

ISOELETTROFOCALIZZAZIONE

SESSSKSSQP LASKQEKDGT EKRRGRGRPRK QPPVSPGTAL VGSQKEPSEV PTPKRPRGRP
KGSKNKGA AK TRKTTTTTPGR KPRGRPKKLE KEEEEGISQE SSEEEQ

Number of amino acids: 106

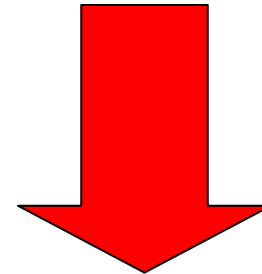
Molecular weight: 11544.8

Theoretical pI: 10.31

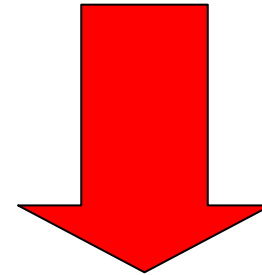
Amino acid composition:

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.

• pK_{a1} = α -carboxyl group, pK_{a2} = α -ammonium ion, and pK_{a3} = side chain group.

Amino acid	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	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
Phenylal.	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 a.	1.88	9.60	3.65	2.77
Glutamic a.	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 \Rightarrow S⁻ (pK_a 8.5)

Serine, Threonine, Tyrosine: gruppo OH \Rightarrow O⁻ (pK_a 13, 13, 10.5 - rispettivamente)

ISOELETTROFOCALIZZAZIONE

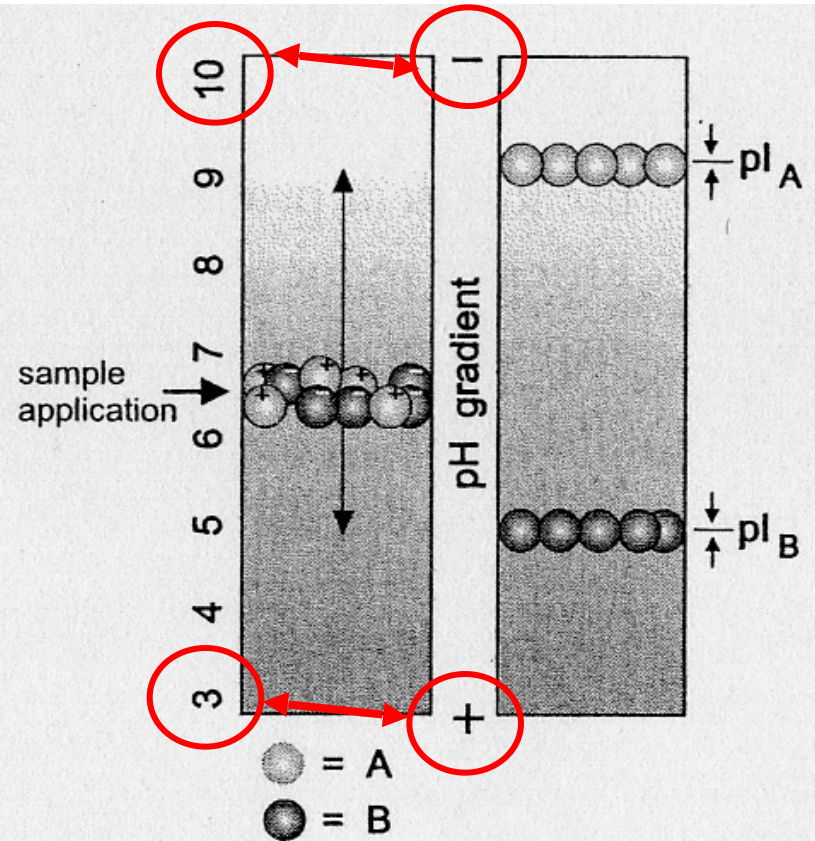
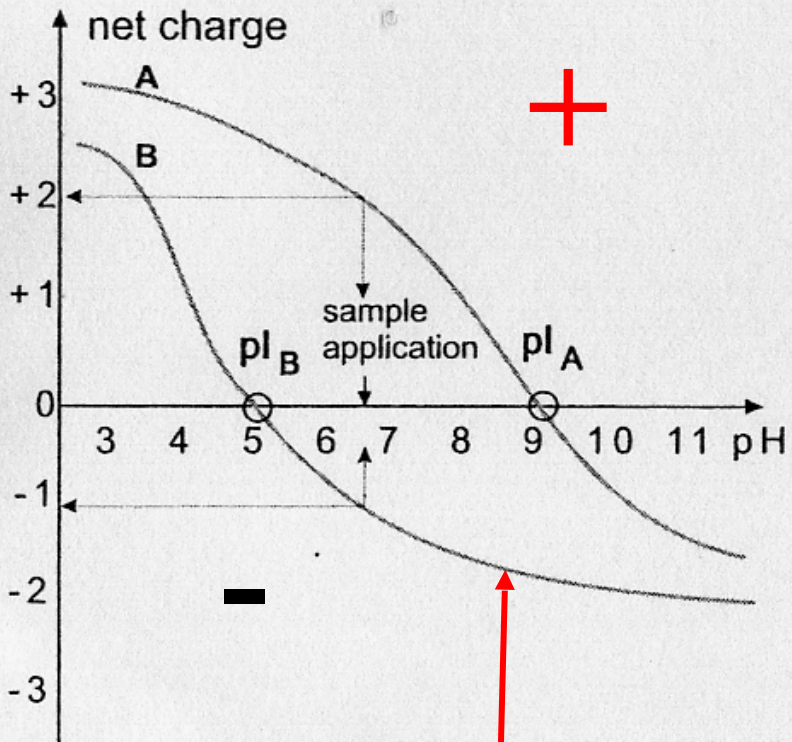
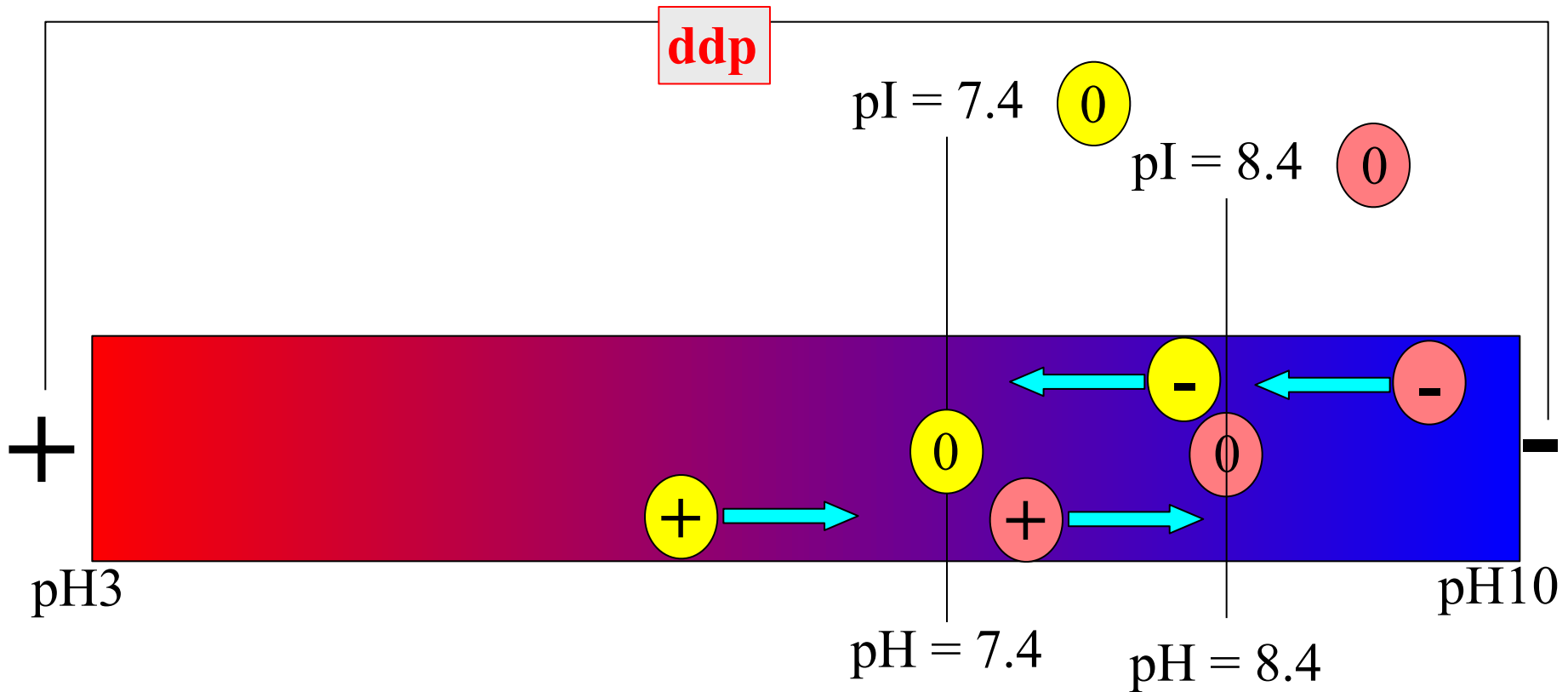


Fig. 6: The principle of isoelectric focusing. *Left:* Net charge curves of two model proteins A and B. At the point of application, A will have two positive,

B will have one negative charge(s). *Right:* Migration of A and B to their pI s 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 già 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 di 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 $\text{pH}=\text{pI}$, 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! Si tende a lavorare con alti voltaggi, che vengono raggiunti progressivamente, dal momento che come le proteine raggiungono il loro pI, si scaricano progressivamente e contribuiscono sempre meno alla conducibilità del gel => corrente bassa.

Isoelettrofocalizzazione: preparazione del campione

Tampone di lisi convenzionale:

9 M Urea, 4% CHAPS, 1% DTT, 0.8 % anfolti 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

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.

DTT - DiTioTreitololo (in alternativa il DTE - DiTioEritritolo)

Agente riducente. Necessario per rompere i ponti disolfuro S-S e mantenere in forma ridotta le proteina.

Strategie alternative per evitare la formazione di ponti disolfuro sono:

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

b) Ossidare i gruppi tiolici delle proteine a disolfidi misti => convertire tutti i gruppi tiolici in una forma ossidata ma stabile (HED –Hydroxyethylsulphide – DeStreak)

ANFOLITI CARRIER: piccole molecole organiche polimeriche, altamente solubili, anfoteriche (presenza contemporanea di gruppi basici e acidi => hanno un pl determinato da questi gruppi) con alto potere tamponante al loro pl.

Sfruttate nel lysis buffer e durante la corsa per:

a) aumentare la solubilità delle proteine

b) prevenire interazioni proteine-gel

BBF: Tracciante per evidenziare il passaggio della corrente nei gel

Isolettrofocalizzazione (ed elettroforesi generica): 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 $\mu\text{g/mL}$
Dichloroisocoumarin	Serine proteases	1–43 $\mu\text{g/mL}$
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 $\mu\text{g/mL}$
TPCK	Chymotrypsin Thiol proteases	70–100 $\mu\text{g/mL}$

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

...

SDS-PAGE: preparazione del campione

Composizione Standard del Tampone di Caricamento

Componente	Concentrazione Finale	Funzione
1. Tampone (pH 6.8)	62.5 mM Tris-HCl	Mantiene il pH corretto per lo stacking . Il pH 6.8 è fondamentale per creare l'interfaccia con il tampone del gel (pH 8.8) nel sistema di stacking discontinuo.
2. Agente Denaturante	2% (w/v) SDS	Denatura le proteine rompendo le interazioni non covalenti. Si lega alle proteine in un rapporto costante (~1.4 g SDS/g proteina), conferendo loro una carica negativa uniforme proporzionale alla massa - Tutte proteine stesso m/z .
3. Agente Riducente	100 mM DTT (Ditiotreitolo)	Rompe i ponti disolfuro (S-S) covalenti, assicurando che le proteine siano in forma di catene polipeptidiche lineari e completamente denurate. Essenziale per strutture quaternarie e terziarie.
4. Addensante	10% (v/v) Glicerolo	Aumenta la densità del campione, permettendogli di essere caricato uniformemente nel fondo del pozzetto di caricamento.
5. Tracciante	0.02% (w/v) Blu di Bromofenolo	Colorante che migra con il fronte di migrazione delle proteine più piccole (circa 20 kDa in gel al 15%), permettendo di monitorare visivamente l'avanzamento dell'elettroforesi.

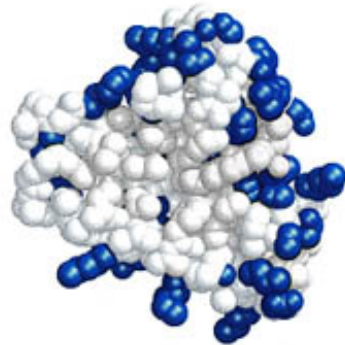
Nel caso il campione sia stato lisato in un altro tampone, bisogna utilizzare una versione concentrata di questo campione (2x, 3x etc,) in modo tale da avere alla fine la concentrazione desiderata.

Questo tampone può anche essere utilizzato per lisare direttamente il campione ed estrarre quindi le proteine (di solito nella versione 2% SDS senza il TRACCIANTE BBF).

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

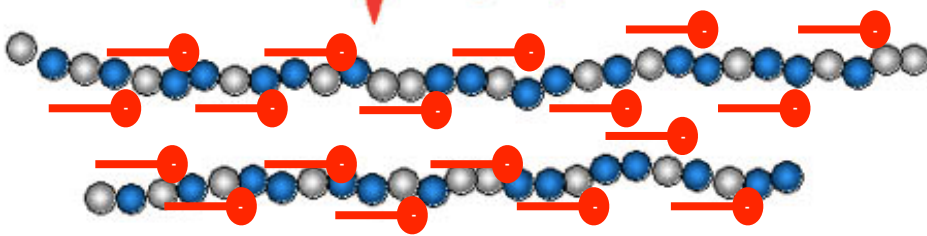
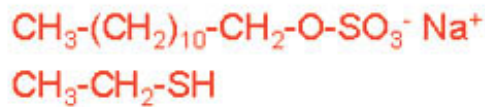
Separazione elettroforetica che discrimina le varie proteine in base al loro PESO MOLECOLARE

NB: Sempre meglio parlare di **peso molecolare apparente** in SDS PAGE



native protein

SDS



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 sì 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.

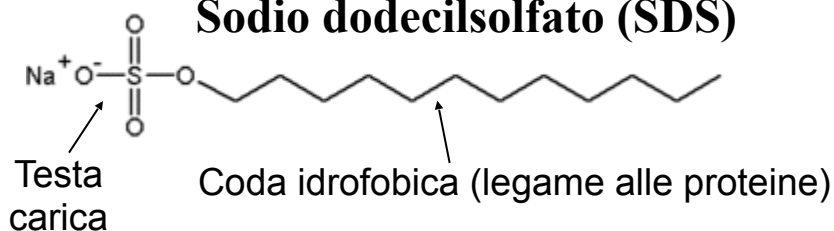
Perchè allora peso molecolare apparente in SDS PAGE?

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.**

Sodio dodecilsolfato (SDS)



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

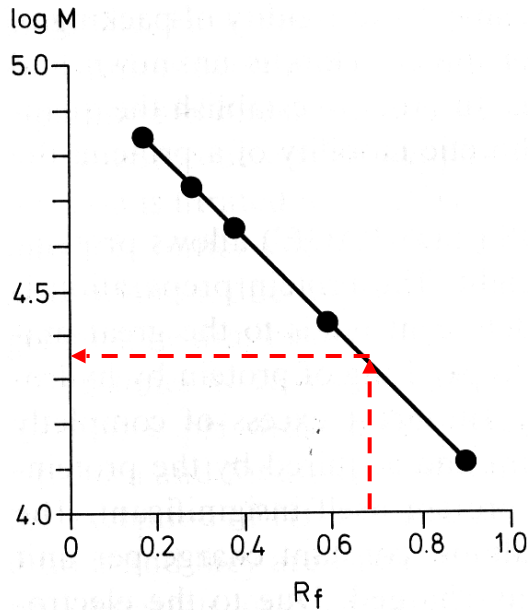


Fig. 18. Linear plot of logarithm molecular mass (log M) versus relative electrophoretic mobility (R_f) of proteins upon PAGE

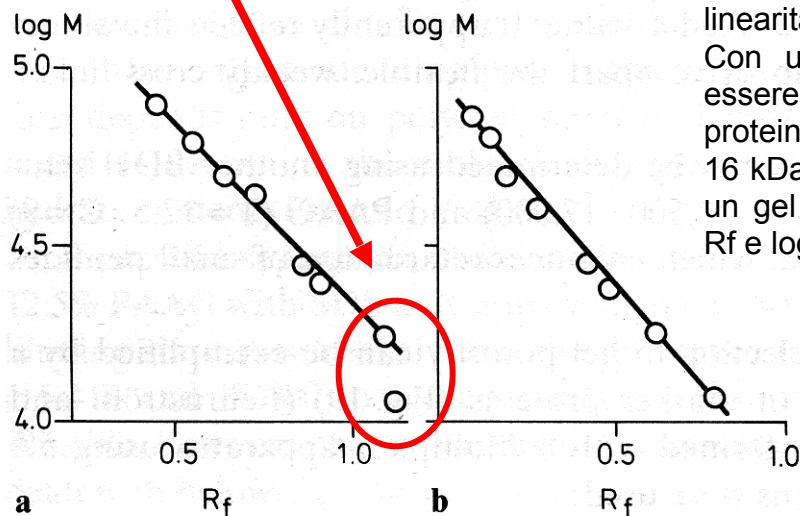
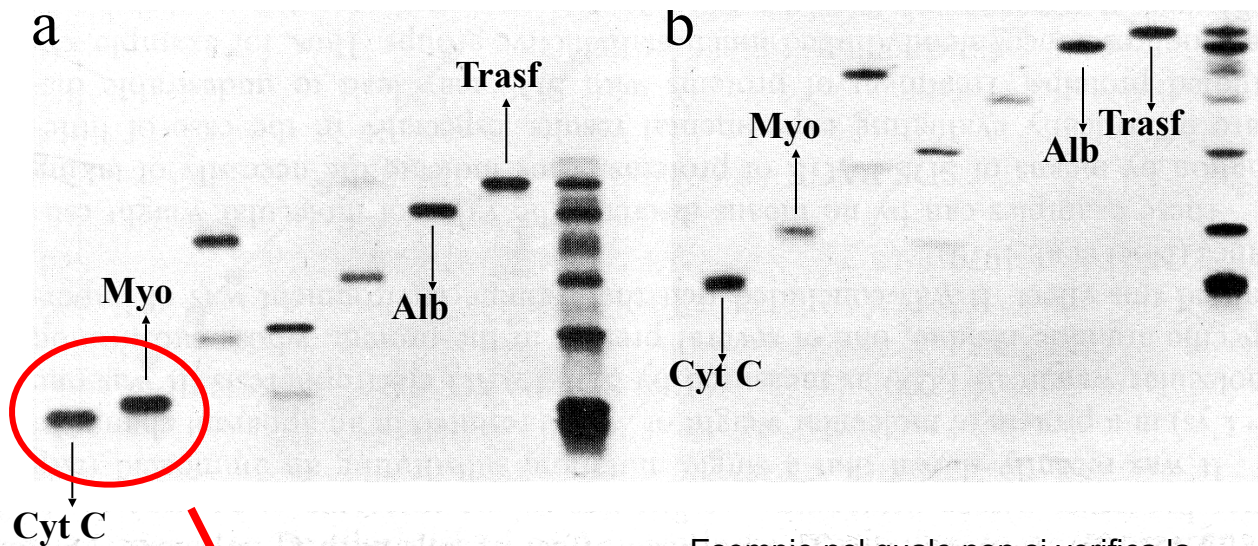
T, %	5	10	15
M (× 10 ⁻³)	18-330	10-110	10-60

Al posto di u' 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 R_f .
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 R_f e $\log M$.

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

Myo e Cyt C: stessa R_f ma diverso $\log M$

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

1. Scelta del Tipo di Gel

Gel a concentrazione fissa: Ideale per separare proteine in un intervallo di peso molecolare ristretto. Risoluzione ottimale solo per quella finestra.

Gel in gradiente lineare (ad es., 4-20%): La scelta migliore per **separare proteine in un ampio intervallo di pesi molecolari** (es. 10-300 kDa) sullo stesso gel. Offre una **risoluzione superiore** perché le proteine si focalizzano in zone dove la % di acrilammide ne rallenta progressivamente la migrazione (effetto "stacking" continuo). Riduce anche il rischio che proteine grandi rimangano intrappolate all'inizio del gel o che proteine piccole diffondano.

2. Parametri del Gel

Lunghezza (altezza): Un gel più lungo (es. gel "lunghi" aumenta notevolmente la **risoluzione**, soprattutto per proteine di dimensioni simili, fornendo più spazio per la separazione. Aumenta però i tempi di corsa.

Spessore: Gel più sottili (0.75-1.0 mm) dissipano meglio il calore, producono bande più nitide e richiedono meno volume di campione. Gel più spessi (1.5 mm) sono più robusti e accettano più campione, ma possono generare più calore con bande più diffuse.

Percentuale di Acrilammide/Bis-acrilammide: %T (concentrazione totale di monomeri): Definisce le dimensioni dei pori. Per proteine grandi ($\gg 100$ kDa), usare gel al 6-10%. Per proteine piccole (10-50 kDa), usare gel al 12-15%. Per pesi molto piccoli (< 10 kDa), possono servire gel al 16-20% o sistemi con Tris-Tricina.

Rapporto di cross-linking (%C): Il rapporto tra Bis-acrilammide e acrilammide totale. Il classico 29:1 ($C \approx 3.3\%$) è un buon compromesso. Un rapporto più alto (es. 37.5:1, $C \approx 2.6\%$) produce pori più grandi, utile per proteine molto grandi o complessi.

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

3. Sistema di Buffer (pH e Composizione)

Tampone Tris-Glycine standard (gel a pH 8.8, buffer di corsa a pH 8.3) è adatto per la maggior parte delle applicazioni.

Tampone Tris-Tricina (Schägger & von Jagow) per proteine **molto piccole (<10-15 kDa)**, che offre una migliore risoluzione a basso peso molecolare.

Per proteine **molto grandi (>200 kDa)**, sistemi con **agarosio-acrilammide** o buffer aggiuntivi come l'**acetato di sodio** nel gel possono aiutare.

4. Condizioni di Elettroforesi

Voltaggio/Temperatura: La corsa a **voltaggio costante** è comune. Una corsa **lenta e refrigerata** (es. 80-100V per diverse ore, a 4°C) dà la massima risoluzione e minimizza il "sorriso/smile" (bande curve da surriscaldamento/deformazione campo elettrico). Una corsa veloce (200V) può essere usata per risparmiare tempo a scapito di una leggera perdita di risoluzione.

Composizione del Buffer di Corsa: Assicurarsi che contenga **SDS (0.1%)** per mantenere le proteine caricate negativamente. Rinnovararlo periodicamente.

5. Preparazione del Campione

Denaturazione completa: Scaldare i campioni a **95°C per 5-10 minuti** in tampone di caricamento con agente riducente (DTT o β -mercaptoetanololo).

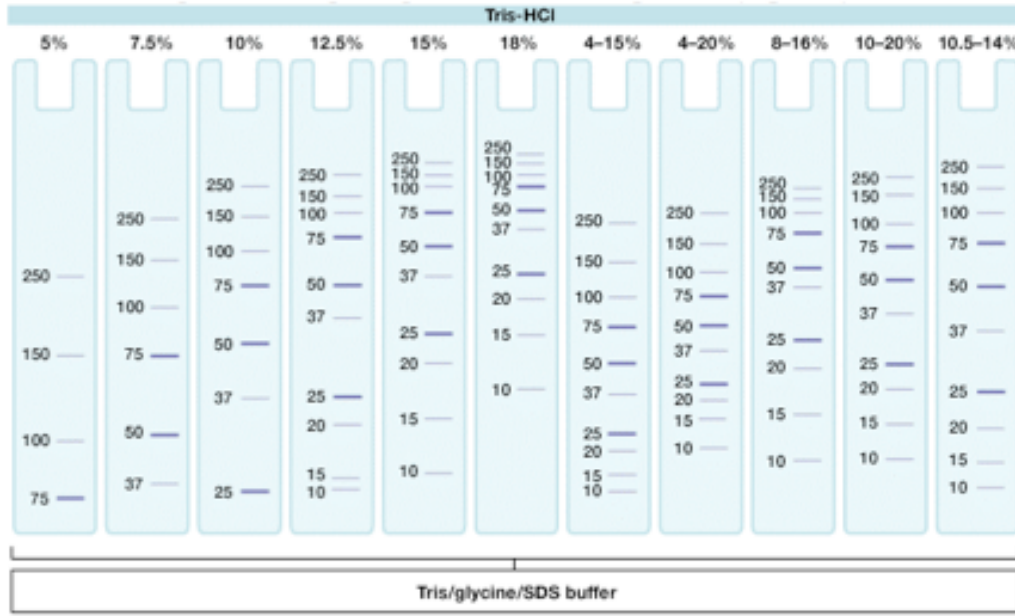
Quantità di carico: Sovraccaricare il gel porta a bande larghe, diffuse e coalescenti. Caricare la **quantità minima necessaria** per la rilevazione. Se necessario, concentrare il campione.

Purificazione: Eliminare contaminanti (sali, acidi nucleici, lipidi) che possono disturbare la migrazione. Precipitazione in acetone/TCA può aiutare.

Scelta del Pozzetto: Evitare i pozzetti laterali, che possono dare bande distorte. Caricare campioni noti ai lati del marker.

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

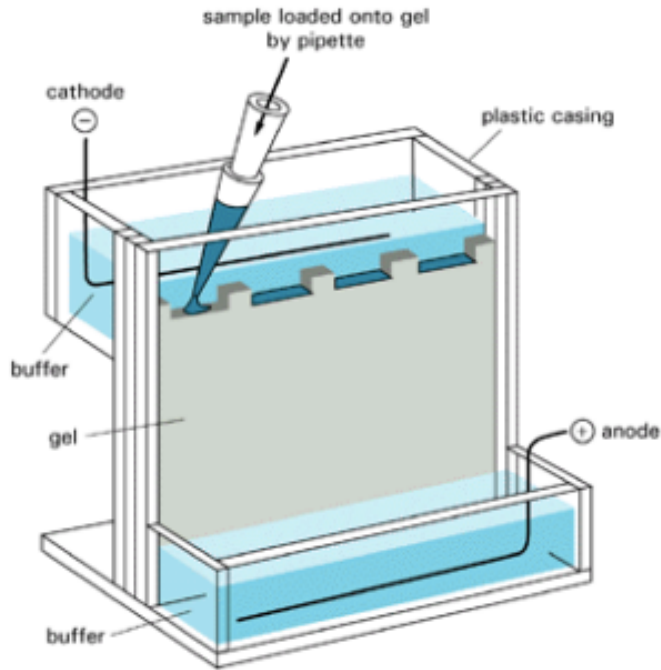
**Ottimizzare T (e C)
(quale T offre la miglior
separazione per le proteine
d'interesse?)**

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 proteina 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 contenenti proteine diverse da sottoporre 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.

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

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

La corsa SDS PAGE viene solitamente divisa in due fasi:

- 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);
- Separazione** delle proteine.

Per quanto concerne le modalità si può sostanzialmente adottare una corsa a:

- 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;
- 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;
- 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

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

50V per 1 ora

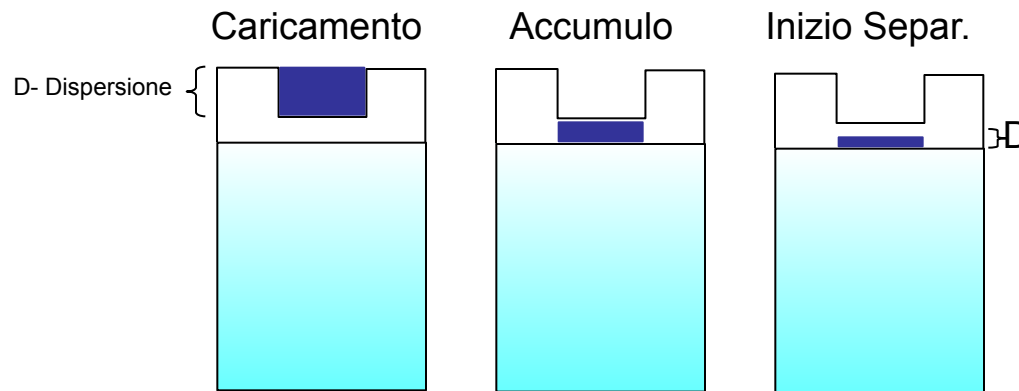
100-200V per 1-2 ore (uscita del BBF)

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 sì 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.



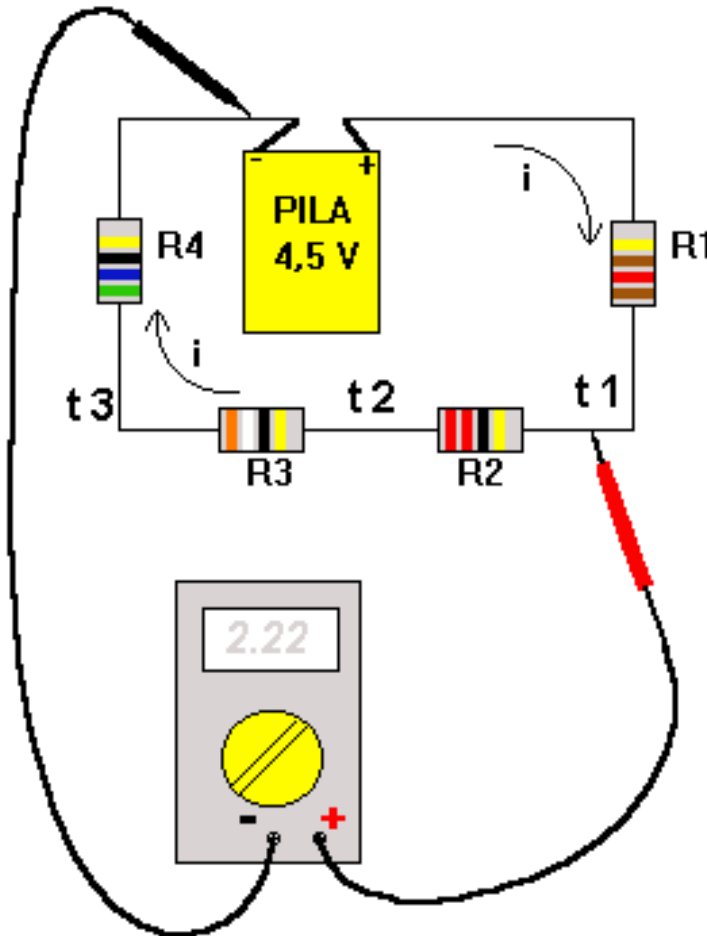
Le proteine migrano nello stacking gel ma le condizioni sono tali per cui non riescono a penetrare nel running gel. In questo modo le proteine si accumulano all'interfaccia stacking/running occupando un "altezza" molto minore rispetto a quella occupata dal liquido nel pozzetto di caricamento => partono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

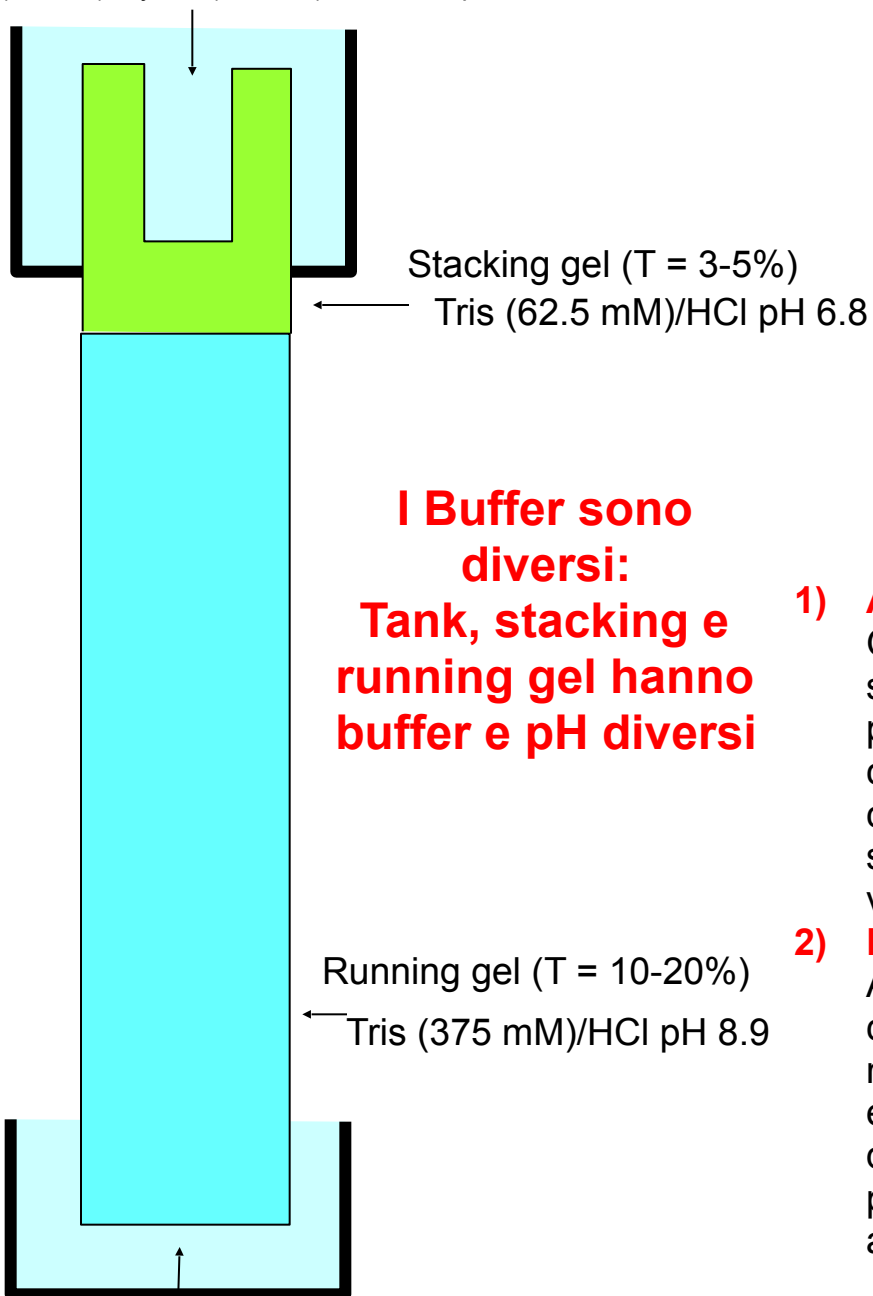
In questo modo anche il campo elettrico sarà più forte e le molecole che ivi si troveranno saranno sottoposte ad una forza maggiore.

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 ($4,5 \text{ V} / [R1+R2+R3+R4]$). A seconda dell'entità della corrente, per ogni R ci sarà una determinata caduta di potenziale.

Sistemi discontinuo - Laemmli discontinuos buffer

Tris (2.5 mM)/Glycine (192 mM) SDS 0.1% pH 8.3



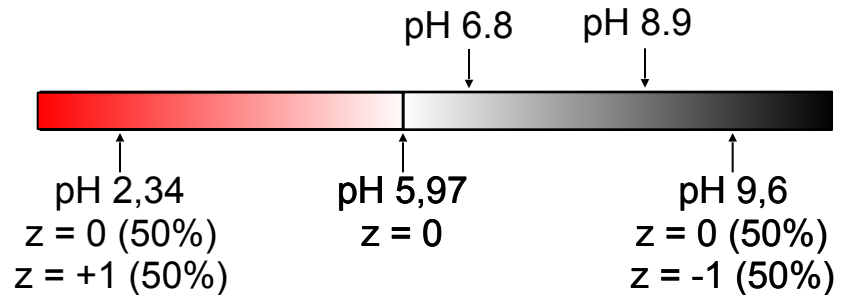
**I Buffer sono diversi:
Tank, stacking e running gel hanno buffer e pH diversi**

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 nulla (-1) e metà avranno carica netta nulla.



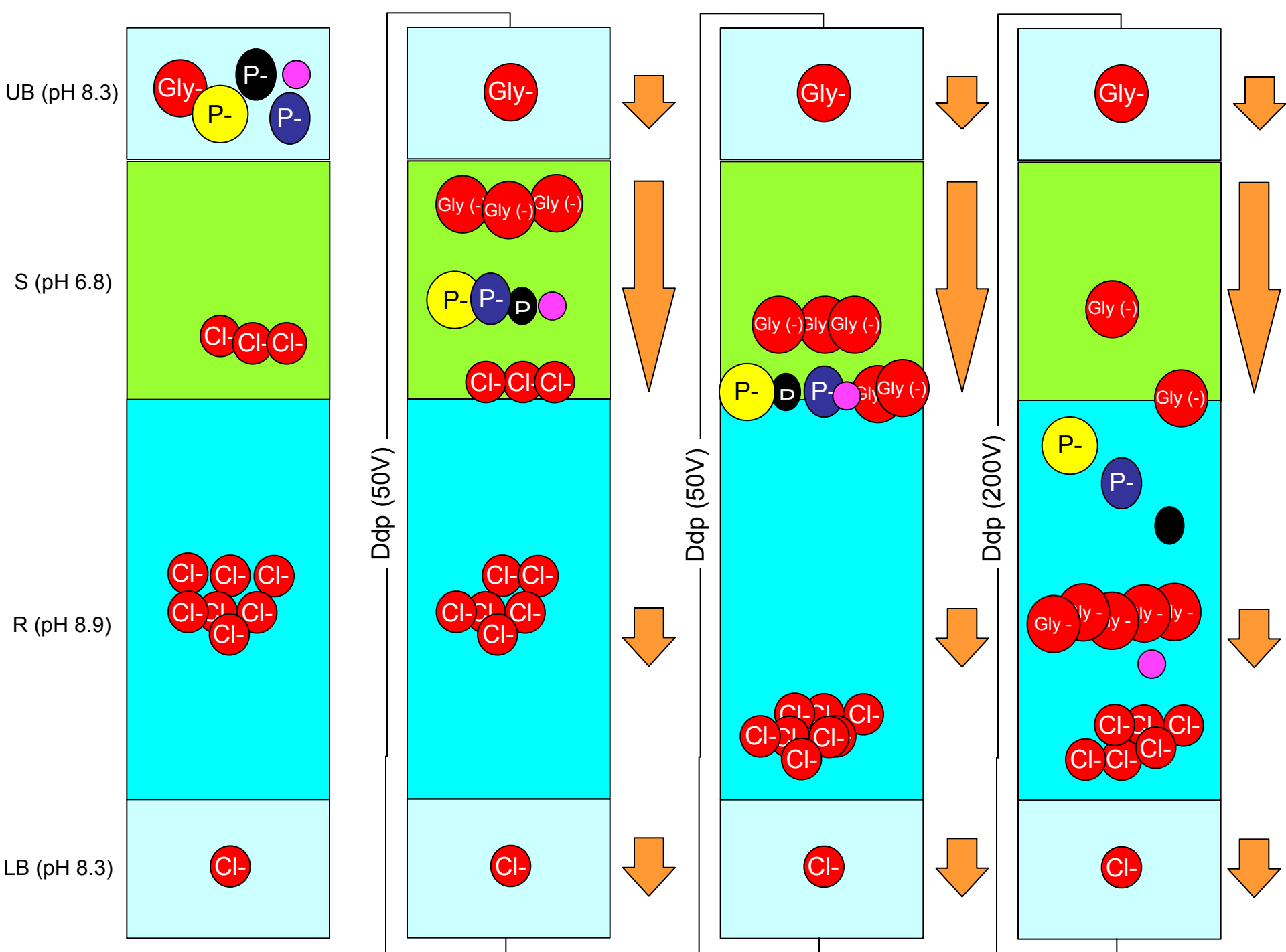
1) Applicazione del voltaggio:

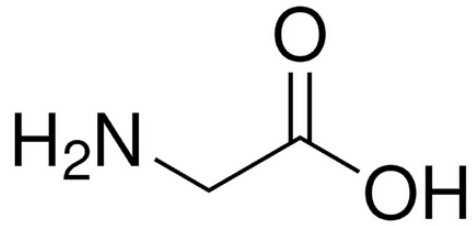
Gli Ioni Cl^- => mobilità elettroforetica molto elevata e nello stacking gel questi vengono rimpiazzati dalla Gly che però passando da pH 8.3 a pH 6.8 perde carica => Gly non conduce e aumenta la resistenza dello stacking gel => campo elettrico aumenta => anche le proteine sono soggette ad un forte campo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

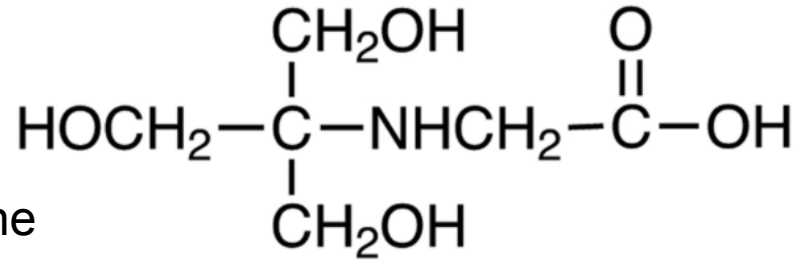
Tris (2.5 mM)/Glycine (192 mM) SDS 0.1% pH 8.3





pK_a: 2.34 e 9.6
pI: 5.97

Glycine vs Tricine



pK_a: 2.3 e 8.15
pI: 5.22

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

Protein in the stacking gel (T=5%, pH 6.8), using both Tricine or Glycine are trapped between the slow GLY (or TRICINE) and Cl⁻ ions. A ddp gradient is formed and proteins stack.

At the pH of the resolving gel (T=10-15 %, pH=8.8) the situation change: the amino group of GLY is partially charged because we are of 0.8 pH unit below its pK_a value. On the contrary, at pH 8.8, TRICINE has its basic group partially uncharged (pK_a < pH, i.e 8.15 < 8.8). Therefore TRICINE is more negative than GLY and has a higher electrophoretic mobility. It moves faster than GLY. In this way, low molecular weight proteins turn out to move slower that TRICINE ions and are not entrapped between TRICINE and Cl⁻.

At the initial ddp applied to the gel, proteins can be subjected to the focusing at the stacking/running interface, but once they are stacked, the porosity (T) of the gel, combined with the low ddp within the running gel make impossible for the proteins to move through the running gel. Only a ddp increase can make proteins running.

Isotachopheresis (ITP) is a specialized electrophoretic technique that occurs within discontinuous systems (such as the SDS-PAGE stacking gel). The name itself reveals its secret: *iso* (equal), *tachos* (speed), and *phoresis* (transport).

In this system, all molecules of interest end up migrating at the **same velocity**, while remaining separated into extremely sharp and concentrated zones.

Here is how the phenomenon works from a physical and technical standpoint:

1. The Configuration (The "Sandwich")

To achieve isotachopheresis, you need a system composed of three types of ions with different mobilities:

- **Leading Ion (L): The fastest ion in the system (e.g., Chloride)**
- **Trailing Ion (T): The slowest ion (e.g., Glycine or Tricine).**
- **Sample (Analytes):** The proteins, which must have an **intermediate** mobility between L and T

Initially, the sample is diluted and occupies a significant volume within the well.

2. The Mechanism: Ohm's Law and the Electric Field

This is the fundamental principle. In an electric circuit, the current is constant. Since the trailing ions (T) conducts electricity less efficiently than the leading ion (L) the zone containing the trailing ion has a **much higher electrical resistance**.

According to Ohm's Law ($V=R \cdot I$). $I = \text{constant}$ but there are three zones with different R: $\text{GLY} > \text{PROTEINS} > \text{Cl}^-$

This means that there are three different zones with a different E (High E: GLY/TRICINE zone - Intermediate E: Proteins - Low: Cl^-)

If a protein **slows down** and falls back into the trailing ion zone, it is hit by the intense electric field, which "shoots" it forward immediately.

If a protein **accelerates** too much and tries to overtake the leading ion, it enters a weak electric field zone and immediately slows down.

Result: All proteins are forced to stay "stacked" in an infinitesimal space between the Chloride and the Glycine/Tricine.

Why is it called "Isotachopheresis"?

Once steady-state is reached, a stable condition is established where the leading ion, the proteins, and the trailing ion all move in a "single file" at the **same velocity** (determined by the leading ion).

In this phase:

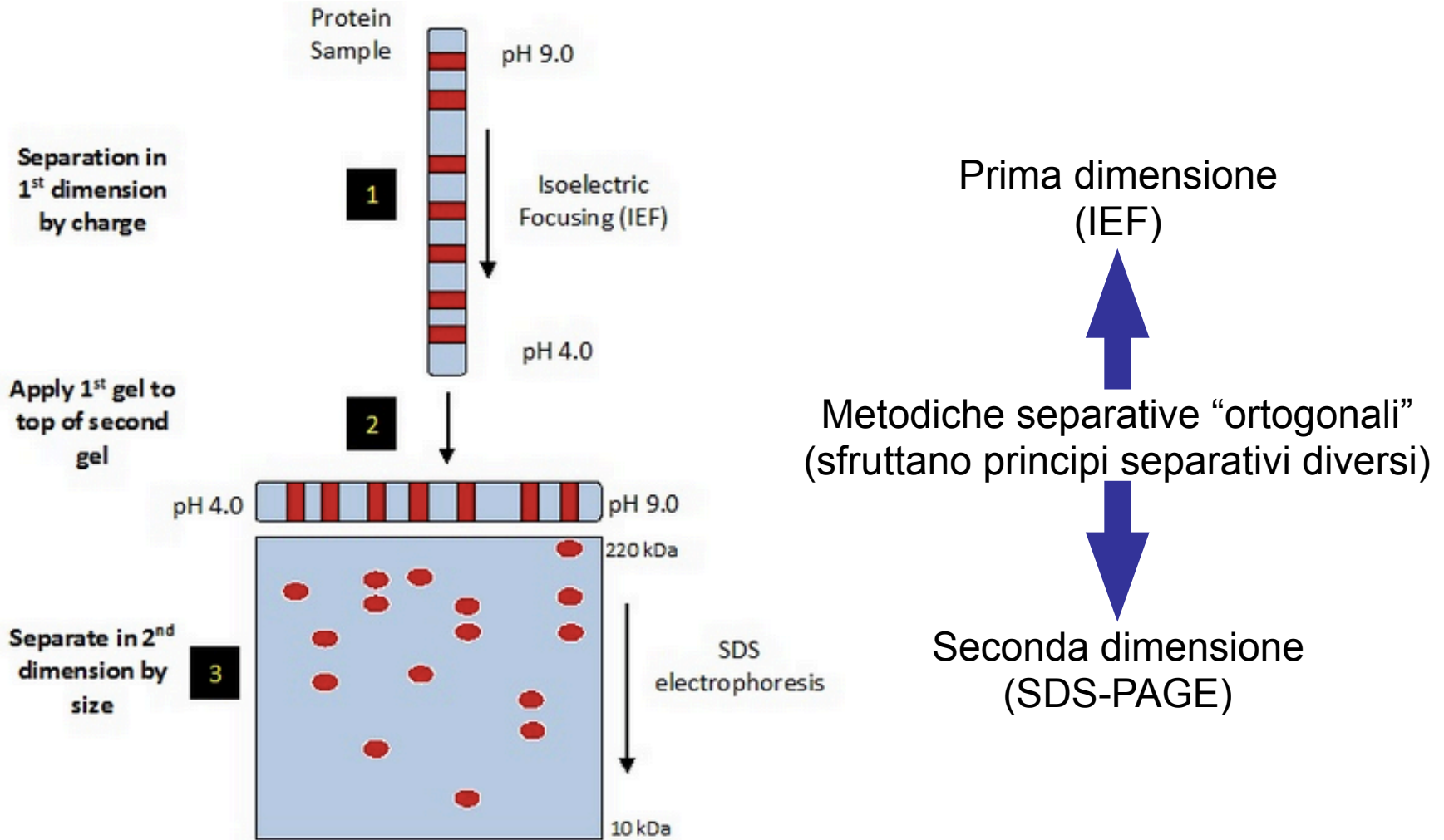
1. **Contiguous zones:** There is no empty space between the different bands.
2. **Concentration effect:** The analyte concentration adjusts to match the leading electrolyte. If the sample was very dilute, ITP drastically compresses it until it reaches a specific plateau concentration.

Why is it essential in the Stacking Gel?

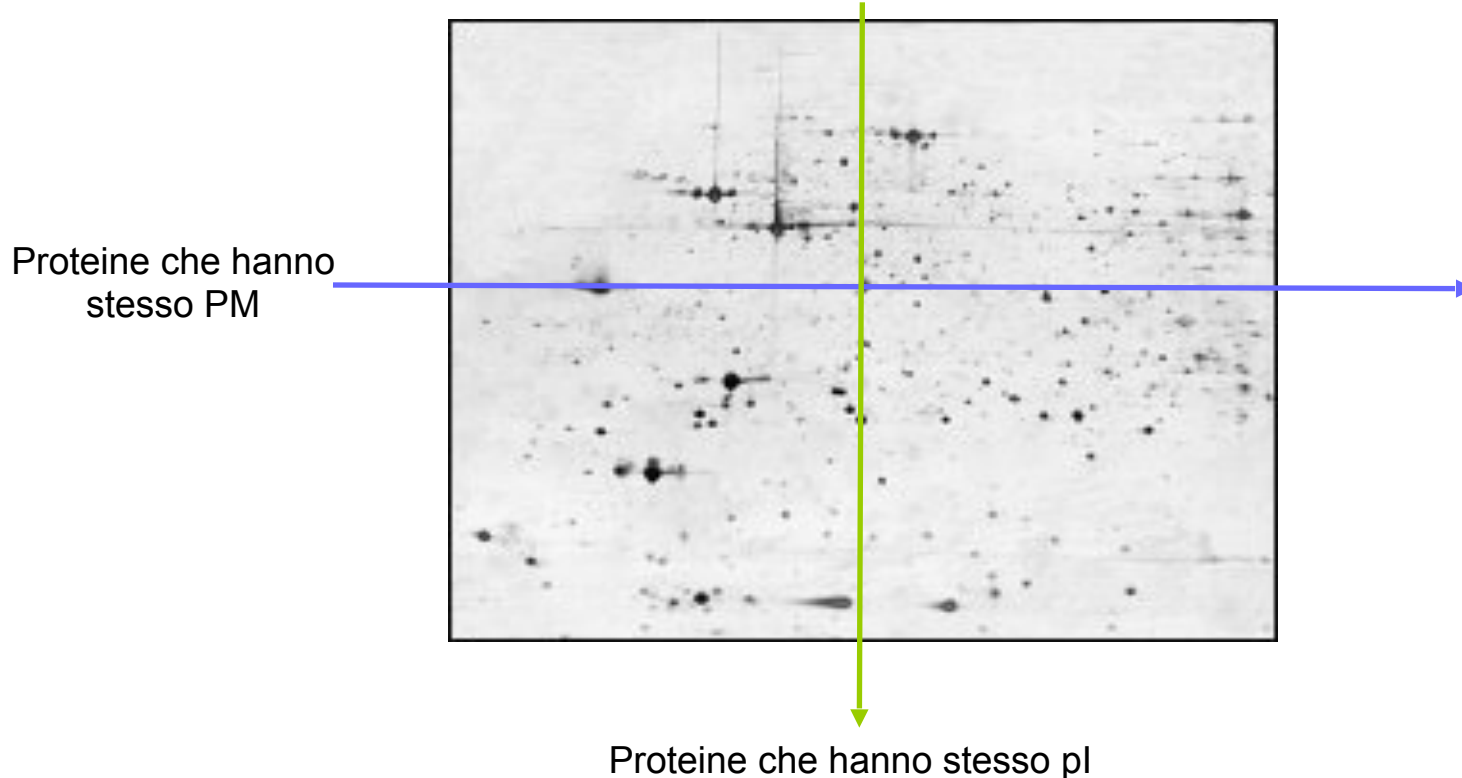
Without isotachopheresis, proteins would enter the resolving gel in the same state they were in the well: as a tall, diluted "cloud." The final bands would be smeared and overlapping.

Only when this thin layer enters the **Resolving Gel** (where pH and porosity change) does the isotachopheresis end, allowing the actual separation by molecular weight to begin.

Elettroforesi bidimensionale (2D-PAGE - IEF/SDS)



Elettroforesi bidimensionale (2D-PAGE - IEF/SDS)



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:

- 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);
- La scelta dell'intervallo del gradiente limita le proteine che andremo a visualizzare.

Elettroforesi bidimensionale (2D-PAGE - IEF/SDS) vs approcci di LC/MS²

Preparazione del campione - equivalente per entrambe le strategie

2D-PAGE - IEF/SDS

In un esperimento standard (A vs B, in triplicato biologico) ben condotto su un lisato cellulare eurariotico, con strip pH 3-10 e colorante fluorescente, ci si può aspettare di visualizzare e quantificare in modo affidabile tra 1.500 e 2.500 spot => per visualizzare (senza identificazione) circa 48/72 ore di lavoro, di cui molte con intervento diretto dell'operatore.

Per ciascun spot da sottoporre ad identificazione 24/36 ore di processamento con 1,5 ore di analisi LC/MS² / Spot

LC/MS²

In un esperimento di LC/MS² di tipo convenzionale con strumentazioni standard => (A vs B, in triplicato biologico) => circa 12 ore in completa autonomia strumentale => 2 ore processamento su tool bioinformatico. Identificate e quantificate circa 4000/5000 proteine.

2D-PAGE è una tecnica superata dal momento che approcci di proteomica LC/MS² forniscono risultati qualitativi e quantitativi su interi proteomi (fino a circa 10000 proteine) in meno di una giornata lavorativa in una modalità completamente automatizzata dove l'operatore interviene in pratica solo nella fase di preparazione del campione

Elettroforesi bidimensionale (2D-PAGE - IEF/SDS) vs approcci di LC/MS²

Anno	Pubblicazioni "2D-Gel" (Appross.)	Pubblicazioni "Proteomics AND Mass Spectrometry" (Appross.)	Rapporto (MS / 2D)
1995	~400	~50	0.1 : 1
2000	~1,500	~400	0.3 : 1
2005	~1,700 (PICCO)	~1,800	≈1.1 : 1 (SORPASSO)
2010	~1,200	~3,000	2.5 : 1
2015	~800	~5,500	7 : 1
2020	~700	~8,500	12 : 1
2023	~550	~12,000+	>20 : 1

In conclusione: non si tratta di una sostituzione netta, ma di un'evoluzione tecnologica. La **MS ha spostato il baricentro della proteomica** dalla separazione visiva analogica alla misurazione digitale di precisione. La 2D, come molte tecniche rivoluzionarie, ha preparato il terreno, definito i problemi e poi è stata superata in larga parte per la maggior parte delle applicazioni da una tecnologia più potente e versatile. È il classico ciclo tecnologico: rivoluzione, maturità, parziale obsolescenza, stabilizzazione in nicchia.