

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

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

Alta sensibilità

Permettere analisi quantitative

Compatibile con MS

Rapido

Economico

Non tossico

... in pratica non esiste il metodo ideale

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

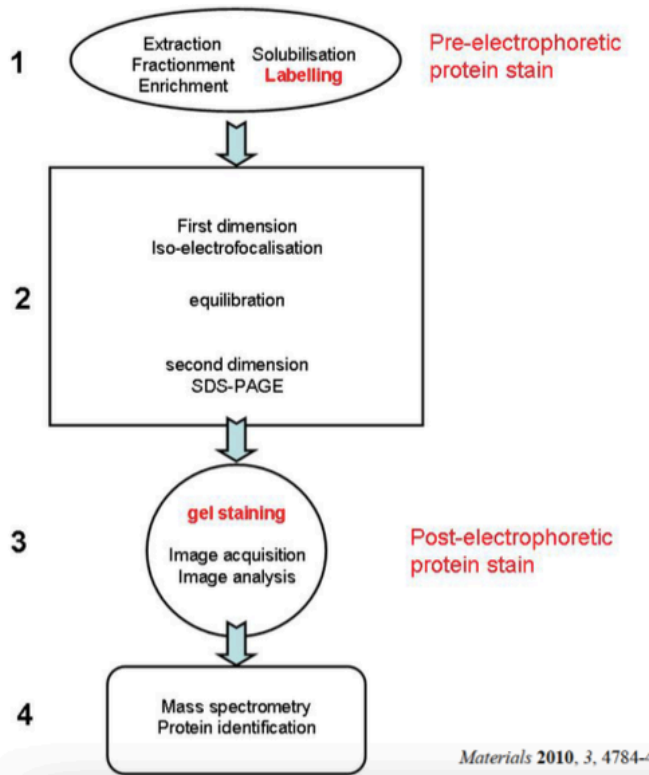
<i>Method</i>	<i>Advantages</i>	<i>Disadvantages</i>
Coomassie Brilliant Blue staining (colloidal)	Steady state method, good quantification, inexpensive, mass spectrometry compatible	Low sensitivity: LOD only ca. 100 ng of BSA, slow, dye particles can cause problems in image analysis
Coomassie Brilliant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

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

Pre- vs. post-staining

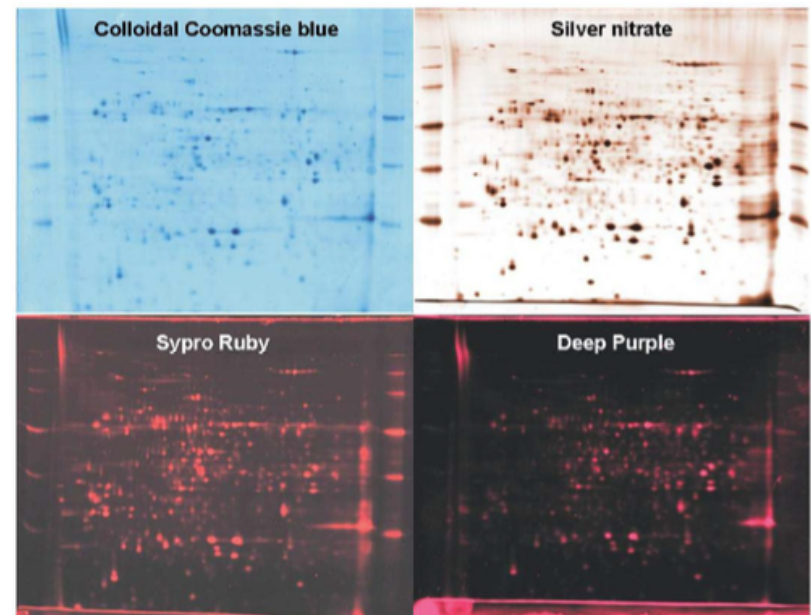
Sotto viene riportato il momento nel quale le proteine vengono “colorate”. In ogni caso risulta di fondamentale importanza la normalizzazione proteica al fine di ottenere dei dati quantitativi.

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



Comparison of different staining procedures

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



Blue Coomassie (CBB)

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

Colorazione classica con BC: (sensibilità: circa 100 ng / banda o spot)

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

Colorazione Commassie Brilliant Blue (CBB) Colloidale G-250: (sensibilità: circa 10-30 ng / banda o spot)

Staining

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

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

1

Fixing solution

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

Prepare fresh

2a

Staining stock solution A

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

2b

Stock staining solution B

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

2

Staining solution, freshly prepared:

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

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

3

Neutralization solution

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

4

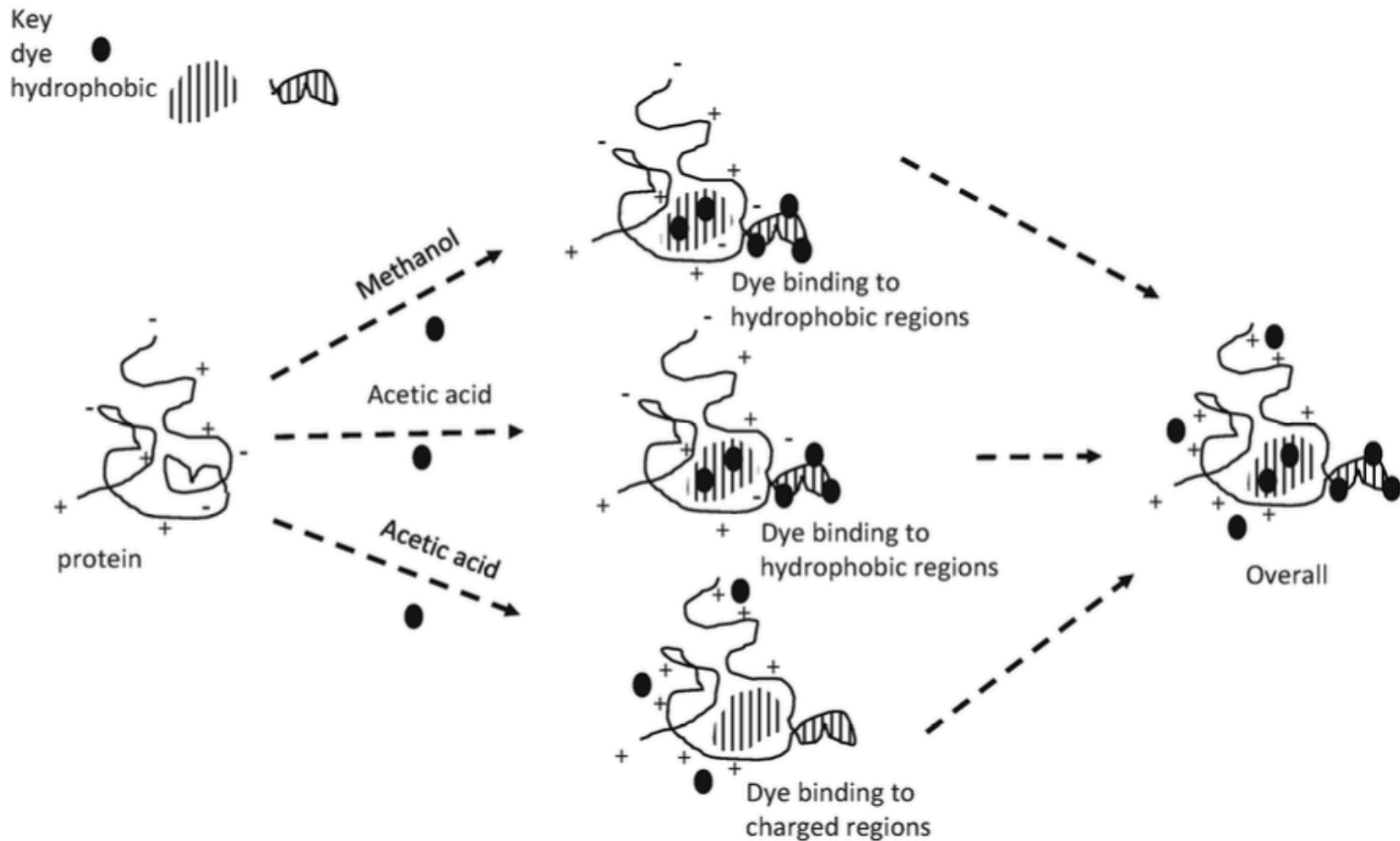
Washing solution

Methanol		125 mL
Water, deionised	make up to	500 mL

5

Stabilizing solution

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



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

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

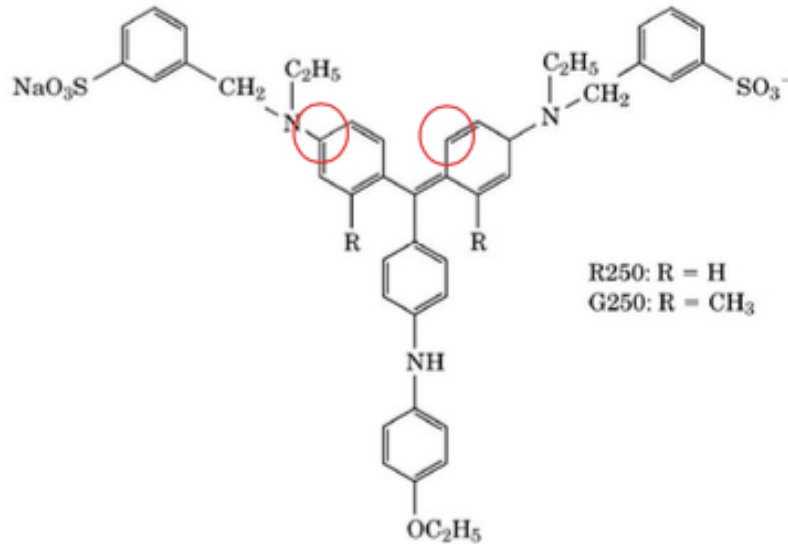
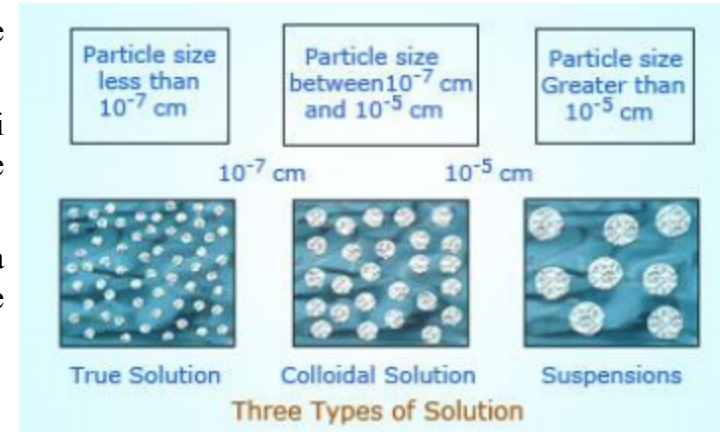
Le proteine denaturate hanno la tendenza a **precipitare** e questo favorisce la loro non fuoriuscita dal gel. Il metanolo concorre a trattenere le proteine all'interno del gel anche perché induce la disidratazione del gel con conseguente restringimento dello stesso. Attenzione che questo effetto è negativo quando vogliamo trasferire le proteine su di una membrana mediante la tecnica del western blot (vedasi avanti). Il metanolo aiuta anche ad eliminare l'SDS dalle proteine favorendo il legame del CBB.

Blue Coomassie - colorazione colloidale con G250

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

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

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



Coomassie G-250

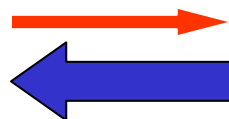
Poco solubile nella soluzione di colorazione descritta precedentemente (2) => si forma una soluzione colloidale.

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

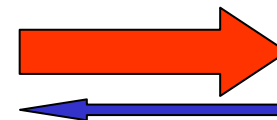
Quando le proteine non legano più CBB, questo non passa più dallo stato colloidale a quello in soluzione.

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

CBB
in soluzione colloidale



CBB
in soluzione



CBB
legato proteine

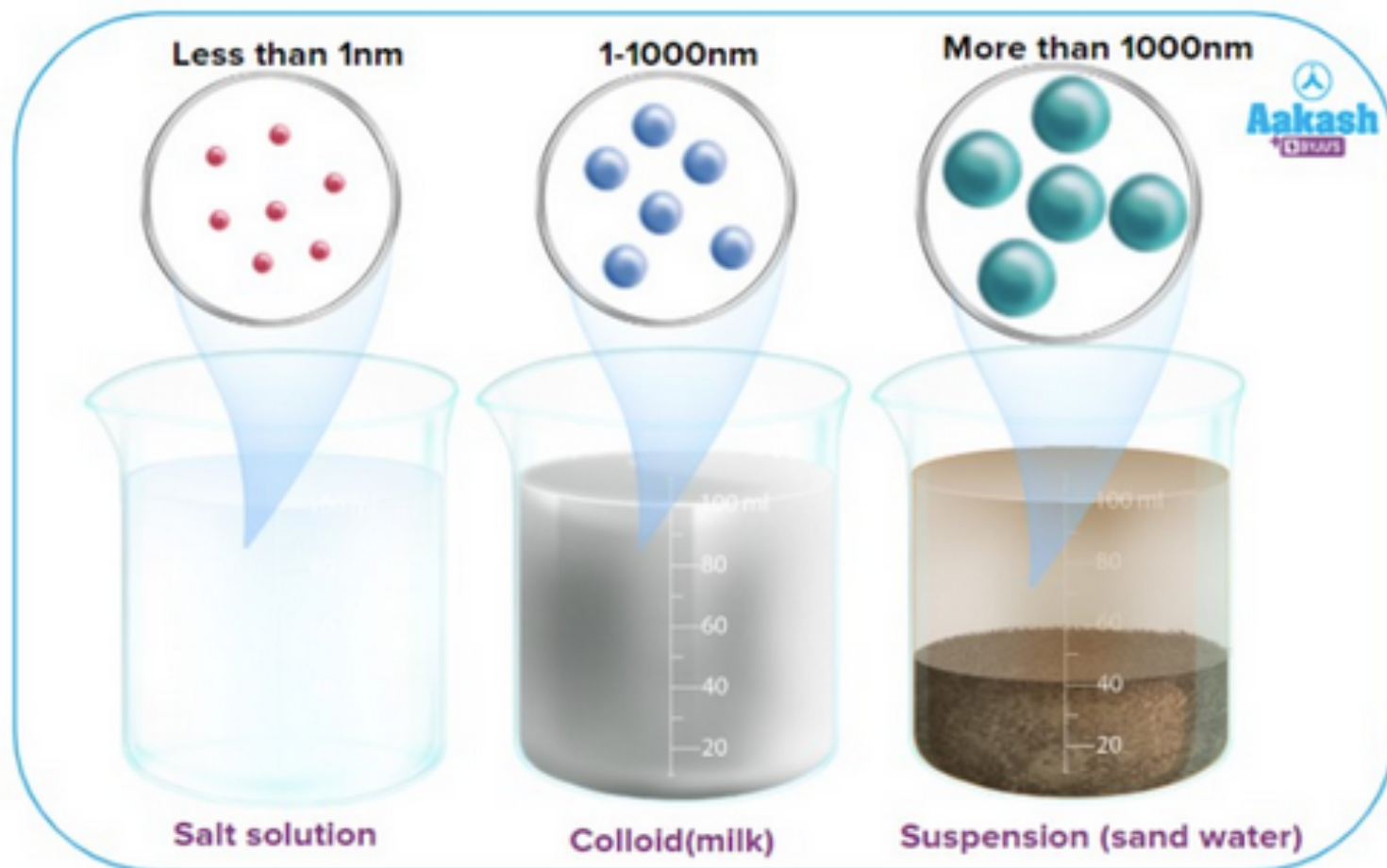
Sempre poco CBB in soluzione
(idrofobico e si lega preferenzialmente alle proteine piuttosto che al gel)

Soluzioni colloidali

$< 0.001 \mu\text{m}$

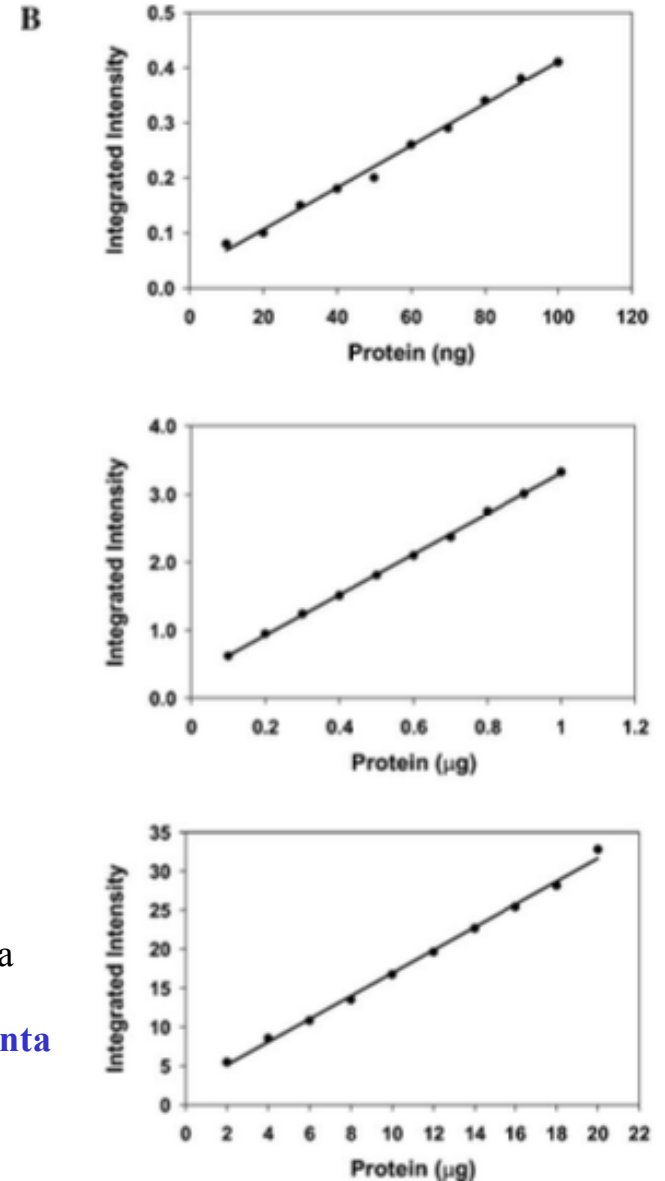
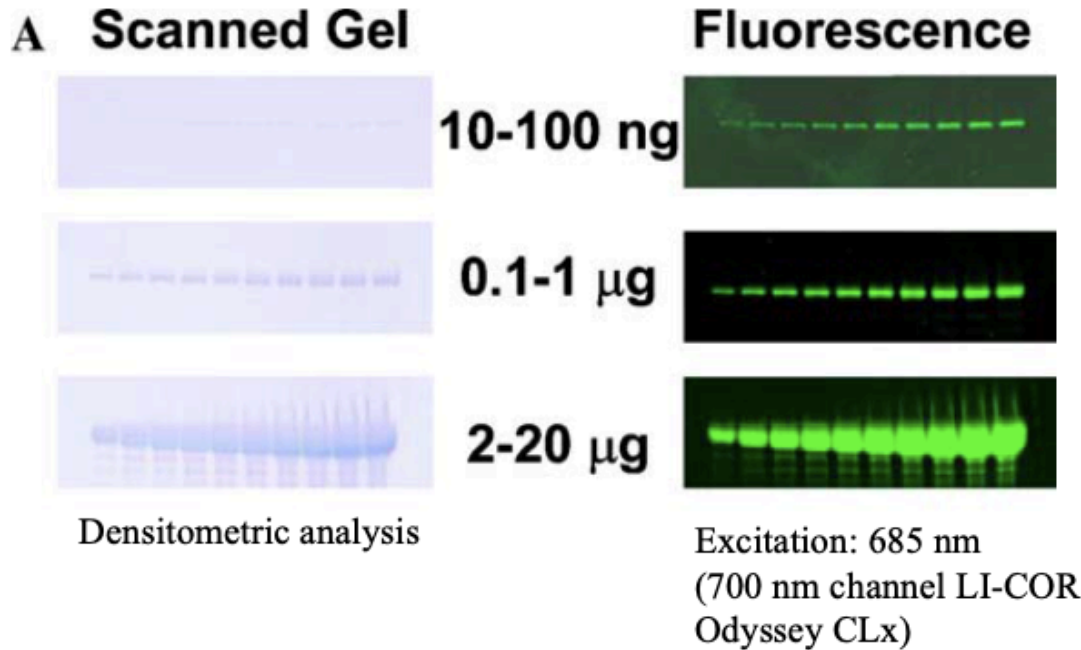
$0.001 \Rightarrow 1 \mu\text{m}$

$> 1 \mu\text{m}$



“Per un gel al $T=10\%$, il limite di esclusione per proteine globulari è circa 150-200 kDa. La dimensione dei pori non è univocamente definibile, ma la spaziatura media tra le catene polimeriche è dell'ordine di **pochi nanometri (3-10 nm).**” \Rightarrow **particelle colloidali sono lasciate fuori dal gel**

Blue Coomassie - densitometria vs. fluorescenza



IMPORTANTE:

Il BC diventa un fluoroforo quando legato alle proteine.

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

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

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

Convenzionale ca

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

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

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

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

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

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

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

(per 1L: 0.5 g di NDS)

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

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

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

- 10) 4 x 4 min in acqua
- 11) Sviluppo

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

- 12) 1-2 min Stop

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

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

MS - compatibile

Solutions

<i>Fix solution:</i>	5% Acetic Acid 30% Ethanol
<i>Sensitivity-enhancing solution:</i>	2 ml of 10% Thiosulfate per liter
<i>Silver stain solution:</i>	0.7 ml of 37% Formaldehyde 12.5 ml of 1 N Silver Nitrate per liter
<i>Development solution:</i>	30 g Anhydrous Potassium Carbonate 250 μ l of 37% Formaldehyde 125 μ l of 10% Thiosulfate per liter
<i>Stop solution:</i>	40 g of Tris 20 ml of Acetic Acid per liter

Protocol

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

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

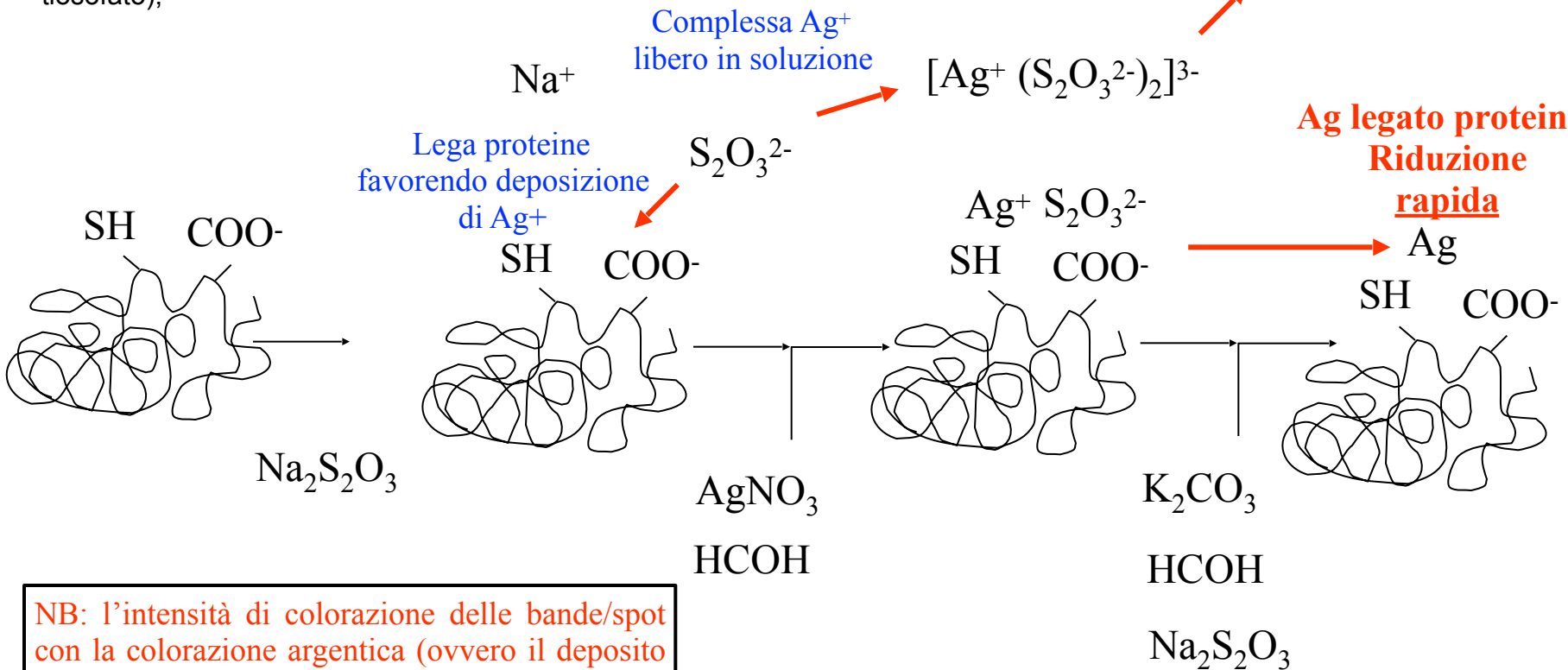
Argentica

Punti chiave in una colorazione argentica:

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

**Ag non legato proteine
ma complessato in soluzione:**

**Riduzione
molto lenta**



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

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

CBB + Argentica

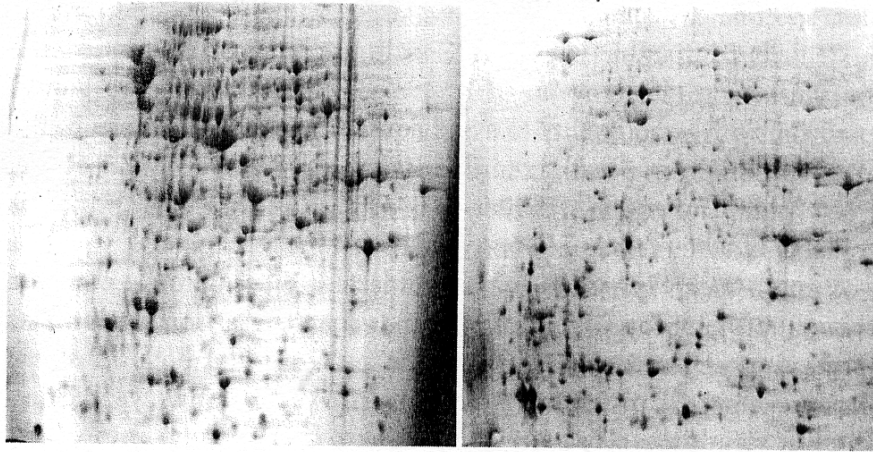


Fig. 39: 2-D electrophoresis of E.coli extract. 1st dimension: IPG 3–10 NL 24 cm, rehydration loading. 2nd dimension: SDS PAGE in 1 mm PPA gel 12.5 % T, 3% C. Left side: 1.2 mg protein, fast Coomassie staining; Right side: 180 µg protein, silver staining. A high number of proteins are stained with completely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

Comparazione tra CBB & Silver staining

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

Le proteine non si colorano tutte allo stesso modo.

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

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

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

CBB + Silver staining

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

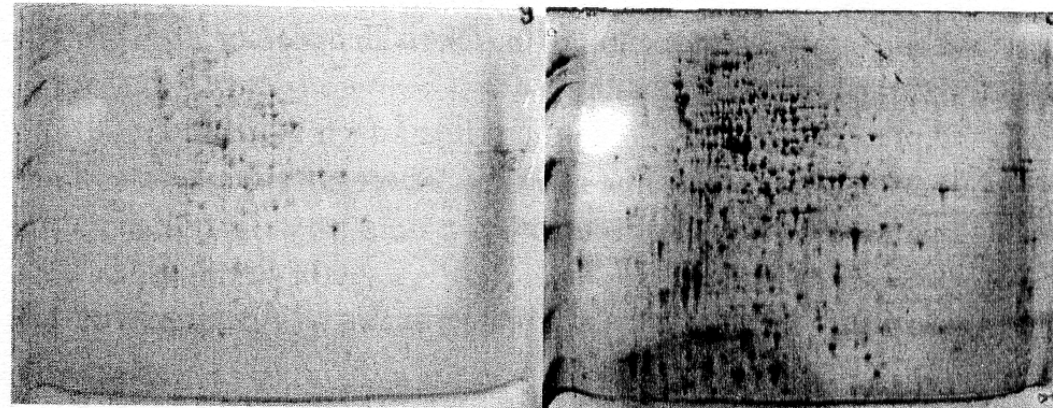


Fig. 40: 2-D electrophoresis of E.coli extract. 1st dimension: 24 cm IPG 3–10 L, rehydration loading of 180 µg protein. 2nd dimension: SDS PAGE

in 1 mm PPA gel 12.5 % T, 3% C. Left side: hot Coomassie staining; Right side: gel stained afterwards with silver.

2D-DiGE

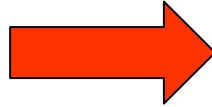
(2-D fluorescence difference gel electrophoresis)

La colorazione (labelling) avviene prima della corsa elettroforetica



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

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



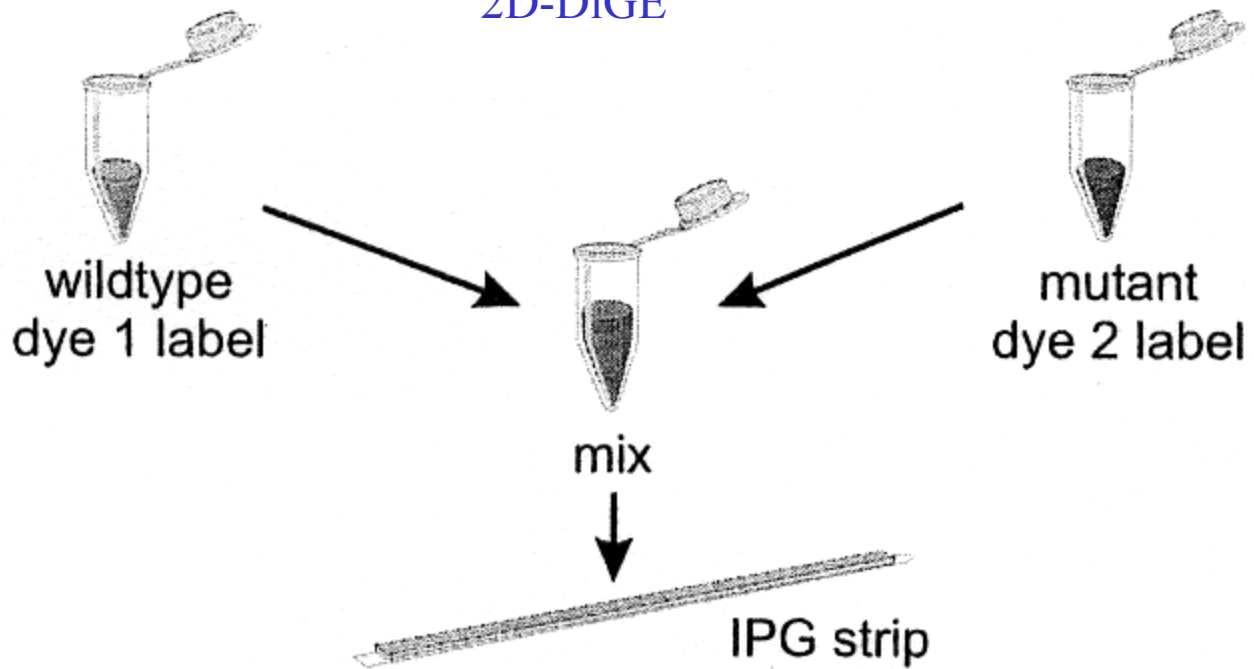
Separazione proteine tramite 2D gels

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



Visualizzazione mediante speciali scanner

2D-DiGE



2-D electrophoresis in one gel

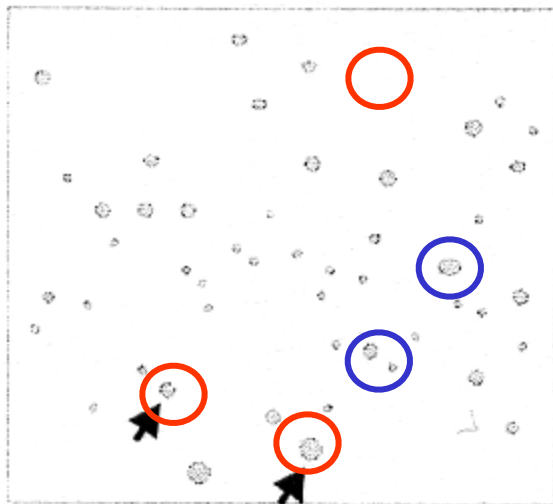


image of dye 1

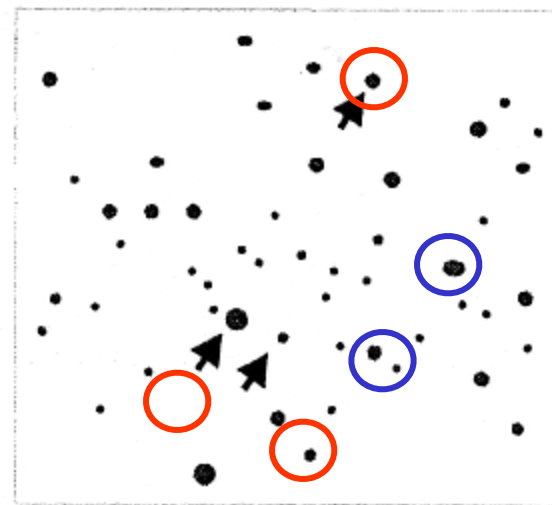
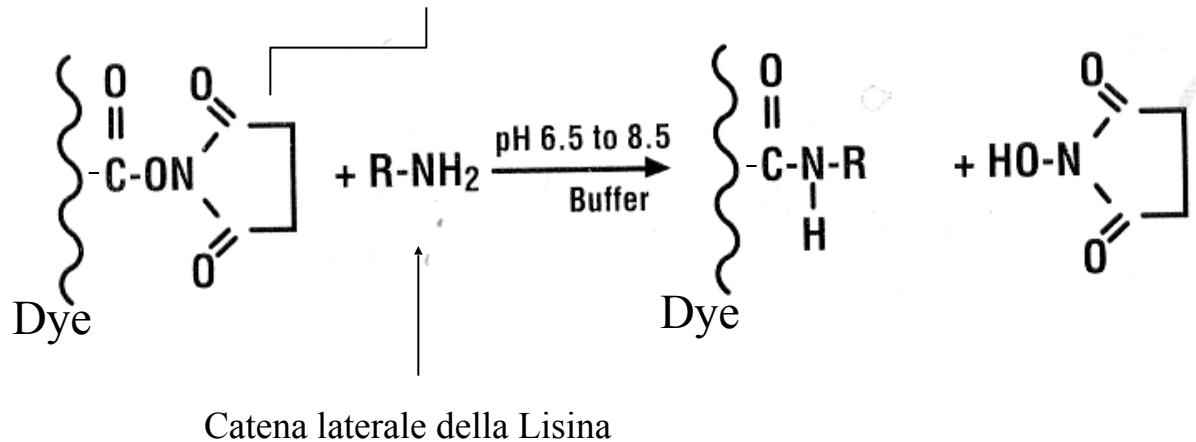


image of dye 2

2D-DiGE e marcatura in genere di proteine con un fluoroforo

Gruppo reattivo: N-idrossisuccinimide



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

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

Cy3: ecc: 532 - emiss: 580

Cy5: ecc: 633 - emiss: 670

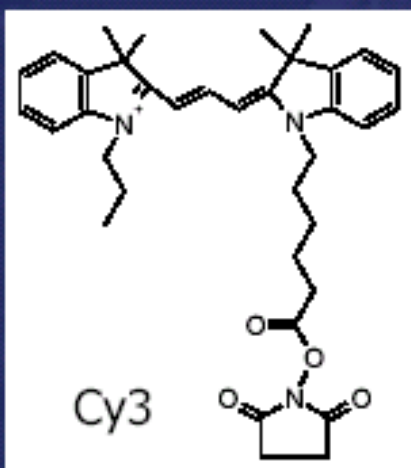
Cy2: ecc: 488 - emiss: 520

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

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

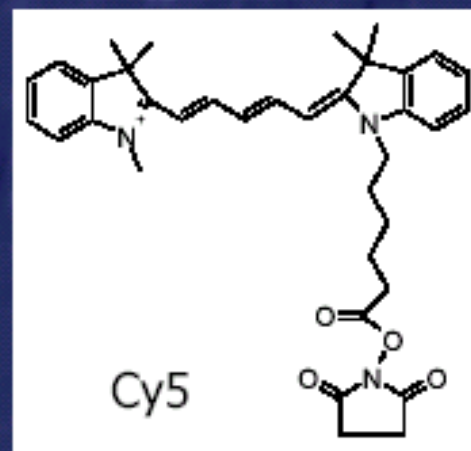
Methodology

Sample A



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

Sample B



Mix



Two-dimensional electrophoresis

Two-dimensional difference gel electrophoresis

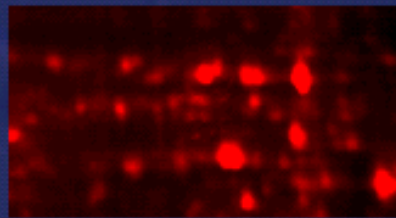
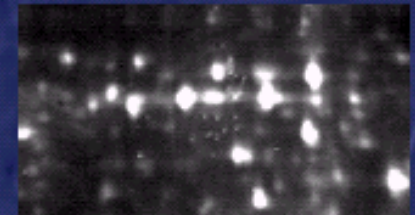
Methodology (2)



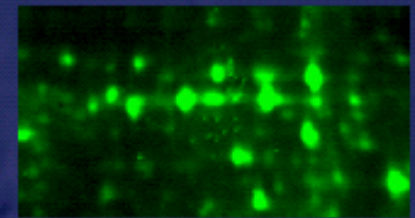
Cy3
←
Sample A



Cy5
→
Sample B

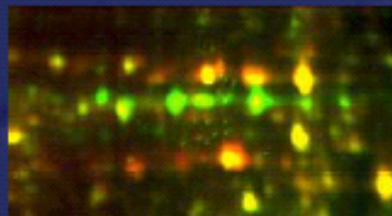


Red: sample A



Green: sample B

Yellow: no difference



2D-DiGE - Utilizzo dello standard interno - controllo della qualità analisi

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

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

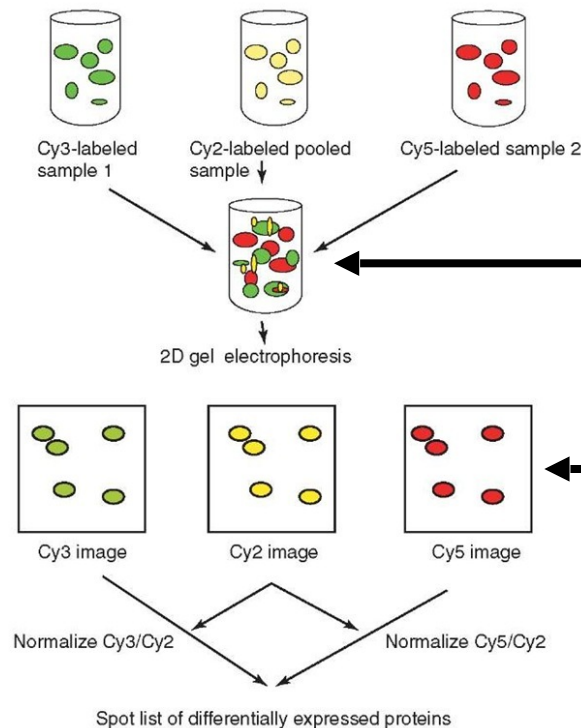
Ipotizziamo di dover comparare 6 campioni tra loro: A, B, C, D, E, ed F.

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

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

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

Questo standard interno viene marcato di solito con Cy2 e viene sempre corso assieme ad altri due campioni marcati rispettivamente con Cy3 e Cy5. Essendo lo standard interno uguale e corso in tutti i gel, esso ci darà ragione della variabilità tecnica e rappresenterà il modo di normalizzare il campione (sarà l'intensità degli spot dello standard interno che ci permetterà di normalizzare).



Lo Standard interno viene corso assieme ai singoli campioni. In teoria esso è rappresentativo di tutte le proteine presenti nei singoli campioni

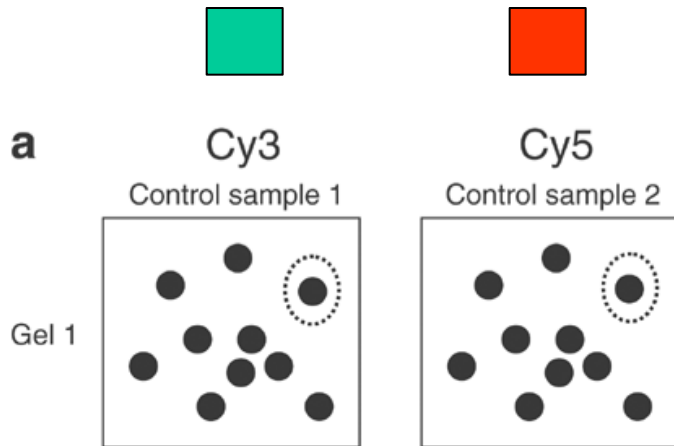
Lo Standard interno subisce tutte le "alterazioni" che subiscono in quel gel i campioni marcati con Cy3 e Cy5 dato che le condizioni sperimentali sono le stesse.

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

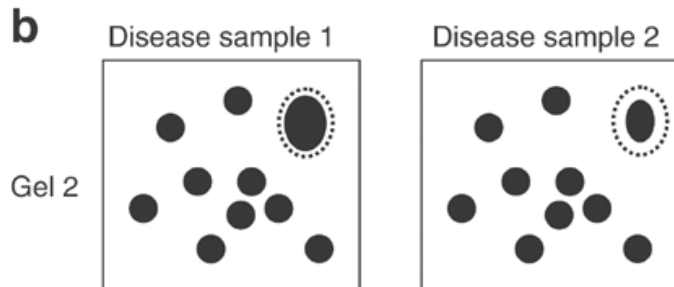
2D-DiGE - Utilizzo dello standard interno

Interpretazione dei risultati:

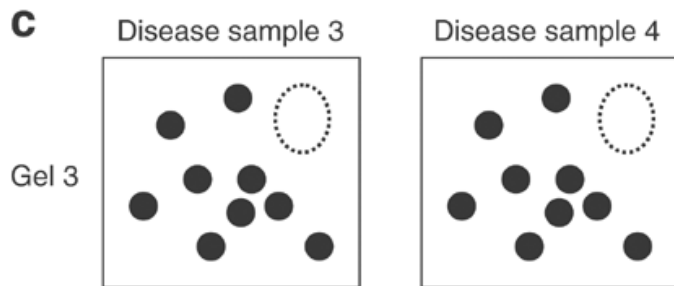
Analizziamo i dati focalizzandoci sulla proteina cerchiata. Il risultato dei gel sembra indicarci che nel Disease sample 1 e 2 la proteina sia up regolata rispetto ai controlli e che nei disease sample 3 e 4 essa invece non venga espressa.



Proteina uguale - i.e 100, 100



Proteina up - i.e 200, 150



Proteina down - i.e. 0, 0



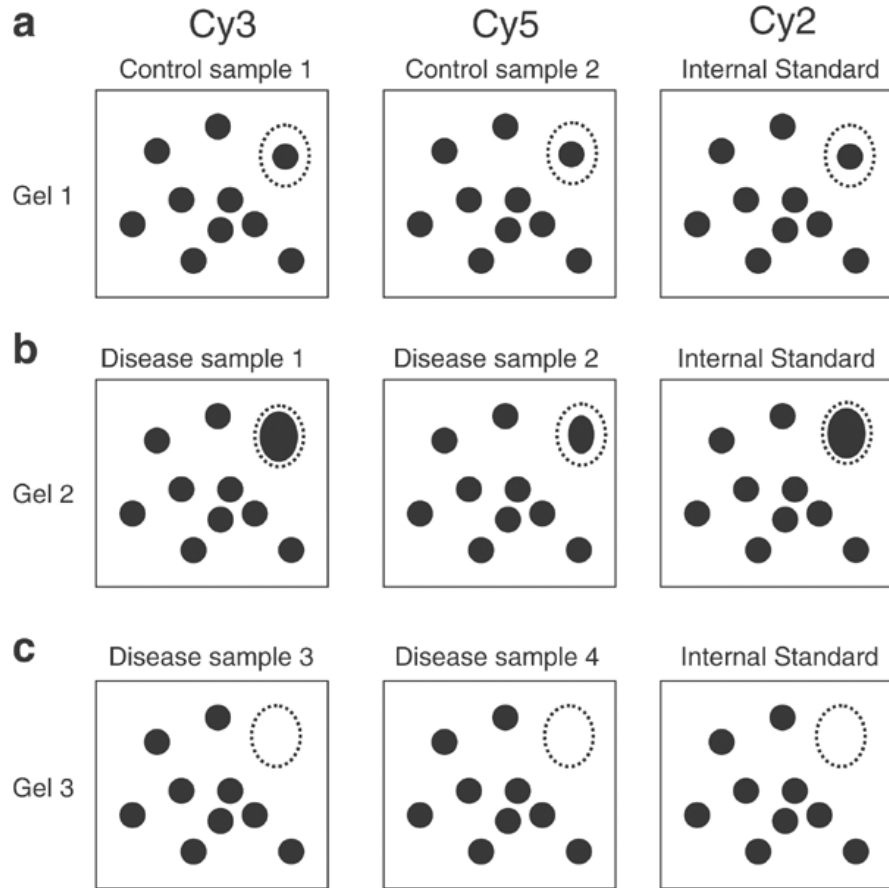
NB: numeri indicanti l'intensità dello spot del tutto arbitrari

2D-DiGE - Utilizzo dello standard interno



Interpretazione dei risultati:

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



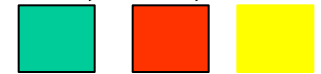
Proteina uguale - i.e 100, 100, 100



$$CS1: 100/100=1$$

$$CS2: 100/100=1$$

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



$$DS1: 200/200=1$$

$$DS2: 150/200=0.75$$

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

“persa per motivi tecnici”

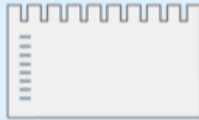


NB: numeri indicanti l'intensità dello spot del tutto arbitrari

STAIN-FREE - BIORAD

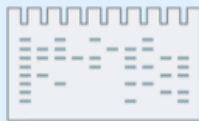
The trihalo compounds in the gels **react** with **tryptophan** residues in a UV-induced reaction to produce fluorescence (enhance TRP fluorescence properties), which can be easily detected by the Gel Doc EZ imager within gels or on low-fluorescence PVDF membranes. Activation of the trihalo compounds in the gels adds 58 Da moieties to available tryptophan residues and is required for protein visualization. **Proteins that do not contain tryptophan residues cannot be detected using this system.** The sensitivity of the Criterion Stain Free system is comparable to staining with Coomassie Brilliant Blue for proteins with a tryptophan content $>1.5\%$; sensitivity superior to Coomassie staining is possible for proteins with a tryptophan content $>3\%$. Proteins are labelled and can be visualized in the gels or after WB transfer.

Electrophoresis

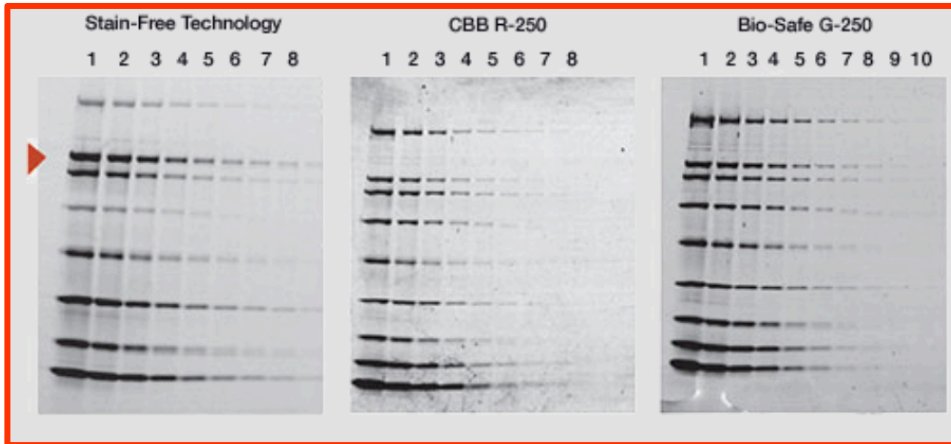


Activation

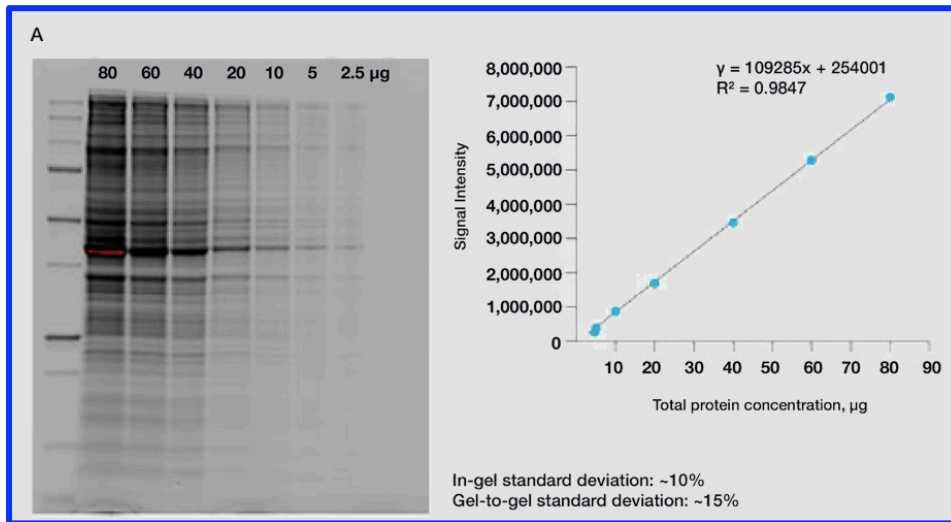
UV 1-5 min



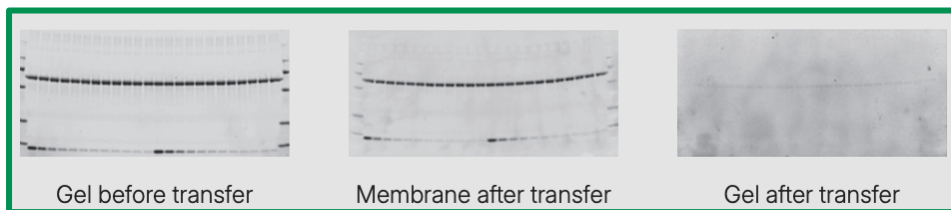
STAIN-FREE - BIORAD



Sensibilità simile al CBB
colloidale (CCB G250)



Lineare su ampio range



Possibilità di visualizzare le
proteine sul gel pre- e post-
trasferimento e anche su
membrana con stesso metodo