

LAVORARE CON LE PROTEINE

ELETTROFORESI

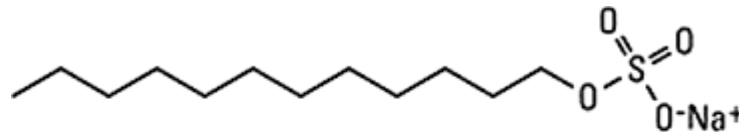
- **Tecnica analitica:** visualizzare e caratterizzare le proteine durante la purificazione stessa.
- Non contribuisce alla purificazione, perché spesso influisce negativamente sulla struttura e sulla funzione delle proteine.
- consente di stabilire il numero di proteine diverse presenti in una miscela o il grado di purezza di una particolare preparazione proteica.
- Dà indicazioni sul punto isoelettrico e il peso molecolare approssimato delle proteine.
- viene di solito effettuata su gel polimerici con numerosi legami crociati, come la poliacrilammide. Il gel di poliacrilammide agisce come un setaccio molecolare che rallenta la migrazione delle proteine proporzionalmente al loro rapporto carica/massa molecolare. Anche la forma delle proteine influisce sulla loro velocità di migrazione.

ELETTROFORESI

Nell'elettroforesi, la forza che muove le macromolecole è il potenziale elettrico, E. La mobilità elettroforetica della molecola (μ) è il rapporto tra la velocità della particella, V, e il potenziale elettrico (E). La mobilità elettroforetica è anche uguale al rapporto tra la carica netta della molecola, Z, e il coefficiente frizionale, f, che dipende in parte dalla forma della proteina.

$$\mu = \frac{V}{E} = \frac{Z}{f}$$

La migrazione di una proteina in un gel durante l'elettroforesi è funzione delle sue dimensioni e della sua forma. Il metodo elettroforetico usato comunemente per valutare la purezza e il peso molecolare delle proteine comprende l'uso del detergente sodio dodecil solfato (SDS)



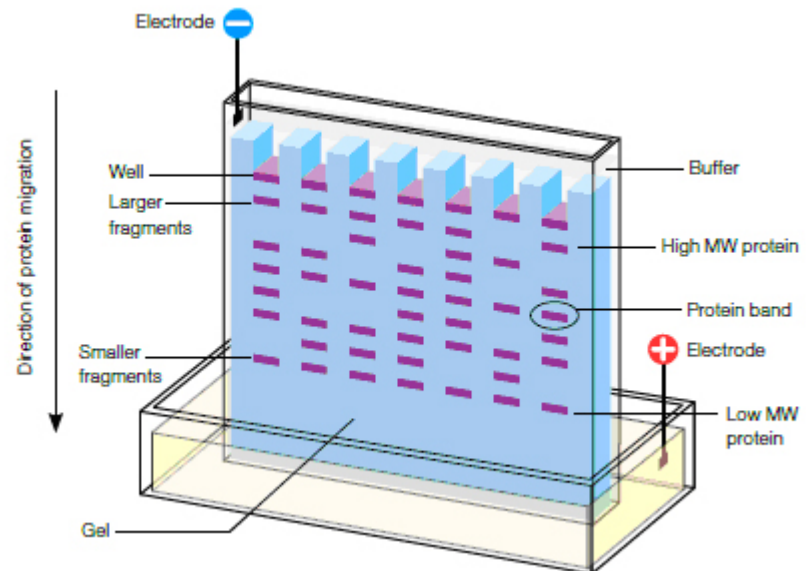
Sodium dodecyl sulfate (SDS)

MW 288

Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

I gel di acrilammide fungono da setaccio selettivo delle dimensioni durante la separazione. Quando le proteine si muovono attraverso un gel in risposta a un campo elettrico, le molecole più piccole viaggiano più rapidamente delle proteine più grandi.

Nella maggior parte delle applicazioni PAGE, il gel è montato su un supporto e l'unico percorso elettrico è attraverso il gel. Di solito il gel ha un orientamento verticale e viene colato con un pettine che genera pozzetti in cui vengono applicati i campioni. L'applicazione di un campo elettrico attraverso le camere tampone forza la migrazione delle proteine all'interno e attraverso il gel.



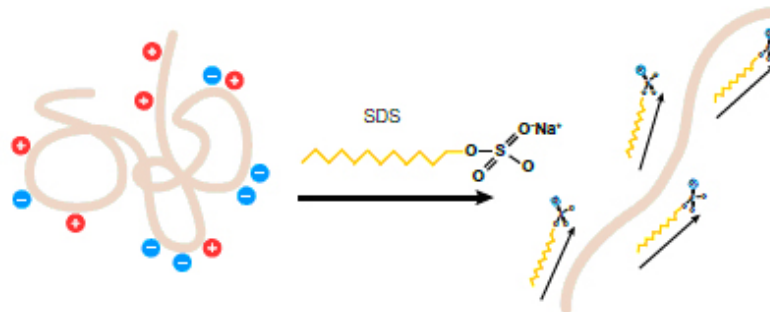
SDS-PAGE

Proteine separate in presenza di SDS: completamente denaturate e dissociate l'una dall'altra.

SDS si lega in modo non covalente alle proteine e conferisce:

- ❖ una carica negativa complessiva sulle proteine, mascherando la carica intrinseca della proteina che lega;
- ❖ un rapporto carica/massa simile per tutte le proteine in una miscela, poiché l'SDS si lega sempre con lo stesso rapporto (1,4 g di SDS per 1 g di proteina, una stechiometria di circa una molecola di SDS per due amminoacidi).
- ❖ una conformazione allungata simile a un bastoncino invece di una struttura terziaria complessa.

Di conseguenza, la velocità di migrazione di una proteina rivestita di SDS in un gel dipende principalmente dalle sue dimensioni, consentendo la determinazione del peso molecolare.

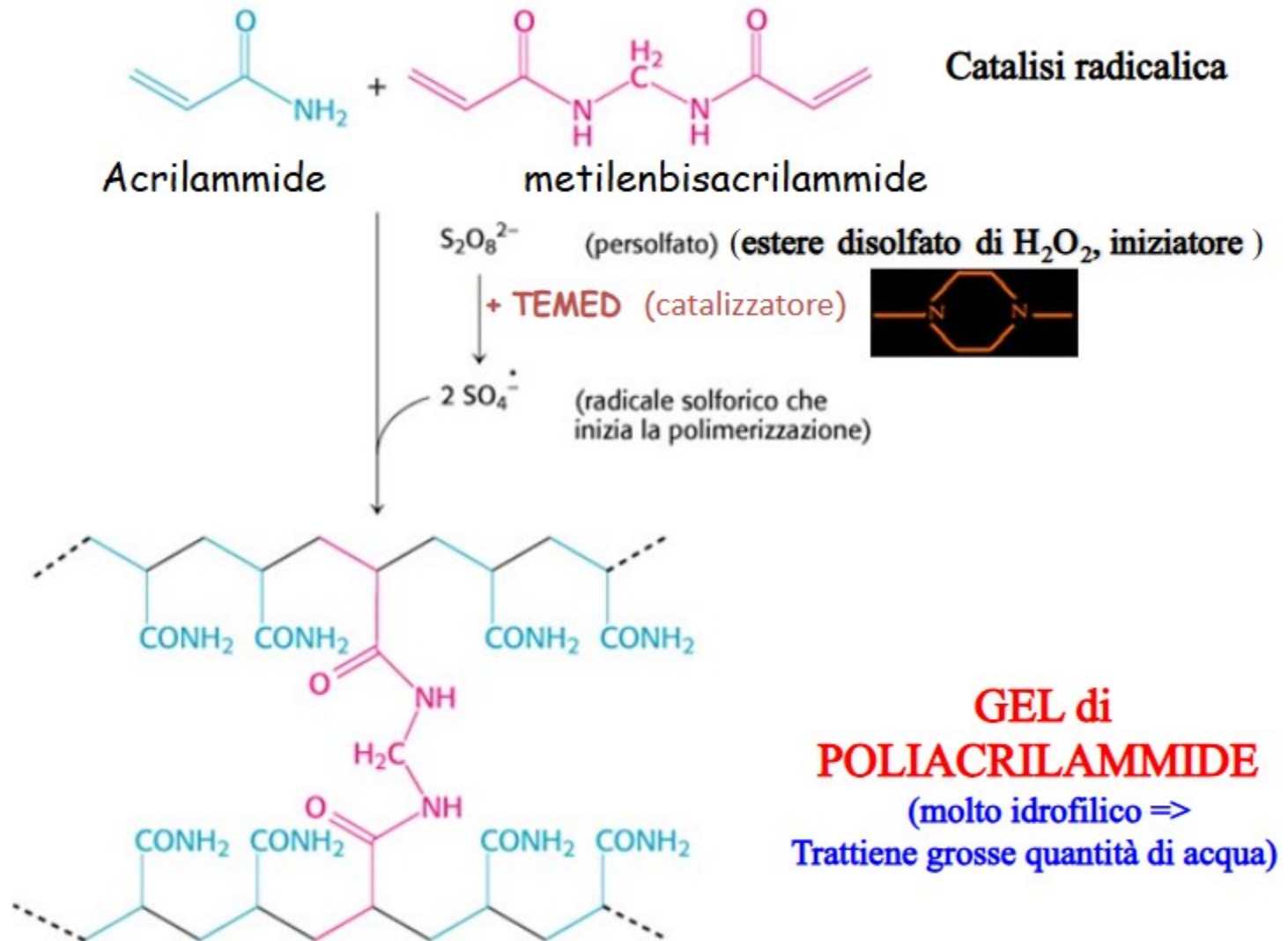


PROCEDIMENTO

- Gel: costituito da acrilammide, bisacrilammide, un denaturante opzionale (SDS) e una soluzione tampone.
- Per avviare la polimerizzazione vengono aggiunti una fonte di radicali liberi e uno stabilizzatore, come il persolfato di ammonio e il TEMED (N,N,N'N' Tetramethylethylenediamine).
- La reazione di polimerizzazione forma un gel grazie alla bisacrilammide aggiunta, che può formare legami crociati tra due molecole di acrilammide.
- Variando il rapporto tra bisacrilammide e acrilammide si ottengono gel a diversa porosità per risolvere molecole diverse a seconda del loro peso molecolare.
- I gel vengono polimerizzati tra due piastre di vetro con un pettine inserito nella parte superiore per creare i pozzetti per i campioni. Dopo la polimerizzazione del gel, il pettine viene rimosso e il gel è pronto per l'elettroforesi

Acrilammide: composto mutageno e potenzialmente cancerogeno, con tossicità sistemica ma preferenziale per il sistema nervoso sia centrale che periferico (causa polineuropatia) e quello riproduttivo.

Gel si possono acquistare pronti



un gel al 4-6% di acrilammide è estremamente morbido e ha pori grandi,
un gel al 10-15% è relativamente compatto e ha pori piccoli.

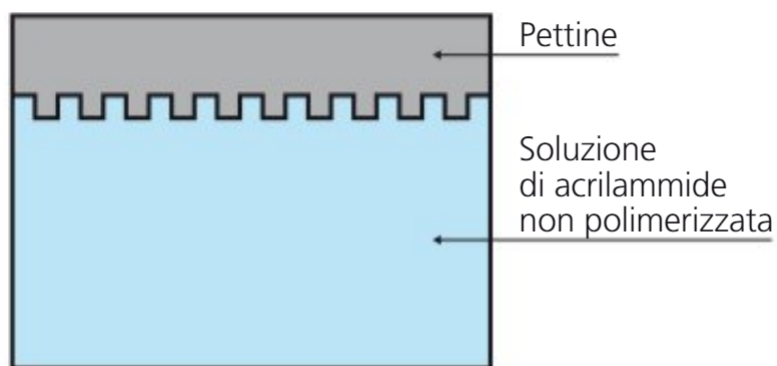
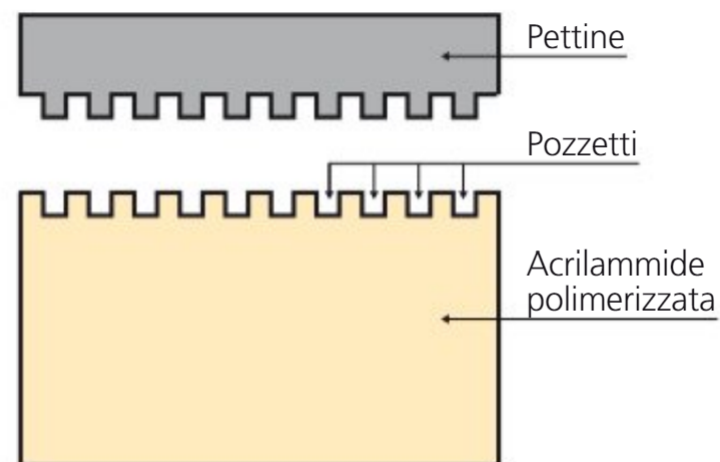


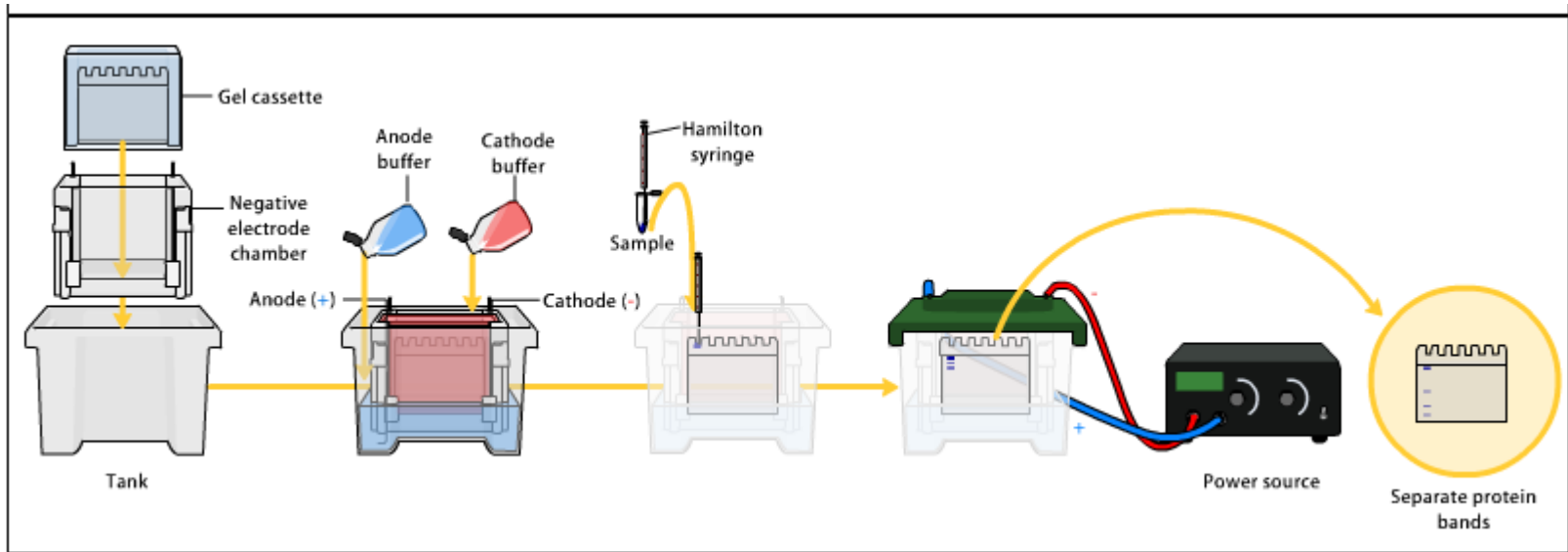
Figura 6.6

I pozzetti per caricare i campioni sul gel da sottoporre a corsa elettroforetica vengono preparati immergendo un pettine di



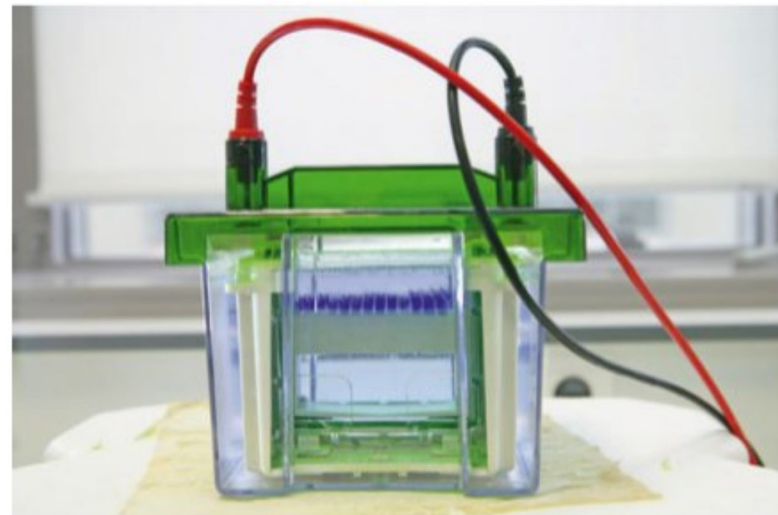
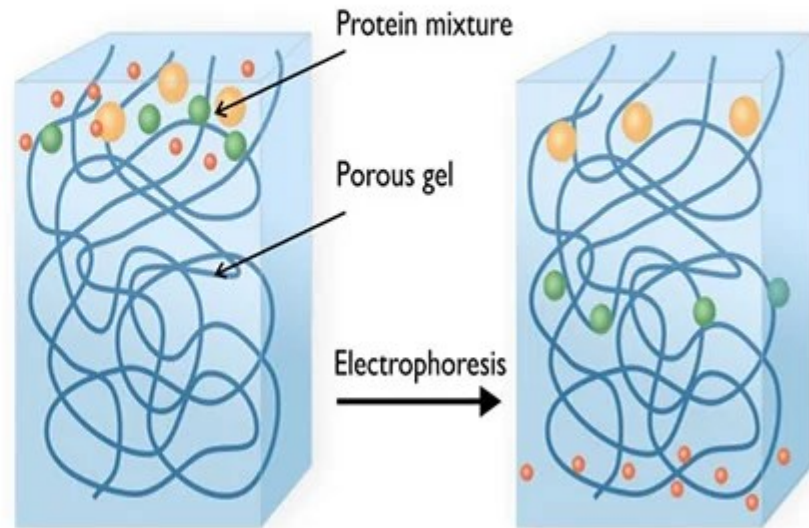
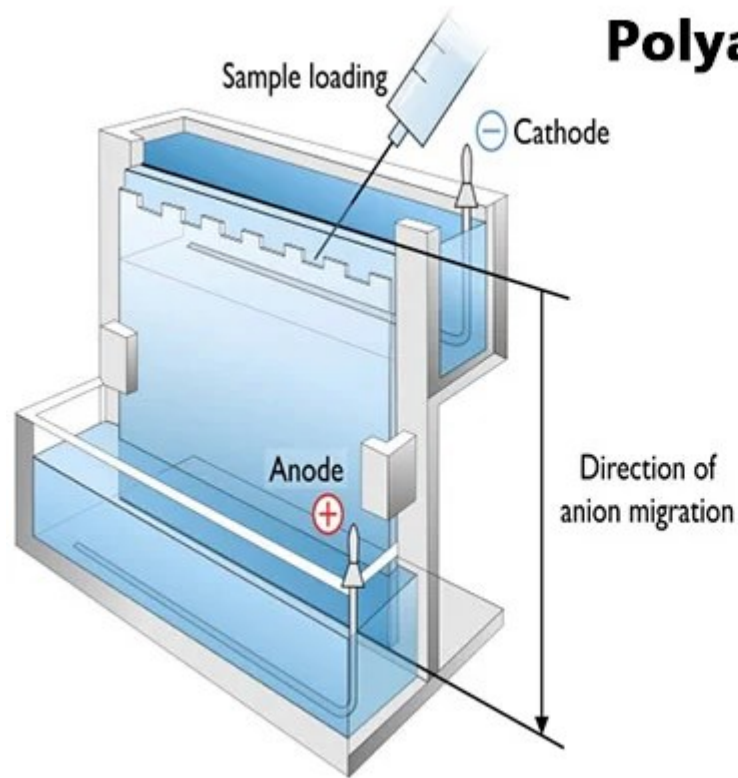
plastica o teflon nella soluzione non ancora polimerizzata. Dopo l'avvenuta polimerizzazione il pettine viene rimosso.

PROCEDIMENTO



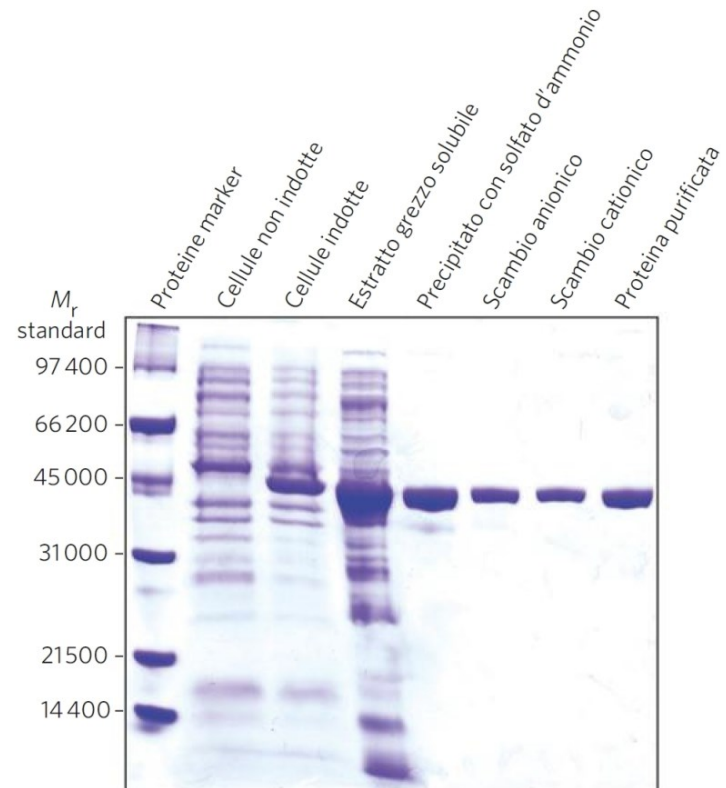
- Un campo elettrico viene applicato al gel, le proteine migrano dall'elettrodo negativo (catodo) verso l'elettrodo positivo (anodo).
- Le proteine si muovono attraverso la matrice del gel in modo diverso: le molecole piccole passano più facilmente attraverso i pori del gel, e quindi si sposteranno di più dall'origine, mentre quelle più grandi hanno più difficoltà a passare attraverso le maglie del gel e si troveranno più vicino all'origine del gel.
- Durata: di solito alcune ore, ma dipende dalla tensione applicata
- Dopo il periodo di tempo stabilito, le biomolecole hanno migrato a distanze diverse in base alle loro dimensioni.
- Il gel viene colorato con blue Coomassie per visualizzare le bande

Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)



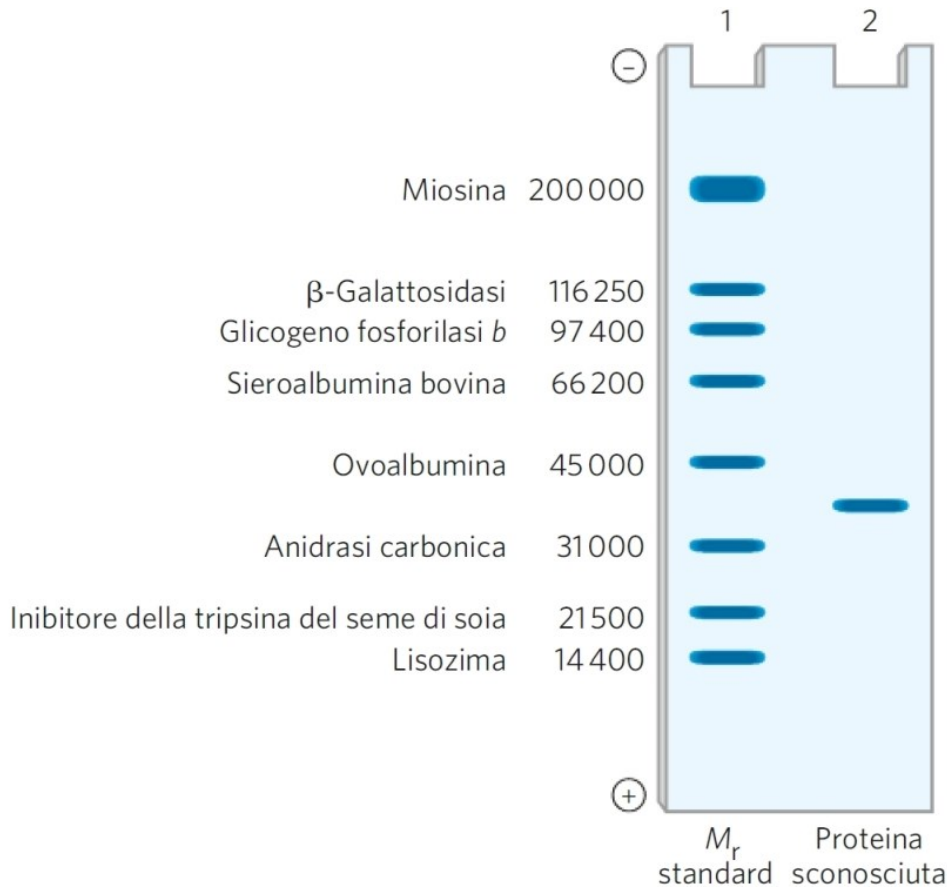


Direzione
della
migrazione

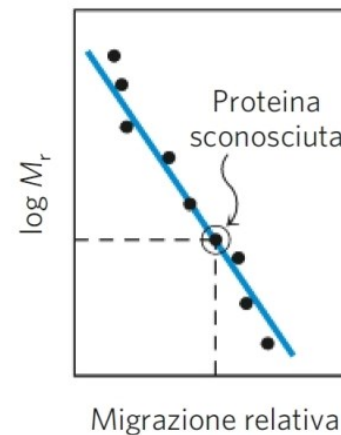


- Ciascuna banda sul gel rappresenta una proteina (o subunità proteica) diversa.
- Si seguono i progressi della purificazione, in base alla diminuzione del numero delle bande proteiche visibili sul gel dopo ogni passaggio di purificazione.
- Determinazione della MM approssimativa di una proteina confrontando la sua migrazione nel gel rispetto a quella di proteine a MM nota
- proteina con due o più subunità differenti: si separano in seguito al trattamento con SDS, e per ciascuna appare una banda distinta.

Determinazione della massa molecolare di una proteina mediante elettroforesi



La relazione tra il logaritmo della M_r e la migrazione elettroforetica è lineare e consente di calcolare il valore del peso molecolare di una proteina sconosciuta da un grafico come quello mostrato.

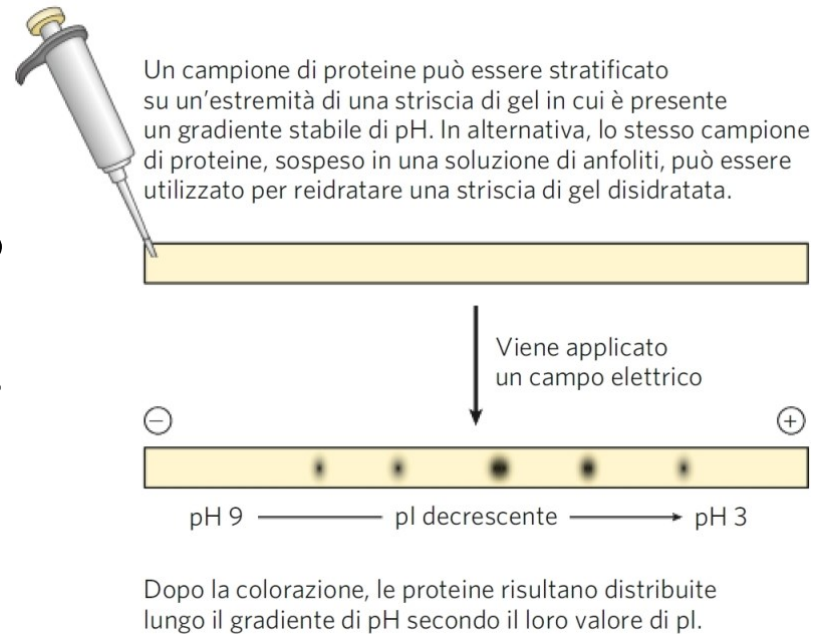


La **mobilità relativa delle biomolecole (R_f)** è il rapporto tra la distanza percorsa dalla molecola sul gel e la distanza totale percorsa da un colorante di tracciamento (blu di bromofenolo)

M_r = massa molecolare relativa

ISOELETTROFOCALIZZAZIONE

- **IEF:** tecnica usata per determinare il punto isoelettrico (pI) di una proteina.
- Viene creato un gradiente di pH utilizzando una miscela di acidi e basi di natura organica a basso peso molecolare (anfoliti) che viene distribuita in un campo elettrico generato attraverso il gel.
- Quando si applica una miscela di proteine, ciascuna proteina migra fino a quando raggiunge il pH corrispondente al suo pI. *(Per ogni proteina c'è un valore di pH al quale il numero di gruppi + equivale il numero di gruppi - (punto isoelettrico pI) al quale la carica netta = 0)*
- proteine con diverso punto isoelettrico si distribuiscono in zone diverse del gel.



ISOELETTROFOCALIZZAZIONE

La migrazione avviene in base alla carica, fino al raggiungimento di quella zona in cui il valore del punto isoelettrico della proteina (pI) è uguale a quello del pH sul gel. Il gel può venir colorato come per SDS PAGE.

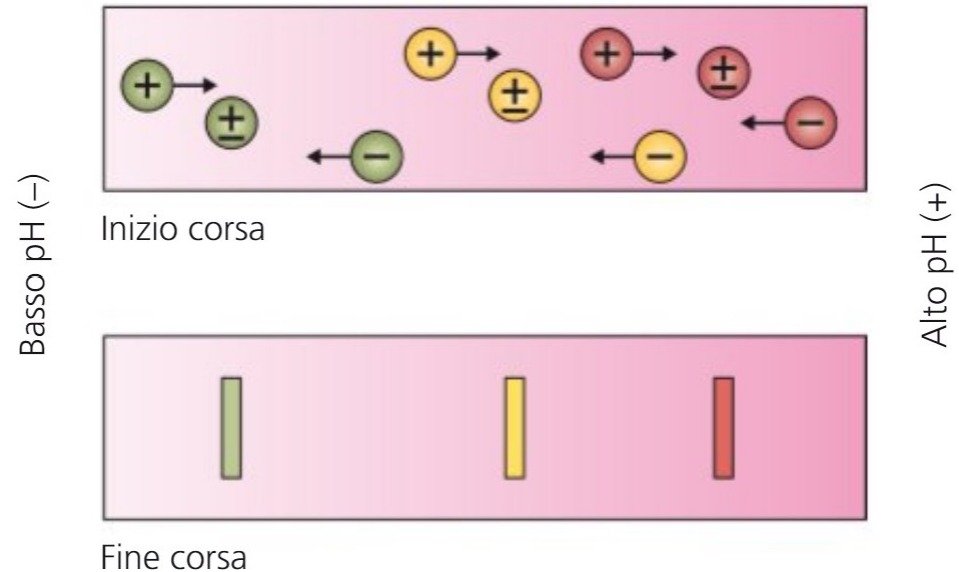
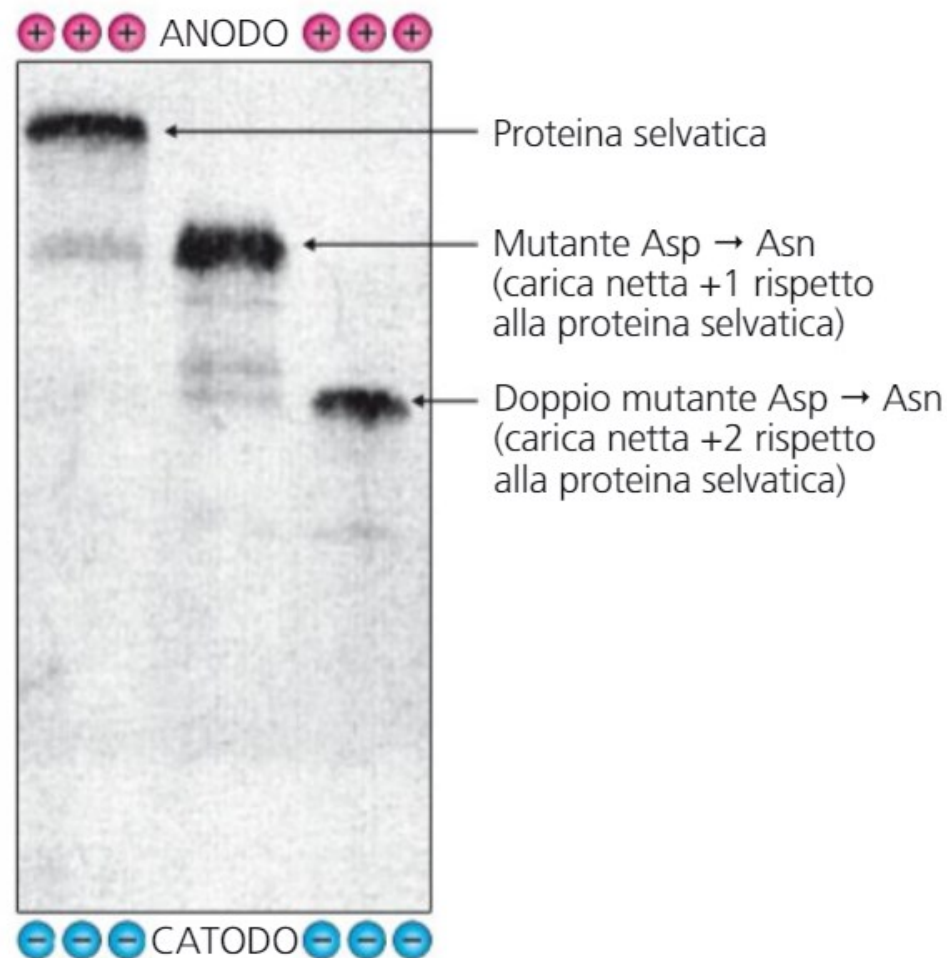


Figura 6.16

focalizzazione isoelettrica dell'enzima serina idrossimetiltrasferasi selvatico (*wild type*) e di due sue forme mutanti, in cui uno o due residui di acido aspartico (Asp) sono stati sostituiti da residui di asparagina (Asn). Per ogni sostituzione Asp → Asn la proteina ha un guadagno di carica netta pari a +1. La differenza di carica tra le forme *wild type* e mutanti è facilmente identificabile con la tecnica della focalizzazione isoelettrica.



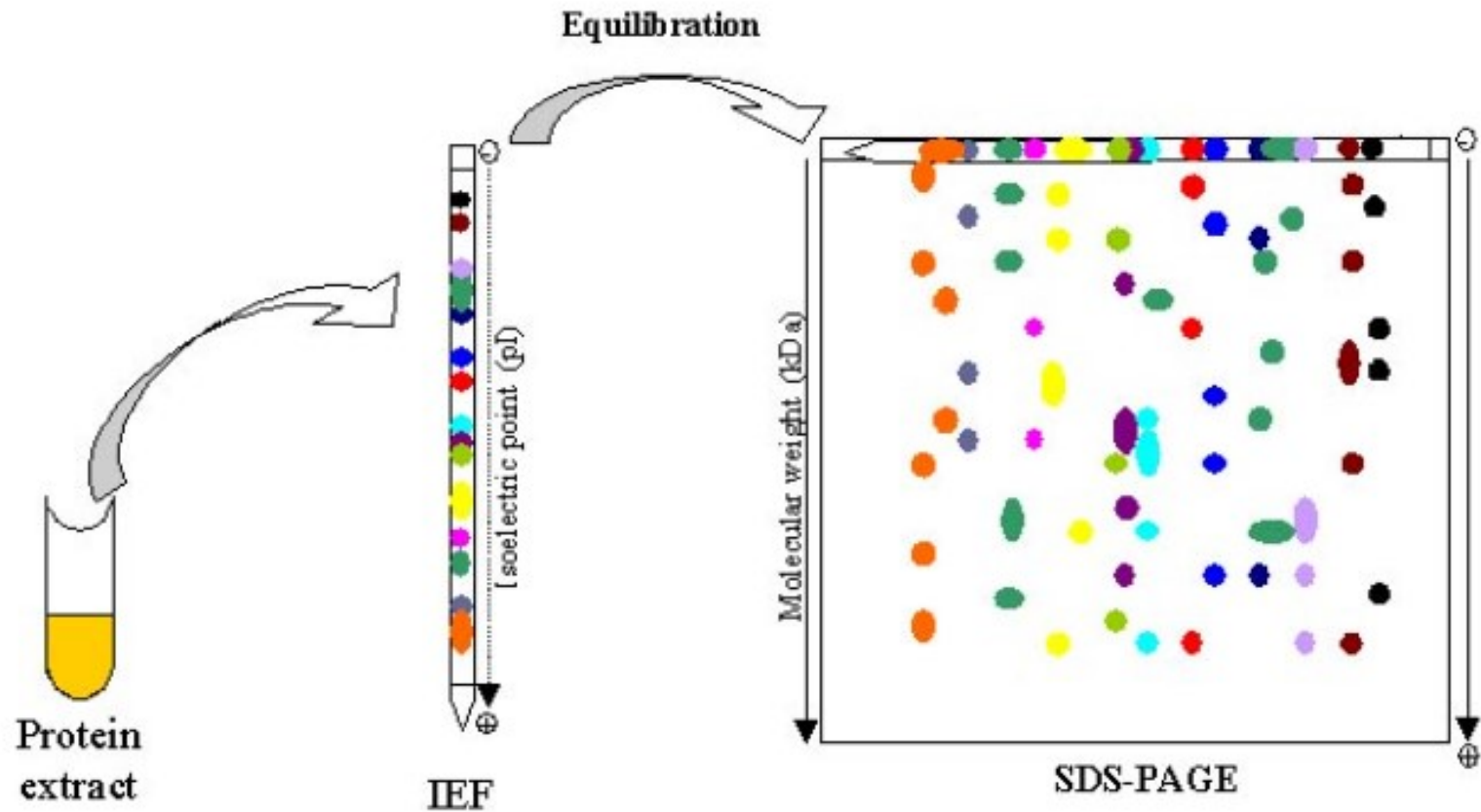
ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE

- elettroforesi bidimensionale: IEF + elettroforesi su SDS può risolvere una miscela complessa di proteine.
- metodo analitico più efficace di qualunque singolo metodo elettroforetico.
elettroforesi bidimensionale: separazione di proteine di identico peso molecolare, ma con differente pI, o proteine con lo stesso pI, ma con differente massa molecolare.

ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE

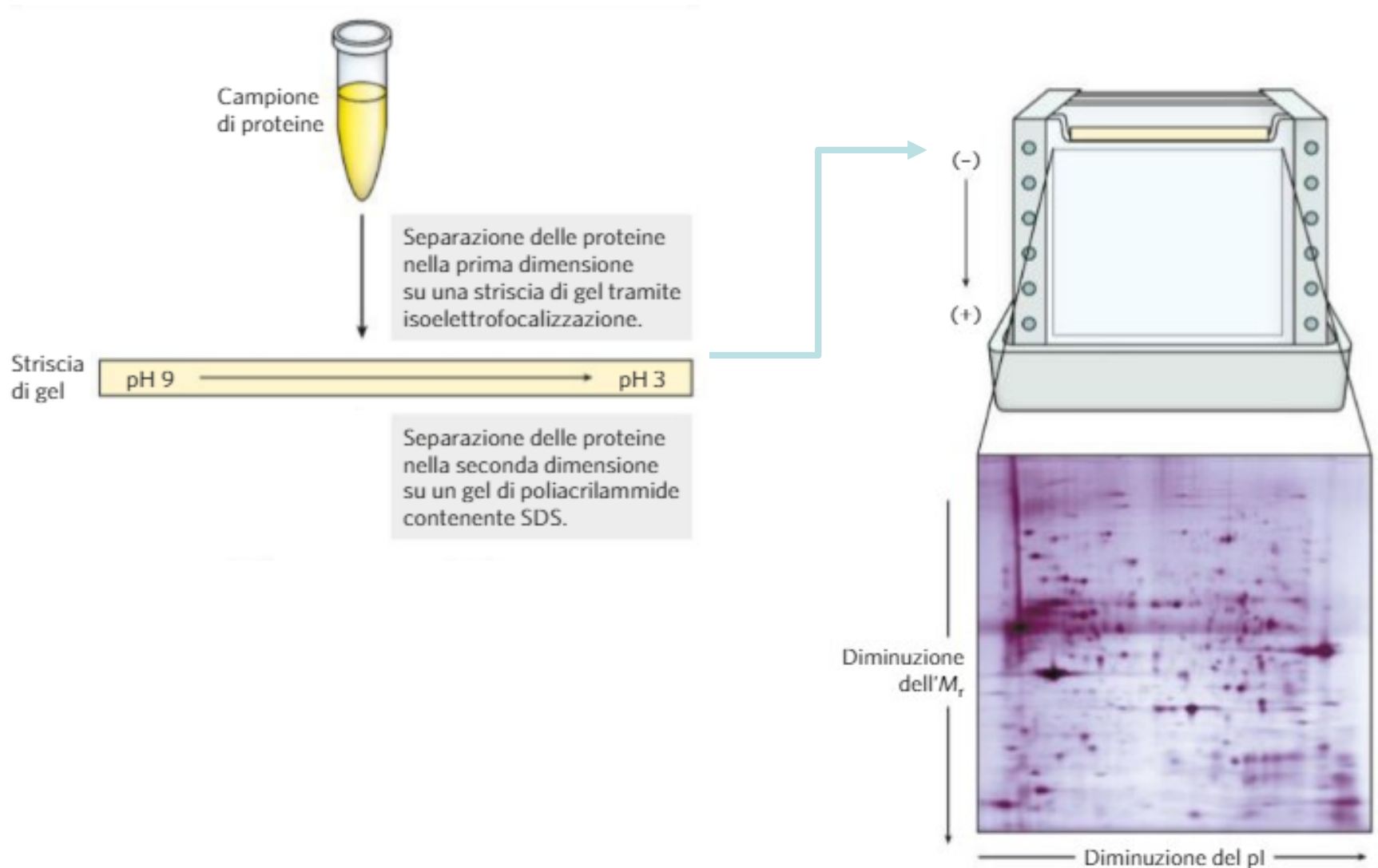
1. separazione di una miscela proteica mediante IEF condotta su una striscia di gel molto sottile.
2. La striscia di gel utilizzata per la separazione mediante IEF viene messa orizzontalmente su un gel di poliacrilammide e le proteine vengono separate mediante elettroforesi in presenza di SDS.
3. In questo **gel bidimensionale** la separazione orizzontale riflette le differenze nel valore del pI, mentre la separazione verticale riflette le differenze nella massa molecolare. Le proteine presenti nel campione di partenza vengono quindi separate in due dimensioni.
4. È possibile separare migliaia di proteine diverse presenti nelle cellule.
5. Ogni macchia che si osserva alla fine della separazione può essere ritagliata e rimossa dal gel per essere identificata tramite spettrometria di massa

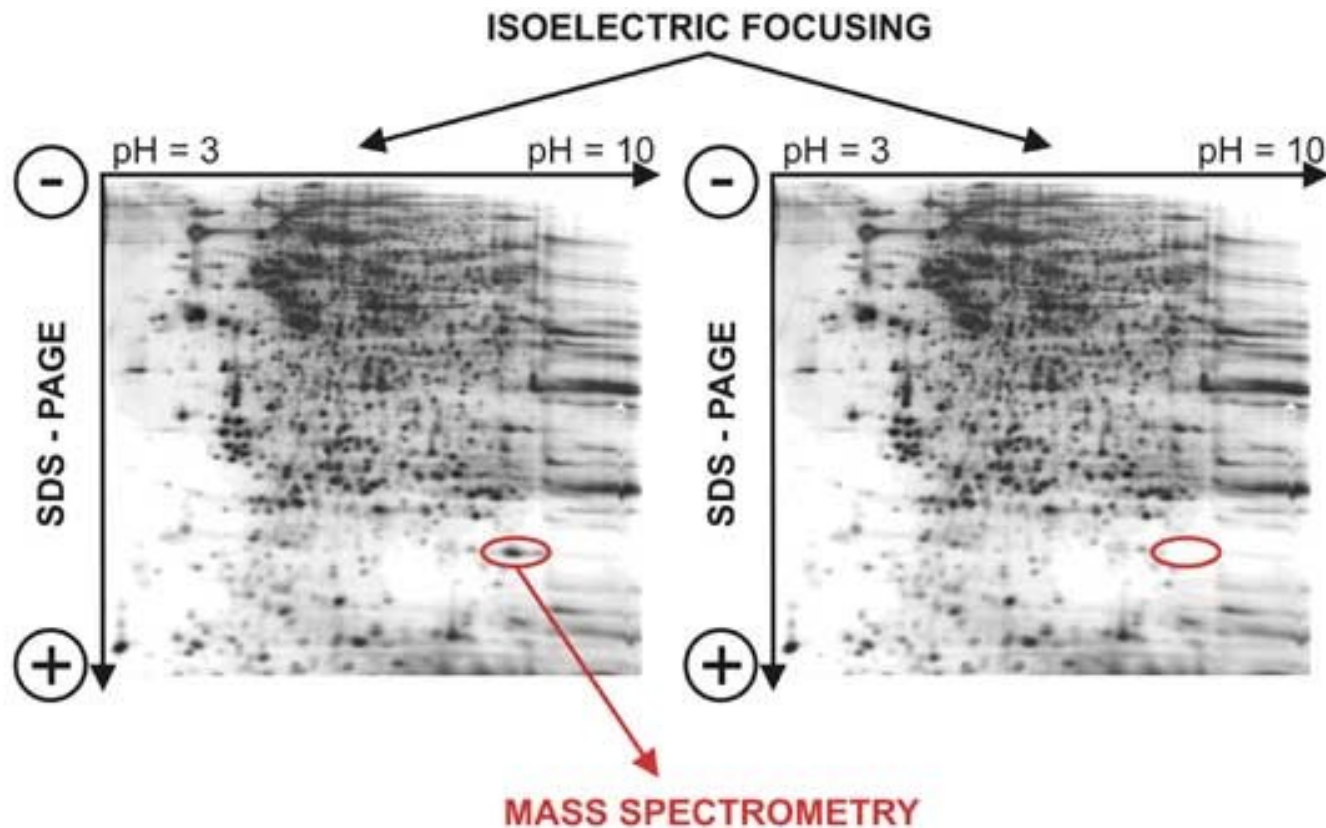
ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE



MAPPE DI PROTEINE

ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE





Le "mappe" di proteine ottenute possono essere usate per fare confronti

Ad esempio: confronto fra campione sperimentale e quello di controllo; tra i campioni di pazienti con una specifica malattia e i loro controlli sani

Identificazione di proteine differenzialmente espresse che possono essere collegate alla patogenesi della malattia studiata.

Le proteine differenzialmente espresse di interesse vengono ottenute tagliando il pezzetto di gel che le contiene ed analizzate mediante spettrometria di massa.