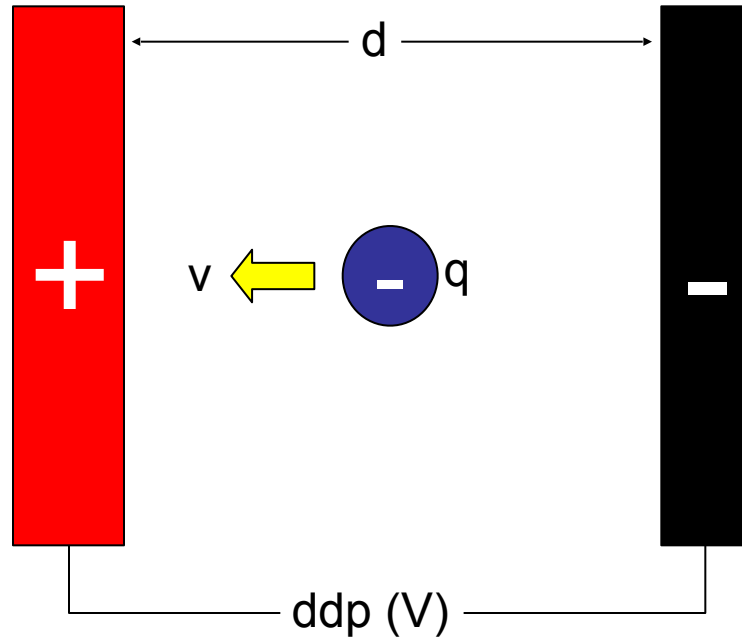


ELETTROFORESI – principi generali

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



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

d: distanza tra gli elettrodi

q: carica della molecola

E (campo elettrico) = V/d

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

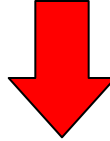
$$v = Eq/f$$

Per aumentare la velocità della corsa elettroforetica basterebbe aumentare E ...ma....

ELETTROFORESI – principi generali

Molecole biologiche presentano gruppi acidi o basici che sono quindi ionizzabili

Per essere analizzata in elettroforesi una molecola deve avere una carica non nulla



pH del mezzo in cui sono in soluzione le molecole deve condizionare la loro carica
(**soluzione tampone**)



N° di ioni non basso
ioni dati dalle proteine (spesso trascurabili come entità numerica)
ioni dati dai costituenti del tampone: non trascurabili



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

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

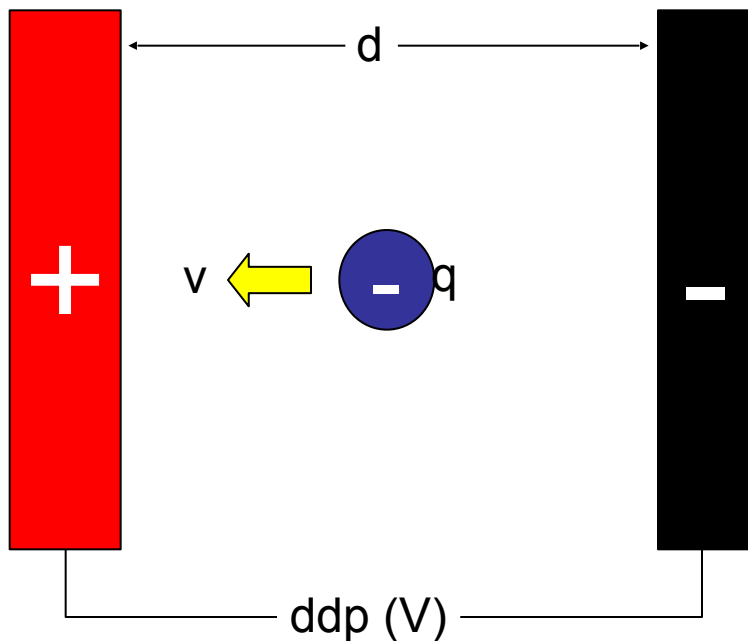
ELETTROFORESI – principi generali

Per la legge di Joule un sistema elettrico caratterizzato da una resistenza R e nel quale viene fatta passare una corrente I attraverso l'applicazione di una ddp (V) per un periodo di tempo T rilascia una quantità di calore dato da $I^2 R T$ (joule - energia)

Cosa provoca il calore in un liquido?

- a) Moti **convettivi** nel sistema
- b) Aumento **diffusione** delle molecole
- c) **Denaturazione** proteine
- d) Modifica delle caratteristiche fisiche del mezzo di separazione (i.e. **viscosità**)

Effetto negativo sulla separazione delle molecole – Risoluzione -



Strategie

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

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

Analisi elettroforetica – workflow -

Preparazione del campione

Campione deve essere sciolto in una soluzione che non interferisce con il processo separativo e che contemporaneamente lo condiziona per la stessa separazione

Per le separazioni in gel di solito è previsto l'uso di un addensante (glicerolo) per facilitare il caricamento e di un tracciante per visualizzare la corsa (in tamponi basici e con corsa anodica si usa il BBF (Blu di Bromofenolo))

Separazione elettroforetica

In condizioni:
a) native
b) denaturanti

Su supporto solido
Su:
a) Acetato di cellulosa
b) Agarosio
c) Poliacrilamide

Su Chip

In capillare (CE)

Rilevazione on line

Rilevazione in gel

Trasferimento su membrana

Western-blot (proteine)

Southern-blot (DNA)
Northern-blot (RNA)

Nitrocellulosa
PVDF

Sotto campo elettrico
(per capillarità)

a) Spettrofotometrica
b) Spettrofluorimetrica
c) CE/MS (Mass Spectrometry)

Metodi di colorazione
a) Blue Coomassie
b) Argentica
c) Coloranti fluorescenti
d) Radioattiva
...

Rilevazione su membrana

Metodi di "colorazione"
a) Rosso Ponceau
b) Anticorpale
c) Radioattiva
...

Elettroforesi su supporti solidi

“Su fogli sottili”

a)Carta

b)Acetato di cellulosa

a)Strati sottili di silice, cellulosa, etc.
su supporti solidi
(TLE Thin Layer Electrophoresis)

L'elettroforesi su acetato di cellulosa, che pur essendo una metodica che non raggiunge le risoluzioni ottenibili con i più moderni gel di poliacrilamide ed agarosio, riveste ancora un ruolo in ambito clinico per la valutazione delle proteine del siero ed altre specifiche applicazioni.

Metodiche relativamente veloci

=>

Buona applicabilità in campo diagnostico/
clinico
(test rapidi)

“In Gel”

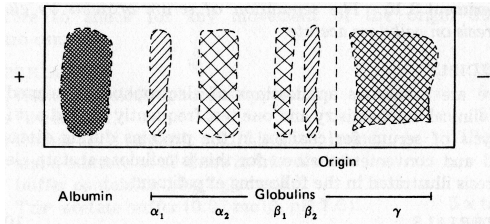
a) Gel di agarosio

a)Gel di poliacrilamide

L'elettroforesi su gel di agarosio e su gel di poliacrilamide offrono una buona risoluzione e vengono comunemente impiegati nei laboratori di ricerca rispettivamente soprattutto per l'analisi di DNA e delle proteine.

L'elevato tempo richiesto per effettuare una corsa con queste metodiche non li rende attrattivi per quel che concerne un uso diagnostico ad alta processività.

Schema → **Elettroforesi**



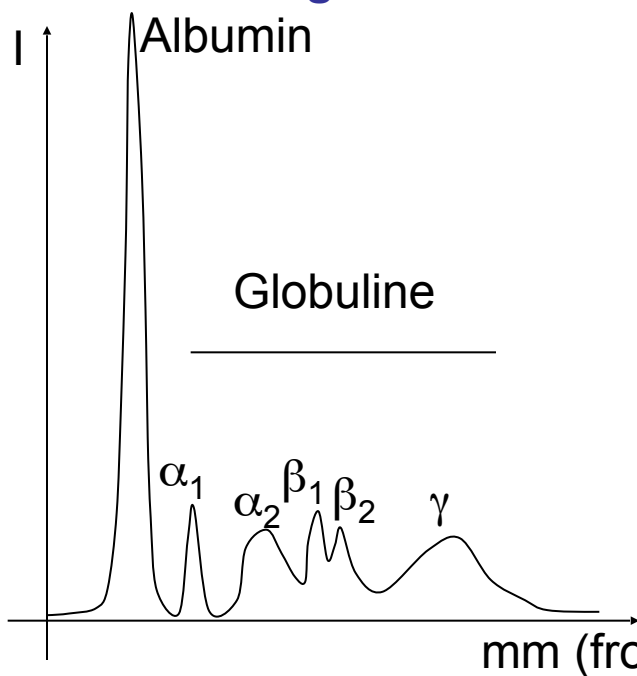
Risultato visibile della separazione elettroforetica mediante opportuna colorazione delle proteine

→ **Elettroforesi**



Risultato elaborato della analisi elettroforetica dato dalla analisi densitometrica del singolo tracciato elettroforetico e nella quale viene riportata l'intensità di ciascuna punto del tracciato elettroforetico (Y) in funzione della sua posizione longitudinale (X).

→ **Elettroferogramma**

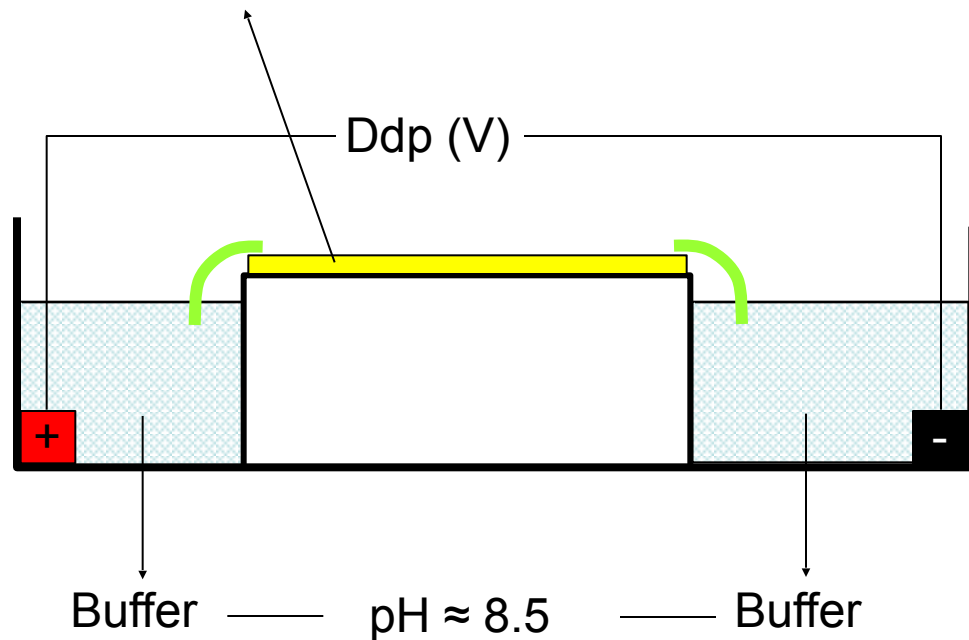


Utile per valutazioni quantitative (comparazione delle aree sottese dai "picchi" elettroforetici)

Elettroforesi su acetato di cellulosa

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

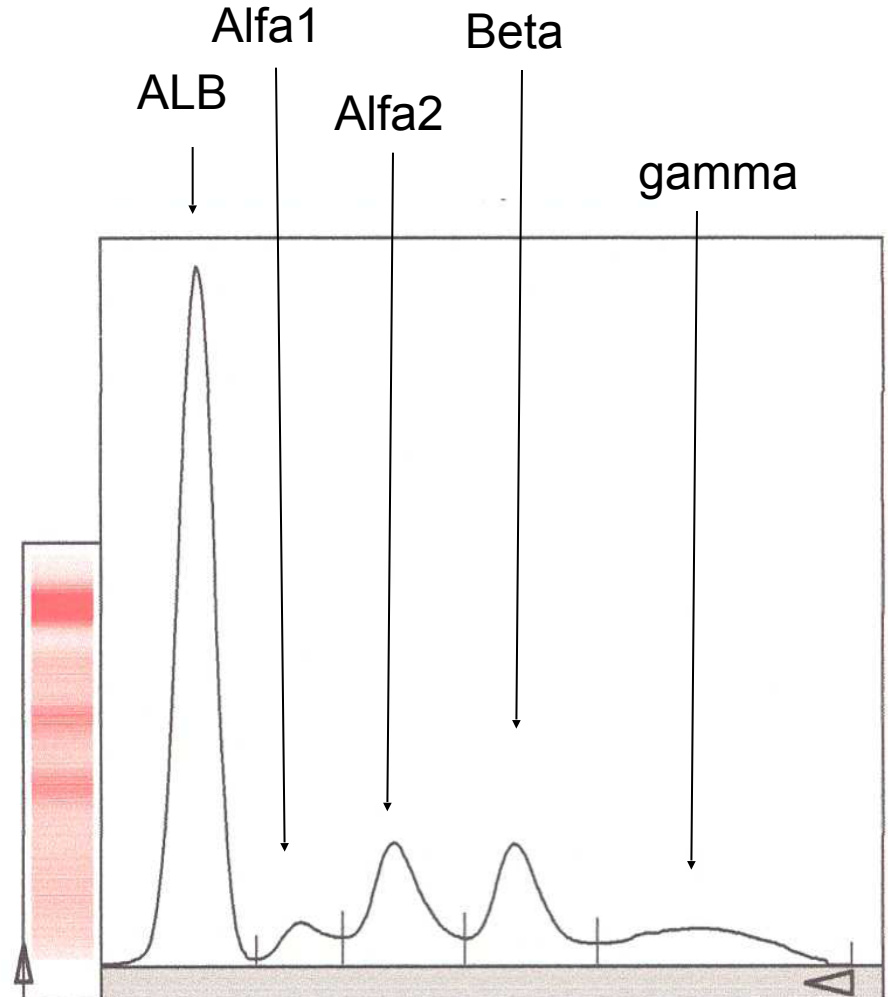
Striscia di acetato di cellulosa



Analisi condotta in circa 15 minuti

Esempio di un referto riguardante le Sieroproteine

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



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

SISTEMI PER ELETTROFORESI PROTEINE SIERICHE

PARAMETRO	ACETATO DI CELLULOSA (OBBOLETO)	GEL DI AGAROSIO (SEBIA e altri)	ELETTROFORESI CAPILLARE (Sebia e altri)
Periodo di utilizzo	Anni 1960-1990	Anni 1980-oggi (ancora molto usato)	Anni 2000-oggi (crescita rapida)
Principio	Elettroforesi su membrana porosa	Elettroforesi in gel semisolido	Elettroforesi capillare in fusione silicica
Supporto fisico	Strisce di acetato di cellulosa	Gel di agarosio su supporto plastico	Tubo capillare di silice fusa (20-50 µm x 20-40 cm)
Preparazione campione	Applicazione manuale con micropipetta	Applicazione automatica o manuale con "pettine"	Iniezione automatica idrodinamica/elettrocinetica
Tempo di corsa	45-60 minuti	20-25 minuti	4-6 minuti
Volume campione	2-5 µL	3-10 µL	1-4 µL
Colorazione	Separata: immergere in Ponceau S, Amido nero, ecc.	Inclusa nel sistema: colorante in fase di migrazione o post-elettroforesi	Rilevamento diretto a UV 214 nm (legami peptidici)
Risciacquo/Fissaggio	Necessario (passaggi multipli)	Minimale o automatizzato	Assente (rilevamento diretto)
Densitometria	Scanner separato + software	Scanner integrato + software automatico	Rilevatore UV integrato + software
Risoluzione	Bassa-media	Alta (buona separazione frazioni)	Molto alta (picchi stretti, baseline pulita)
Riproducibilità	Bassa (variabilità manuale)	Alta	Molto alta (completamente automatizzato)
Automazione	Manuale o semiautomatica	Semi-automatica (caricamento manuale campioni)	Completamente automatica (dall'iniezione al report)
Produttività	20-30 campioni/ora	30-50 campioni/ora	70-150 campioni/ora
Costo per test	Basso (ma alto costo manodopera)	Medio	Medio-alto (minore manodopera)
Manutenzione	Bassa	Media (pulizia piastre, sostituzione gel)	Media-alta (sostituzione capillare, lavaggi)
Consumo reagenti	Alto (coloranti, acidi, alcoli)	Medio	Basso (solo tampone di corridoio)
Rifiuti chimici	Elevati (coloranti tossici, solventi)	Moderati	Minimi
Sensibilità	50-100 mg/dL	10-50 mg/dL	5-15 mg/dL (migliore per piccole M-proteine)
Integrazione con IFE	Manuale separato	Semi-automatica (stesso sistema)	Completamente integrata (Capillarys 2)
Interpretazione	Visiva + densitometria	Software automatico con flag	Software avanzato con IA (riconoscimento pattern)
Formato output	Grafico analogico scannerizzato	Grafico digitale densitometrico	Cromatogramma digitale ad alta risoluzione

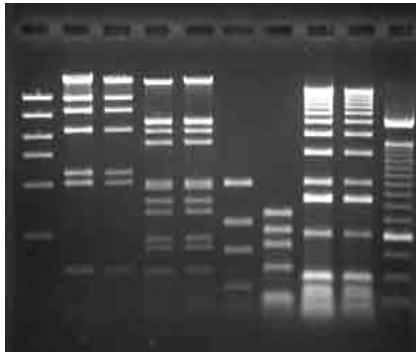
Gel di Agarosio – Separazione molecole di DNA

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

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

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

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



Tipiche condizioni di corsa:

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

ddp: circa 5 V/cm

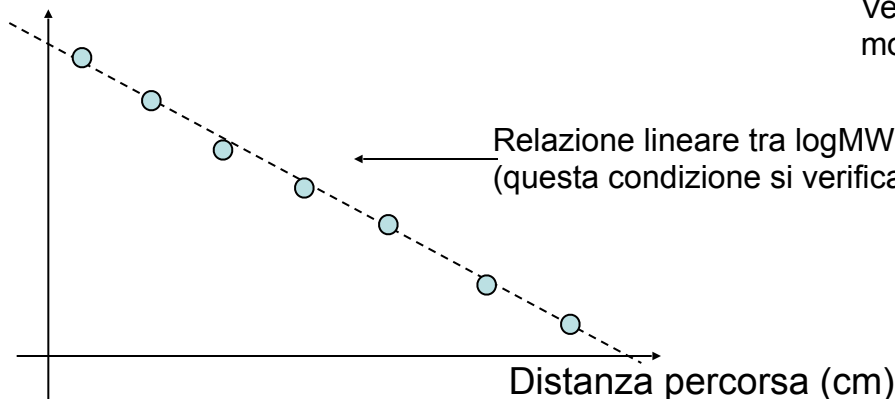
% Agarosio: tipicamente dal 0.5 al 1-2%

Visualizzazione tramite intercalazione di molecole (fluorescenza su transilluminatore UV) o di altro colorante.

Gel di agarosio non sono comunque impiegati solo per analisi di DNA.

Vengono utilizzati anche per analisi di proteine aventi dimensioni molto grandi o di complessi macromolecolari.

Log (bp o MW)



Come costruire una figura contenente un'analisi elettroforetica (valido sia per gel di DNA che per gel di proteine)

Indicare il campione caricato in ogni singolo tracciato

Colony 1
Colony 1

Riportare i segni relativi alla posizione dei riferimenti utilizzati

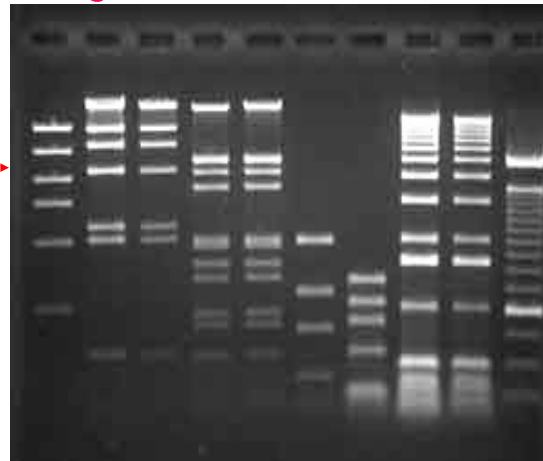
Indicare con una freccia (sempre esterna) bande di particolare interesse ai fini della discussione del risultato

cDNA 1

2000
1000

Indicare il numero del tracciato elettroforetico. Permette di identificare in modo univoco un particolare tracciato nella discussione dei risultati riferendosi ad un numero preciso.

Conviene inserirlo anche se non si fa specifico riferimento ad un particolare tracciato nel testo in quanto consente di identificare un tracciato in un eventuale discussione dell'articolo in sede di revisione, commento, etc.



1 2 3 ...

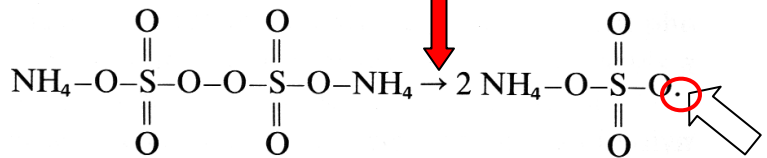
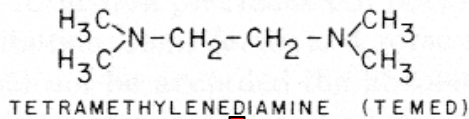
bp

Indicare l'unità dei riferimenti
(i.e bp, kDa)

Polimerizzazione di un gel di poliacrilamide

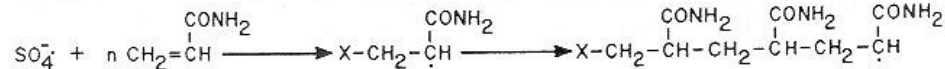
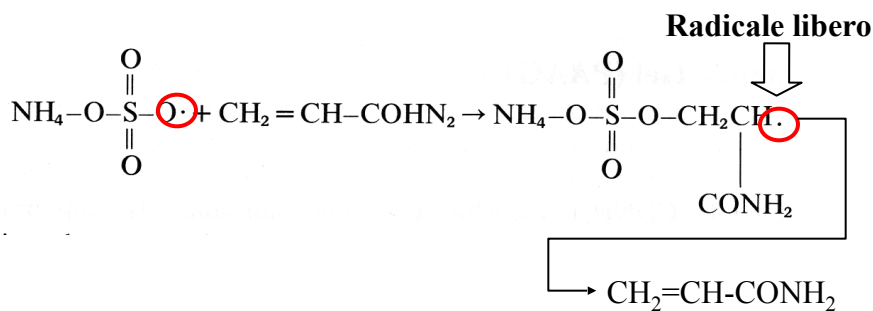
(APS + TEMED + Acrilamide + Bis-Acrilamide)

Senza TEMED la reazione di decomposizione dell'APS in radicale libero sarebbe molto lenta (ma non nulla). Polimerizzazione quindi avviene ma l'innesto è molto più lungo.

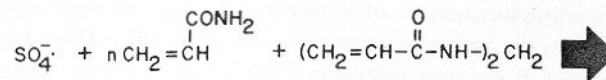
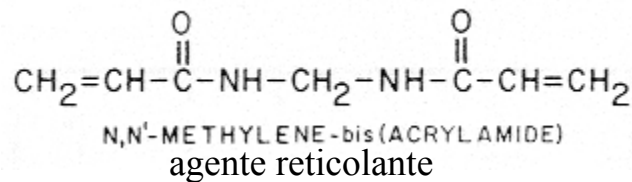


Ammoniopersolfato (APS)

Radicale libero



Catena di poliacrilamide polimerizzata
senza la presenza di un agente reticolante

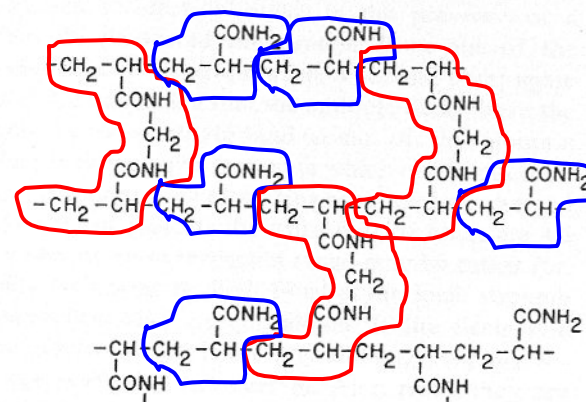


T: (g acril. + g bis-acril.) / volume (espressa come percentuale)
x grammi/100 ml => x %

C: g bis-acrilamide / (g bis-acril. + g acril.) (espressa come percentuale)
y grammi bis-acril / 100 gr (bis-acril. + acril.) => y %

T e C devono essere determinati empiricamente. Nella IEF, si usano bassi valori (soprattutto per quanto concerne T; T=4%, C=3%) poiché le proteine devono essere libere di raggiungere la zona dove il pH del gel è uguale al loro pI. In altre metodiche elettroforetiche, la frizione che le molecole incontrano muovendosi durante la corsa elettroforetica è parte integrante del processo separativo => è opportuno valutare quali siano le migliori combinazioni di T e C per ottenere una buona separazione.

Entro certi limiti si può dire che aumentando T e C si hanno dei reticoli più fitti. Se però c'è troppa bis-acrilamide c'è la tendenza a formare "doppi ponti" che invece vanno a contribuire ad un allargamento delle maglie.



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

Elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE) - Proteine

Native

Viene mantenuta la struttura secondaria / terziaria ed eventualmente quaternaria delle proteine (o di loro complessi con altre molecole come ad esempio il DNA)

Condizioni:

Si opera con tamponi ad un pH non lontano dalla neutralità.

Si evita assolutamente il riscaldamento del sistema elettroforetico che può causare la denaturazione delle proteine/complessi per effetto termico.

Non è possibile utilizzare detergenti non-ionici ne tanto meno ionici, come anche non si possono utilizzare sostanze riducenti.

Condizioni

Denaturanti

La struttura secondaria / terziaria ed eventualmente quaternaria delle proteine viene persa a causa dell'utilizzo di detergenti (i.e. SDS) o agenti denaturanti (i.e. UREA).

Condizioni:

Possono essere adottati tamponi di corsa anche a pH lontani dalla neutralità.

Generalmente è accettabile un blando riscaldamento del sistema elettroforetico. Il limite in questo caso è imposto dalla resistenza del supporto solido oppure da eventuali modificazioni a carico delle proteine dovute alla reazione di queste con qualche molecola presente nel sistema elettroforetico.

Si fa in modo che eventuali dimeri o complessi macromolecolari uniti da ponti disolfuro vengano rotti per azione di agenti riducenti (DTT o beta-mercaptoetanololo).

La migrazione elettroforetica è influenzata sia dalla carica della molecola che dall'ingombro sterico della stessa che comporta un rallentamento a causa dell'effetto setaccio del gel in cui avviene la migrazione.

Non si possono fare alcune ipotesi circa il peso molecolare delle proteine analizzate.

Nel caso in cui non vengano utilizzati detergenti ionici la migrazione è influenzata dalla carica della molecola e dall'attrito che essa incontra muovendosi nel gel, con la differenza rispetto ai gel nativi che l'attrito non è collegato alla sua struttura secondaria/terziaria ne tanto meno quaternaria ma solo all'estensione della sua struttura primaria. Nel caso si utilizzino dei detergenti ionici questi vanno a conferire sostanzialmente a tutte le proteine il medesimo rapporto m/z e pertanto esse si separano in base al loro peso molecolare