

Metodi per la rilevazione di bande/spot proteici in analisi su PAGE

Requisiti ideali per un metodo di rilevazione di spot proteici da 2D

Alta sensibilità

Permettere analisi quantitative

Compatibile con MS

Rapido

Economico

Non tossico

... in pratica non esiste il metodo ideale

Principali metodi di colorazione/rilevazione di proteine in analisi su PAGE

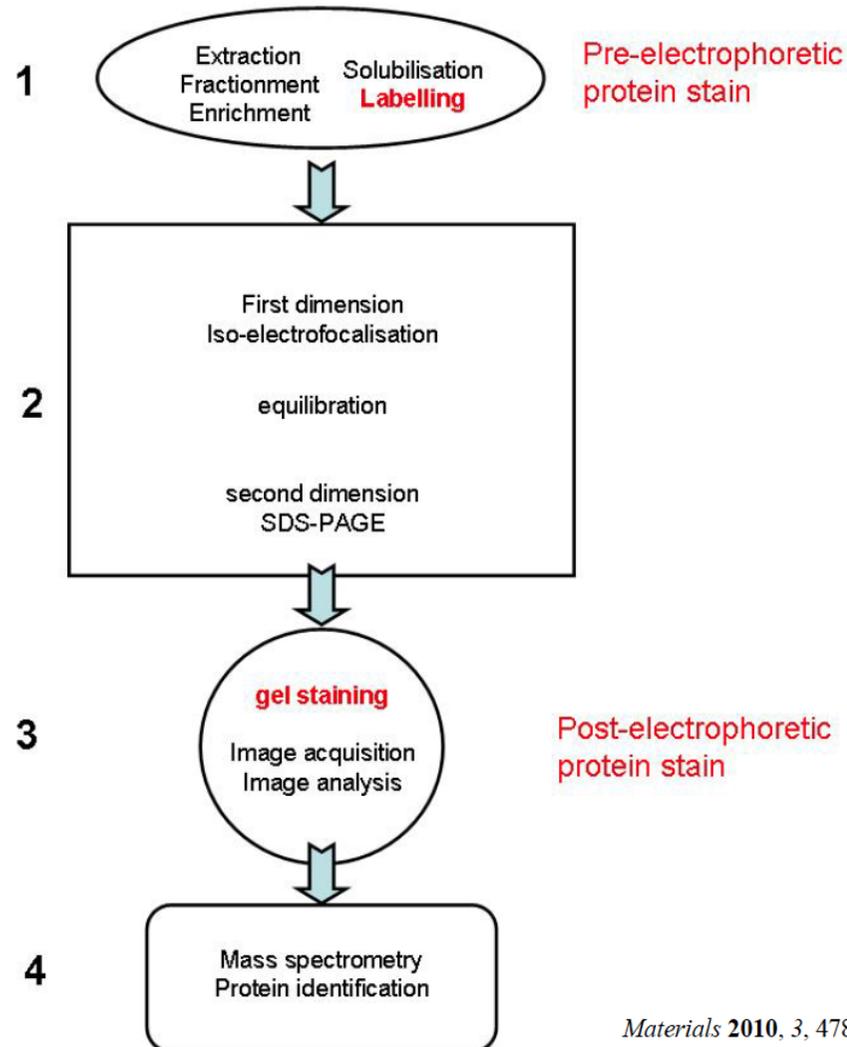
Method	Advantages	Disadvantages
Coomassie Brilliant Blue staining (colloidal)	Steady state method, good quantification, inexpensive, mass spectrometry compatible	Low sensitivity: LOD only ca. 100 ng of BSA, slow, dye particles can cause problems in image analysis
Coomassie Brilliant Blue staining (alcohol free, hot, monodispers)	Steady state method, fast, good quantification, inexpensive, very environment friendly, mass spectrometry compatible	Low sensitivity: LOD only ca. 200 ng of BSA, background destaining necessary
Zinc imidazol reverse staining	Medium sensitivity: LOD ca. 10 ng of BSA, fast, very good compatible with mass spectrometry	Bad for quantification, negative staining not easy for documentation
Silver staining (silver nitrate)	High sensitivity: LOD ca. 0.5 ng, can be made mass spectrometry compatible	Poor dynamic range, limited quantification possibilities, multistep procedure
Silver staining (silver diamine)	High sensitivity: LOD ca. 0.5 ng, stains basic proteins better than the protocol above	Poor dynamic range, limited quantification possibilities, multistep procedure, high silver nitrate consumption
Fluorescent staining with RuBPS	Medium to good sensitivity: LOD ca. 5 ng of BSA, very good for quantification, wide dynamic range, mass spectrometry compatible	Overnight procedure, less sensitive than mass spectrometry compatible silver staining, fluorescence scanner necessary, dye particles can cause problems in image analysis

Method	Advantages	Disadvantages
Fluorescent labelling for difference 2-D gel electrophoresis	Medium to good sensitivity: LOD ca. 5 ng, direct comparison of up to three samples in one gel, good for quantification, wide dynamic range, mass spectrometry compatible	Labelling protocols must be optimized for different samples, fluorescence scanner necessary, relatively expensive
Radioactive labelling	High sensitivity: LOD below pg, good quantification, very wide dynamic range with phosphorimager	Limited to living cells, gels have to be dried, phosphor imager necessary, radioactivity needed
Stable isotope labelling	High sensitivity: LOD below pg, wide dynamic range, good quantification	Methods still under development also for 2-D electrophoresis, expensive, mass spectrometer needed
Western blotting	Ideal for highly sensitive and selective detection of certain proteins, general protein staining is also possible, proteins are well accessible on the blotting membrane	Additional electrophoresis step, uneven transfer of proteins, limited mass spectrometry compatibility because of membrane material, specific detection works only when antibodies are available

Pre- vs. post-staining

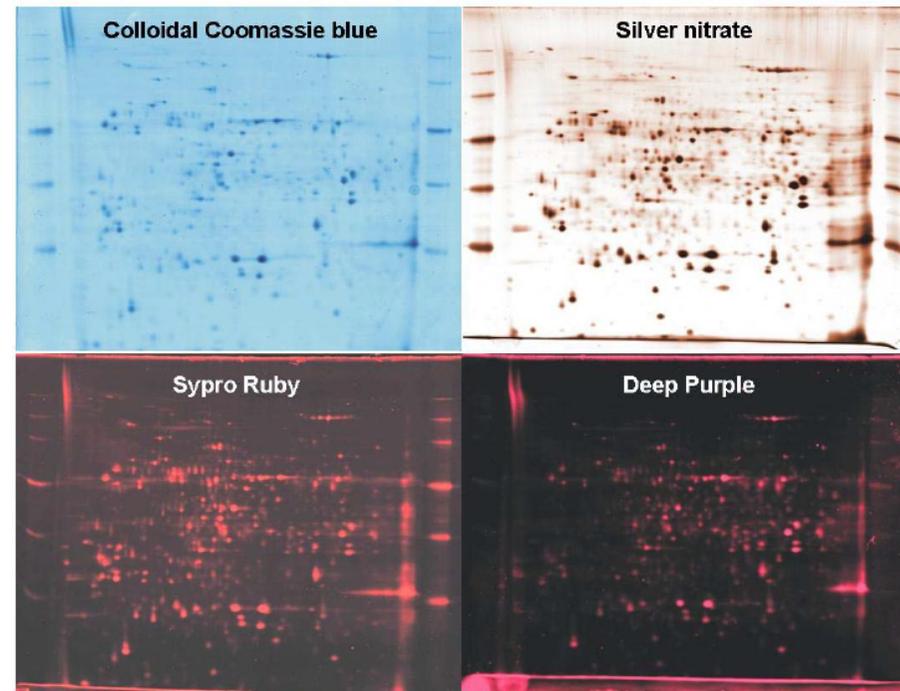
Sotto viene riportato il momento nel quale le proteine vengono “colorate”. In ogni caso risulta di fondamentale importanza la normalizzazione proteica al fine di ottenere dei dati quantitativi.

La **DIGE** è l'unica colorazione (tra quelle che trattiamo approfonditamente) nella quale le proteine vengono marcate prima della PAGE



Comparison of different staining procedures

Sotto vengono riportate 4 diverse metodiche di colorazione delle proteine. Da notare la **diversa sensibilità** offerta dalle 4 metodiche. Osservando attentamente i gel, si possono notare delle proteine che vengono “diversamente evidenziate” dalle 4 metodiche. Il diversamente si riferisce al fatto che il rapporto tra il loro segnale e quello delle altre proteine non è sempre uguale.



Blue Coomassie

Colorazione Classica con Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250 (sensibilità: circa 100-50 ng - banda proteica). Il Blue Coomassie lega preferenzialmente residui aromatici e basici (Tyr, Phe, Trp, His, Arg - vedasi metodo di Bradford). **In generale si assume che questo metodo colori in modo quantitativo tutte le diverse proteine.** E' un metodo molto spesso usato per normalizzare campioni proteici.

Colorazione classica con BC: (sensibilità: circa 100 ng)

Lavare il gel 5 min in acqua mQ (per togliere eccesso di SDS - compete con il BC per il legame alle proteine). Fissare e colorare il gel con una soluzione di acqua/metanolo/acido acetico (4/5/1) allo 0,05% di Blue Coomassie (R-250). La colorazione può essere protratta dall'ora fino ad o/n. Decolorare il gel con una soluzione acqua/etanolo (1/3) fino ad ottenere un fondo quasi trasparente (attenzione che anche gli spot/bande proteiche vengono decolorate con questo protocollo. E' necessario seguire il processo di decolorazione attentamente al fine di non perdere informazioni). Decolorazione possibile anche con semplice 10% acido Acetico in acqua (decolorazione più lunga ma più economica e non comporta decolorazione delle bande proteiche)

Colorazione Coomassie Brilliant Blue (CBB) Colloidale G-250: (sensibilità: circa 10-30 ng)

Staining

1. Fix for 60 minutes in fixing solution.
2. Stain overnight with staining solution.
3. Transfer gel into neutralization buffer for 1 - 3 min
4. Wash with 25 % methanol for less 1 min.
5. Transfer gel into stabilizing solution.

For further staining, the gel has to stay in stabilizing solution for one day, and then repeat steps 2 to 5. Three staining should be enough, which takes about one week. Gel can stay in staining or stabilizing solution over the weekend without any effect on the results.

1

Fixing solution

o-Phosphoric acid (85 %)	1.3 % (w/v)	5 mL
Methanol	20 % (v/v)	100 mL
Water, deionised	make up to	500 mL

Prepare fresh

2a

Staining stock solution A

o-Phosphoric acid (85 %)	2 % (w/v)	9.5 mL
Ammonium sulfate	10 % (w/v)	40 g
Water, deionised	make up to	400 mL

2b

Stock staining solution B

Coomassie Brilliant Blue G-250	5 % (w/v)	2.5 g
Water, deionised	make up to	50 mL

2

Staining solution, freshly prepared:

- Mix 10 mL of stock staining solution B with 400 mL of stock staining solution A.
- Add 100 mL methanol.

The staining solution should never be filtered because the colloidal dye particles formed are retained on the filter.

3 Neutralization solution

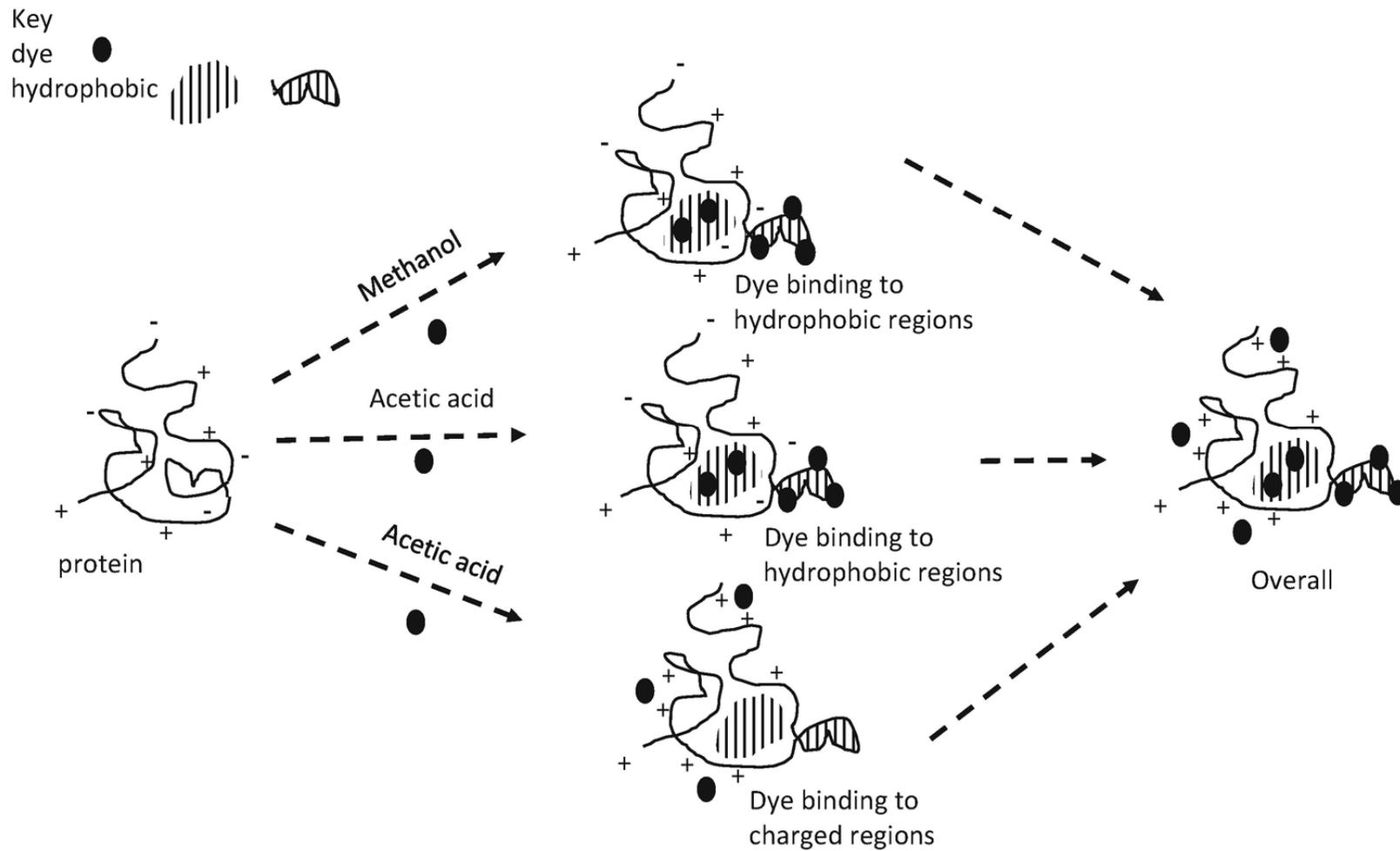
Tris-base	0.1 M	6 g
Water, deionised	make up to	500 mL
o-Phosphoric acid	titrate to	pH 6.5

4 Washing solution

Methanol		125 mL
Water, deionised	make up to	500 mL

5 Stabilizing solution

Ammonium sulfate		100 g
Water, deionised	make up to	500 mL



L'acido acetico e il **metanolo** favoriscono la **denaturazione** delle proteine consentendo un più efficiente legame del colorante BC alle proteine

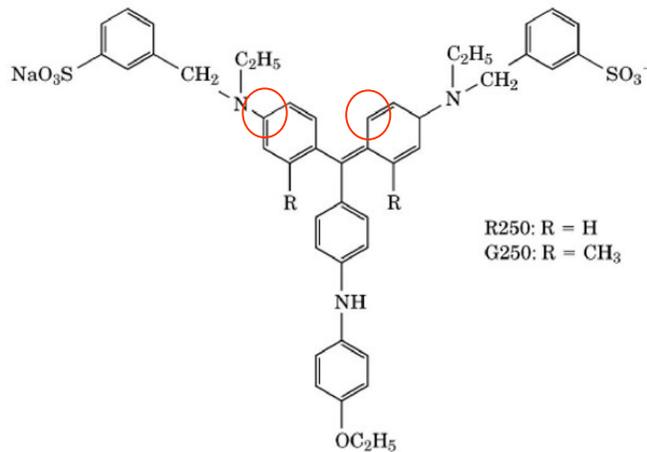
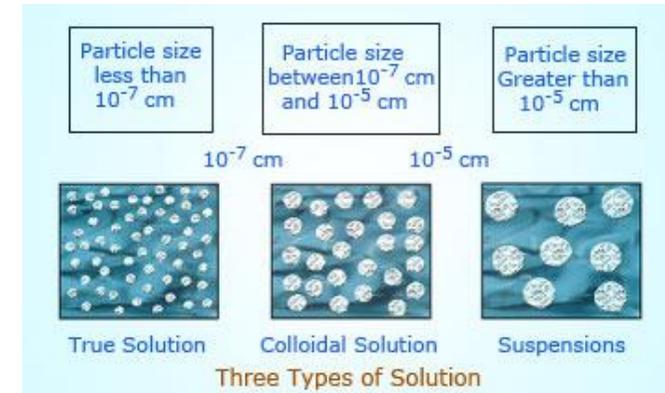
Goldring J.P.D. (2018) The Roles of Acetic Acid and Methanol During Fixing and Staining Proteins in an SDS–Polyacrylamide Electrophoresis Gel. In: Kurien B., Scofield R. (eds) Protein Gel Detection and Imaging. Methods in Molecular Biology, vol 1853. Humana Press, New York, NY.

Blue Coomassie - colorazione colloidale con G250

Lo **stato colloidale** è intermedio fra quello delle soluzioni vere e proprie e quello delle sospensioni sedimentabili.

Le **soluzioni vere e proprie** sono costituite da ioni o molecole singole o piccoli aggregati molecolari (da 1 a 1000 atomi) disciolte in un solvente. Le particelle disciolte sono estremamente piccole, con diametri particellari inferiori a 0,1 μm .

Le **dispersioni colloidali** (impropriamente dette **soluzioni colloidali**) sono costituite da **aggregati molecolari** disciolte in un solvente (fase disperdente). Le particelle disciolte (fase dispersa) hanno diametri particellari compresi fra 10 e 0,1 μm .



CBB G/R250

Coomassie G-250

Poco solubile nella soluzione di colorazione descritta precedentemente (2) \Rightarrow si forma una soluzione colloidale.

La piccola quantità di CBB in soluzione viene legata preferenzialmente (alta costante di associazione) dalle proteine e non dalla matrice del gel. Mano a mano che il CBB si lega alle proteine una piccola porzione passa dallo stato colloidale a quello in soluzione e viene quindi legato dalle proteine.

Quando le proteine non legano più CBB, questo non passa più dallo stato colloidale a quello in soluzione.

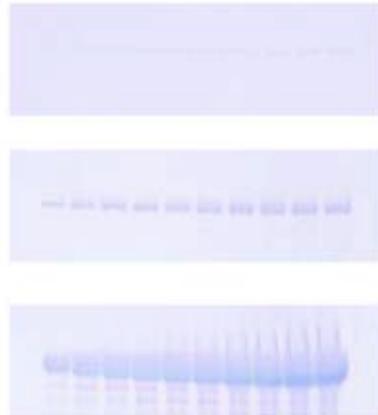
In pratica, alla fine della colorazione le proteine sono colorate mentre la matrice di acrilamide non lega il CBB-G250 e in tal modo si ha un fondo trasparente.



Sempre poco CBB in soluzione

Blue Coomassie - densitometria vs. fluorescenza

A Scanned Gel



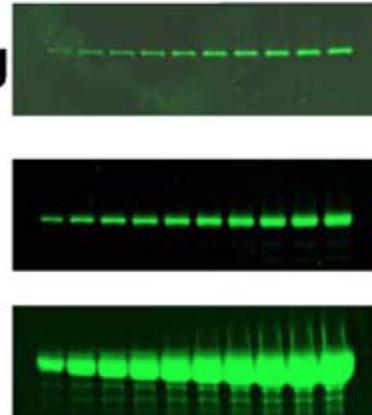
10-100 ng

0.1-1 µg

2-20 µg

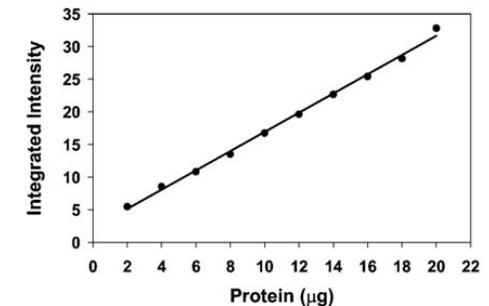
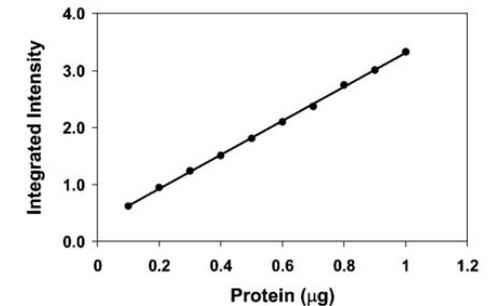
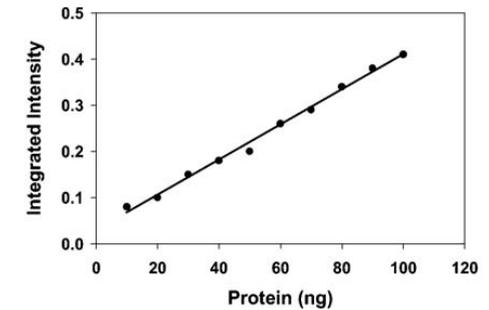
Densitometric analysis

Fluorescence



Excitation: 685 nm
(700 nm channel LI-COR
Odyssey CLx)

B



IMPORTANTE:

Il BC diventa un fluoroforo quando legato alle proteine.

Notare la linearità di risposta di una rilevazione fatta sfruttando la fluorescenza

In un intervallo che va da 10 nanogrammi a 20 microgrammi.

In questo caso la sensibilità di una colorazione con BC aumenta notevolmente fino a raggiungere la soglia dei ng.

Argentica

Convenzionale

- 1) lavare gel 5 min in acqua.
- 2) Fissare i gel per 1 h in 40 % Etanolo – 10 % A. acetico

Per 500 ml: 200 ml Etanolo – 50 ml A. acetico

- 3) Fissare i gel per 3h-3gg in 5 % Etanolo – 5 % A. acetico

Per 500 ml: 25 ml Etanolo – 25 ml A. acetico

- 4) lavare 10 min in acqua
- 5) 30 min in 1 % glutaraldeide – 0.5 M NaAcetato

per 500 ml: 10 ml glutaraldeide 50 % - 20.5 g NaAcetato anidro

- 6) lavare i gel 3x in acqua – 10 min – 4°C
- 7) 2 x 30 min in Acido 2,7 naftalendisulfonico 0.05% - 4°C

(per 1L: 0.5 g di NDS)

- 8) 4 x 15 min in acqua – 4°C
- 9) 30 min in soluzione con argento

(2 g AgNO₃ in 50 ml – aggiungere lentamente a 150 ml di acqua con 3.3 ml

NH₃ e 1 ml NaOH 5M – aggiungere altri 50 ml acqua mQ)

- 10) 4 x 4 min in acqua

11) Sviluppo

500 µl formaldeide 37% + 500 µl acido citrico 5% in 500 ml acqua.

- 12) 1-2 min Stop

5% acido acetico (per 500 ml: 25 ml acido acetico in 475 ml acqua)

- 13) 10 min in acqua distrillata
- 14) Conservare in acqua con EDTA (0.5 g/L) per evitare l'ingiallimento.

MS - compatibile

Fix solution: 5% Acetic Acid
30% Ethanol

Sensitivity-enhancing solution: 2 ml of 10% Thiosulfate per liter

Silver stain solution: 0.7 ml of 37% Formaldehyde
12.5 ml of 1 N Silver Nitrate per liter

Development solution: 30 g Anhydrous Potassium Carbonate
250 µl of 37% Formaldehyde
125 µl of 10% Thiosulfate per liter

Stop solution: 40 g of Tris
20 ml of Acetic Acid per liter

Protocol

- 1) **FIXATION** - Soak the gels in *Fix solution* for at least 3 x 30 min
- 2) Rinse in water for 3 x 10 min
- 3) **SENSITIZATION** - To sensitize, soak gels for 1 min (one gel a time) in *Sensitivity-enhancing solution*
- 4) Rinse 2 x 1 min in water
- 5) **SILVER IMPREGNATION** - Impregnate for at least 30 min in *Silver stain solution*
- 6) Rinse in water for 5-15 s to remove the liquid film or the silver solution brought with the gel
- 7) **DEVELOPMENT** - Develop image (10-20 min) in *Development solution*
When the gel is dipped in the developer, a brown microprecipitate of silver carbonate should form. This precipitate must be redissolved to prevent deposition and background formation. This is simply achieved by immediate agitation of the box. The spot intensity reaches a plateau after 15-20 min of development, and then background appears. Stop development at the beginning of background development.
- 8) **STOP** - Stop development (30-60 min) in *Stop solution*
- 9) Rinse with water (several changes) prior to drying or densitometry

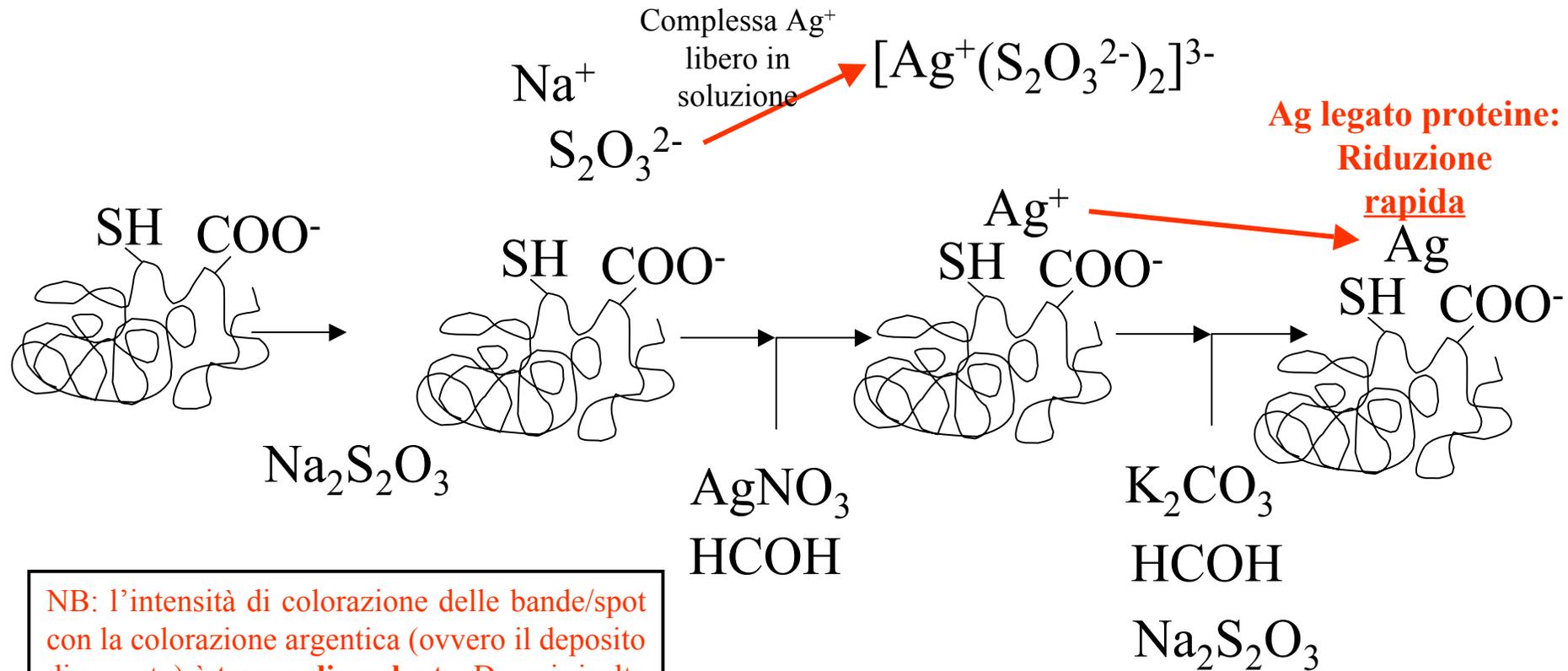
NB: la colorazione convenzionale prevede l'utilizzo di glutaraldeide che è un agente crosslinkante. Il fatto che le proteine siano unite favorisce il deposito di Ag (rendendo più sensibile la colorazione) ma ciò non consente che su queste proteine possano essere condotte delle analisi di MS per l'identificazione (ne di PMF ne di Peptide sequencing - vedasi più avanti nel testo).

Argentica

Punti chiave in una colorazione argentica:

- 1) Il processo di riduzione dell'Ag⁺ ad Ag è autocatalitico. La presenza di Ag favorisce la riduzione di Ag⁺ ad Ag;
- 2) L'Ag⁺ si lega alle proteine in modo preferenziale rispetto alla matrice del gel;
- 3) Si usa un agente riducente (come la HCOH) per favorire la riduzione dell'Ag⁺;
- 4) Tramite opportuni lavaggi viene eliminato l'Ag⁺ non legato alle proteine;
- 5) Il tiosolfato di sodio lega l'Ag⁺ in eccesso e quindi previene la sua riduzione se libero in soluzione. Questo permette alla reazione di sviluppo di poter esser protratta nel tempo senza che il background si alzi troppo - sensitization;

**Ag non legato proteine
ma complessato in soluzione:
Riduzione
molto lenta**



NB: l'intensità di colorazione delle bande/spot con la colorazione argentica (ovvero il deposito di argento) è tempo dipendente. Da qui risulta evidente come sia difficile riprodurre i risultati in modo consistente e come sia difficile confrontare gel colorati separatamente.

Potassio Carbonato:
basifica l'ambiente e permette la riduzione da parte della formaldeide dell'Ag legato alle proteine. La reazione viene bloccata acidificando l'ambiente

CBB + Argentica

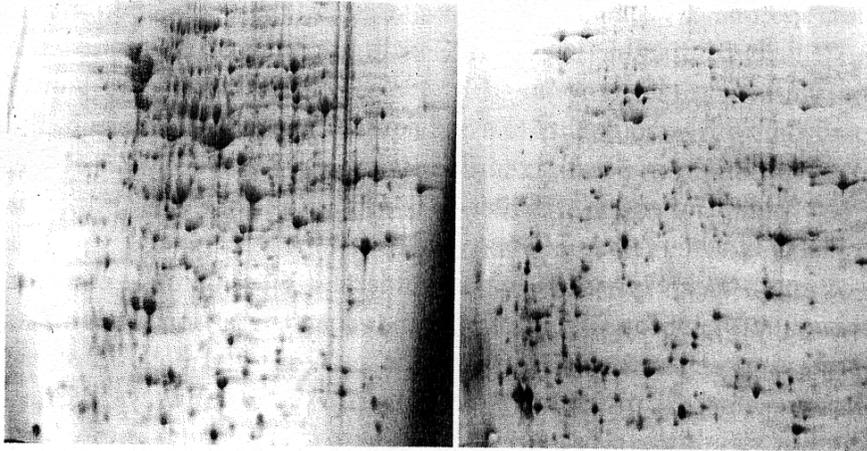


Fig. 39: 2-D electrophoresis of E.coli extract. 1st dimension: IPG 3–10 NL 24 cm, rehydration loading. 2nd dimension: SDS PAGE in 1 mm PPA gel 12.5 % T, 3% C. Left side: 1.2 mg protein, fast Coomassie staining; Right side: 180 µg protein, silver staining. A high number of proteins are stained with completely different intensity.

Comparazione tra CBB & Silver staining

Silver staining **più sensibile** rispetto a CBB ma presenta **colorazione differenziale** rispetto a CBB.

Le proteine non si colorano tutte allo stesso modo.

Questo è dovuto alle loro diverse proprietà chimico-fisiche che si riflettono in caratteristiche di legame diverse nei confronti del CBB o Ag.

Colorazione argentica di solito danno sensibilità nell'ordine di 0.5-0.10 ng di proteina

=> circa 100 volte più sensibili rispetto al CBB (dipende dal protocollo utilizzato)



CBB + Silver staining

Effettuare le due colorazioni in serie (prima CBB e successivamente Ag di solito risulta in una migliore sensibilità e una colorazione in modo uniforme di tutte le proteine. (Quelle che non si colorano solo con l'argento, se trattate in questo modo risultano colorarsi anche in argento => è possibile visualizzare, sfruttando la sensibilità della colorazione argentica) un numero maggiore di proteine!

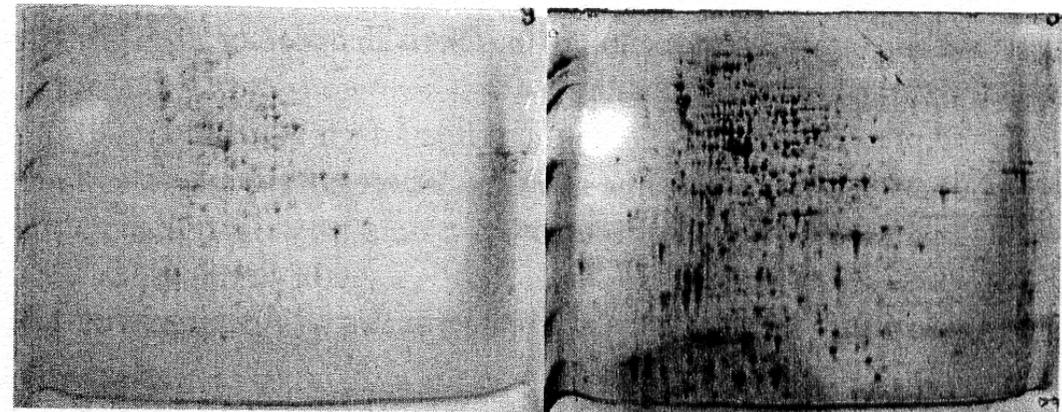


Fig. 40: 2-D electrophoresis of E.coli extract. 1st dimension: 24 cm IPG 3–10 L, rehydration loading of 180 µg protein. 2nd dimension: SDS PAGE in 1 mm PPA gel 12.5 % T, 3% C. Left side: hot Coomassie staining; Right side: gel stained afterwards with silver.

2D-DiGE

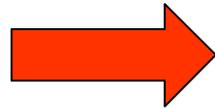
(2-D fluorescence difference gel electrophoresis)

La colorazione (labelling) avviene prima della corsa elettroforetica



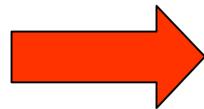
Derivatizzazione delle proteine
con **molecole fluorescenti**
(**aventi differenti λ ecc. & λ emiss.**)

Campioni proteici “marcati” in modo differenziale possono essere separati sul medesimo gel bidimensionale
- minimizzare variazioni gel-gel-



Separazione proteine
tramite 2D gels

Impostando le opportune lunghezze d'onda d'eccitazione e di emissione è possibile visualizzare le proteine derivanti dal campione 1, quelle dal campione 2 oppure ottenere un'immagine relativa alla sovrapposizione dei due campioni



Visualizzazione mediante
speciali scanner

2D-DiGE

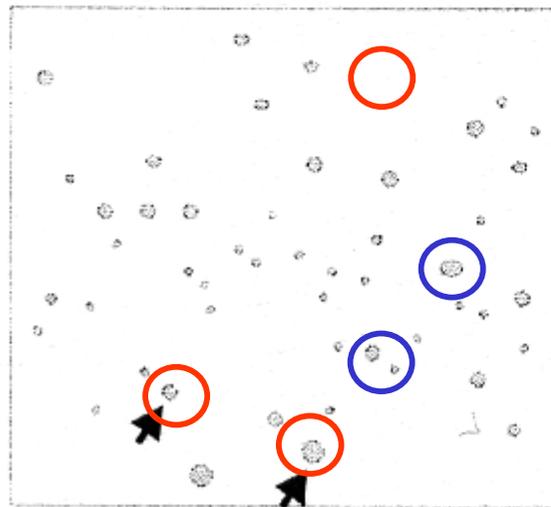
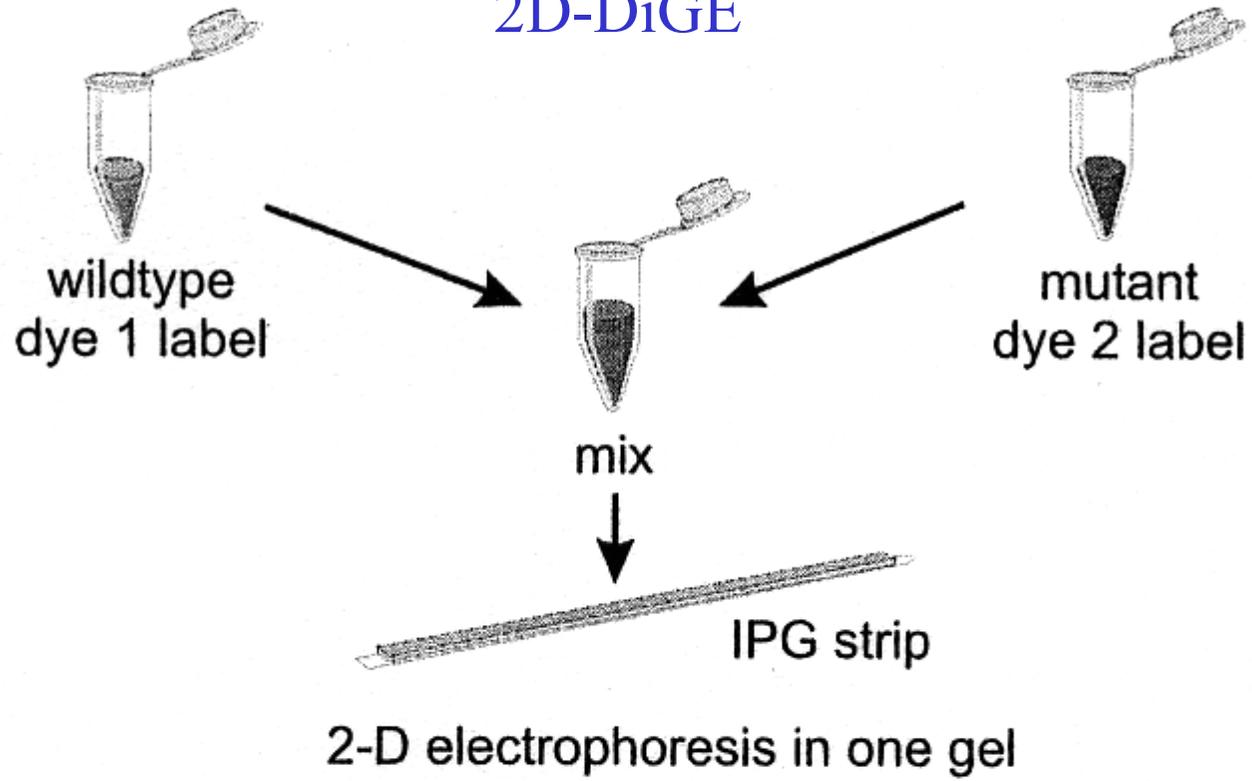


image of dye 1

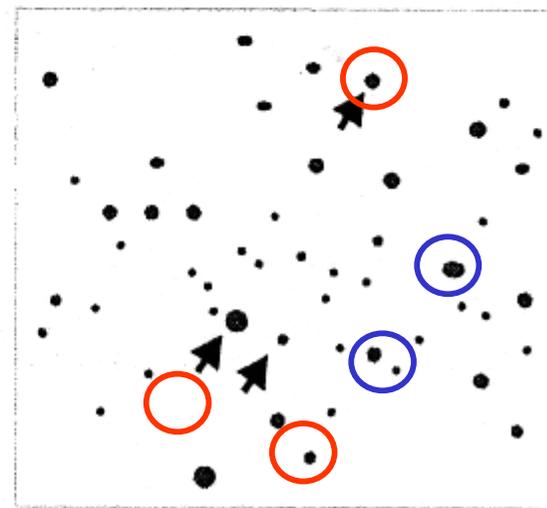
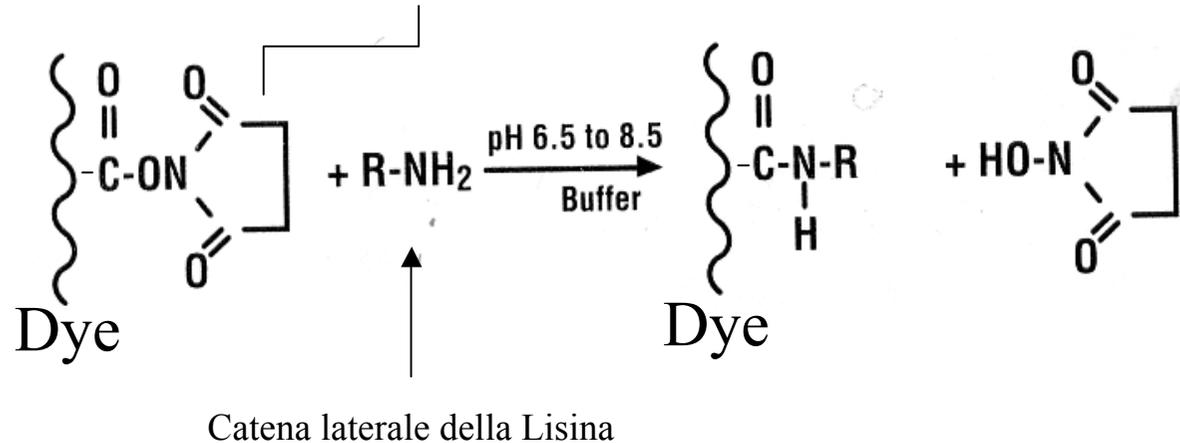


image of dye 2

2D-DiGE

Gruppo reattivo: N-idrossisuccinimide



=> la reazione di derivatizzazione porterebbe alla perdita di un carica positiva, ma le molecole di colorante sono strutturate in modo tale da recare una carica +1. In questo modo il punto isoelettrico della proteina non varia.

=> la derivatizzazione di una proteina con una molecola organica comporta una variazione di peso molecolare. Tutti e tre i coloranti sono di peso equivalente e la reazione di derivatizzazione è condotta in modo che solo una piccola porzione del totale dei residui di lisina presenti nel campione venga derivatizzato => solo una piccola frazione delle proteine è derivatizzata, la rimanente parte non lo è (minimal labeling). Dato che l'aggiunta di un fluoroforo modifica la massa di circa 500 Da, tale variazione non è influente al fine dello spostamento della proteina marcata rispetto a quella non marcata.

Cy3: ecc: 532 - emiss: 580

Cy5: ecc: 633 - emiss: 670

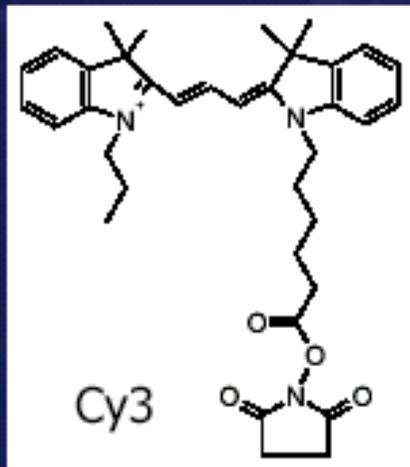
Cy2: ecc: 488 - emiss: 520

Con l'uso di specifici filtri posso visualizzare i tre coloranti in modo distinto (separare i tre canali) e quindi avere delle immagini distinte dei tre diversi campioni corsi all'interno dello stesso gel

2D-DiGE

Two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE)

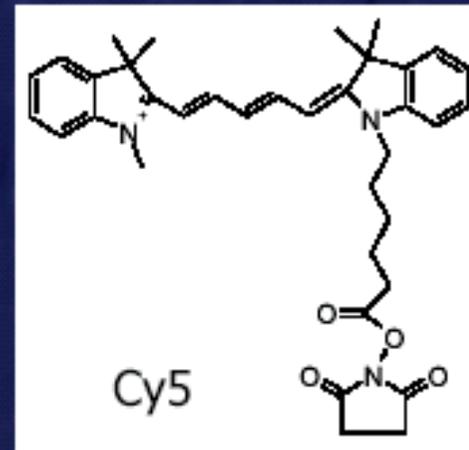
Sample A



Methodology

- Distinct fluorescent properties
- Lysine labeling
- Charge compensation
- Identical Mw
- Hydrophobic
- MS compatible

Sample B



Mix

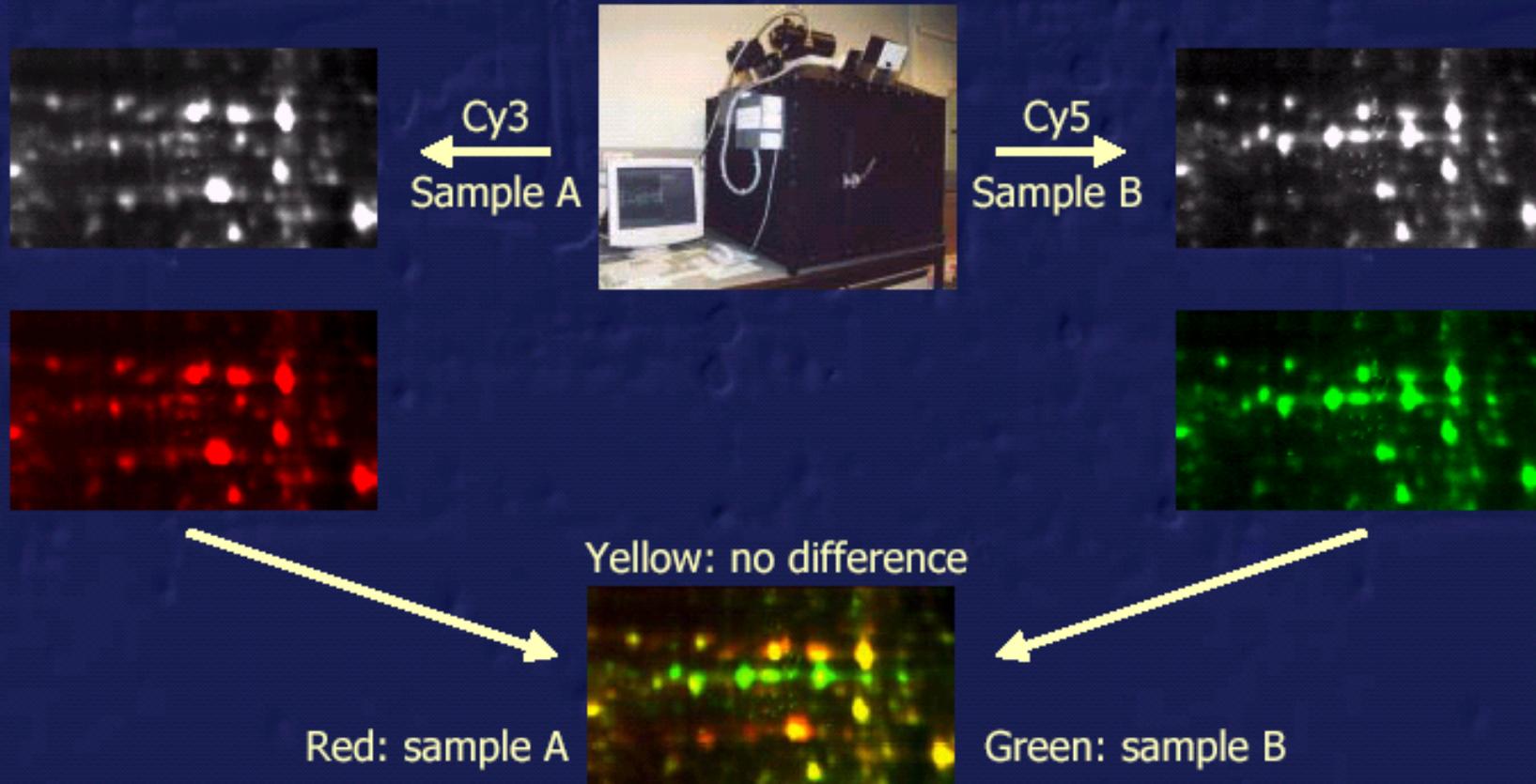


Two-dimensional electrophoresis

2D-DiGE

Two-dimensional difference gel electrophoresis

Methodology (2)



2D-DiGE - Utilizzo dello standard interno

In un singolo gel possono essere corsi fino a 3 campioni: Cy2, Cy3 e Cy5, ipoteticamente il campione A, B, e C.

Ma come facciamo a comparare più campioni tra loro, fare delle repliche biologiche e tenere contemporaneamente conto della variabilità tecnica?

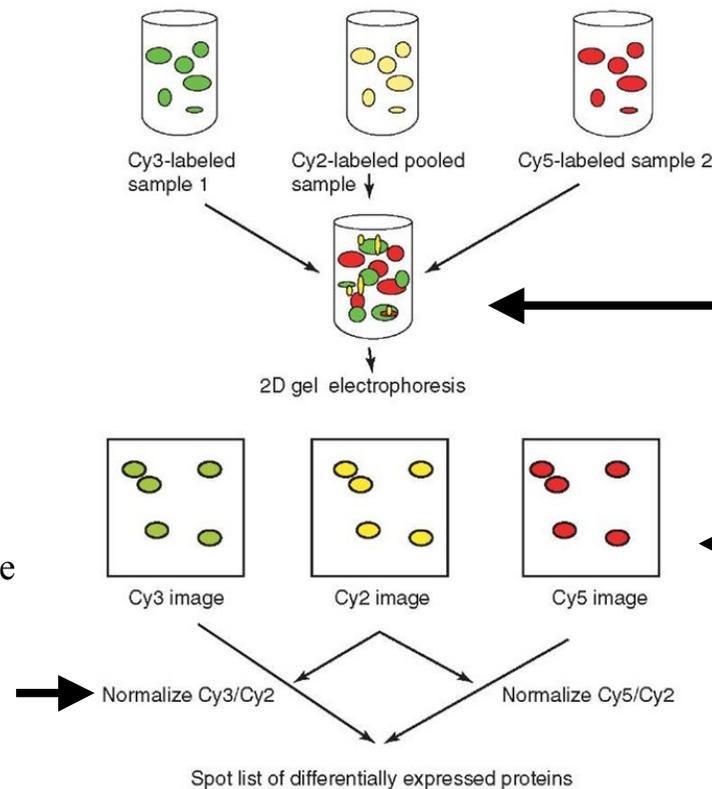
Ipotizziamo di dover comparare 6 campioni tra loro: A, B, C, D, E, ed F.

In teoria uno potrebbe pensare di fare una comparazione da un lato A, B, C e dall'altro D, E, F.

Questo in linea teorica assumendo che non ci siano variazioni dovuti a problemi tecnici, ovvero che il gel dove sono corsi A, B, e C sia uguale al gel dove sono stati corsi i campioni D, E, ed F. Senza contare che il tutto si deve verificare anche per le tre repliche biologiche (ovvero devo avere sei gel diversi tutti esattamente uguali). Questa situazione è non verosimile.

Il problema viene superato creando lo standard interno: miscela ottenuta con quantità equivalenti di A, B, C, D, E, ed F.

Questo standard interno viene marcato di solito con Cy2 e viene sempre corso assieme ad altri due campioni marcati rispettivamente con Cy3 e Cy5. Essendo lo standard interno uguale e corso in tutti i gel, esso ci darà ragione della variabilità tecnica e rappresenterà il modo di normalizzare il campione.



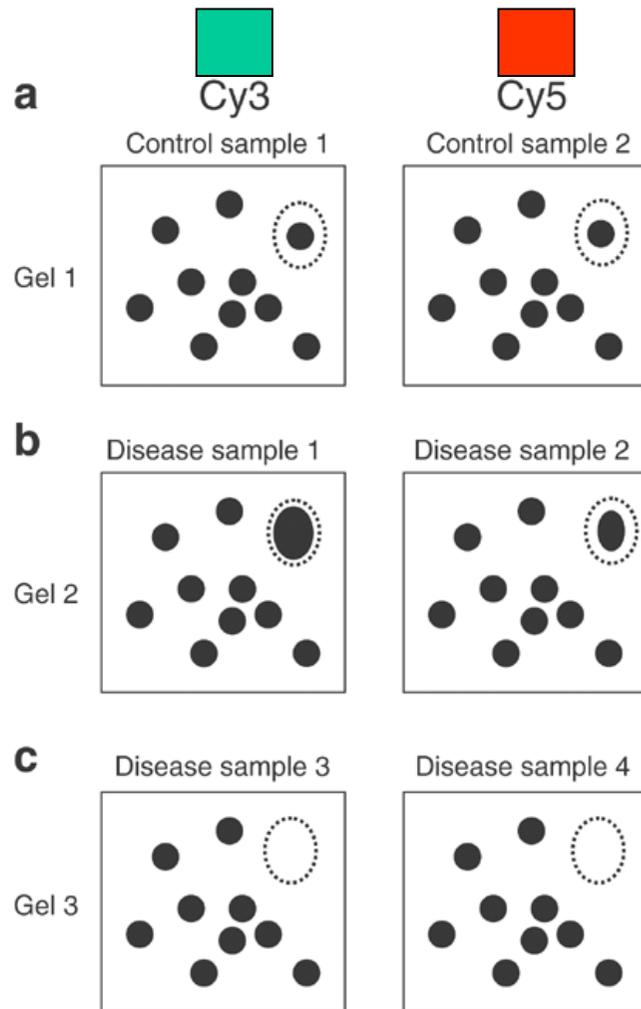
Lo **Standard interno** viene corso assieme ai singoli campioni.

In teoria esso è rappresentativo di tutte le proteine presenti nei singoli campioni

Lo **Standard interno** subisce tutte le “alterazioni” che subiscono in quel gel i campioni marcati con Cy3 e Cy5 dato che le condizioni sperimentali sono le stesse.

Ogni singola proteina può essere normalizzata rispetto alla sua corrispondente nello standard interno. **Questo valore può essere confrontato con quello derivante da un altro gel.**

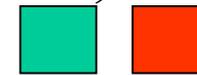
2D-DiGE - Utilizzo dello standard interno



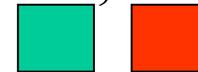
Interpretazione dei risultati:

Analizziamo i dati focalizzandoci sulla proteina cerchiata. Il risultato dei gel sembra indicarci che nel Disease sample 1 e 2 la proteina sia up regolata rispetto ai controlli e che nei disease sample 3 e 4 essa invece non venga espressa.

Proteina uguale - i.e 100, 100



Proteina up - i.e 200, 150

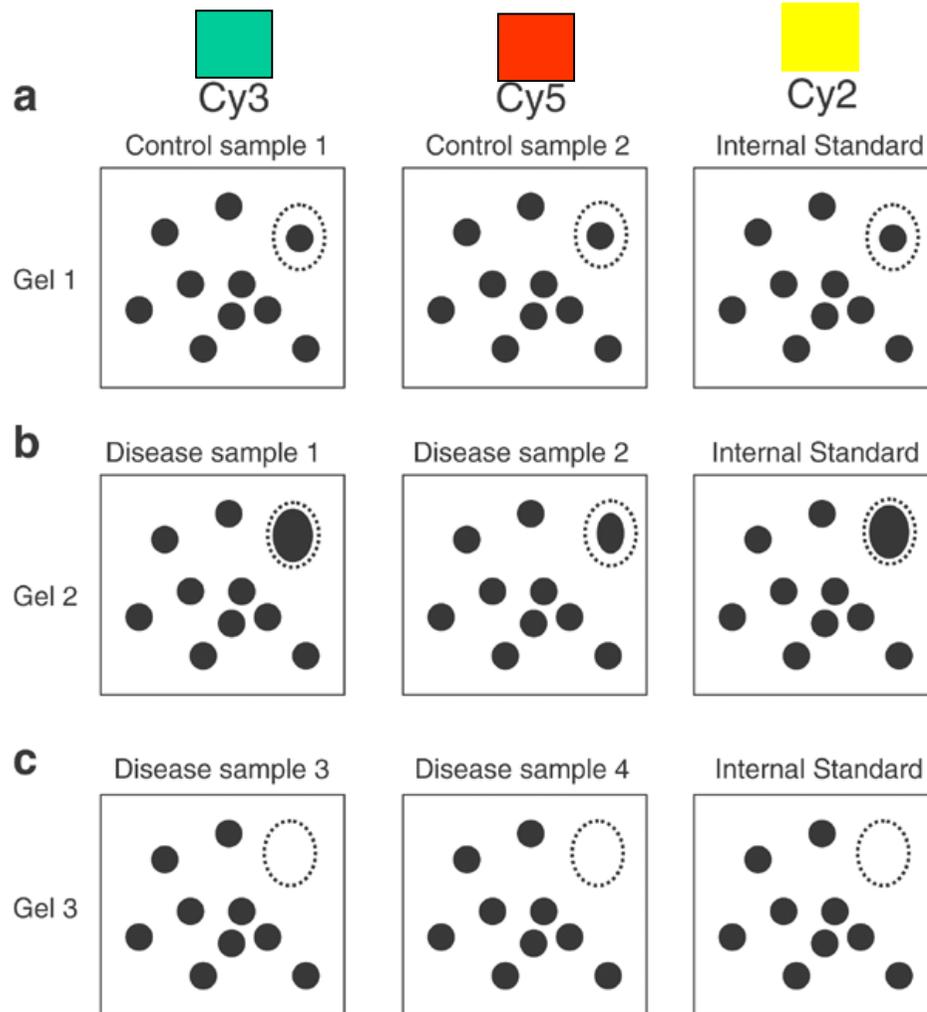


Proteina down - i.e. 0, 0



NB: numeri indicanti l'intensità dello spot del tutto arbitrari

2D-DiGE - Utilizzo dello standard interno



Interpretazione dei risultati:

Come si può evincere dai rapporti sotto indicati, il risultato indica che la proteina cerchiata nel DS2 è down-regolata e che nei campioni DS3 e DS4 essa non è valutabile.

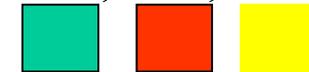
Proteina uguale - i.e 100, 100, 100



$$CS1: 100/100=1$$

$$CS2: 100/100=1$$

Proteina DS2 down - i.e 200, 150, 200



$$DS1: 200/200=1$$

$$DS2: 150/200=0.75$$

Proteina non valutabile - i.e. 0, 0, 0

“persa per motivi tecnici”



NB: numeri indicanti l'intensità dello spot del tutto arbitrari