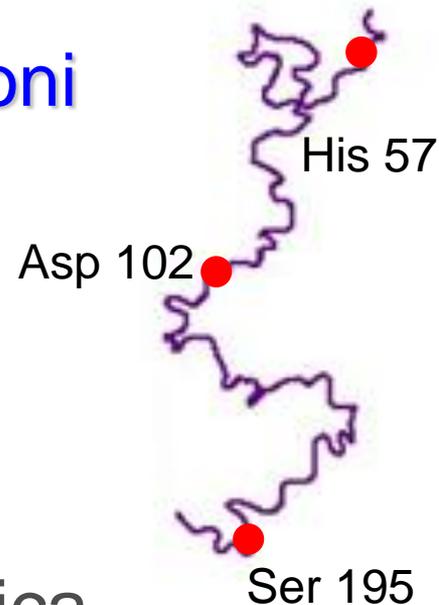
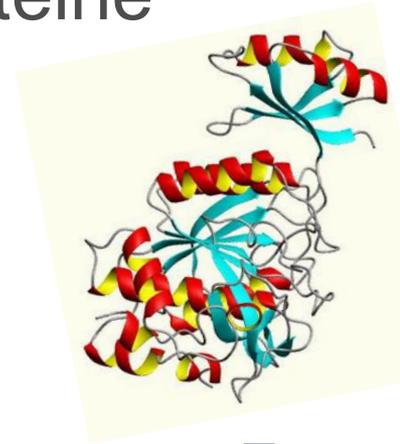
Detergenti ionici

Congelamento

Alte concentrazioni saline

Processo che porta a:

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



SDS-PAGE IN PRATICA

Le proteine non entrano subito nel gel per la corsa

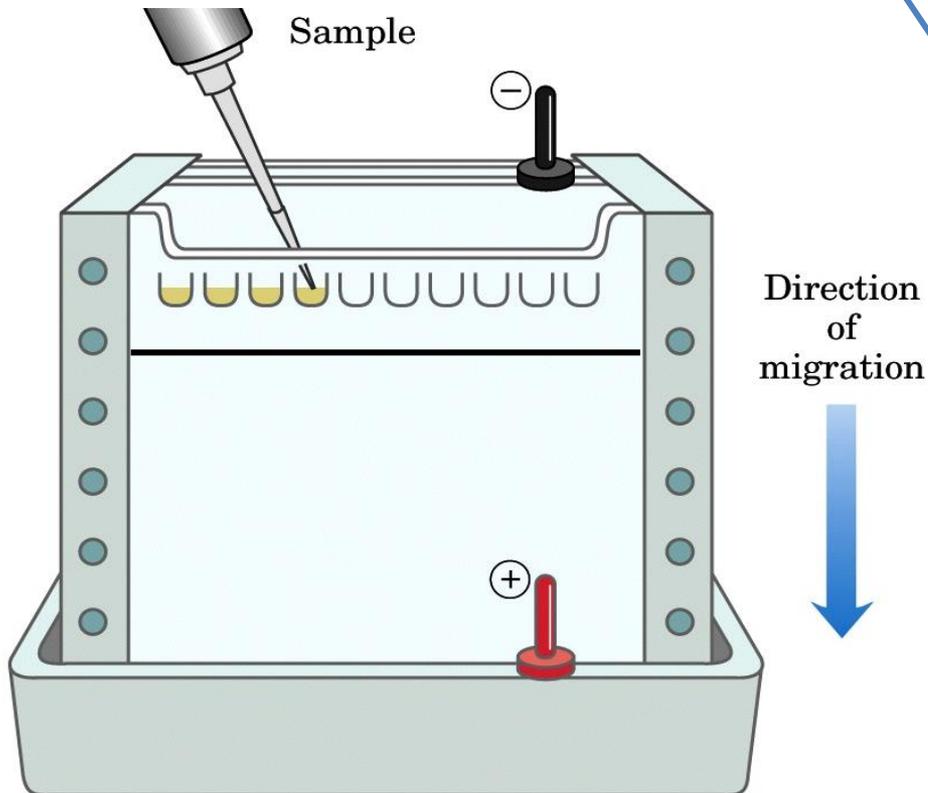
2 gel di PAA sovrapposti

gel di impaccamento

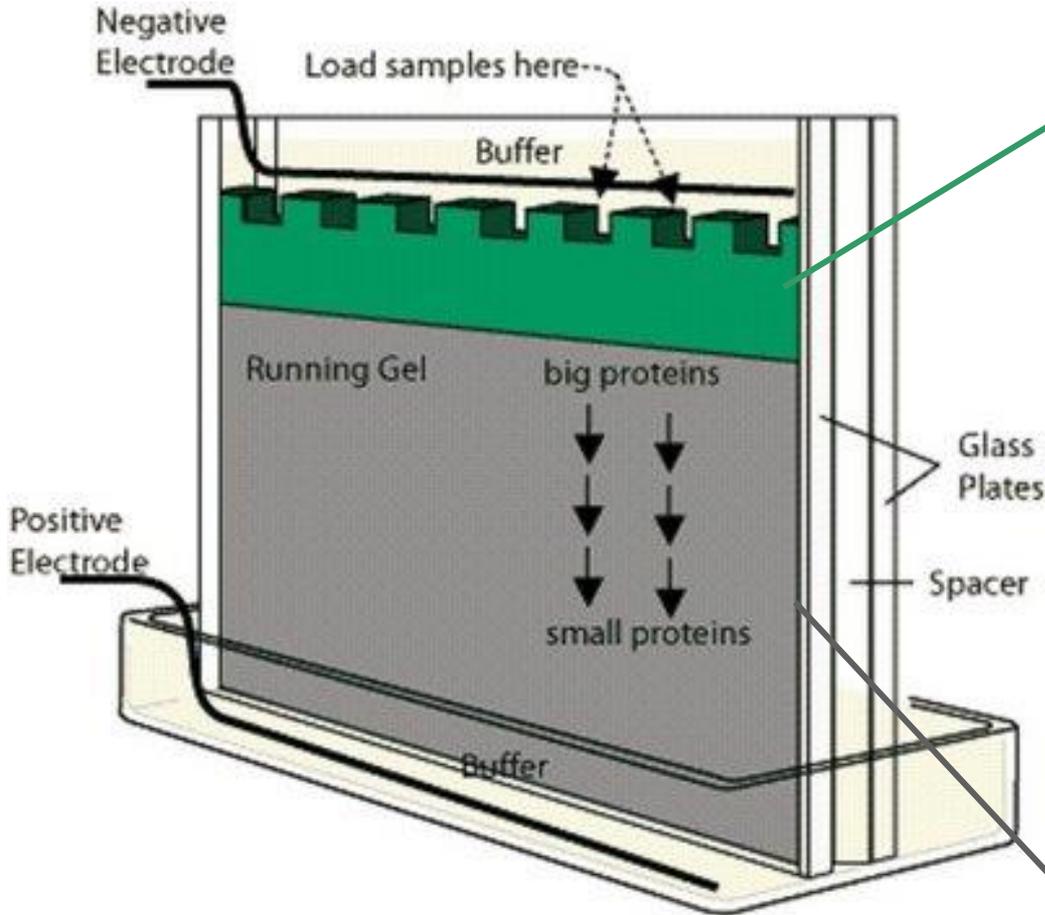
(concentrazione delle proteine)

gel per la corsa

(separazione delle proteine in base al loro PM)



I DUE GEL



Gel di impaccamento

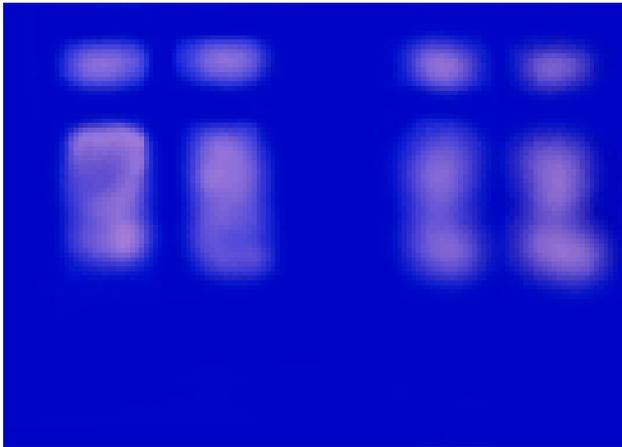
- PAA **4%**
- SDS 10%
- Tris-HCl 1.0 M pH **6.8**

Gel per la corsa

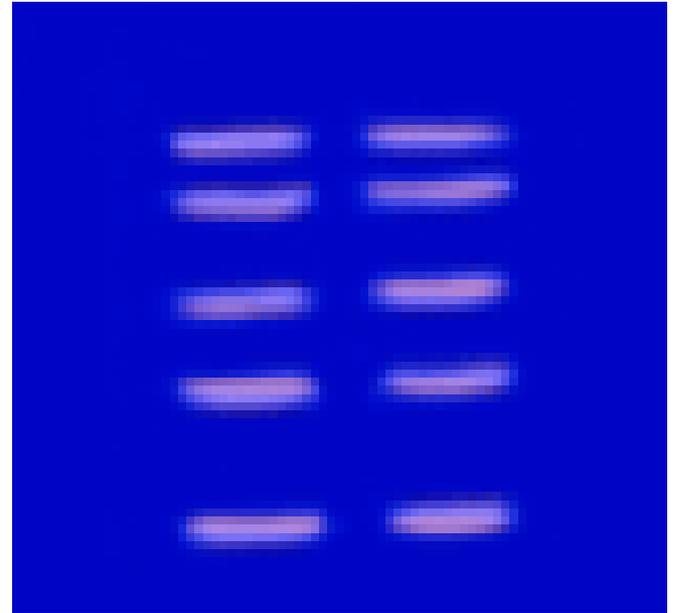
- PAA **12%**
- SDS 10%
- Tris-HCl 1.5 M pH **8.8**

PERCHE' OCCORRE IL GEL DI IMPACCAMENTO?

Senza gel di impaccamento



Con gel di impaccamento



IL TAMPONE DEL CAMPIONE

Tris-HCl a pH 6.8

SDS

addensante

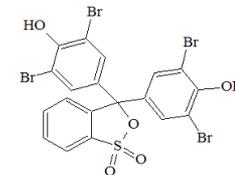
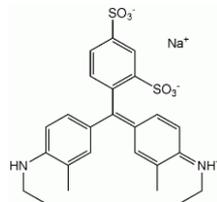
[Saccarosio o glicerolo]

riducente

[β -mercaptoetanol]

traccianti [Xilene Cianolo-Blu di Bromofenolo]

Sample
loading
buffer:

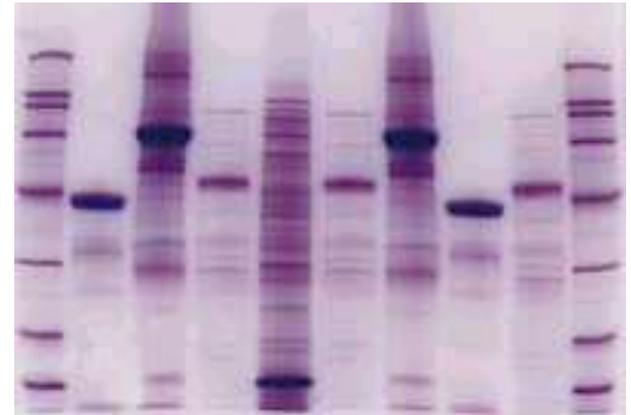
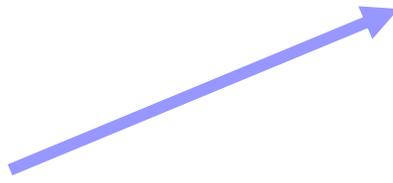


NOTA BENE

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

Coloranti per proteine:

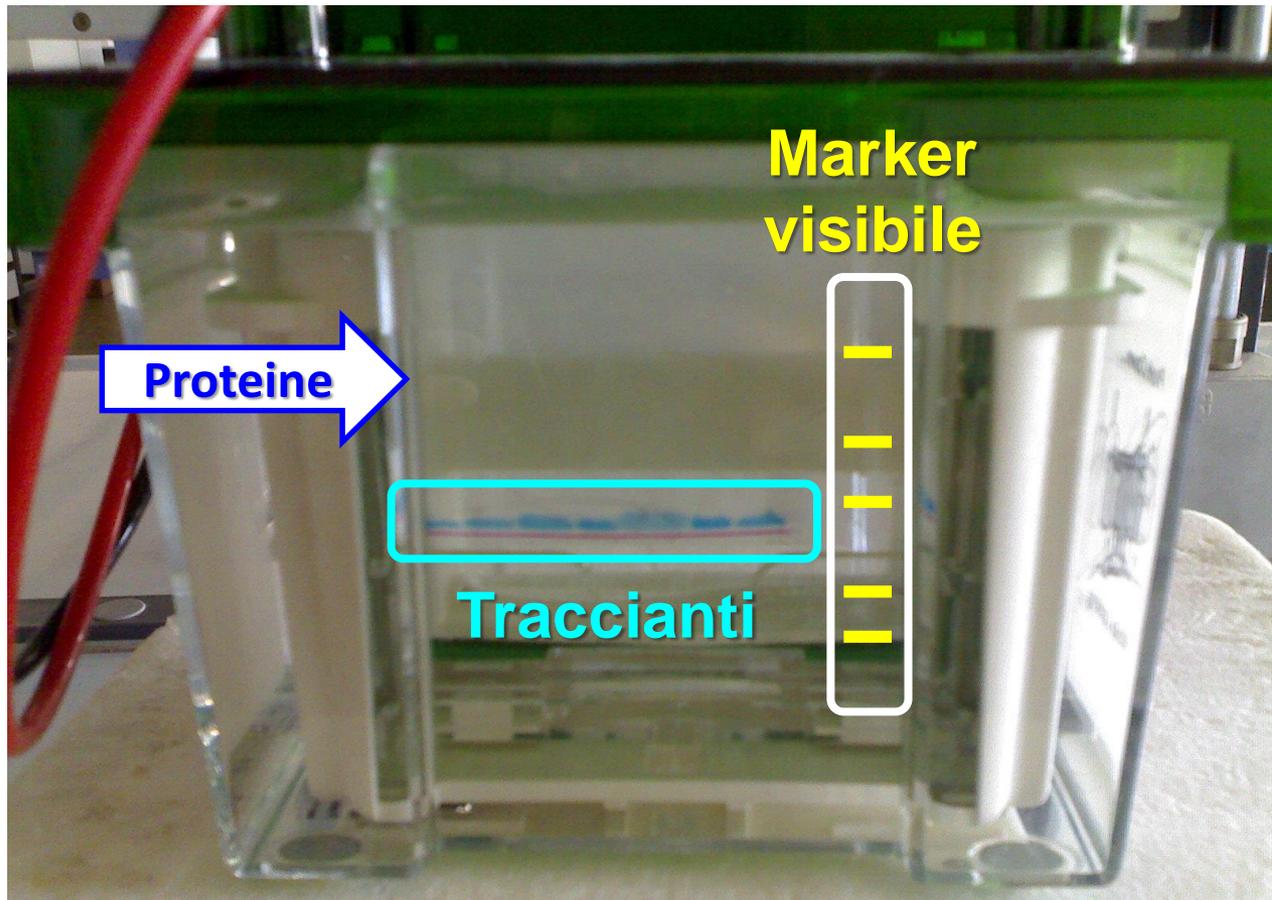
Coomassie Blue



Colorazione
Argentica



TRACCIANTI ELETTROFORETICI



TAMPONI IN USO

Tampone di corsa:

Tris-HCl **pH 8.3** 25 mM
SDS 3.5 mM
Glicina 190 mM

Tampone del campione:

Tris-HCl **pH 6.8**
SDS
Addensante
Riducente
Traccianti

Gel per la corsa

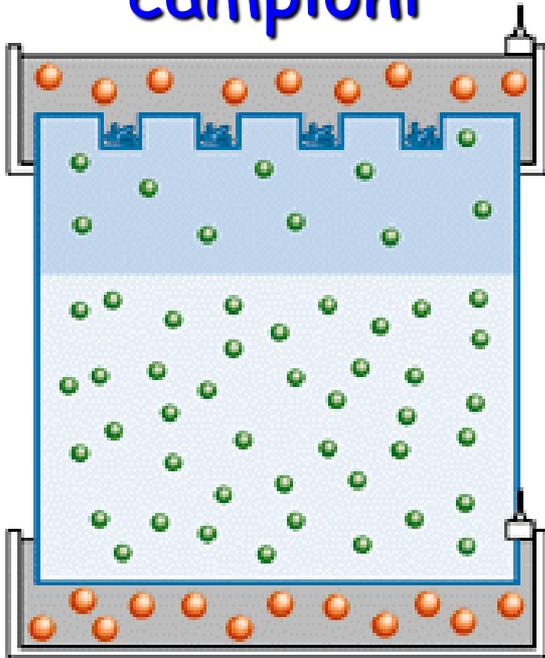
- PAA **12%**
- SDS 10%
- Tris-HCl 1.5 M **pH 8.8**

Gel di impaccamento

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

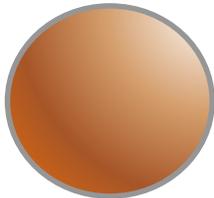
SDS-PAGE, INIZIO DELL'ESPERIMENTO

Caricamento
campioni



Cl^- : nel gel e
nel campione.

La **glicina** è presente solo
nel tampone di corsa.
Non può esser dentro il
gel, per via dei vetri!



Glicina



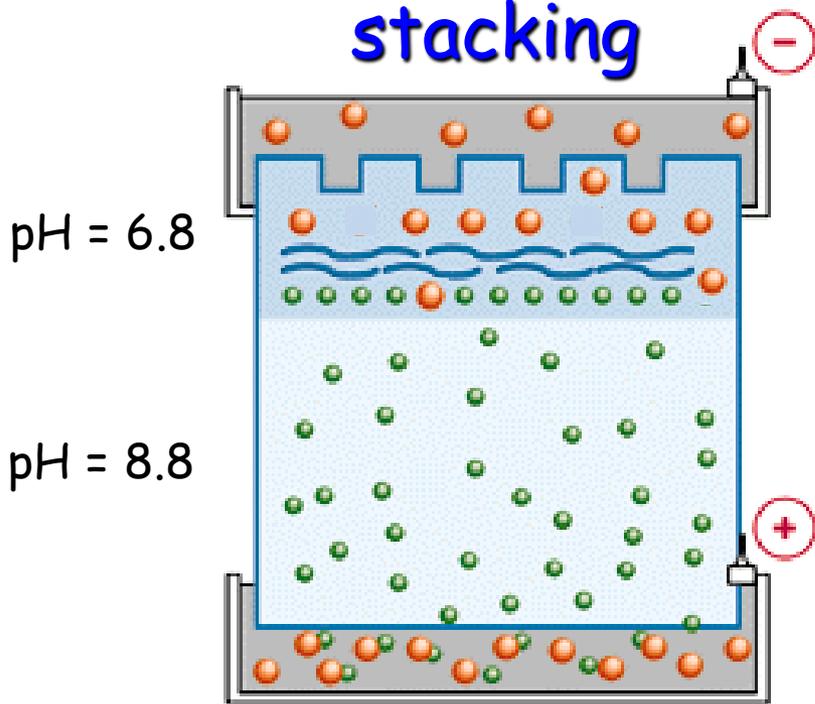
Cloruro



Proteina-SDS

COSA ACCADE NELLO STACKING GEL: ISOTACOFORESIS

Corsa nello
stacking



Ione glicinato (-, pI = 6.06)

Il **punto isoelettrico (pI)** è il valore di pH a cui una molecola non possiede alcuna carica netta elettrica e dunque nemmeno mobilità elettroforetica.

μ :

$\text{Cl}^- > \text{proteine-SDS} >$

glicinato

PRINCIPIO DELLA ISOTACOFORESIS

Al passaggio di corrente tutte le specie ioniche devono migrare con **uguale velocità**. Le 3 specie variano le loro concentrazioni in modo che:

[Cl⁻] > [proteine-SDS] >> [glicinato]

$$v = E \cdot q / f$$

 Intensità
del campo
elettrico



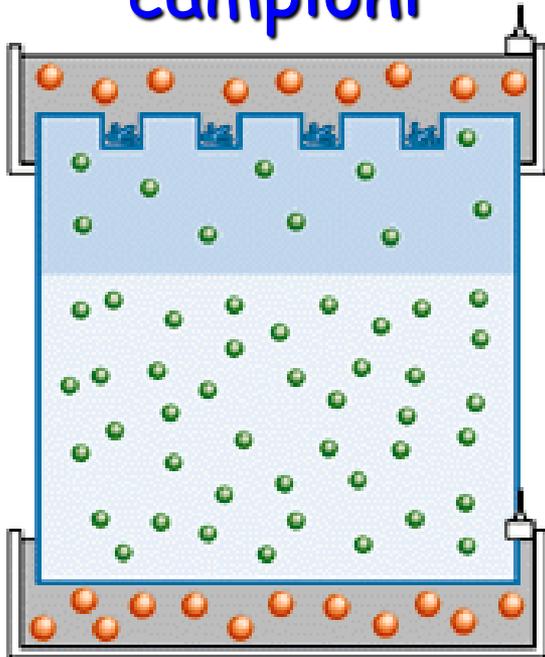
Conduktivität



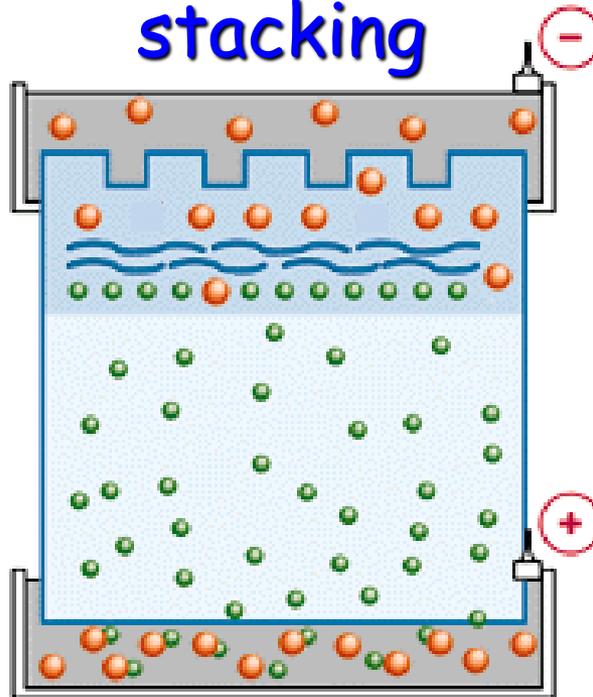
Concentrazione

SDS-PAGE

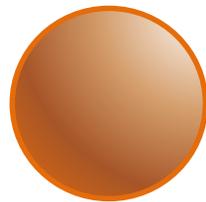
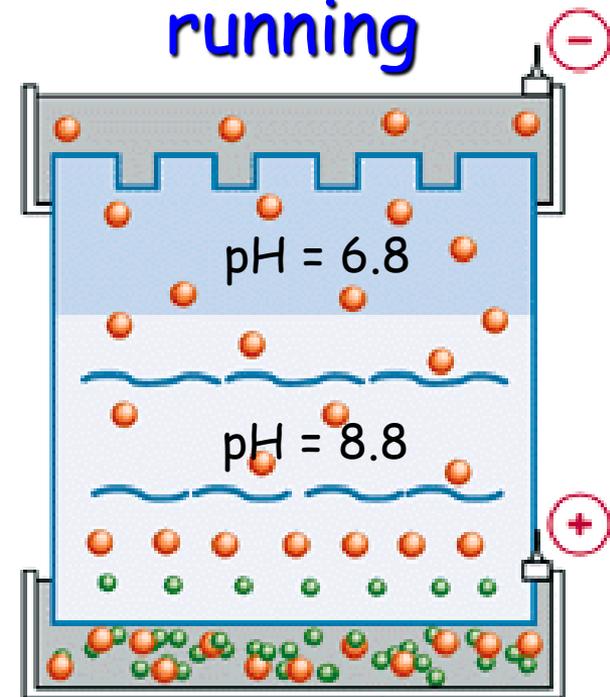
Caricamento
campioni



Corsa nello
stacking



Corsa nel
running



Glicina



Cloruro



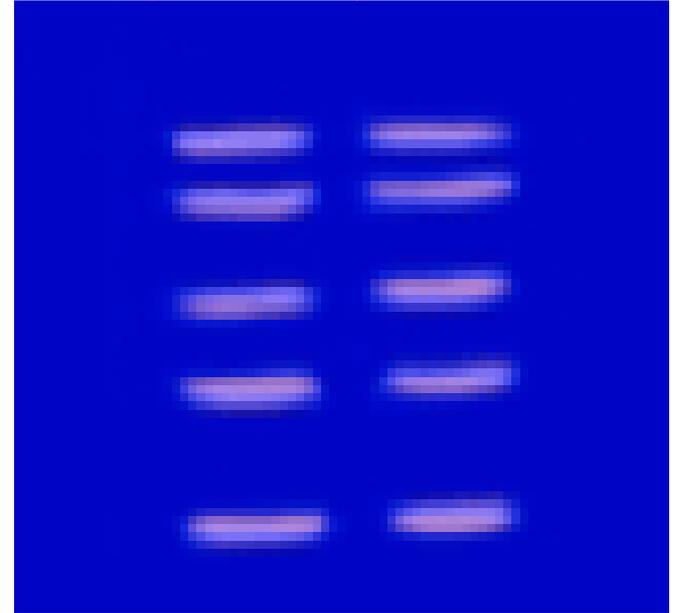
Proteina

IN ULTIMA ANALISI, A COSA SERVONO IL GEL DI IMPACCAMENTO E L'ISOTACOFORESIS?

Senza gel di impaccamento



Con gel di impaccamento



Ad aumentare la **risoluzione** delle bande.

ISOTACOFORESIS

E' una tecnica elettroforetica eseguita su un gel con porosità elevata, 4% di PAA, 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 isoelettrico, circa 6)**. L'effetto assottigliamento è dovuto agli ioni di glicinato (carichi negativamente) che hanno una mobilità elettroforetica inferiore sia al campione che al Cl^- , più veloce, il quale nella corsa elettroforetica sarà in testa.

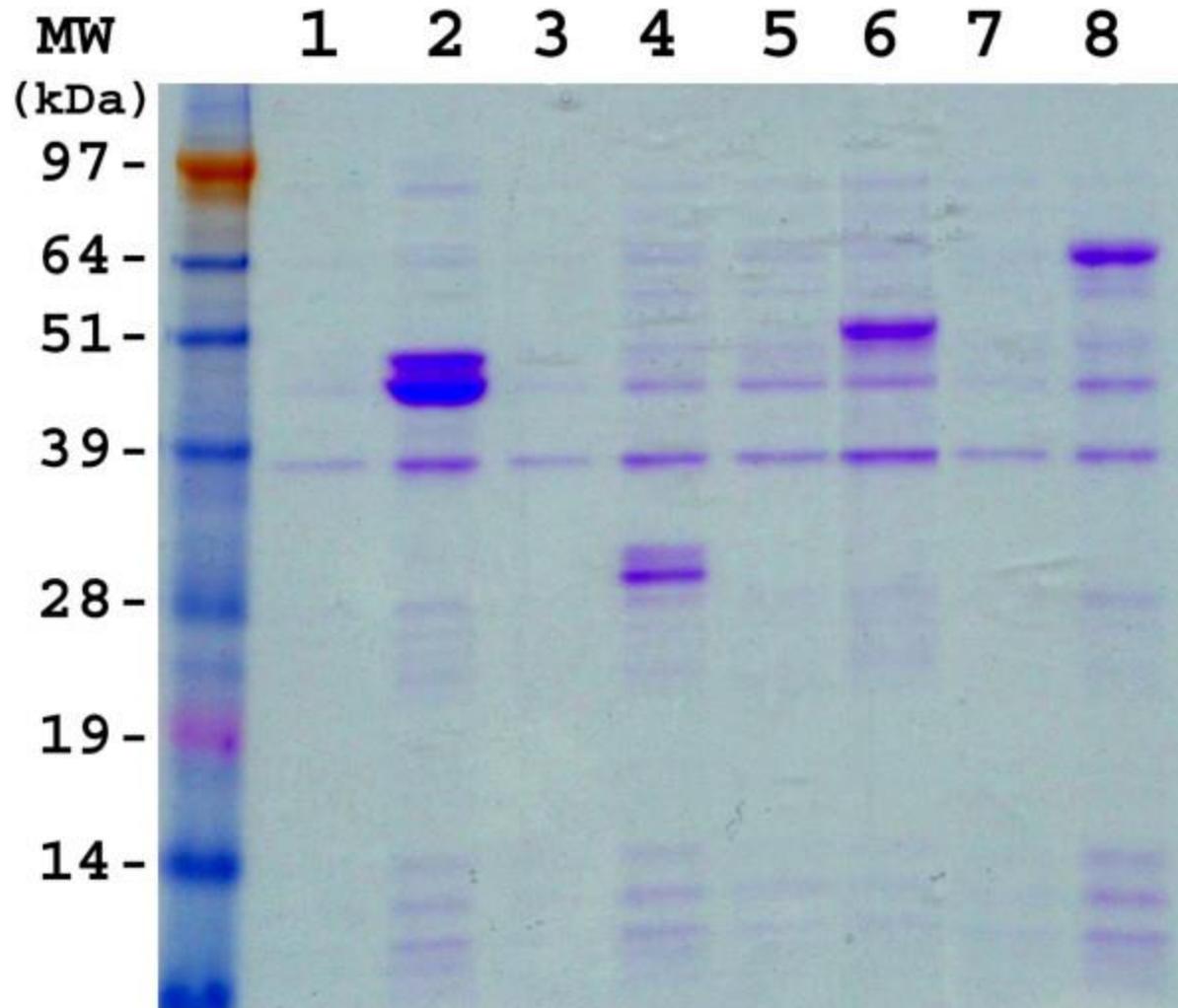
Quando viene applicata la corrente, tutte le specie ioniche devono migrare alla stessa velocità altrimenti si verifica l'interruzione del "circuito" elettrico. La separazione avviene in funzione della mobilità elettroforetica della particella, i più mobili in questo fronte uniforme staranno davanti.

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 $\text{Cl}^- > \text{proteina} > \text{Glicinato}$.

Poiché le proteine sono in piccola quantità, tendono a concentrarsi in una banda molto stretta tra glicinato e Cl^- .

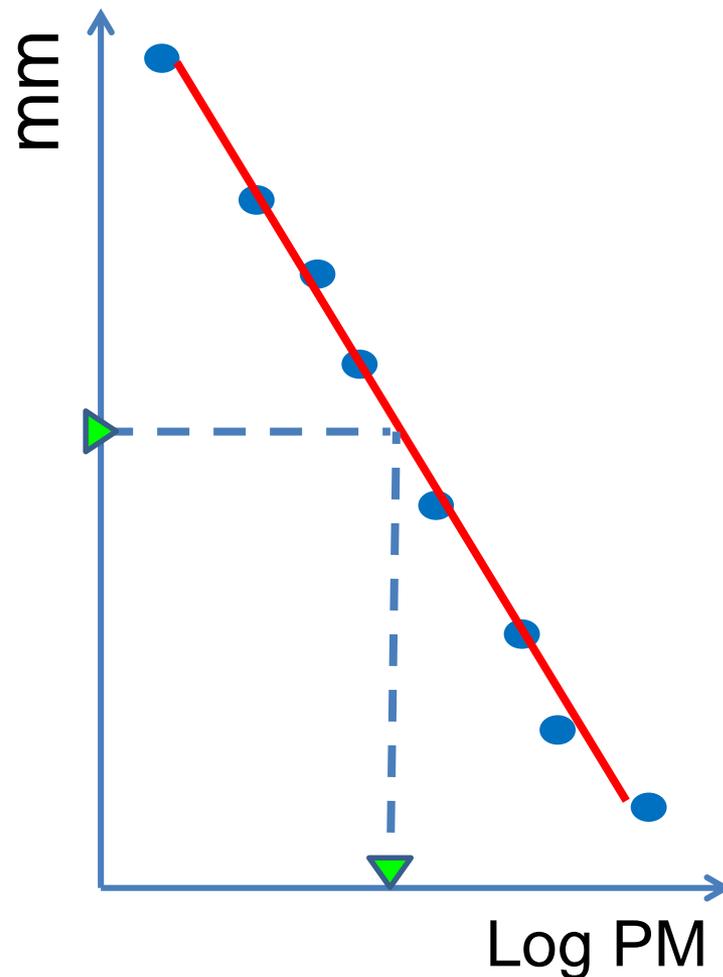
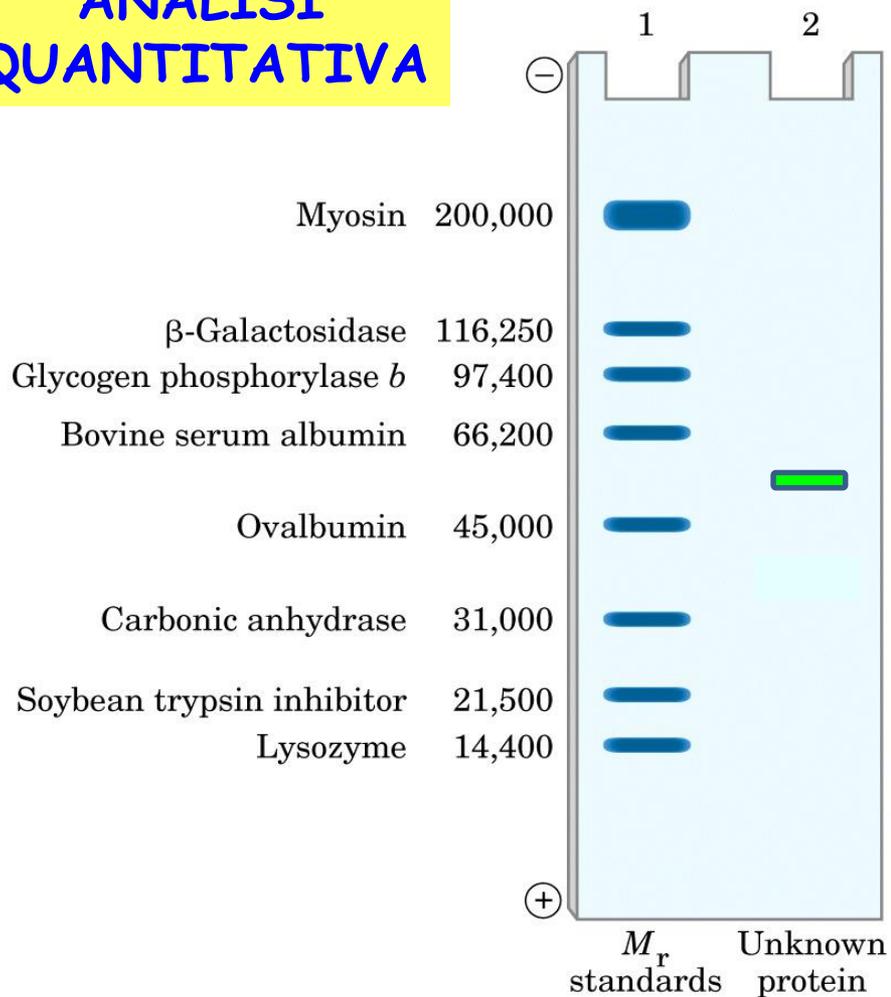
SDS-PAGE PER ANALISI QUALITATIVA



**ANALISI
QUALITATIVA**

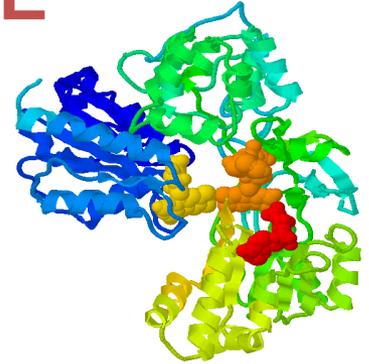
SDS-PAGE PER ANALISI QUANTITATIVE DETERMINAZIONE DEL PM DI UNA PROTEINA

ANALISI QUANTITATIVA



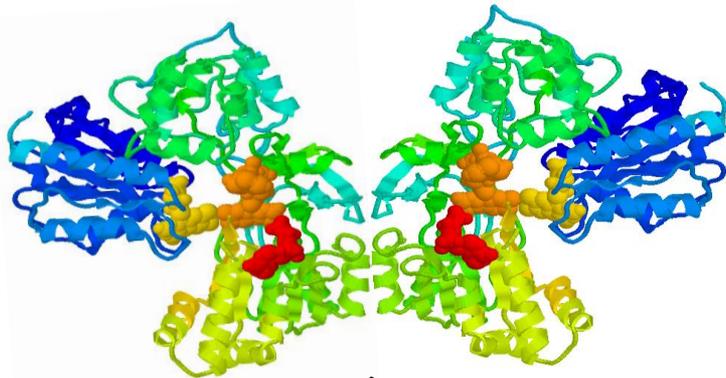
PROGETTIAMO UNA SDS-PGE

Dobbiamo analizzare un campione che sappiamo migrare come una banda da 40 kDa.

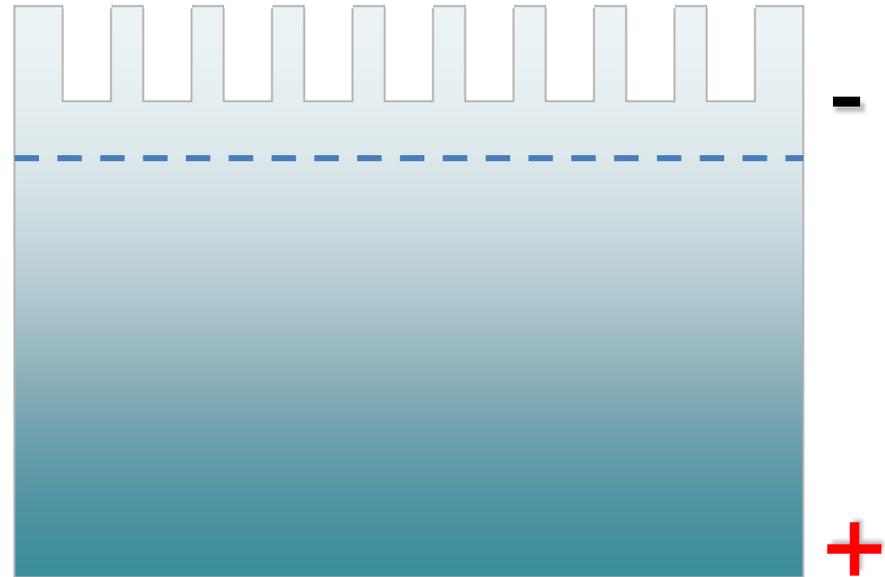


Cosa dobbiamo caricare?

Secondo problema:
il campione in parte
dimerizza.



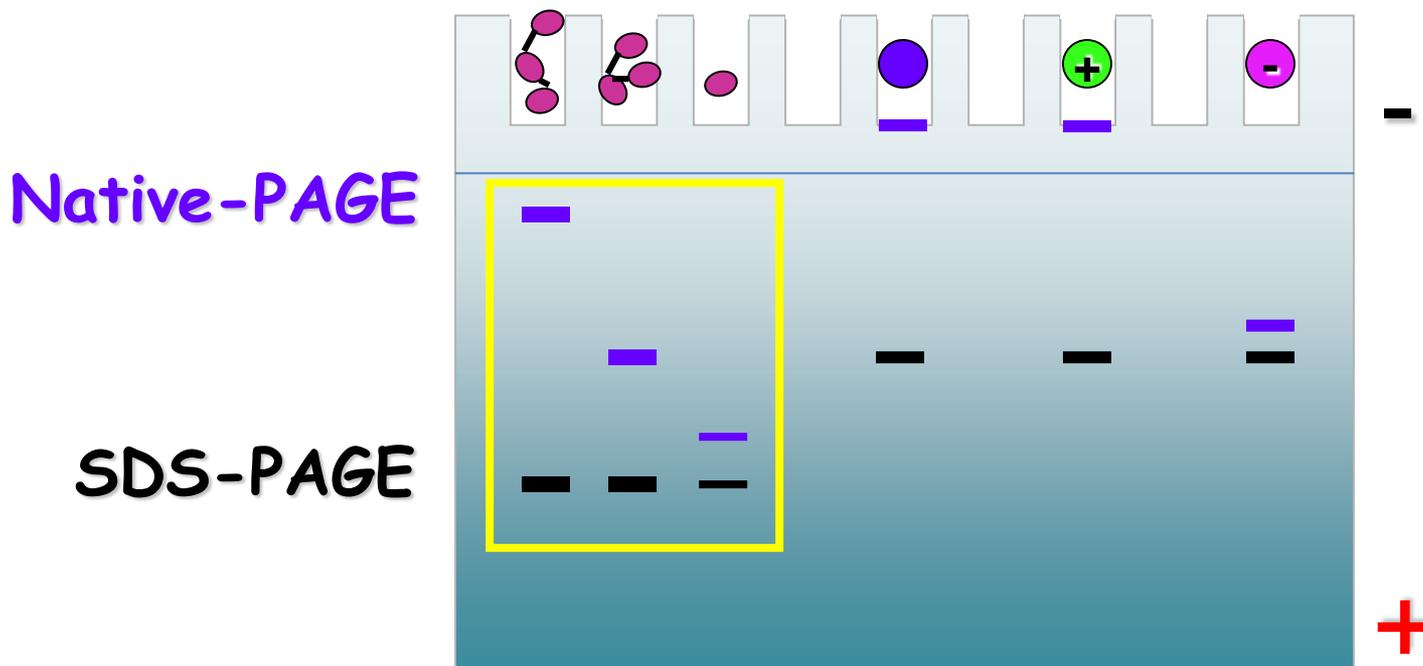
Come migrerà?



SDS-PAGE vs NATIVE-PAGE

In una elettroforesi in condizioni **native** le proteine conservano le proprie **cariche e forma**.

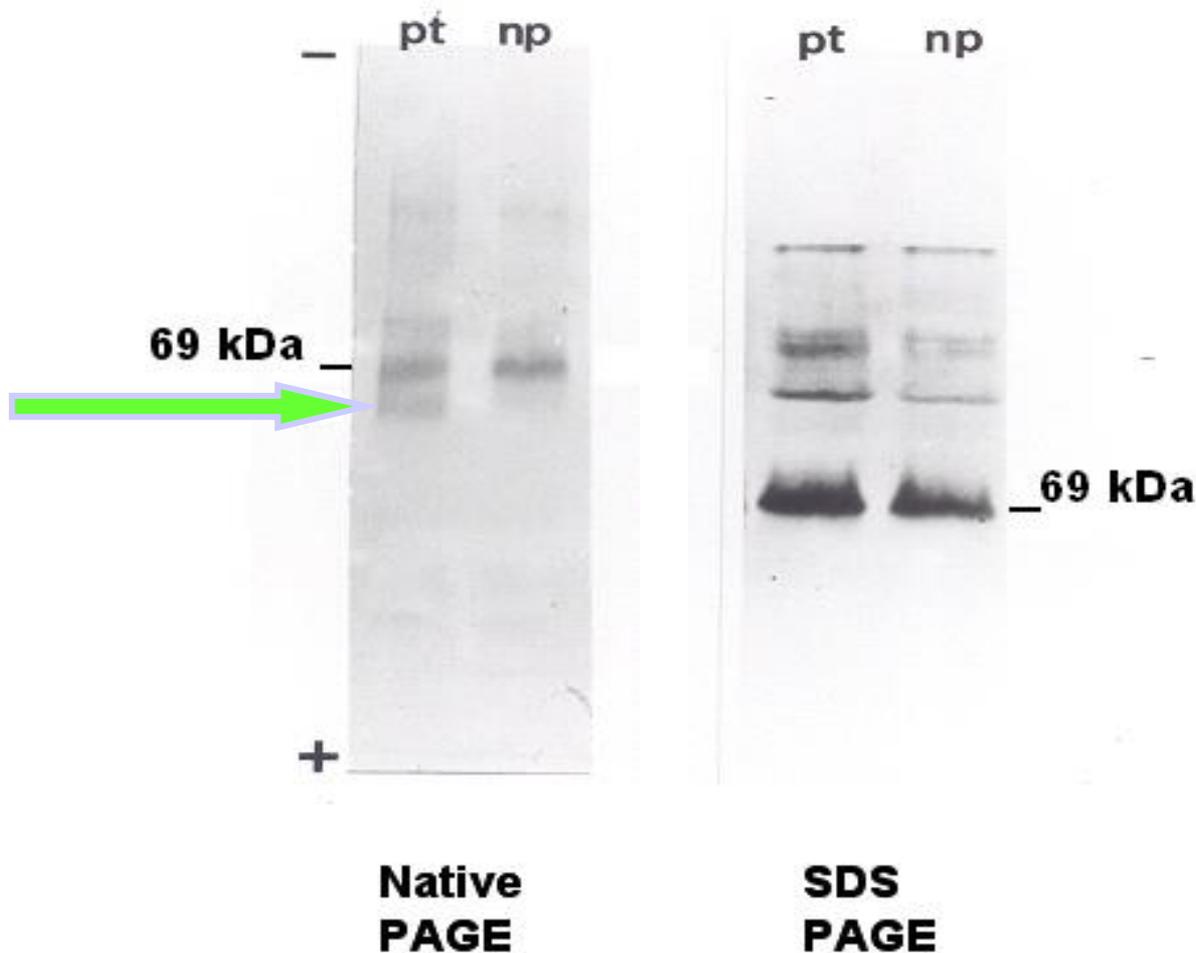
Nessun pre-trattamento dei campioni prima della Native-PAGE.



SDS-PAGE vs NATIVE-PAGE

PAGE-SDS: **solo dimensioni**

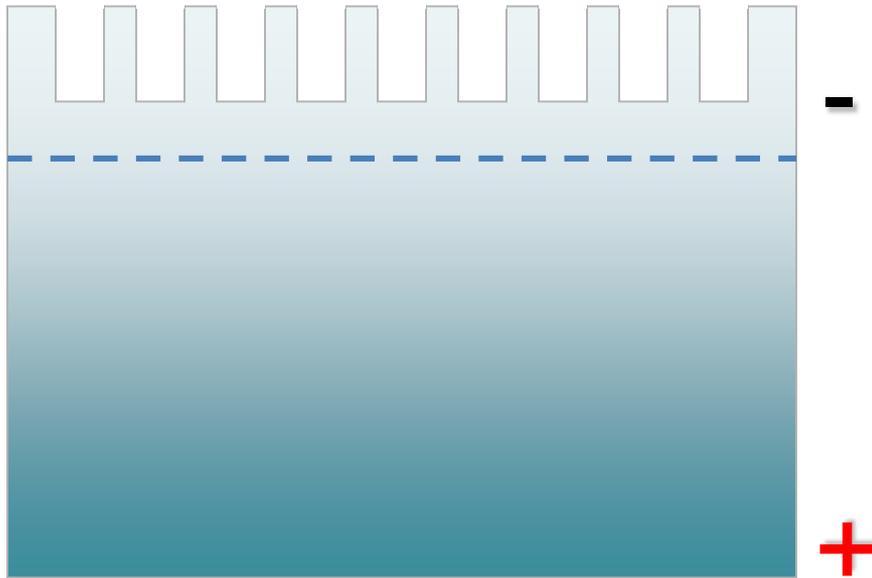
PAGE “nativa”: dimensioni, densità di carica (pI), “forma”



np = normale

pt = mutazione
in eterozigosi

GEL IN GRADIENTE DI PAA



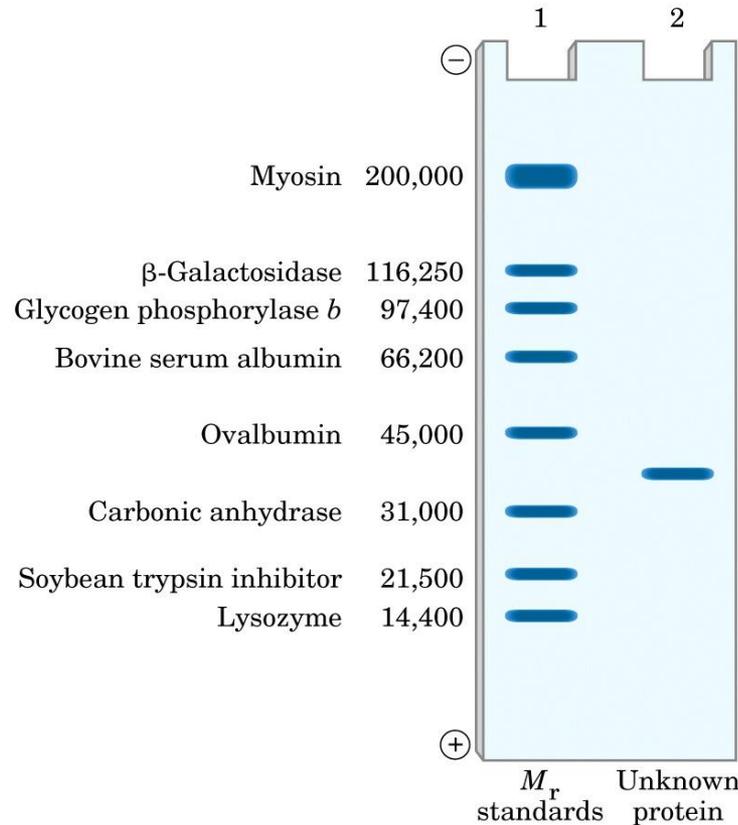
Facile da creare in laboratorio od acquistabile con il gradiente desiderato (comune il 4-12%).

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

SDS-PAGE E DETERMINAZIONE DEL PM DI UNA PROTEINA

$$Y = 35 \text{ cm}$$

$$X = \text{[redacted]}$$



$$Y = -1.3 X + 89.1$$

