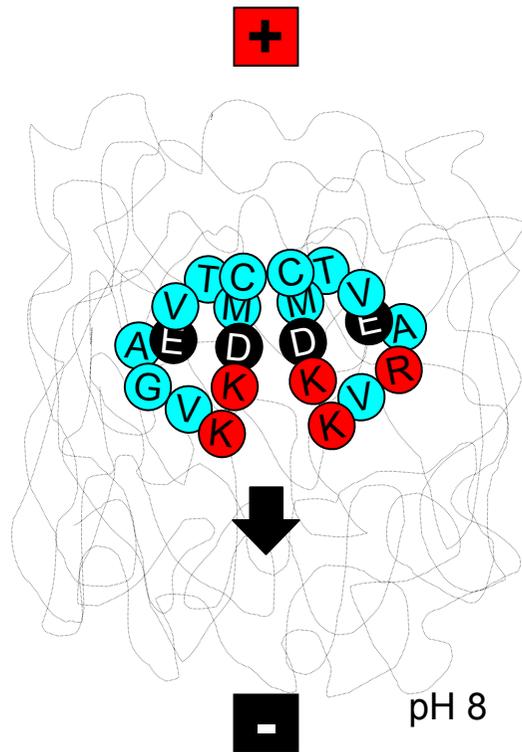


Elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE) - Proteine

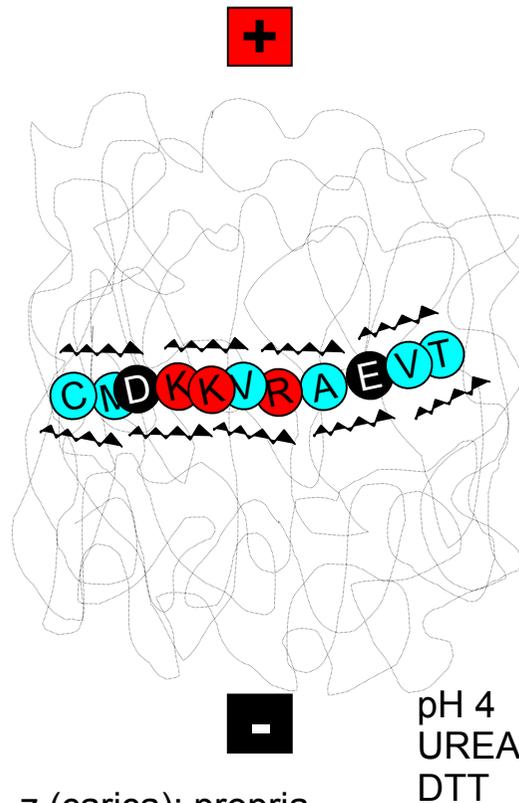
NATIVA



z (carica): propria
Struttura mantenuta (I, II, III, IV)
Separazione:
•Effetto setaccio su struttura II, III e IV
•Carica

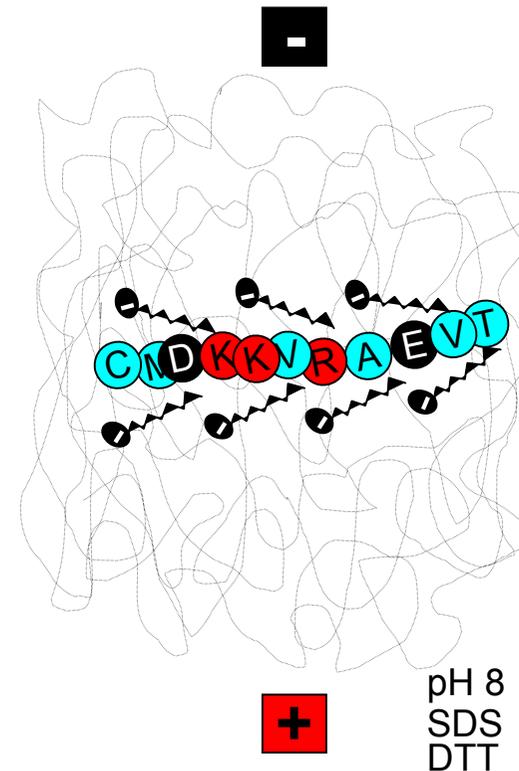
NON NATIVA

Detergenti/agenti caotropici
non ionici



z (carica): propria
Struttura mantenuta (I)
Separazione:
•Effetto setaccio su struttura I
•Carica
Entro certi limiti si può dire
dipendente dal rapporto m/z

Detergenti/agenti caotropici
ionici



Z (carica): imposta
Struttura mantenuta (I)
Separazione:
•Effetto setaccio su struttura I
Entro certi limiti si può dire
dipendente da m (massa)

Elettroforesi

NATIVA

Tris/Glicine-PAGE

25 mM Tris

192 mM Glicine

Scelta iniziale per lo studio di proteine nella loro conformazione nativa

EMSA

(Electro-Mobility-Shift-Assay)

Tris/Borate/EDTA buffer – TBE

Analisi di complessi DNA/proteina

E' una tecnica che si basa sul ritardo nella migrazione anodica del DNA quando questo è legato a una proteina; anche nota come Band Shift

Blue Native Gel

Analisi di complessi proteici e di proteine a bassa solubilità (come ad esempio proteine di membrana)

Tecnica molto particolare che si basa sul fatto che viene aggiunto il Blue Coomassie al tampone di corsa (catodico) e questo si lega alle proteine e conferisce loro una carica negativa che le fa migrare verso l'anodo ma contemporaneamente non le denatura.

NON NATIVA

Detergenti/agenti caotropici non ionici

Acido Acetico/Urea

(AU PAGE)

1M Acido acetico

8M Urea

Triton X-100/Acido Acetico/Urea

(TAU PAGE)

1M Acido acetico

8M Urea

0.5% Triton X-100

AU e AUT PAGE costituiscono una metodica analitica che fornisce ottimi risultati per analisi di proteine fortemente basiche come ad esempio gli istoni

Isoelettrofocalizzazione

Metodica elettroforetica che separa le proteine in base al loro punto isoelettrico

Detergenti/agenti caotropici ionici

SDS-PAGE

25 mM Tris

192 mM Glicine

0.1% SDS

E' la metodica elettroforetica in assoluto più diffusa nei laboratori che si occupano di proteine. Separa le proteine in base al loro peso molecolare – attenzione -

Acido Acetico/Urea/CTAB

(AUC PAGE)

1M Acido acetico

8M Urea

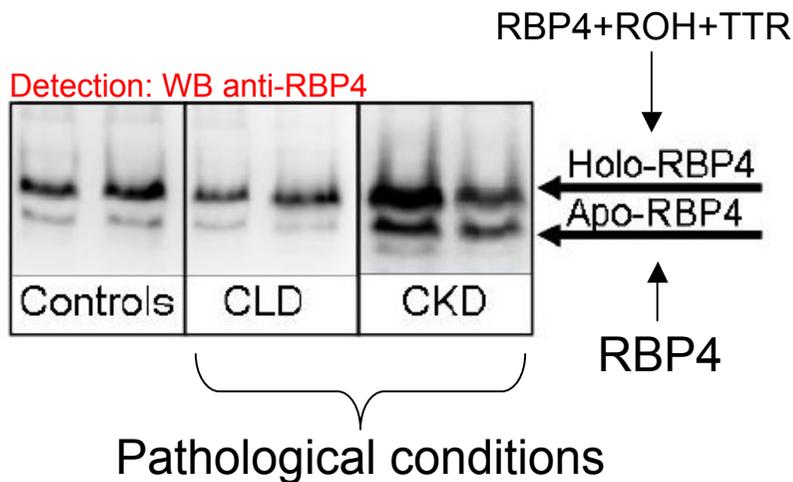
0.15% CTAB

Anche questa metodica, come la AU e la AUT è sfruttata soprattutto per lo studio di proteine basiche e prevede l'utilizzo di un detergente (CTAB) carico positivamente.

NATIVE PAGE - Tris/Gly PAGE

- "Native" or "non-denaturing" gel electrophoresis is run in the absence of detergents.
- The mobility of proteins depends on both the protein's **charge** and its **hydrodynamic size**.
- The electric charge driving the electrophoresis is governed by the **intrinsic charge on the protein at the pH of the running buffer**. This charge will, of course, depend on the amino acid composition of the protein as well as post-translational modifications such as acetylation or phosphorylation.
- Since the protein retains its folded conformation, its hydrodynamic size and **mobility** on the gel **will** also **vary** with the nature of this **conformation** (higher mobility for more compact conformations, lower for larger structures like oligomers).
- If native PAGE is carried out near neutral pH (to avoid acid or alkaline denaturation), it can be used to study conformation, self-association or aggregation, and the binding of other proteins or compounds. This makes them **excellent tools for detecting** things such as:
 - changes in charge due to chemical degradation (e.g. deamidation)
 - unfolded, "molten globule", or other modified conformations
 - oligomers and aggregates (both covalent and non covalent)
 - binding events (protein-protein or protein-ligand).

NB: anodic or cathodic migration depends on the protein charge at that pH (pH of the running gel - some protein can be lost in the running buffer because they migrate away from the gel).
 This separation does not allow to calculate MW of proteins.
 Mobility is the result of a set of properties.



SAMPLE CKD: abnormal abundance of Apo-RBP4

Resolving gel (see later)

0.375 Tris/HCl, pH 8.8.

Stacking gel (see later)

0.125 M Tris/HCl, pH 6.8.

Sample:

10 µl of serum diluted 1:20 in sample buffer (0.125 Tris/HCl, 2.74 M glycerol, 0.1 mM bromphenol blue, pH 6.8)

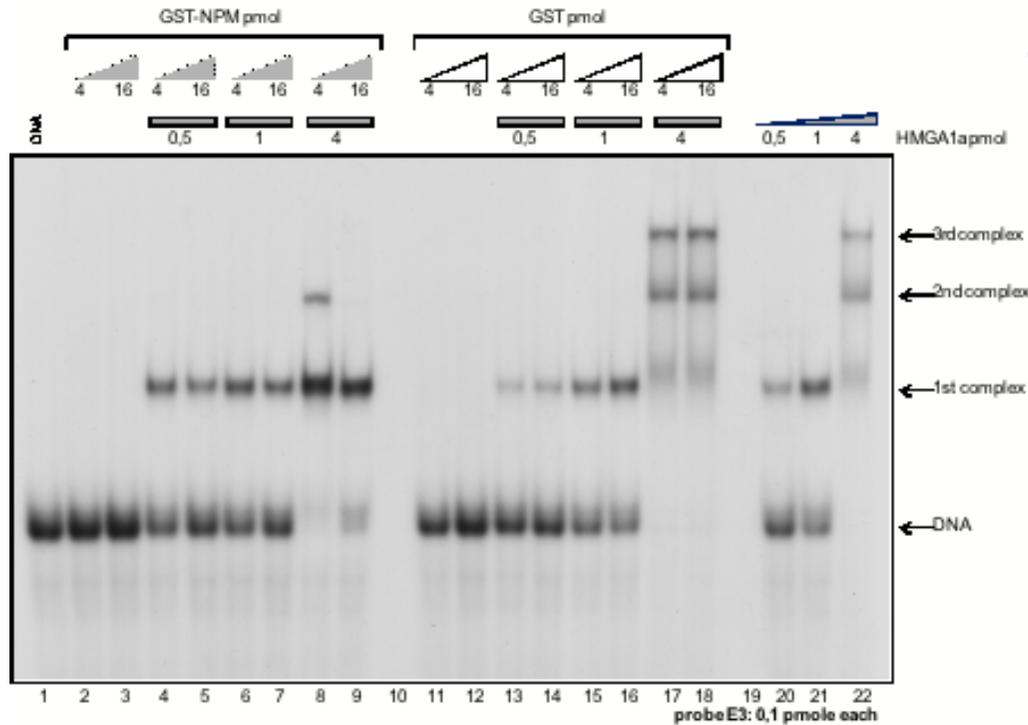
NB:

pH: it should be within non denaturing conditions.

Glycerol: (it is necessary to make the protein solution dense and to allow the loading into the wells).

Bromphenol blue: it is a tracking dye for the electrophoretic separation. It should always be the fastest migrating molecule in the separation.

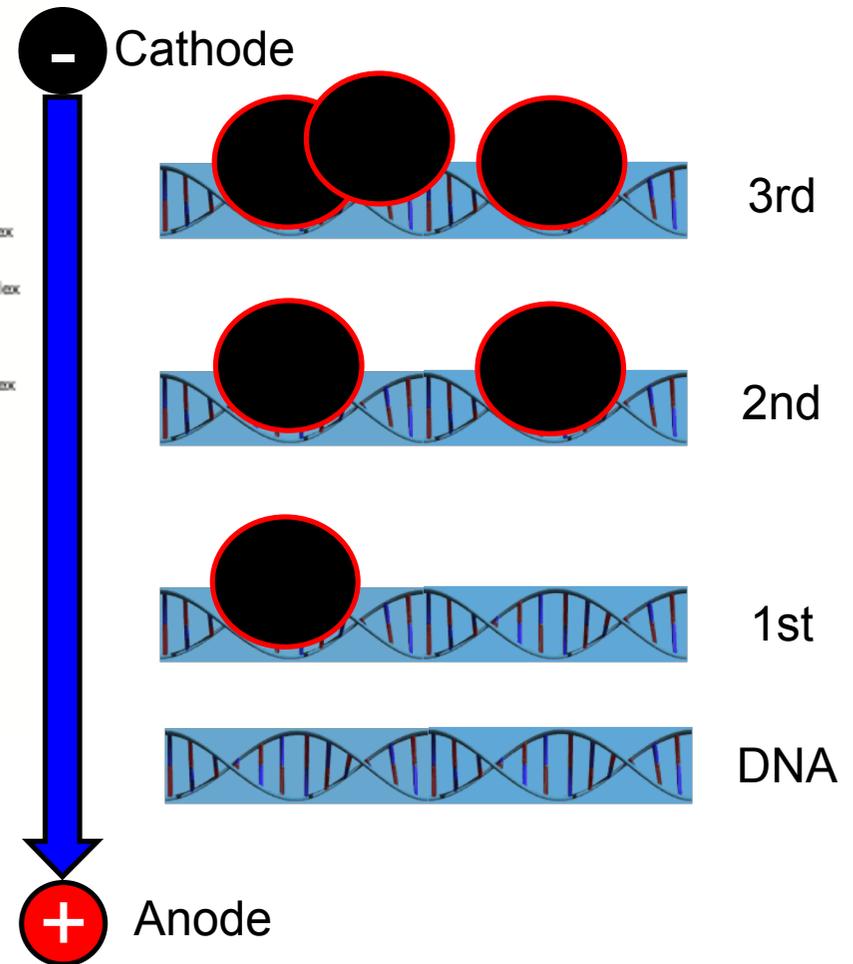
NATIVE PAGE – DNA/Protein complexes (EMSA)



Gel: Polyacrilamide (T= 7%) in TBE buffer **Anodic and catodic buffer & Gel buffer:** TBE (Tris/HCl 50 mM, Boric Acid 50 mM, EDTA 2 mM) **Binding Buffer:** 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 75 mM KCl, 1 mM DTT, 5 microg/mL BSA, DNA competitor (TBD)

NB: presenza di competitori aspecifici (proteine e DNA)

Attenzione alle condizioni di corsa - evitare assolutamente il riscaldamento del gel



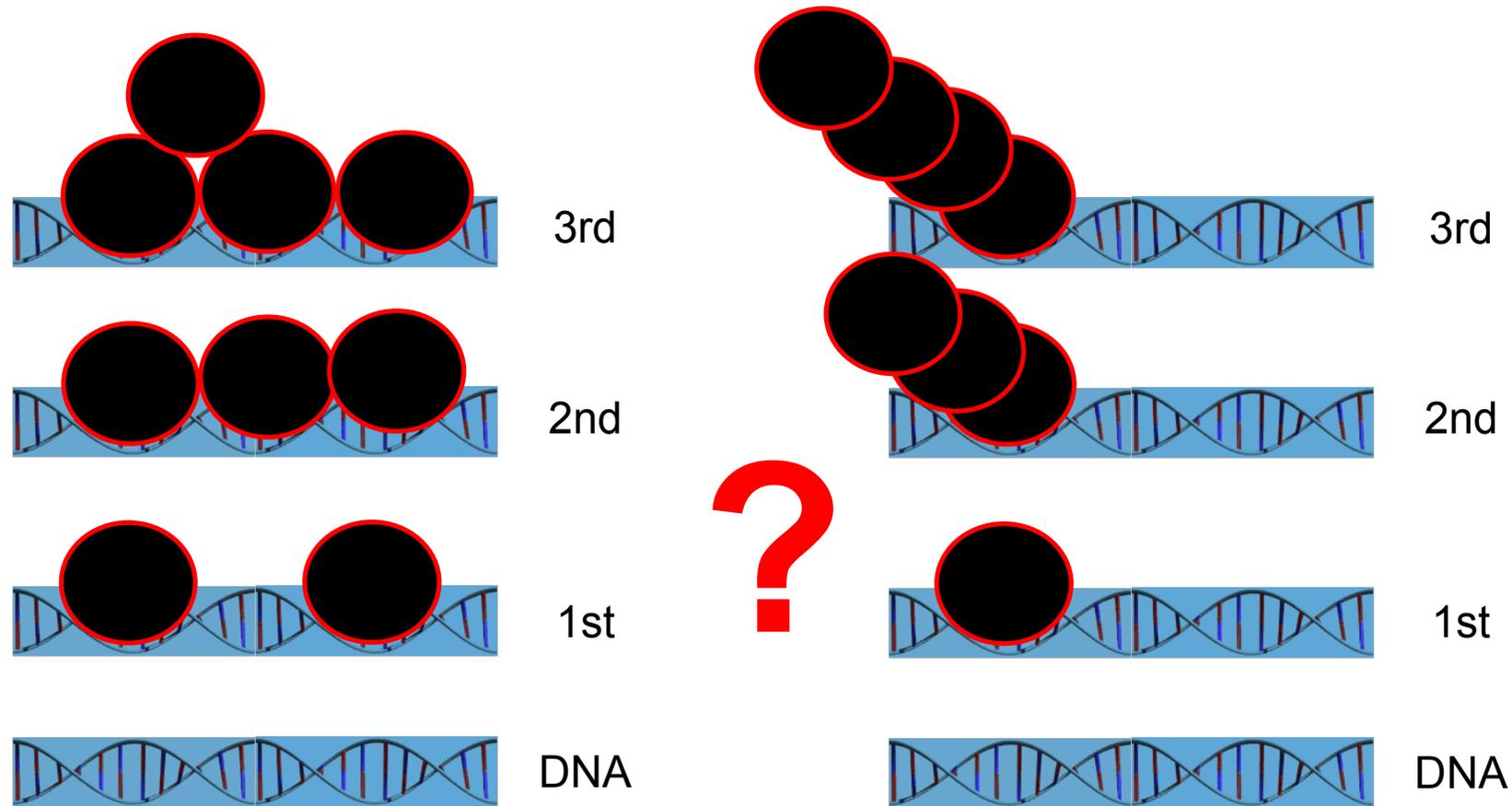
EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay (anche noto come Band Shift).

Complessi **Proteina/DNA** migrano verso anodo (polo+) a causa della forte carica negativa del DNA. Se il DNA è “libero” da proteine esso ha una mobilità elettroforetica maggiore rispetto a quando è complessato con una o più proteine (ritardo nella migrazione).

Complessi proteina/DNA non si dissociano per via **dell'effetto gabbia** (cage effect) del gel! Proteina e DNA sono in continuo equilibrio (legati/dissociati). Sotto azione di un campo elettrico quando dissociati migrerebbero da parti opposte (molto spesso le proteine che legano il DNA sono fortemente cariche positivamente e migrerebbero verso il catodo) e questo impedirebbe la visualizzazione di un complesso. Il fatto che siano all'interno di un gel, in pratica impedisce la dissociazione del complesso.

La visualizzazione puo avvenire con diverse strategie. La più comune è la marcatura del DNA con **fosfato radioattivo** (^{32}P), che nel tempo però è stata rimpiazzata da marcatura del DNA con **fluorofori**.

Attenzione all'interpretazione dei risultati!!!!!!!!!!!!!!

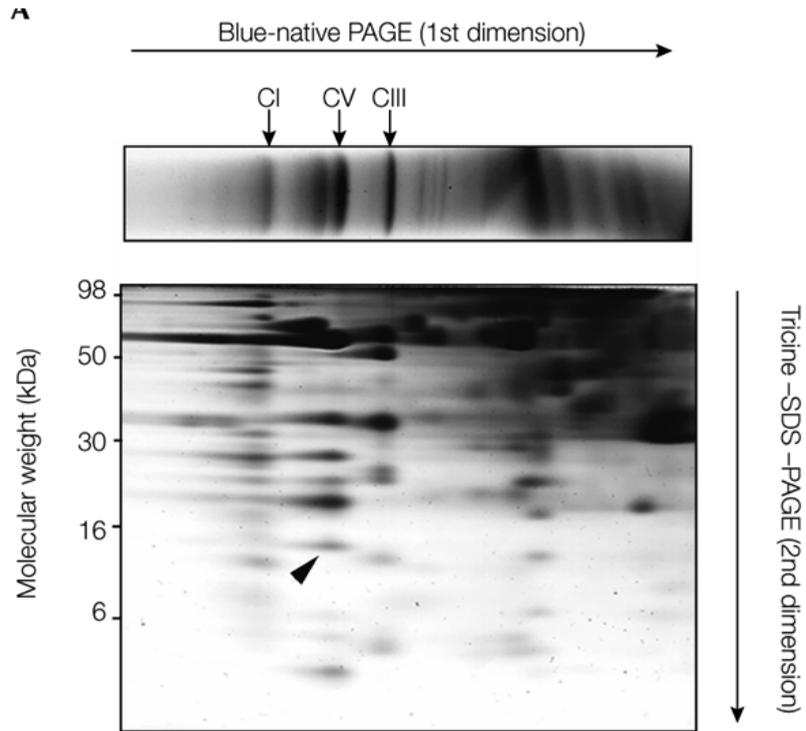
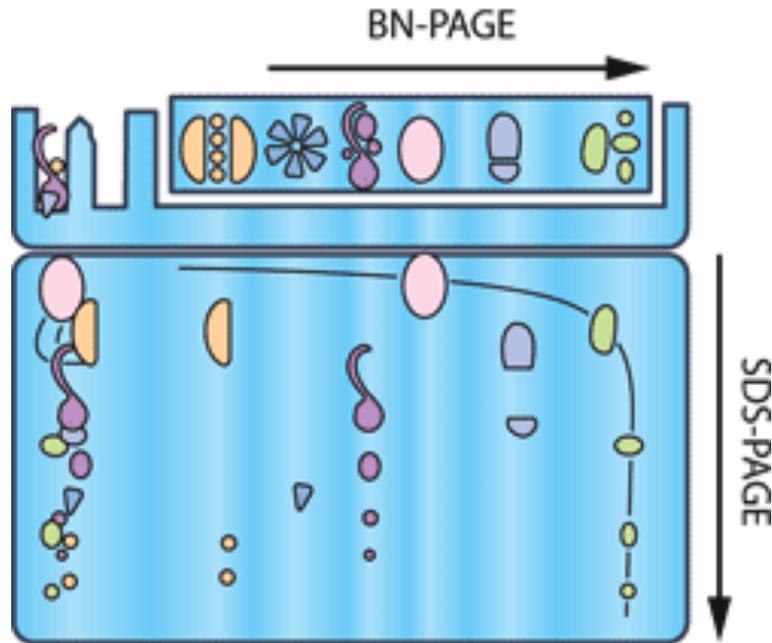


Dall'immagine e dal numero delle bande elettroforetiche "ritardate" non possiamo desumere la stechiometria dei complessi proteina/DNA. Occorrono altri tipi di analisi per poter stabilire la stechiometria esatta e la conformazione del complesso.

L'immagine mostrata nella pagina precedente dice semplicemente che si possono formare fino a 3 complessi diversi e che la formazione di questi complessi dipende dalla disponibilità della proteina (ovvero dalla sua concentrazione).

Per interpretare correttamente un risultato dobbiamo conoscere la metodica!

NATIVE PAGE: BLUE NATIVE PAGE



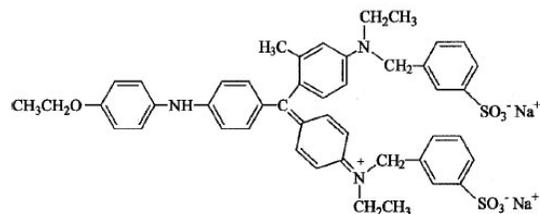
Blue Native Page: Metodica elettroforetica condotta in condizioni native. Il Blue Coomassie (BC - vedasi la struttura riportata sotto) si lega alle proteine e conferisce una carica netta negativa. La sua azione come detergente non è però così forte da portare a denaturazione le proteine e i complessi macromolecolari in cui sono inserite che in tal modo rimangono nella loro conformazione nativa (struttura I, II, III e IV mantenute integre). Il BC viene utilizzato assieme ad altre molecole che aiutano a mantenere in soluzione i complessi macromolecolari e a “rompere” l’ambiente in cui questi complessi macromolecolari si trovano, come ad esempio le membrane cellulari. Questa elettroforesi viene di solito condotta in **modalità 2D**, abbinata all’SDS-PAGE

Coomassie Blue G250: fornisce carica negativa senza dissociare i complessi macromolecolari (1)

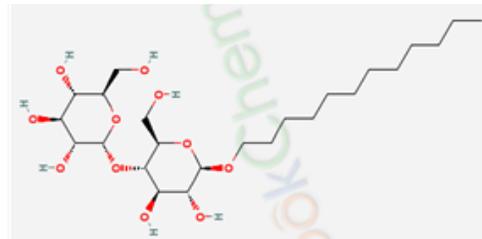
Dodecyl-beta-D--maltoside: detergente per solubilizzare le membrane mitocondriali (2)

Acido aminocapronico (sale zwitterionico): solubilizzazione delle proteine (3)

1



2



3

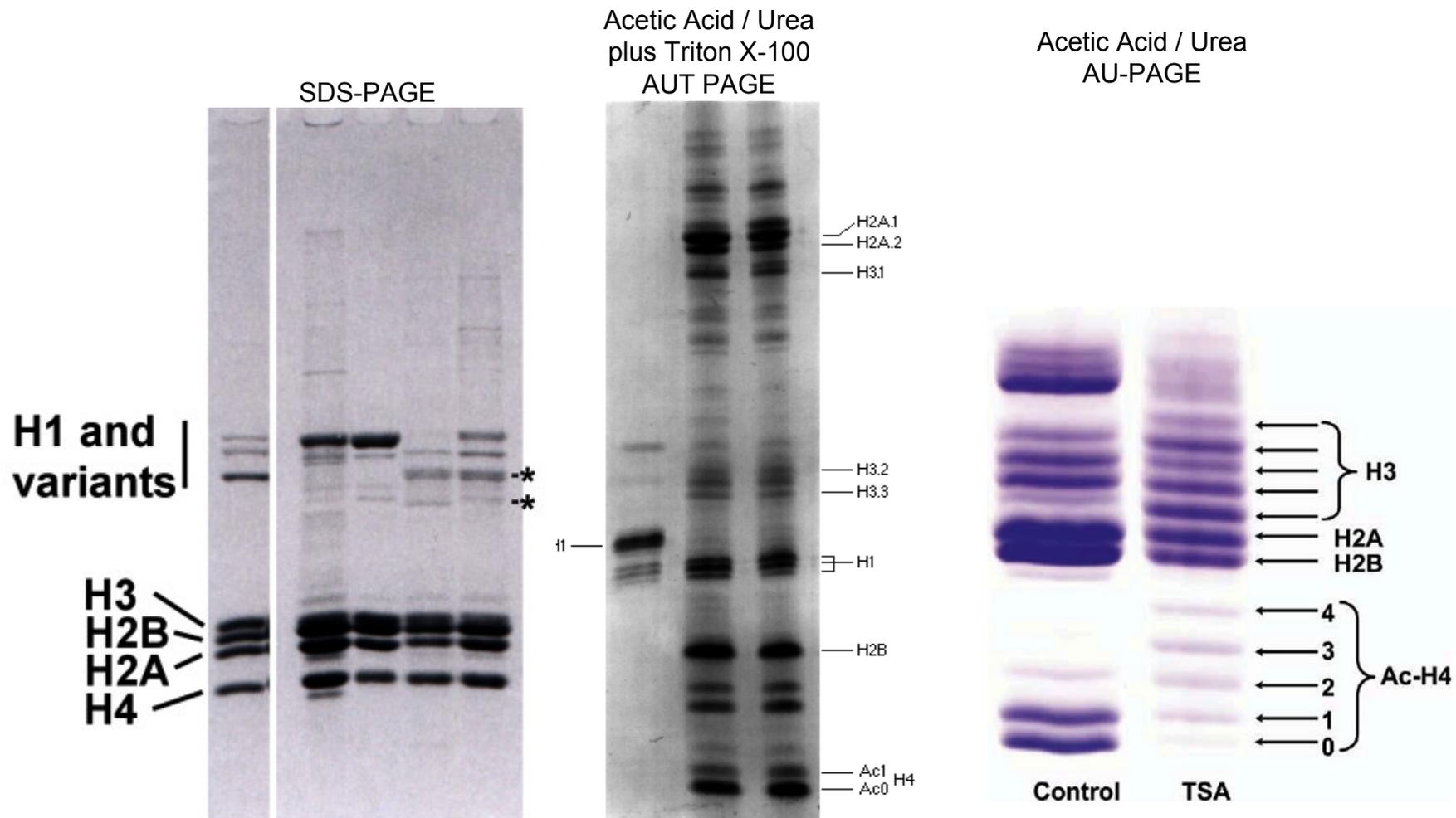


Elettroforei in condizioni denaturanti: Acetic Acid / Urea PAGE

Metodica elettroforetica condotta in condizioni denaturanti ma dove la carica è data dai gruppi ionizzabili della proteine. Condotta a pH acido - acido acetico - La corsa è di tipo catodico, verso il polo negativo. Le proteine si muovono secondo il loro rapporto m/z

Di seguito sono riportate delle analisi elettroforetiche condotte in condizioni diverse: SDS-PAGE, AUT-PAGE a AU-PAGE. Notare la differente mobilità elettroforetica a seconda del tipo di analisi adottata (**selettività diversa**)

Le diverse metodiche elettroforetiche utilizzate per separare gli istoni nucleosomiali forniscono una diversa **SELETTIVITA'**. In questo modo vengono fornite **opportunità analitiche differenti**.

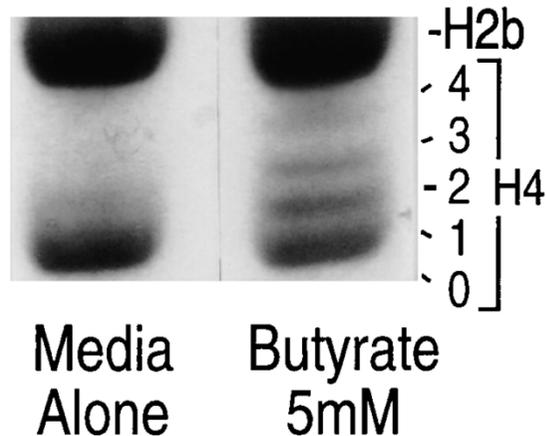


Acetic Acid / Urea PAGE

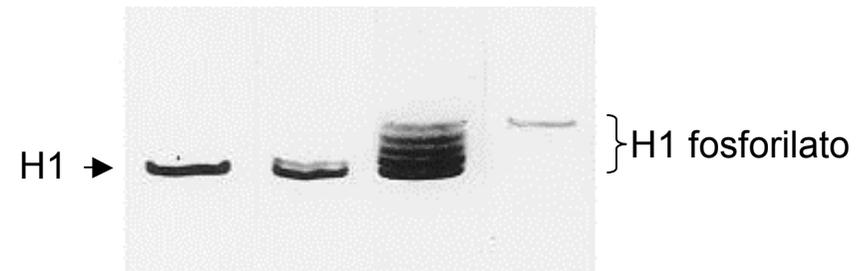
Metodiche elettroforetiche dove la mobilità elettroforetica dipende dalla carica propria delle molecole consentono di evidenziare **specifiche modifiche post-traduzionali** (che comportano alterazione della carica)

Siccome le AU e AUT PAGE **non comportano alterazioni nella carica della proteina** e la migrazione delle proteine dipende dal loro stesso rapporto m/z, queste due metodiche consentono di visualizzare quelle modificazioni post-traduzionali che alterano la carica delle proteine (come l'acetilazione - perdita di una carica positiva) e la fosforilazione (aggiunta di due cariche negative).

ACETILAZIONE (perdita 1+)



FOSFORILAZIONE (aggiunta 2-)



NB: è possibile distinguere in AU page un'acetilazione da una fosforilazione?

Perché una AU-PAGE risulta diversa da una AUT-PAGE (vedasi figura nella slide precedente)? Per il fatto che il Triton X-100 (T) lega in modo diverso le diverse forme istoniche. Essendo un detergente si lega in modo dipendente alla loro **idrofobicità**. Questo fa sì che la massa globale (detergente + istone) sia diversa per i diversi istoni e per le diverse isoforme istoniche, e questo ha un'influenza sulla migrazione elettroforetica dal momento che le proteine migrano in modo dipendente rispetto al loro m/z.

NB: attenzione ad aspetti conformazionali che possono influire sulla mobilità elettroforetica.

Se una certa modificazione post-traduzionale comporta la stabilizzazione di una struttura maggiormente compatta o viceversa questo fatto non può essere trascurato nella valutazione dell'analisi elettroforetica. Ricordarsi che è sempre presente un'effetto setaccio dato dalle maglie del gel.