

Corso di

Proprietà di Biopolimeri

Prof. R. URBANI

Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche
a.a. 2023-2024

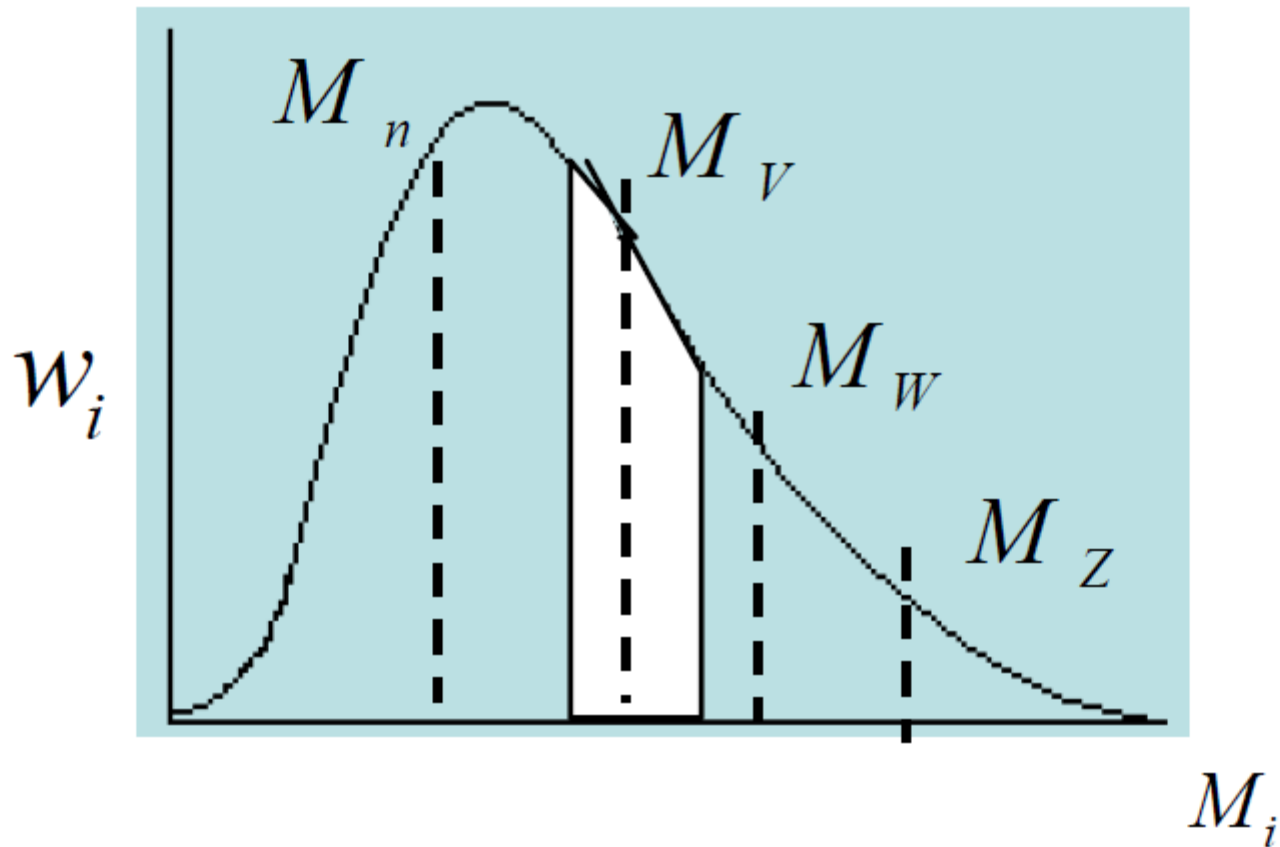
Elettroforesi

PESI MOLECOLARI

- **Uno dei problemi che si presenta sempre quando si studiano (bio)polimeri è quello della determinazione del peso molecolare.**
- **I polimeri possono essere monodispersi o polidispersi.**
- **Monodispersi: tutte le catene hanno lo stesso peso molecolare (es. proteine).**
- **Polidispersi: le catene hanno una distribuzione di pesi molecolari (es. polisaccaridi). In questo caso i valori che si danno sono quelli relativi alle medie.**

- Definizione delle masse molecolari medie, polidispersità
- Curve di distribuzione delle masse molecolari
- Tecniche per la determinazione delle masse molecolari medie:
 - Osmometria
 - Viscosimetria
 - Diffusione della luce
 - Centrifugazione
 - Analisi dei gruppi terminali
- Frazionamento di polimeri:
 - Esclusione sterica (SEC o GPC) (cromatografia)

Funzione di distribuzione e pesi medi



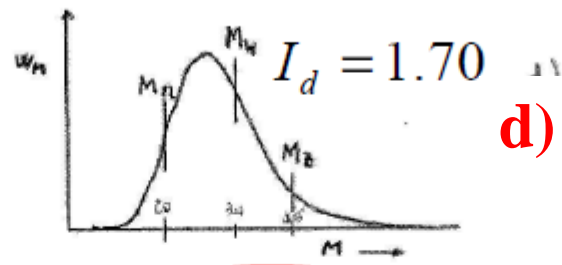
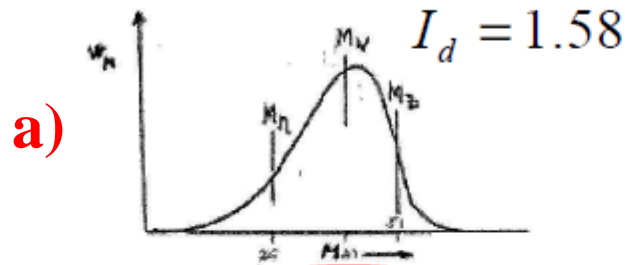
Si definisce **INDICE DI POLIDISPERSITA** il rapporto:

$$I_d = \frac{\overline{M}_w}{M_n} = 1 + \frac{\sigma_n^2}{M_n^2}$$

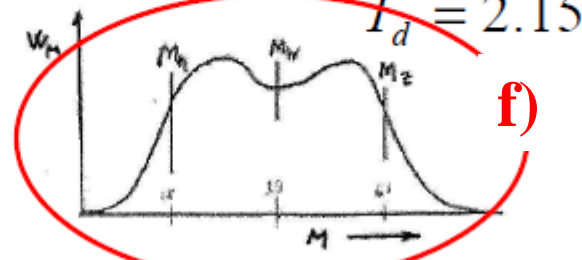
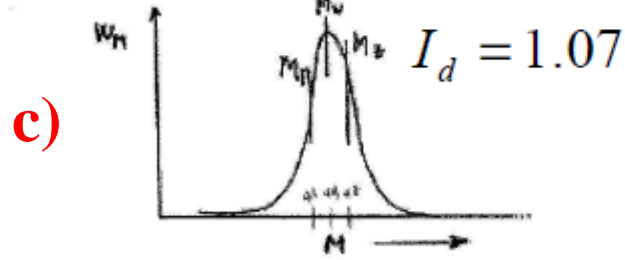
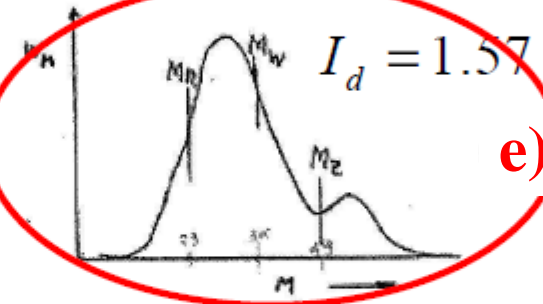
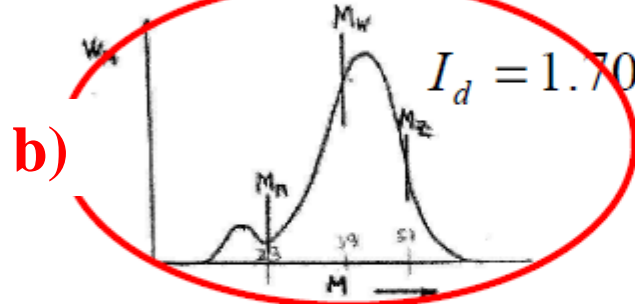
Con σ_n^2 la varianza della distribuzione $\sigma_n^2 = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} N_i (M_i - \overline{M}_n)^2}{\sum_{i=1}^{\infty} N_i}$)

I_d fornisce una misura della larghezza della distribuzione dei pesi molecolari

Esempi di distribuzione



$$I_d = \frac{\overline{M_w}}{\overline{M_n}}$$



Distribuzione bimodale

Curve b) e e) hanno stesso M_n
 Curve b) e f) hanno stesso M_w

Metodi per la determinazione dei pesi molecolari

Determinazione dei pesi molecolari fatta con soluzioni polimeriche diluite

Determinazione pesi molecolari può essere eseguita con:

- **Metodi assoluti:** basati sulle proprietà delle soluzioni
- **Metodi relativi:** relazione tra proprietà misurata e massa molecolari stabilita attraverso tarature

Metodi assoluti:

Osmometria, diffusione della luce, analisi gruppi terminali, spettrometria di massa

Metodi relativi:

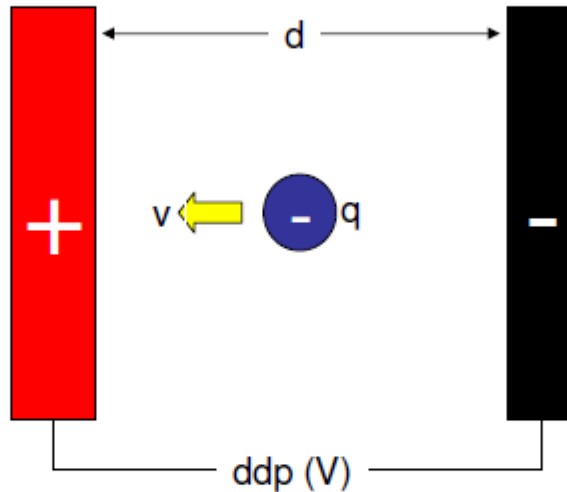
Osmometria a pressione di vapore, viscosimetria, GPC, gel elettroforesi

Il tipo di massa molecolare media ottenuta dipende dal metodo utilizzato

Metodo	Informazioni	Intervallo di applicabilità (g/mol)
Osmometria	Mn	50000-alcuni milioni
Osmometria a tensione di vapore	Mn	<30000
Analisi gruppi terminali	Mn	<15000
Diffusione della luce	Mw	20000-5x10 ⁶
Viscosimetria	M _v	15000-10 ⁶
Ultracentrifuga	Mw, Mz, MWD	2000-10 ⁷
Cromatografia a permeazione di gel (GPC)	MWD	

ELETTROFORESI – principi generali

Una molecola con una carica netta non nulla posta tra due elettrodi di segno opposto migra verso l'elettrodo con segno opposto alla sua carica netta



ddp (V): differenza di potenziale applicata tra gli elettrodi

d: distanza tra gli elettrodi

q: carica della molecola

E (campo elettrico) = V/d

La molecola si muove verso l'elettrodo di segno opposto con una velocità (v) che è proporzionale all'entità del campo elettrico (V) e della sua carica (q) e inversamente proporzionale all'attrito che incontra nel muoversi (f – coefficiente d'attrito)

$$v = Eq/f$$

$$f = 6\pi r\eta$$

Applicare una ddp (V) in un mezzo che contiene ioni equivale a generare una corrente (I) che è inversamente proporzionale alla resistenza (R) del mezzo stesso

$$V = RI \text{ (legge di Ohm)} \Rightarrow I = V/R$$

Mobilità elettroforetica

Comunemente, non si fa riferimento alla velocità di migrazione di una particella nel campo elettrico, ma alla sua **mobilità elettroforetica**, indicata con μ e pari a :

$$\mu = \frac{v}{E} \quad (\mu = \frac{\text{cm}}{\text{sec}} / \frac{\text{V}}{\text{cm}} = \frac{\text{cm}^2}{\text{sec} \cdot \text{V}} = \text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{V}^{-1})$$

definita come la velocità, in cm/sec, in un campo elettrico unitario:

$$\rightarrow \mu = \frac{q}{f}$$

Quindi, la mobilità è indipendente dal campo elettrico, ma dipende (a parità di altre condizioni) dalla struttura intrinseca della molecola (carica, dimensioni, forma, PM)

ELETTROFORESI – principi generali

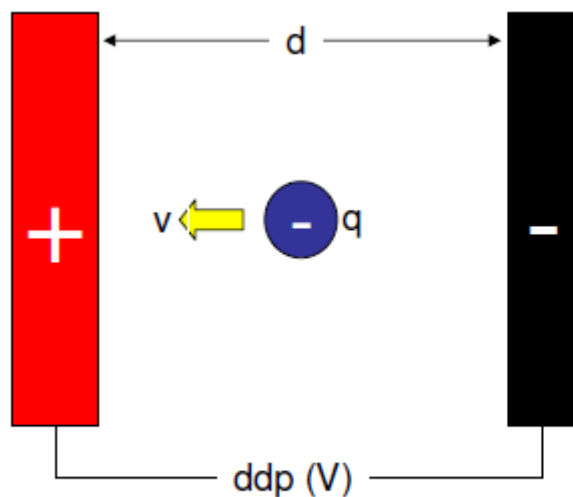
Per la legge di Joule in un sistema elettrico caratterizzato da una resistenza R e nel quale viene fatta passare una corrente I si sviluppa sotto forma di **calore** una potenza che è data da

$$W = VI = I^2R$$

Cosa provoca il calore in un sistema del genere?

- a) Moti convettivi nel sistema
- b) Aumento diffusione molecole
- c) ...

Effetto negativo sulla separazione delle molecole
– Risoluzione –

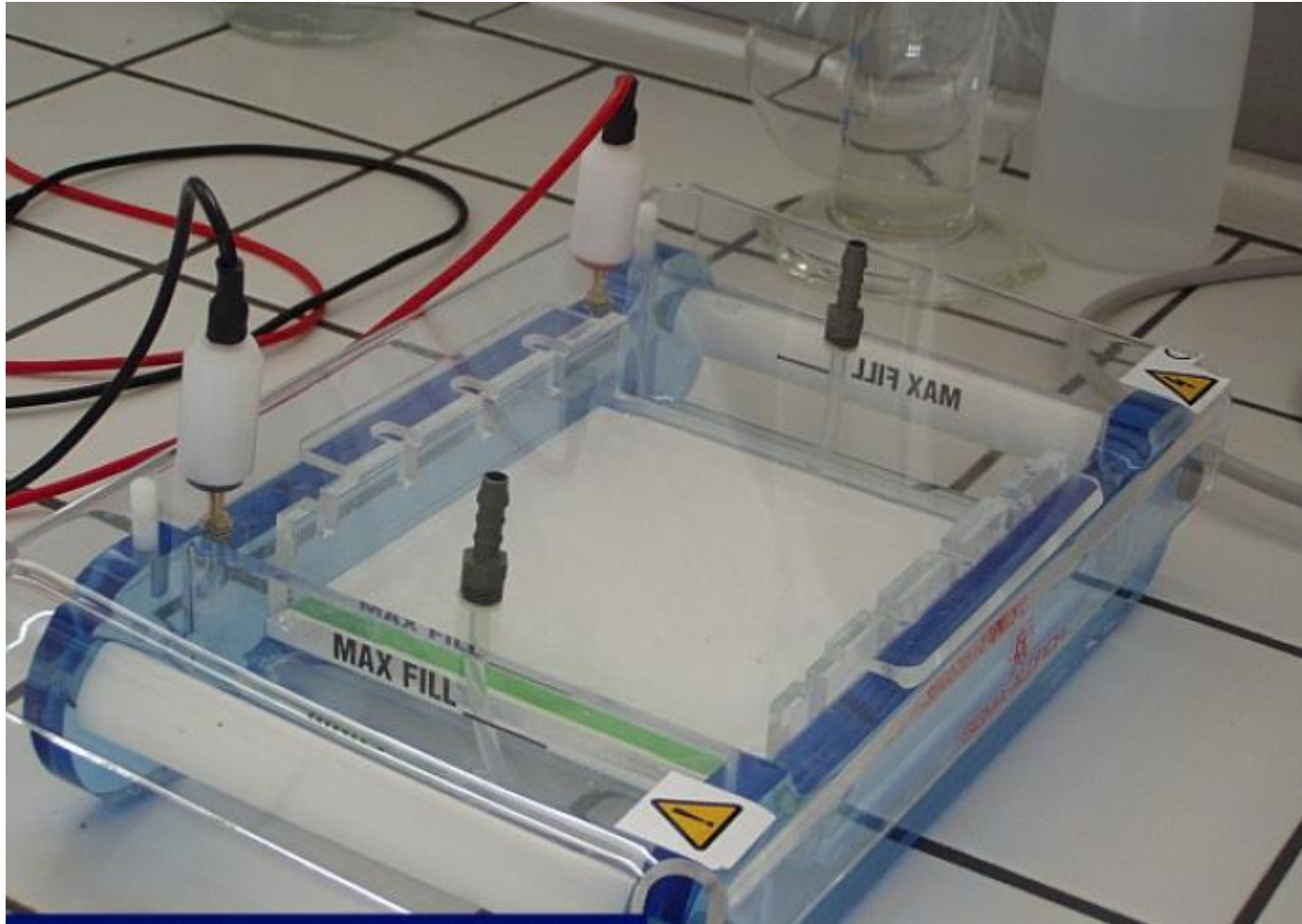


Strategie

Elettroforesi condotta in un mezzo che contrasta/minimizza i moti convettivi e la diffusione delle molecole
=>
ELETTROFORESI su SUPPORTO SOLIDO

Rimozione estremamente efficiente del calore attraverso la riduzione delle dimensioni del sistema elettroforetico
=>
ELETTROFORESI CAPILLARE (Free Flow Electrophoresis)

Elettroforesi di biopolimeri



Elettroforesi

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

- **CAMPIONE** (Carica, Dimensioni, Forma)
- **TAMPONE** (Concentrazione, pH)
- **SUPPORTO** (Adsorbimento, Filtrazione molecolare)

Elettroforesi

➤ SUPPORTI

➤ Non setaccianti

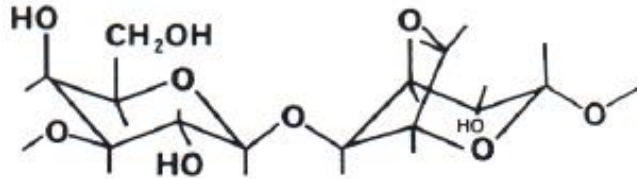
(Carta), acetato di cellulosa

➤ Setaccianti

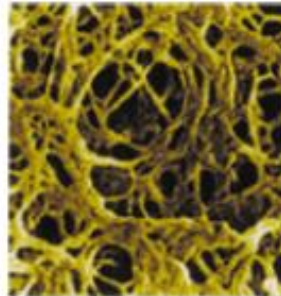
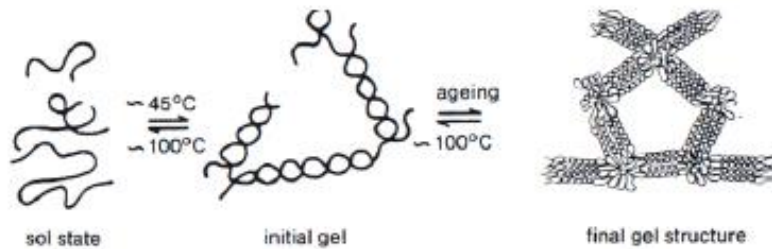
Gel di poliacrilammide (**PAGE**)

Gel di Agarosio

Gel di Agarosio



Polimero di D-galattosio
e
3,6 anidro L-galattosio

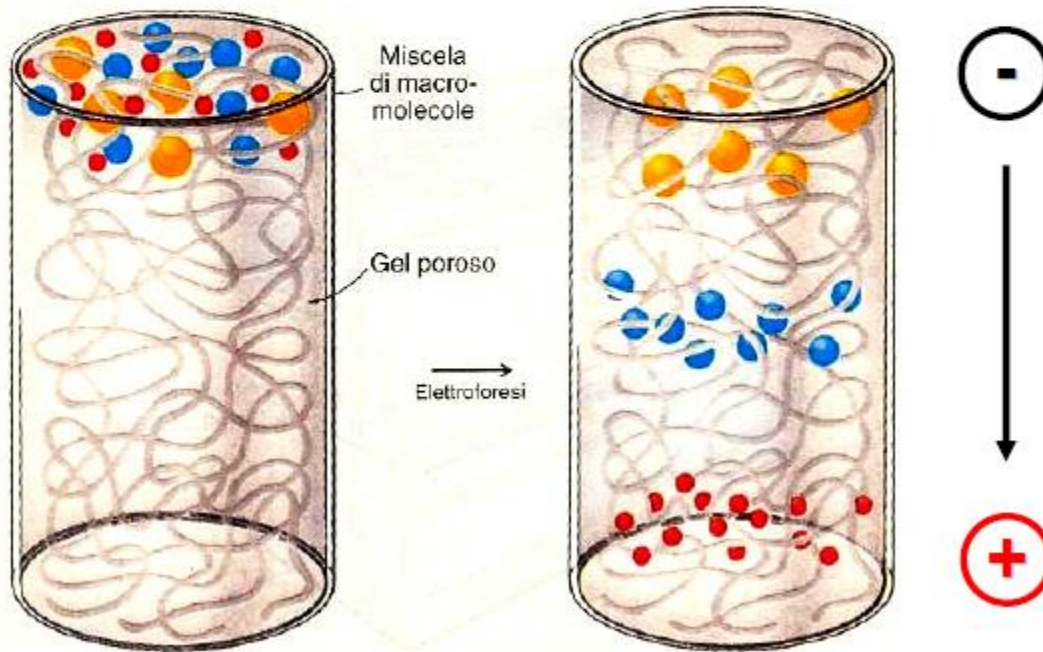


Transizione di stato
(macroreticolo sulla base di
legami idrogeno)
Transizione gel-sol tramite
riscaldamento

Agarosio modificato mediante
aggiunta di gruppi CH_3 sui
gruppi OH ha temperature di
transizione minori (low melting
agarose)

Reticolo di agarosio polimerizzato
“setaccio molecolare”

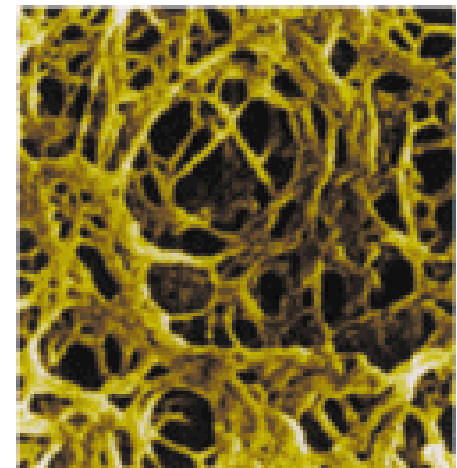
Effetto "setaccio" in un gel uniforme



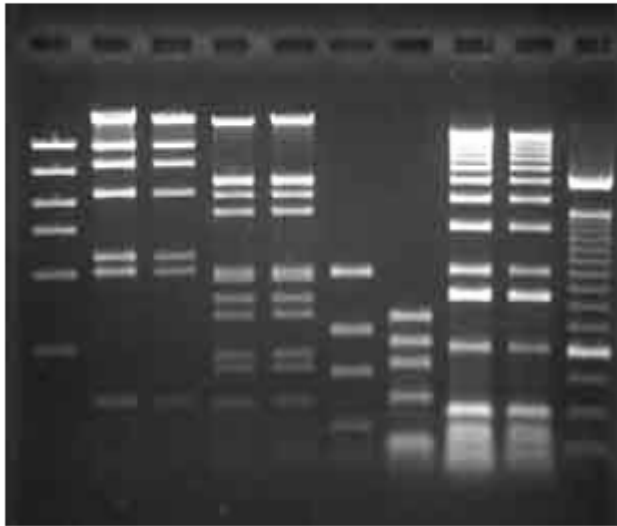
le quantità di agarosio e di tampone determinano la porosità del gel, quindi si stabiliscono in base al peso molecolare della banda

Potere Risolutivo Agarosio

% Agarosio	(range in DNA bp)
0.3	60.000 - 5.000
0.6	20.000 - 1.000
0.7	10.000 - 800
0.9	7.000 - 500
1.2	6.000 - 400
1.5	4.000 - 200
2.0	3.000 - 100



Gel di Agarosio – Separazione molecole di DNA

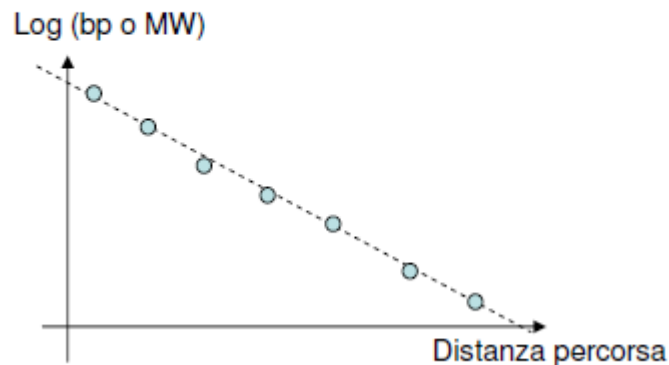


Molecole di DNA, essendo costituite da unità ripetitive recanti ciascuna la stessa carica, hanno tutte lo stesso rapporto massa/carica.

Se messe in una soluzione e poste sotto l'azione di un campo elettrico esse migrerebbero sostanzialmente alla stessa velocità, indipendentemente dalla loro grandezza.

Se la migrazione viene fatta avvenire in un setaccio molecolare esse si separano in base all'attrito/difficoltà che incontrano nel muoversi lungo la matrice stessa.

Molecole di piccole dimensioni (numero di paia di basi minori) presenteranno una migrazione elettroforetica maggiore rispetto a molecole più grandi (numero di paia di basi maggiore)



Tipiche condizioni di corsa:

Tampone: TAE o TBE (Tris/Acetato/EDTA o Tris/Borato/EDTA) – pH circa 8

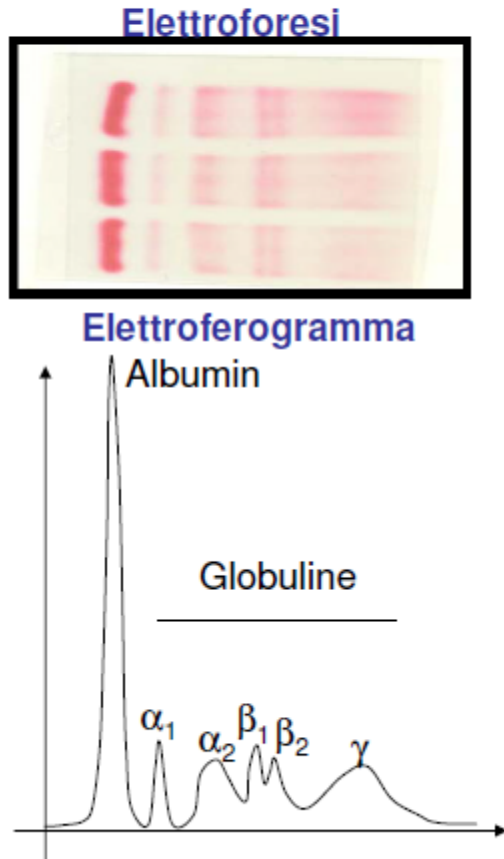
ddp: circa 5 V/cm

% Agarosio: dal 0.5 al 1-2%

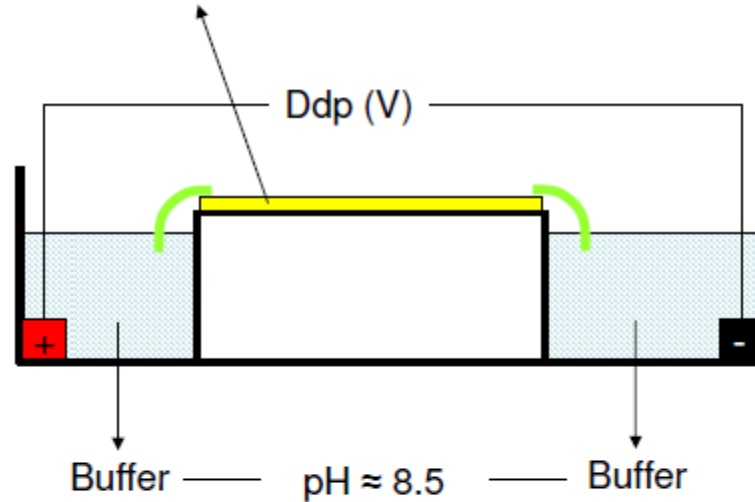
Visualizzazione tramite intercalazione di Etidio Bromuro (fluorescenza su transilluminatore UV)

Elettroforesi su acetato di cellulosa

Campione viene depositato sulla superficie del supporto di acetato di cellulosa che è imbibito del tampone di corsa e successivamente viene applicata la ddp. Il pH del tampone determina la carica delle molecole che si separano secondo il loro rapporto m/z e l'attrito che incontrano nel muoversi.



Striscia di acetato di cellulosa

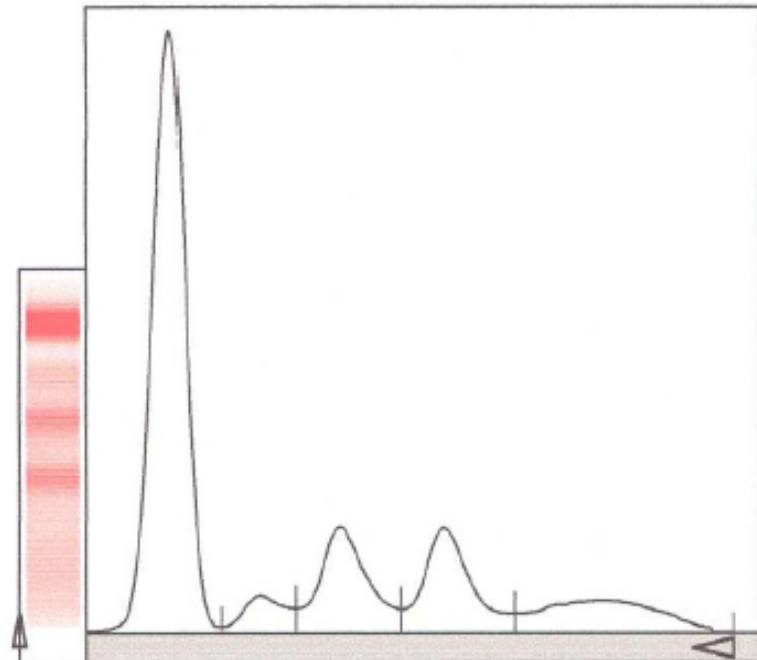


Analisi condotta in circa 15 minuti

Esempio di un referto riguardante le Sieroproteine

Frazioni	%	% Normale	g/dl
Albumina	55,3	52,0-68,0	4,04
Alfa1	4,6	2,0- 5,0	0,34
Alfa2 ↑	14,6	6,6-13,5	1,07
Beta	14,3	8,5-14,5	1,04
Gamma	11,2	11,0-21,0	0,82
Prot. Tot. (g/dl)		(6,00- 8,00)	7,30
Rapp. A/G	1,24		

Alcune patologie sono caratterizzate da specifiche alterazioni del profilo elettroforetico delle proteine del siero. Sono in commercio anche kit per la valutazione di proteine urinarie, lipoproteine, emoglobine, etc.



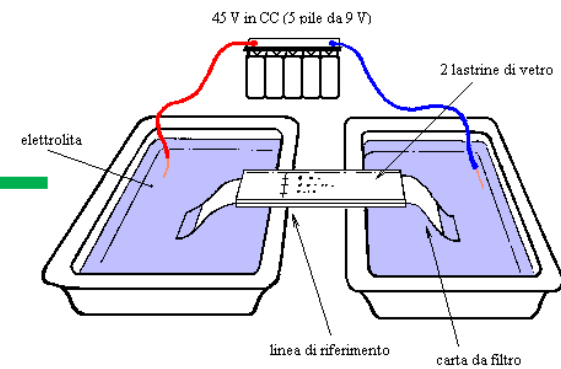
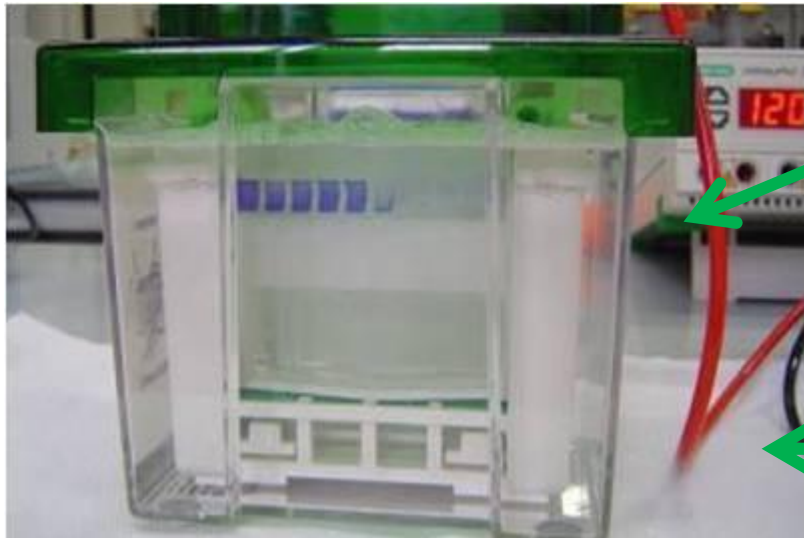
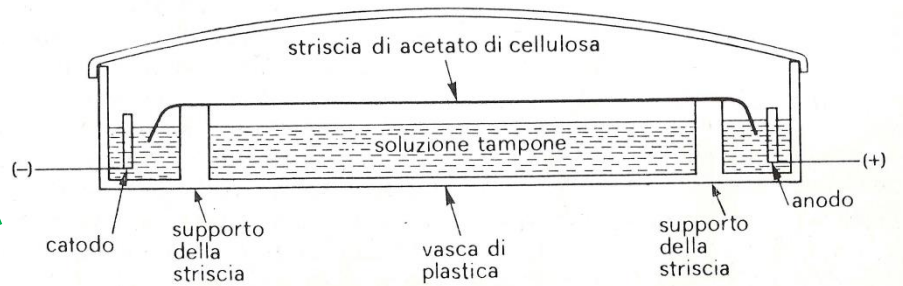
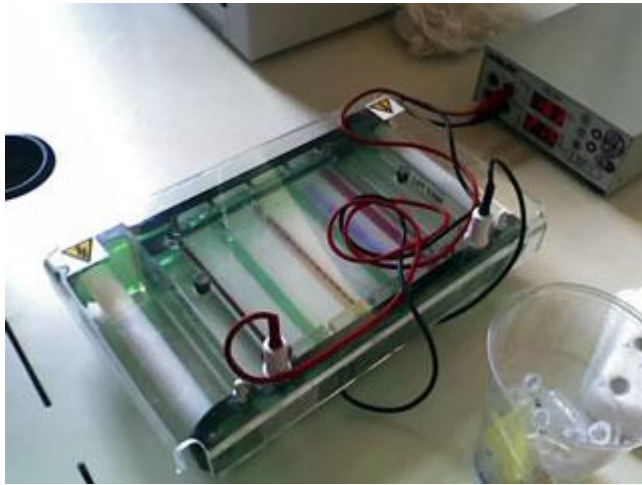
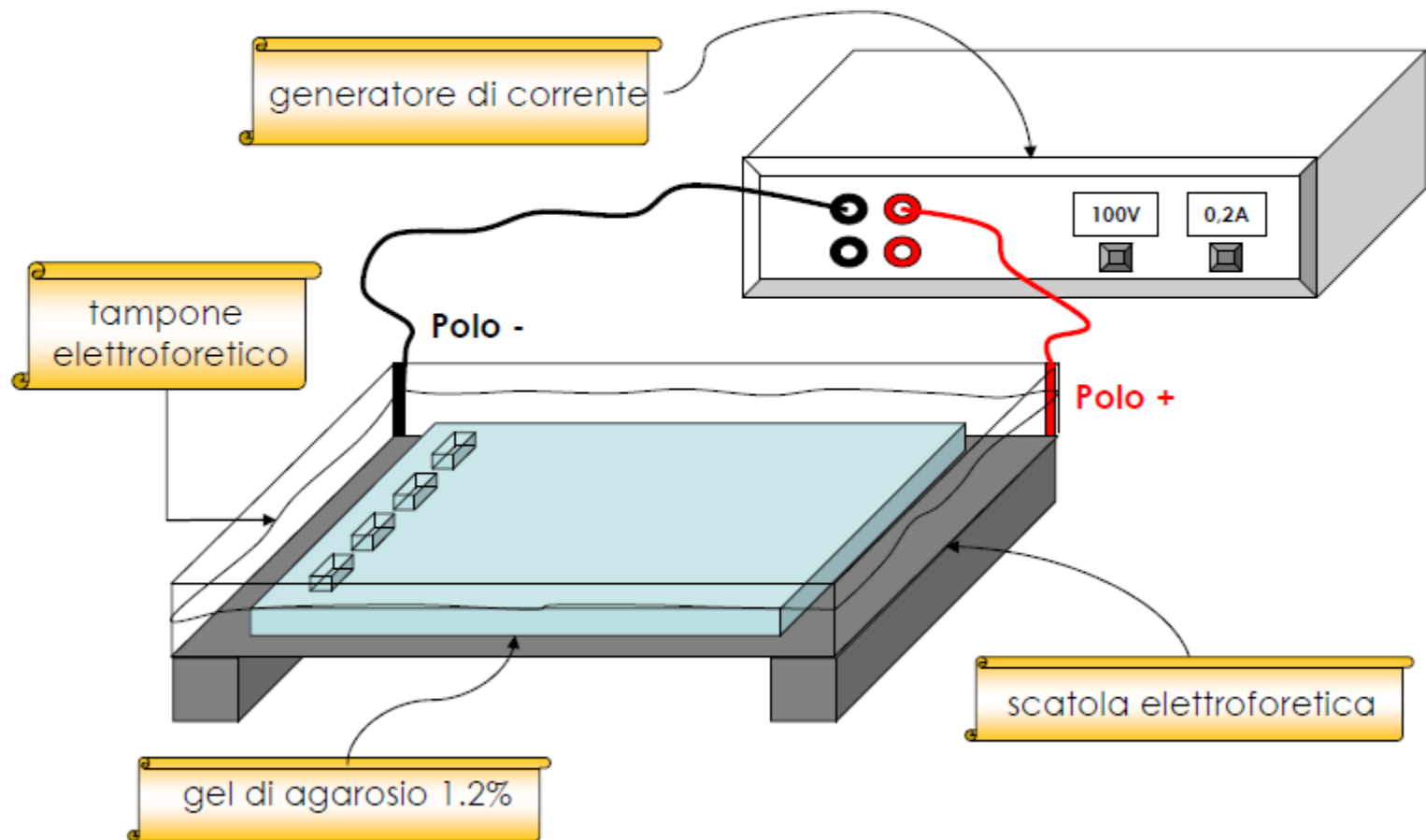
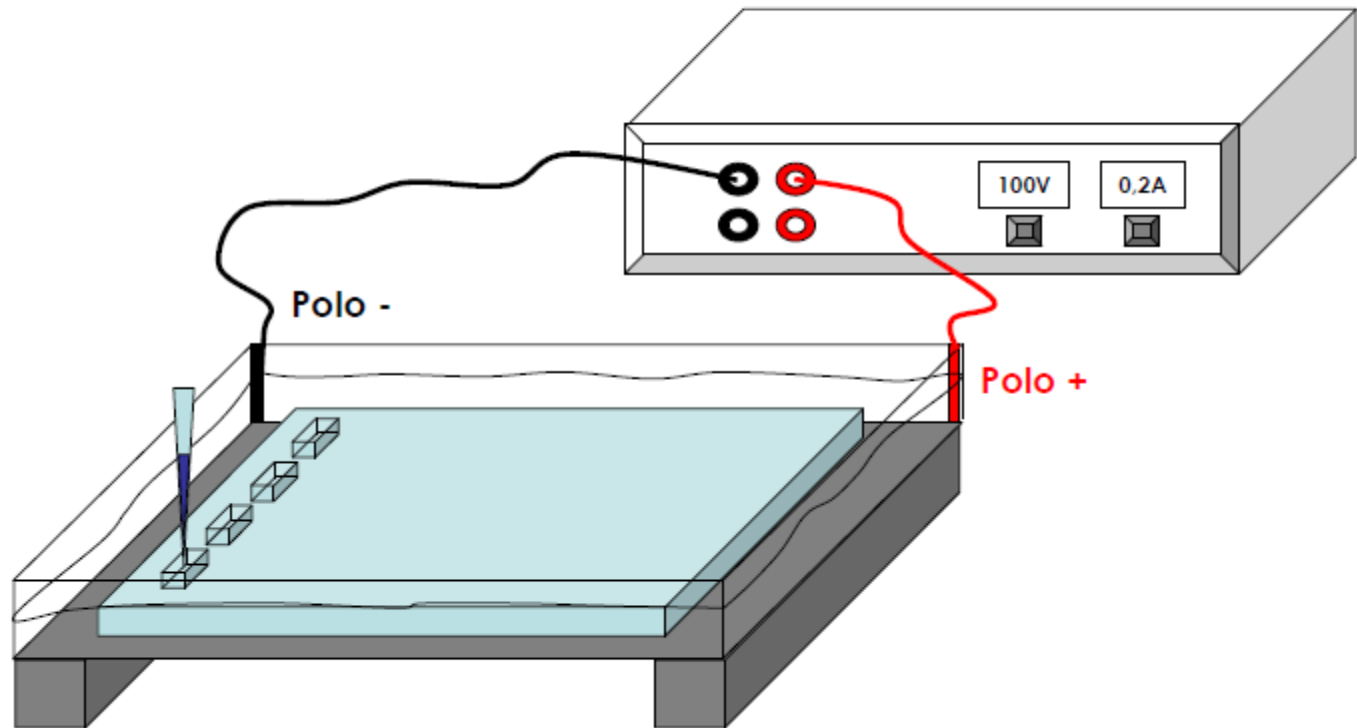


Figura 21 - Sistema sperimentale per elettroforesi su carta.

ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO

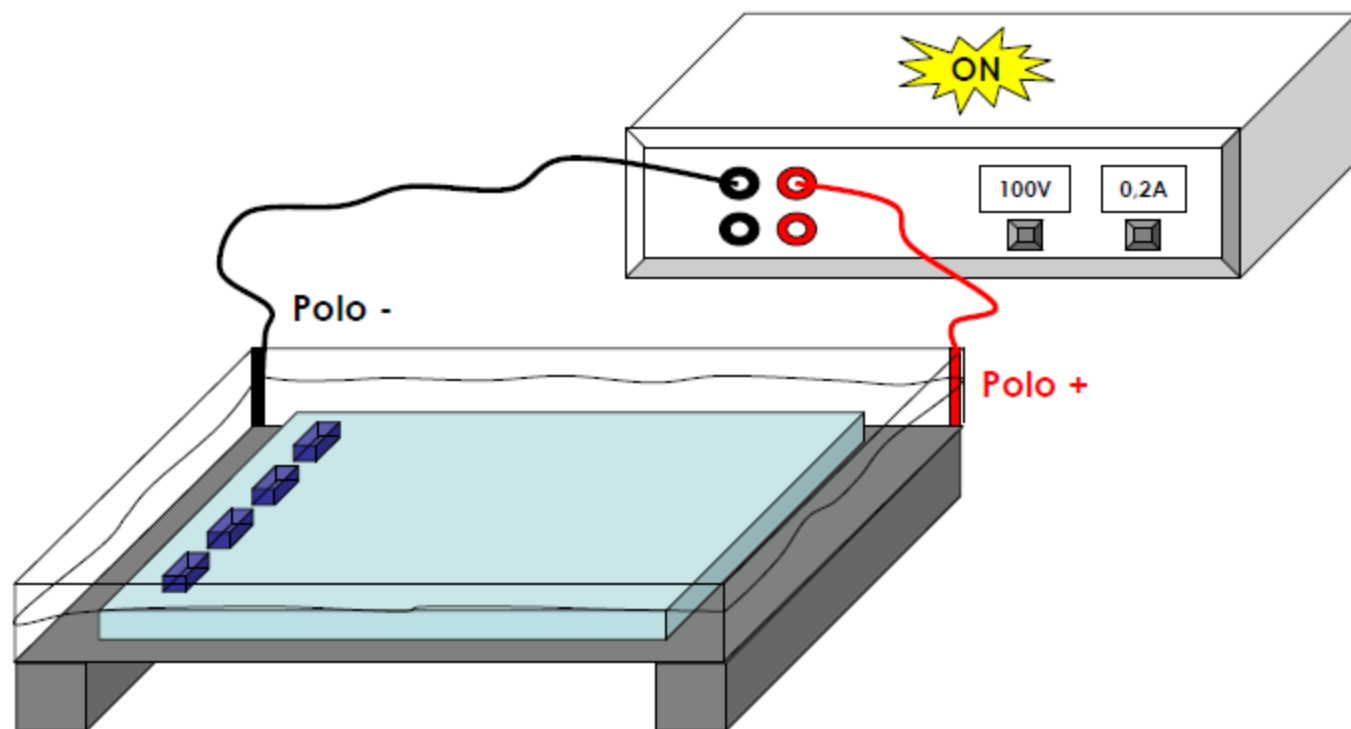


ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO



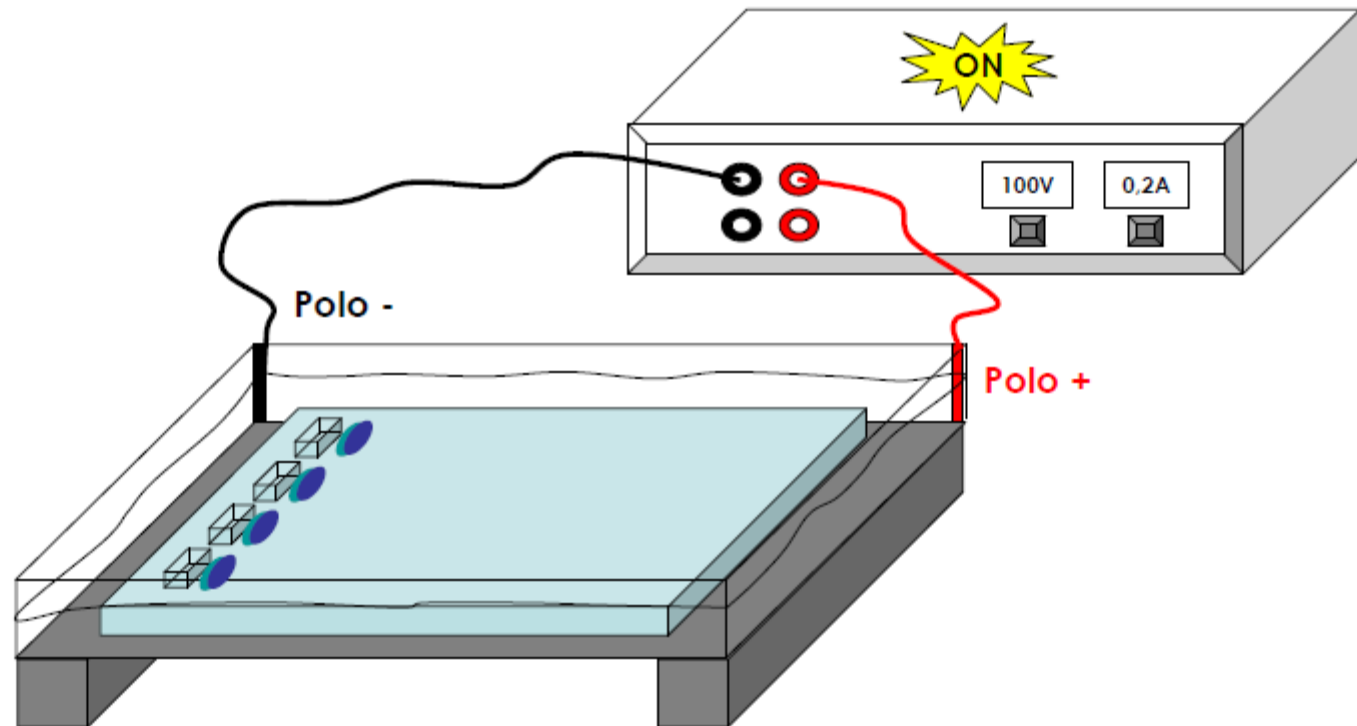
Loading dye aiuta il caricamento del campione nel pozzetto del gel. Contiene glicerolo, **Blu di bromofenolo** e **Blu di xilencianolo** che migrano nel gel a velocità diversa.

ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO



Loading dye aiuta il caricamento del campione nel pozzetto del gel. Contiene glicerolo, Blu di bromofenolo e Blu di xilencianolo che migrano nel gel a velocità diversa.

ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO

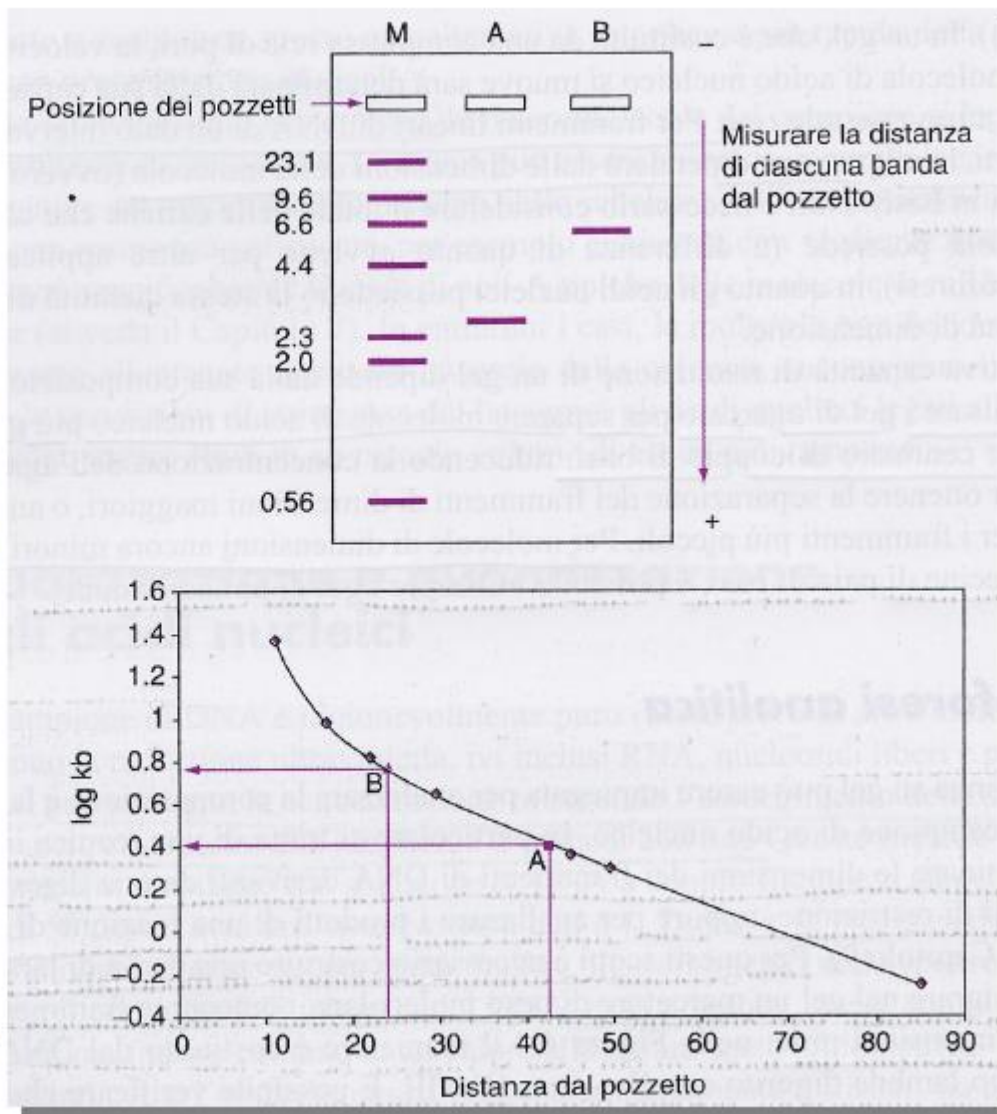


Loading dye aiuta il caricamento del campione nel pozzetto del gel. Contiene glicerolo, **Blu di bromofenolo** e **Blu di xilencianolo** che migrano nel gel a velocità diversa.

Conoscendo la distanza di migrazione di frammenti di dimensione nota (M) posso "interpolare" la lunghezza delle molecole A e B

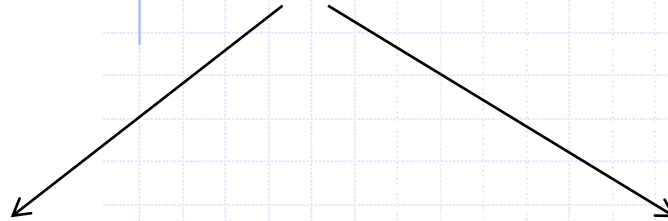
A = 2.5 kb

B = 6 kb



Elettroforesi

- Può essere:
 - Nativa
 - Denaturante



Elettroforesi

- Nativa
 - 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

Elettroforesi

- Denaturante
 - A pH leggermente alcalino l' SDS porta due cariche negative e quindi rende tutta la proteina carica negativamente
 - Il rapporto carica/massa sarà uguale tra le diverse proteine

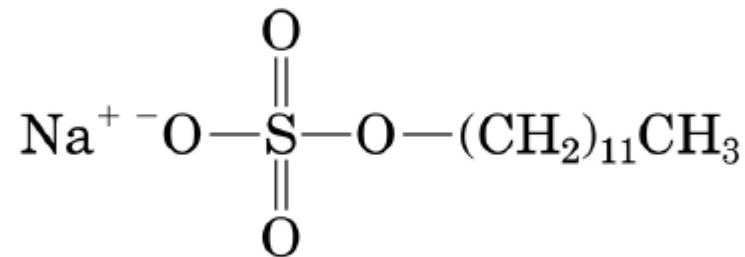
Elettroforesi

- Dato che stiamo cercando di separare molte **proteine** differenti con diverse forme e dimensioni,
 - **ciò che vogliamo per prima cosa è di renderle lineari in modo che le proteine non abbiano più una struttura secondaria, terziaria o quaternaria**
- Perché non solo la **massa** ma anche la **forma** di un oggetto determinerà la facilità di movimento in un mezzo

SDS

Detergente anionico che si lega fortemente alle proteine in rapporto di circa una molecola di SDS per ogni due residui di aminoacidi

L'SDS è un detergente anionico che può dissolvere molecole idrofobiche e possiede una carica negativa (quella del solfato)



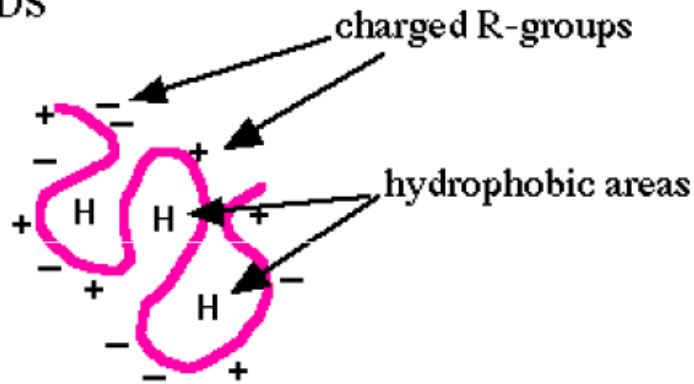
le proteine saranno solubilizzate ed inoltre esse saranno coperte da molte cariche negative (1,4 g di SDS per 1 g di proteine)

➤ L'interazione SDS/proteine:

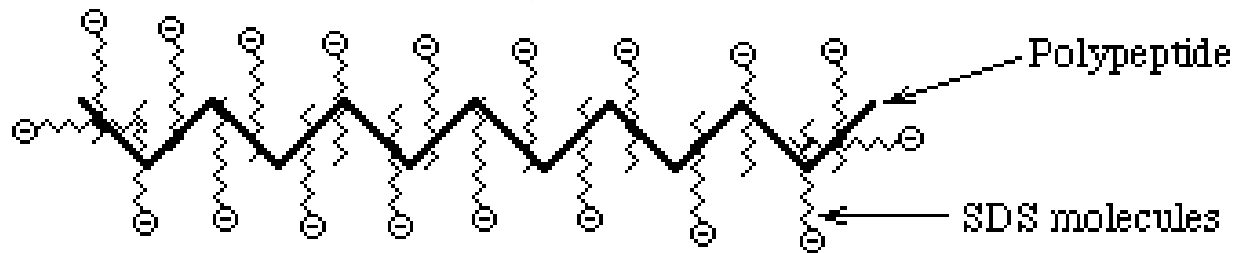
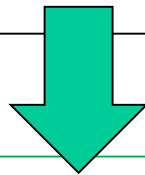
- provoca la destabilizzazione della struttura terziaria della proteina denaturandola
- le conferisce una carica netta negativa rendendo trascurabile la carica della proteina nativa
- Il risultato è che la proteina assume una forma linearizzata ed una carica negativa approssimativamente proporzionale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

Trattamento con SDS

BEFORE SDS



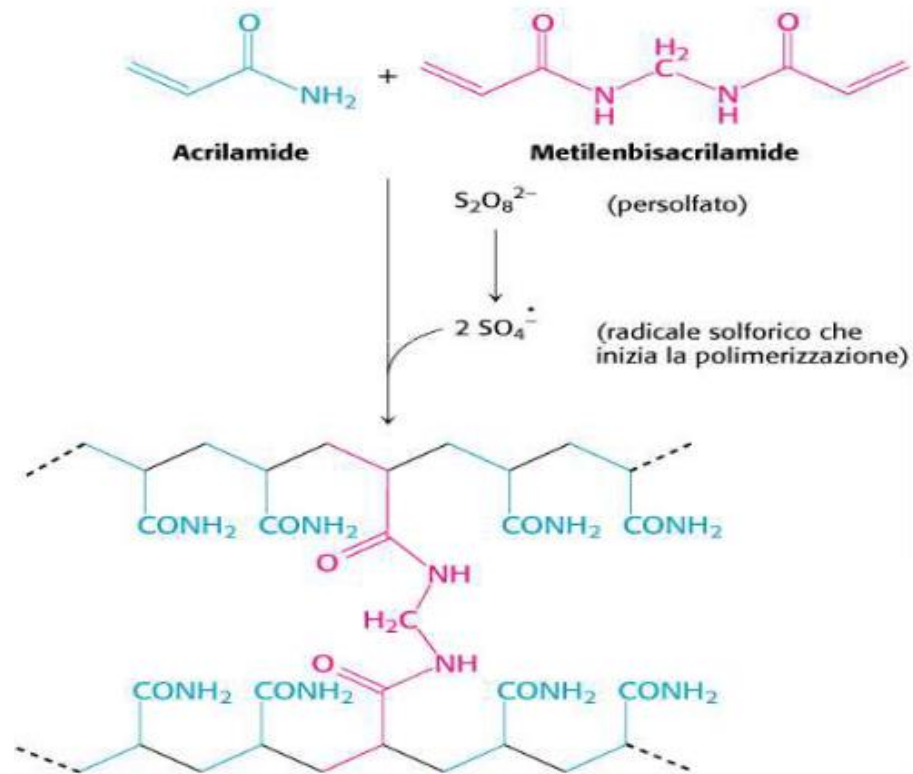
AFTER SDS



La forma di qualsiasi proteina è praticamente quella di un ellissoide allungato e la carica è praticamente la stessa: **quindi la separazione avviene solo in base al peso molecolare.**

Trattamento del campione Proteico

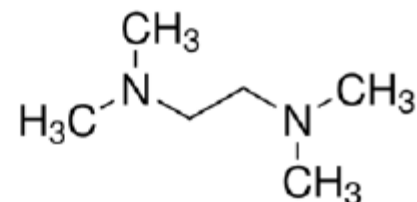
- SDS
 - denatura le proteine (stessa forma a “bastoncino”)
 - conferisce la stessa densità di carica (negativa)
- 2-Mercaptoetanololo $\text{HS-CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
 - rompe eventuali ponti disolfuro
- Temperatura (100 °C)
 - accelera la completa denaturazione
- Blu di Bromofenolo/glicerolo
 - Si aggiungono un colorante per marcare il fronte



Catena di poliacrilamide polimerizzata in presenza di un agente reticolante ("bis-acrilamide")

TEMED

N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine



Il TEMED catalizza la rottura omolitica dell'APS, producendo così i radicali necessari per la reazione di polimerizzazione radicalica dell'acrilammide.

Il TEMED va conservato al buio, a RT, e possibilmente, in ambiente anidro. Questo perché il TEMED è igroscopico ed in presenza di acqua si ossida perdendo le sue proprietà catalitiche. Il TEMED ossidato si riconosce in quanto assume colorazione giallastra.

Pittogramma di pericolo (regolamento CE 1272/2008)

Simboli di rischio chimico



infiammabile

corrosivo

Nocivo

Ammonio persolfato



L'APS è una molecola instabile, ed estremamente igroscopica. Quando è sciolto in acqua si scompone spontaneamente, pertanto si consiglia di preparare la soluzione appena prima dell'uso. Generalmente, si prepara una soluzione madre al 10 % e la si conserva a -20 °C. APS e TEMED aggiunti in quantità eccessive, oltre ad alterare le proprietà del gel, possono ossidare le proteine del campione.

Pittogramma di pericolo (regolamento CE 1272/2008)

Simboli di rischio chimico



estremamente tossico Comburente Nocivo

Dimensione dei pori del gel

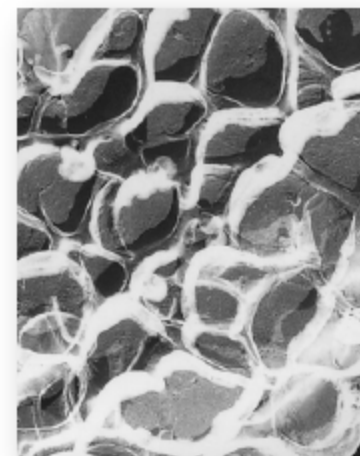
$$\%T = \frac{\text{g(acrylamide + bisacrylamide)}}{100 \text{ ml}} \times 100$$

$$\%C = \frac{\text{g(bisacrylamide)}}{\text{g(acrylamide + bisacrylamide)}} \times 100$$

La dimensione dei pori è funzione della quantità totale di monomeri (% T) presenti nella soluzione e del rapporto tra l'agente cross-linkante e l'acrilammide (% C).

Più spesso la composizione del gel viene data come rapporto in peso acril:bis-acril (per es. 30:0,8).

Porosità del gel



<i>% T</i>	<i>Intervallo di frazionamento</i>
5-12	20.000 – 150.000
10-15	10.000 – 80.000
≥ 15	≤ 15.000

Generalmente al crescere di % T la dimensione dei pori decresce perché l'acrilammide è più concentrata, mentre al disotto del 3% si perde l'effetto setacciante.

- La **poliacrilamide** è il polimero più utilizzato per la elettroforesi di proteine con PM tra 5.000 e 200.000
- 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
 - **La sua porosità può essere controllata** ed è tale che si può modulare l'effetto di setaccio molecolare
 - È utilizzabile per la elettroforesi sia nativa che denaturante



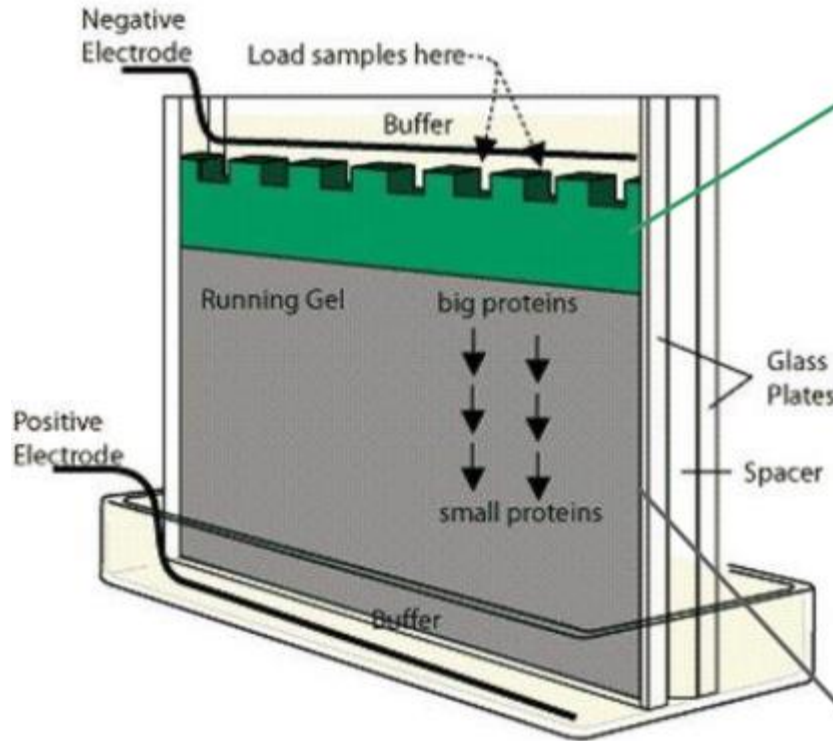
: il monomero è una potente neurotossina

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

- 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, di solito 10 x 10 cm
- Sulla superficie del running gel viene depositata una piccola quantità di acqua o di butanolo per ottenere una superficie piatta

I DUE GEL



Stacking gel

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

Running gel

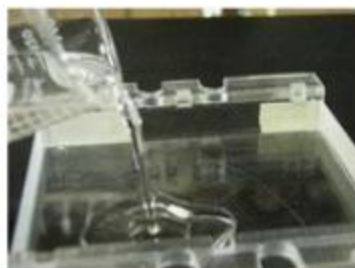
- PAA **12%**
- SDS 10%
- Tris-HCl 1.5 M pH **8.8**

Preparazione del gel di agarosio

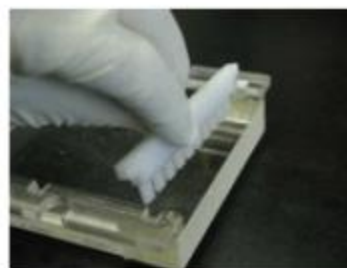
1



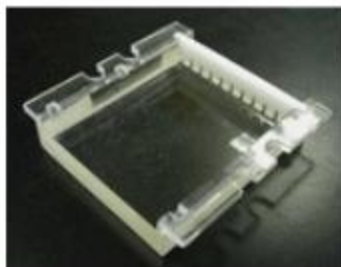
2



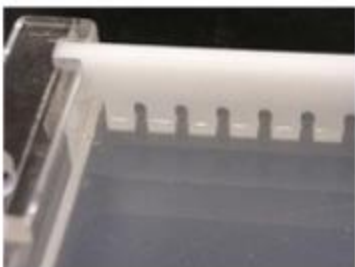
3



4



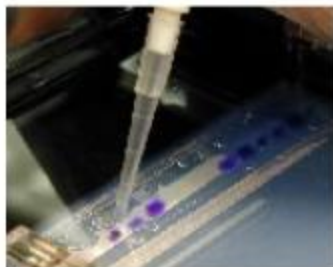
5



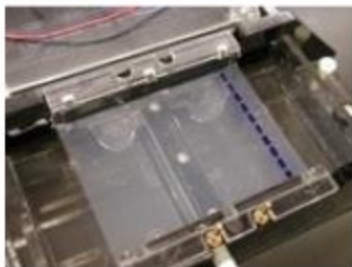
6



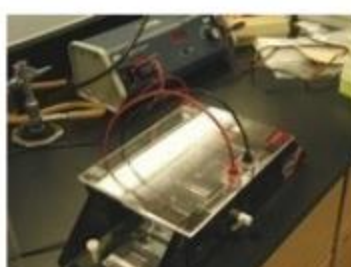
7



8

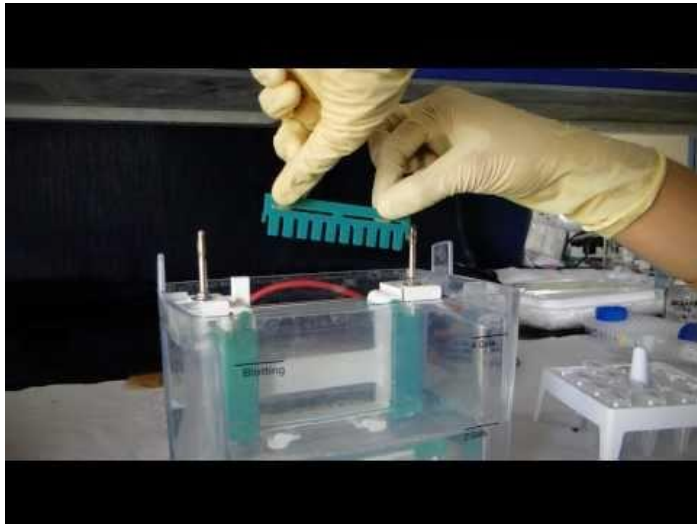


9

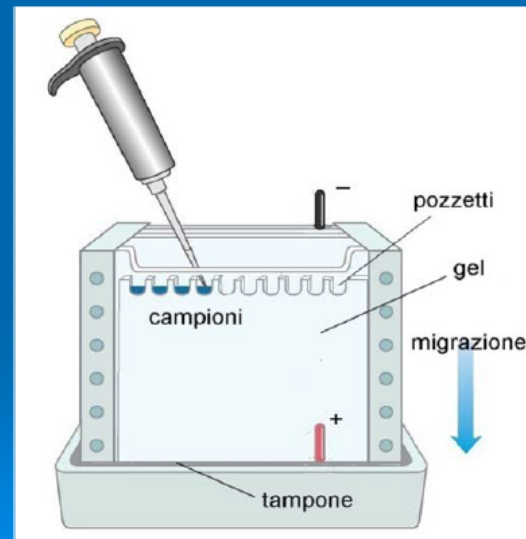


- Dopo la rimozione dell'acqua o del butanolo, al di sopra del running gel viene colato quello che sarà lo stacking gel
- Prima che il gel polimerizzi si sistema sul lato superiore del gel un "pettine" di plastica che a gelificazione ultimata viene tolto lasciando nel gel i pozzetti di alloggio per il caricamento dei campioni

Elettroforesi verticale



Un pettine permette la formazione di pozzetti atti alla deposizione di molti campioni sullo stesso gel



Preparazione dei campioni

SDS: Denatura le proteine e conferisce la stessa densità di carica negativa

DTT (ditiotreitolo) e b-Mercaptoetanololo: Rompe eventuali ponti disolfuro



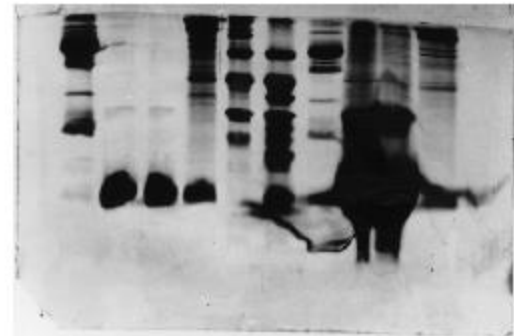
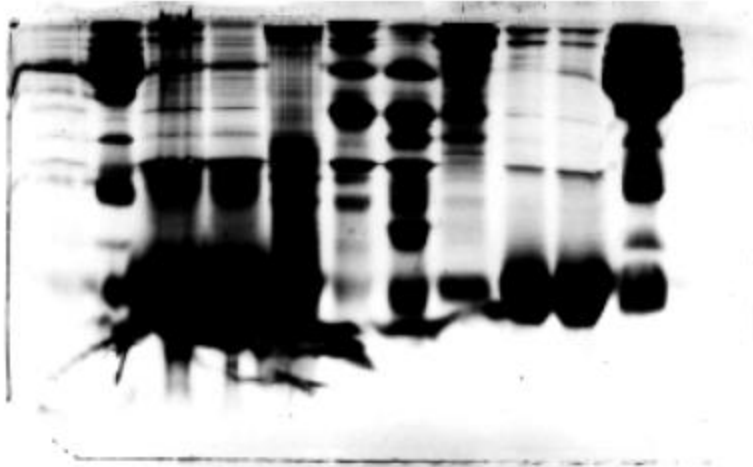
Glicerolo: Aumenta la densità dei campioni depositandoli nel pozzetto

Blu di bromofenolo: Visualizza i campioni e va a costituire il fronte di migrazione

Bollitura (100°C per 2-3 minuti): Accelera la completa denaturazione

Nota Bene:

Il gel di poliacrilamide ha una capacità limitata e sovraccaricarlo con le proteine può dare risultati di precipitazioni ed aggregazione, produzione di striature e macchie. I risultati migliori si ottengono caricando, per ogni pozzetto, 10 μ l di proteina denaturata concentrata 2 mg /ml.



Colorazione

1. Colorazione di proteine con coloranti che si legano con forza ad esse.

Rosso Ponceau

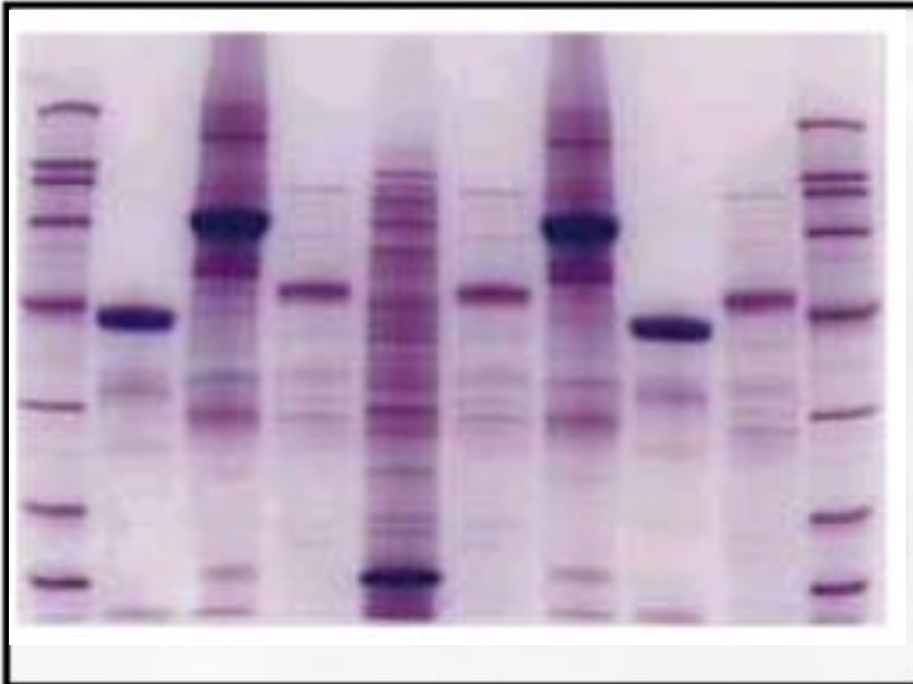
Blue di Coomassie

Colorazione con Argento

Analisi

Dopo preventivo essiccamento (gel dryer system) le proteine colorate su gel possono essere analizzate (PM, quantità) tramite densitometria (scanner, digital camera, densitometro)

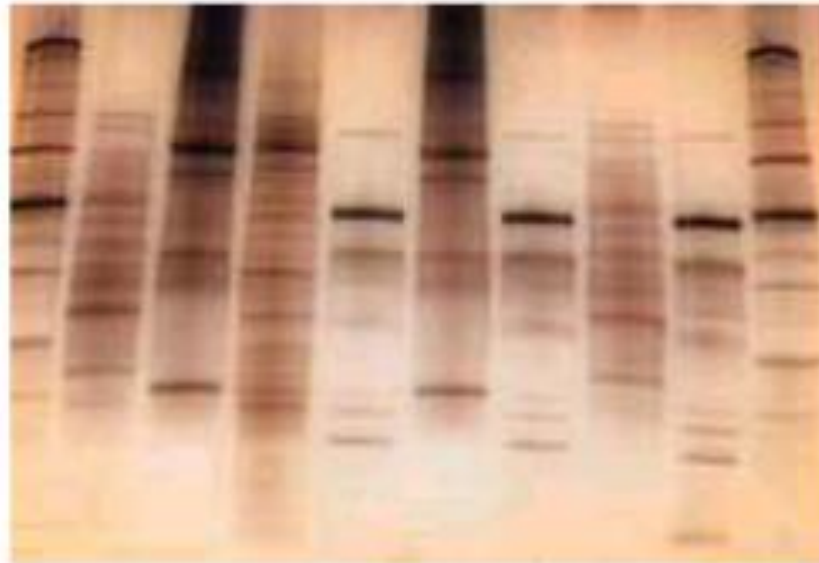
Blue di Coomassie



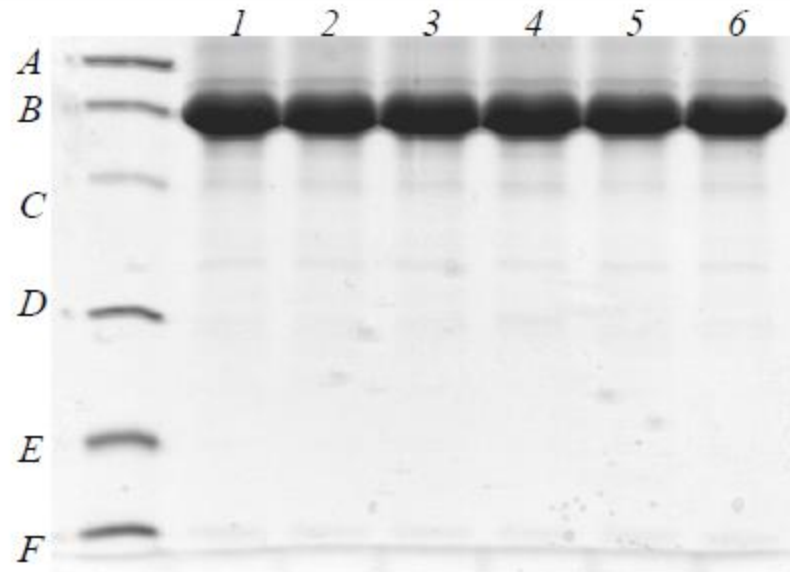
Detection limit: 1–5 μg of protein

Colorazione con l'argento

Detection limit: 0.1–0.5 μg of protein



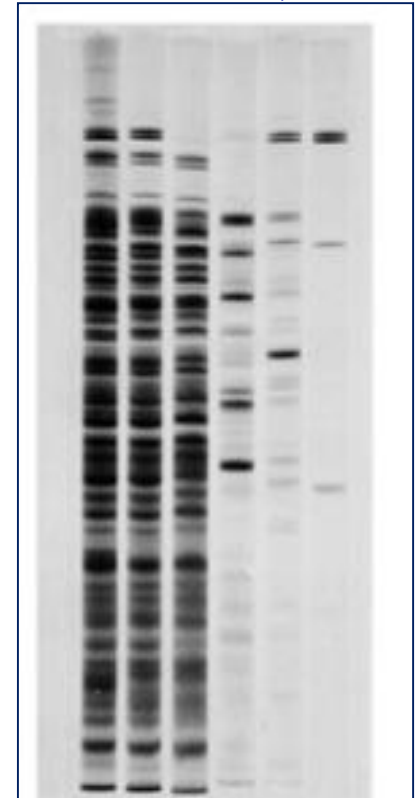
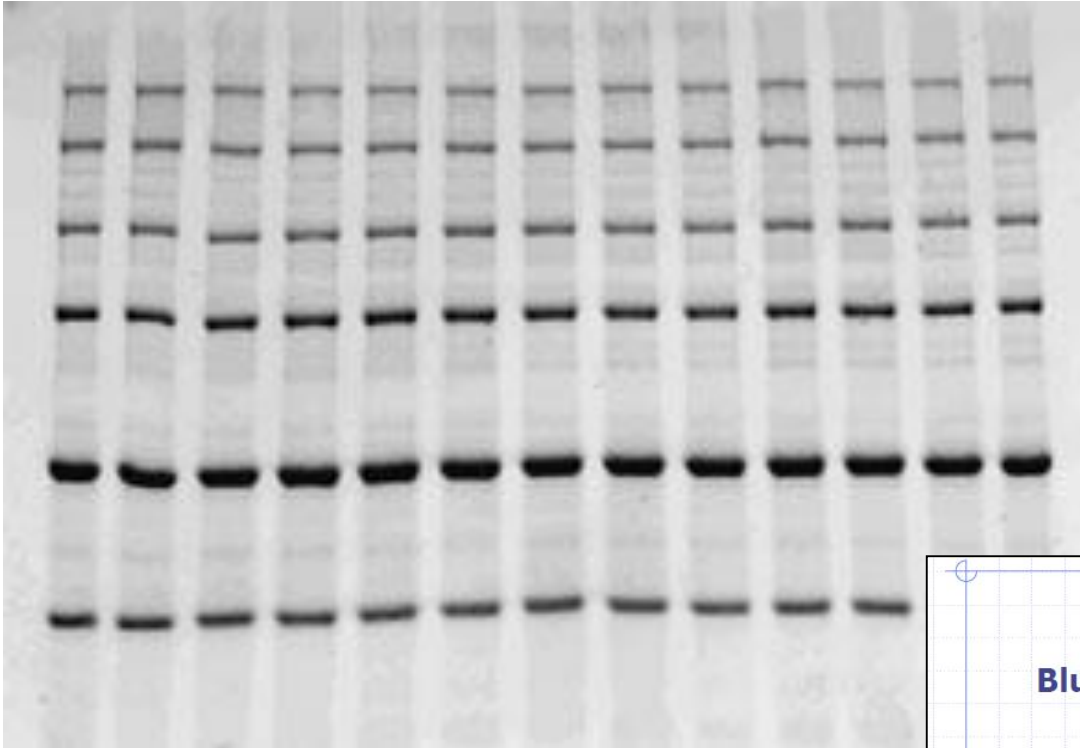
Studio dell'immagine ottenuta



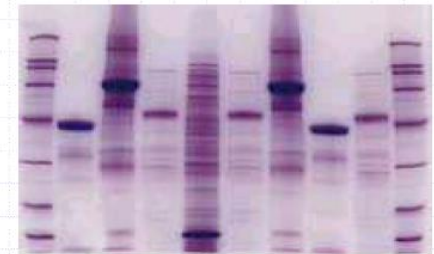
<i>Standard (low range)</i>	<i>MM</i>
<i>A- Fosforilasi B</i>	<i>97.400</i>
<i>B- BSA</i>	<i>66.200</i>
<i>C- Ovalbumina</i>	<i>45.000</i>
<i>D- Anidrasi carbonica</i>	<i>31.000</i>
<i>E- Inibitore della tripsina</i>	<i>21.500</i>
<i>F- Lisozima</i>	<i>14.400</i>

1, 2, 3, 4, 5, 6 = campioni di albumina

Elettroforesi su piastre di gel in presenza di SDS (SDS-PAGE).



Blue Coomassie



Argento

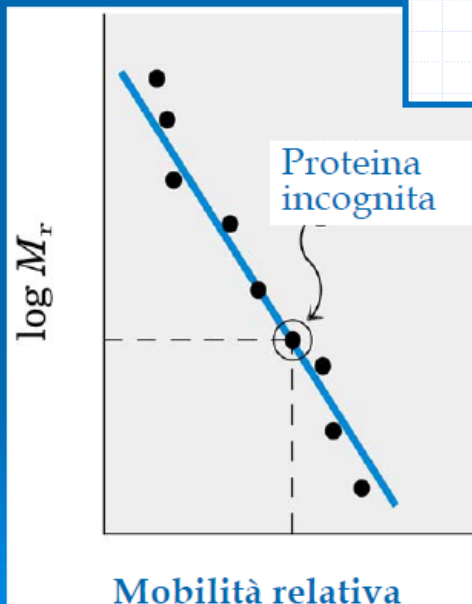
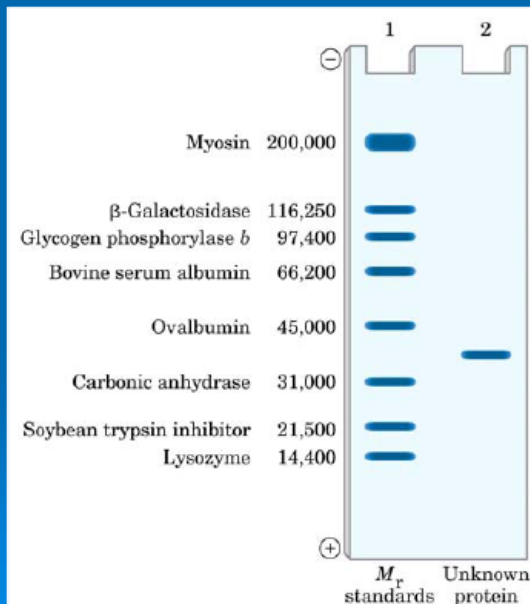


Determinazione della massa molecolare di catene polipeptidiche

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

- 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

SDS-PAGE: determinazione del peso molecolare



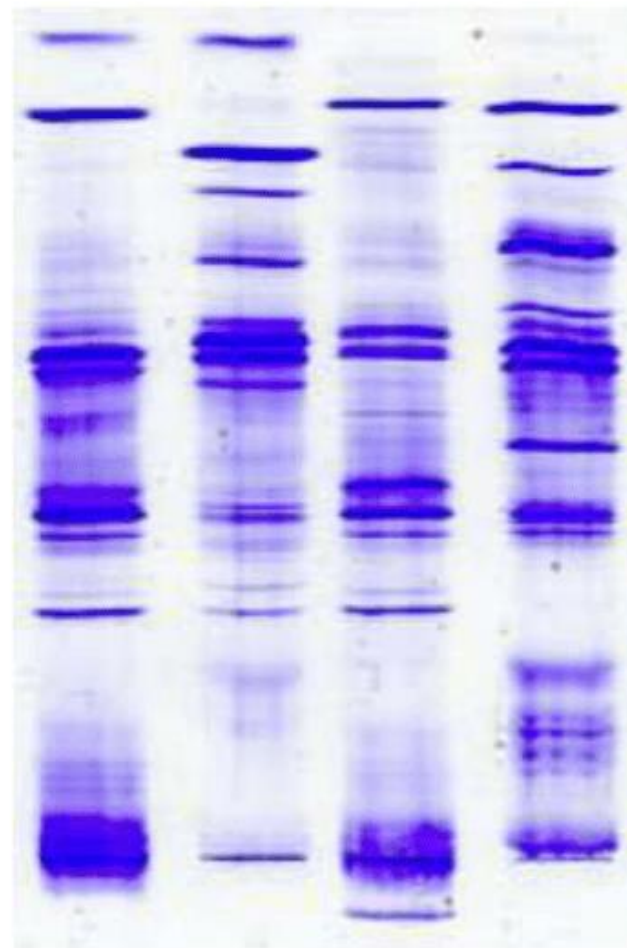
ELETTROFORESI DI PROTEINE

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)

Metodica introdotta nel 1965



FOCALIZZAZIONE ISOELETTRICA (IEF)

pl: 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

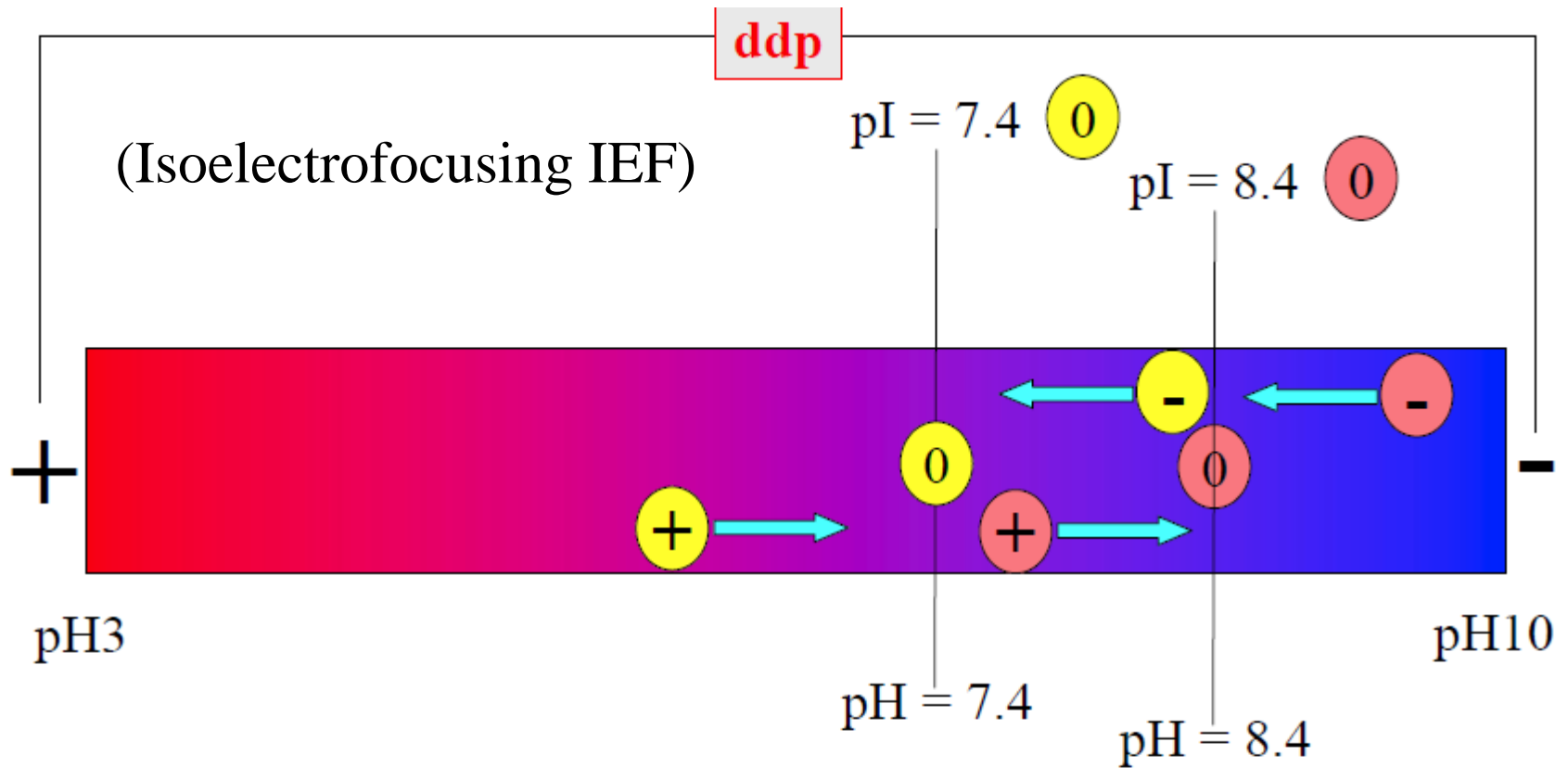
- **Risoluzione** altissima.



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

SVANTAGGI

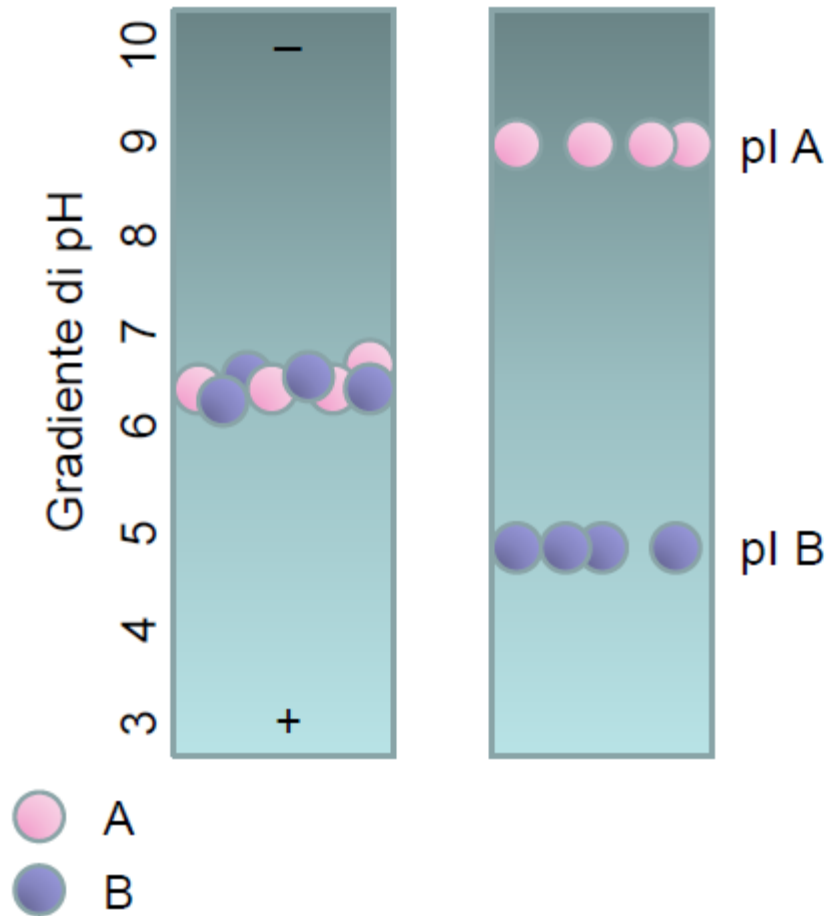
- Costi elevati (apparecchiatura e materiali).
- Richiede ore di lavoro.
- Applicabilità solo a molecole **anfotere**.



Una proteina dispersa in un gradiente di pH, si troverà ad avere carica netta positiva, negativa oppure nulla (se si trova già ad un pH pari al suo pI. Sottoposta all'azione di un campo elettrico **opportunitamente orientato** essa si muoverà, a seconda della carica che reca verso l'elettrodo di segno opposto, fino a raggiungere il pH pari al suo pI. In questo punto essa assume carica netta nulla e non è più sottoposta all'azione del campo elettrico. Se per una qualsiasi ragione essa si muove a dx o a sx, allontanandosi dalla regione dove $\text{pH}=\text{pI}$, essa assume carica e viene nuovamente focalizzata. => Questo conferisce l'alta risoluzione che si ha nelle analisi di isoelettrofocalizzazione.

E' doveroso ricordare che più distante una proteina si trova dal suo pI (in termini di pH) maggiore sarà la sua carica e dunque anche la sua mobilità elettroforetica, mano a mano che essa si avvicina al pH pari al suo pI, la sua carica netta diminuisce e di conseguenza diminuisce anche la sua mobilità elettroforetica => il processo di focalizzazione è un processo che solitamente richiede tempi lunghi, proprio per questo fatto!

FOCALIZZAZIONE ISOELETRICA (IEF)



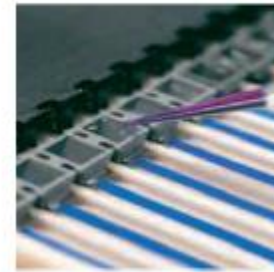
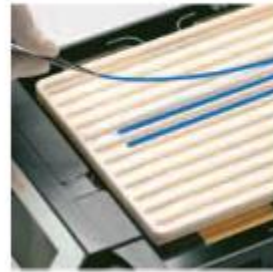
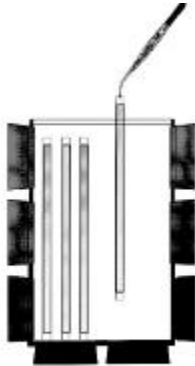
L'intervallo di pH è scelto in modo da contenere i **pI** di **TUTTI** i componenti della miscela da separare.

FOCALIZZAZIONE ISOELETTRICA (IEF)

Tipico supporto



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



- ❖ Eccellente risoluzione ($\Delta pI < 0,01$ unità di pH), bande molto nette e sensibilità elevate;
- ❖ Largo intervallo di pI;
- ❖ Alto voltaggio (generalmente > 1000 V)

Dopo la corsa le proteine vengono rivelate per **colorazione**.



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!)

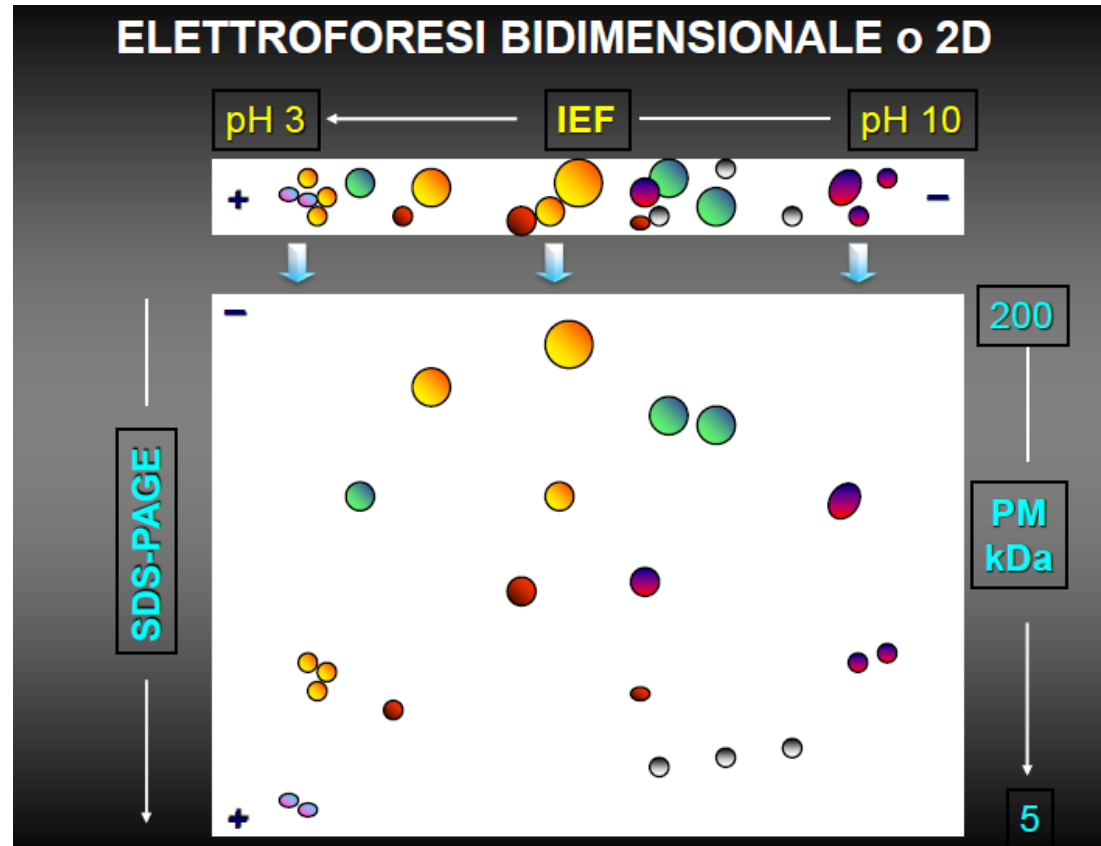
La seconda dimensione

Combina le caratteristiche della IEF, nella quale le proteine sono separate **in base alla loro carica**, con quella della SDS-PAGE classica, in cui le proteine sono separate **in base alla loro massa**.

Tale combinazione consente di disporre di uno dei metodi analitici più sofisticati per la separazione di miscele proteiche complesse.

Dopo l'IEF, il gel viene recuperato dal tubo, incubato con un tampone contenente SDS e quindi viene caricato nel gel contenente SDS.

La separazione avviene quindi in base alle dimensioni.

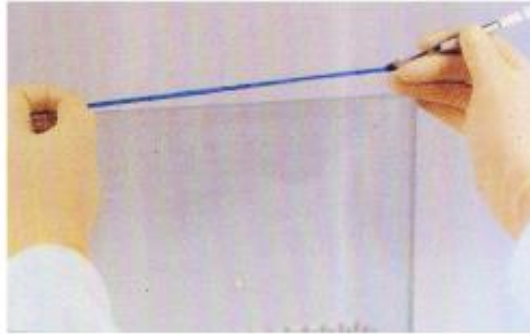


ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE o 2D

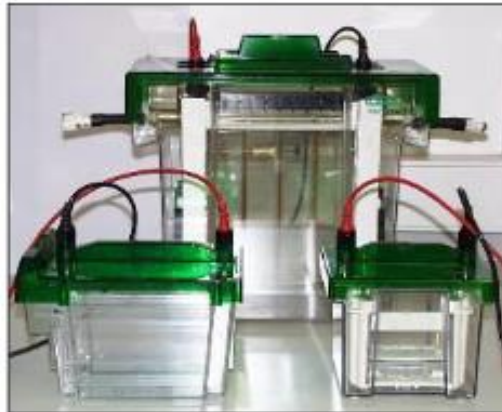
Accoppiamento di 2 metodi monodimensionali elettroforetici. Si effettua **prima** una isoelettrofocalizzazione (IEF), **poi** una SDS-PAGE.

- 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

2° DIMENSIONE: IEF

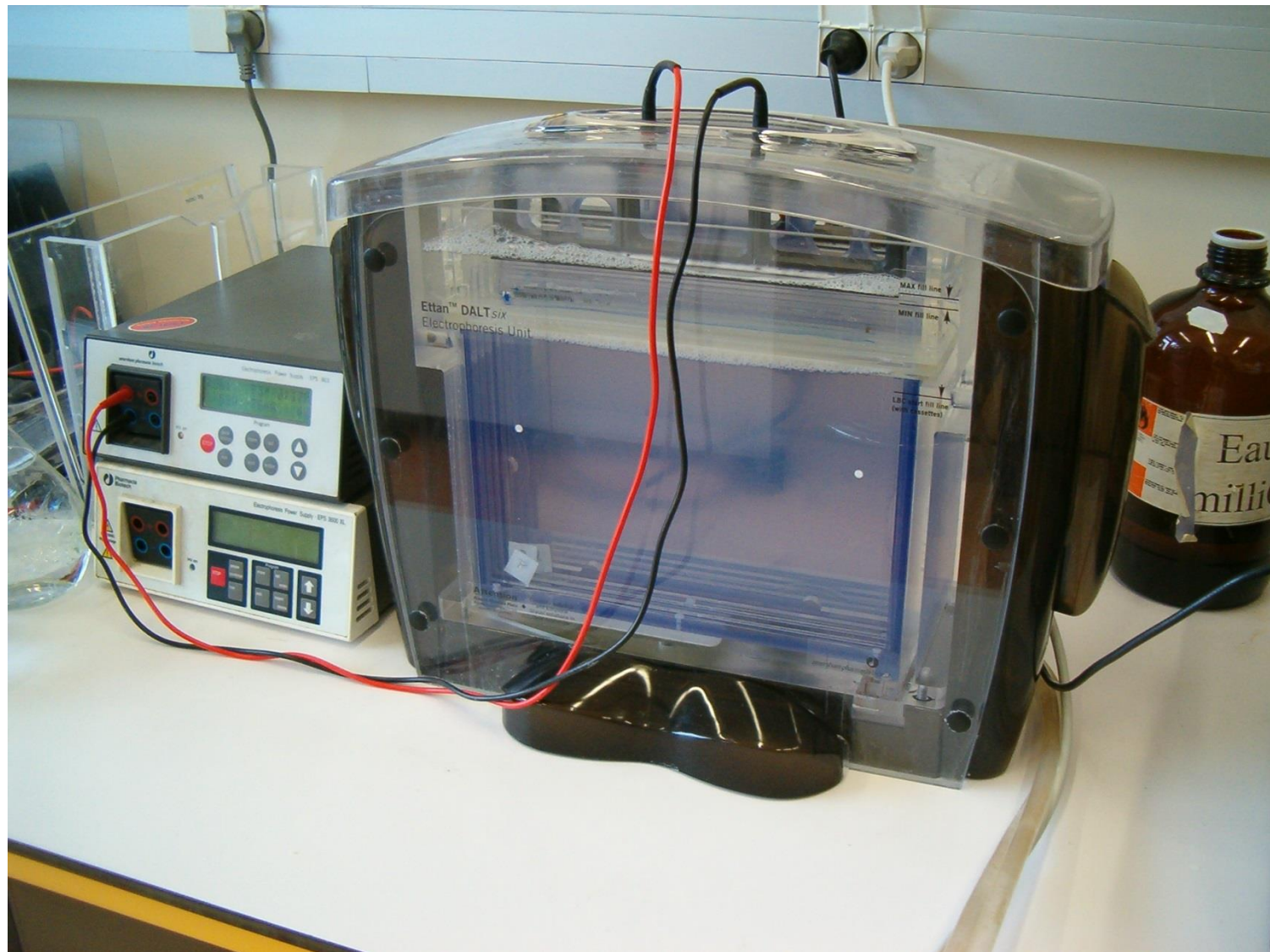


Equilibratura e trasferimento del gel per IEF sulla **sommità** del gel per l'SDS-PAGE (2° dimensione)



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

Elettroforesi 2D



ELETTROFORESI DI PROTEINE

Tipi di gel elettroforesi applicabili alle proteine:

- Elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)
- Elettroforesi in condizioni native
- Isoelettrofocalizzazione (IEF)
- Elettroforesi bidimensionale (2D PAGE)

Quale tipo di elettroforesi usare?
Dipende tipo di analisi che vogliamo fare.

Identificazione/separazione in base alla dimensione	→	SDS-PAGE
Identificazione /separazione in base alla funzione	→	gel nativo
Separazione in base al pi	→	IEF
Analisi di una miscela complessa	→	2D gel

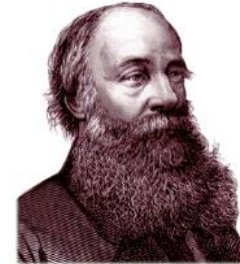
➤ Emissione di calore

- Il problema della maggior parte dei tipi di elettroforesi è che la potenza generata nel mezzo in cui passa la corrente viene dissipata sotto forma di calore



EFFETTO JOULE

$$C = i^2 R t$$



C = calore dissipato

i = intensità di corrente

R = resistenza elettrica

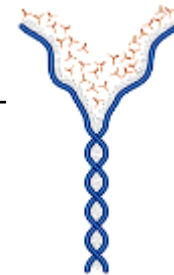
t = tempo



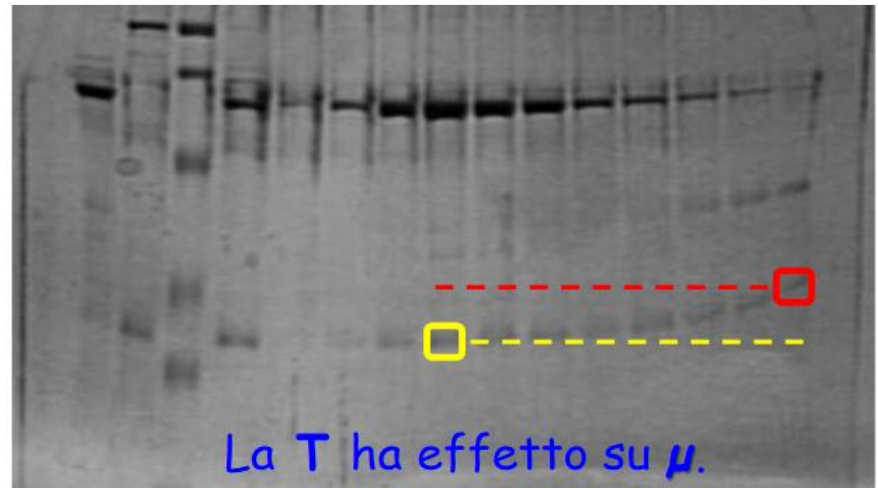
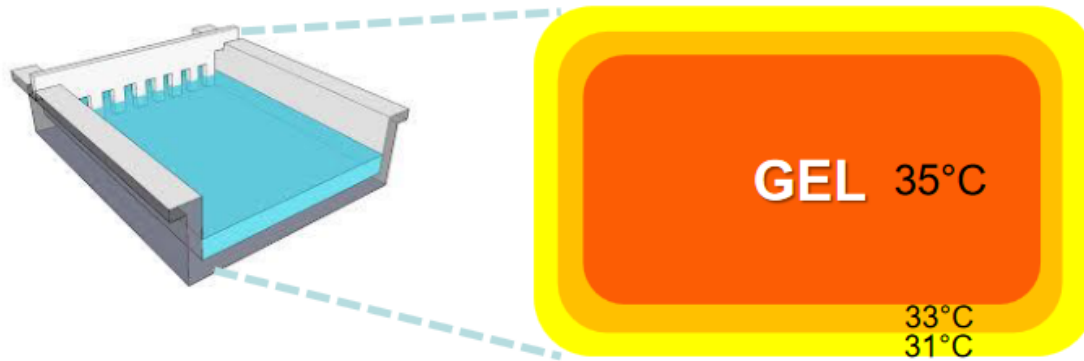


➤ Il calore può avere i seguenti effetti negativi:

- aumento della velocità di diffusione dei campioni e degli ioni del tampone che determina la formazione di bande meno definite
- comparsa di correnti convettive, che portano al mescolamento dei campioni separati
- denaturazione di quei campioni che sono poco stabili alle alte temperature



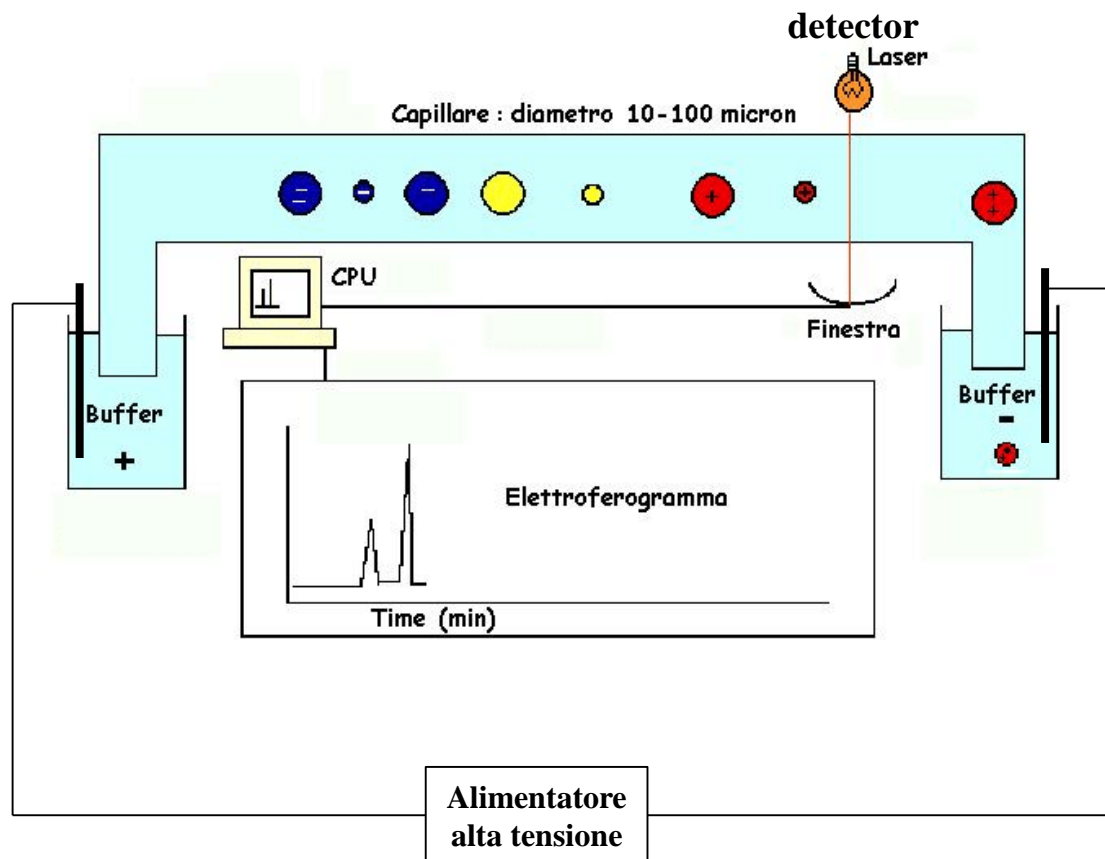
DISPERSIONE NON OMOGENEA DEL CALORE



Lo stesso campione migra diversamente per effetto Joule.

- Il costante sviluppo di calore rimane comunque un serio problema
- Infatti, il tempo che occorre per eseguire l'elettroforesi dipende dall'intensità di corrente
- Si devono adottare delle condizioni di compromesso con l'uso di intensità di corrente adatte per avere tempi di separazione accettabili
- Si deve utilizzare un buon sistema di refrigerazione per dissipare il calore prodotto

ELETTROFORESI CAPILLARE



ELETTROFORESI CAPILLARE

L'elettroforesi capillare (CE) consiste in una famiglia di tecniche di separazione che utilizzano dei **capillari in silice fusa** per separare sistemi complessi di molecole grandi e piccole.

In CE vengono utilizzati **alti voltaggi** e la separazione è funzione della carica e delle dimensioni molecolari.

L'elettroforesi capillare permette di limitare i problemi legati allo sviluppo di calore

Il calore viene facilmente disperso essendo molto alto il rapporto tra la superficie e il volume.

L'elettroforesi capillare è una separazione elettroforetica che avviene in un capillare di diametro variabile tra **25 e 100 μm** .

Strumento

- capillare di silice fusa
- serbatoi separati contenenti due elettrodi
- generatore di voltaggio
- sistema di rivelazione
- sistema di acquisizione dei dati (computer)

Sistemi di rivelazione

- detector UV-vis
- detector a fluorescenza
- detector a conducibilità
- detector elettrochimico
- spettrometri di massa
- detector radioattivo

In dipendenza del tipo di capillare e del mezzo solvente, l'elettroforesi capillare può articolarsi in più tipi di tecniche.

Effettuare l'elettroforesi in un capillare di piccolo diametro permette di utilizzare campi elettrici molto elevati poiché i capillari dissipano efficacemente il calore prodotto.

Aumentare il campo elettrico significa avere separazioni molto efficienti e ridurre i tempi di separazione.

Tipi di molecole separabili con CE

- amminoacidi
- peptidi
- proteine
- acidi nucleici
- ioni inorganici
- acidi e basi organiche
- intere cellule

In conclusione, la CE presenta:

- ☺ alta efficienza di separazione
- ☺ piccola quantità di campione (1-10 μ l)
- ☺ separazione rapida (da 1 a 45 min)
- ☺ selettività
- ☺ automazione
- ☺ possibilità di quantificazione
- ☺ riproducibilità

RNA

ELETTROFORESI IN CONDIZIONI DENATURANTI

Gli acidi nucleici a singolo filamento (come l'RNA) tendono a formare complesse strutture secondarie, pertanto la loro "corsa elettroforetica" è fortemente influenzata dal modo in cui si ripiegano.

NB

L'RNA prima di essere separato per elettroforesi deve essere prima denaturato, al fine di mantenere le molecole in forma lineare

NB

Agenti denaturanti comunemente usati:
calore, formaldeide, formammide, urea

Elettroforesi del DNA

VELOCITA' DI MIGRAZIONE

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

1) Dimensioni del DNA:

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

parametro K varia al variare della [agarosio] nel gel.

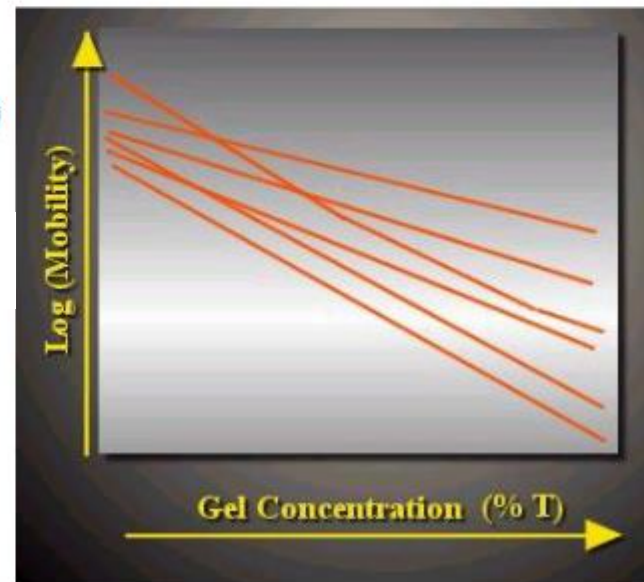
2) Concentrazione di agarosio del gel:

$$\log \mu = \log \mu_0 - K_R \%T$$

μ_0 = mobilità libera del DNA

K_R è il coefficiente di ritardo

Relazione lineare tra il logaritmo della mobilità elettroforetica (μ) e la concentrazione del gel $\%T$



La **concentrazione del gel** influisce sulla risoluzione e la separazione del DNA.

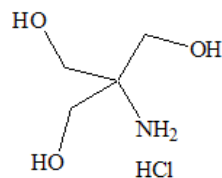
Per una elettroforesi su gel di agarosio standard, una concentrazione di:

- 0,8% dà una buona separazione e risoluzione di grandi frammenti di DNA **5-10 kb**;
- il 2% dà una buona risoluzione per i piccoli frammenti **0.2-1 kb**.
- Il gel **1%** è usato spesso per un elettroforesi standard.

Tamponi (buffers)

In generale, il buffer ideale dovrebbe avere una buona conducibilità e produrre poco calore, non surriscaldarsi troppo.

I più usati sono Tris/acetato/EDTA (**TAE**) e Tris/borato/EDTA (**TBE**)



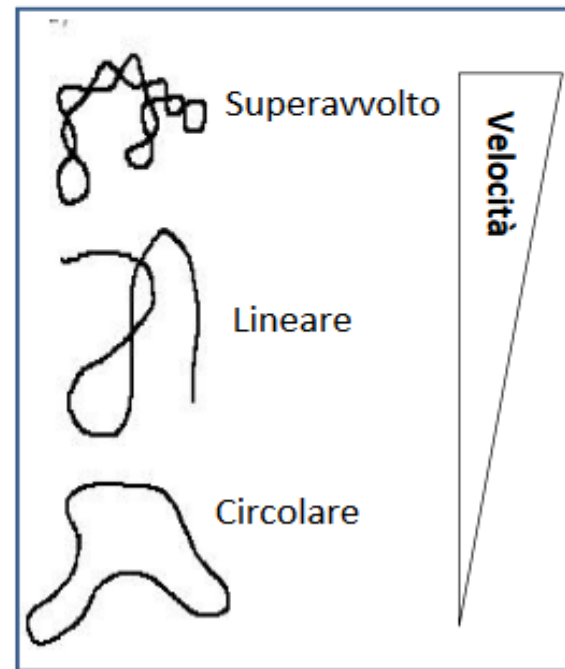
**Tris(idrossimetil)amminometano
Cloridrato**

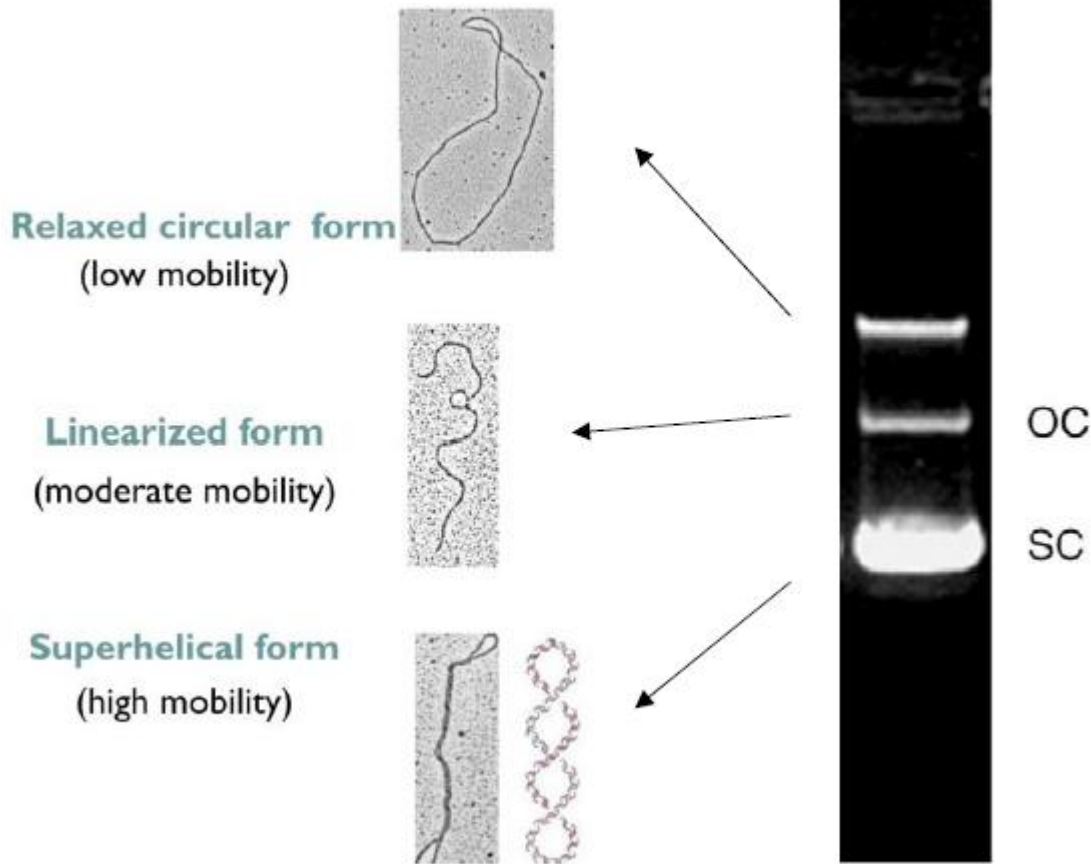
non mostra effetti inibitori su enzimi

3) Conformazione del DNA:

DNA superavvolto, lineare e circolare hanno velocità di migrazione diversa anche se di dimensione uguale:

- La forma SUPERAVVOLTA corre più veloce perché è più compatta;
- La forma CIRCOLARE corre più lenta perché è la più “ingombrante” e fa più fatica 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 nella PCR).





La velocità con cui le varie forme si muovono tuttavia può cambiare usando differenti condizioni di elettroforesi, e la mobilità del DNA circolare può essere maggiormente influenzata rispetto al DNA lineare dalle dimensioni dei pori del gel.

La dimensione di un DNA circolare plasmidico non può essere accuratamente quantificata utilizzando marcatori standard, se non è stato prima **linearizzato** con digestione usando enzimi di restrizione.

4) Composizione in basi

La velocità di migrazione dipende poco dalla composizione in basi

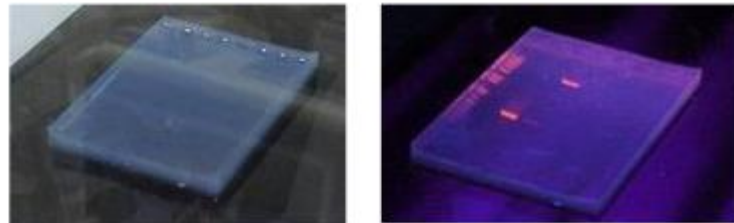
5) Voltaggio applicato:

Proporzionalità diretta a bassi voltaggi (5 V/cm)

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

6) Presenza di bromuro di etidio:

Colorante fluorescente (**intercalante**) utilizzato per visualizzare il DNA.

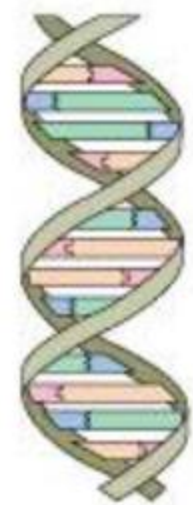


Radiazione UV assorbita a $\lambda = 254 \text{ nm}$ dal DNA
Riemessa a **590 nm** (arancione).

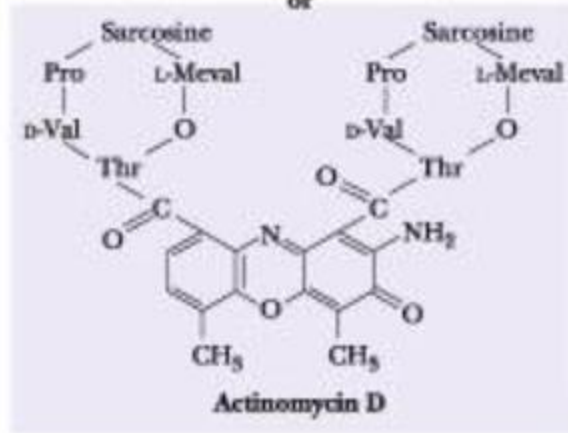
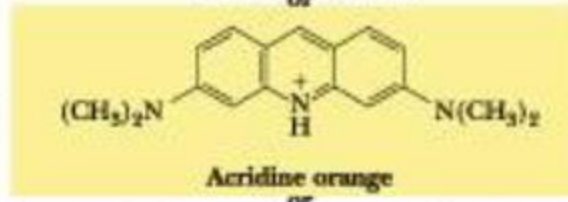
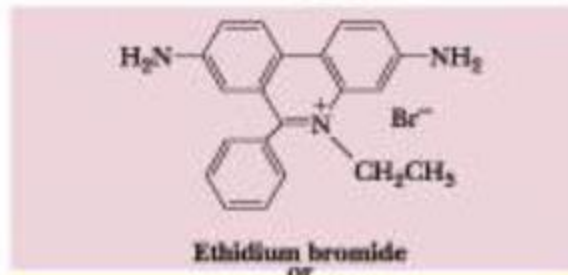
Il colorante riduce la velocità di migrazione del DNA
di circa il **15%** .

Sensibilità
0,1 µg DNA

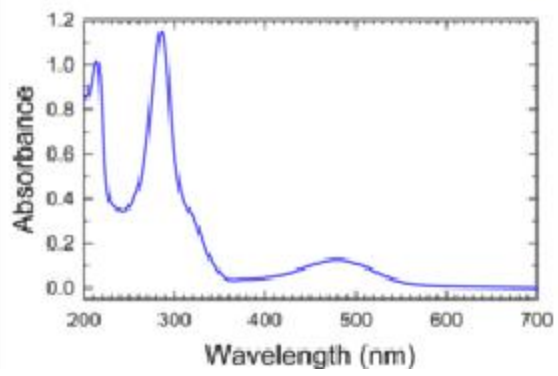
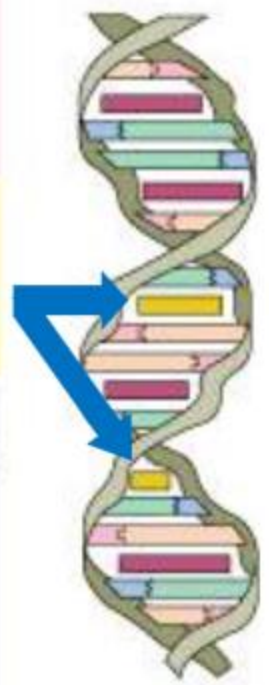
B-DNA before
intercalation



Intercalating agents



B-DNA after
intercalation



SCHEDA DI DATI DI SICUREZZA

secondo il Regolamento (CE) Num. 1907/2006

Versione 5.2 Data di revisione 13.06.2014

Data di stampa 20.10.2015

Ethidium Bromide

SEZIONE 1: Identificazione della sostanza o della miscela e della società/impresa

1.1 Identificatori del prodotto

Nome del prodotto	: Ethidium bromide
Codice del prodotto	: E7637
Marca	: Sigma
N. INDICE	: 612-278-00-6
Num. REACH	: Per questa sostanza non è disponibile un numero di registrazione in quanto la sostanza o i suoi usi sono esentati da registrazione, il tonnellaggio annuale non richiede registrazione oppure la registrazione è prevista ad una scadenza successiva.
N. CAS	: 1239-45-8

1.2 Usi pertinenti identificati della sostanza o miscela e usi sconsigliati

Usi identificati : Chimici di laboratorio, Produzione di sostanze chimiche

1.3 Informazioni sul fornitore della scheda di dati di sicurezza

Società : Sigma-Aldrich S.r.l.
Via Gallarate 154
I-20151 MILANO

Telefono : +39 02-3341-7310
Fax : +39 02-3801-0737
Indirizzo e-mail : eurtechserv@sial.com

1.4 Numero telefonico di emergenza

Telefono per le emergenze : +39 02-6610-1029 (Centro Antiveleeni Niguarda
Ca' Granda - Milano)

SEZIONE 2: Identificazione dei pericoli

2.1 Classificazione della sostanza o della miscela

Classificazione secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008

Tossicità acuta, Orale (Categoria 4), H302

Tossicità acuta, Inalazione (Categoria 2), H330

Mutagenicità delle cellule germinali (Categoria 2), H341

Per il testo completo delle indicazioni di pericolo (H) citate in questa sezione, riferirsi alla sezione 16.

Classificazione secondo le Direttive EU 67/548/CEE o 1999/45/CE

T+	Molto tossico	R68
Xn	Nocivo	R26
		R22

Per il testo completo delle frasi R citate in questa sezione, riferirsi alla sezione 16.

2.2 Elementi dell'etichetta

Etichettatura secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008

Pittogramma



Avvertenza

Pericolo

Indicazioni di pericolo

H302

H330

H341

Consigli di prudenza

P260

P281

P284

P310

Descrizioni supplementari del rischio

Nocivo se ingerito.

Letale se inalato.

Sospettato di provocare alterazioni genetiche.

Non respirare la polvere/ i fumi/ i gas/ la nebbia/ i vapori/ gli aerosol

Utilizzare il dispositivo di protezione individuale richiesto.

Utilizzare un apparecchio respiratorio.

Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

nessuno(a)

2.3 Altri pericoli - nessuno(a)

SEZIONE 6: Misure in caso di rilascio accidentale

6.1 Precauzioni personali, dispositivi di protezione e procedure in caso di emergenza

Usare una protezione respiratoria. Evitare la formazione di polvere. Evitare di respirare vapori/nebbia/gas. Prevedere una ventilazione adeguata. Evacuare il personale in aree di sicurezza. Non inalare polvere.

Vedere Sezione 8 per i dispositivi di protezione individuale.

6.2 Precauzioni ambientali

Evitare sversamenti o perdite supplementari, se questo può essere fatto senza pericolo. Non lasciar penetrare il prodotto negli scarichi.

6.3 Metodi e materiali per il contenimento e per la bonifica

Ritirare e provvedere allo smaltimento senza creare polvere. Spazzare e spalare. Conservare in contenitori adatti e chiusi per lo smaltimento.

6.4 Riferimenti ad altre sezioni

Per lo smaltimento riferirsi alla sezione 13.

GelRed™ & GelGreen™

Safe and sensitive nucleic acid gel stains

GelRed™ and GelGreen™ are next-generation fluorescent nucleic acid gel stains designed to replace the highly toxic ethidium bromide (EtBr). Developed by scientists at Biotium, GelRed™ and GelGreen™ are superior to EtBr and other EtBr alternatives by having a combination of low toxicity, high sensitivity and exceptional stability.

EtBr has been the predominant dye used for nucleic acid gel staining for decades because of its low price and generally sufficient sensitivity. However, EtBr is a highly mutagenic chemical. The safety hazard and costs associated with decontamination and waste disposal can ultimately make the dye expensive and inconvenient to use. For this reason, alternative gel stains, such as SYBR® dyes, have become commercially available in recent years. While these alternative dyes have reduced mutagenicity, they sacrifice sensitivity and stability. For example, SYBR® Safe has very limited sensitivity while SYBR® Green and SYBR® Gold are much less stable than EtBr. SYBR® dyes also enter cells rapidly to stain mitochondria and nuclear DNA, making it more likely for the dyes to be harmful to cells. Indeed, SYBR® Green I has been shown to strongly potentiate DNA mutation caused by UV light and other mutagens (Ohta, et al. *Mut. Res* 492, 91 (2001)).

Safer options for gel staining

To make safer gel stains, scientists at Biotium used a novel yet very simple concept: reducing genotoxicity by preventing the dyes from entering living cells. We believe that the mutagenicity of a DNA-binding dye can greatly be reduced by denying it access to genomic DNA in living cells. Thus, we engineered the chemical structures of GelRed™ and GelGreen™ such that the dyes are incapable of crossing cell membranes. Ames tests have confirmed that GelRed™ and GelGreen™ are nonmutagenic at concentrations well above the concentrations used for gel staining. This is in contrast to SYBR® Safe, which reportedly could not be tested for mutagenicity at its working concentration due to excessive toxicity (see the GelRed and GelGreen Safety Report at www.biotium.com for details). Furthermore, environmental safety tests showed that GelRed™ and GelGreen™ are non-toxic to aquatic life. Because of this, GelRed™ and GelGreen™ are classified as non-hazardous waste, and can be disposed as regular trash or down the drain. For more information, please download the GelRed™/GelGreen™ Safety Report at www.biotium.com.

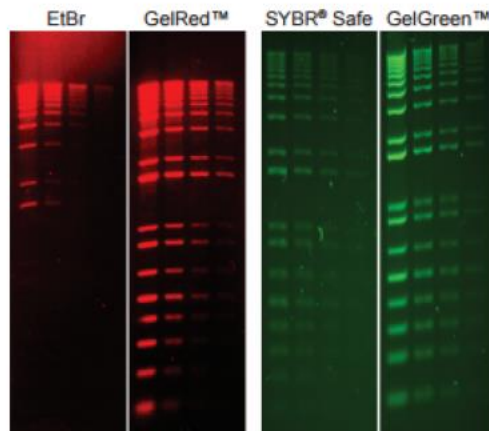


Figure 1. GelRed™ and GelGreen™ are more sensitive than EtBr and SYBR® Safe.

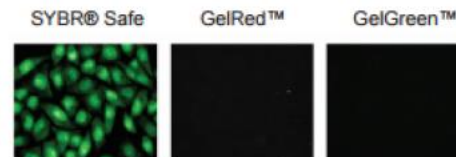


Figure 2. GelRed™ and GelGreen™ gel stains are safer because they cannot penetrate cell membranes to bind DNA in living cells. HeLa cells were incubated at 37°C with 1X SYBR® Safe, GelGreen™ or GelRed™, respectively. Images were taken following incubation with dye for 30 min using FITC filter set for SYBR® Safe and GelGreen™, and Cy5 filter set for GelRed™. SYBR® Safe rapidly entered cells and stained nuclei. GelRed™ and GelGreen™ were unable to cross cell membranes, demonstrated by the absence of fluorescence staining. Staining was observed in dead cells present sporadically in the cultures, as is observed with other non-membrane permeable nucleic acid dyes (not shown). The presence of cell in the imaging field was confirmed by phase contrast microscopy (not shown).

FEATURES

Safer than EtBr

Shown by Ames test and other tests to be nonmutagenic and noncytotoxic.

Easy disposal

Passed environmental safety tests for direct disposal down the drain or in regular trash.

Ultra-sensitive

More sensitive than EtBr and SYBR® Safe.

Extremely stable

Stable in solution at room temperature.

Simple to use

For precast or post-electrophoresis gel staining.

Compatible with standard instruments

GelRed™ replaces EtBr; GelGreen™ replaces SYBR® dyes.

Compatible with downstream applications

Use your regular gel extraction kit to remove dyes from DNA for cloning or sequencing.

7) Composizione e forza ionica del buffer:

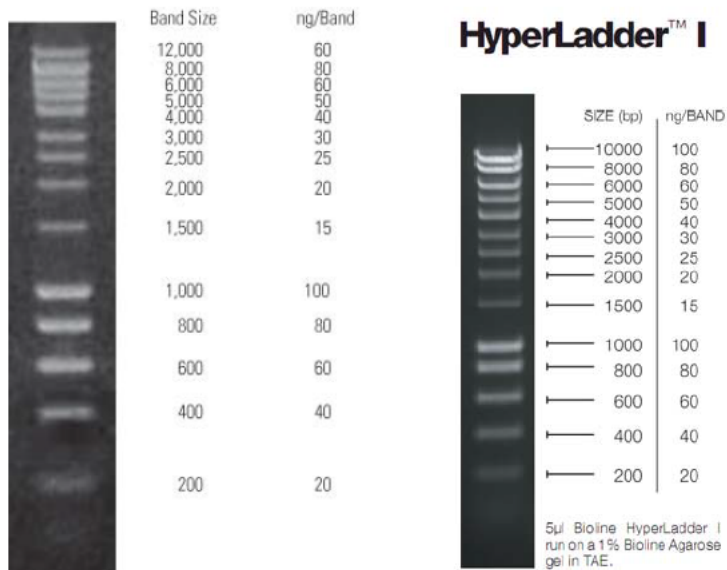
Forza ionica molto **ridotta** → conduttività elettrica bassa → migrazione lenta

Forza ionica **elevata** → conduttività alta → si genera una gran quantità di calore che può sciogliere il gel e denaturare il DNA.

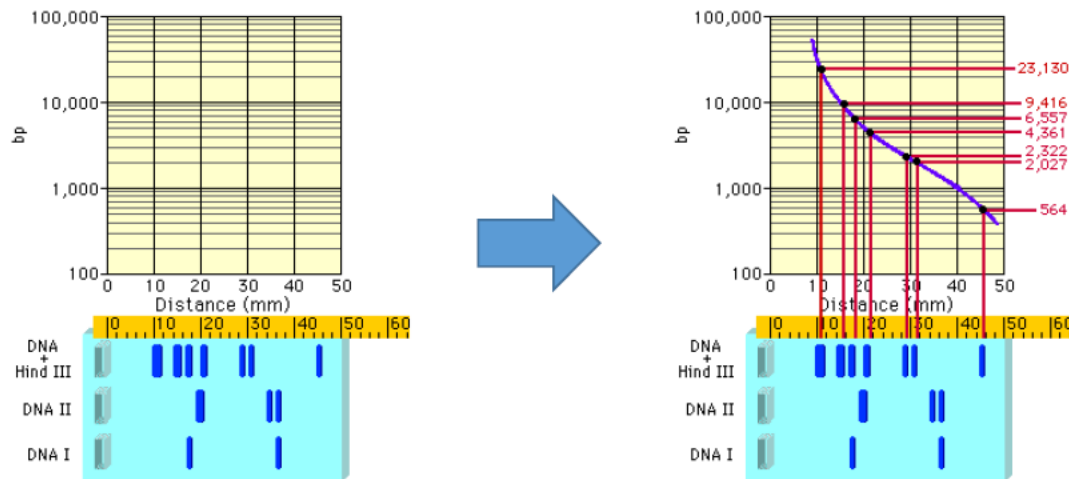
I più usati sono Tris/acetato/EDTA (**TAE**) e Tris/borato/EDTA (**TBE**)

Quantificazione di DNA usando gel di Agarosio

Un marcatore DNA è caricato vicino ai campioni nel gel per misurare la lunghezza kb (lunghezza) e ngr (peso) dei frammenti di DNA

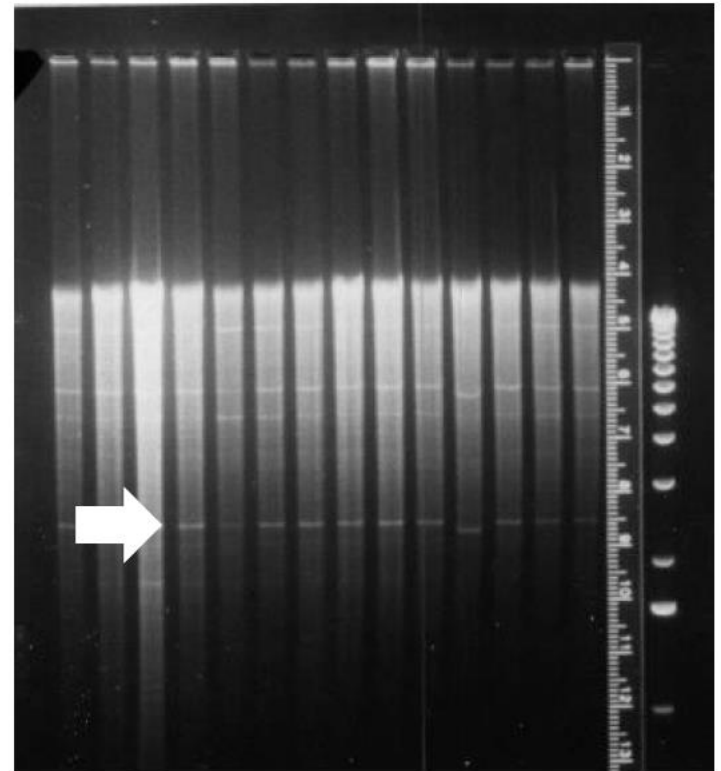
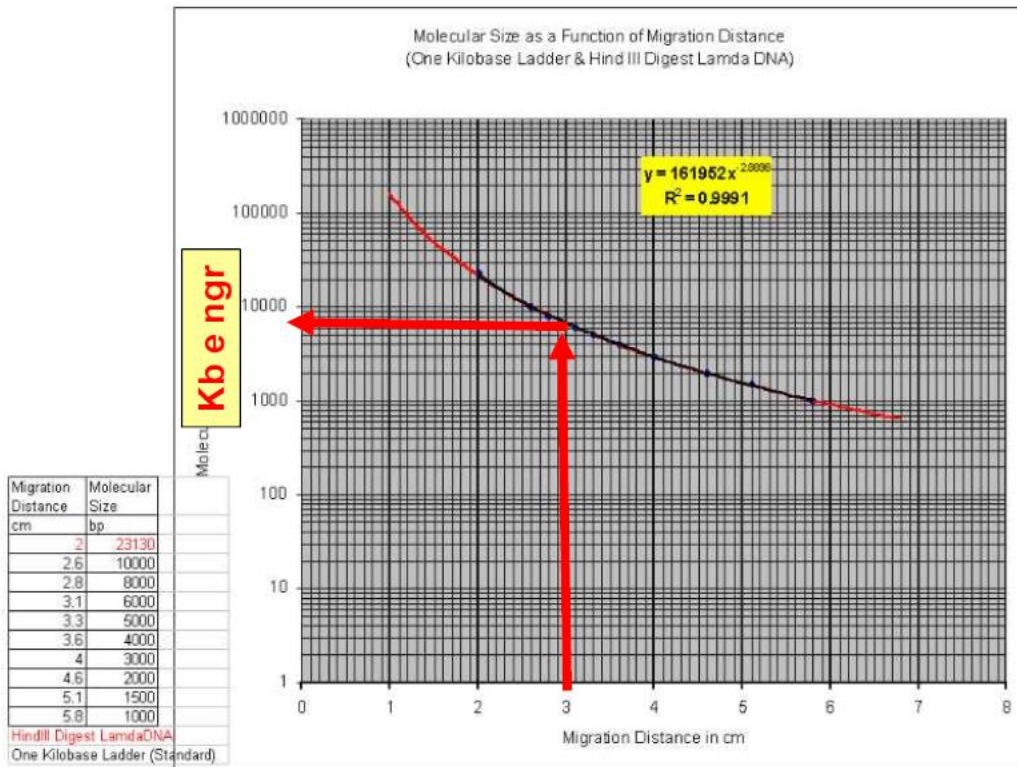


Quantificazione di DNA usando gel di Agarosio



Le molecole di DNA più piccole viaggiano più velocemente rispetto a molecole più grandi in gel, e si muovono ad un tasso che è inversamente proporzionale al \log_{10} del numero di paia di basi (bp). Molecole più grandi vengono risolte meglio utilizzando gel a bassa concentrazione, mentre le molecole più piccole sono separate meglio in gel ad alta concentrazione.

Quantificazione di DNA usando gel di Agarosio



VISUALIZZAZIONE DEL DNA SIA SU AGAROSO, SIA SU PAA

TRANSILLUMINATORE CLASSICO



Schermo
trasparente
agli UV

VISUALIZZAZIONE DEL DNA

TRANSILLUMINATORI MODERNI



Può esser provvisto di sistema
per la rilevazione e **fotografia**
delle bande.



