ISOELETTROFOCALIZZAZIONE

SESSSKSSQP LASKQEKDGT EKRGRGRPRK QPPVSPGTAL VGSQKEPSEV PTPKRPRGRP

KGSKNKGAAK TRKTTTTPGR KPRGRPKKLE KEEEEGISQE SSEEEQ

Number of amino acids: 106

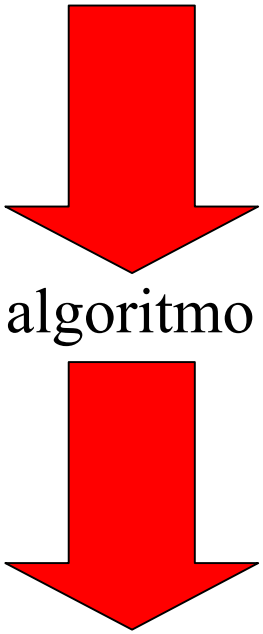
Molecular weight: 11544.8

Theoretical pI: 10.31

Amino acid composition:

Ala (A)	4	3.8%
Arg (R)	11	10.4%
Asn (N)	1	0.9%
Asp (D)	1	0.9%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	6	5.7%
Glu (E)	14	13.2%
Gly (G)	11	10.4%
His (H)	0	0.0%
Ile (I)	1	0.9%
Leu (L)	3	2.8%
Lys (K)	16	15.1%
Met (M)	0	0.0%
Phe (F)	0	0.0%
Pro (P)	13	12.3%
Ser (S)	14	13.2%
Thr (T)	8	7.5%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	0	0.0%
Val (V)	3	2.8%

1 Nterm + 11 R + 1 D + 14 E + 16 K + 1 Cterm



algoritmo

pI: pH al quale la carica netta della proteina = 0

Se sottoposta all'azione di un campo elettrico

non si muove

Focalizzazione - CONCENTRAZIONE

ISOELETTROFOCALIZZAZIONE

Table of pK_a and pI values

- The pK_a values and the isoelectronic point, pI, are given below for the 20 α-amino acids.
- pKa_1 = α-carboxyl group, pK_{a2} = α-ammonium ion, and pK_{a3} = side chain group.

Amino acid	**pKa_1**	**pKa_2**	**pKa_3**	**pI**
Glycine	2.34	9.60	---	5.97
Alanine	2.34	9.69	---	6.00
Valine	2.32	9.62	---	5.96
Leucine	2.36	9.60	---	5.98
Isoleucine	2.36	9.60	---	6.02
Methionine	2.28	9.21	---	5.74
Proline	1.99	10.60	---	6.30
Phenylalanine	1.83	9.13	---	5.48
Tryptophan	2.83	9.39	---	5.89
Asparagine	2.02	8.80	---	5.41
Glutamine	2.17	9.13	---	5.65
Serine	2.21	9.15	---	5.68
Threonine	2.09	9.10	---	5.60
Tyrosine	2.20	9.11	---	5.66
Cysteine	1.96	8.18	---	5.07
Aspartic acid	1.88	9.60	3.65	2.77
Glutamic acid	2.19	9.67	4.25	3.22
Lysine	2.18	8.95	10.53	9.74
Arginine	2.17	9.04	12.48	10.76
Histidine	1.82	9.17	6.00	7.59

pI di una proteina:

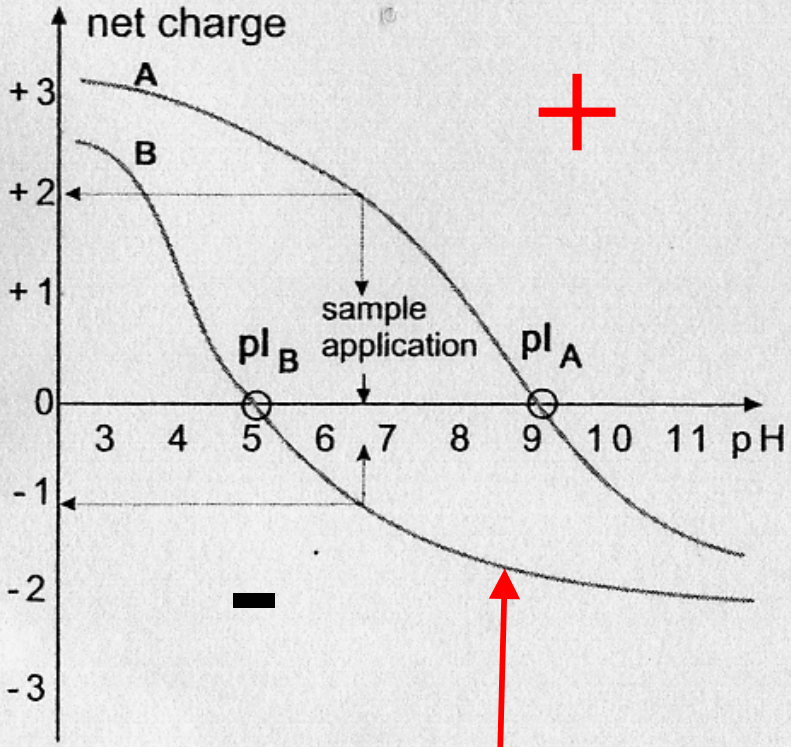
Residui D, E, K, R, H

+ N-term + C-term

+ PTMs

NB: ci sono dei residui che possono essere carichi anche se non sono propriamente acidi o basici:
Cysteine: gruppo SH => S^- (pKa 8.5)
Serine, Threonine, Tyrosine: gruppo OH => O^- (pKa 13, 13, 10.5 - rispettivamente)

ISOELETTROFOCALIZZAZIONE



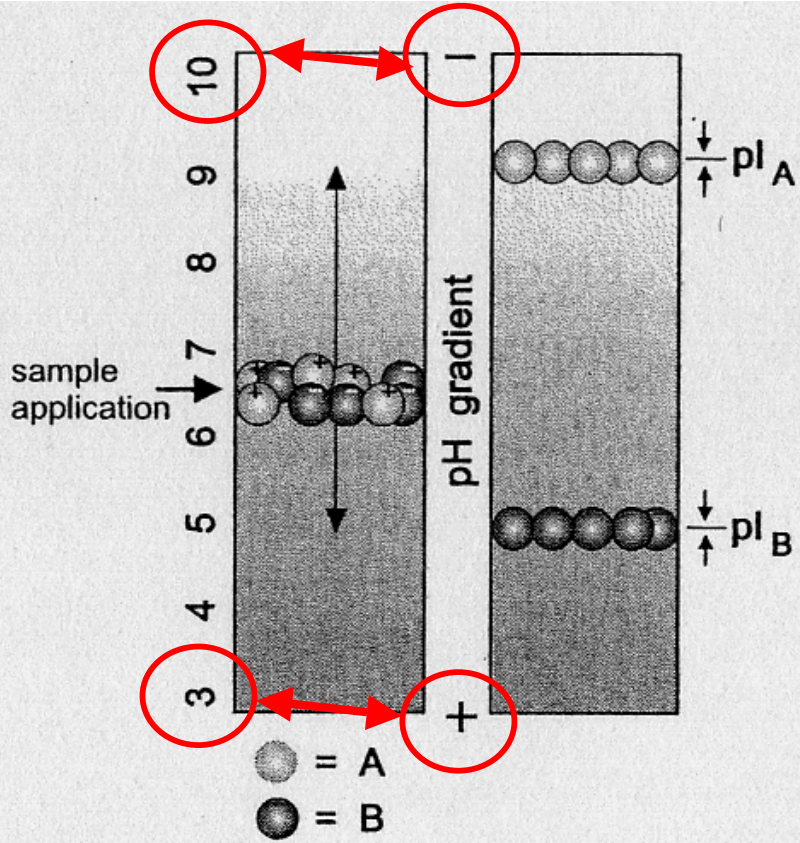
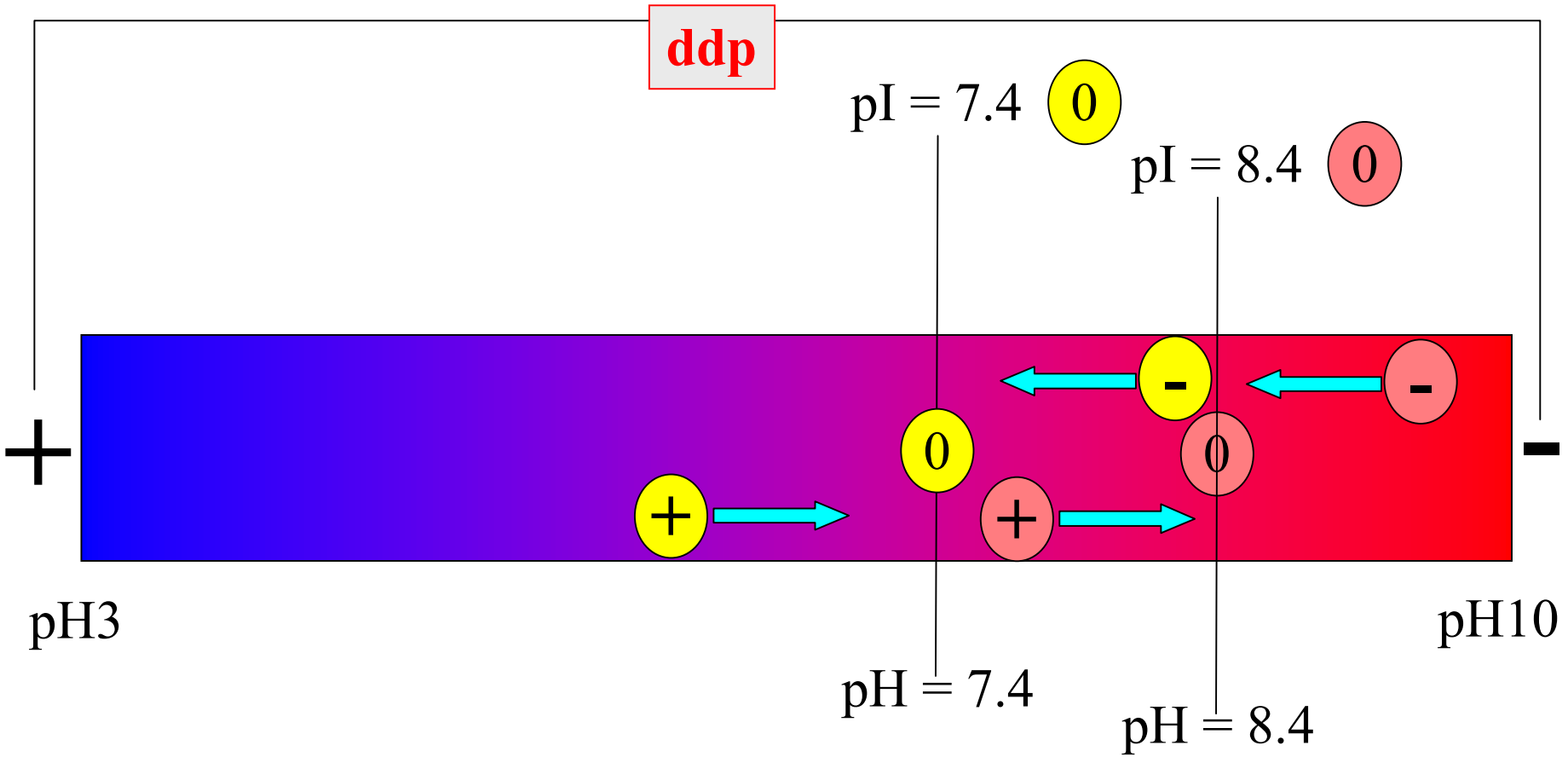


Fig. 6: The principle of isoelectric focusing. *Left:* Net charge curves of two model proteins A and B. At the point of application, A will have two positive, B will have one negative charge(s). *Right:* Migration of A and B to their pIs in the pH gradient of an isoelectric focusing gel.

ISOELETTROFOCALIZZAZIONE



Una proteina dispersa in un gradiente di pH, si troverà ad avere carica netta positiva, negativa oppure nulla (se si trova gia ad un pH pari al suo pI. Sottoposta all'azione di un campo elettrico **opportunamente orientato** essa si muoverà, a seconda della carica che reca verso l'elettrodo si 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 pH=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!

Isoelettrofocalizzazione: preparazione del campione

Tampone di lisi convenzionale:

9 M Urea, 4% CHAPS, 1% DTT, 0.8 % anfoliti carrier, 0,002% blu di bromofenolo

NB: Questo è solo un esempio dei tanti tamponi che possono essere utilizzati per l'estrazione

UREA:

è un agente **caotropo** (denaturante) ed è in grado di mantenere in soluzione proteine idrofobiche

[in particolari casi si può usare, in combinazione con l'UREA, la **TIOUREA**, che è un agente caotropo più forte dell'UREA ed è in grado di solubilizzare meglio proteine idrofobiche (7M UREA- 2M TIOUREA)].

Denaturazione => portare ogni singola proteina ad avere una sola ed unica conformazione. (questo poichè proteine con conformazioni differenti hanno migrazioni differenti).

L'azione denaturante aiuta ad inbire eventuali attività enzimatiche presenti in soluzione.

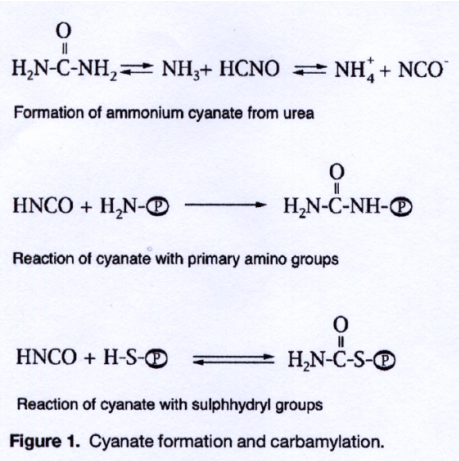


Figure 1. Cyanate formation and carbamylation.

ATTENZIONE:

La carbamilazione delle proteine che avviene in presenza di urea e con una temperatura sopra i 40 °C (circa) porta alla modificazione delle ammine primarie con conseguente perdita della possibilità per questi gruppi di assumere una carica positiva => si ha una alterazione del pI delle proteina i cui residui aminoacidici hanno subito tale modificazione!

A 4°C una soluzione contenente 9M Urea precipita, anche in questo caso la temperatura deve essere controllata. Non è possibile conservarla in ghiaccio

Isoelettrofocalizzazione: preparazione del campione

CHAPS:

Detergente zwitterionico utilizzato per aumentare la solubilità delle proteine idrofobiche. In genere vengono utilizzati detergenti **non carichi** (NP-40, Triton X100, etc) o **zwitterionici** (CHAPS, etc).

Anche i detergenti concorrono nella denaturazione delle proteine e nell'inibizione di attività enzimatiche presenti nel campione.

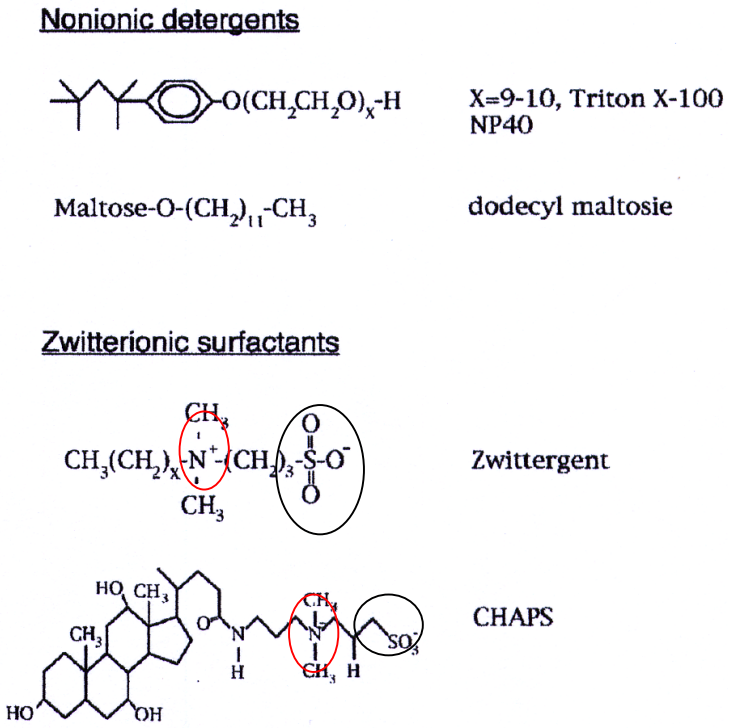


Figure 2. Nonionic and zwitterionic detergents.

Flashback - metodi per il condizionamento del campione

A volte ci si può trovare nelle condizioni di avere il proprio campione "contaminato" dal detergente anionico SDS (proteine estratte con SDS lysis buffer). L'SDS essendo una molecola carica negativamente e legandosi lo stesso alle proteine (forma delle micelle detergente-proteine) non consente una corretta focalizzazione.

L'SDS risulta compatibile con una isoelettrofocalizzazione qualora esso sia presente nel lisato finale ad una concentrazione minore dello 0,25% e si trovi in rapporto 1/8 (o ancora minore) con detergenti nonionici o zwitterionici. Oppure si può ricorrere alla precipitazione o alla ultrafiltrazione (i.e FASP senza la digestione enzimatica)

Detergenti come NP-40 e Triton X100 sono non ionici e risultano essere abbastanza blandi => attenzione alle attività enzimantiche che vengono mantenute (proteasi attive)

Isoelettrofocalizzazione: preparazione del campione

1) **DTT - DiTioTreitolo** (in alternativa il DTE - DiTioEritritolo)
Agente riducente. Necessario per rompere i ponti disolfuro S-S e mantenere in forma ridotta le proteina.

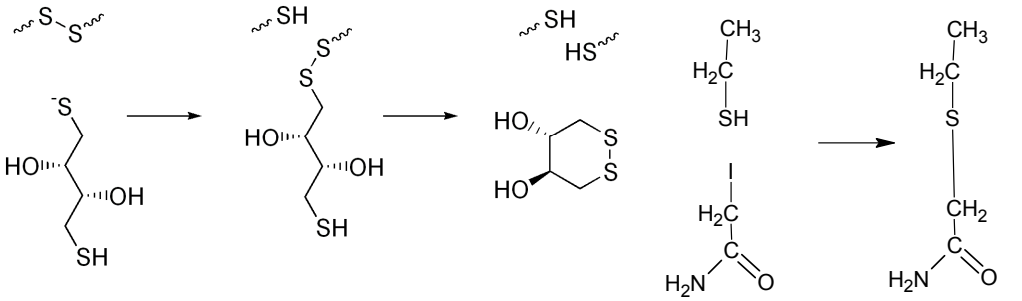
A pH >8 il gruppo sulfidrilico del DTT diventa ionizzato e migra per ciò verso l'anodo. Questo fatto porta ad una perdita di DTT nelle regioni a pH >8 con conseguente perdita delle caratteristiche riducenti dell'ambiente => Le proteine si ossidano in modo casuale (formazione di ponti acquisiscono carica e si spostano dal loro punto isoelettrico (fenomeno delle strisciate di proteine a pH >8 - Streaking). L'altro agente utilizzato fino ad una decina di anni fa era il beta-mercaptoetanolo che ora non è più utilizzato poiché è stato sostituito dai due piu' potenti agenti riducenti DTT e DTE. NB: per agire il DTT deve essere nella forma ionizzata, pK_{a1} e pK_{a2} sono 9.2 e 10.1 e questo ne limita il suo utilizzo…solo una piccola frazione è ionizzato a pH 7 o più basso. (NB: una strategia è quella di aumentare la sua concentrazione). In generale quindi il DTT non è un buon reagente riducente per lavorare in IEF.

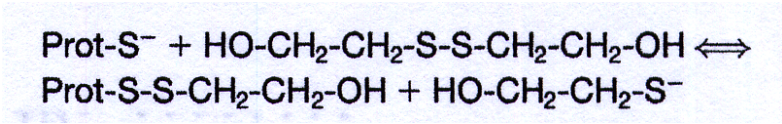
Altre due strategie per evitare la formazione di ponti disolfuro sono:

2) Ridurre ed alchilare (con iodoacetamide – IAA) la proteina prima della IEF.

3) Ossidare i gruppi tiolici delle proteine a disulfidi misti => convertire tutti i gruppi tiolici in una forma ossidata ma stabile (HED –Hydroxyethyldisulphide – DeStreak)

1 **DTT** 2 **IODOACETAMIDE** 3 **DeStreak**





Isoelettrofocalizzazione: preparazione del campione

ANFOLITI CARRIER:

Sono molecole che erano (ma in alcuni casi lo sono anche ora) utilizzate per creare gradienti di pH.

Caratteristiche:

a) piccole molecole organiche polimeriche

b) altamente solubili

c) anfoteriche (presenza contemporanea di gruppi basici e acidici => hanno un pI determinato da questi gruppi)

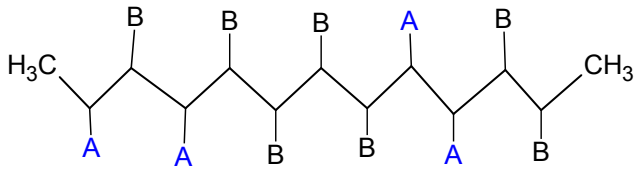
d) alto potere tamponante al loro pI.

Sfruttate nel lysis buffer e durante la corsa per:

a) aumentare la solubilità delle proteine

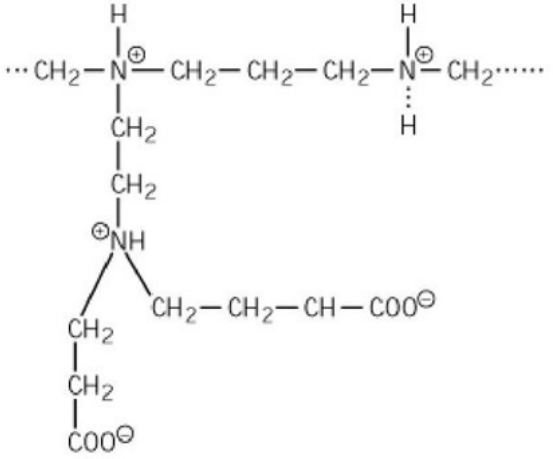
b) prevenire interazioni proteine-gel

A seconda dell'intervallo di pH scelto per l'analisi di isolettrofocusing vengono selezionate miscele di anfoliti su misura (IPG buffer - immobilzed pH gradient buffer).



A: gruppo acidico

B: gruppo basico



Isoelettrofocalizzazione: preparazione del campione

Table 2. Protease inhibitors and their targets

Protease inhibitor	Target	Recommended working concentration
APMSF	Plasma serine proteases	10–20 μM
Aprotinin	Serine proteases	0.01–0.3 μM
Bestatin	Aminopeptidases	40 μg/mL
Dichloroisocoumarin	Serine proteases	1–43 μg/mL
Disodium EDTA	Metalloproteases	100 μM
E-64	Thiol proteases	1.4–2.8 μM
Leupeptin	Serine and thiol proteases	1 μM
Pepstatin	Acidic proteases	1 μM
PMSF	Serine proteases	100–1000 μM
Phosphoramidon	Thermolysin Collagenase Metalloendoproteases	7–569 μM
TLCK.HCl	Trypsin Thiol proteases	37–50 μg/mL
TPCK	Chymotrypsin Thiol proteases	70–100 μg/mL

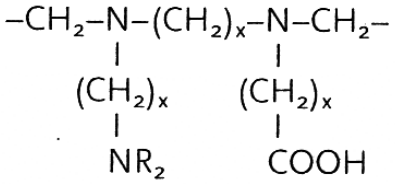
Inibitori di Proteasi:

Anche se le condizioni utilizzate per la preparazione del campione sono denaturanti, alcuni enzimi proteolitici riescono a rimanere attivi.
Ne consegue una degradazione proteica durante le fasi che precedono la corsa elettroforetica.
A tale scopo è utile includere nel tampone di estrazione / preparazione del campione degli inibitori di proteasi.
Solitamente questi inibitori vengono venduti sotto forma di cocktails pronti all'uso.
Può essere utilizzato anche Tris Base fino a 40 mM => rende alcalino l'ambiente e neutralizza una serie di proteasi attive in ambiente acido.

… **e inibitori di altri enzimi:**
Fosfatasi: sodio ortovanadato
Deacetilasi: sodio butirrato
…

Isoelettrofocalizzazione: generazione del gradiente di pH

Generati da anfoliti



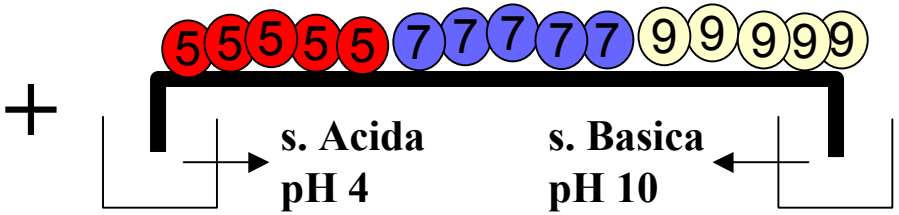
R = H or $-(CH_2)_x-COOH$, x = 2 or 3

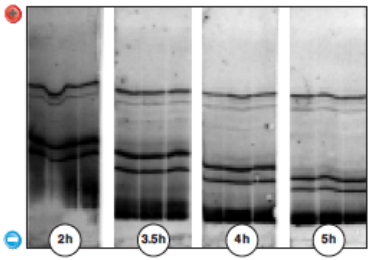
Composti contenenti un numero variabile di gruppi amminici e carbossilici. Ciascuna molecola ha un suo pI e dove sottoposte all'azione di un campo elettrico migrano a seconda della propria carica netta. [soluzione acida all'anodo (+) e basica al catodo (-)]

Hanno la caratteristica di avere un'alta capacita tamponante al loro pI.

SVANTAGGI

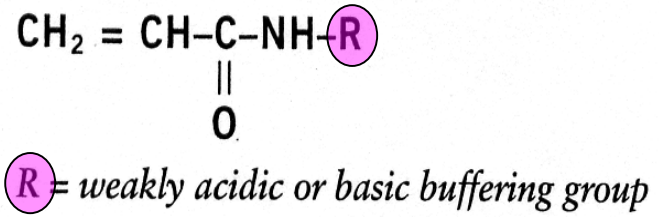
Il gradiente non è stabile nel tempo (spostamento) e la forma del gradiente è influenzabile dalle molecole che vengono analizzate.





Posizione delle bande varia a seconda del tempo di focalizzazione. Fenomeno dell'elettroendosmosi

Immobilizzati



Questi derivati dell'acrilammide sono noti come ***Immobilines***. I gruppi R possono essere gruppi carbossilici o amminici (pK_a da 0.8 a 4.6 / pKa da 6.2 a 12).

Questi derivati sono fatti co-polimerizzare assieme alla soluzione di bis-acr. e acr. Essi sono quindi immobilizzati nel reticolo del gel. Il gradiente si forma perché il loro inserimento è fatto in modo da avere più gruppi basici ad un'estremità e più gruppi acidi all'altra estremità, in modo variabile a creare un vero e proprio gradiente.

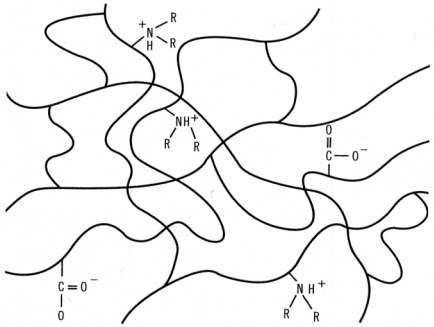
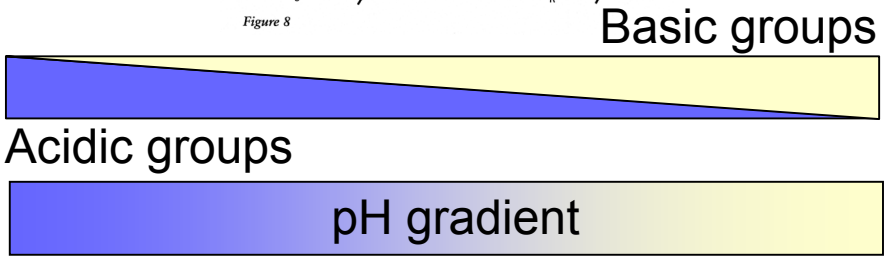
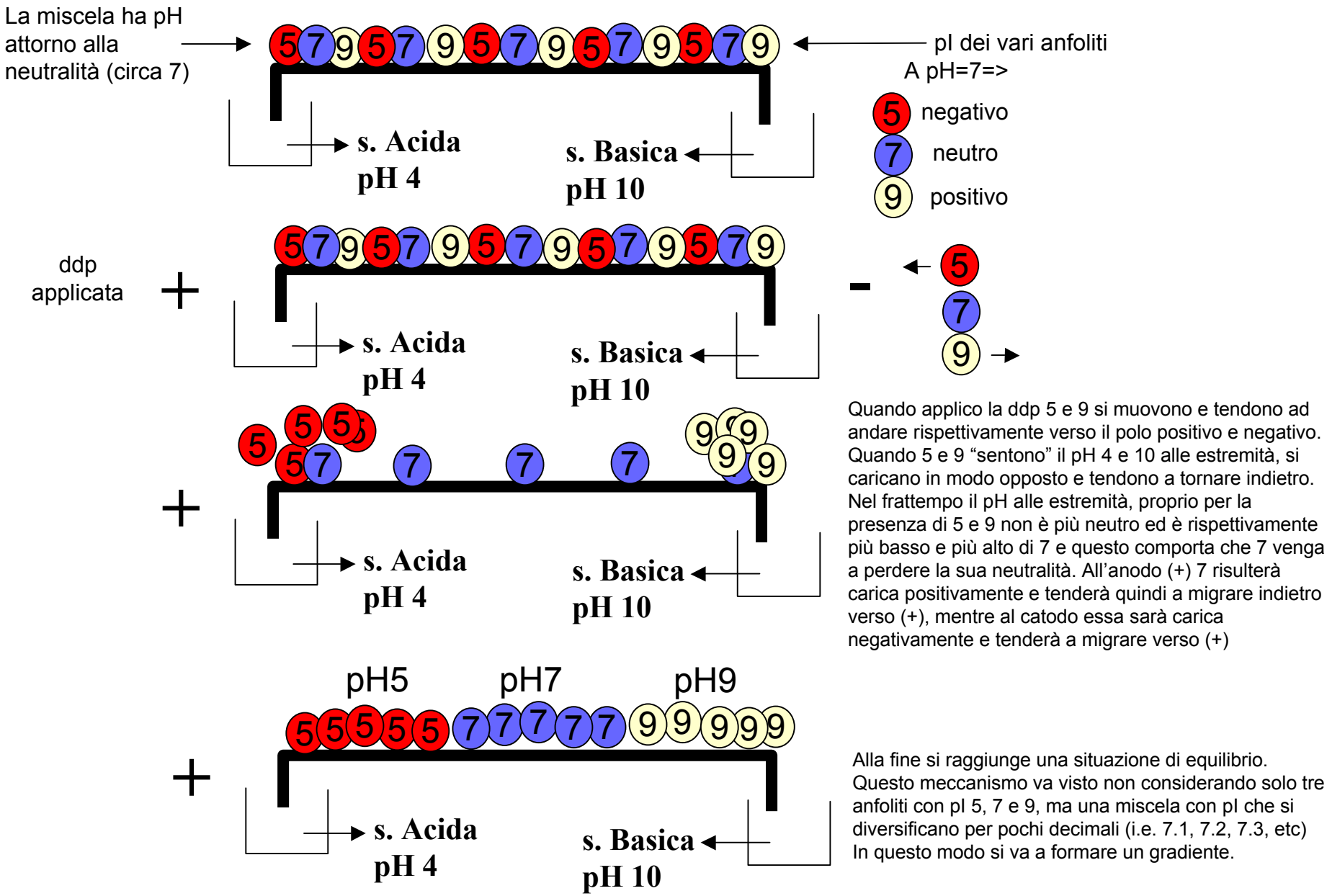


Figure 8



Isoelettrofocalizzazione: generazione del gradiente di pH



Quando applico la ddp 5 e 9 si muovono e tendono ad andare rispettivamente verso il polo positivo e negativo. Quando 5 e 9 "sentono" il pH 4 e 10 alle estremità, si caricano in modo opposto e tendono a tornare indietro. Nel frattempo il pH alle estremità, proprio per la presenza di 5 e 9 non è più neutro ed è rispettivamente più basso e più alto di 7 e questo comporta che 7 venga a perdere la sua neutralità. All'anodo (+) 7 risulterà carica positivamente e tenderà quindi a migrare indietro verso (+), mentre al catodo essa sarà carica negativamente e tenderà a migrare verso (+)

Alla fine si raggiunge una situazione di equilibrio. Questo meccanismo va visto non considerando solo tre anfoliti con pI 5, 7 e 9, ma una miscela con pI che si diversificano per pochi decimali (i.e. 7.1, 7.2, 7.3, etc) In questo modo si va a formare un gradiente.

Isoelettrofocalizzazione: vantaggi dei gradienti immobilizzati

=> possibilità di reperire in commercio gel preformati - **minimizza variazioni dovute alla preparazione dei gel**;

=> i gel vengono preparati su una pellicola di plastica che ne facilita l'utilizzo e consente di **maneggiarli senza romperli** (gel molto lassi, T molto bassi);

=> i **gradienti di pH sono stabili** nel tempo e non subiscono alterazioni dovute alla presenza del campione stesso.

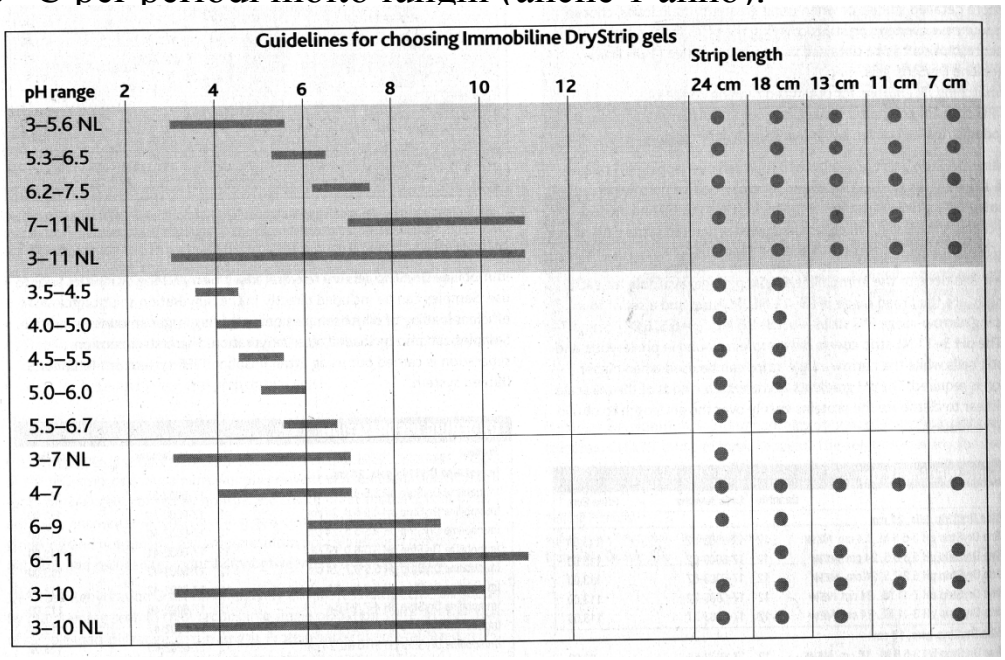
=> I gradienti sono praticamente continui e possono essere costruiti secondo diverse esigenze: lineari/non lineari; ampi (ad esempio pH 3-10)/molto ristretti (anche pH 4-5)

Commercialmente sono disponibili gel per isoelettrofocalizzazione con gradienti immobilizzati di diversi tipi ma per convenzione le dimensioni sono le seguenti: 3 mm larghezza - 0.5 mm spessore (dopo reidratazione). Questi gel vengono solitamente venduti deidratati, e possono essere conservati a -20 °C per periodi molto lunghi (anche 1 anno).

Immobiline DryStrip Gels (continued)

TECHNICAL SPECIFICATIONS	
Gel dimensions	70 × 3 × 0.5 mm, 110 × 3 × 0.5 mm, 130 × 3 × 0.5 mm, 180 × 3 × 0.5 mm, 240 × 3 × 0.5 mm
Gel matrix	Polyacrylamide T = 4%, C = 3%
Gel backing	Polyester film
Storage	-20 °C

Da notare i parametri T e C, che sono molto bassi. In questo tipi di elettroforesi il gel svolge l'unico scopo di prevenire il rimescolamento delle proteine a causa dei moti convettivi. Esso non deve interferire però con la migrazione delle proteine.

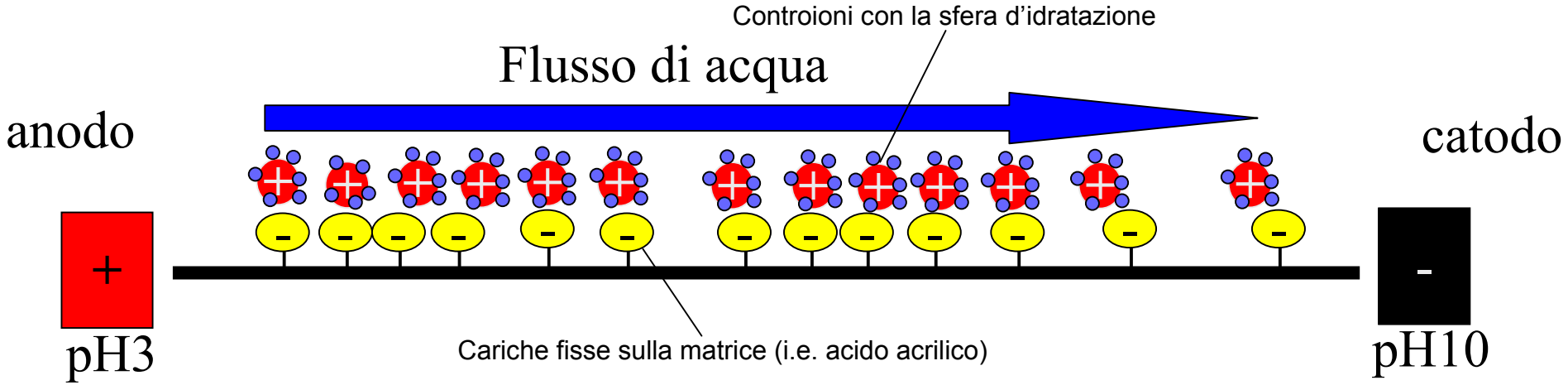


Isoelettrofocalizzazione: reidratazione dei gel

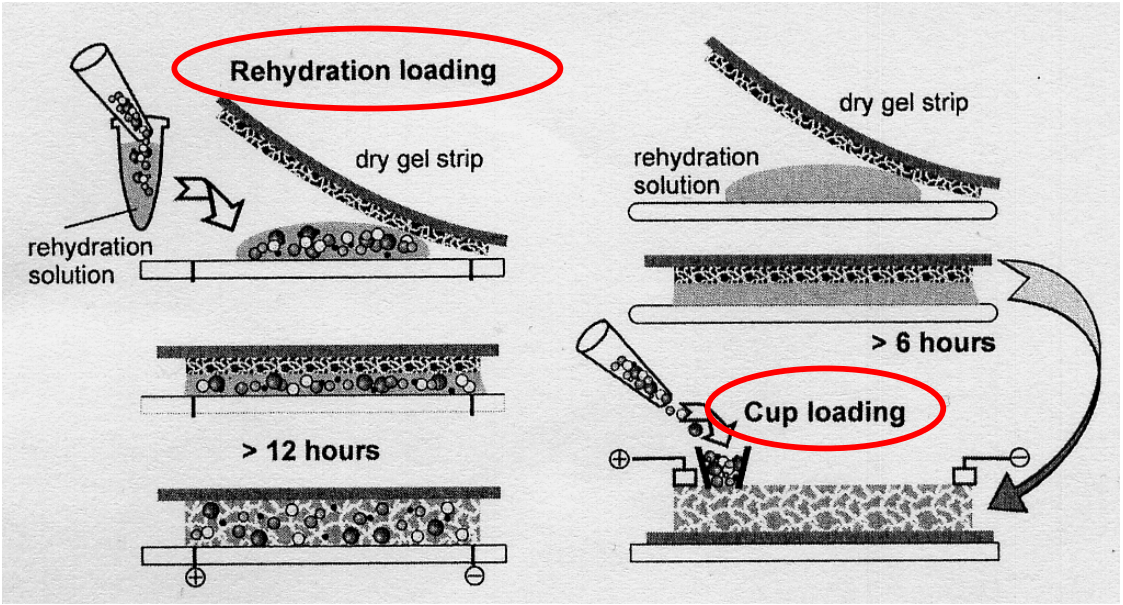
I gel recanti i gradienti di pH immobilizzati sono di solito deidratati e devono essere reidratati in opportune condizioni:
Si reidratano in modo da poter condurre in seguito la corsa elettroforetica:
Il metodo più comunemente usato prevede che i gel vengano messi a contatto con un volume specifico (a seconda delle loro dimensioni) di una soluzione di reidratazione:
8 M Urea (o in alternativa la composizione usata per il lysis buffer), 4-0,5 % CHAPS, 0,2 % DTT (o altri agenti riducenti), 0,5% (fino a 2% nel caso di strip da 24 cm) IPG buffer, 10% glicerolo e 0,002% BBF.

Fenomeno dell' **elettroendosmosi**:

Nel caso ci siano cariche fisse (i.e. acido acrilico copolimerizzato con l'acrilamide [impurezza che è possibile ritrovare nella soluzione di acrilamide e che comporta la presenza di un gruppo carbossilico sul reticolo di acrilamide]) sulla matrice che forma il gel queste non possono migrare in un campo elettrico ma hanno solitamente dei controioni con la loro sfera d'idratazione che migrano verso il polo opposto creando un vero e proprio flusso di acqua. (fenomeno che portava a dei problemi notevoli utilizzando gradienti di pH non immobilizzati => distorsione/spostamento del gradiente di pH). Il glicerolo aumentando la densità del mezzo diminuisce/minimizza questo effetto - importante anche durante il trasferimento delle proteine dalla prima alla seconda dimensione. Tale fenomeno si sfrutta in modo positivo nell'elettroforesi capillare (elettroforesi condotta in assenza di una matrice solida reticolante, ovvero in soluzione libera), dove crea un vero e proprio flusso in grado di trasportare anche molecole con carica opposta verso il catodo).
Fenomeno che disturbava i gradienti di pH generati con anfoliti carrier e che non li rendeva "stabili" nel tempo".



Isoelettrofocalizzazione: reidratazione dei gel



Rehydration loading

Il campione si trova in lysis buffer e viene diluito in rehydration buffer (calcolo di µg da utilizzare nella IEF - tutti i campioni devono essere normalizzati: stessa quantità di campione e stesse proporzione lysis buffer/rehydration buffer nel caso questi due fossero diversi). Il campione così preparato viene lasciato 1h ad equilibrare. Il campione viene applicato nello strip holder (contenitore delle stesse dimensioni della strip - minimizzare volumi - volumi predeterminati). Il gel viene applicato a testa in giù in modo che si stabilisca un contatto con gli elettrodi. Il gel viene lasciato in queste condizioni per 12 h con applicata una ddp di 50 V. Dal momento che il gel era secco, esso si rigonfia alle sue dimensioni originarie e nello stesso tempo le proteine, presenti in soluzione, vengono "aspirate" assieme al liquido. Il voltaggio favorisce l'entrata delle proteine ed il gel ha delle maglie (C e T) tali da consentire una loro agevole entrata. La corsa può avvenire sia a testa in giù nello stesso strip holder che a testa in su in uno strip holder apposito. Il gel viene coperto con un apposito olio (cover fluid) per fare in modo che durante la corsa il campione non evapori.

Cup loading

Il gel viene reidratato seguendo una procedura analoga a quella utilizzata per il caricamento a reidratazione (rehydration loading) con la sola differenza che non c'è campione proteico durante tale fase. Al termine della reidratazione, il gel viene collocato capovolto (gel verso l'alto) in un'apposita vaschetta. Sul gel, in una determinata posizione (a seconda che sia un caricamento anodico o catodico) viene collocata un apposito applicatore dentro il quale viene caricato il campione. La corsa di isoelettrofocalizzazione in questo caso viene effettuata sempre a testa in sù.

Isoelettrofocalizzazione

Rehydration vs cup loading

(not always we have a scientific explanation!)

Rehydration loading	*Cup loading*
Pro	**Pro**
The proteins are distributed evenly over the gradient, precipitation at the sample application point cannot happen.	IEF in very acidic narrow gradients and in basic pH gradients works much better with cup loading.
Rehydration, sample application and IEF can be combined to one single step, resulting in less manipulation steps.	The sample gets immediately transported into the gel and becomes separated, thus the chances of protein interactions are reduced, for instance by proteases.
When the sample is diluted, a higher protein load can be applied.	The proteins can be loaded onto both ends of the strip in order to include proteins with pIs close to the pH of their application points.
Voltage can be applied during rehydration, which improves the entry of high molecular weight proteins.	Because of mostly unknown reasons*) some sample types display more spots after cup loading, which are obviously lost with rehydration loading.
Con	**Con**
When basic gradients like pH 6 – 11 and pH 6 – 9 are employed, rehydration loading leads to severe protein losses, because some proteins do not like basic environment.	Proteins with isoelectric points close to the pH of the application point have low mobility and solubility, they tend to precipitate on the surface and build a streak in the second dimension gel. Also when proteins applied on both ends, proteins precipitate at the application points. Quantification of proteins becomes a problem.
The protein mixture is kept for many hours at room temperature, thus the danger of exposure to protease activities can increase.	

TABLE 15. REHYDRATION SOLUTION VOLUME PER IPG STRIP

IPG strip length (cm)	Total volume per strip[1] (µl)
7	125
11	200
13	250
18	350

[1]Including sample, if applied.

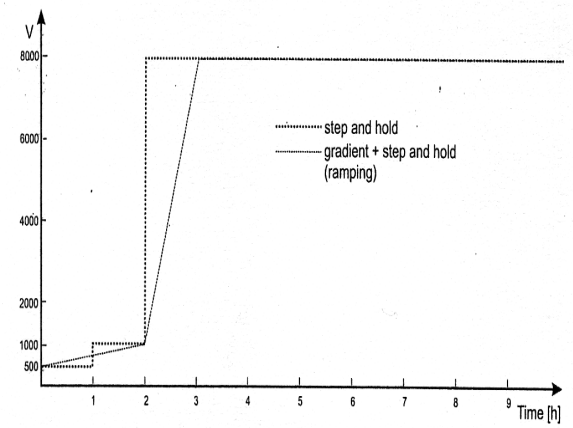
Volumi calcolati di liquido da applicare per la reidratazione / caricamento per reidratazione.
Volumi maggiori => entrata preferenziale di molecole a basso peso molecolare (prima acqua poi altri ioni e per ultime proteine ad alto PM).
Volumi minori: il gel non si rigonfia alle opportune dimensioni => dimensioni dei pori della matrice non sono controllati e pari a quello che dovrebbero essere (minori). Questo porta ad una difficolta nell'analizzare proteine ad alto PM.

Rehydration loading	*Cup loading*
During the rehydration process the protein concentration outside the gel strip increases, which can lead to aggregation of proteins; those cannot enter the gel.	During the first phase of IEF the proteins become concentrated at the point of entry and can form aggregates and precipitate.
With preparative sample loads, proteins with low solubility tend to precipitate inside the gel during the run, which lead can to blurred spot pattern.	Cup loading on both ends does not always work fine, for example, when the mobilities of negatively and positively charged proteins are too different.

Isoelettrofocalizzazione: voltaggi durante la separazione

Perché viene applicata una ddp incrementale e non si opera subito al massimo?

Durante la corsa elettroforetica avvengono tre cose:
a) I sali che recano una carica fissa escono progressivamente dal gel e non contribuiscono più alla conducibilità del gel;
b) Gli anfoliti carrier via via che la corsa procede raggiungono pH = pI e non contribuiscono più alla conducibilità del gel;
c) Le proteine quando migrano via via perdono la loro carica e quindi la conducibilità del gel diminuisce progressivamente.
Queste tre cose fanno si che si possa aumentare il voltaggio dal momento che la corrente progressivamente scende. Se si procedesse subito al voltaggio massimo, si svilupperebbe troppa potenza e quindi troppo calore che rovinerebbe (brucerebbe) il gel (in ogni caso, si opera sempre con un limite sulla corrente!).



Il voltaggio può essere aumentato sia in modo lineare (ramping) che in modo brusco (step and hold). Le condizioni di corsa dipendono dal particolare intervallo di pH scelto e dalla lunghezza della strip. Importante è impostare un amperaggio massimo per ciascuna strip (50 mA - importante impostare il n° di strip che vengono corse in parallello poichè la corrente massima sarà diversa: 1 strip => 50 mA max - 2 strip => 100 mA max). Sarebbe opportuno stabilire il Vh (vedasi slide succesiva) da applicare per ottenere la migliore focalizzazione (metodo empirico - varie corse IEF e scegliere quella migliore). Tutte le strip corse in parallelo devono essere praticamente "equivalenti" in termini di resistenza per non avere canali preferenziali di passaggio della corrente. Il sistema misura la corrente totale che passa, non come essa si distribuisce tra le diverse strip!

Termine focalizzazione:

a) **Strip congelate** - Strip possono essere lavate in acqua (immerse una decina di volte in un becker contenente acqua), scolate su un pezzo di carta e messe a congelare (-80 °C) in un contenitore dove vengono fatte appoggiare sul loro supporto di plastica - IMPORTANTE PER NON ROVINARE IL GEL che è molto appiccicoso). La seconda dimensione può essere corsa in un secondo momento.Se si prevede che a volte ci sia la necessità di effettuare la seconda dimensione in un secondo momento e quindi di adottare questo metodo di conservazione => anche nel caso si possano correre subito, le strip vengono sempre congelate. Aumenta la riproducibilità del metodo (IMPORTANTE: STESSE OPERAZIONI PER OGNI STRIP CHE SI VUOLE CONFRONTARE!).

b) **Strip analizzate in seconda dimensione**

Isolelettrofocalizzazione

Non esiste un protocollo di isoelettrofocalizzazione universale => ogni singolo passo deve/può essere ottimizzato in funzione del campione in indagine. Questo vale a partire dalla scelta del lysis buffer fino ai voltaggi applicati durante la corsa di IEF.
Per quanto concerne la corsa di isoelettrofocalizzazione valgono comunque alcune regole generali:

Temperatura: mantenuta attorno ai 20 °C: più bassa l'urea cristallizza, più alta (>37 °C) l'urea modifica le proteine (carbamilazione).

Sistemi per il dissipamento del calore (cella di Peltier) - Limitatori dell'amperaggio (mantenuto al di sotto dei 50 μA) [il passaggio di corrente genera calore - vedasi parte generale sull'elettroforesi).

Si adotta **l'integrale voltore (volthour)**, definito come la quantità di volt applicata in un determinato periodo di tempo
(esempio: 8000 Vh = 8000 V x 1h oppure 4000 V x 2h oppure [2000 V x 2h + 4000 V x 1h]).

Questo serve a riprodurre in modo migliore le stesse condizioni in corse effettuate separatamente poichè si compensa per eventuali variazioni nei voltaggi applicati dovute a variazioni della conducibilità (ricordarsi che si lavora in modalità di corrente limitante!).

Gradienti di voltaggio (esempio)

Corrente max/strip →
Temperatura corsa IEF →
Intervallo pH strip →
Lunghezza strip →

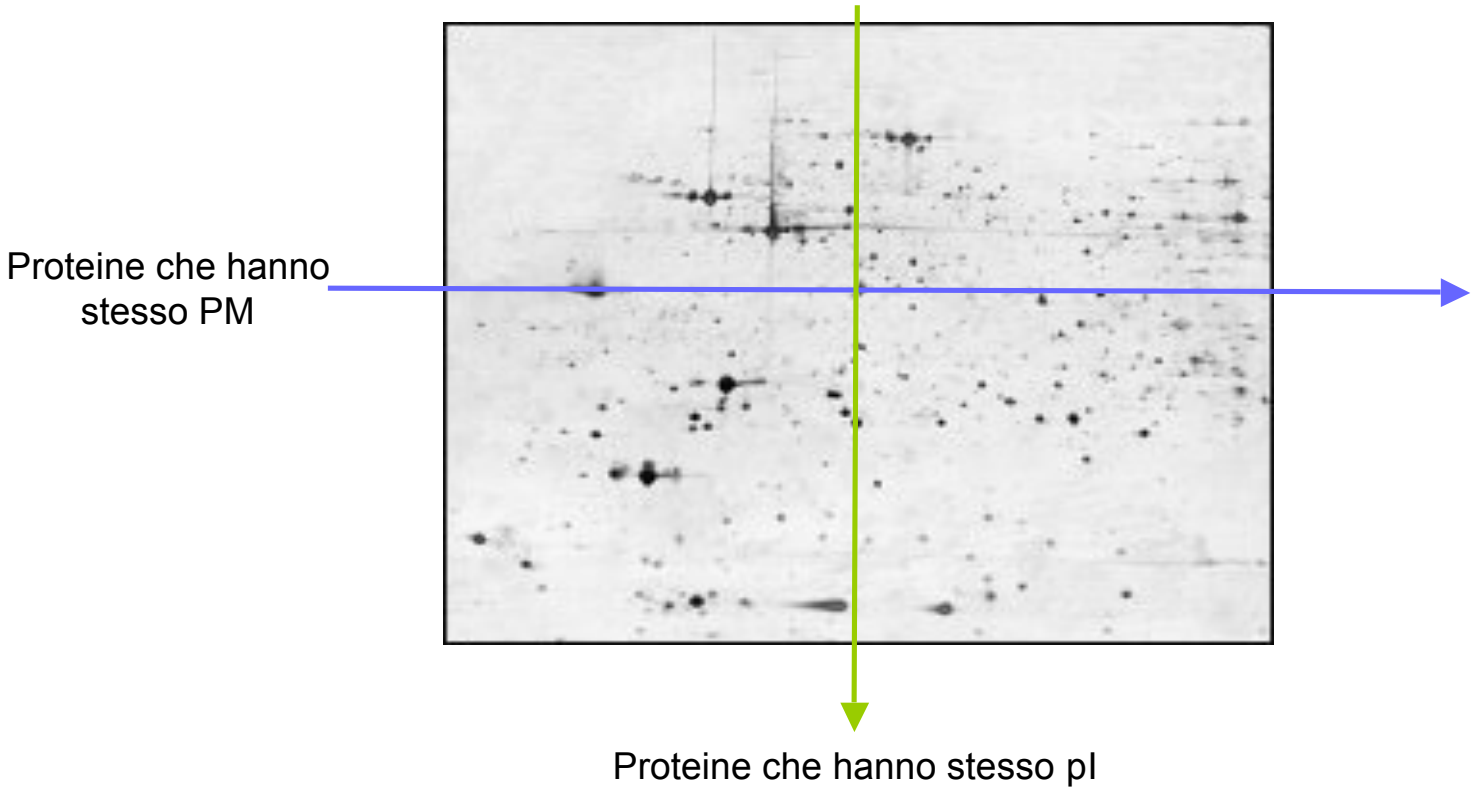
50 µA per IPG strip
20 °C for both rehydration and IEF

pH gradients 4–7 L, 3–10 L, and 3–10 NL

	Step	Voltage	Step duration (h:min)	Volt-hours (Vh)	Gradient type
7 cm		rehydration	12:00[1]		
	1	500	0:30	250	Step-n-hold
	2	1000	0:30	500	Step-n-hold
	3	8000[2]	1:00	8000	Step-n-hold

Isoelettrofocalizzazione: alcuni esempi

Corretta Focalizzazione (visualizzazione dopo analisi 2D)

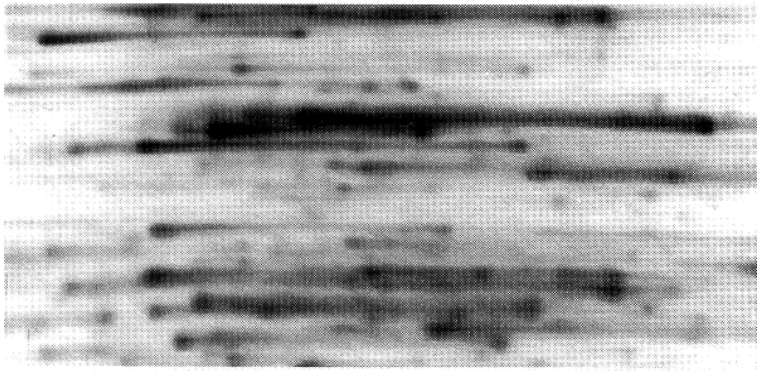


In questa immagine risulta evidente come la combinazione di due strategie separative “ortogonali” porta ad ottenere una separazione di proteine che altrimenti non sarebbero risolte usando solo una delle due metodiche.

NB: limiti nella IEF:

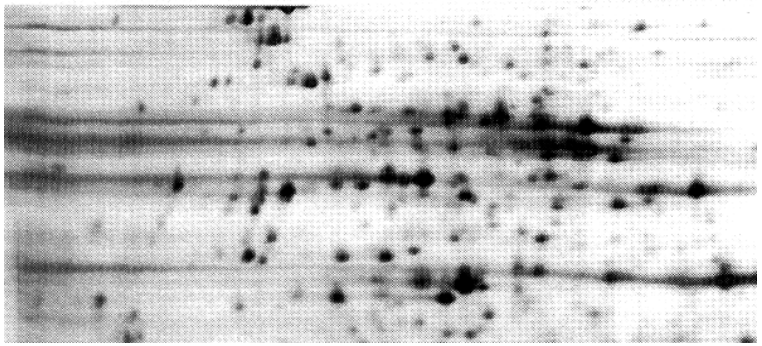
a) Proteine ad alto peso molecolare non entrano efficientemente nella strip di IEF e come si vede la parte alta del gel è praticamente vuota! (sopra i 100 kDa si inizia ad avere problemi);
b) La scelta dell’intervallo del gradiente limita le proteine che andremo a visualizzare.

Aspetto del gel dopo colorazione: indicazioni sull'andamento della corsa di IEF



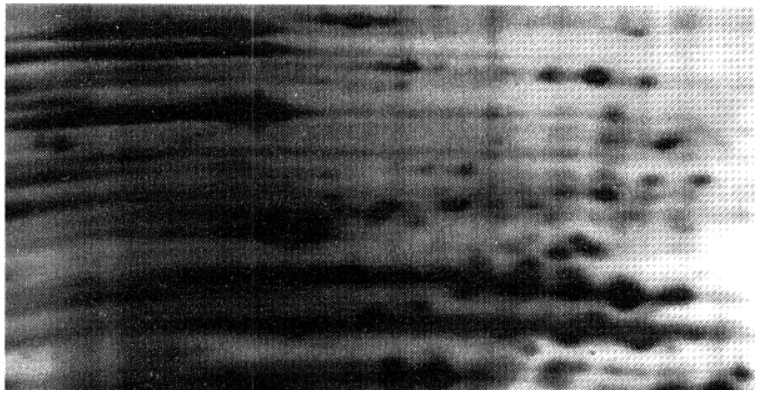
UNDER-FOCUSING:

Non è stato applicato un numero di Vh sufficiente per permettere la focalizzazione di tutti gli spots. La maggior parte degli spot mostra una coda e lo spot stesso non è ben definito, indice del fatto che non è perfettamente focalizzato.



OVER-FOCUSING:

E' stato applicato un numero di Vh altamente superiore a quello necessario per permettere la focalizzazione di tutti gli spots. La maggior parte degli spot risulta focalizzata mentre alcuni, pur essendo ben focalizzati, mostrano una una coda. Si distingue nettamente dal under-focusing.
Dovuto a fenomeni di elettroendosmosi, ossidazione delle cisteine o modificazione delle proteine

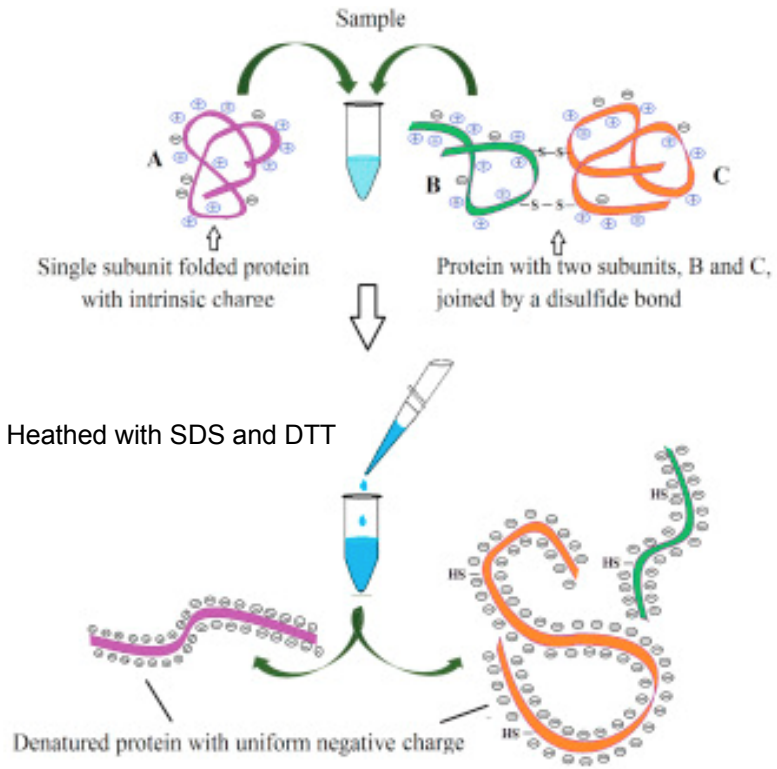


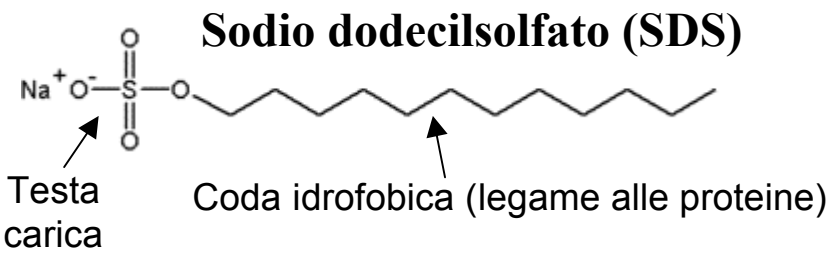
PRECIPITAZIONE nella IEF:

Si notano (soprattutto in una regione ben delimitata del gel) delle forti striature orizzontali, indice del fatto che la proteina è precipitata nella prima dimensione e non ha focalizzato. Durante la seconda dimensione il precipitato è stato risolubilizzato dall'SDS.

SDS PAGE - analisi singola o in combinazione con IEF (2D-PAGE)

Separazione elettroforetica che discrimina le varie proteine in base al loro PESO MOLECOLARE
NB: Sempre meglio parlare di peso molecolare apparente in SDS PAGE





L'SDS si lega alle proteine mediante la sua porzione idrofobica e rompe sia le strutture secondaria che terziarie (non i legami disolfuro). Ogni molecola di SDS possiede una carica negativa e su ogni mg di proteina si legano circa 1,4 mg di SDS [equivale a dire che c'è una molecola di SDS circa ogni 2 aa]. L'elevata carica negativa (la forza di repulsione che le cariche negative esercitano fra di loro) conferita alla catena polipeptidica la rende praticamente lineare. L'elevata carica negativa conferita dall'SDS rende trascurabile la carica propria della proteina. Dato che l'SDS si lega con la stessa stechiometria a tutte le proteine il rapporto massa/carica è uguale per tutte le proteine. Questo fa si che sia esclusivamente l'ingombro sterico ad influenzare la migrazione (mobilità elettroforetica) in una matrice a porosità controllata (gel di poliacrilammide) con applicata una differenza di potenziale.

Perchè allora peso molecolare apparente in SDS PAGE?

Perchè non sempre tutto quello che viene assunto in teoria si verifica nella realtà:

a) **Proteine con composizione aa particolare possono avere una stechiometria di legame al SDS diversa;**

b) **La loro carica può non essere trascurabile.**

Relazione lineare tra M e mobilità elettroforetica in una SDS-PAGE

Costanti empiriche determinate da T e C, temperatura
e dalle condizioni sperimentali (tamponi, corrente, etc.)

$$u' = A - B \log M$$

Mobilità elettroforetica — Peso molecolare

NB: DIPENDENZA LINEARE
è valida solo per determinate accoppiate:
PM-porosità del gel

T,%	5	10	15
M ($\times 10^{-3}$)	18–330	10–110	10–60

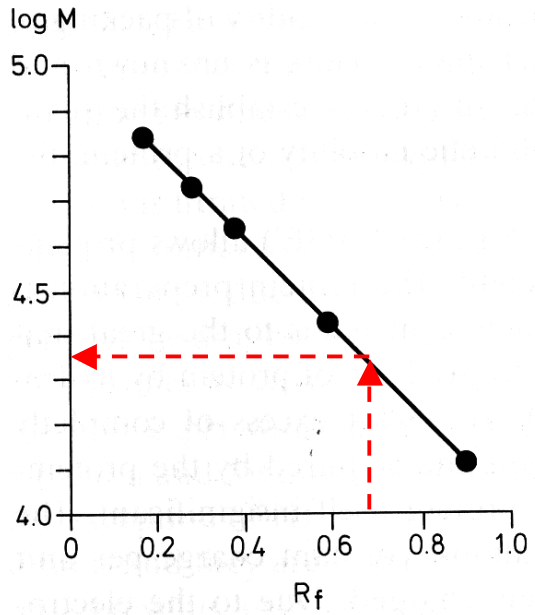
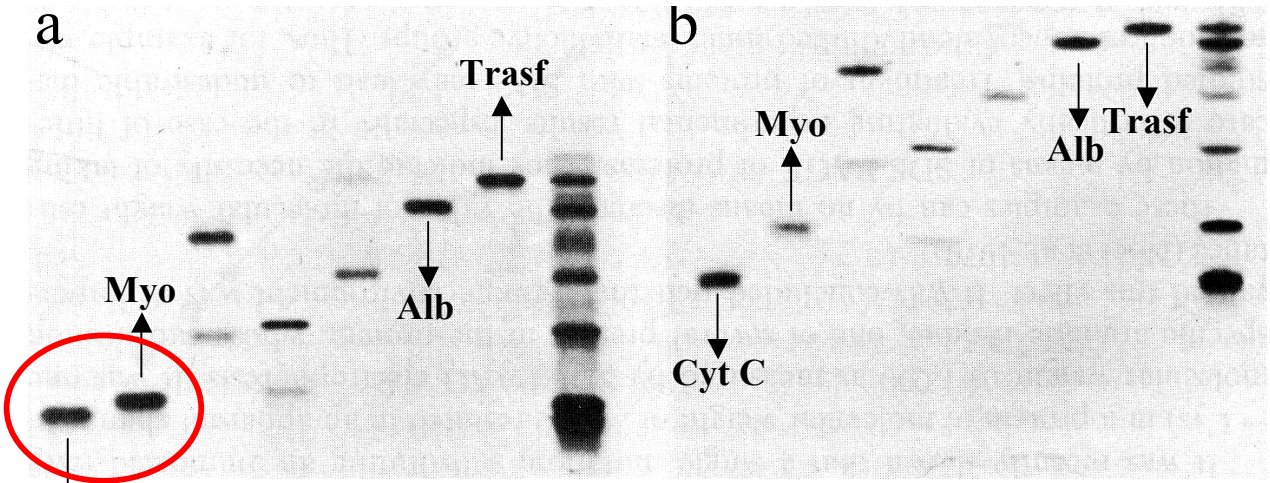


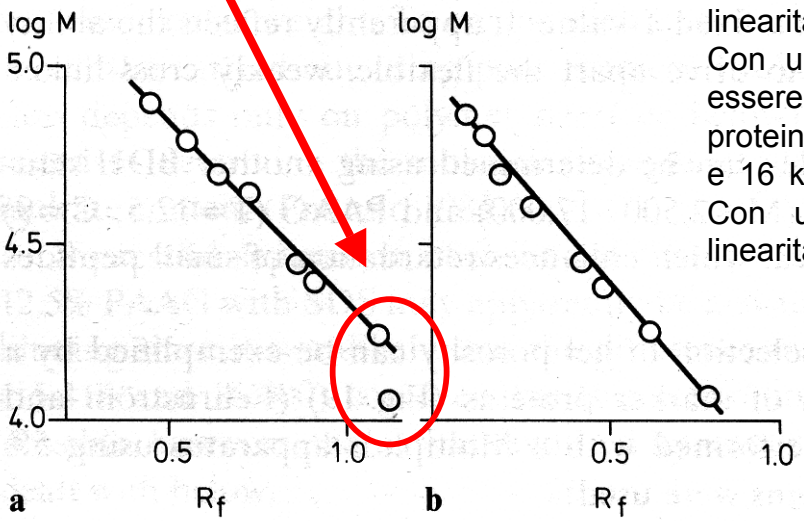
Fig. 18. Linear plot of logarithm molecular mass (log M) versus relative electrophoretic mobility (R_f) of proteins upon PAGE

Al posto di ù si usa R_f (mobilità elettroforetica relativa), espressa come rapporto tra la distanza percorsa dalla molecola della quale si vuole calcolare R_f e la distanza percorsa dalla molecola più veloce che si è analizzata nel gel (di solito è il BBF o una molecola proteica a basso peso molecolare, la più veloce della corsa elettroforetica, che può essere il tracciante oppure il riferimento di peso molecolare più piccolo) [i.e. d_p/d_{BBF}]. Separando molecole proteiche a peso molecolare noto si può costruire una curva di calibrazione. Questa consente, per una proteina incognita corsa sul medesimo gel, di ricavare la sua R_f e quindi di risalire al suo PM.

Relazione lineare tra M e mobilità elettroforetica in una SDS-PAGE

T=5% T=10%





Esempio nel quale non si verifica la linearità tra M e Rf.
Con un gel T=5% le maglie risultano essere troppo lasse per distinguere due proteine con peso molecolare di 12 kDa e 16 kDa (Cyt e Myo, rispettivamente).
Con un gel T=10% si ripristina la linearità tra Rf e logM.

Fig. 20 a, b. The graphs of log M versus R_f plotted on the basis of data given in Fig. 19 (Fehrnström and Moberg 1977)

Myo e Cyt C: stessa Rf ma diverso logM

Opzioni a disposizione per ottimizzare la separazione in SDS-PAGE (sia in 2D che 1D SDS-PAGE)

Cosa si vuole visualizzare tramite la separazione in SDS-PAGE?

Come nella IEF (dove si sono fatte delle scelte relative alle dimensioni delle strip e all'intervallo di pH preso in considerazione), anche per quel che concerne la SDS-PAGE è possibile ottimizzare il processo separativo in funzione di quello che si vuole visualizzare:

a) **Gel omogeneo (C e T fissi) vs Gel in gradiente (T variabile)**
I gel in gradiente offrono una risoluzione maggiore su di un intervallo di M (peso molecolare) maggiore. Per questi gel però non vale la linearità per quel che concerne LogMW e Rf.. Questo tipo di gel però sono più difficili da generare ed in genere difficili da riprodurre (alta variabilità gel-gel). Solitamente vengono acquistati e non preparati "in casa" come per i gel a C e T fissi.

b) **Ottimizzare T (e C)**
In funzione dei pesi molecolari che si vogliono maggiormente risolti possono essere scelti degli opportuni valori di T (e C) che meglio si prestano a risolvere le proteine in quello specifico intervallo.

c) **Scegliere i tamponi di corsa**:
- scelta iniziale cade sul classico Laemmli Buffer (Tris-Glicina - vedasi in seguito);
- Tris-Tricina => migliora la separazione delle proteine a **basso peso molecolare** (**Vedasi avanti - sistemi discontinui**);
- Tris-Borato-EDTA => migliora le separazione delle **glicoproteine** - l'acido borico forma in soluzione specie che si vanno a complessare con i carboidrati conferendo carica negativa

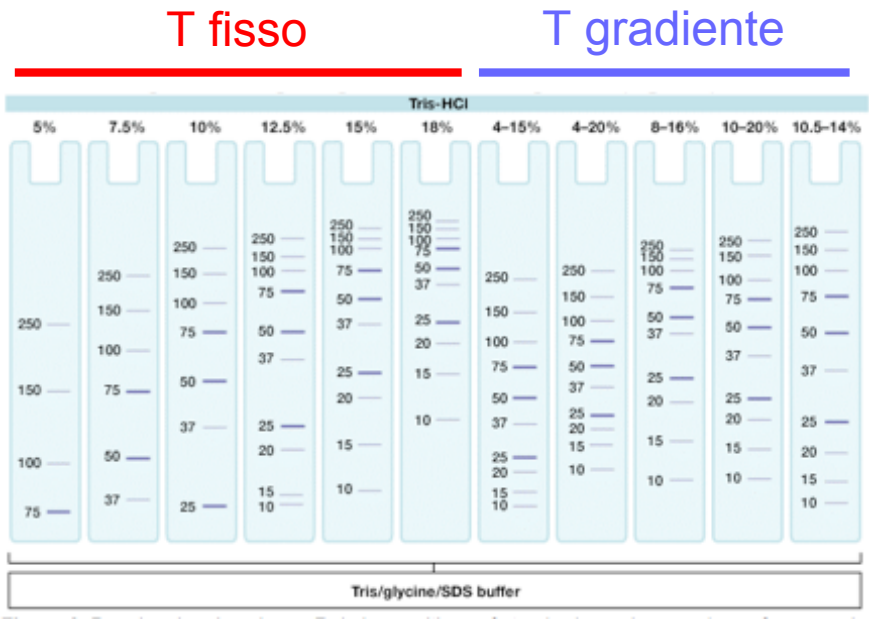
At low boron concentrations (B ≤ 0.025 M) the following equilibrium is found $B(OH)_3 + 2H_2O \leftrightarrow [B(OH)_4]^- + H_3O^+$
At higher boron concentrations (B > 0.025 M) an equilibrium is formed between $B(OH)_3$, polynuclear complexes of $B_3O_3(OH)_4^-$, $B_4O_5(OH)_4^{2-}$, $B_3O_3(OH)_5^{2-}$, $B_5O_6(OH)_4^-$ and $B(OH)_4^-$.

- altro ….. (esiste una svariata serie di tamponi che possono essere utilizzati in casi particolari.....è bene quindi sapere che c'è la possibilità di agire anche a questo livello!).

Molto spesso la cosa migliore da fare è quella di eseguire delle prove variando di volta in volta un solo parametro ed osservare i miglioramenti/(peggioramenti) ottenuti.

Opzioni a disposizione per ottimizzare la separazione in SDS-PAGE (sia in un contesto 2D che 1D SDS-PAGE)

Gel omogeneo (C e T fissi) vs Gel in gradiente (T gradiente)



Notare la diversa
Distribuzione dei vari riferimenti di M

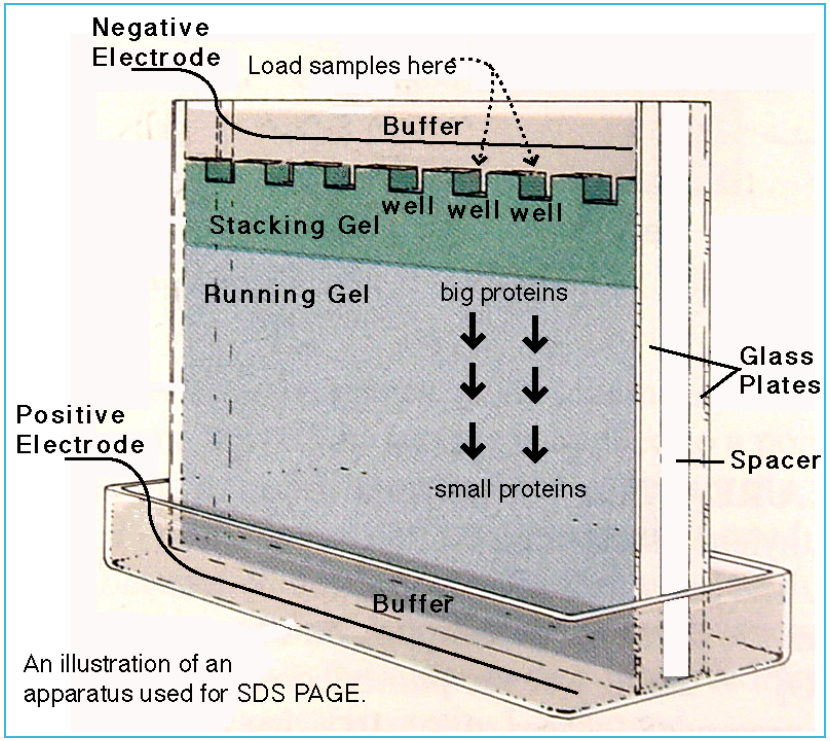
Ottimizzare T (e C) (quale T offre la miglior separazione per le proteine d'interesse?)

Se l'analisi elettroforetica è un'analisi esplorativa conviene scegliere di operare con percentuali di T in grado di offrire la migliore separazione su un "range più esteso possibile. Osservando l'immagine sopra riportata, ad esempio, si potrebbe decidere di operare con un 12.5% o con un gel in gradiente tipo 10.5-14%. Una volta però individuata la regione che riveste maggiore interesse, si possono fare dei miglioramenti nella separazione operando con gel diversi utilizzando T o gradienti che offrono una risoluzione migliore nella regione prescelta.

Molto dipende dalla proteine d'interesse o dalla necessità ad esempio di analizzare più proteine in contemporanea (ad esempio voler effettuare analisi di WB su più proteine sfruttando una sola analisi SDS-PAGE, in questo caso il gel può essere trasferito in toto sulla membrana e poi la membrana tagliata in "strisce" in modo da avere zone conteneti proteine diverse da sottopporre ad riconoscimenti con ab diversi

Alcune considerazioni ulteriori sui sistemi SDS-PAGE

Sistema elettroforetico "classico" per condurre delle analisi in singola dimensione di tipo SDS-PAGE



Parametri fisici che POSSO modificare in una gel elettroforesi:

1) Lunghezza del gel: influenza in modo specifico la risoluzione della separazione. Aumento della lunghezza => aumento di R.

2) Spessore del gel: Influenza la capacità di caricamento. Aumento dello spessore => diminuzione della resistenza. Diminuisce anche la capacità di dissipare calore.

1) Lunghezza dei pozzetti: influenza la capacità di caricamento. La lunghezza dei pozzetti "toglie spazio al running gel e quindi alla risoluzione del mio sistema.

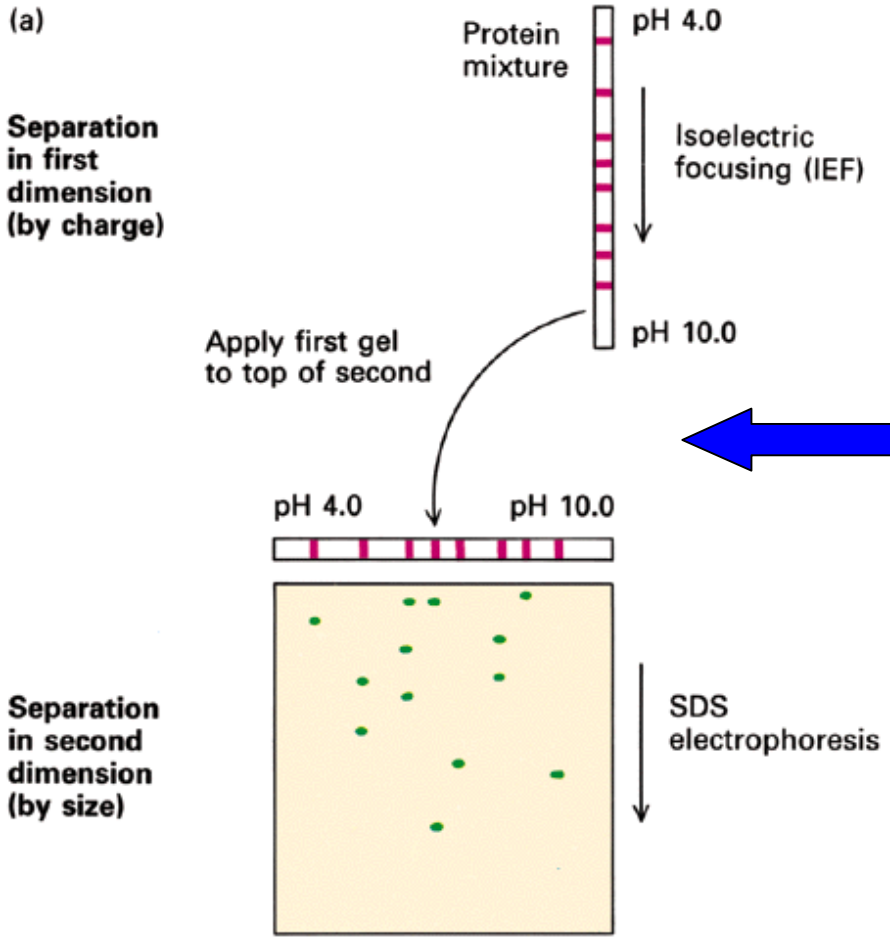
E' bene tenere a mente queste considerazioni passando da un formato all'altro poiché, cambiando i parametri indicati viene a modificarsi la R del circuito elettrico con relative alterazioni sia nella potenza sviluppata che nella velocità di migrazione delle proteine (in dipendenza di come viene condotta una corsa elettroforetica, ovvero a V, I o W costanti - vedasi avanti)

Ricordiamo alcune nozioni di base:

a) Legge di Ohm: $V=RI$
b) Calore generato è legato a W (potenza)
c) $W=VI$ oppure I^2R

Le molecole proteiche migrano perché a loro viene applicata una forza: $F=qE$, dove E rappresenta il campo elettrico, che è legato alla ddp (V) applicata.

Analisi elettroforetiche bidimensionali (IEF/SDS-PAGE)



Condizionamento delle strip di IEF per l'analisi SDS-PAGE

Dopo il condizionamento, la strip viene fisicamente messa "in testa", ovvero adagiata a stretto contatto ad un gel di tipo SDS-PAGE.
Quando in questa condizione, viene applicata una ddp, le proteine precedentemente separate sulla base del loro pI escono dal gel di IEF, si accumulano all'interfaccia IEF/SDS-PAGE e successivamente vengono ad essere separate secondo il loro peso molecolare.
In pratica le molecole vengono ad essere sottoposte a due separazioni che sfruttano principi "ortogonali" (i.e. punto isoelettrico e peso molecolare).

Trasferimento delle proteine dalla 1ª alla 2ª dimensione

Dopo l'isoelettrofocalizzazione le strip vanno:

=> lavate 2 volte in acqua mQ per togliere l'eccesso di Dry strip cover fluid;
=> vanno congelate a -80 °C (si potrebbe procedere subito all'analisi in SDS-PAGE ma, dato che non sempre si riesce ad effettuare questa operazione immediatamente dopo l'IEF, conviene, al fine di migliorare la riproducibilità dell'analisi congelare sempre le strip).
=> condizionate per l'analisi in SDS-PAGE:

messe ad incubare in 2% SDS, 50 mM TRIS/HCl pH 8.8, 6 M Urea, 30% Glicerolo e 0,01% BBF in presenza di:

1% DTT - 15 min
2,5% Iodoacetamide (IAA) - 15 min

SDS: conferire carica negativa alle proteine - (sono necessari circa 30' per equilibrare completamente le strip di IEF con l'SDS. Durante queste operazioni, le strip non vanno incontro ad una rilevante perdita di proteine dal momento che recano comunque cariche positive e negative (quelle dei derivati dell'acrilamide per formare il gradiente di pH) che funzionano al pari di una colonna cromatografica a scambio ionico. L'SDS richiede un così lungo tempo per legarsi alle proteine perchè i gruppi carbossilici delle strips tendono a contrastare il suo legame alle proteine (repulsione elettrostatica).

Tris/HCl pH 8.8: anche se viene utilizzato un gel di accumulo (nel caso dei flatbed gels) il cui pH è pari a 6.8 si preferisce utilizzare pH 8.8 poichè l'alchilazione da parte della IAA è ottimale a questo pH.

Urea e Glicerolo: Aumentando la densità della soluzione acquosa della strip diminuiscono l'effetto del'elettroendosmosi, che porterebbe ad una sostanziale diminuzione dell'efficacia del trasferimento delle proteine dalla prima alla seconda dimensione. L'urea contribuisce anche al mantenimento in soluzione delle proteine idrofobiche.

BBF: utilizzato come tracciante per la corsa in seconda dimensione.

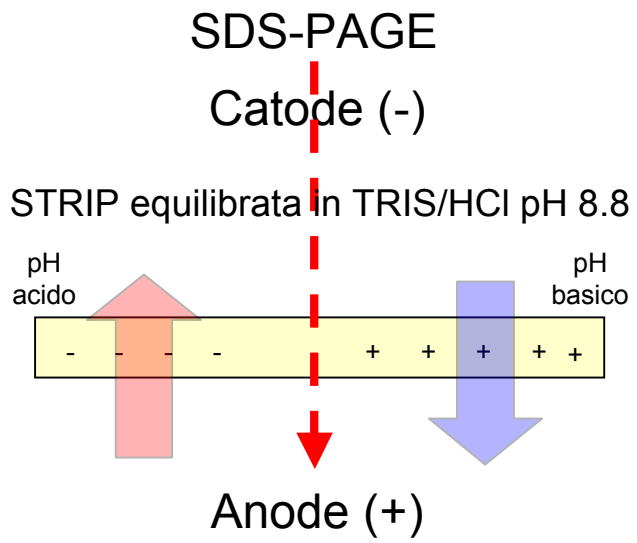
DTT: mantenere in stato ridotto i gruppi SH delle proteine

IAA: bloccare in modo covalente i gruppi SH delle proteine prevenendo la formazione di ponti disolfuro durante la seconda dimensione ed impedendo anche che quest'ultimi (gruppi SH) reagiscano con l'acrilamide.

Una proteina modificata in modo incontrollato risulta maggiormente soggetta a problemi di identificazione

Trasferimento delle proteine dalla 1ª alla 2ª dimensione

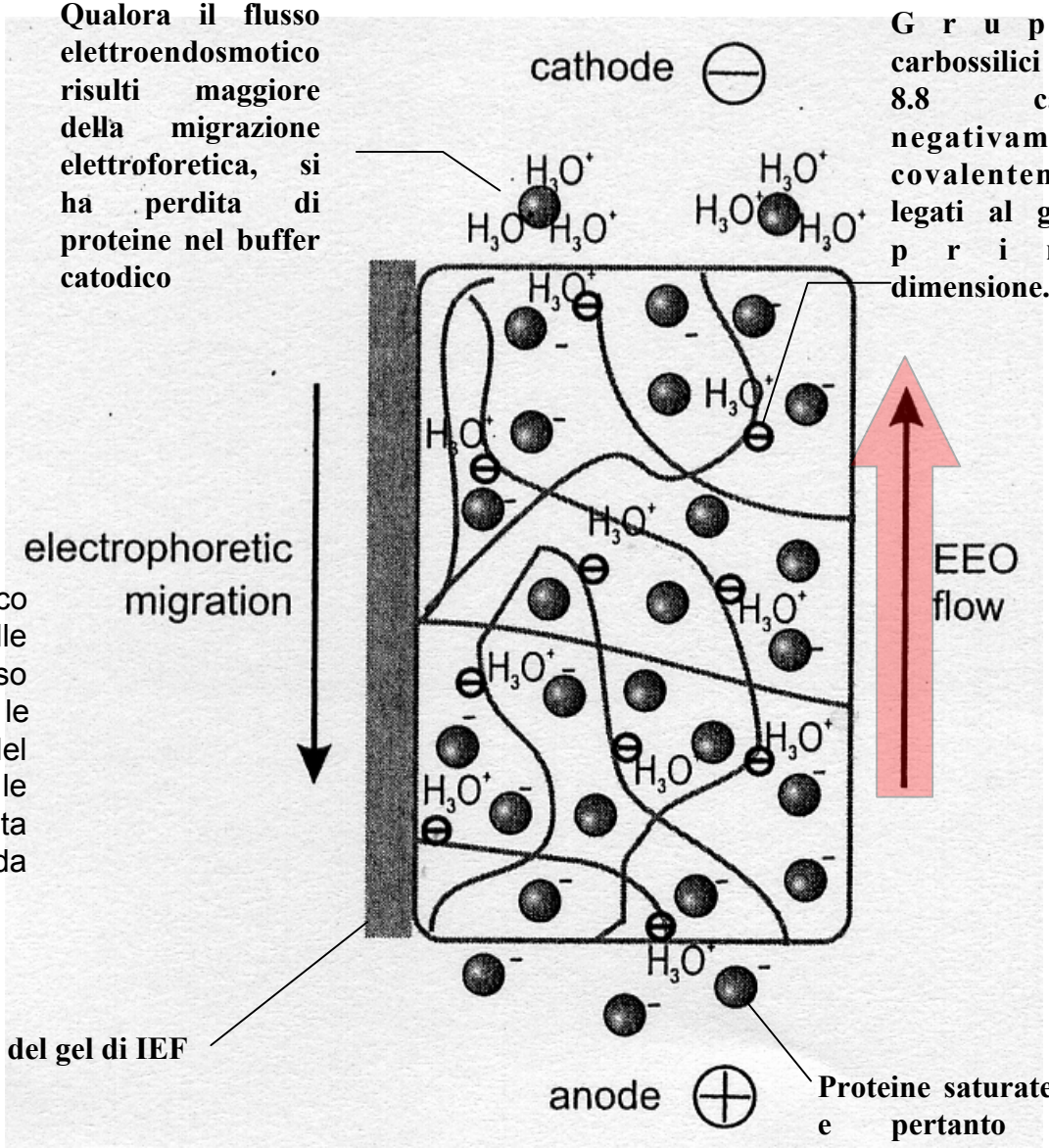
Flusso elettroendosmotico



In una porzione del gel il flusso elettroendosmotico fornisce un contributo favorevole all'uscita delle proteine dal gel e al loro trasferimento verso l'anodo (dx). Però, dalla parte opposta (sx), dove le cariche fisse sul gel sono negative, la direzione del flusso elettroendosmotico è inversa al moto che le proteine dovrebbero avere e questo rappresenta un ostacolo al loro trasferimento sul gel di seconda dimensione (SDS-PAGE).

Qualora il flusso elettroendosmotico risulti maggiore della migrazione elettroforetica, si ha perdita di proteine nel buffer catodico

Gruppi carbossilici (a pH 8.8 carichi negativamente) covalentemente legati al gel di prima dimensione.

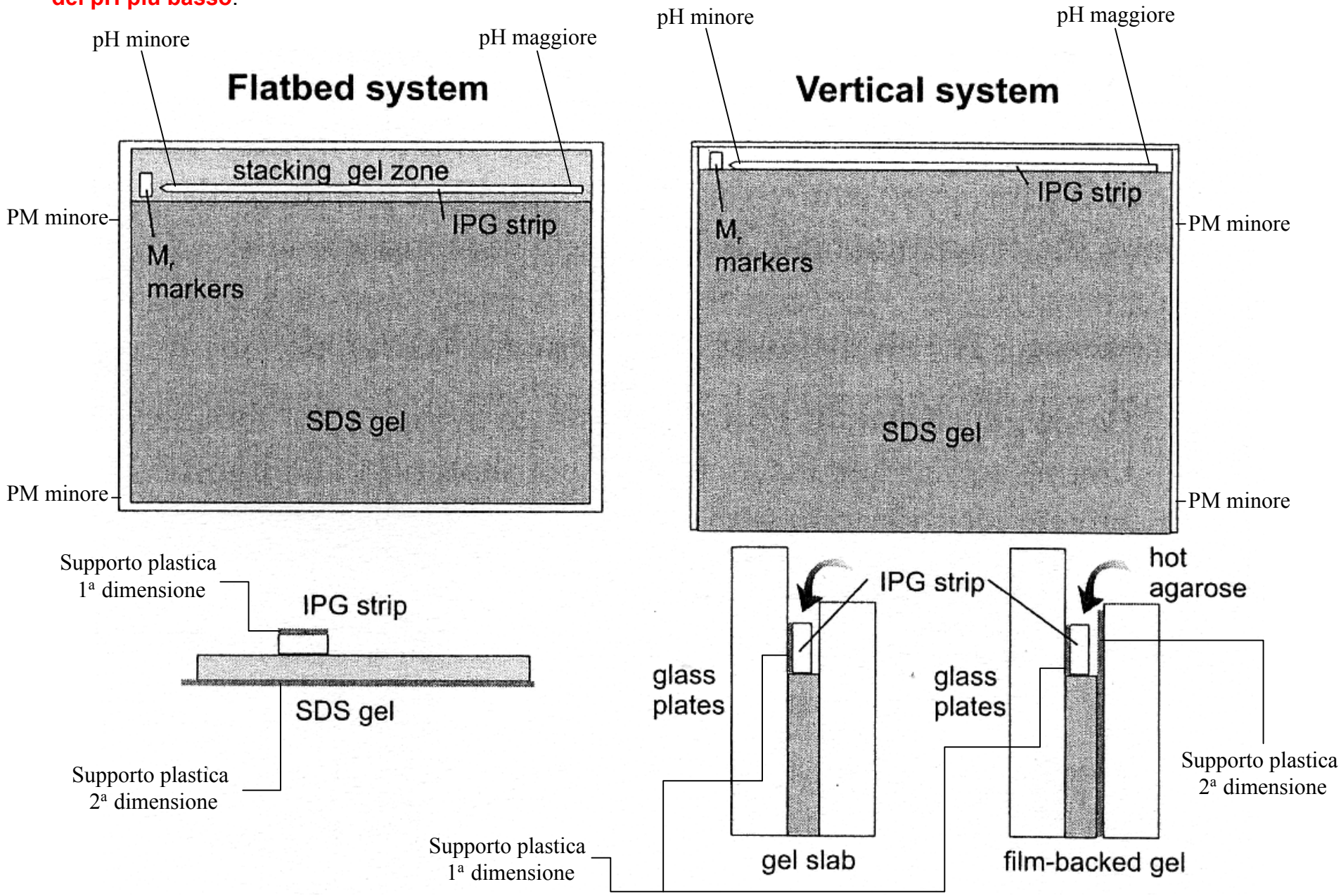


Supporto di plastica del gel di IEF

Proteine saturate di SDS e pertanto cariche negativamente.

Orientamento canonico della seconda dimensione

Esiste una **convenzione** su come correre i gel SDS-PAGE nel contesto di una analisi bidimensionale per far in modo che sia identificabile l'orientamento del gradiente di pH. La convenzione vuole che i riferimenti di **PM vengano collocati dalla parte del pH più basso**.



Trasferimento delle proteine dalla 1ª alla 2ª dimensione

Hot agarose: soluzione per fissare la strip in testa al gel di seconda dimensione

Soluzione di agarosio 0,5% in tampone catodico e 0,01% BBF.

Una volta che la strip di IEF è posta tra i vetri per la seconda dimensione (supporto di plastica adeso al vetro) il gel è mantenuto in posizione tramite una soluzione riscaldata di agarosio (la sua temperatura non deve essere superiore a 60°C a causa della presenza di urea nella soluzione di equilibrazione in SDS).

Oltre a servire per mantenere fisso il gel, la soluzione di agarosio serve:

a) per fornire una soluzione di continuità solida tra la strip ed il gel di seconda dimensione;
b) per evitare la presenza di bolle tra i due gel;
c) per riempire eventuali spazi vuoti nel gel di seconda dimensione. Possono essere presenti dei sottili canali a lato del gel di seconda dimensione la cui presenza e dovuta al fatto che il gel quando polimerizza si ritira leggermente.

La soluzione di agarosio di solito viene preparata prima, divisa in aliquote da 1 mL, sciolta in microonde e mantenuta sciolta in un bagnetto a 60 °C. (L'agarosio deve essere privo di impurezze che altrimenti verrebbero trasferite alla seconda dimensione ed eventualmente potrebbero interferire con la visualizzazione degli spots).

Riferimenti di peso molecolare:

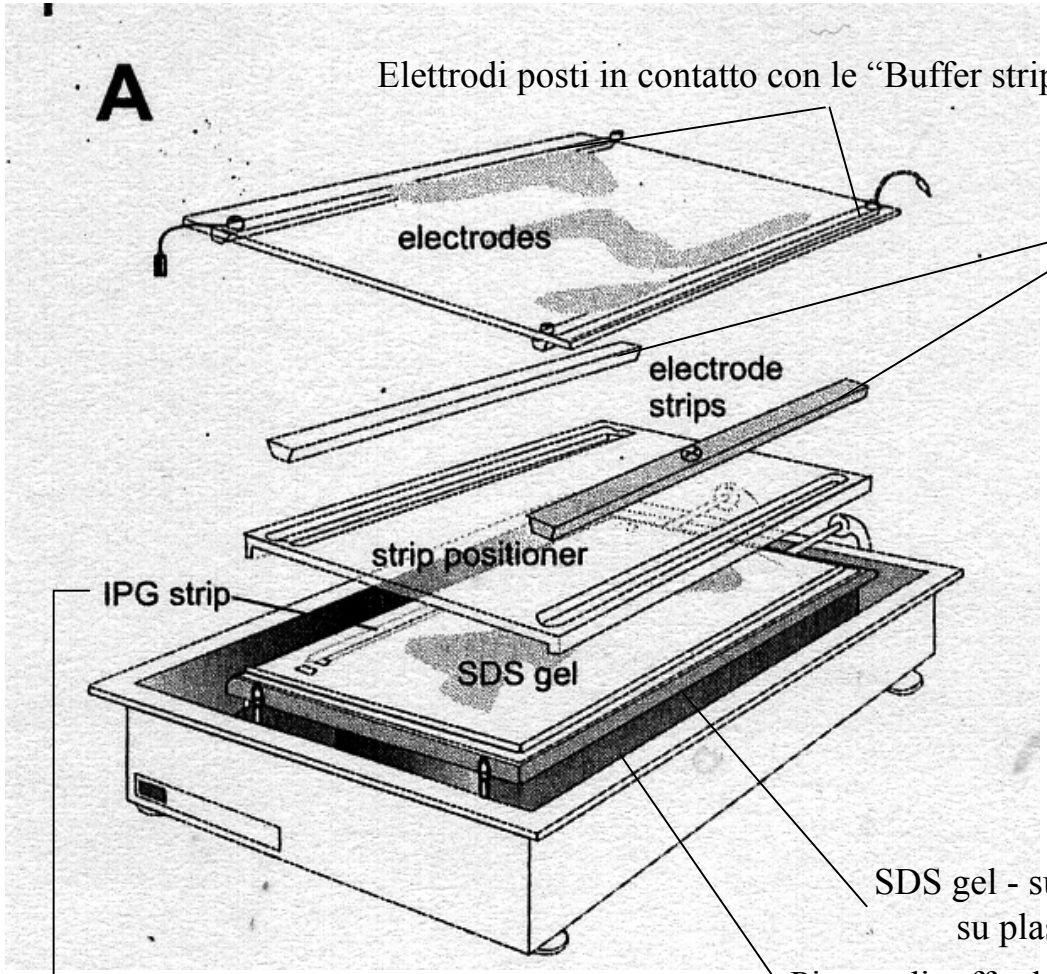
I riferimenti di peso molecolare possono essere caricati sia facendo formare un pozzetto nel gel di agarosio a lato delle strip (convenzione vuole che sia fatto alla sinistra delle strip dal lato del pH minore) oppure utilizzando degli appositi pezzi di carta per applicazione dei riferimenti di peso molecolare che vengono imbibiti con una soluzione fatta dai pesi molecolari (di solito sono pronti in solvente campione SDS) e l'hot agarose. Il pezzo di carta (comunemente noto come *IEF sample application piece*) viene applicato tra i vetri, a lato delle strip seguendo la stessa convenzione precedentemente riportata.

I pesi molecolari servono per determinare il peso molecolare apparente delle proteine separate in seconda dimensione (si utilizza la stessa procedura vista per la determinazione del peso molecolare in una normale SDS PAGE.)

Una procedura alternativa è quella di sciogliere nello stesso gel bidimensionale alcuni spot proteici e risalire tramite la loro identificazione al rispettivo peso molecolare. In questo modo ci si potrà costruire una curva di calibrazione con dei riferimenti interni allo stesso gel 2D. Attenzione che gli spot prescelti dovranno essere presenti in tutti i gel 2D in cui scelgo questa opzione di calibrazione ed inoltre la loro identificazione dovra risultare non ambigua.

Sistemi elettroforetici per correre le analisi SDS-PAGE di seconda dimensione (dopo IEF)

Sistemi Flatbed



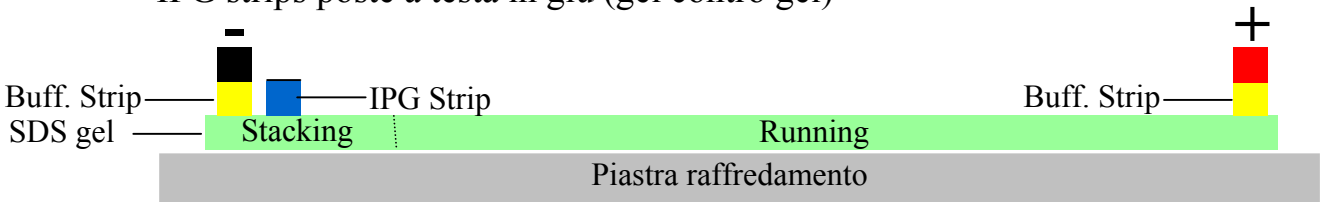
Elettrodi posti in contatto con le "Buffer strips"

Strisce di carta o di poliacrilammide "buffer strips" imbevute del buffer catodico e anodico e poste in diretto contatto con il gel di poliacrilamide

SDS gel - supportato su plastica

Piastra di raffreddamento

IPG strips poste a testa in giù (gel contro gel)



Gel composto da **Stacking** gel e **Running** gel

Sistemi per seconda dimensione verticale - corse multiple

(per gel singoli si possono utilizzare le classiche celle elettroforetiche)

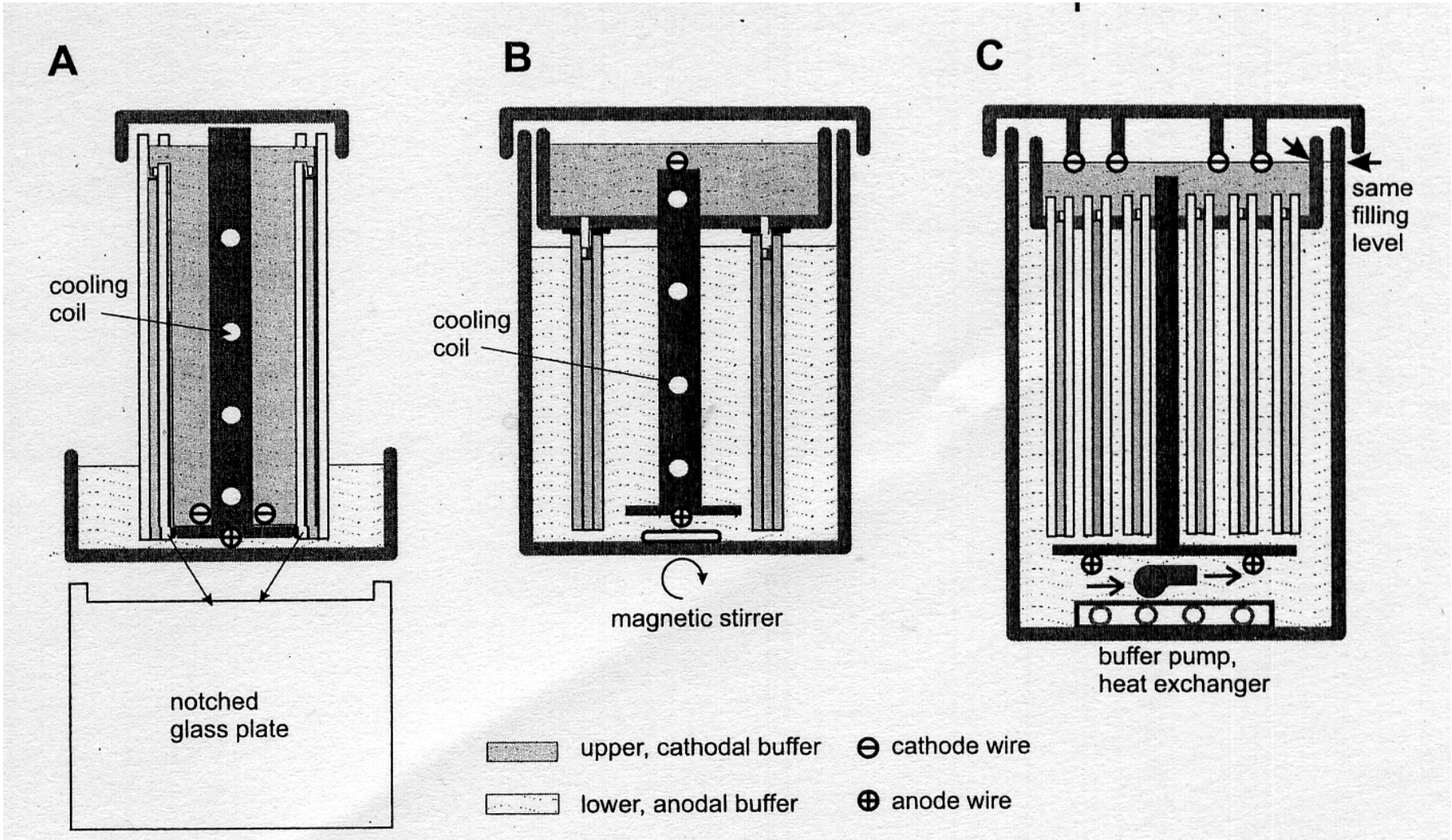


Fig. 36: Three different designs of vertical chambers. All of them can be cooled. *A.* Buffer-backed chamber. *B.* Chamber with tight upper buffer tank. *C.* Chamber for fast multiple runs.

Trasferimento delle proteine dalla 1ª alla 2ª dimensione

Tab. 5: Comparison of the properties of flatbed and vertical systems

Flatbed Systems	*Vertical Systems*
One gel per instrument	Multiple gel runs possible.
Can also be used for IEF in IPGs	Dedicated for SDS electrophoresis
Gel thickness is limited, because cooling is only possible from one side.	Higher protein loading capacity, because thicker gels can be used, which are cooled from both sides
Very versatile for different gel sizes and methods	Gel sizes fixed by glass plate sizes
Thin layer gels can be used, easy application of the IPG strips.	Thin gels cannot be used, because the IPG strip would not fit between the glass plates.
Buffer strips (polyacrylamide or filter paper) can be used instead of large volumes of liquid buffers.	Blotting is easier because of higher gel thickness.
The IPG strip has to be removed from the SDS gel after 40 minutes because of EEO effects.	The IPG strip does not have to be removed.

0,5 mm

1 mm
1,5 mm

SDS-PAGE e Trasferimento delle proteine dalla 1ª alla 2ª dimensione

Condizioni di corsa per SDS PAGE 1D e 2D (seconda dimensione)

La corsa SDS PAGE viene solitamente divisa in due fasi:
a) **Accumulo** (i.e. del campione caricato nei pozzetti o trasferimento delle proteine dalla strip di prima dimensione al gel di seconda dimensione e accumulo all'interfaccia);
b) **Separazione** delle proteine.

Per quanto concerne le modalità si può sostanzialmente adottare una corsa a:
1) **voltaggio costante** - metodo più comodo, ma anche il più lungo. Con il passare del tempo la corrente e la potenza diminuiscono - a cause del fatto che progressivamente la resistenza del sistema aumenta, quindi a parità di voltaggio si ha una diminuzione della corrente e quindi anche della potenza;
2) **corrente costante** - metodi più veloce ma che porta a possibile innalzamento della temperatura dal momento che con il passare del tempo la resistenza del sistema diminuisce e per avere la medesima corrente viene innalzato il V => potenza aumenta e aumenta anche il calore;
3) **potenza costante** - in questo modo si controlla il calore prodotto dal sistema elettroforetico. Non tutti gli apparati consentono di lavorare a potenza costante.

In ogni caso è importante **evitare il surriscaldamento** dei gel (ove è possibile si cerca di raffreddarli a 10 - 15 °C - vedi sistemi per corsa gel multipli - oppure di dissipare il calore mediante ventilazione)

Six gel systems (10 °C)

Overnight runs:			
Step 1	2 W per gel	Over night	
Fast runs			
Setting of a standard power supply:			
Step 1	2 W per gel	45 min	V and mA to max
Step 2	100 W (max 30 W per gel)	3.5 hours to 5 hours	V and mA to max

Gel singolo (10 x 8 cm) (raffreddamento a ventilazione)

50V per 1 ora
100-200V per 1-2 ore (uscita del BBF)

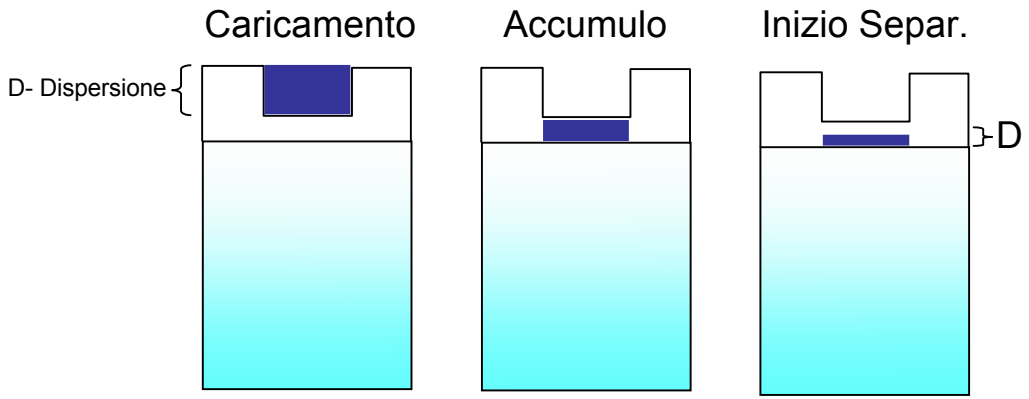
Nota bene: nei sistemi multipli è doveroso non superare la potenza massima per singolo gel.
Ad esempio, quando si corrono tre gel su di un sistema per 6 gel è bene utilizzare 90 W.
Rimanere sempre entro i limiti di potenza indicati dal costruttore (potenza massima per gel e potenza massima complessiva).

Gel di poliacrilammide discontinui (stacking e running)

PROBLEMATICA: dispersione della banda

Dato che il campione viene caricato in forma liquida all'interno di appositi pozzetti, questo fa si che esso sia disperso in un determinato spazio. Se la corsa comincia subito, senza che vi sia stato un processo di accumulo il campione risulta disperso, ovvero le proteine entrerebbero nel gel in tempi diversi in funzione della loro vicinanza al gel e in questo modo inizierebbero a migrare in tempi diversi con il risultato di non avere delle bande "strette" e quindi con grossi problemi in termini di risoluzione analitica.

Soluzione: Gel diviso in due porzioni: Accumulo (stacking gel) e Corsa (running gel). Il campione dopo esser stato caricato, nella fase iniziale della corsa si accumula all'interfaccia delle due porzioni e successivamente la separazione parte con il campione che è "concentrato" in una zona ristretta.

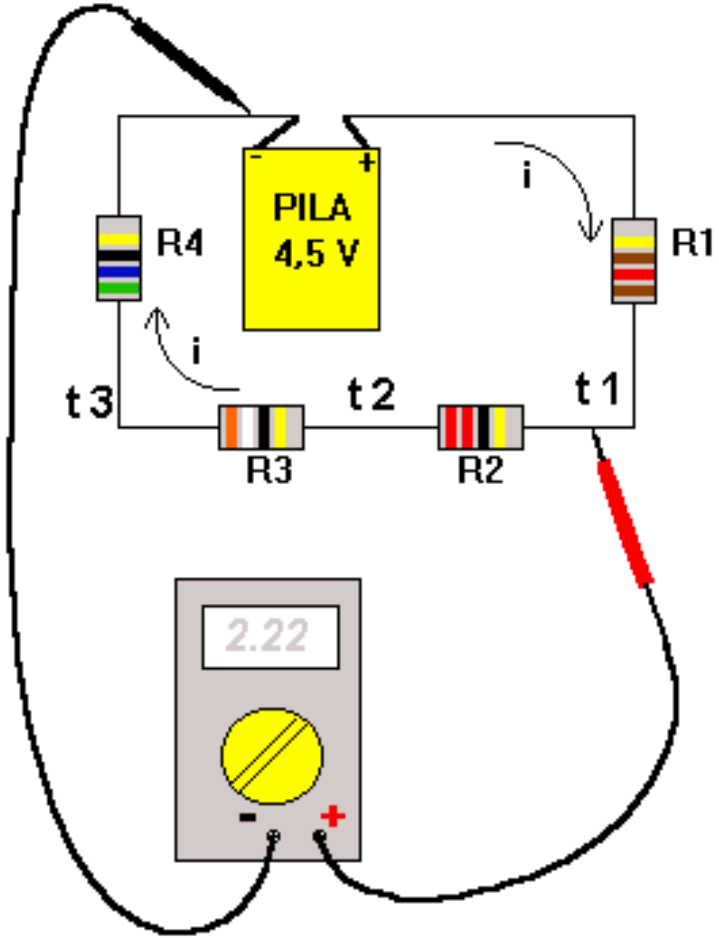


Le proteine migrano nello stacking gel ma le condizioni sono tali per cui non riescono a penetrare nel running gel. In questo modo le proteine si accumulano all'interfaccia stacking/running occupando un "altezza" molto minore rispetto a quella occupata dal liquido nel pozzetto di caricamento => partono in pratica tutte dallo stesso punto => sono allineate / accumulate.

Alla base di questo fenomeno c'è la diversa porosità del gel e la diversa composizione dei buffer

Sistemi elettroforetici discontinui: alcune considerazioni
Caduta di tensione in un circuito elettrico

Dipende dalle resistenze dei vari componenti



Esempio: Circuito elettrico con 4 resistenze (R1-4)

La tensione totale di 4,5 volt si suddivide fra le varie resistenze, assumendo un valore più alto proprio ai capi di quelle resistenze che, essendo di maggior valore, richiedono più sforzo.

La tensione presente ai capi di ogni resistenza rappresenta la caduta di tensione relativa a quella resistenza.

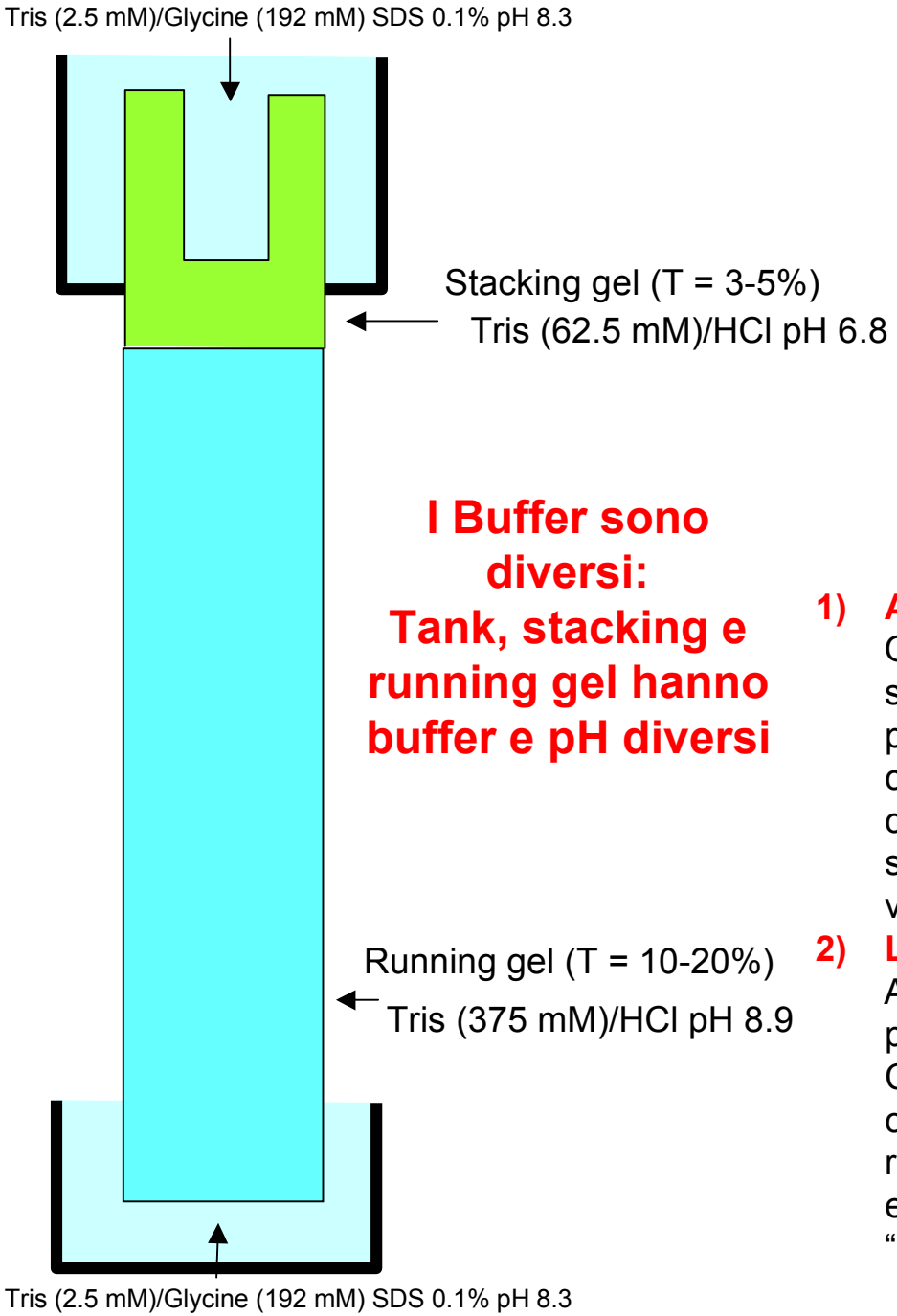
Ai capi della resistenza più alta ci sarà quindi anche la caduta di potenziale più elevata.

In questo modo anche il campo elettrico sara più forte e le molecole che ivi si troveranno saranno sottoposte ad una forza maggiore.

La corrente nel circuito è la stessa in ogni punto.

La differenza di potenziale di 4,5 V generata dalla pila darà nel circuito una corrente fissa (4,5 V / [R1+R2+R3+R4]). A seconda dell'entità della corrente, per ogni R ci sarà una determinata caduta di potenziale.

Sistemi discontinuo - Laemmli discontinuos buffer



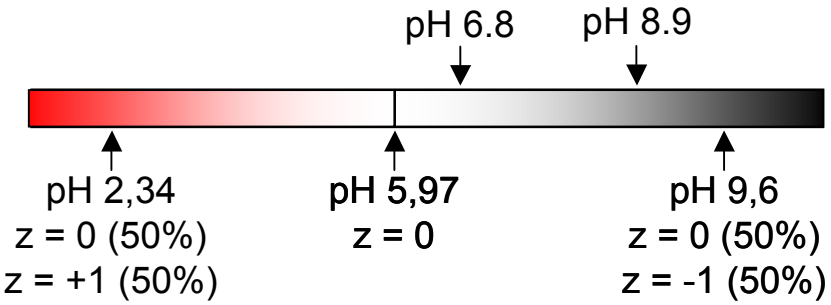
I Buffer sono diversi: Tank, stacking e running gel hanno buffer e pH diversi

Glycine: pI = 5.97 (pK_{a1} = 2.34 – pK_{a2} = 9.6)

A pH = 6.8 leggera prevalenza di carica negativa

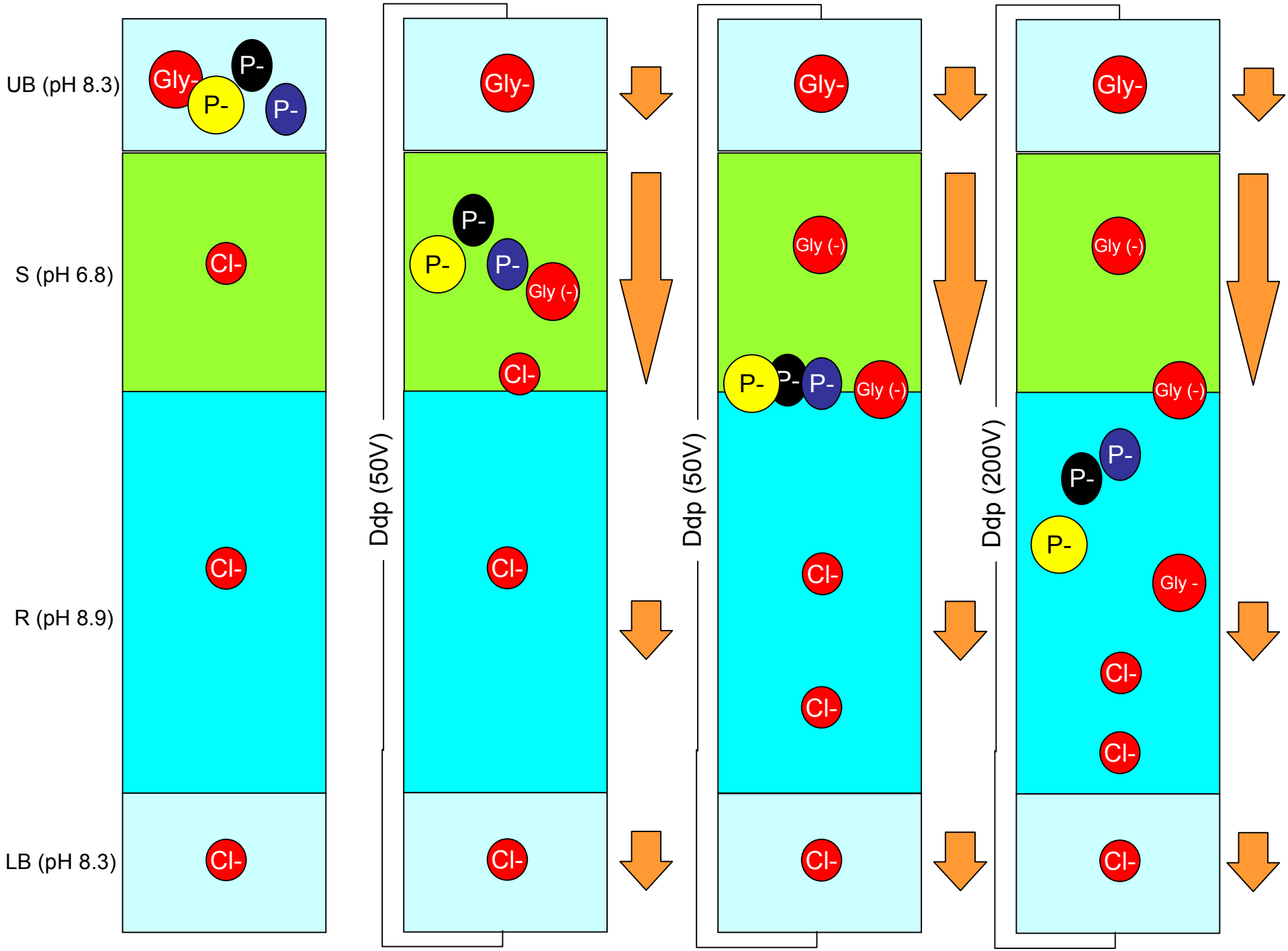
A pH = 8.9 molto più negativa rispetto a pH 6.8

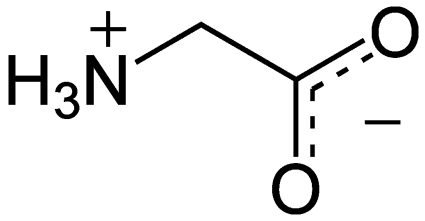
Ricordarsi che a pH 9.6 metà delle molecole di Gly avranno carica netta negativa (-1) e metà avranno carica netta nulla.

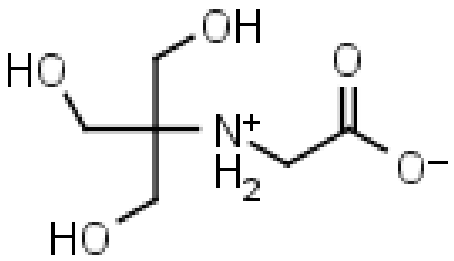


1) **Applicazione del voltaggio:**
Gli Ioni Cl^- => mobilità elettroforetica molto elevata e nello stacking gel questi vengono rimpiazzati dalla Gly che però passando da pH 8.3 a pH 6.8 perde carica => Gly non conduce e aumenta la resistenza dello stacking gel => campo elettrico aumenta => anche le proteine sono soggette ad un forte campo elettrico e la loro migrazione e veloce.

2) **Le proteine raggiungono il confine Stacking/Running:**
A questo livello le molecole di Gly riassumono una parziale carica negativa (pH 8.9) e la sostituzione di ioni Cl^- con molecole di Gly^- non comporta un aumento del campo elettrico come nello stacking gel. Il campo elettrico rimane quindi basso (determinato dal voltaggio applicato) e le proteine non migrano più velocemente ma si "accumulano" all'interfaccia Stack/Running.


UB (pH 8.3)
S (pH 6.8)
R (pH 8.9)
LB (pH 8.3)
Gly-
P-
P-
P-
Cl-
Cl-
Cl-
Ddp (50V)
Gly-
P-
P-
P-
Gly (-)
Cl-
Cl-
Cl-
Ddp (50V)
Gly-
Gly (-)
P-
P-
P-
Gly (-)
Cl-
Cl-
Cl-
Ddp (200V)
Gly-
Gly (-)
Gly (-)
P-
P-
P-
Gly -
Cl-
Cl-
Cl-





Glycine vs Tricine

pK_a: 2.34 e 9.6	pK_a: 2.3 e 8.15
pI: 5.97	pI: 5.22

In alkaline conditions (pH > 8) => Tricine is more negative than Glycine

=>

Higher electrophoretic mobility

Low molecular weight proteins in Laemmli conditions migrates with SDS at the front of the gels => they are not separated each other.

This is due to the fact that all the proteins in the stacking gel are stacked between glycine and Chloride ions. Tricine is faster than glycine and it is not able to entrap all the proteins. More proteins remain behind Tricine and therefore they are not overlapping with SDS that stack in front of the chloride ions. This helps in make low molecular weight proteins more resolved. As a counterpart, high molecular weight proteins are not properly separated with Tris/Tricine discontinuous systems.

Protein position with respect to SDS migration is the key element for a better resolution in the low molecular weight range.