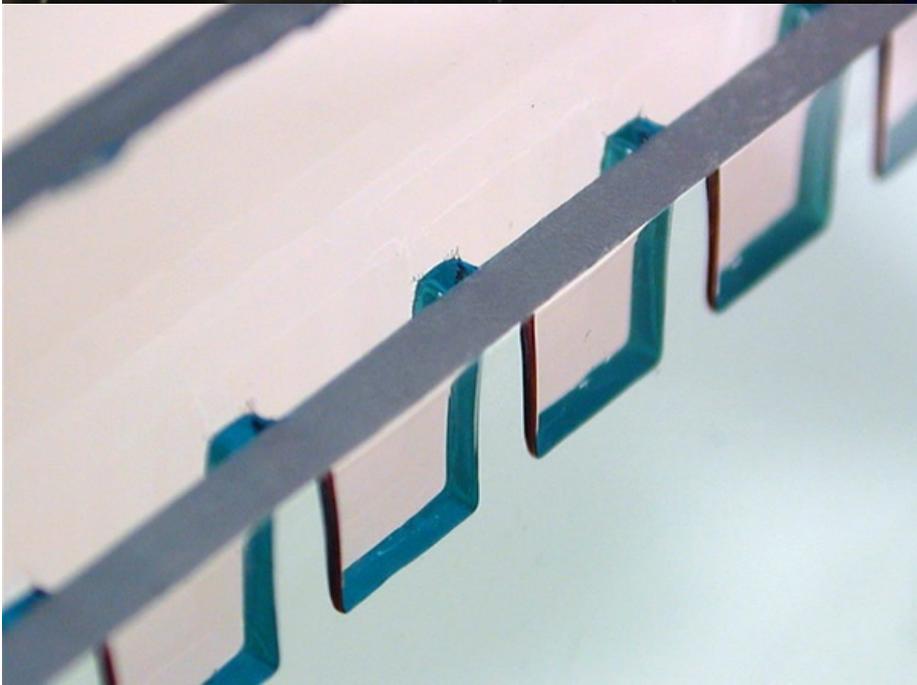
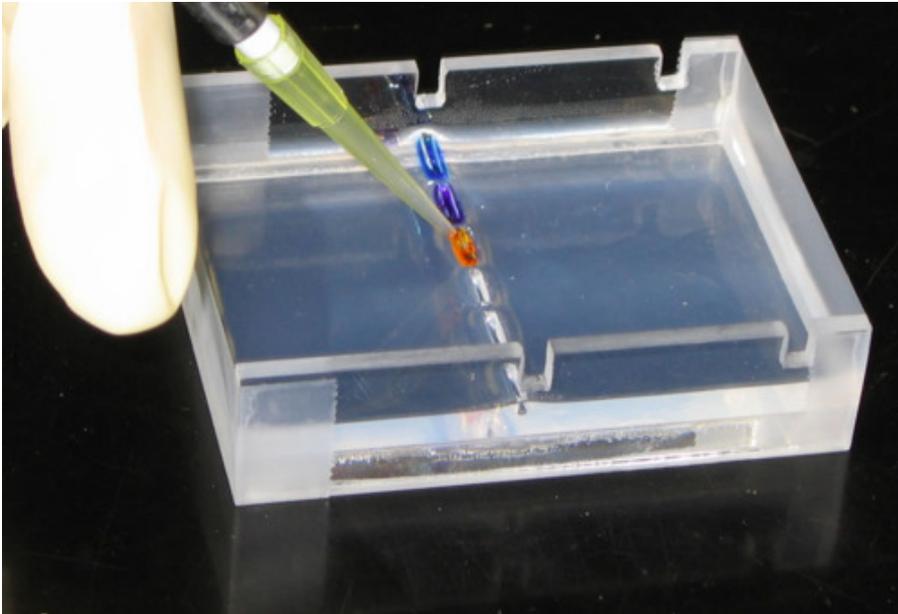
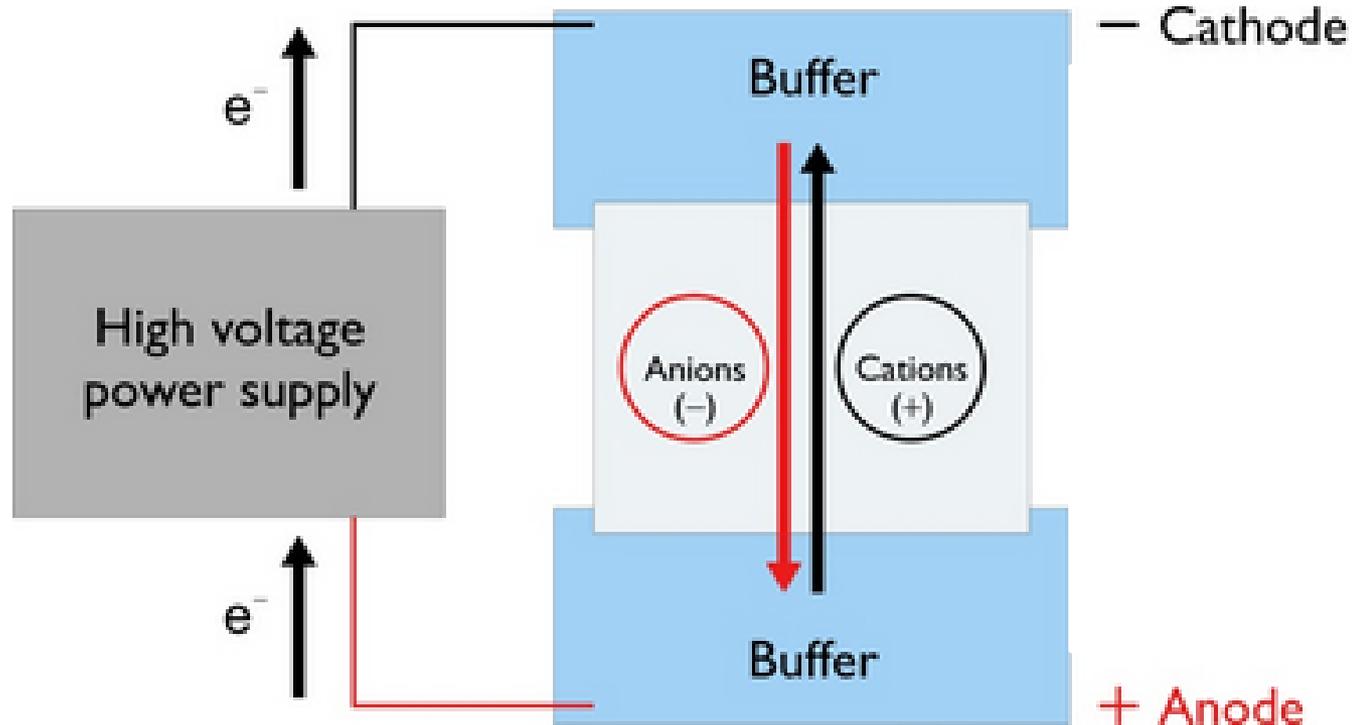


ELETTROFORESI



1

Elettroforesi: Separazione di molecole cariche mediante applicazione di un campo elettrico

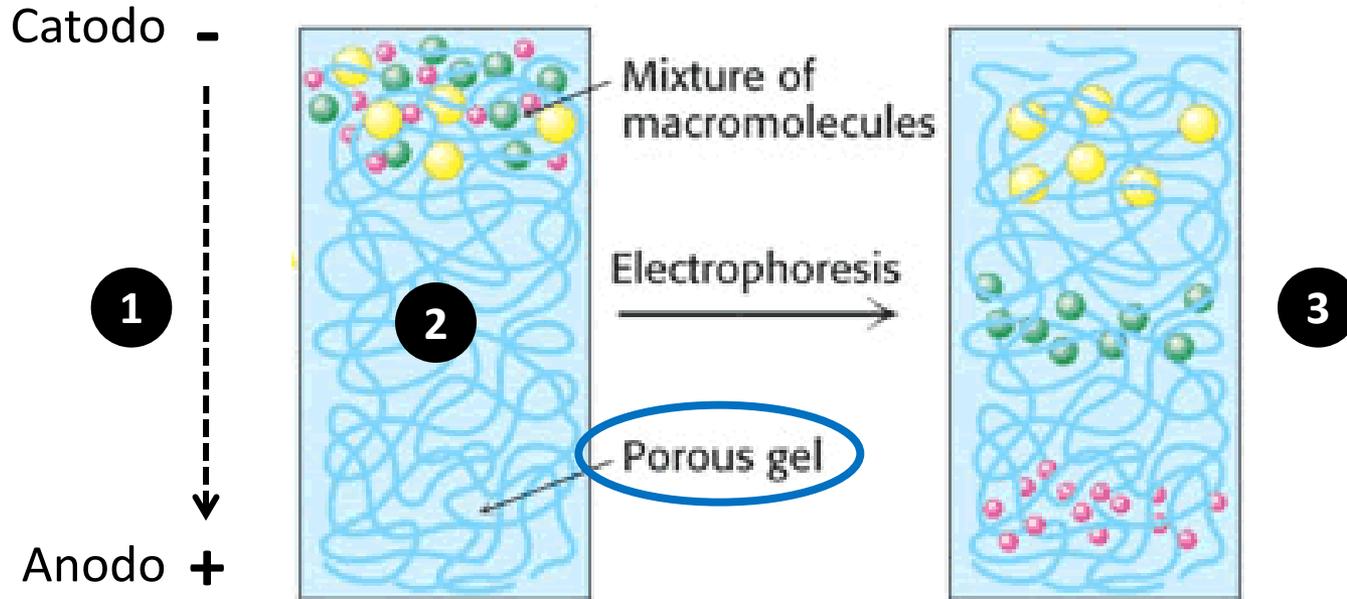


Cationi (+) \longrightarrow Polo negativo o CATODO

Anioni (-) \longrightarrow Polo positivo o ANODO

1

Elettroforesi: Separazione di molecole cariche mediante applicazione di un **campo elettrico**



2

Utilizzo di un **supporto poroso (gel)** costituito da un polimero che agisce come un **setaccio**

3

La **concentrazione** del polimero influisce sulla **dimensione dei pori** del setaccio e permette la **separazione per dimensione**

ELETTROFORESI

Tecnica analitica che consente di **separare** molecole cariche grazie all'applicazione di un campo elettrico.

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

Migrazione
inversamente
proporzionale
alla dimensione
delle particelle

v = velocità di migrazione

E = gradiente di voltaggio del campo elettrico

q = carica della particella

f = coefficiente frizionale del mezzo

viscosità

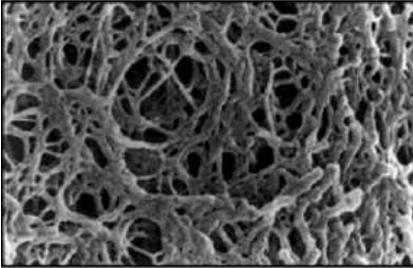
forma

dimensioni

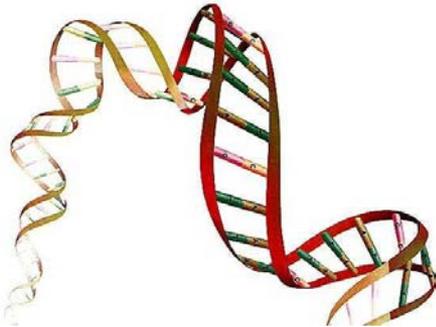
pori

molecola

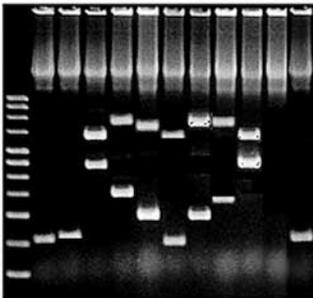
Due tipi di polimeri: AGAROSIO e POLIACRILAMIDE



Diametro pori:
Da **50 a >200 nm**



es. PCR

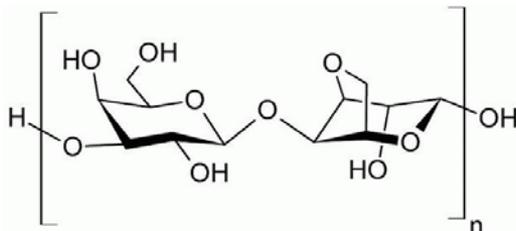


Paio di
nucleotidi
medio:
650 Da

GEL DI AGAROSIO

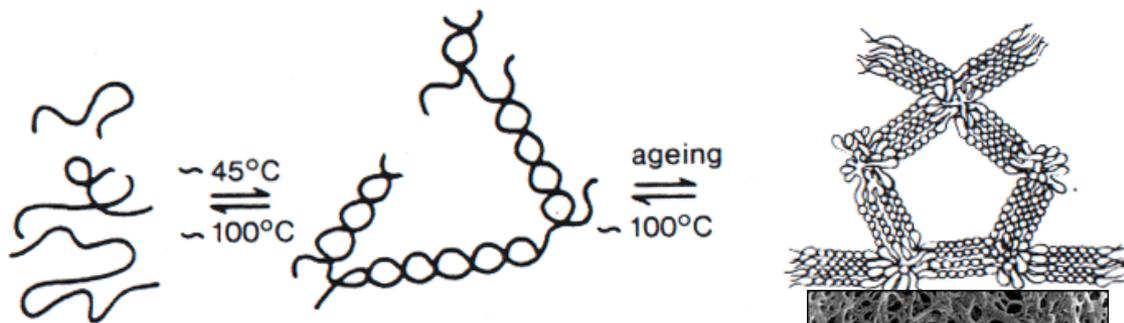
Agarosio: **polimero lineare** estratto da un'alga marina, la cui struttura di base è:

D-Galattoso-3,6-Anidro-L-Galattopiranosio

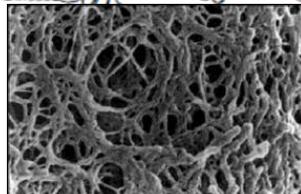


Legame O-glicosidico

- Forma una matrice semisolida avente pori di dimensione diversa in funzione della concentrazione utilizzata
- Maggiore è la **[agarosio]**, più piccoli sono i pori nel gel.



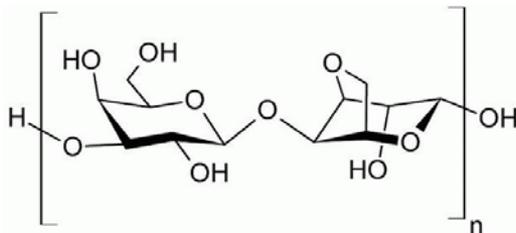
Si forma un
reticolo tridimensionale



GEL DI AGAROSIO

Agarosio: **polimero lineare** estratto da un'alga marina, la cui struttura di base è:

D-Galattoso-3,6-Anidro-L-Galattopiranosio



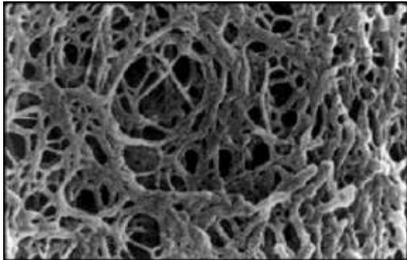
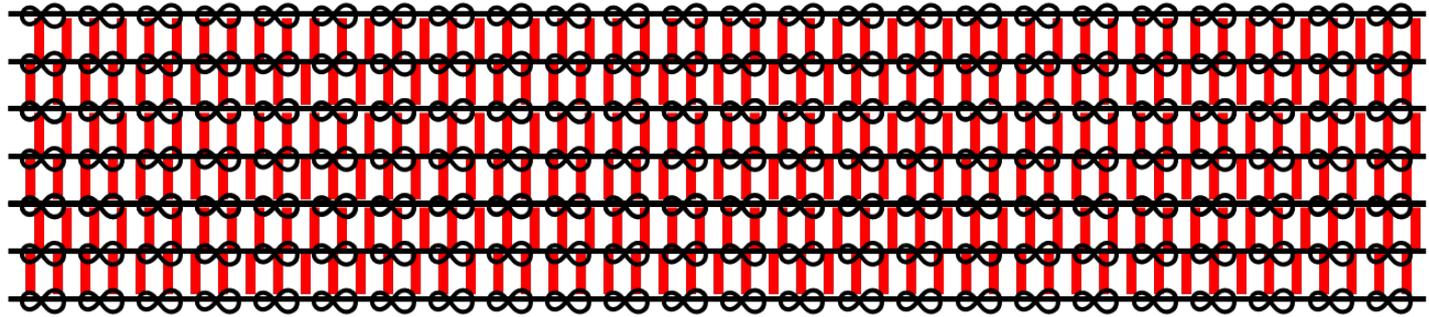
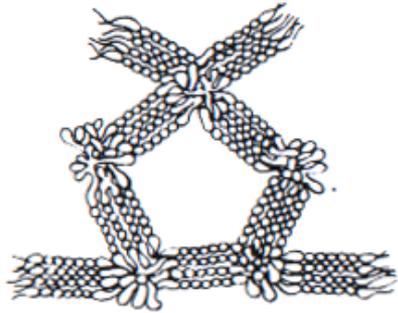
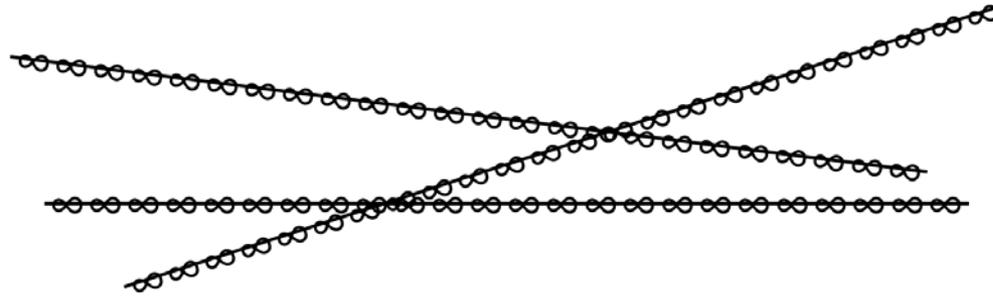
Legame O-glicosidico

- Forma una matrice semisolida avente pori di dimensione diversa in funzione della concentrazione utilizzata
- Maggiore è la **[agarosio]**, più piccoli sono i pori nel gel.

Il **DNA** che possiede **carica negativa** a **pH neutro**, migrerà verso l'**anodo** (polo +)



NATURA CHIMICA DEL GEL DI AGAROSIO



Diametro pori:
Da 50 a >200 nm

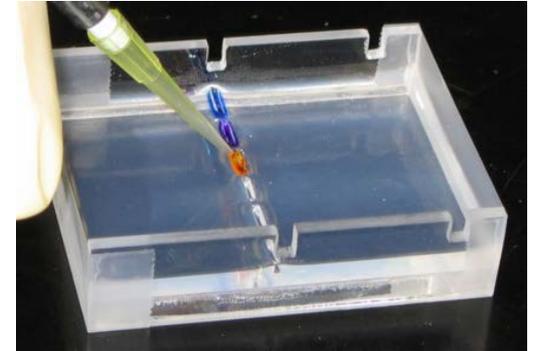


Fra i **polimeri** di agarosio si formano **ponti H**

Da cosa dipende la VELOCITÀ DI MIGRAZIONE

La **velocità di migrazione** del DNA all'interno di un gel di agarosio è influenzata da numerosi parametri:

- DIMENSIONE DEL DNA
- CONCENTRAZIONE DI AGAROSIO NEL GEL
- CONFORMAZIONE DEL DNA
- PRESENZA DI BROMURO DI ETIDIO
- VOLTAGGIO APPLICATO $v = \frac{E \cdot q}{f}$
- LA COMPOSIZIONE IN BASI **NON** INFLUENZA LA MIGRAZIONE



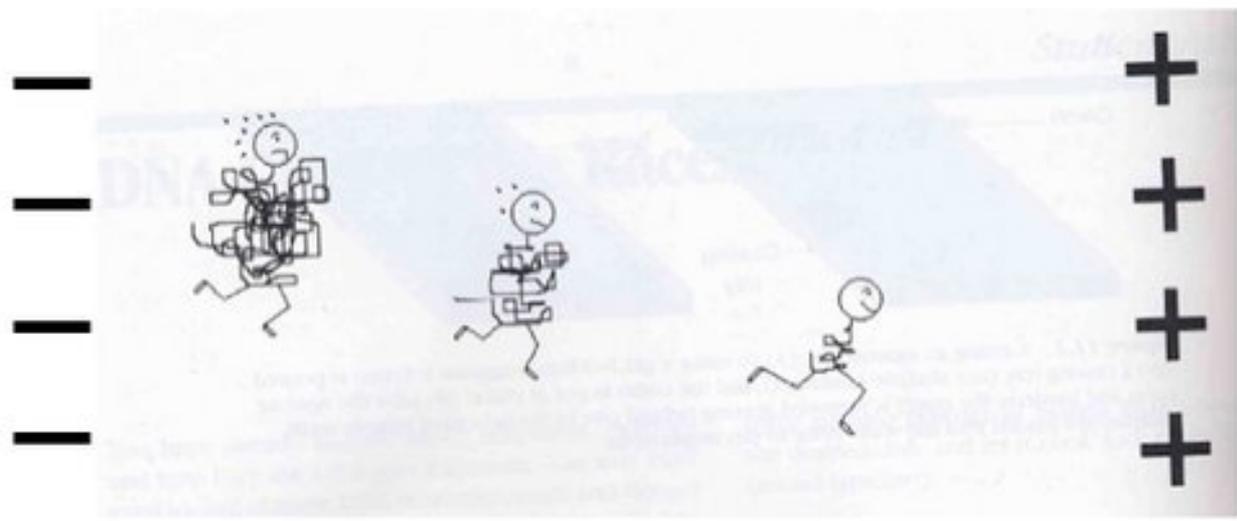
□ DIMENSIONE DEL DNA

$$V = \frac{K}{\text{Log}_{10} \text{ bp}}$$

Relazione di proporzionalità diretta tra pb e PM:

- molecole grandi migrano lentamente
- molecole piccole migrano velocemente

(il parametro K varia al variare della concentrazione di agarosio nel gel)



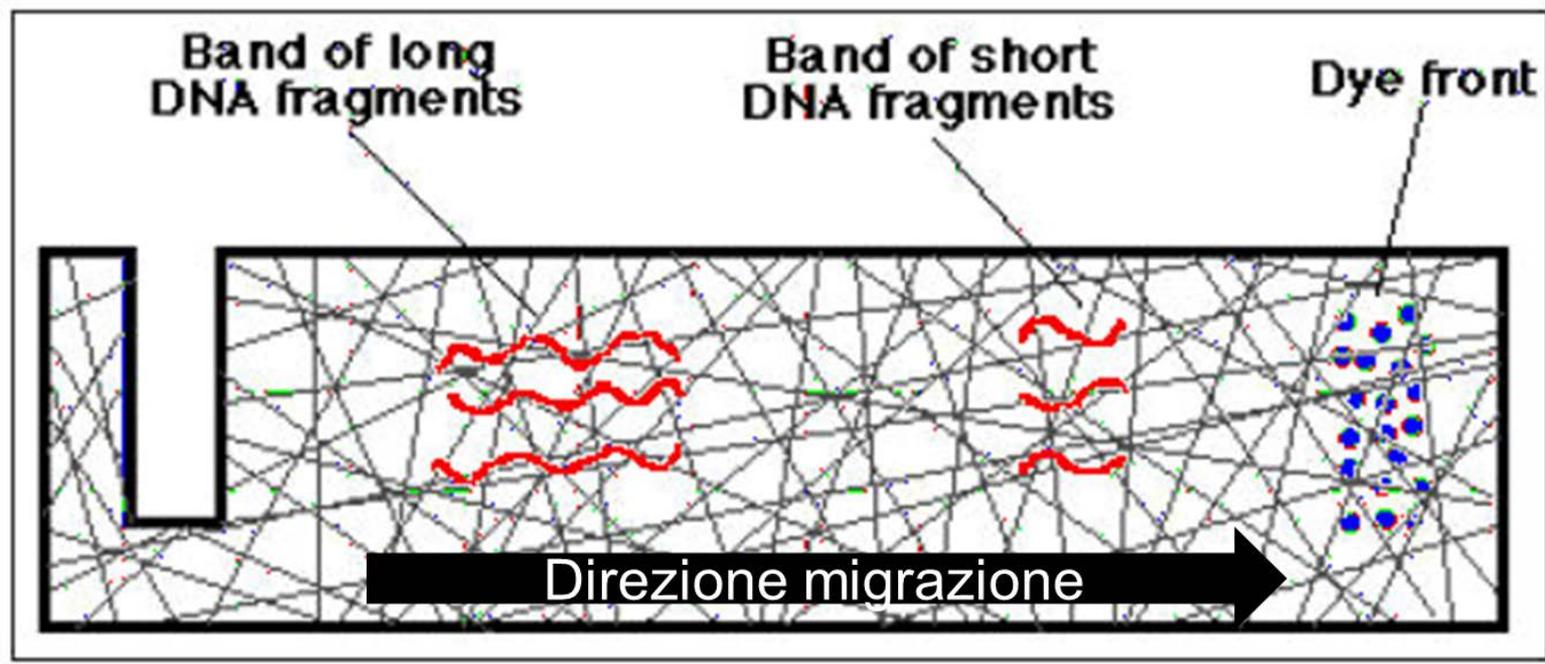
□ DIMENSIONE DEL DNA

$$V = \frac{K}{\text{Log}_{10} \text{ bp}}$$

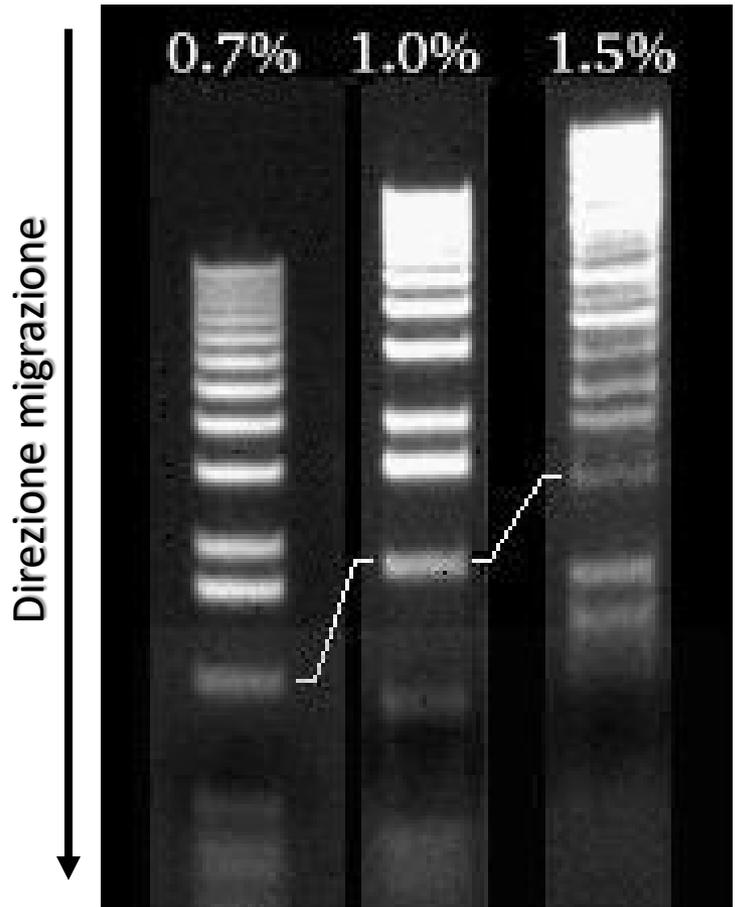
Relazione di proporzionalità diretta tra pb e PM:

- **molecole grandi** migrano **lentamente**
- **molecole piccole** migrano **velocemente**

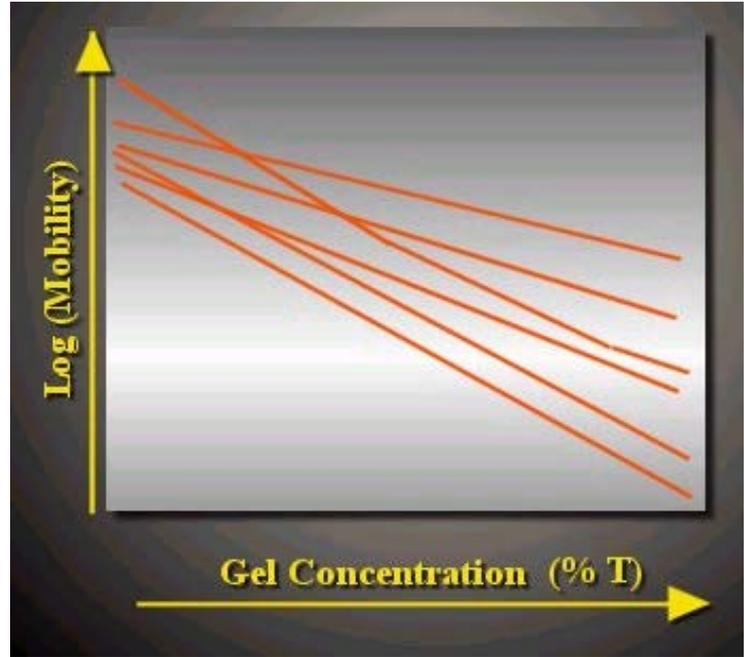
(il parametro K varia al variare della concentrazione di agarosio nel gel)



CONCENTRAZIONE DI AGAROSIO NEL GEL

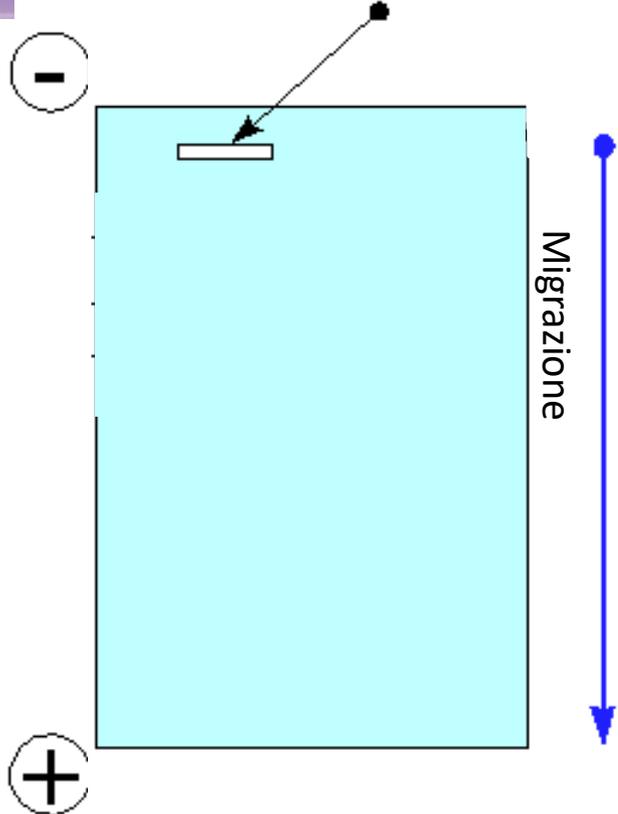
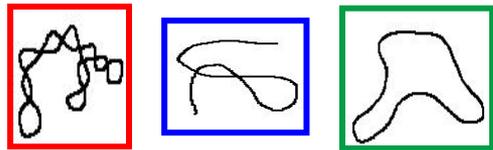
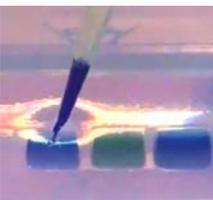


[agarosio] %p/v	Range di separazione (bp)
0.3	5.000 – 60.000
0.6	1.000 – 20.000
0.7	800 – 10.000
0.9	500 – 7.000
1.2	400 – 6.000
1.5	200 – 3.000
2.0	100 – 2.000



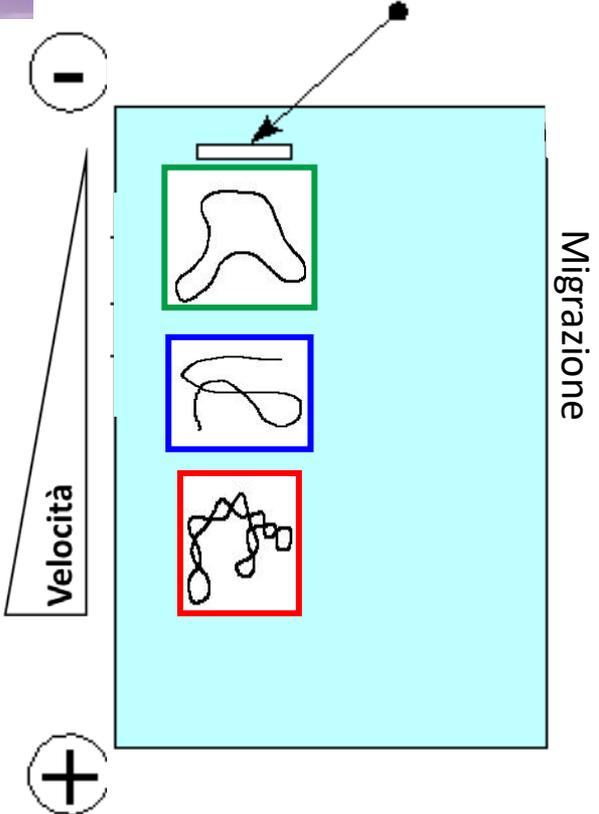
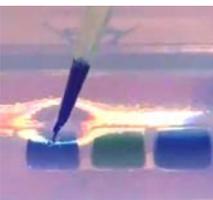
□ CONFORMAZIONE DEL DNA

DNA **lineare**, **circolare** e **superavvolto** dello **stesso peso molecolare** hanno **diversa velocità** di migrazione



CONFORMAZIONE DEL DNA

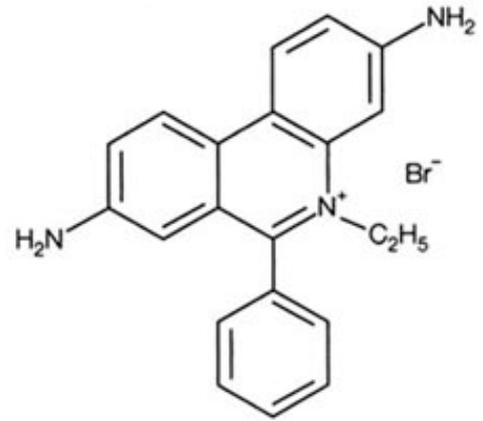
DNA **lineare**, **circolare** e **superavvolto** dello **stesso peso molecolare** hanno **diversa velocità** di migrazione



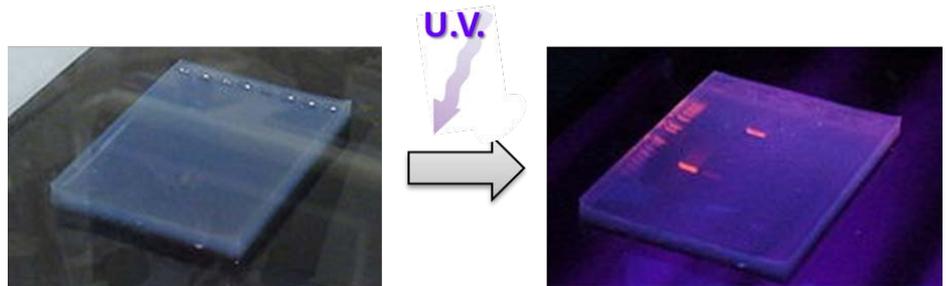
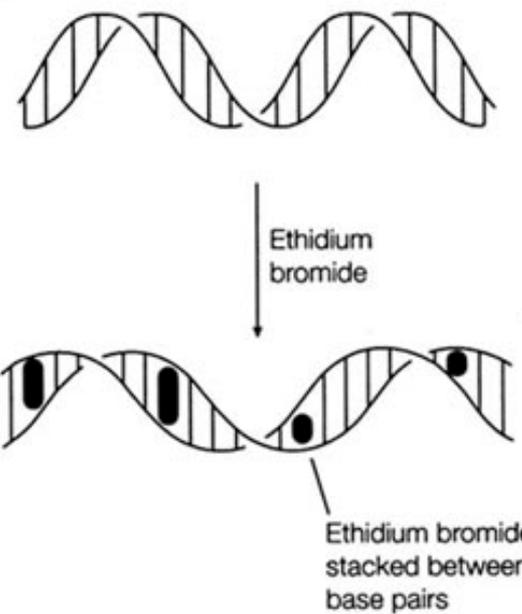
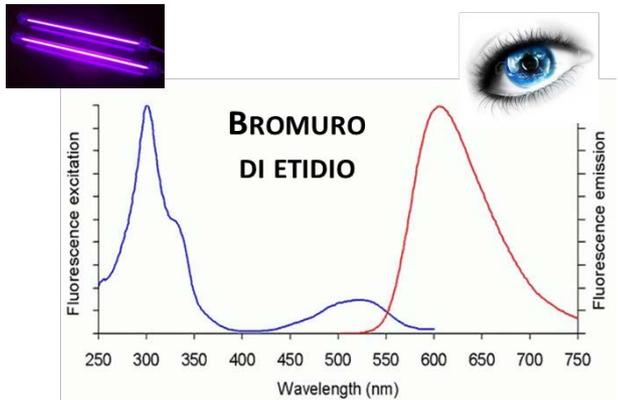
- La forma **CIRCOLARE** migra più lenta perché è la più "ingombrante" e "fatica" di più a muoversi all'interno dei pori del gel.
- La forma **LINEARE** si colloca a metà (la forma lineare è, ad esempio, quella che si ritrova come prodotto di digestione di un plasmide o nella PCR).
- La forma **SUPERAVVOLTA** migra più veloce perché è più compatta.

PRESENZA DI BROMURO DI ETIDIO

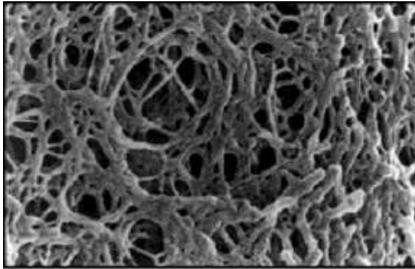
- **Colorante fluorescente (intercalante)** che consente di visualizzare il DNA
- Assorbimento negli **U.V.** ed emissione nel visibile (**590 nm, arancione**).
- Riduce la velocità di migrazione di **~15%**



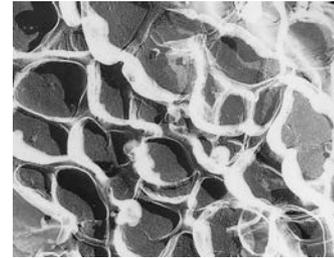
Bromuro di etidio



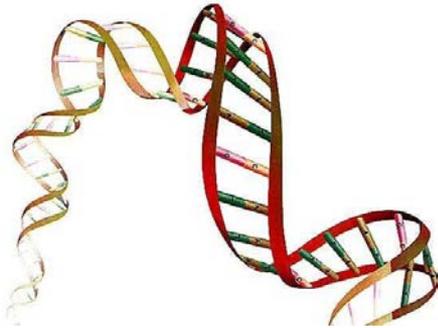
Due tipi di polimeri: AGOROSO e POLIACRILAMIDE



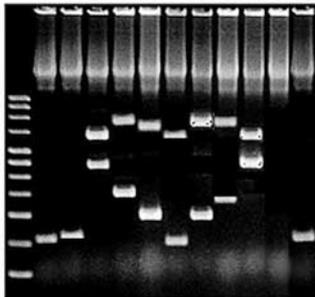
Diametro pori:
Da **50 a >200 nm**



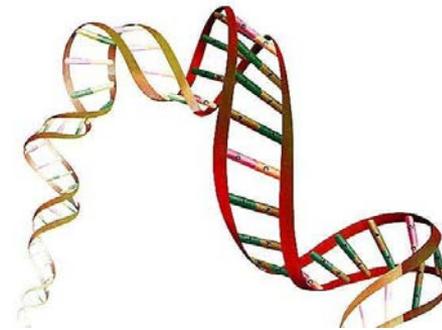
Diametro pori:
Da **0.5 a 2 nm**



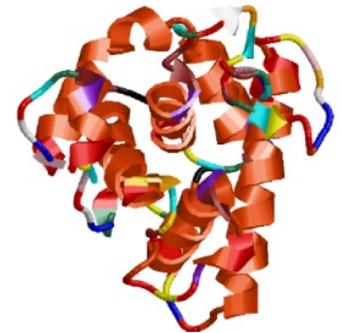
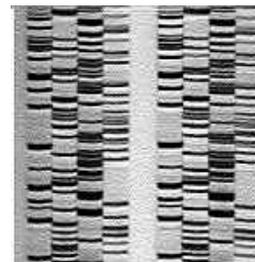
es. PCR



Paio di
nucleotidi
medio:
650 Da



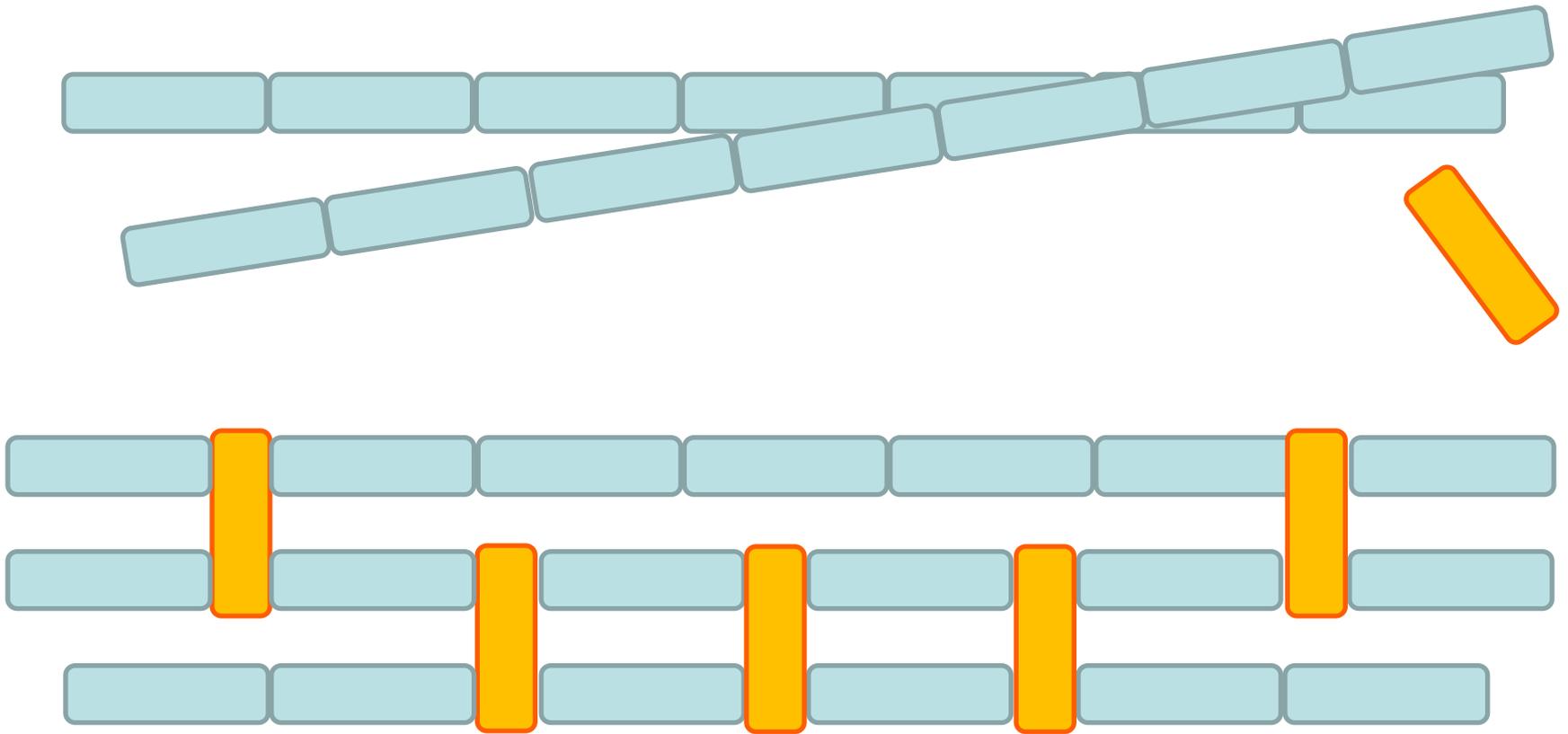
es. seq DNA



Aa medio:
110 Da

GEL DI POLIACRILAMIDE (PAA)

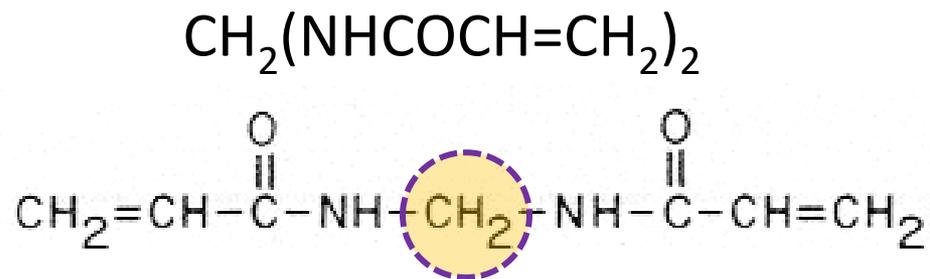
L'**acrilamide** è un **monomero** ($\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$) che viene fatto polimerizzare con un agente in grado di stabilire **legami crociati** in presenza di un **catalizzatore** e di un **iniziatore**.



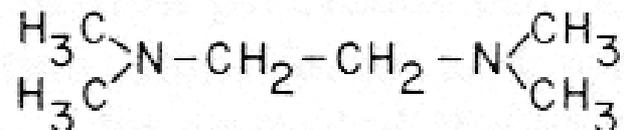
Si formano **legami covalenti** tra i monomeri → **polimerizzazione**.

ELEMENTI INDISPENSABILI PER LA POLIMERIZZAZIONE

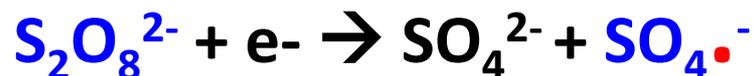
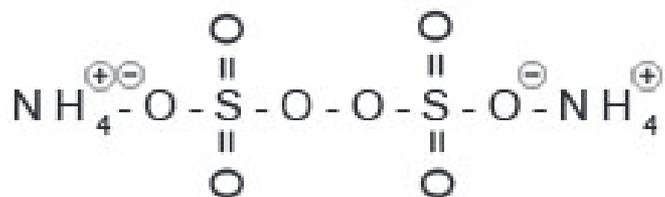
Agente cross-linker: N,N'-metilenbisacrilamide



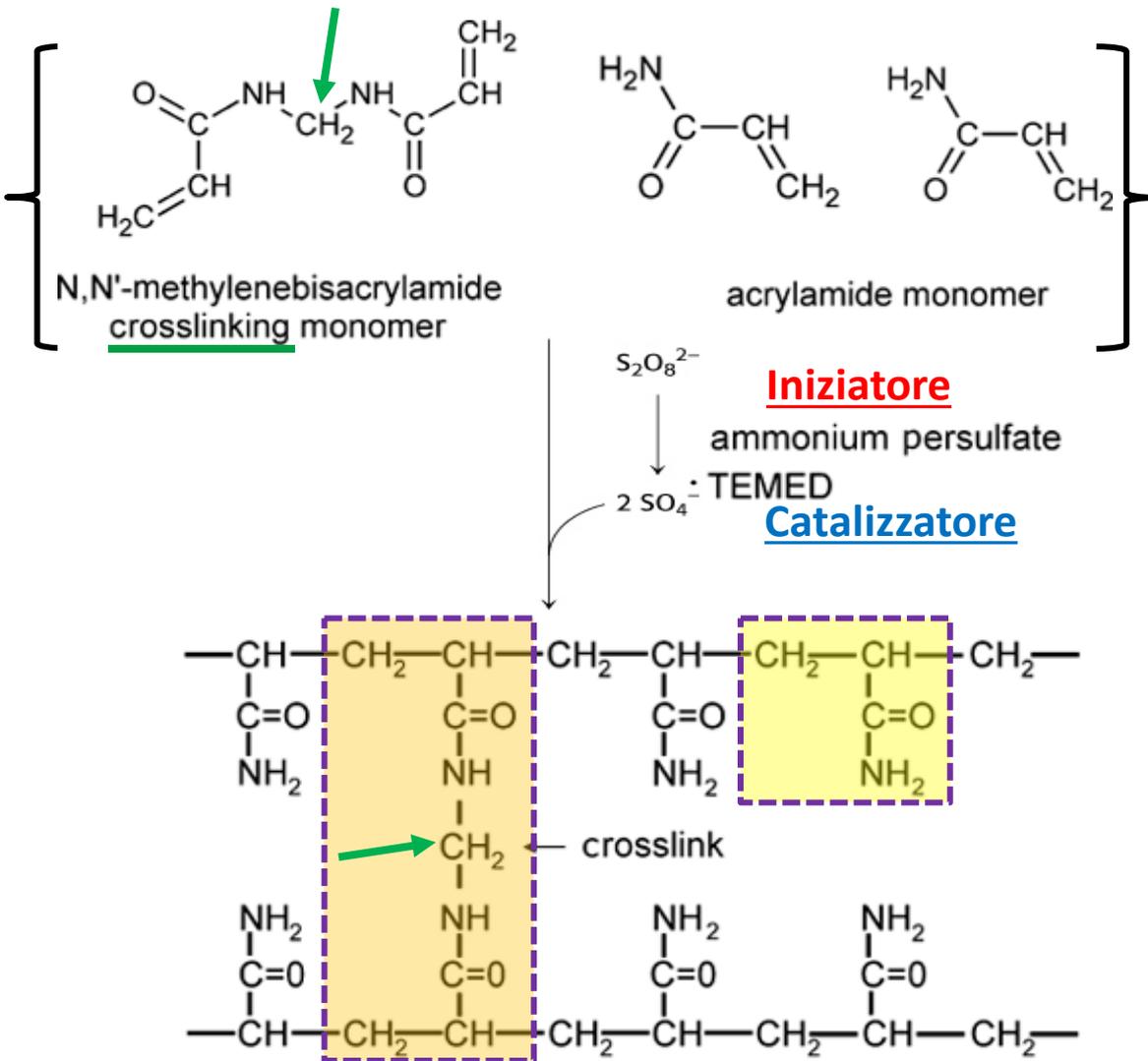
Catalizzatore: TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina)



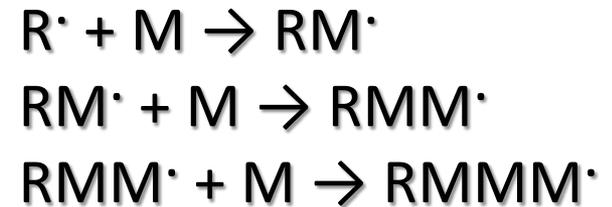
Iniziatore: ammonio persolfato (APS)



L'acrilamide genera un polimero poroso



Reazione a catena:
i monomeri di acrilamide
polimerizzano
(legami covalenti)
a formare lunghe catene.



Indispensabile l'**agente cross-linker** per la
formazione del reticolo tridimensionale

La **concentrazione** di **acrilamide** influisce sulla **dimensione dei pori** del setaccio e consente la **separazione delle proteine per dimensione**

% di acrilamide
consigliata

Dimensioni delle
proteine

8%

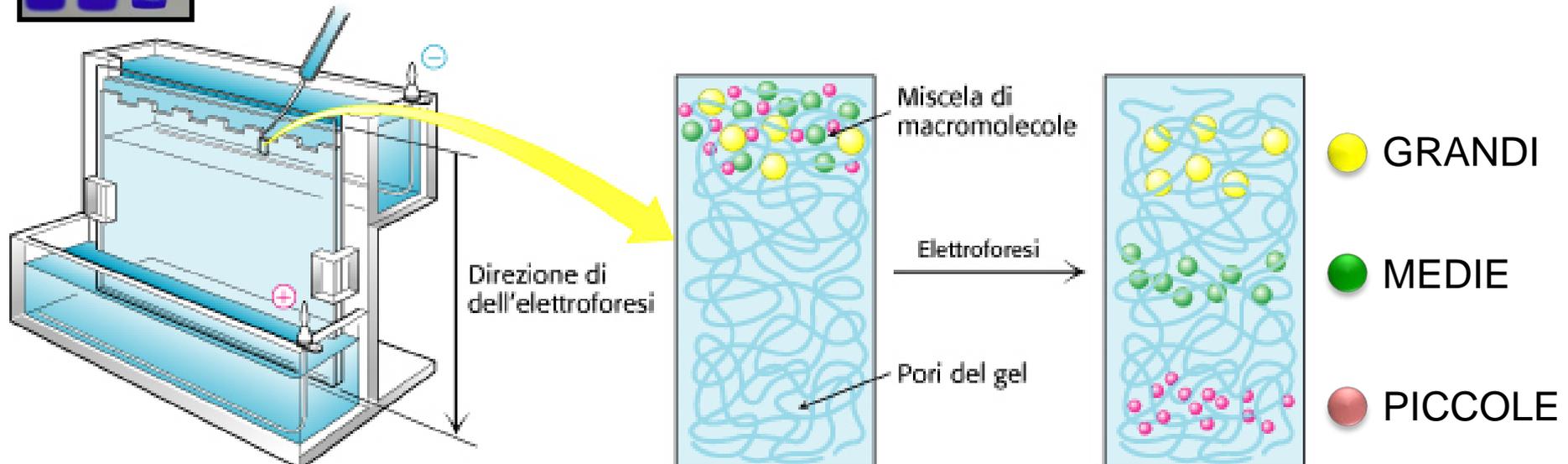
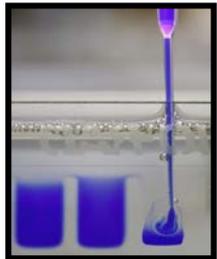
40-200 kDa

10%

21-100 kDa

12%

10-40 kDa

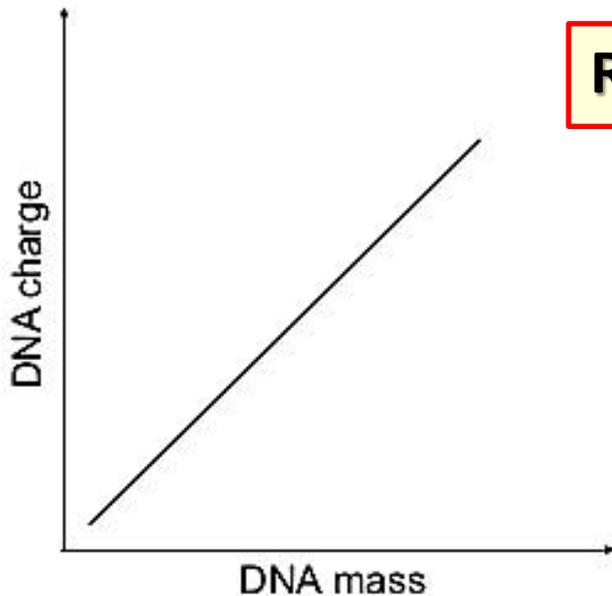


ELETTROFORESI E RAPPORTO CARICA-MASSA

Charge-to-mass ratio

this ratio significantly affects the mobility of a macromolecule through a solution when driven by an electric field (two molecules of identical mass but different charge will move at different rates in an electric field).

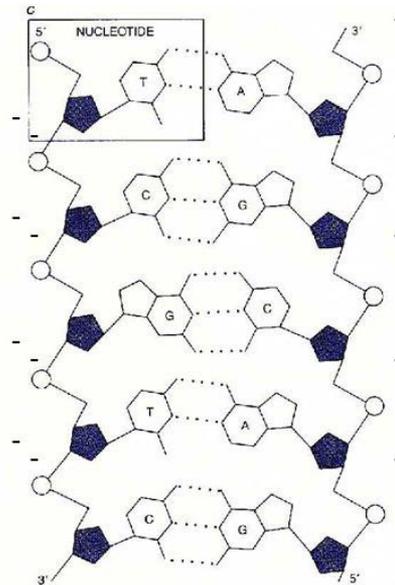
Since at neutral pH, the majority of the **net charge on DNA** is derived from the **negatively charged phosphate groups** in the DNA backbone, as DNA increases in size, the total charge increases at the same rate. The resulting **charge-to-mass ratio** therefore remains **constant**, and DNA fragments of **different sizes all move at about the same rate in an electric field**. For **separation** of the fragments **according to size**, it is necessary to force the fragments to **migrate through a molecular sieve or matrix** of many small pores that allows the **smaller fragments** to **move faster than the larger fragments**.



Rapporto carica massa costante

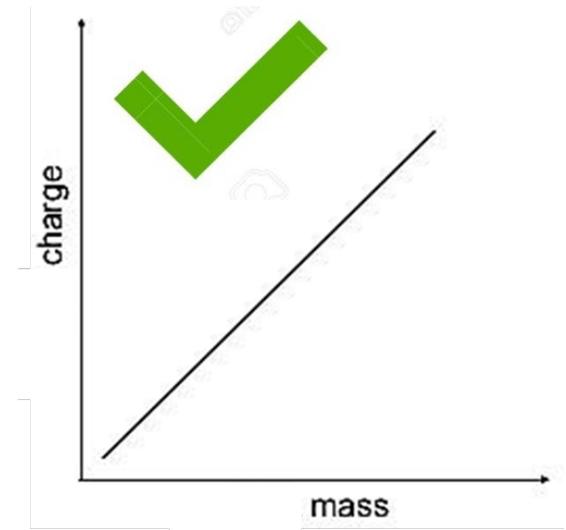


Necessario un "setaccio" per separare per dimensioni

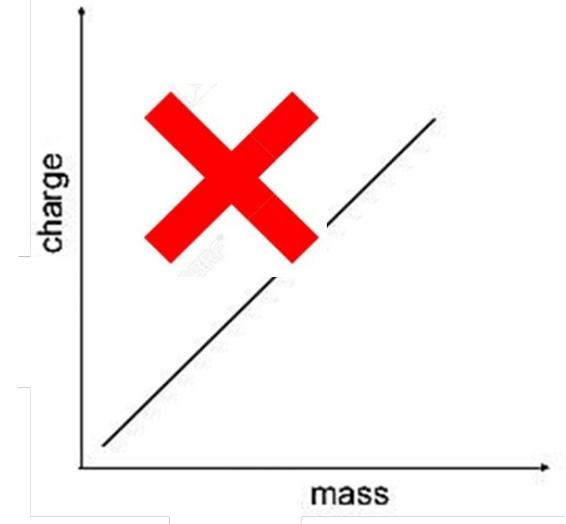
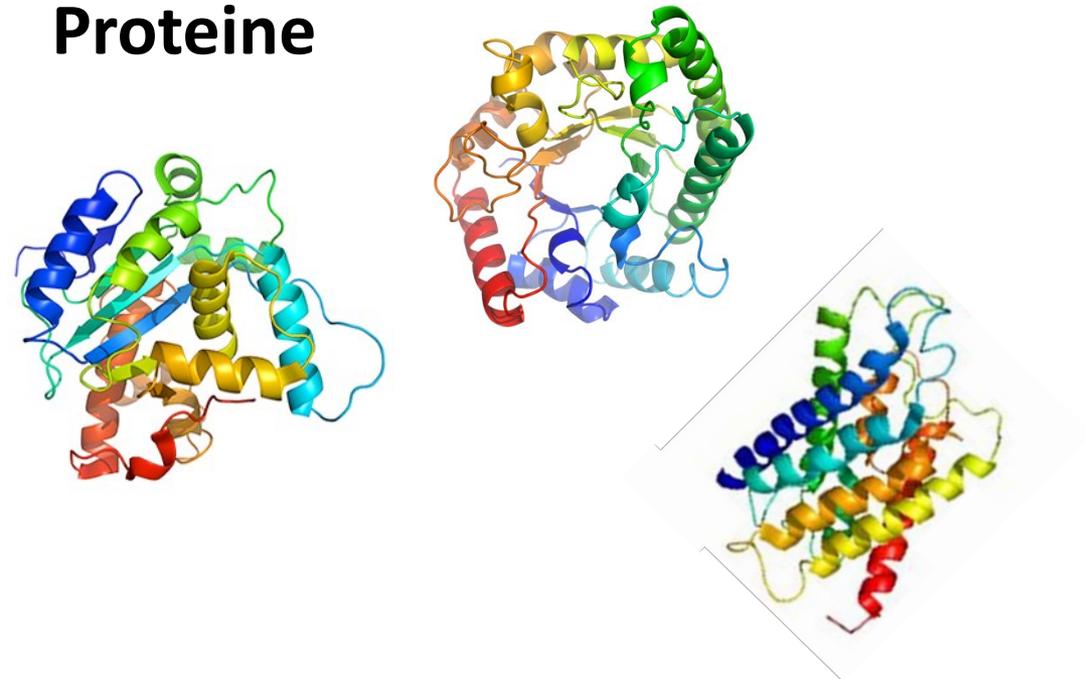


ELETTROFORESI E RAPPORTO CARICA-MASSA

DNA



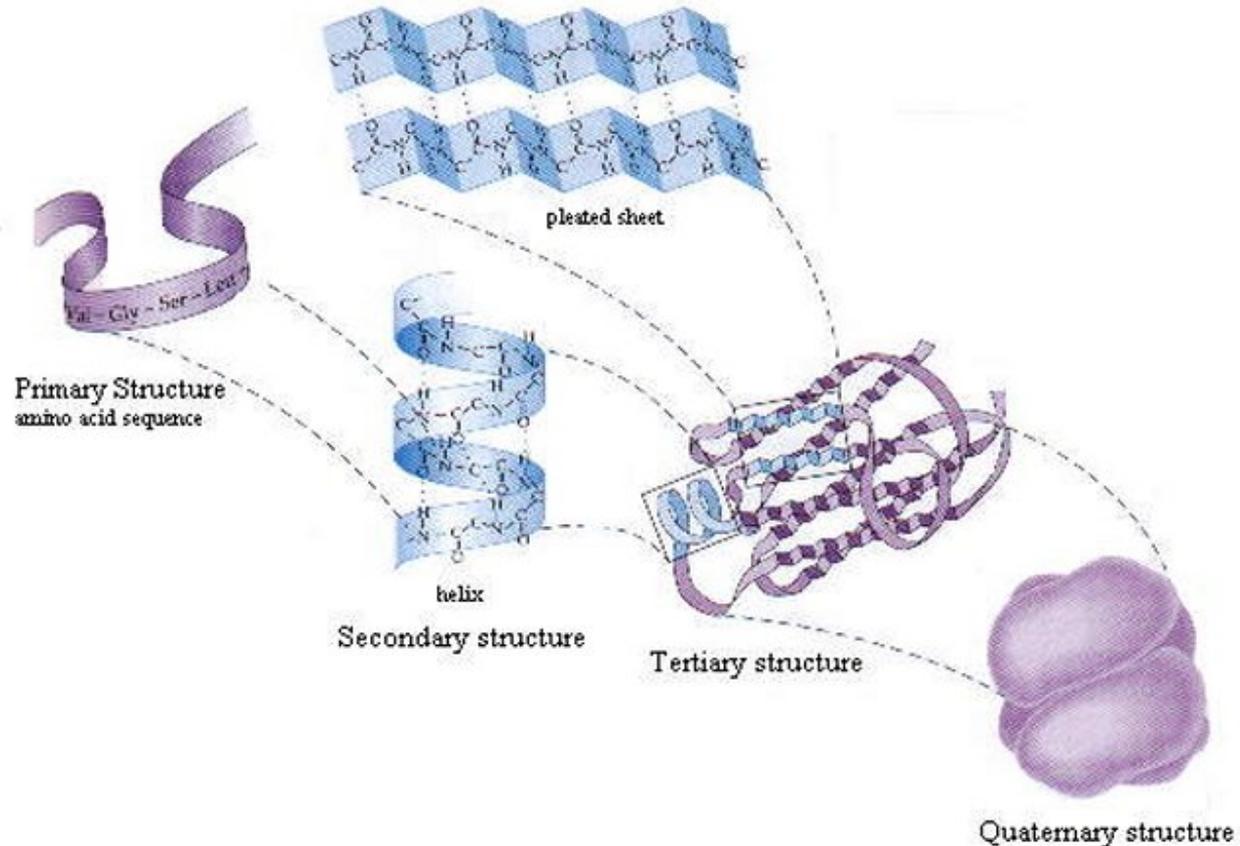
Proteine



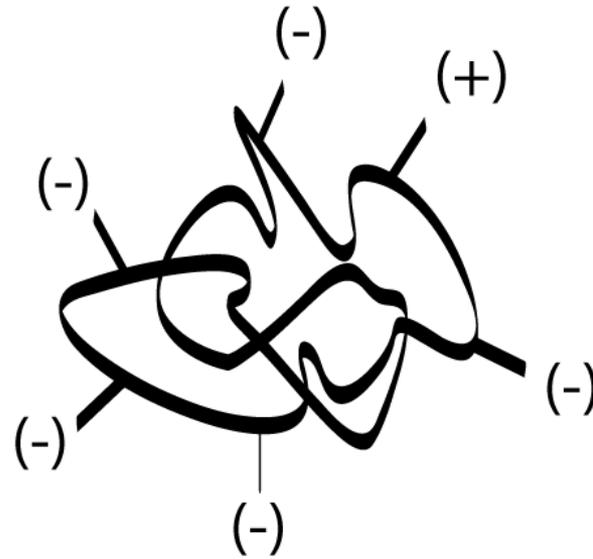
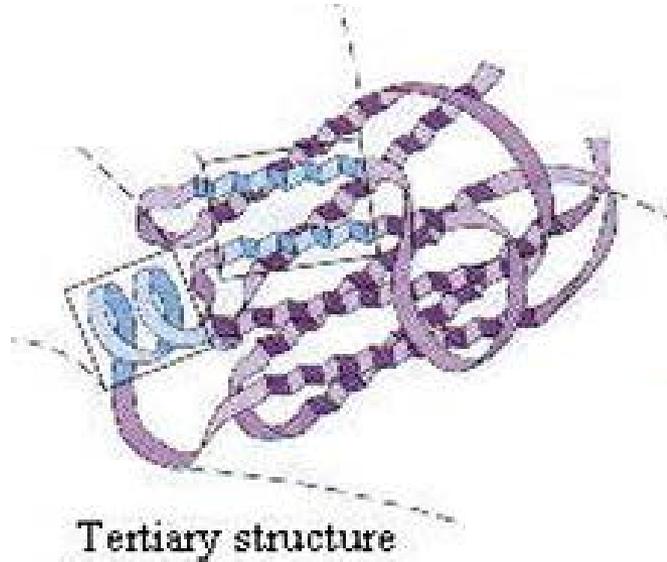
ELETTROFORESI DI PROTEINE

Molto più complessa della separazione elettroforetica di DNA.

Fortissime variazioni { forma delle proteine
cariche delle proteine



ELETTROFORESI DI PROTEINE



SDS-PAGE **(SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)**

Condizioni
denaturanti

Condizioni
denaturanti e
riducenti

ELETTROFORESI DI PROTEINE → SDS-PAGE

SDS-PAGE = Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

- **Temperatura (5' a 95-100°C)**
accelera la denaturazione completa
- **SDS** Detergente anionico che denatura le proteine conferendovi la stessa densità di carica (negativa).
- **β-Mercaptoetanololo** $\text{HS-CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
– Rompe eventuali legami disolfuro, riducendoli.

SDS-PAGE - Effetto della Temperatura

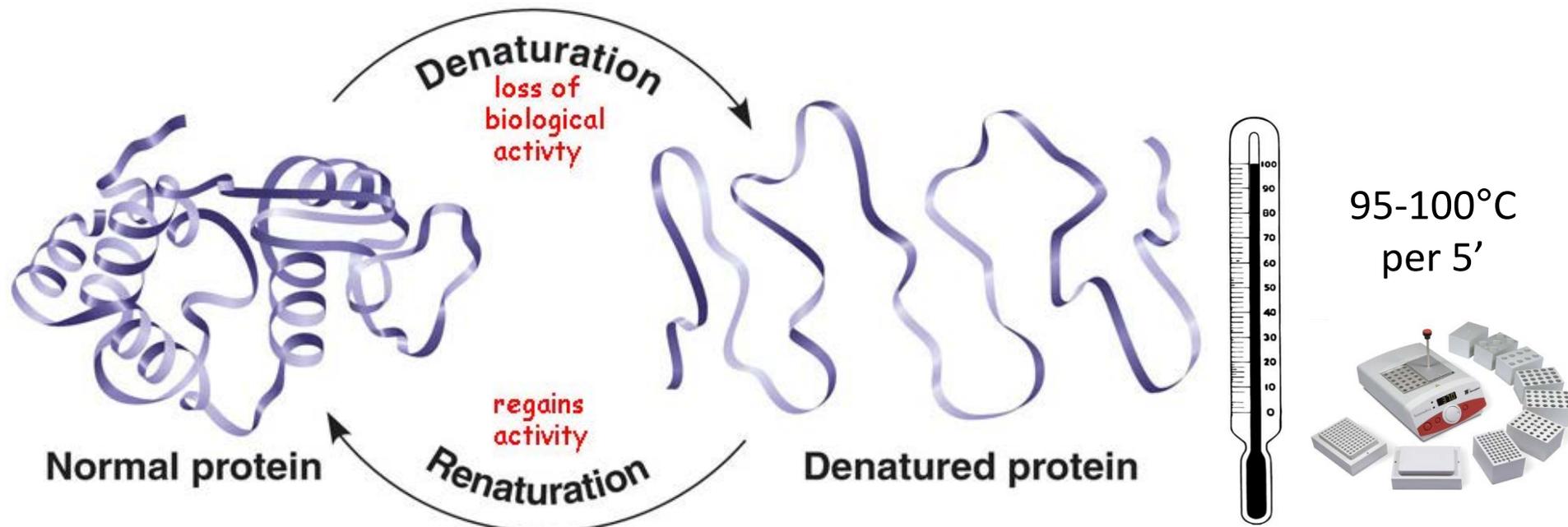
SDS-PAGE = Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

- **Temperatura (5' a 95-100°C)**
accelera la denaturazione completa
- **SDS** Detergente anionico che denatura le proteine conferendovi la stessa densità di carica (negativa).
- **β -Mercaptoetanolo** $\text{HS-CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
– Rompe eventuali legami disolfuro, riducendoli.

SDS-PAGE - Effetto della Temperatura

SDS-PAGE = Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

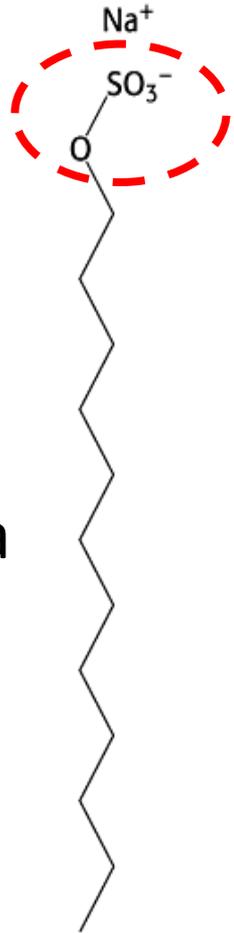
- **Temperatura (5' a 95-100°C)**
accelera la denaturazione completa



SDS-PAGE - Effetto dell' SDS

SDS-PAGE = Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

- **Temperatura (5' a 95-100°C)**
accelera la denaturazione completa
- **SDS** Detergente anionico che denatura le proteine conferendovi la stessa densità di carica (negativa).
- **β -Mercaptoetanolo** $\text{HS-CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
– Rompe eventuali legami disolfuro, riducendoli.



Sodio dodecil solfato
(SDS)

SDS-PAGE - Effetto dell' SDS

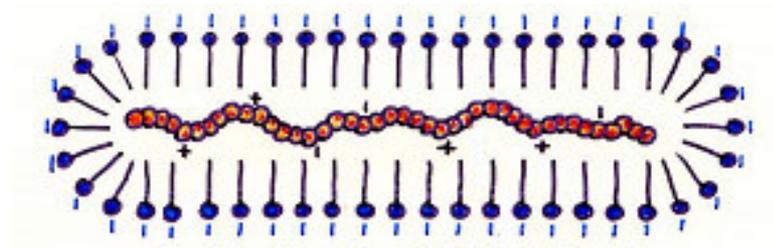
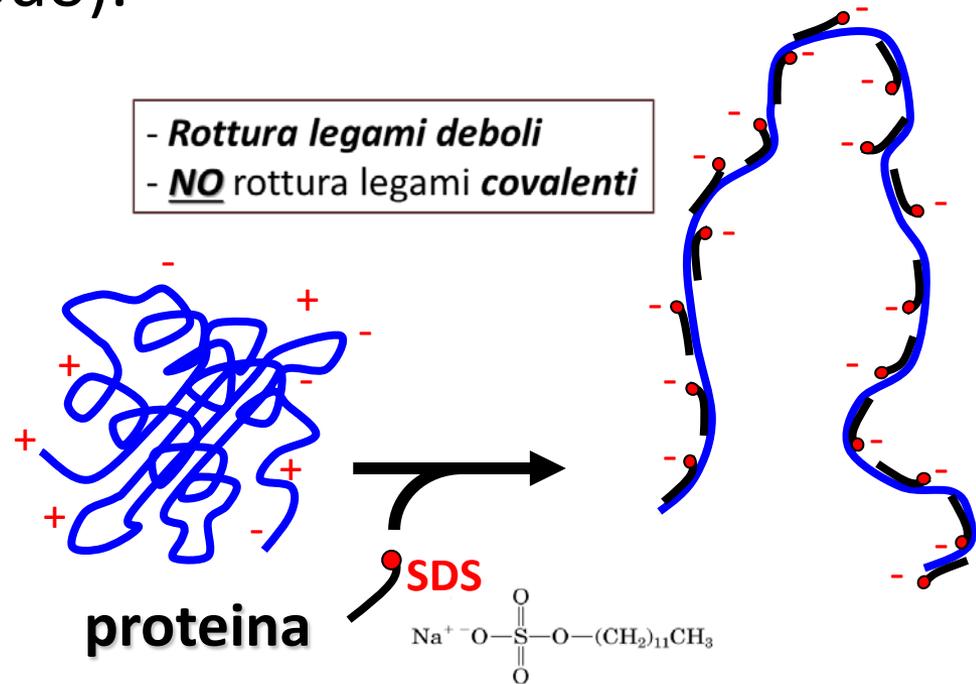
- I complessi **proteina-SDS** sono altamente carichi e **tutti negativi** (migrano verso l'anodo).

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

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

- Le proteine hanno tutte lo **stesso rapporto carica/massa**

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

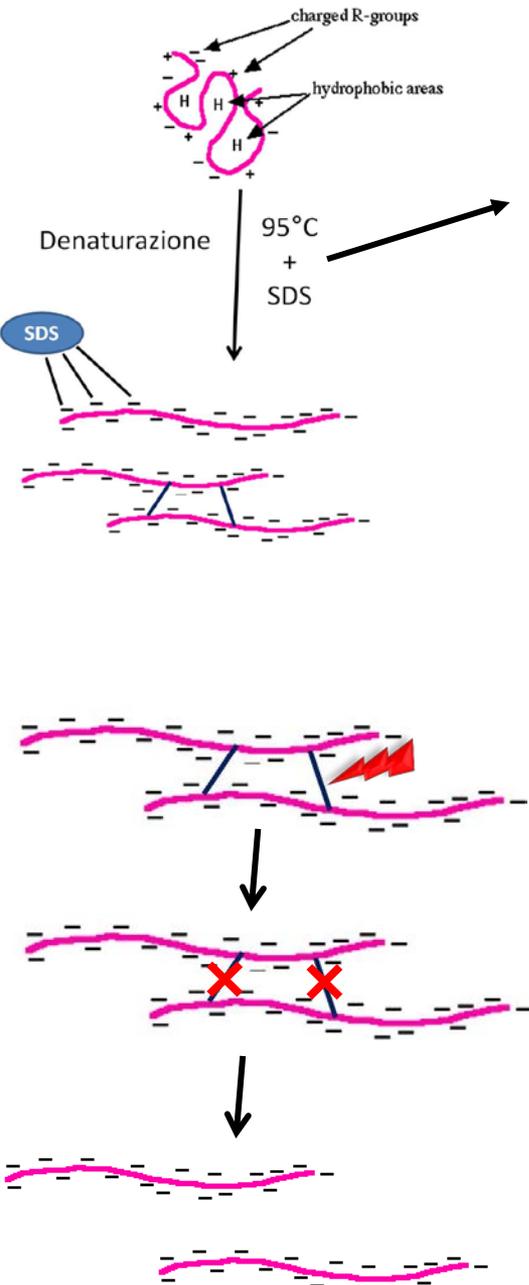


SDS-PAGE - Effetto del β -Mercaptoetanololo

SDS-PAGE = Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

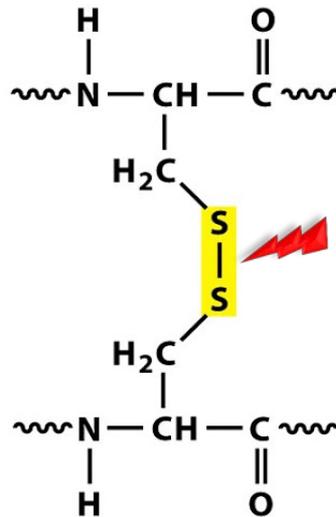
- **Temperatura (5' a 95-100°C)**
accelera la denaturazione completa
- **SDS** Detergente anionico che denatura le proteine conferendovi la stessa densità di carica (negativa).
- **β -Mercaptoetanololo (HS-CH₂CH₂OH)**
– Rompe eventuali legami disolfuro, riducendoli.

SDS-PAGE - Effetto del β -Mercaptoetanololo



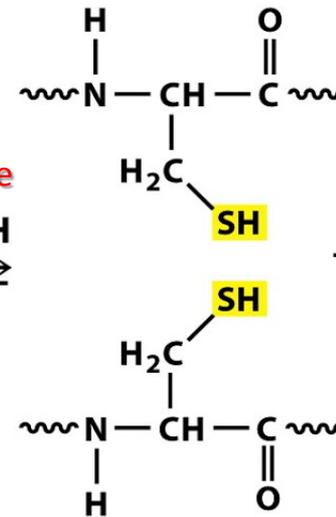
+ **agente riducente** (es β -mercaptoetanololo)

Proteina con
ponte disolfuro

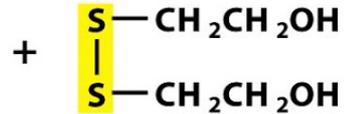


Cystine residue

Agente riducente



Cysteine residues



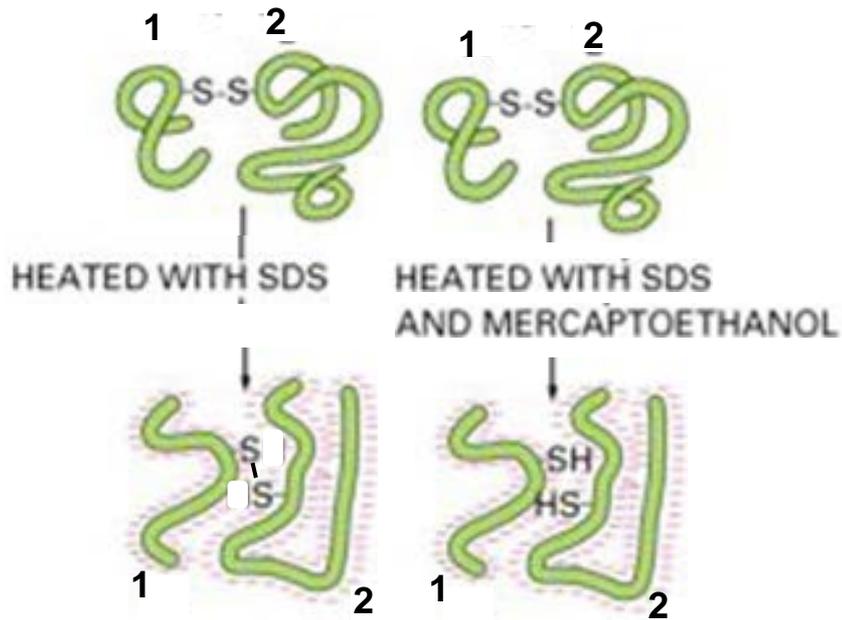
ELETTROFORESI DI PROTEINE - SDS-PAGE

SDS-PAGE = Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

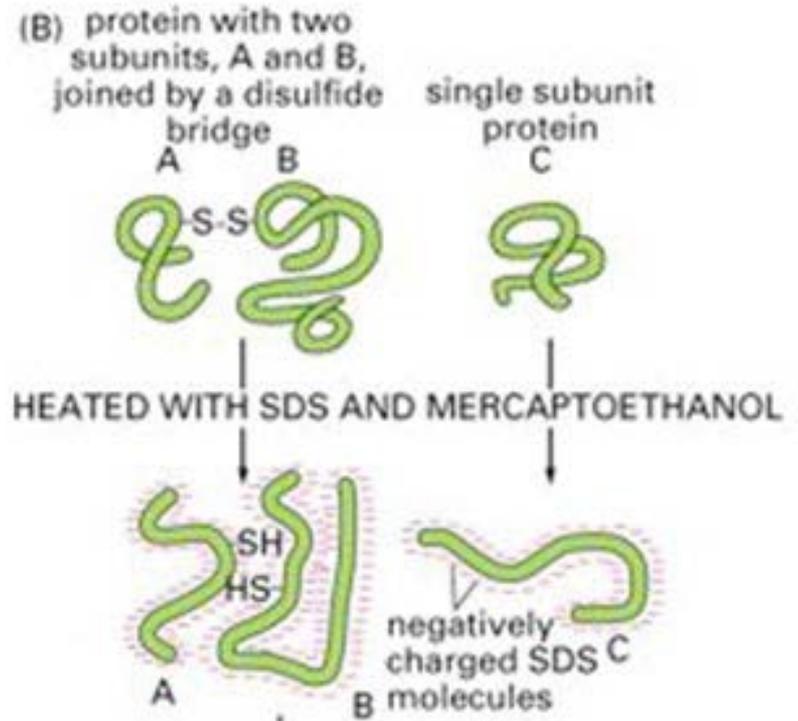
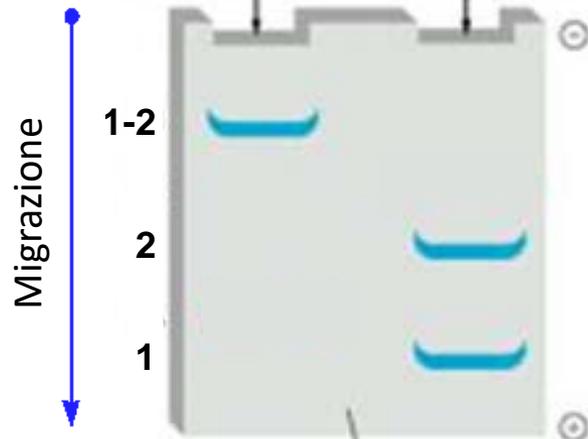
- **Temperatura (5' a 95-100°C)**
accelera la denaturazione completa
- **SDS** Detergente anionico che denatura le proteine conferendovi la stessa densità di carica (negativa).
- **β -Mercaptoetanolo** **HS-CH₂CH₂OH**
– Rompe eventuali legami disolfuro, riducendoli.

Proteine così trattate assumono struttura filamentosa

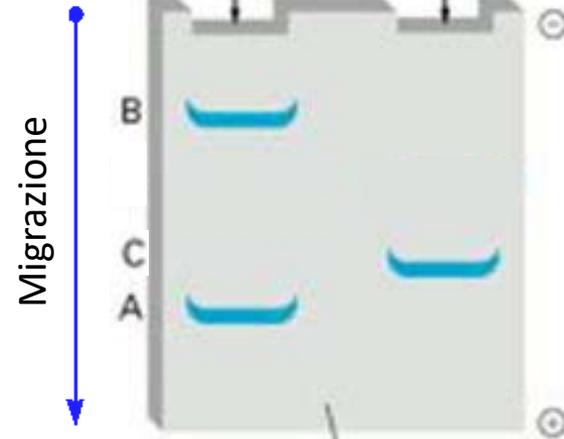
Effetto di denaturanti/riducenti su proteine e migrazione



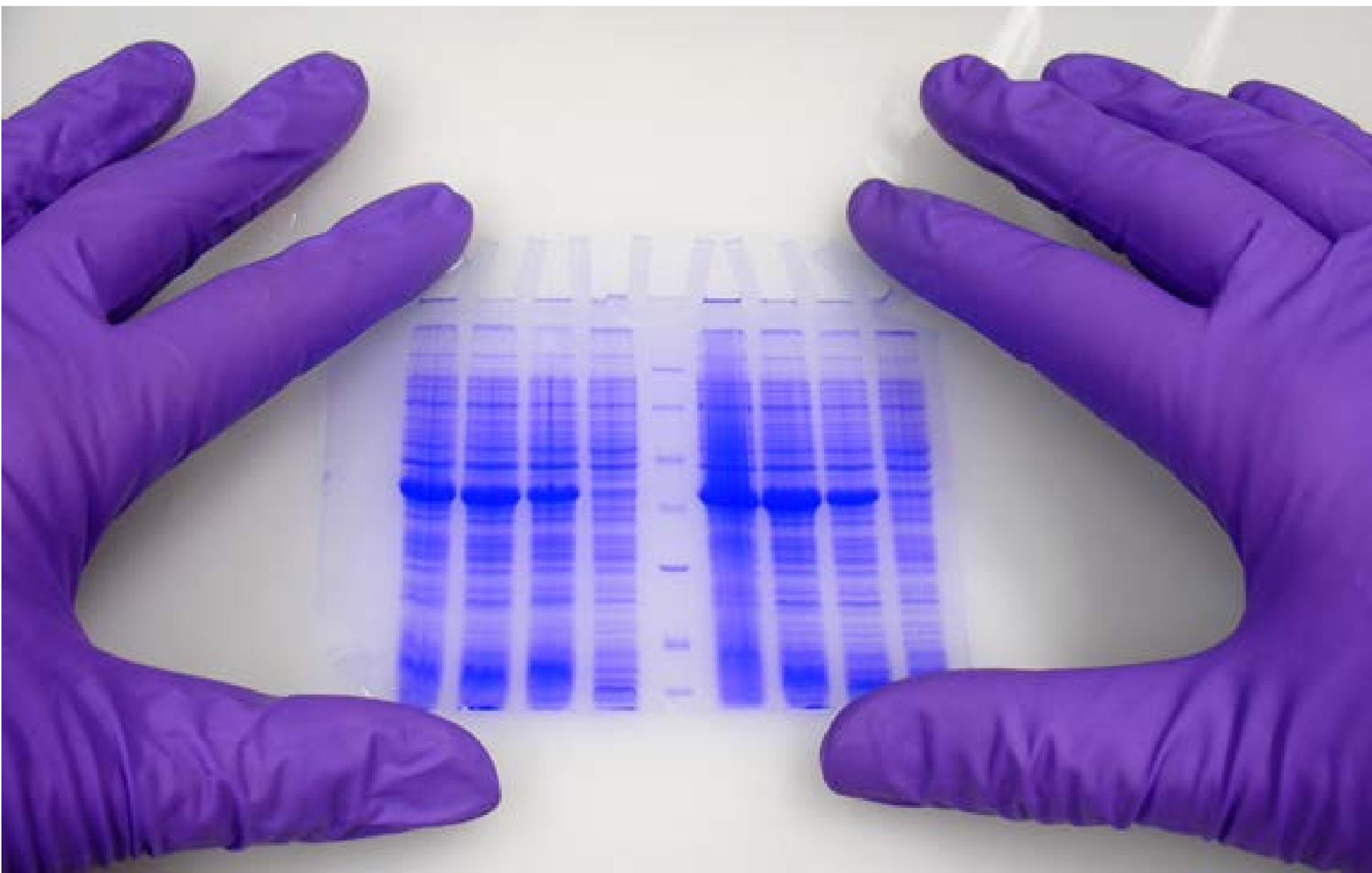
POLYACRYLAMIDE-GEL ELECTROPHORESIS



POLYACRYLAMIDE-GEL ELECTROPHORESIS

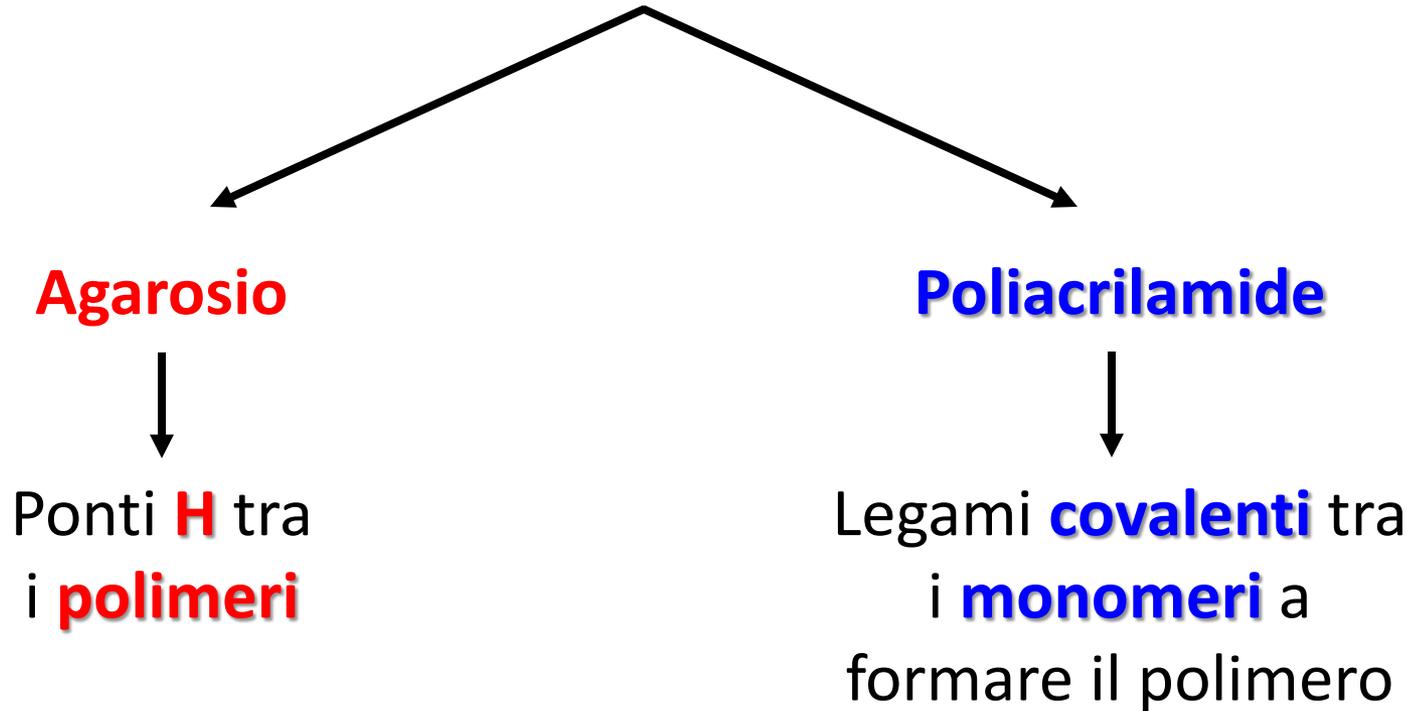


Risultato della colorazione con Blue Coomassie



IMPORTANTE!!

La natura dei legami chimici che permettono la formazione dei gel è diversa tra agarosio e poliacrilamide



Elementi aggiuntivi introdotti nella corsa elettroforetica

In elettroforesi, per controllare migrazione/dimensione dei campioni nella corsa elettroforetica viene inserito un **marcatore di peso molecolare (Marker)**

Per DNA

DNA fagici o plasmidi frammentati per restrizione enzimatica.



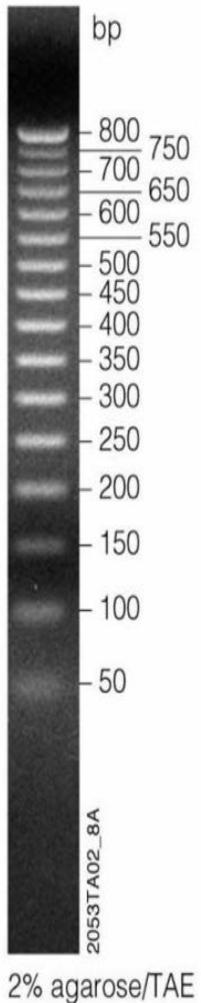
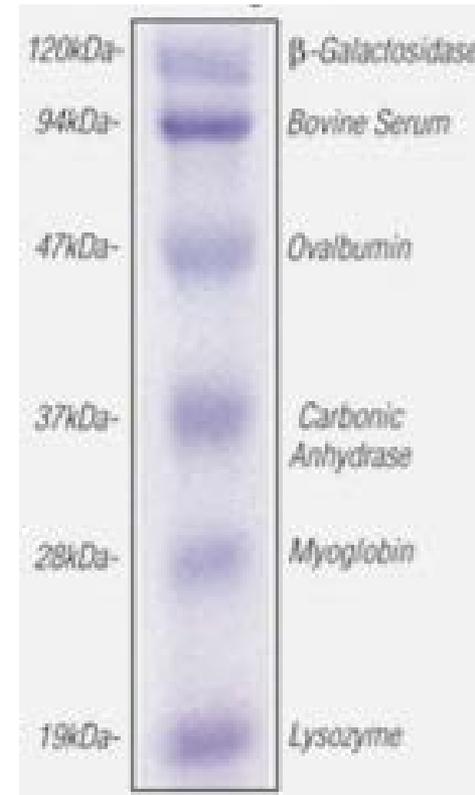
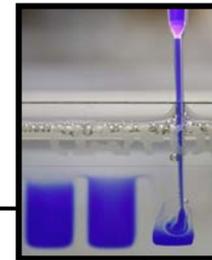
Traccianti elettroforetici

Es. **orange**, **blu di bromofenolo**,
Aggiunti al campione come
indicatore del fronte elettroforetico,
assieme ad un addensante.

NON si legano al campione

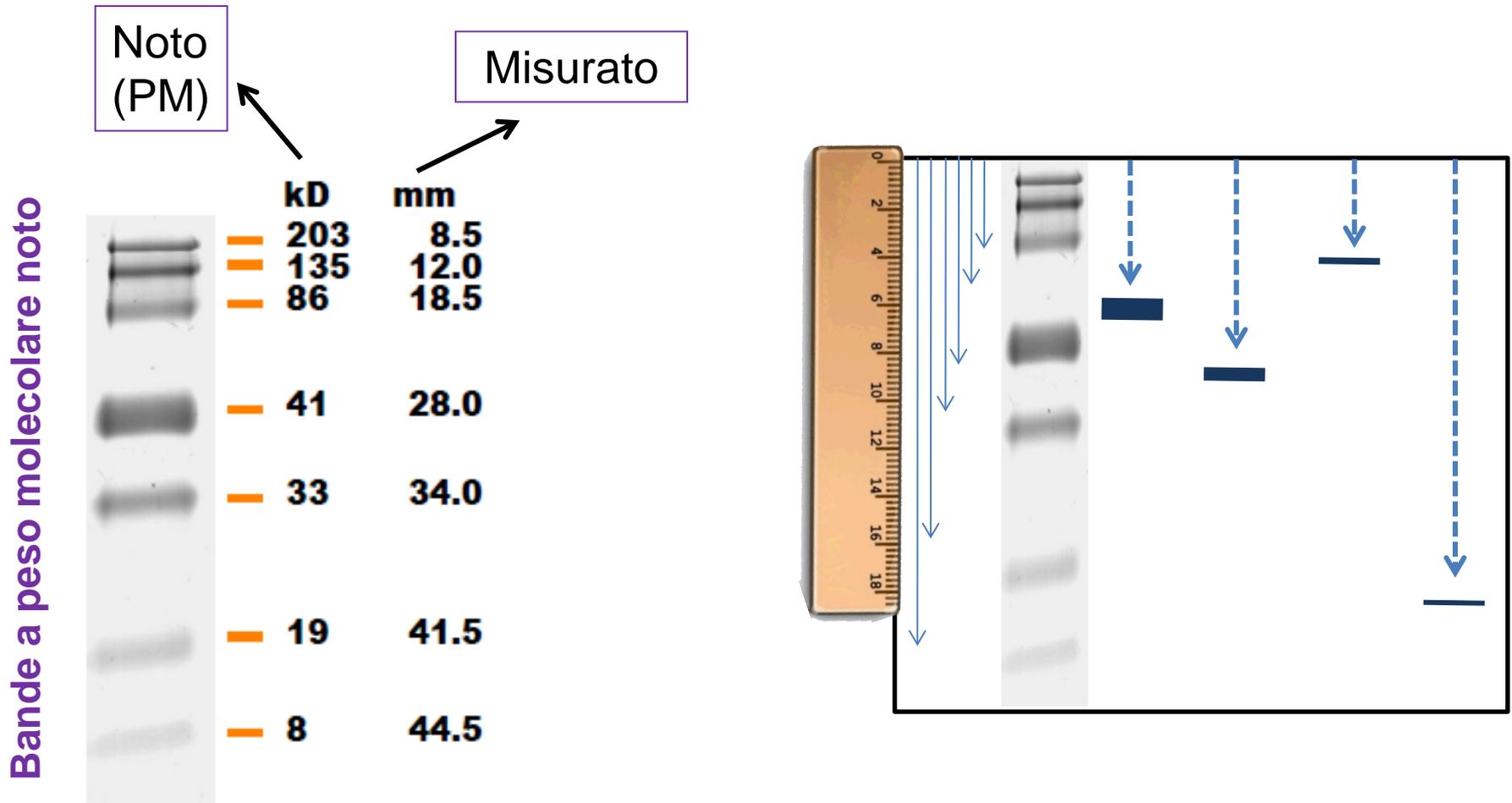
Per proteine

Miscela di proteine (colorate) a dimensione nota



Determinazione del Peso Molecolare (PM o MW)

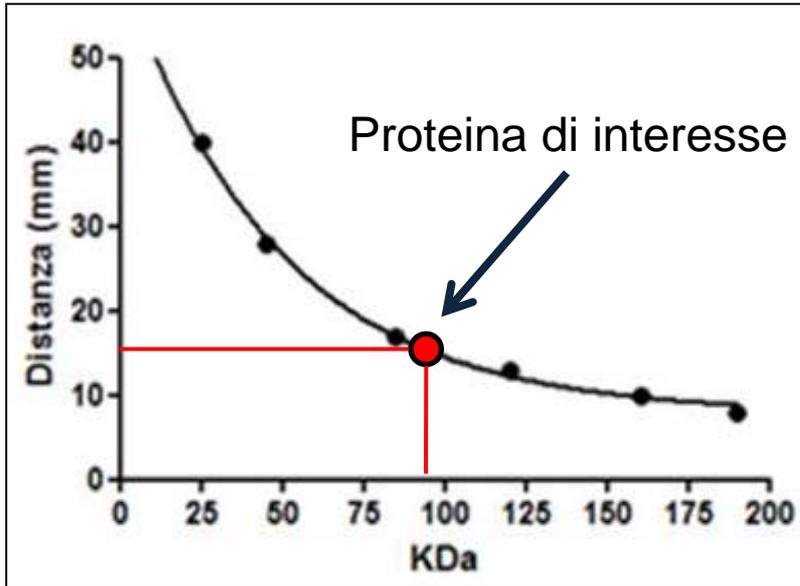
È possibile calcolare il peso molecolare di una proteina di interesse misurando la migrazione di bande di dimensione nota



Determinazione del Peso Molecolare (PM o MW)

È possibile calcolare il peso molecolare di una proteina di interesse misurando la migrazione di bande di dimensione nota

Migrazione (mm) in funzione del **PM**



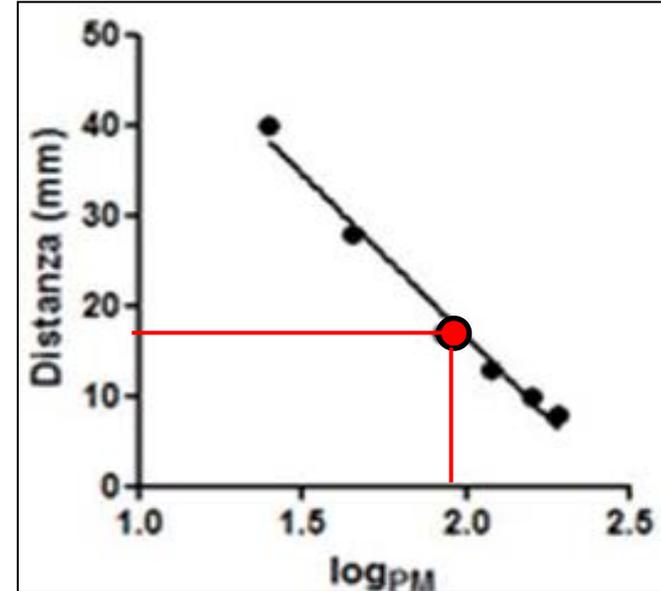
RISULTATO:

Grafico **non lineare**

dai mm percorsi dalla proteina (asse y)
si ricava il **PM** (asse x)

Es: proteina 90 KDa

Migrazione (mm) in funzione del **logPM**



RISULTATO:

Grafico **linearizzato**;

dai mm percorsi dalle proteine (asse y)
si ricava il **logPM** (asse x)

Es: proteina 90 KDa (logPM = 1,95)