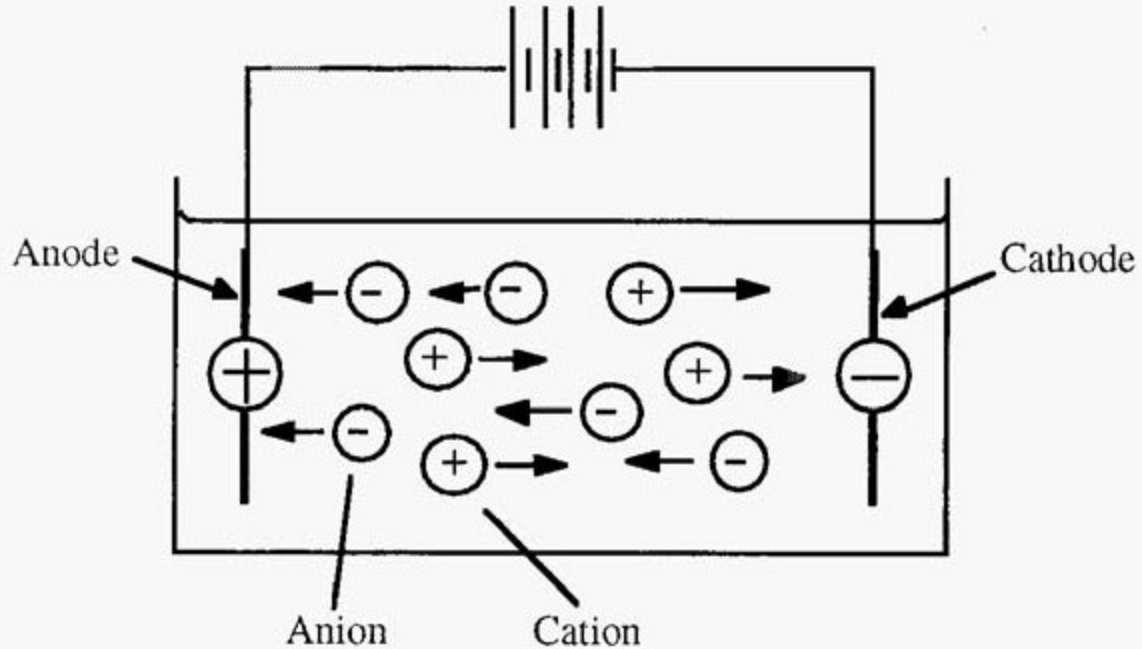


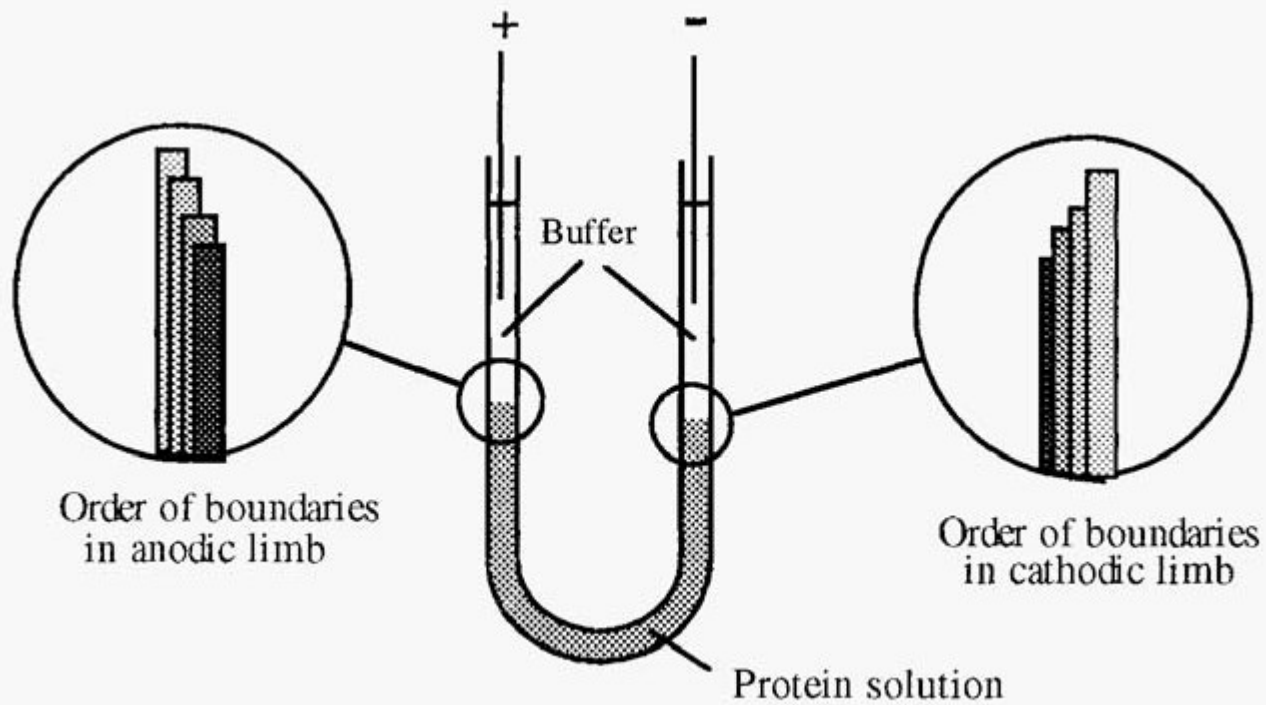
Tecniche elettroforetiche

- ❑ L'elettroforesi è una tecnica che consiste nella migrazione differenziata in un campo elettrico, di molecole elettricamente cariche. Molte molecole di interesse biologico, come gli amminoacidi, i peptidi, le proteine, i nucleotidi e gli acidi nucleici, possiedono gruppi ionizzabili e possono esistere in soluzione come specie elettricamente cariche, sia come cationi che come anioni.
- ❑ L'apparecchiatura per l'elettroforesi è composta, fondamentalmente, da due parti: un alimentatore ed una cella elettroforetica.
- ❑ L'alimentatore fornisce un flusso di corrente continua agli elettrodi applicati alla cella elettroforetica e pertanto i cationi migrano verso il catodo e gli anioni verso l'anodo ad una velocità che dipende dall'equilibrio che si instaura tra le forze di spinta del campo elettrico e le forze frenanti esistenti tra ioni e mezzo circostante.
- ❑ L'elettroforesi viene solitamente condotta su un supporto inerte ed omogeneo, il campione viene sciolto in un opportuno tampone, col quale, inoltre, viene saturato l'eventuale supporto in modo da consentire la conduzione della corrente.

Elettroforesi



Movimento di ioni in un campo elettrico



Elettroforesi di Tiselius

- La mobilità elettroforetica di una molecola carica, μ , sarà uguale a:
- $\mu = \mathbf{v}/\mathbf{E}$ dove \mathbf{v} è la velocità della particella (molecola) ed \mathbf{E} è il potenziale elettrico.
- D'altra parte \mathbf{v} è direttamente proporzionale ad \mathbf{E} ed alla carica della molecola, \mathbf{q} , ed è inversamente proporzionale alle dimensioni della molecola e alla viscosità del mezzo in cui si muove (forze frizionali \mathbf{f} o resistenza): $\mathbf{v} = \mathbf{E}\mathbf{q}/\mathbf{f}$

dove $\mathbf{f} = 6\pi r\eta$

- ***Fattori che influenzano la velocità di migrazione***

- CAMPIONE (carica, dimensioni, forma);
- TAMPONE (concentrazione, pH)
- SUPPORTO (adsorbimento, filtrazione molecolare).

❖ La **forza ionica** è un importantissimo parametro , infatti se si aumenta la forza ionica o la concentrazione del tampone aumenta anche la forza elettromotrice che scorre nella cella e di conseguenza dovrebbe anche aumentare la velocità di migrazione. Sorprendentemente il campione migra meno e questo avviene perchè, concentrando il tampone, si crea una competizione tra gli ioni del campione e quelli del tampone.

❖ La **temperatura** è un altro parametro molto importante in quanto aumentando la temperatura, diminuisce la viscosità e quindi la velocità di migrazione aumenta. L'aumento della temperatura fa però evaporare la soluzione tampone, con una conseguente concentrazione degli ioni e un rallentamento della velocità di migrazione. La temperatura si può innalzare per vari motivi, tra cui la resistenza che si sviluppa durante la migrazione e quindi ogni sistema elettroforetico deve essere dotato di un buon sistema di termostatazione che mantenga costante la temperatura.

- Durante la corsa elettroforetica si può assistere all'insorgenza di un fenomeno chiamato **elettro-endosmosi** che è la conseguenza di una differenza di carica tra le molecole di acqua del tampone e la superficie del mezzo di supporto. Ciò genera una forza motrice che provoca il movimento verso il catodo degli ioni ossonio del tampone che, per un effetto di trascinamento del solvente, portano con se anche molecole prive di carica. Questo fenomeno accelera il movimento dei cationi e ritarda quello degli anioni essendo contrario alla loro migrazione. L'effetto elettro-endosmotico può essere vantaggioso o dannoso. E'vantaggioso nell'elettroforesi capillare, mentre è dannoso nell'isoelettrofocusing.

Supporti per Elettroforesi

➤ **Non setaccianti:**

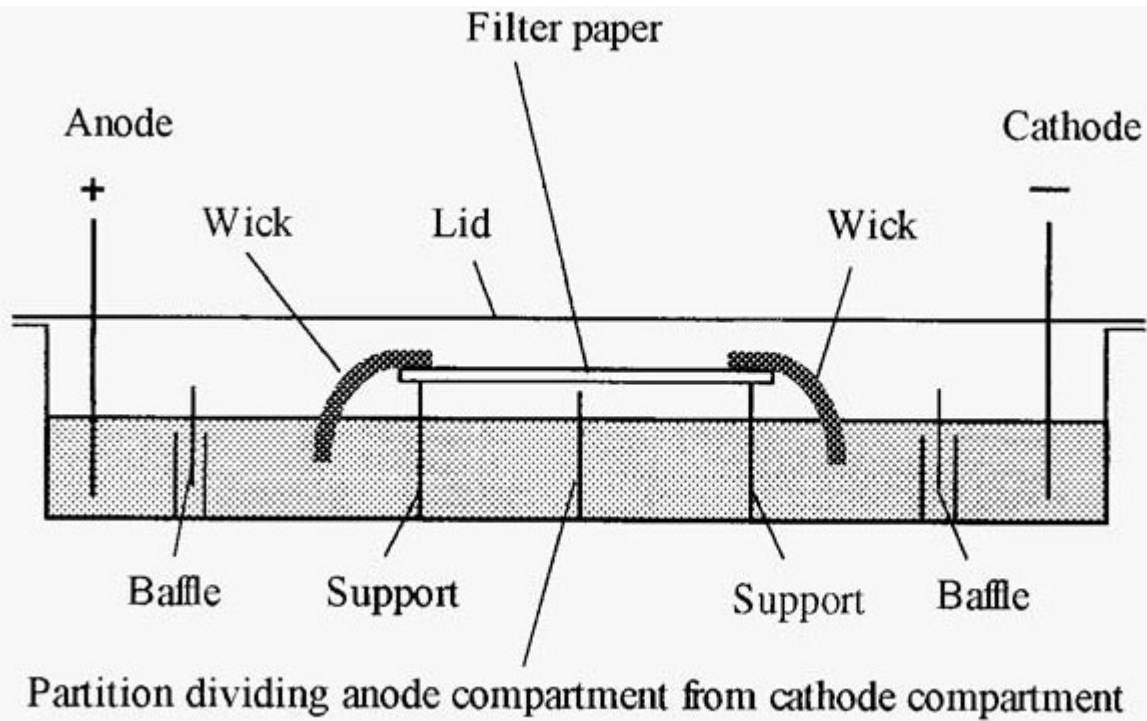
- (Carta), **acetato di cellulosa;**

➤ **Setaccianti:**

- Gel di **poliacrilammide;**
- Gel di **agarosio.**

Supporti per elettroforesi

- Carta: la carta cromatografica può essere usata per l'elettroforesi senza alcun trattamento preliminare. Con questo supporto si verifica sempre un certo adsorbimento che può essere attenuato con l'impiego di tamponi a pH più elevato del punto isoelettrico del campione; inoltre con la carta si verifica sempre un



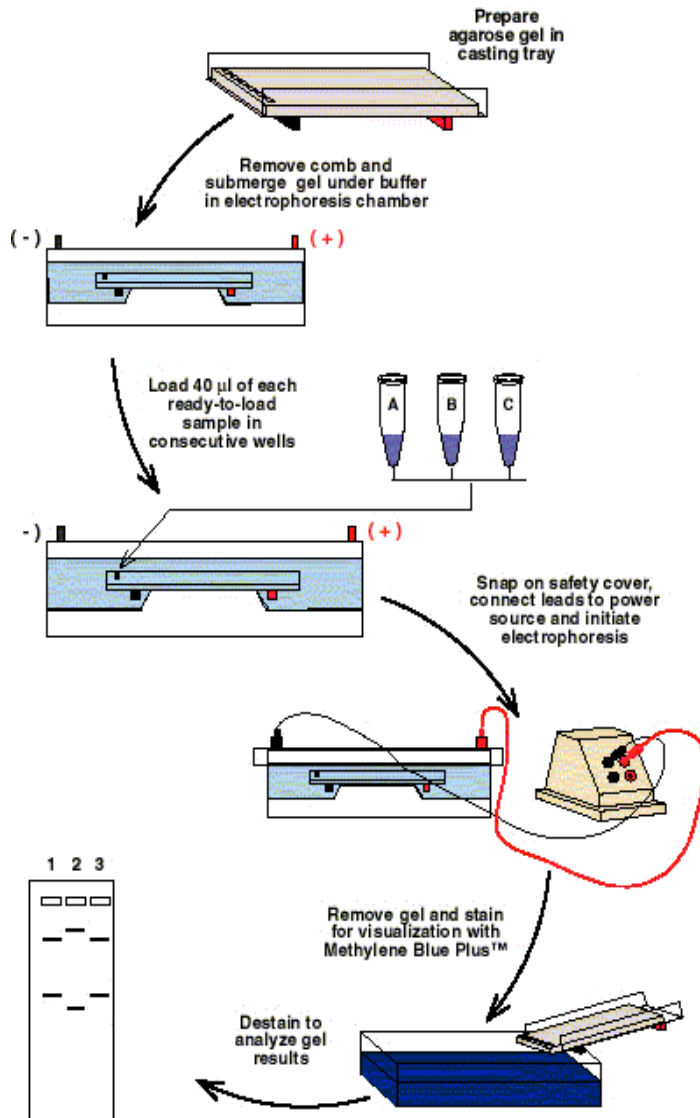
Apparato per elettroforesi su carta

Acetato di cellulosa: in commercio sono disponibili strisce sottili e uniformi di acetato di cellulosa ad elevata purezza e dotate di una struttura microporosa e omogenea con le quali si osserva un adsorbimento molto scarso, anche lavorando con macromolecole. L'acetato di cellulosa è pertanto un mezzo ottimale per la separazione di composti marcati e per l'applicazione di microtecniche, quali l'immunodiffusione e l'immunolettroforesi, mentre non è adatto a scopi preparativi. L'acetato di cellulosa è meno idrofilo della carta, assorbe meno tampone e dà, quindi, migliori risoluzioni in un tempo minore. Un'altra conseguenza del minor contenuto di tampone delle strisce di acetato di cellulosa è che, a un dato valore di amperaggio e di voltaggio costante, si verifica una maggiore produzione di calore. Occorre quindi prestare molta attenzione per prevenire l'essiccamento delle strisce, soprattutto ad alto voltaggio. La striscia di acetato di cellulosa, dopo la corsa e la colorazione, può essere resa trasparente mediante trattamento con solventi diafanizzanti che permettono un'analisi densitometrica delle bande. Questo supporto ha trovato applicazione in chimica clinica per la separazione delle proteine ematiche, delle glicoproteine, delle lipoproteine e delle emoglobine.

□ **Agar:** l'agar è una miscela poco costosa, non tossica di due polimeri derivati dal galattosio: l'**agarosio** e l'agarpectina. Sottoforma di gel all'1% l'agar presenta un elevato contenuto d'acqua, una buona struttura fibrosa, un diametro dei pori elevato ed una bassa resistenza frizionale. Di conseguenza, durante l'elettroforesi, il movimento degli ioni è molto rapido e favorisce la separazione delle macromolecole. L'agar presenta lo svantaggio di una elevatissima elettro-endosmosi.

□ In commercio sono presenti diversi tipi di agarosio che si differenziano per il grado di purezza. I gel d'agarosio si prestano molto bene alla colorazione dopo la corsa e la loro scarsa resistenza alla diffusione delle proteine anche di alto peso molecolare li rende un ottimo supporto per la identificazione delle proteine con metodi immunochimici. I gel di agarosio a bassa endosmosi sono usati anche per la separazione di acidi nucleici e frammenti di DNA; in questo caso la migrazione differenziale è funzione semplicemente del numero di basi di cui sono composti gli acidi nucleici da separare.

Preparazione e uso del gel d'agarosio



□ Si fa sciogliere l'agarosio con tampone TBE in un fornello a microonde. In seguito viene aggiunto **bromuro di etidio** (colorante fluorescente utilizzato per l'osservazione delle bande di DNA). Si versa il gel sul vassoio adatto alla vaschetta e lo si lascia solidificare.

□ Poi si inserisce nella cella elettroforetica con una quantità di tampone che lo ricopre, consentendo il caricamento dei campioni nei pozzetti.

□ Per agevolare l'osservazione dei campioni carichi e seguirne la migrazione elettroforetica si aggiunge al campione un colorante come il **blu di bromofenolo**. Fra i campioni ci puo' essere un marker di peso molecolare.

□ Si applica corrente al voltaggio e per il tempo desiderato.

□ Alla fine della corsa il gel è osservato al transilluminatore, che eccita il bromuro di etidio utilizzando luce ultravioletta.

Poliacrilammide: i gel di poliacrilammide vengono preparati al momento dell'uso facendo copolimerizzare acrilamide con metilen-bisacrilammide, un agente in grado di stabilire legami crociati, in presenza di un catalizzatore come il persolfato di ammonio allo 0,1-0,3% ed un iniziatore come il TEMED. E' una tipica polimerizzazione radicalica ed è necessario degassare le soluzioni prima che queste siano impiegate.

Schema del meccanismo di polimerizzazione dell'acrilammide

Il TEMED, N-tetrametilendiammina, catalizza la decomposizione dello ione persolfato con formazione del radicale libero:



$\text{SO}_4^{\cdot -}$ rappresenta la specie efficace ($\text{R}\cdot$) nella catalisi di polimerizzazione con persolfato. Il radicale libero $\text{R}\cdot$ trasferisce l'elettrone spaiato sulla catena nascente di acrilammide che funge da radicale libero essa stessa.

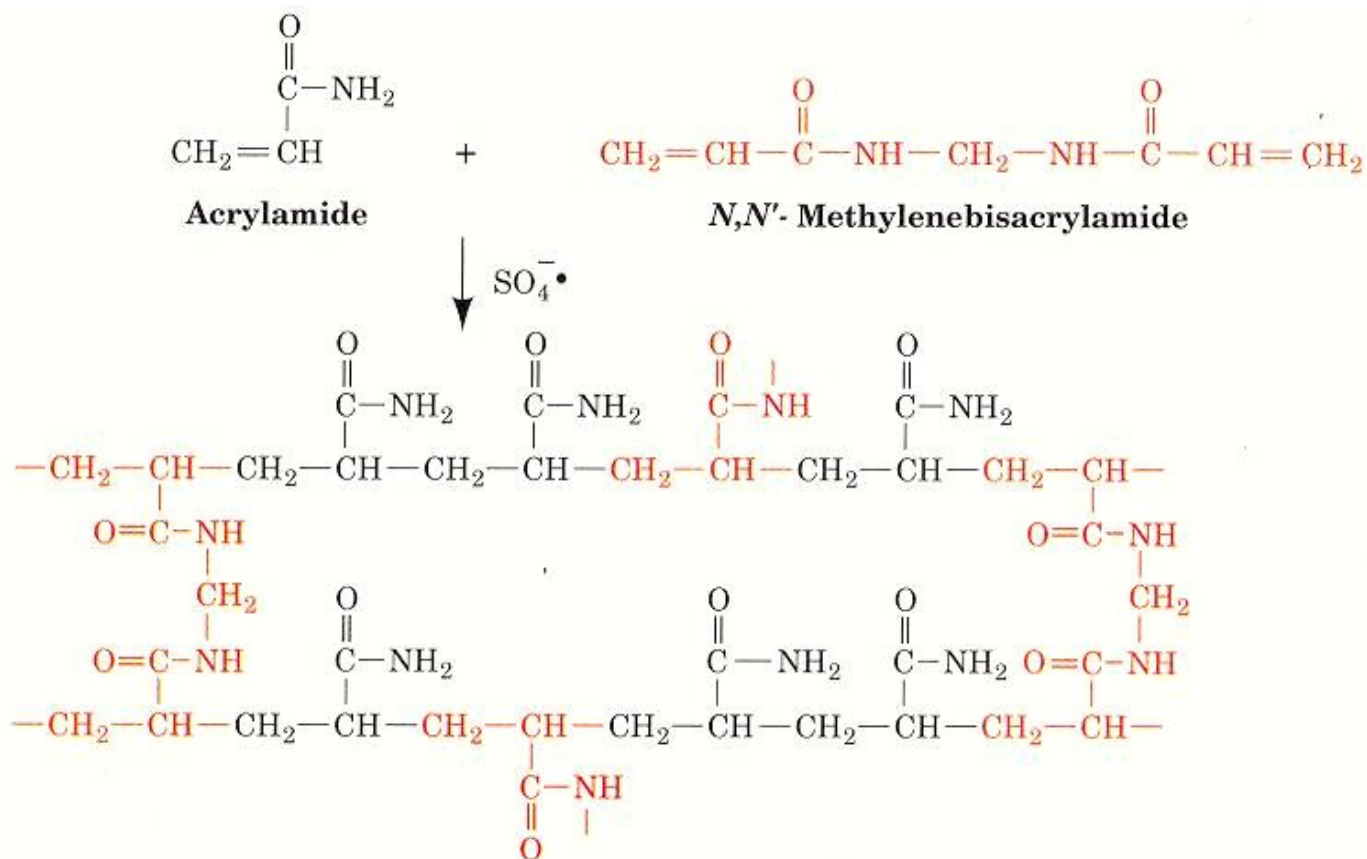


Figure 5-21

The polymerization of acrylamide and *N,N'*-methylenebisacrylamide to form a cross-linked polyacrylamide gel. The polymerization is induced by free radicals resulting from the chemical decomposition of **ammonium persulfate** ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-} \rightarrow 2\text{SO}_4^{\cdot -}$) or the photodecomposition of riboflavin in the presence of traces of O_2 . In either case, ***N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine**

(**TEMED**), a free radical stabilizer, is usually added to the gel mixture. The physical properties of the gel and its pore size are controlled by the proportion of polyacrylamide in the gel and its degree of cross-linking. The most commonly used polyacrylamide concentrations are in the range 3 to 15% with the amount of *N,N'*-methylenebisacrylamide usually fixed at 5% of the total acrylamide present.

- La porosità del gel dipende dalla concentrazione di acrilammide e di metilenbisacrilammide utilizzata nella preparazione del gel.
- La porosità dei gel di poliacrilammide è altamente riproducibile e la loro porosità può essere esattamente prevista e scelta per separare molecole aventi carica simile, ma diversa grandezza e forma. Si usano quindi, in particolare, per la risoluzione di miscele di proteine. Altre caratteristiche di questi gel sono la

➤ La **poliacrilamide** è il polimero più utilizzato per la elettroforesi di proteine con PM tra 5.000 e 200.000 Daltons.

➤ I suoi vantaggi sono:

-**notevole resistenza meccanica** sia quando sono idratati che quando vengono seccati;

-**completa trasparenza** sia nel visibile che nell'UV, la trasparenza resta anche quando sono seccati;

-**aderisce bene al vetro** evitando che si creino vie preferenziali.



Tuttavia è bene ricordare che il monomero di acrilammide è una potente neurotossina ed è anche mutagena.

Gel di Poliacrilammide

➤ I gel di poliacrilammide vengono definiti in base alla percentuale totale di acrilammide (acrilammide + bis-acrilammide) presente e le dimensioni dei pori del gel sono determinate dalle concentrazioni di acrilammide e bisacrilammide impiegate.

- 37,5:1 per le proteine
- 29:1 per gli acidi nucleici e le proteine
- 19:1 per il sequenziamento degli acidi nucleici.

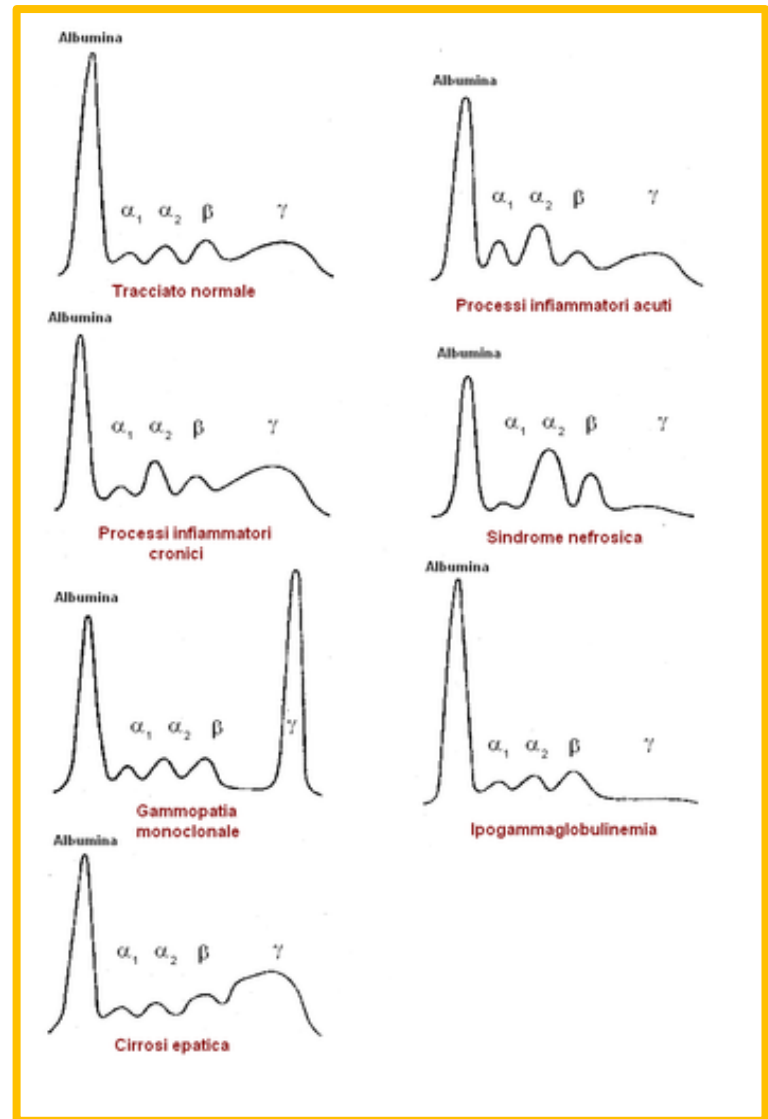
Tecniche elettroforetiche

Le tecniche elettroforetiche sono di diversi tipi a seconda del supporto utilizzato, della cella elettroforetica, di composti particolari aggiunti al supporto, degli agenti usati nel rilevamento del materiale sottoposto ad elettroforesi, ecc.

Elettroforesi zonale: nell'elettroforesi zonale il supporto è costituito generalmente da strisce di acetato di cellulosa o da gel d'agarosio. E' una tecnica molto impiegata nella separazione delle proteine del siero.

Il siero costituisce la parte liquida del sangue, privato delle cellule e del fibrinogeno. Le proteine del siero sono molte e danno un tracciato elettroforetico tipico in quanto si dispongono in zone a loro caratteristiche. La modalità dell'elettroforesi zonale prevede il mantenimento della proteina in uno stato nativo .

Elettroforesi delle sieroproteine



□ Il **gel d'agarosio** rappresenta un ottimo metodo per la separazione delle proteine plasmatiche perché offre una buonissima risoluzione della regione γ e pertanto è particolarmente indicato per lo studio delle gammopatie monoclonali. Per la preparazione di questo gel, si impiegano agarosio a media endosmosi, tampone barbital e fogli di Gel Bond. Si prepara una soluzione allo 0,8% di agarosio in tampone barbital. La soluzione viene fatta bollire sotto agitazione per circa 1 min e questo permette una completa solubilizzazione dell'agar. La soluzione viene fatta raffreddare a 65°C e versata in uno stampo sul cui fondo viene posto un foglio di Gel Bond. Lo spessore del gel deve essere di 1 mm. Dopo almeno 1 h lo stampo può essere smontato e il gel viene posto in una camera umida a temperatura ambiente. Il gel si trova nelle condizioni migliori di utilizzo dopo 12 h. L'applicazione del campione avviene attraverso l'impiego di apposite mascherine che permettono la deposizione in fessure di 5-10 mm di 1-10 μ l di campione. I campioni, prima di essere inseriti, vengono diluiti 1:2 con un soluzione di tampone barbital contenente lo 0,1% di blu di bromofenolo, che consente di seguire la mobilità dell'albumina.

□ L'elettroforesi viene eseguita applicando un voltaggio di 20 V/cm e viene interrotta quando il blu di bromofenolo ha raggiunto il margine anodico del gel, il che corrisponde ad una migrazione dell'albumina di circa 7 cm.

□ Il gel si fissa ponendolo per 30 min. in una soluzione all'80% di acido picrico e al 20% di acido acetico. Dopo essere stato pressato per 20 min con carta Whatman n° 1, il gel viene asciugato con un ventilatore ad aria calda per 10 min e può essere colorato con il colorante desiderato. Il colorante più utilizzato nell'analisi delle proteine del siero è il Coomassie Blue. Il gel viene lasciato per 10 min nel colorante e poi decolorato; il decolorante è costituito per il 45% da metanolo, per il 45% da acqua e per il 10% da acido acetico. Dopo la decolorazione il gel viene asciugato con un ventilatore ad aria calda e può essere ora conservato.

Elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni native

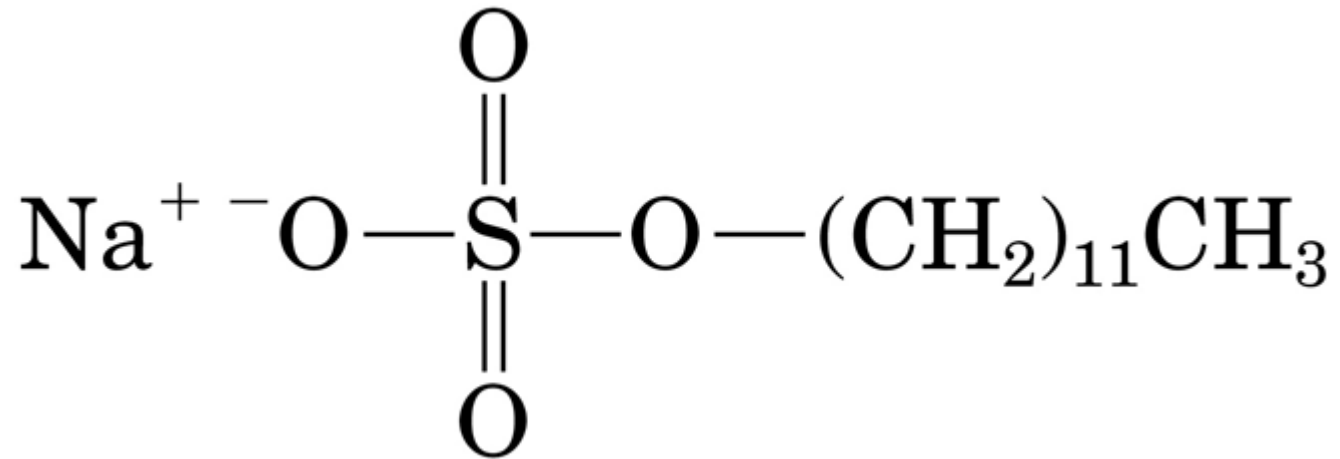
- Le proteine vengono separate sulla base della loro carica netta e in base alle dimensioni;
- La sua risoluzione è relativamente bassa;
- Discrimina tra proteine con PM uguale, ma con carica differente;
- Permette la rapida purificazione e il recupero di proteine in condizioni native;
- Può essere usata per una colorazione catalitica;
- Permette lo studio di proteine polimeriche

Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS:

è uno dei metodi più largamente usati per separare le proteine e determinare il loro peso molecolare apparente.

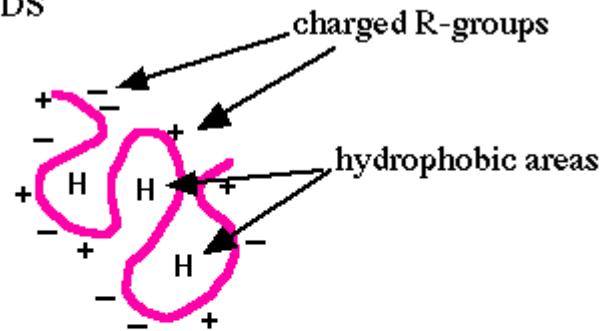
Elettroforesi con tamponi discontinui: in questa tecnica si impiegano due tipi di gel o tamponi, che vanno posti in una camera verticale, con l'anodo posto inferiormente, e stratificati l'uno sull'altro. I gel, definiti, rispettivamente, di impaccamento e di separazione, sono costituiti da poliacrilammide. In soluzione con la proteina si impiega sodio dodecilsolfato (SDS). L'SDS è un detergente anionico che si lega saldamente alle proteine (1 molecola di SDS ogni 2 residui amminoacidici) e ne provoca la denaturazione, di conseguenza l'elettroforesi avviene in condizioni non native; in presenza di un eccesso di SDS, un grammo di proteina si lega a circa 1,4 g di SDS, fornendo alla proteina una carica negativa costante per unità di massa. L'elettroforesi a tamponi discontinui viene largamente impiegata per determinare il peso molecolare delle proteine e, ovviamente, di fianco al campione, si fa correre uno standard di peso molecolare noto.

Sodio dodecilsolfato (SDS)



Effetto dell' SDS sulle proteine

BEFORE SDS



AFTER SDS

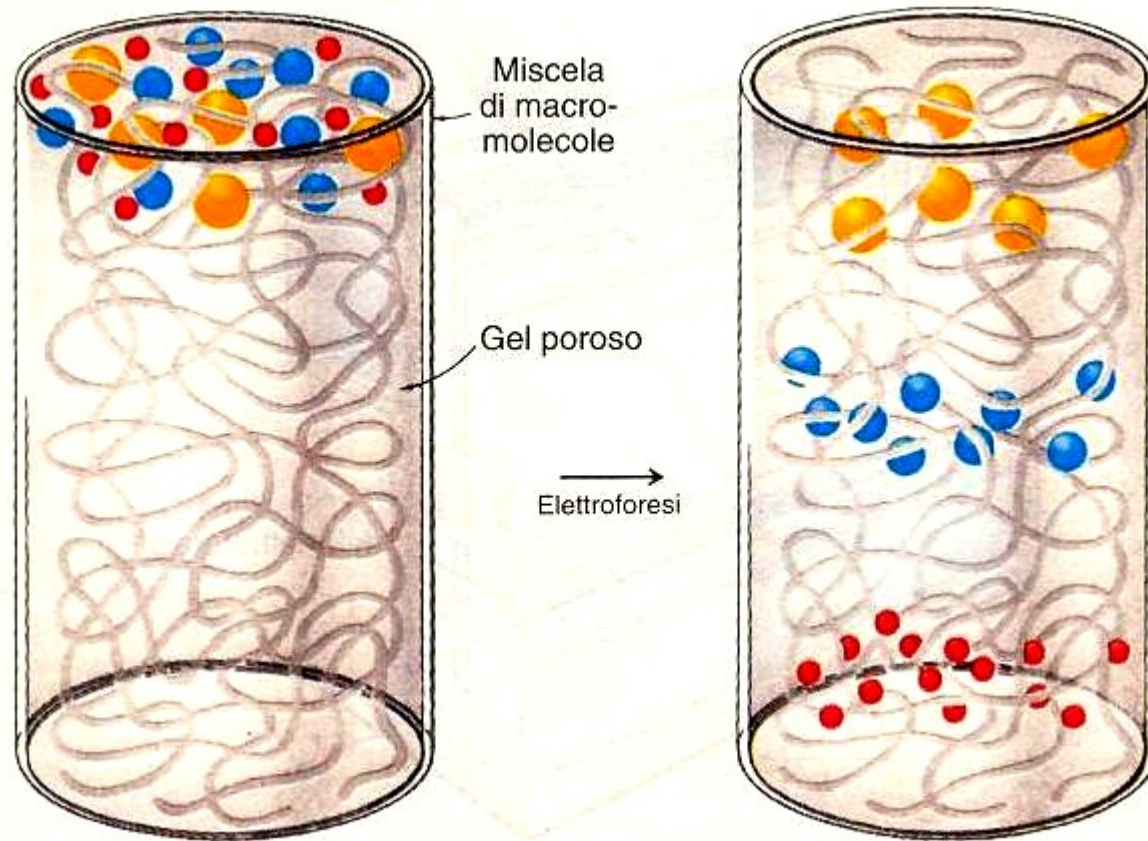


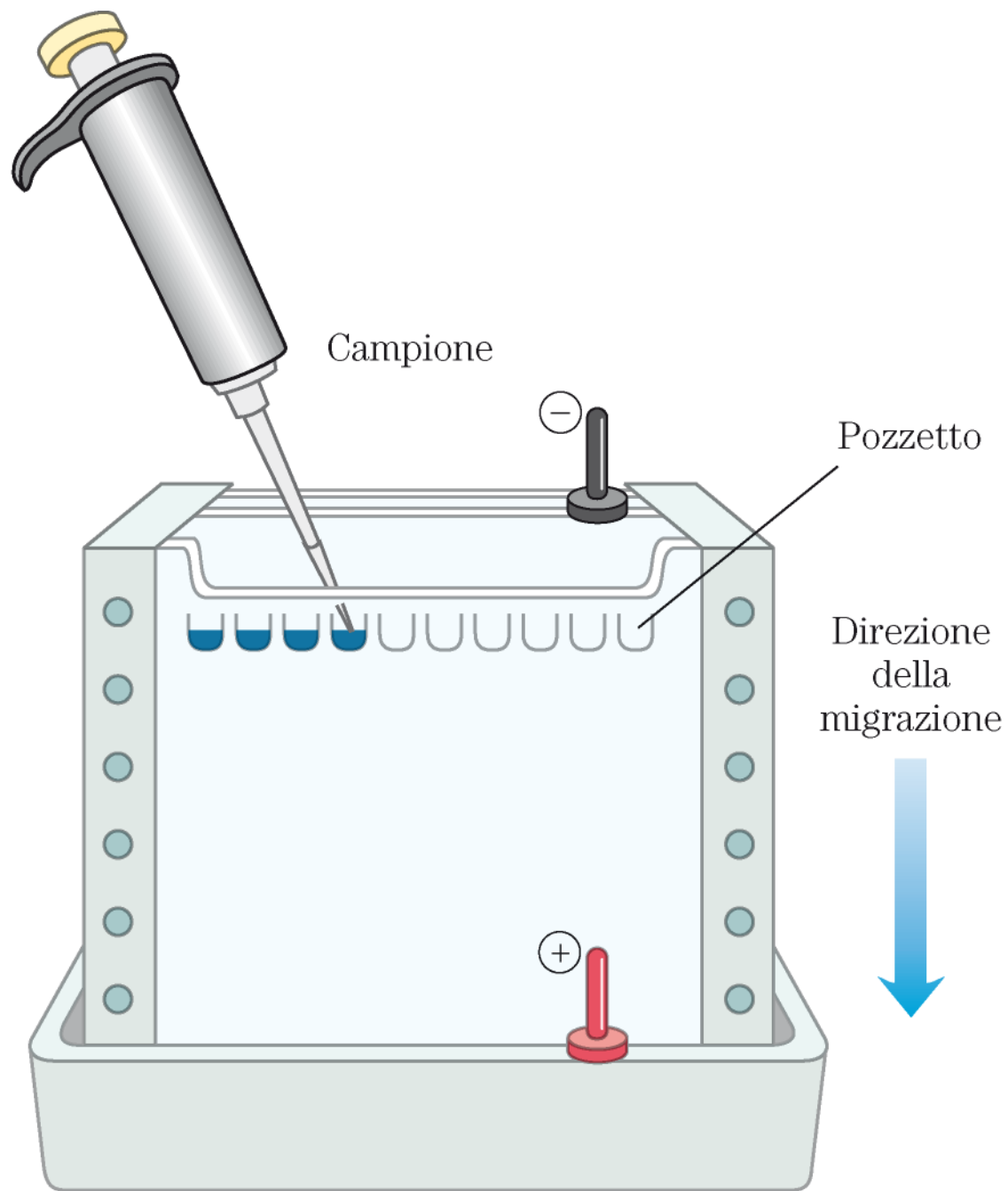
➤ ***L'interazione SDS/proteine:***

- provoca la destabilizzazione della struttura terziaria della proteina denaturandola;
- conferisce una carica netta negativa rendendo trascurabile la carica della proteina nativa;
- il risultato è che la proteina assume una forma linearizzata ed una carica negativa approssimativamente proporzionale alla sua massa, in modo che il rapporto carica/massa sarà essenzialmente identico per proteine diverse.

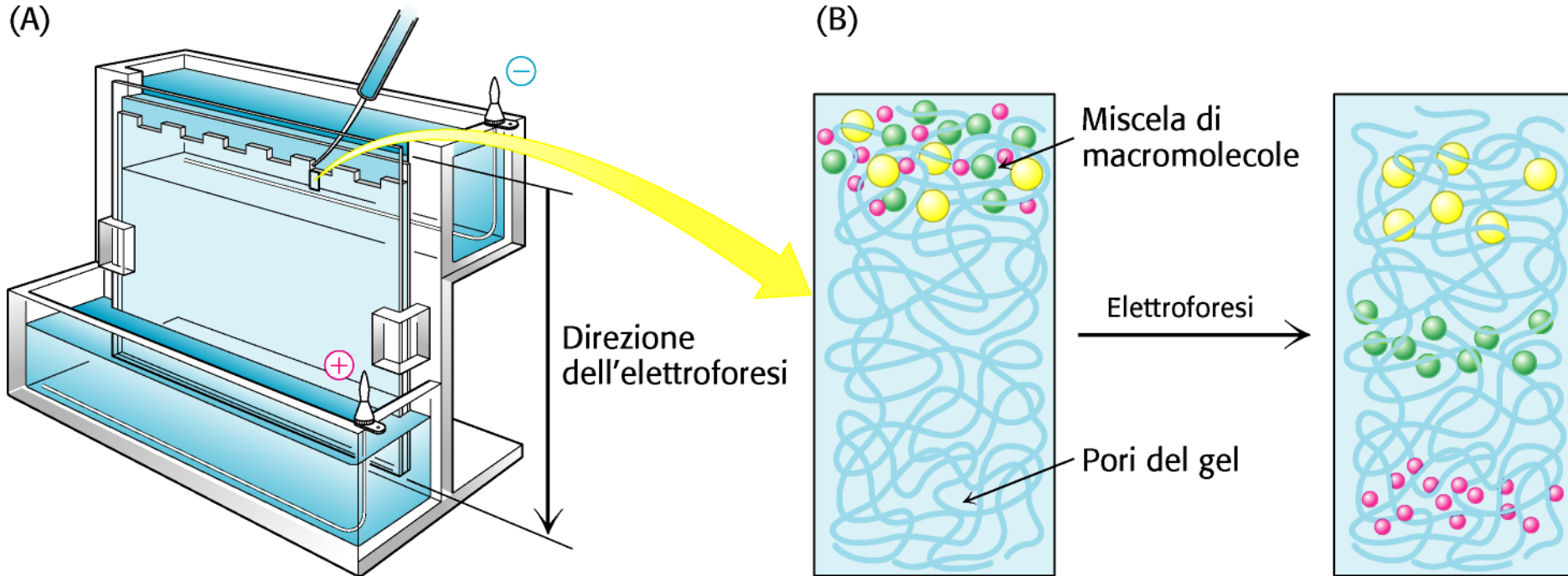
- La separazione dei complessi SDS-proteine (quando sottoposti ad un campo elettrico) avviene quindi in base agli effetti di setaccio molecolare dovuti alle dimensioni dei pori del gel.
- Ciò fa sì che le proteine più piccole si muovano rapidamente attraverso il gel, mentre quelle di dimensioni maggiori sono più rallentate, migrando di meno.

Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS





Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS



Proteine con
peso molecolare
uguale si
muoveranno
formando delle
bande omogenee

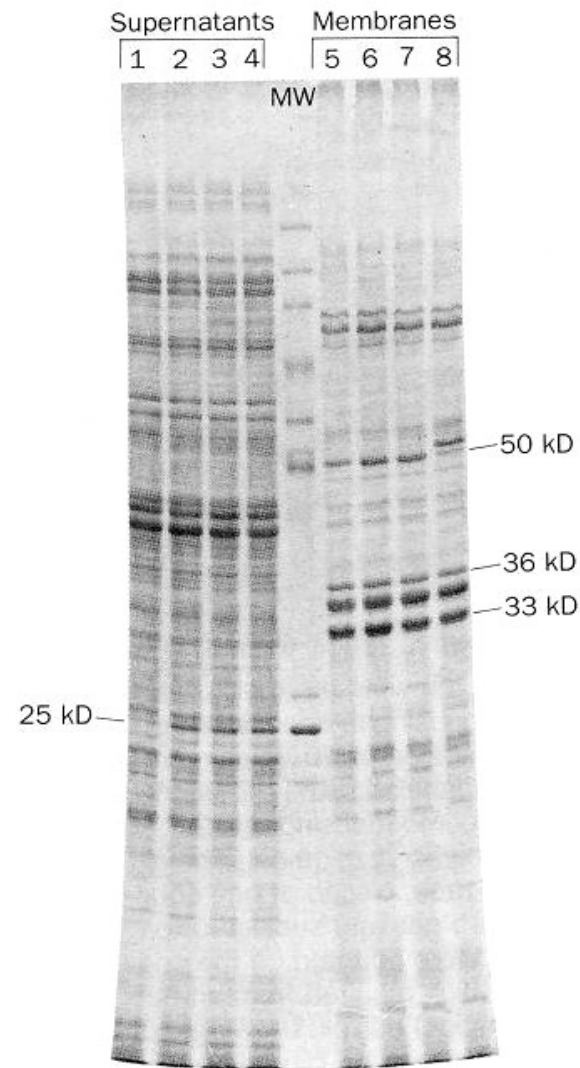
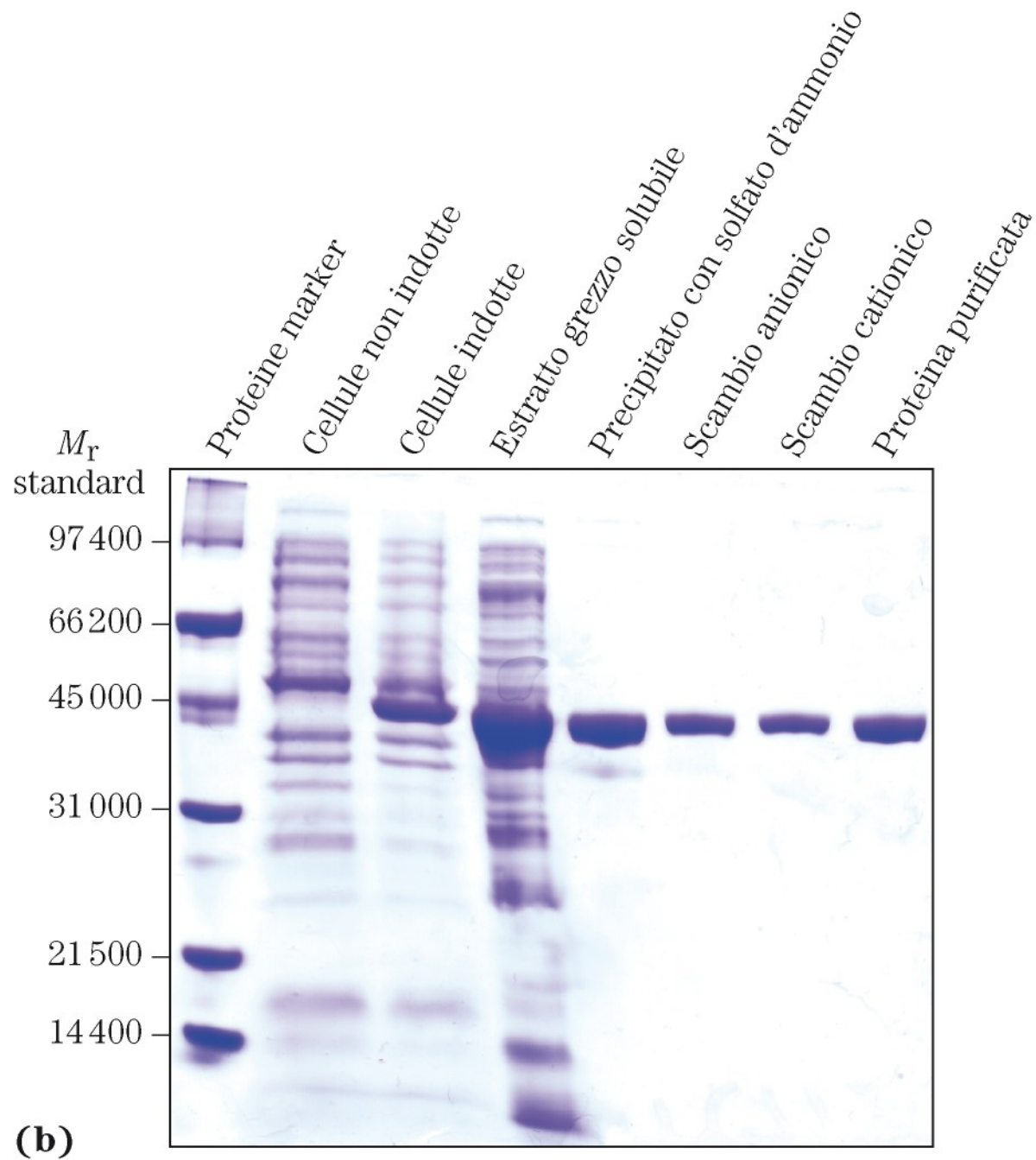


Figure 5-26

The SDS-polyacrylamide disc electrophoresis pattern of the supernatant (*left*) and membrane fractions (*right*) of various strains of the bacterium *Salmonella typhimurium*. Samples of 200- μ g of protein each were run in parallel lanes on a 35-cm long \times 0.8-mm thick slab gel containing 10% polyacrylamide. The sample marked MW contains molecular weight standards. [Courtesy of Giovanna F. Ames, University of California, Berkeley.]



(b)

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

- Nella **SDS-PAGE** si utilizza un gel discontinuo composto da:
 - **Stacking gel** nel quale vengono formati i pozzetti in cui vengono depositati i campioni da analizzare;
 - **Running gel** (gel di risoluzione) che è la matrice in grado di separare le singole macromolecole.

SDS-PAGE

- I gel a percentuale bassa (3-5%) possiedono pori di grosse dimensioni e sono utilizzati nei gel di impaccamento (**stacking gel**) in cui avviene il caricamento e la concentrazione del campione.
- Il gel di separazione vero e proprio (**running gel**) ha una percentuale compresa fra il 7,5 e il 20%, in cui le dimensioni

SDS-PAGE

- Il running gel viene fatto polimerizzare fra due lastre di vetro che sono mantenute parallele e separate da sottili spaziatori di plastica. Normalmente il gel ha uno spessore di 0,8-1,5 mm e le sue dimensioni dipendono dalla risoluzione che si vuole ottenere.
- Sulla superficie del running gel viene depositata una piccola quantità di una soluzione acqua/butanolo per ottenere una superficie piatta.
- Dopo la rimozione dell'acqua/butanolo, al di sopra del running gel viene colato quello che sarà lo stacking gel.
- Prima che il gel polimerizzi si sistema sul lato superiore del gel un "pettine" di plastica che a gelificazione ultimata viene tolto lasciando nel gel i pozzetti di alloggio per il caricamento dei campioni.

SDS-PAGE

- Quando il gel è pronto, viene assemblato nell'apparato per l'elettroforesi, rappresentato essenzialmente dalla cella elettroforetica costituita da due vasche a contatto con le due estremità del gel.
- Tali vasche, contenenti ciascuna un elettrodo, vengono riempite di una soluzione tampone opportuna (Tampone di corsa).
- **Preparazione dei campioni:** i campioni proteici sono di solito solubilizzati in un tampone Tris/HCl a pH 6,8 contenente SDS, un riducente quale ditiotreitolo o β -mercaptoetanololo, per ridurre i ponti disolfuro, saccarosio o glicerolo per aumentare la densità e blu di bromofenolo come indicatore della corsa.
- Deposito dei campioni nei pozzetti: vengono depositati piccoli volumi dei campioni (nell'ordine dei μ l).
- Una volta caricati i campioni, tra i due elettrodi viene applicata una differenza di

SDS-PAGE

- Togliendo il campo elettrico prima che le molecole da analizzare abbiano raggiunto il fondo del gel avremo ottenuto una separazione dei singoli componenti in base alla loro mobilità elettroforetica.
- A questo punto essi vengono visualizzati mediante opportuni metodi di colorazione o di rivelazione.

- Lo scopo del **SDS-PAGE** è quello di permettere una separazione molto efficiente delle proteine sulla base del solo peso molecolare.
 - Per questo è necessario comprimere le proteine contenute nel pozzetto di caricamento in una banda molto sottile in modo che tutte le proteine siano allineate sulla linea di partenza rappresentata dal bordo superiore del gel di separazione (running gel).
 - Questo si ottiene utilizzando per:
 - lo stacking gel:** poliacrilammide al 4% (3-5%) in tampone Tris/HCl 0,125 M **pH 6,8** contenente SDS.
 - il running gel:** poliacrilammide al 7,5-20% in tampone Tris/HCl 0,375 M **pH 8,8** contenente SDS.
- **Tampone di corsa:** Tris/glicina **pH 8,3** + SDS.

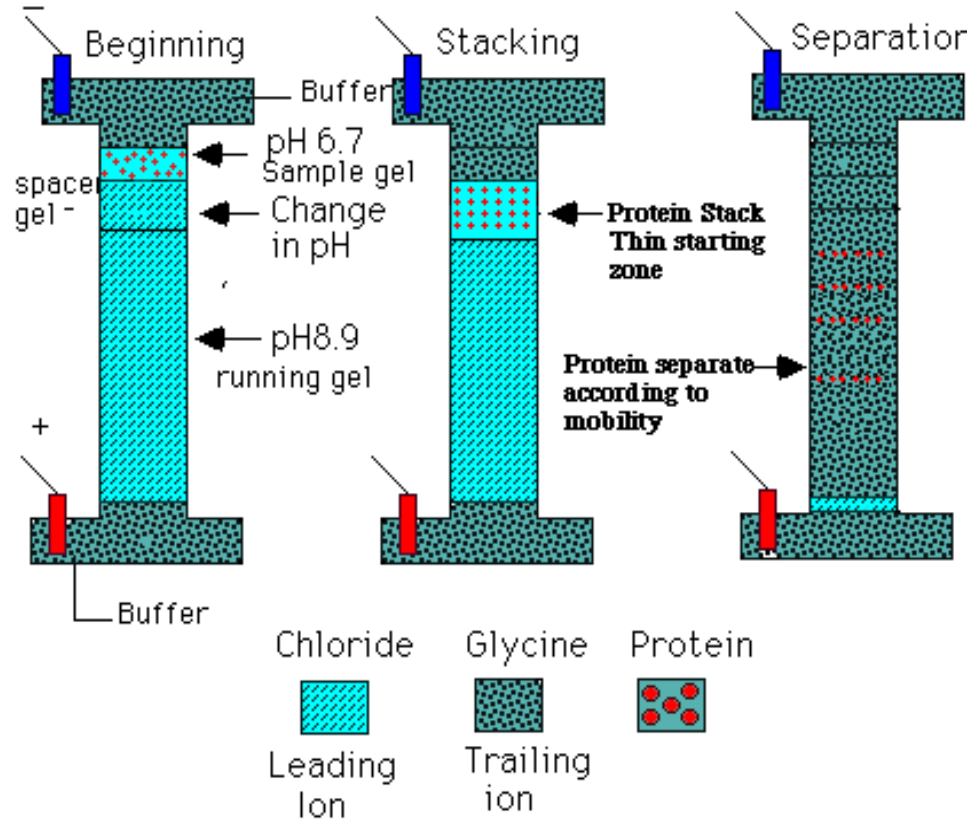
SDS-PAGE

- Il pH dello **stacking gel** è inferiore di circa 2 unità rispetto a quello del tampone di corsa.
- In quest'ultimo il pH è 8,3 e la glicina (acido debole) è quindi presente per il 95% sotto forma di ione dipolare (zwitterione $\text{CH}_2(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$) e solo per il 5% sotto forma di anione glicinato ($\text{CH}_2(\text{NH}_2)\text{COO}^-$).
- Quando viene applicata la corrente :
- gli ioni di glicina nel tampone di corsa si muovono allontanandosi dal catodo (elettrodo -) per cui si dirigono verso il campione e lo stacking gel , ma con una mobilità inferiore rispetto allo ione Cl^- ;
- In quel punto il pH è basso (6.8) per cui gli ioni glicina perdono molta della loro carica e rallentano il loro movimento;
- In questo modo la glicina non potrà portare efficacemente la corrente e saranno le stesse proteine a portarla, migrando verso l'anodo.

SDS-PAGE

- Allo stesso tempo nello stacking gel e nel campione:
- gli ioni cloruro altamente mobili si muovono per allontanarsi dal catodo;
- questo crea una zona ristretta nella parte superiore dello stacking gel in cui la conduttanza è molto bassa (cioè c'è un'alta resistenza);
- come risultato si avrà una concentrazione degli anioni proteici a ridosso degli ioni cloruro in ordine di mobilità ionica decrescente;
- **Cl⁻ > proteine > glicinato;**
- le proteine penetrano nel gel di corsa sotto forma di bande sottilissime al seguito dello ione cloruro. Si concentrano in un volume molto piccolo e nel gel si osserva proprio la formazione di una strato molto sottile al limite tra gel di

SDS-PAGE



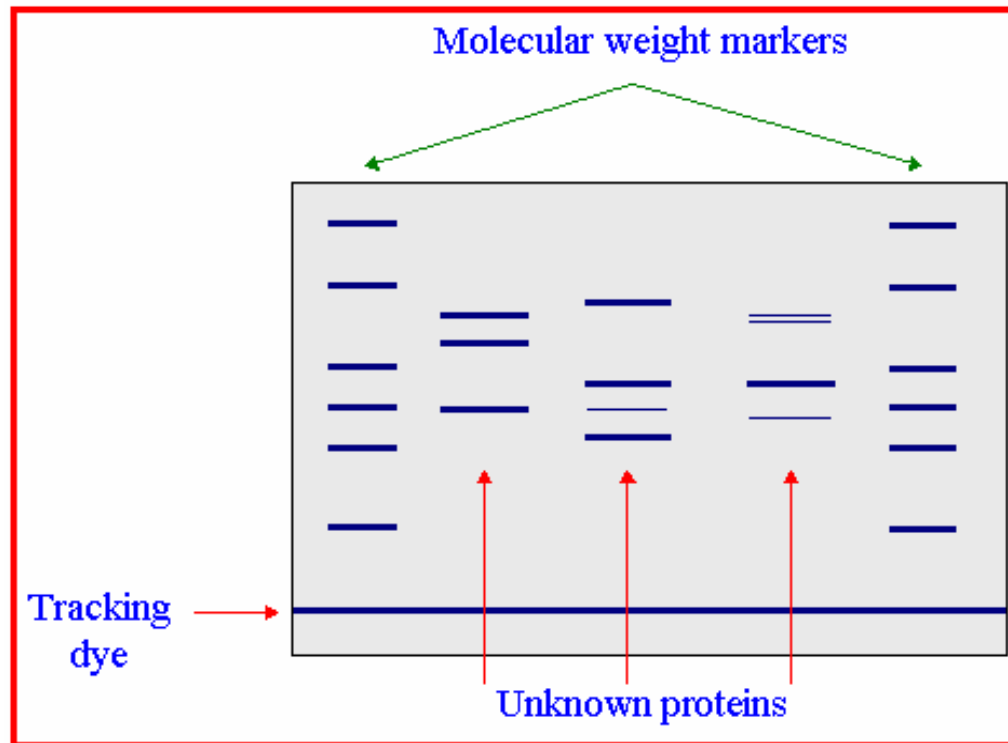
Elettroforesi: SDS-PAGE

- Quando il fronte del colorante, blu di bromofenolo (presente nel campione) raggiunge la prossimità del fondo del gel, è il momento di interrompere la corsa.
- Tuttavia se è nota la posizione della banda a più basso peso molecolare (ad esempio caricando un marker di proteine a fianco ai campioni) è possibile lasciare uscire il colorante dal gel.

Elettroforesi: SDS-PAGE

- Per monitorare la progressione della corsa elettroforetica uno o più pozzetti vengono generalmente dedicati ai markers di peso molecolare;
- Questi sono miscele di proteine precolorate e di peso molecolare noto capaci quindi di indicare la migrazione di proteine di peso molecolare simile;

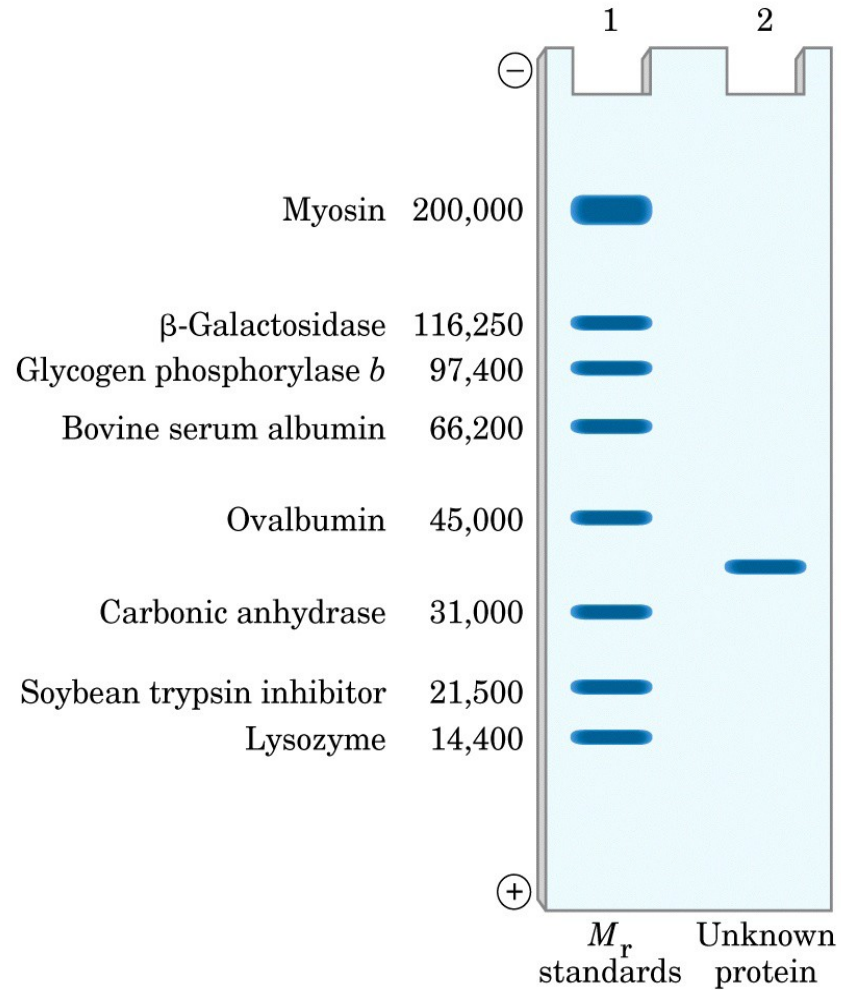
Elettroforesi: SDS-PAGE



Elettroforesi: SDS-PAGE

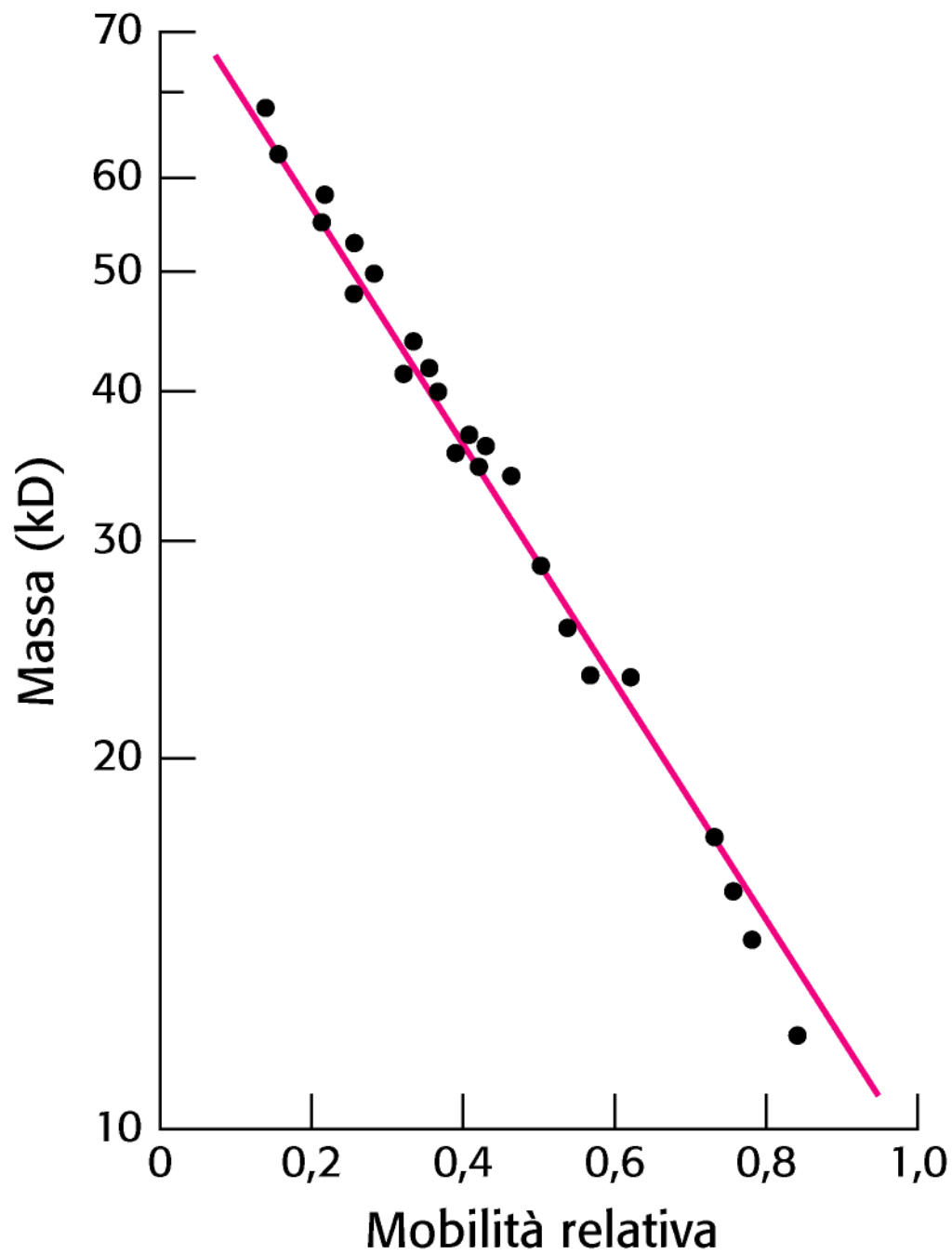
- La massa molecolare relativa (M_r) di una proteina può essere determinata confrontando la sua mobilità con quella di una serie di proteine "standard", delle quali si conosce la massa molecolare relativa, separate sullo stesso gel.

Elettroforesi: SDS-PAGE



(a)

**Elettroforesi
SDS-PAGE**



Elettroforesi: SDS-PAGE

- E' da tenere presente che tramite questa metodica si determina il peso molecolare apparente di una proteina, in quanto alcune proteine, per loro natura (composizione amminoacidica, modificazioni, ecc.) migrano in modo anomalo, non rispecchiando il loro effettivo peso molecolare.

Elettroforesi: SDS-PAGE

- Standard proteici. In commercio sono disponibili diversi standard proteici che coprono un'ampia gamma di pesi molecolari (PM) diversi.
- Ve ne sono per tutte le applicazioni: per determinare con la massima approssimazione il peso molecolare, per verificare l'efficienza di trasferimento su membrana

Elettroforesi: SDS-PAGE

- **I marker possono essere:**
- *non colorati;*
- *oppure pre-colorati.*
- I primi permettono una determinazione più accurata del PM, mentre i secondi sono più adatti per la conferma dell'andamento dell'elettroforesi e del trasferimento su membrana.
- La maggior parte dei marker precolorati in commercio produce 8-12 bande che possono essere tutte dello stesso colore oppure di colori diversi. L'uso di

Elettroforesi: SDS-PAGE

➤ Rivelazione delle proteine su gel

- Una volta completata l'elettroforesi, il gel deve essere analizzato per avere informazioni sulla posizione e sulla quantità di ogni proteina.
- Poiché le proteine non sono direttamente visibili, il gel deve essere processato.
- La procedura più comune di rivelazione è la colorazione.
- In genere, dopo che le proteine sono state colorate, il gel viene fotografato od essiccato.

Elettroforesi: SDS-PAGE

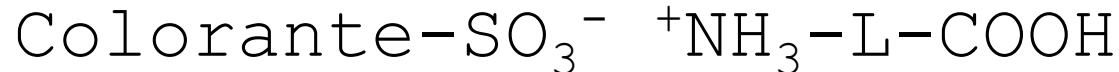
- Colorazione delle proteine totali su gel:
- I kit disponibili sul mercato per la colorazione e la quantificazione delle proteine totali su SDS-PAGE includono sistemi rapidi e più o meno sensibili a base di blu Coomassie, kit di colorazione argentea (silver staining), sistemi per colorazione reversibile con zinco o rame e coloranti fluorescenti.

Elettroforesi: SDS-PAGE

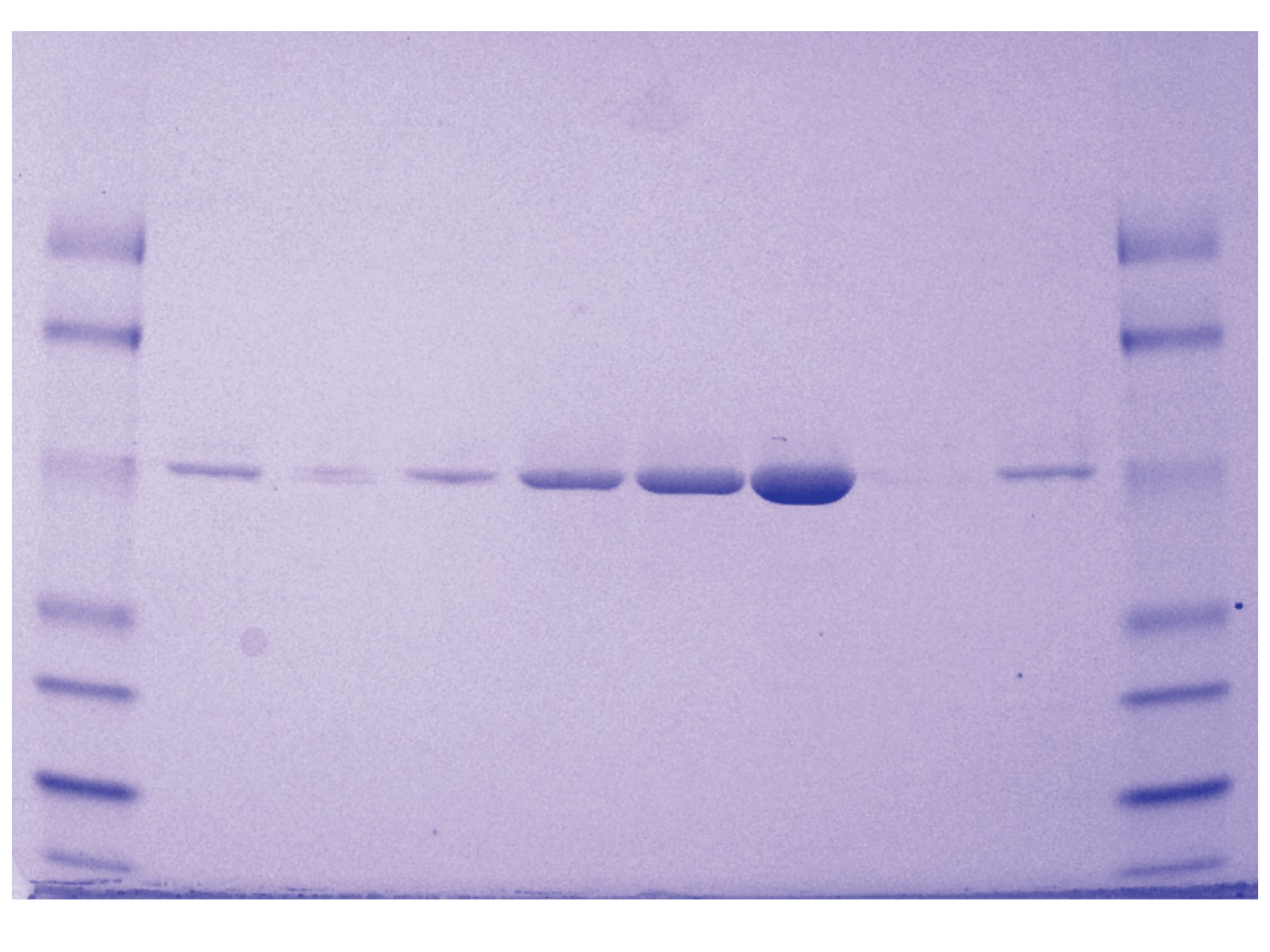
- Ogni sistema di colorazione ha i suoi pregi e difetti:
- la colorazione con blu Coomassie, ad esempio, è lineare e quindi in grado di fornire una quantificazione più accurata di quanto non faccia il silver staining (non lineare), ma è molto meno sensibile (fino a 100 volte);

Elettroforesi: SDS-PAGE

- **Blu Coomassie**: il blu Coomassie si lega alle proteine attraverso legami ionici tra i gruppi sulfonici del colorante e i gruppi amminici delle proteine oltre che attraverso forze di Vander-Waals;



- **Si aggiunge il colorante** in acido acetico e metanolo, si lascia a reagire finchè tutto il gel è diventato blu;
- poi **si decolora con acido acetico e metanolo**.



Elettroforesi: SDS-PAGE

➤ Argento:

- Si fissano le proteine con **il metanolo**, si aggiunge **nitrato di argento** che si lega alle proteine.
- Si **aggiunge quindi formaldeide in bicarbonato per ridurre l'Ag⁺ ad argento metallico**. La reazione viene fermata con **acido acetico**.
- Il procedimento è analogo a quello dello sviluppo fotografico.

Elettroforesi: SDS-PAGE

➤ ***Conservazione dei risultati:***

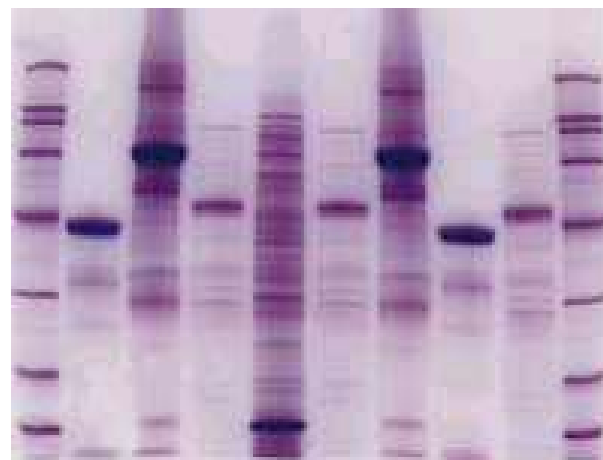
- fotografia;
- scansione ottica.

➤ ***Il gel può essere:***

- conservato in glicerolo tra due foglietti di plastica sigillati;
- oppure può essere essiccato.

Elettroforesi: SDS-PAGE

Blu Coomassie



Argento



➤ ***Elettroforesi in gradiente***

- Si possono utilizzare gel di poliacrilammide in gradiente di concentrazione. I gradienti vengono fatti con un gradientatore e le concentrazioni dei gel vanno dal 5% al 25% con un decremento delle dimensioni dei pori, che comporta una migliore risoluzione delle proteine a basso peso molecolare.
- La migrazione delle proteine verrà progressivamente frenata dalla progressiva riduzione dei pori fino ad essere totalmente interrotta nei punti in cui la dimensione dei pori diventa più piccola del diametro delle proteine e si formeranno così bande molto strette e altamente risolte.
- Nella formazione dei gradienti assumono un ruolo importantissimo le condizioni di polimerizzazione.

➤ **Isoelettofocusing:**

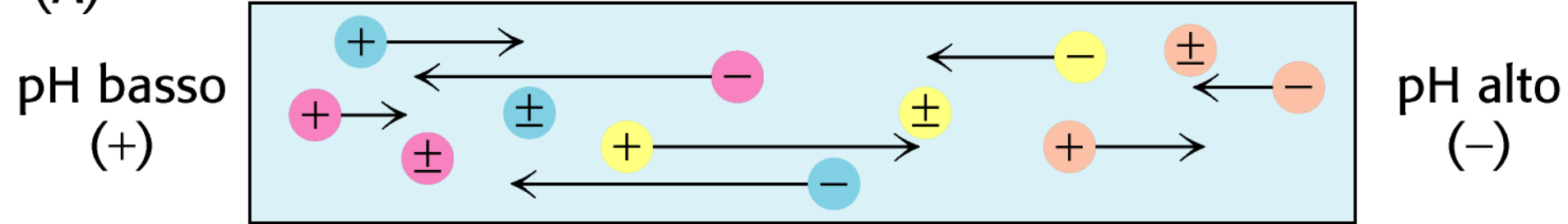
- Questa tecnica è dotata di un elevatissimo potere risolutivo ed è impiegata per la separazione di composti anfoteri, ad esempio amminoacidi, peptidi e proteine, ed in particolare isoenzimi.
- Aminoacidi e peptidi anfoteri sono separati in un campo elettrico lungo il quale vi è un gradiente sia di potenziale sia di pH. La regione anodica ha un pH più basso di quella catodica e il gradiente di pH è mantenuto stabile attraverso l'impiego di miscele di anfolti a basso peso molecolare aventi punti isoelettrici che coprono l'intervallo di pH desiderato. **Questi anfolti o anfoline devono avere un ottimo potere tamponante, un'eccellente conduttività, una buona solubilità nel gel di elettroforesi e nel solvente impiegato, nessuna influenza sul sistema di rilevamento o sul campione e devono inoltre essere separabili dal campione.**
- Le anfoline sono costituite da acidi alifatici sintetici poliammino-policarbossilici e sono in vendita in miscele che coprono od un ampio intervallo di pH (3-10) od un ristretto intervallo di pH (4-5) a seconda delle necessità. Gli estremi di pH sono scelti in modo da comprendere il punto isoelettrico di tutti i componenti da separare.

➤ **Isoelektrofocusing:**

- I composti che, all'inizio della corsa, si trovano in una zona di pH inferiore al loro punto isoelettrico sono carichi positivamente e migrano verso il catodo. Tuttavia, man mano che si avvicinano al catodo, il pH aumenta, finchè non corrisponde esattamente al loro punto isoelettrico. In queste condizioni i composti hanno carica netta nulla e si arrestano.
- Analogamente, i composti che all'inizio si trovano in zone di pH superiori al loro punto isoelettrico sono carichi negativamente e migrano verso l'anodo finchè non raggiungono una zona a pH corrispondente al loro punto isoelettrico nella quale si

Isolettrofocusing

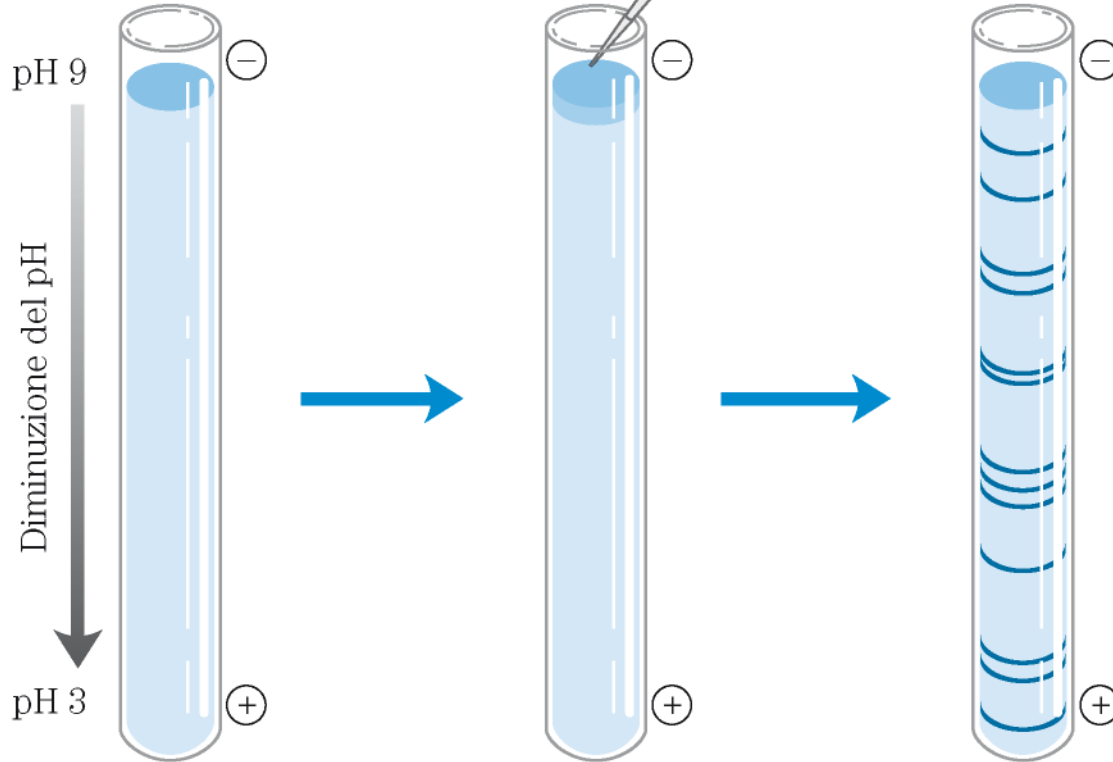
(A)



(B)



Viene
incorporata
nel gel
una soluzione
di anfolti



Dopo l'applicazione
di un campo elettrico,
nel gel si forma
un gradiente
di pH stabile

Viene caricata la
soluzione proteica
e si applica ancora
un campo elettrico

Dopo la colorazione,
le proteine sono
distribuite lungo
il gradiente di pH
secondo il loro pI

- **L'isoelettrofocusing**, nonostante sia un'ottima tecnica, può presentare dei problemi; i più comuni sono:
- interruzioni di banda o deformazioni dovute alla presenza di particolato che precipita nel punto di applicazione, eliminabili con una preventiva prefiltrazione o centrifugazione;
- bande irregolari, ad arco, ondulate sono dovute ad irregolarità nel gel (microbolle introdotte durante la polimerizzazione), troppo sale nel campione o campioni applicati troppo in vicinanza del bordo;
- bande non nette o sfocate, date da un tempo di focalizzazione troppo lungo o troppo corto;
- bruciature e scintille dovute ad essiccamento dell'estremità anodiche e catodiche dovuto ad endosmosi. Nei range molto acidi si assottiglia il lato anodico, negli intervalli basici l'assottigliamento del gel avviene al catodo. Per evitare questo fenomeno si può aumentare la viscosità creando un gradiente di densità ponendo la parte densa nella regione predisposta all'assottigliamento.

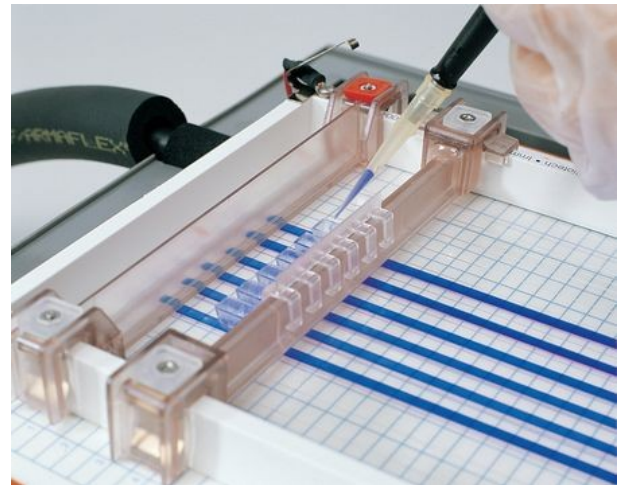
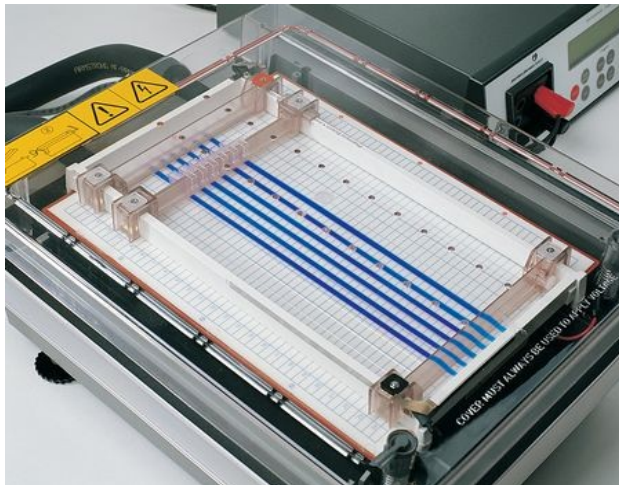
➤ ***Isoelettofocalizzazione in gradienti di pH immobilizzati:***

- il sistema delle immobiline permette di realizzare una separazione in base al punto isoelettrico senza l'utilizzo del sistema delle anfoline. Il sistema utilizza una serie di derivati dell'acrilammide aventi la struttura generale:

$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}$ dove R contiene od un gruppo carbossilico od un gruppo amminico terziario.

- La copolimerizzazione di questi monomeri con diverso pK in diversa concentrazione permette di creare dei gradienti preformati di pH all'interno del gel di poliacrilammide. Una volta integrate nel gel, le immobiline conferiscono una capacità tamponante controllata, una bassa conduttività all'interno del gradiente e si evita il così detto cathodic drift. In queste condizioni è possibile applicare grosse differenze di potenziale su gel molto sottili e ottenere risoluzioni nell'ordine di 0,001 unità di pH.

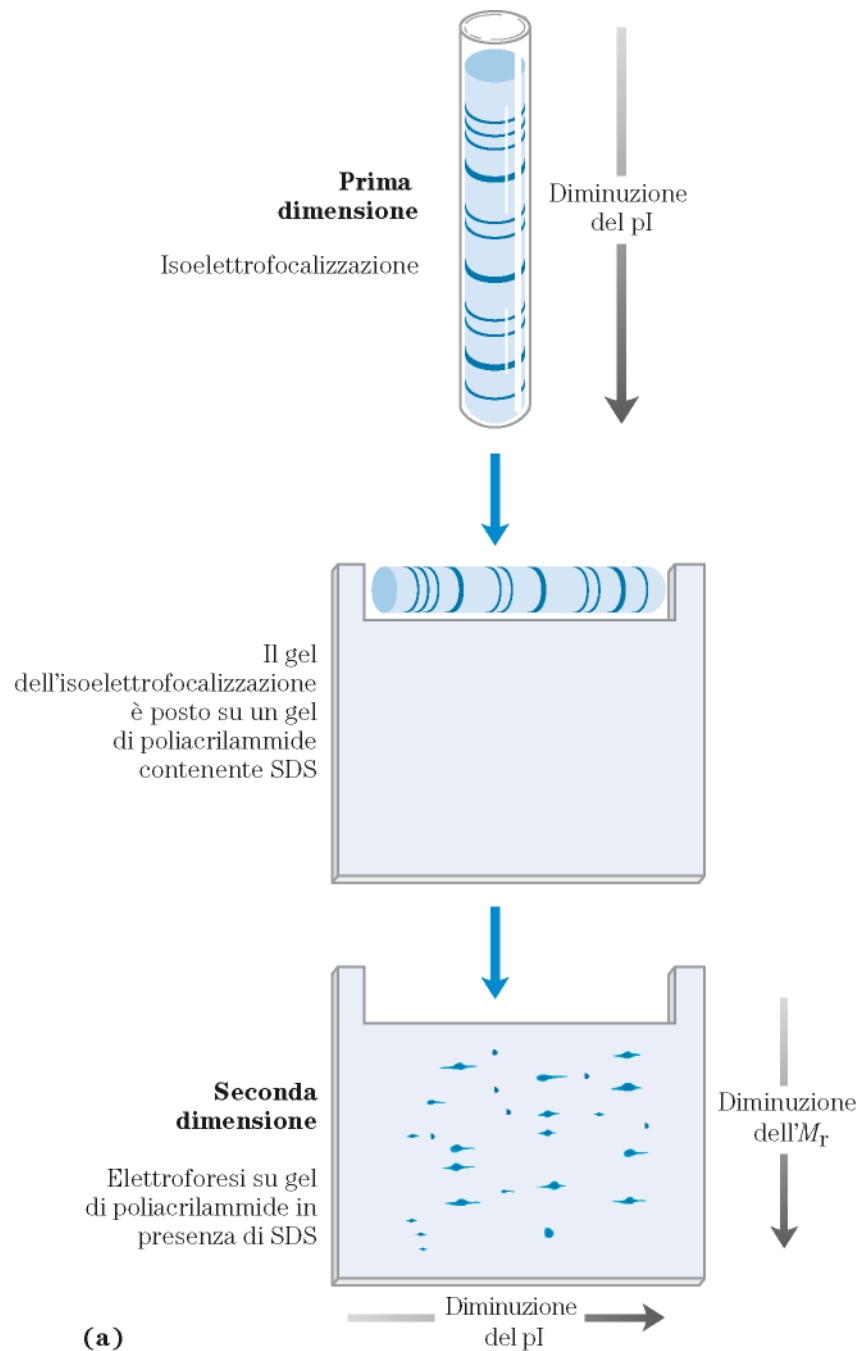
Isoelettrofocusing: immobiline



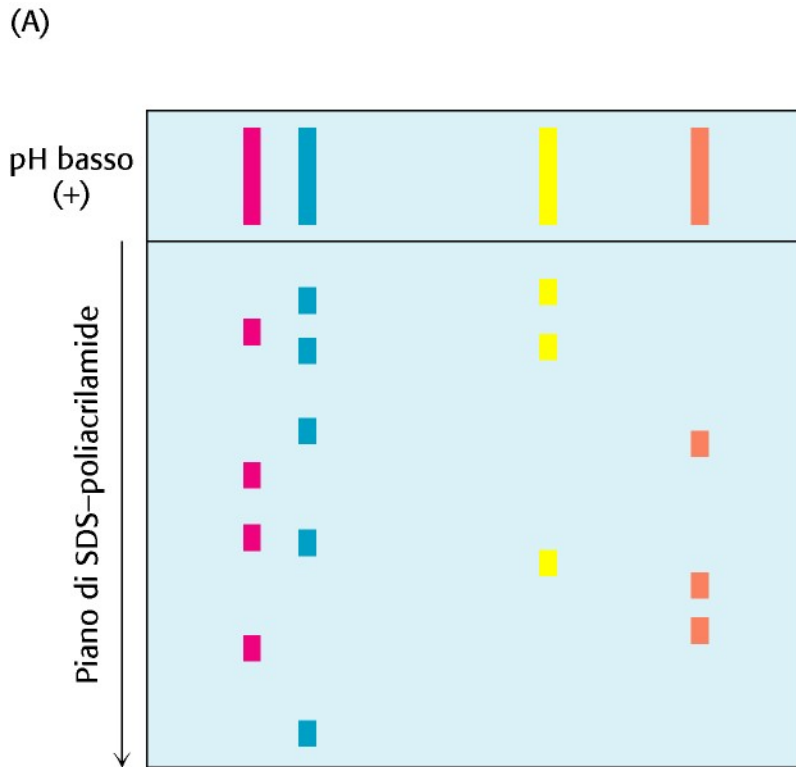
Elettroforesi bidimensionale (2D)

- Elettroforesi bidimensionale permette di ottenere una risoluzione ancora maggiore di una miscela complessa di proteine. I componenti sono prima separati in base a differenze nel punto isoelettrico, mediante isoelettrofocusing, e successivamente in base al peso molecolare mediante SDS-PAGE utilizzando gradienti a concentrazioni crescenti di acrilammide.
- Grazie a questo tipo di separazione elettroforetica si possono identificare le singole proteine e interpretare le mappe ottenute.

Elettroforesi 2D



Elettroforesi 2D





↓
Diminuzione
dell' M_r
↓

← Diminuzione
del pI →

(b)

➤ *Elettroforesi in presenza di urea:*

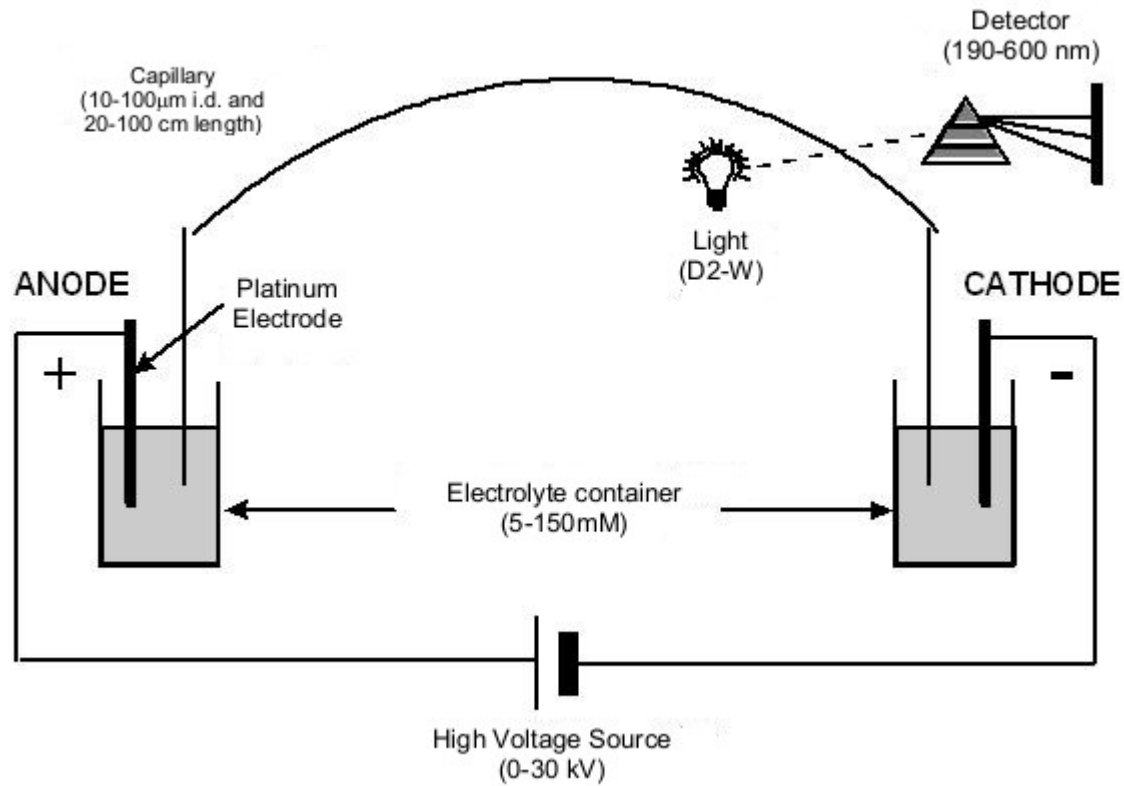
- Questo tipo di elettroforesi impiega urea che ad elevate concentrazioni denatura le proteine e fa loro assumere una conformazione tipo random coil
- E' possibile creare all'interno di un gel di poliacrilammide un gradiente a concentrazione crescente di urea tale che durante la migrazione elettroforetica, quando la proteina incontra una concentrazione di urea sufficiente, la proteina inizia a

➤ Elettroforesi capillare:

- L'elettroforesi capillare (**CE**) è una tecnica analitica che fonde il principio dell'elettroforesi con i concetti strumentali e di automazione propri dell'HPLC. L'elettroforesi capillare usa, come alternativa alla piastra di gel o ad altri supporti, un capillare del diametro dell'ordine di decine di micron, per definizione anti-convettivo, in quanto il piccolo diametro limita la quantità di calore generato anche quando vengono applicati centinaia di Volt per centimetro. Inoltre, l'alto rapporto area/volume della superficie interna del capillare favorisce la dissipazione del calore attraverso le pareti del capillare stesso. L'elettroforesi capillare fu introdotta per la prima volta da Hjertén nel 1967, ma è diventata una vera e propria tecnica analitica solo all'inizio degli anni '80 quando ne sono stati messi a punto i principi teorici e sono state descritte le relazioni fra le variabili operative e la qualità della separazione. Da allora la CE è una tecnica in rapida crescita.

- Il grande vantaggio di questa tecnica è il vasto campo di applicazione e la sua versatilità, in quanto, si possono realizzare diverse modalità operative.
- Originariamente considerata per la separazione di macromolecole biologiche come le proteine, si è rivelata utile per la separazione di aminoacidi, farmaci chirali, vitamine, pesticidi, ioni inorganici, coloranti, surfattanti, zuccheri, oligonucleotidi e perfino virus.
- Le caratteristiche vantaggiose di questa tecnica sono:
 - rapidità d'analisi;
 - alta efficienza;
 - minime quantità di campioni e di solventi;
 - rivelazione UV on-line;
 - diversi modi operativi e ampio campo di applicazione;
 - si opera in mezzi acquosi, mezzi naturali per le molecole biologiche, ma anche con mezzi non-acquosi;
 - può essere accoppiata con vari sistemi di rivelazione (UV, fluorescenza, massa);
 - semplicità di sviluppo del metodo;
 - possibilità di automazione.

Elettroforesi capillare



Elettroforesi capillare

- Il capillare deve essere chimicamente ed elettricamente inerte, trasparente alle lunghezze d'onda UV e visibile, flessibile e robusto e, se possibile, poco costoso. Il materiale che incontra tutti questi requisiti è la silice fusa. Il capillare è in realtà di silice fusa nella sua parte interna, mentre esternamente è fatto di polimide, la quale lo rende robusto e maneggevole. Nel CE non esiste una vera e propria cella di rivelazione, come accade nell'HPLC, ma la cella è sul capillare, cioè è una piccola porzione della sua lunghezza che viene resa trasparente alla luce eliminando la poliammide.
- Parametri del capillare per valutare la migrazione degli analiti:
 - lunghezza totale, da un'estremità all'altra, in genere 50-75 cm;
 - lunghezza alla finestra, dall'estremità di iniezione del campione alla sua rivelazione alla finestra.

Elettroforesi capillare

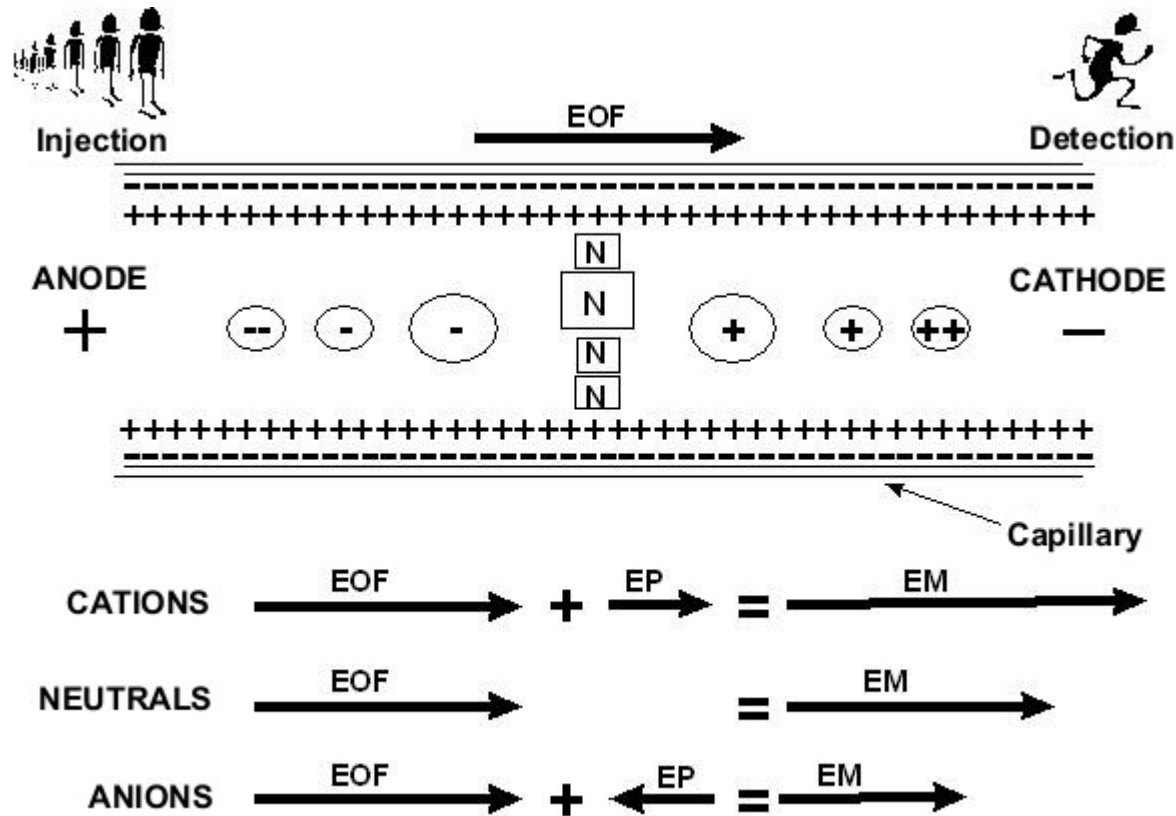
- Il diametro interno del capillare è in genere 20-100 μm . La parete interna del capillare è costituita dai gruppi silanologici della silice (SiOH). Prima di operare qualsiasi tipo di analisi il capillare va riempito (condizionamento) con, ad esempio, NaOH 1 M o comunque una base o un acido forti (o un surfattante come SDS in casi particolari) tali da ionizzare i silanoli in modo completo e ottenere così la parete interna del capillare carica negativamente.
- Un parametro importante per operare in modo riproducibile è la termostatazione del capillare. La termostatazione viene effettuata, nelle moderne apparecchiature, ad aria o a liquido.

- Dopo che il capillare è stato condizionato va riempito con un elettrolita di fondo (background electrolyte - BGE) o tampone che permetta il passaggio della corrente. Tipicamente si usano vari tamponi, inorganici e organici. Un buon elettrolita di fondo deve possedere:
- un buon potere tampone ai valori di pH a cui si desidera operare;
 - bassa assorbanza di fondo alla lunghezza d'onda scelta per la rivelazione;
 - bassa mobilità per minimizzare la generazione di corrente.
- L'iniezione del campione avviene dopo il condizionamento e il riempimento con l'elettrolita di fondo. Un volume di campione molto piccolo, dell'ordine dei nl, viene iniettato ad una estremità del capillare e ciò può essere effettuato in modi diversi.

- La soluzione contenente il campione si trova in una provetta in cui entra una estremità del capillare e una piccola porzione di liquido viene fatta passare nel capillare attraverso due processi:
- un processo idrodinamico che si può realizzare applicando una pressione positiva a tale estremità, od applicando il vuoto, quindi risucchiando aria dall'altra estremità oppure ancora per sifonamento, posizionando le due estremità del capillare ad altezze diverse;
 - un processo elettrocinetico applicando cioè il voltaggio in modo da far migrare la prima porzione di campione.
 - In genere il campione viene iniettato all'anodo, mentre la rivelazione avviene al catodo.

- Viene quindi fatta iniziare la corsa elettroforetica applicando un voltaggio (di solito i valori operativi vanno da **10 a 30 kV**). L'analita da analizzare o gli analiti da separare in caso di una miscela, migreranno con una velocità e in una direzione che dipende dalla loro massa e dalla loro carica e da un parametro molto importante che è il flusso elettroosmotico. Perché passi corrente all'interno del capillare, quando il voltaggio viene applicato, le estremità del capillare saranno immerse nell'elettrolita di fondo.
- Detector. Il rivelatore UV-VIS è di gran lunga il più usato.

Elettroforesi capillare



EOF = electroosmotic flow; EP = electrophoretic flow; EM = electrophoretic migration