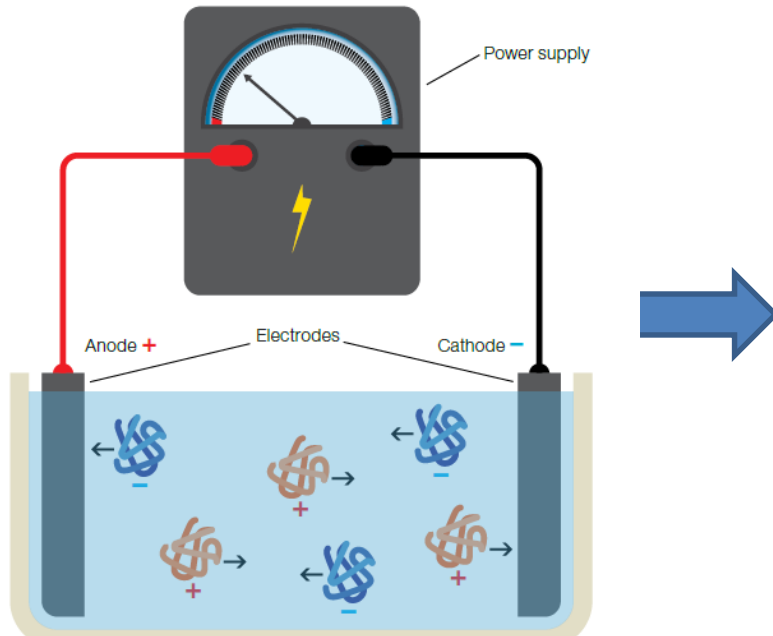


# Elettroforesi

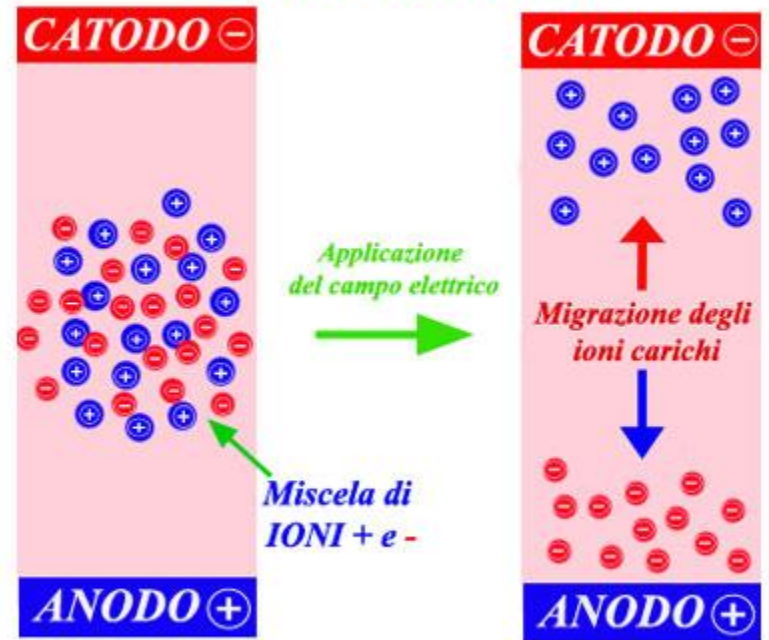
Tecniche che permettono di separare diverse macromolecole cariche tramite l'applicazione di un campo elettrico.

## Apparato elettroforesi



Fonte: Internet

## ELETTROFORESI



Utilizzata in biochimica e biologia molecolare per lo studio di proteine ed acidi nucleici (DNA ed RNA).

Metodica sia **qualitativa** che **quantitativa**.

# Principi Generali

Una molecola carica si sposta in un campo elettrico con una velocità proporzionale alla sua densità di carica, dimensione e forma secondo la legge:

$$v = \frac{E * q}{f}$$

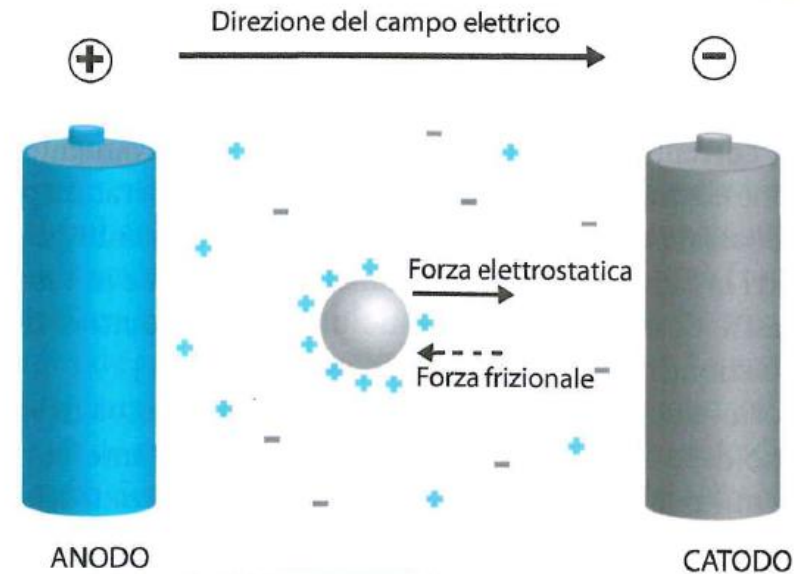
In cui:

v = velocità

E = gradiente di potenziale

q = carica

f = coefficiente di frizione →  
dipende da dimensioni e forma  
della molecola e dalla  
viscosità/costante dielettica del  
mezzo



In genere, al posto della velocità si usa la mobilità elettroforetica:

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{f}$$

Esprime *la tendenza di una molecola carica a muoversi all'interno di un campo elettrico applicato*.

Dipende da:

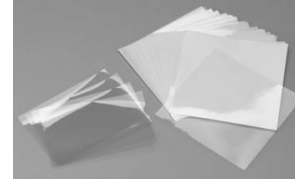
- Carica;
- Dimensione;
- Viscosità del mezzo.

In condizioni definite, la mobilità elettroforetica è una proprietà intrinseca di una molecola → si può utilizzare per analizzare molecole diverse.

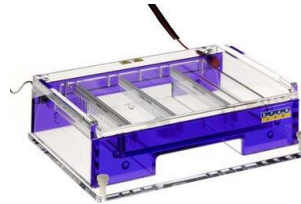
## Supporti usati in elettroforesi:

Fonte: Internet

- Acetato di cellulosa



- Gel di agarosio



- Gel di poliacrilammide (PAGE)

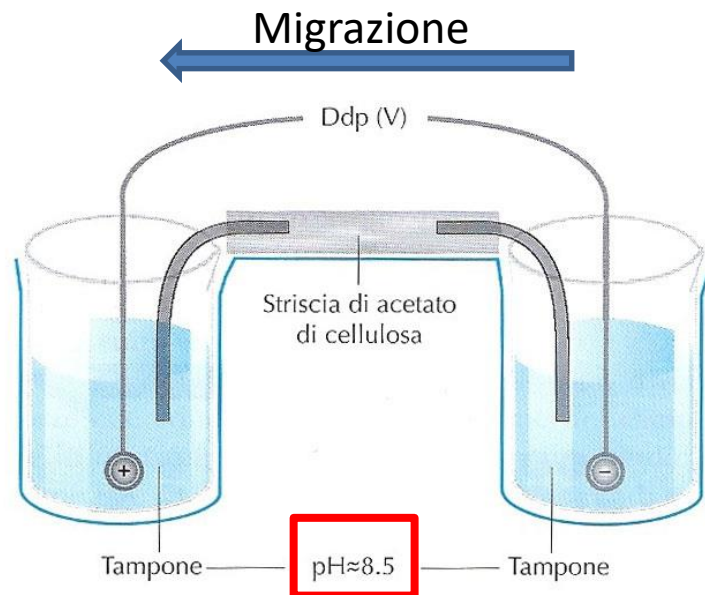


**Agiscono da setacci molecolari!!!**

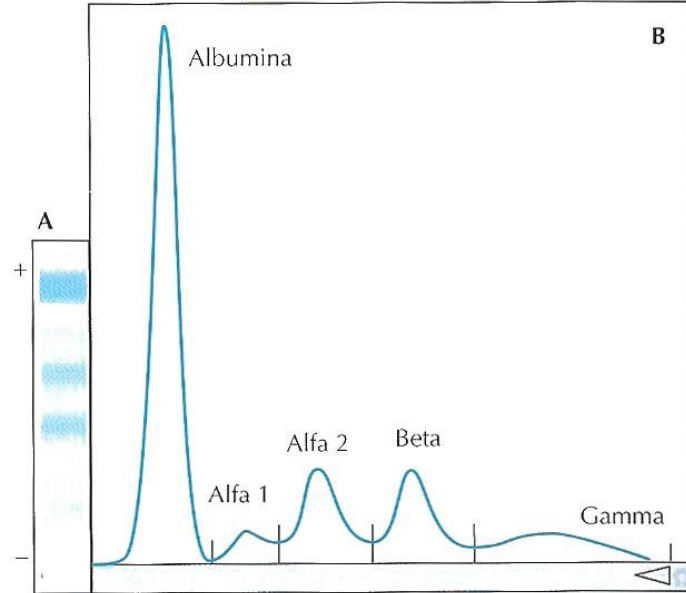
# Acetato di Cellulosa

Matrice inerte superiore alla semplice cellulosa, perché non presenta fenomeni di adsorbimento.

Utilizzato soprattutto in **ambito clinico** per la separazione delle proteine del siero (porzione liquida del sangue dopo eliminazione parte corpuscolata e proteine coagulazione).



# ESEMPIO DI TRACCIATO ELETTROFORETICO DELLE PROTEINE DEL SIERO



Frazione elettroforetica	Intervallo di riferimento
Albumina	52.0÷69.0%
Alfa-1-globuline	1.0÷6.0%
Alfa-2-globuline	4.5÷14.0%
Beta-globuline	7.0÷14.0%
Gamma-globuline	9.0÷20.0%
Rapporto albumina/globuline	1.22÷2.23

Fonte: Biochimica Applicata, Edises, 2012

Primo picco: Albumina

Secondo picco:  $\alpha$ 1-globuline (alfa-1-antitripsina)

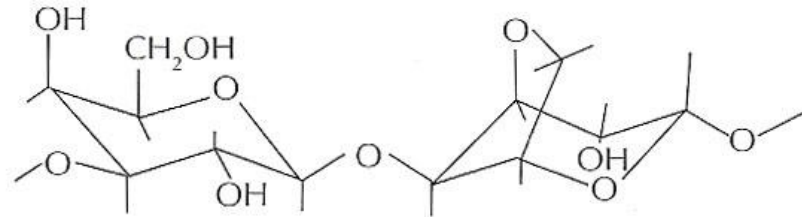
Terzo picco:  $\alpha$ 2-globuline (alfa-2-macroglobulina, aptoglobina)

Quarto picco:  $\beta$ -globuline (transferrina, complemento frazione C3)

Quinto picco:  $\gamma$ -globuline (IgG, IgA, IgM)

# Gel di Agarosio

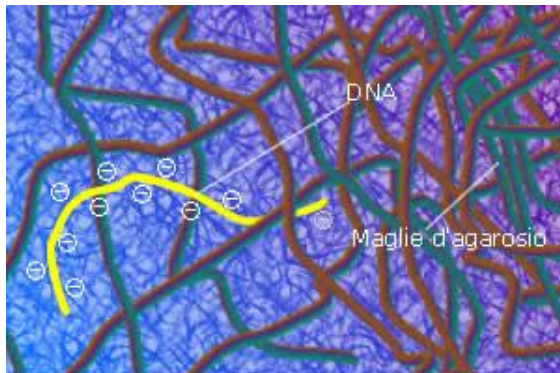
Miscela di due polimeri: **agarobiosio** e **agaropectina**.



Fonte: Internet

E' insolubile in acqua a temperatura ambiente → per scioglierlo bisogna aumentare la temperatura fino all'ebollizione.

**Gelificazione** → formazione di legami idrogeno tra le diverse catene polisaccaridiche.



Campo elettrico  
- ————— +

Fonte: Internet

Durante la gelificazione, si formano dei «**pori**» nel gel (invisibili) la cui dimensione è **inversamente proporzionale** alla **concentrazione di agarosio**.



Utilizzato per l'analisi di macro-complessi proteici ed ***acidi nucleici***.

- Ottimo metodo per la separazione delle proteine del siero → buona risoluzione della regione gamma.
- DNA ed RNA a  $\text{pH} > 4$  hanno carica negativa → hanno mobilità anodica e perciò si separeranno solo in base alla dimensione.

### **Metodi di visualizzazione (DNA ed RNA):**

DNA (doppio filamento) ed RNA nativo → etidio bromuro (intercalante delle basi accoppiate, fluorescente)

# Gel di Poliacrilammide

Diversi **vantaggi**:

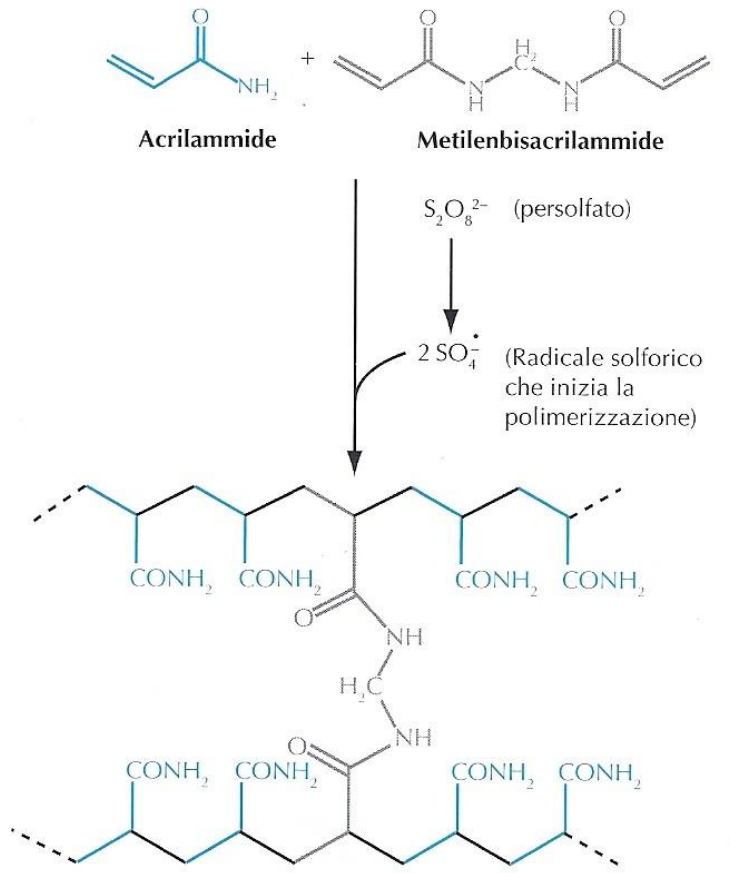
- Elevato potere di risoluzione di proteine ed acidi nucleici di piccole/medie dimensioni.
- Minime interazioni con la matrice delle molecole.
- Buona stabilità fisica del gel.
- Studio di proteine in conformazione *nativa* o *denaturante*.

Sfrutta sia la diversa mobilità elettroforetica che «*l'effetto setaccio*» del gel (separazione per peso molecolare).

Come si ottiene un gel di poliacrilammide?!?!?

Polimerizzazione di **acrilammide** ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) con **N,N'-metilen-bisacrilammide** ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ), responsabile della formazione di legami crociati.

Segue uno schema di **polimerizzazione radicalica**: attivazione – propagazione – terminazione.



Fonte: Biochimica Applicata, Edises, 2012

**Ammonio persolfato** → catalizzatore  
**TEMED** (N,N,N,N-tetrametiletilendiammina)  
→ iniziatore.

Il TEMED decompone lo ione persolfato con formazione del radicale solforico ( $\text{SO}_4^{\cdot -}$ ) [Attivazione].

Il radicale trasferisce l'elettrone spaiato sulla catena nascente di acrilammide, diventando radicale → innesca il processo di polimerizzazione [Propagazione].

La reazione termina con l'accoppiamento di 2 catene polimeriche in crescita [Terminazione].

La porosità del gel varia in base alla concentrazione di acrilammide e metilen-bisacrilammide.

Gel a bassa %acrilammide → pori grandi, meno restrittivi per proteine grandi.

Gel ad alta %acrilammide → pori piccoli, difficile entrata proteine grandi; buona separazione proteine piccole.

%T	Range di pesi molecolari (Da) di proteine che possono essere separate
5	da 25 000 a 300 000
10	da 15 000 a 100 000
15	da 12 000 a 50 000

Gel a **gradiente di concentrazione**: concentrazione acrilammide da 5% a 25% → dimensione dei pori diminuiscono progressivamente.

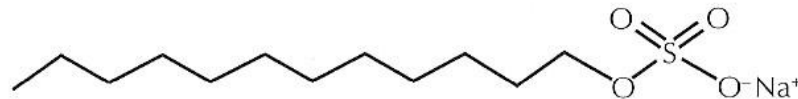
Migliore risoluzione proteine a basso PM.

# Elettroforesi su gel di Poliacrilammide in presenza di SDS (SDS-PAGE)

**SDS-PAGE:** PolyAcrilammide Gel Electrophoresis in SDS

Uno dei metodi più usati per separare le proteine in base al peso molecolare e determinare il loro PM apparente.

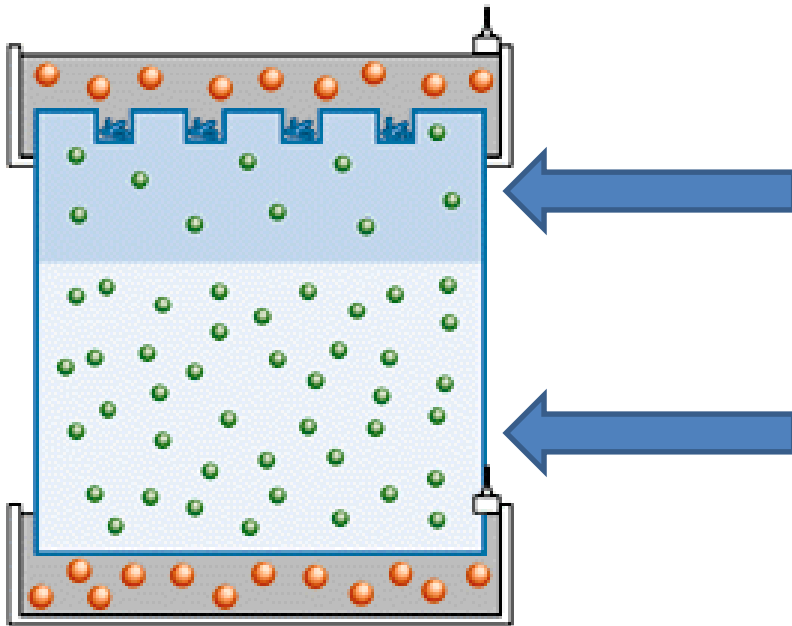
**SDS:** Sodio Dodecil Solfato, detergente anionico (denaturante).



Fornisce alla proteine una carica negativa costante per unità di massa.

Due tipi di gel:

- *Stacking gel*
- *Running gel*



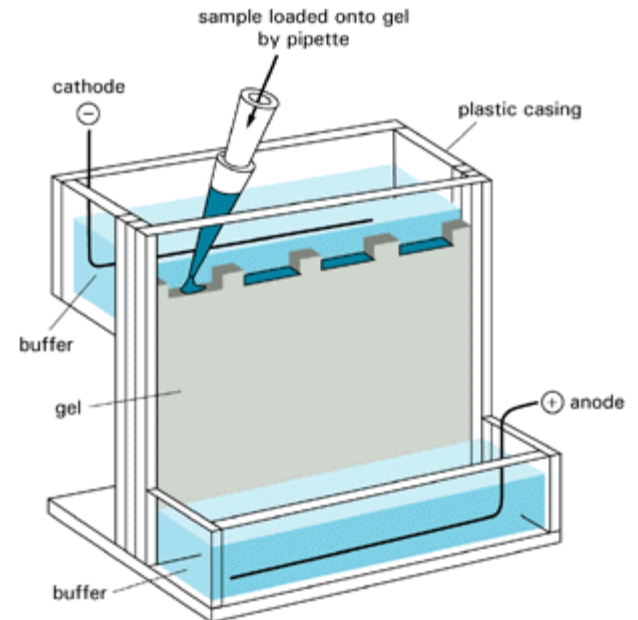
Fonte: Internet

**Stacking gel:** gel di impaccamento. Concentrazione di acrilamide inferiore a quello di corsa (5%); tampone a pH 6.8.  
*Funzione:* concentra i campioni in bande.

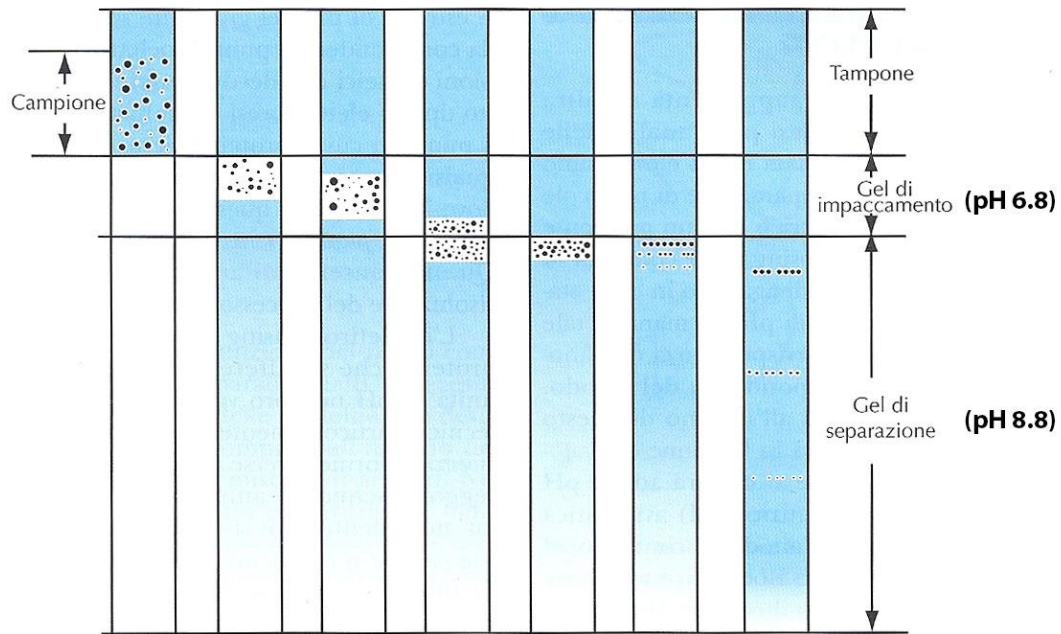
**Running gel:** gel di corsa. Concentrazione di acrilamide variabile; tampone a pH 8.8.  
*Funzione:* separare i campioni

**Loading buffer:** Tris-HCl pH 6.8 + Glicerolo +  $\beta$ -mercaptoetanol (o DTT) + SDS + blu bromofenolo.

**Tampone di corsa:** Tris-Glicina-SDS pH 8.3.



Fonte: Internet



Fonte: Biochimica Applicata, Edises, 2012



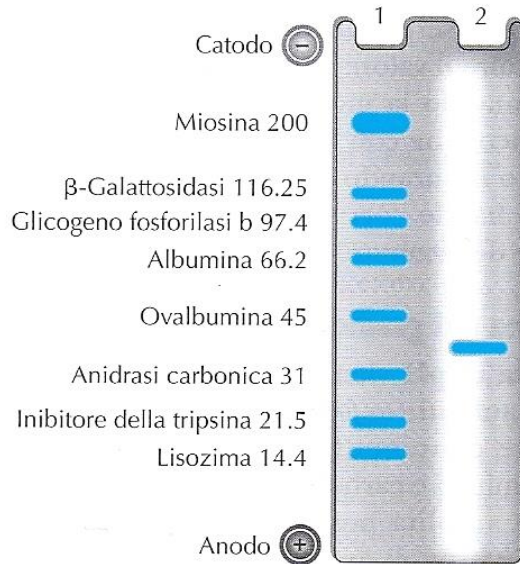
## Colorazione

- Blue di Coomassie
- Nitrato d'Argento
- Coloranti fluorescenti



Fonte: Internet

# Determinazione peso molecolare apparente



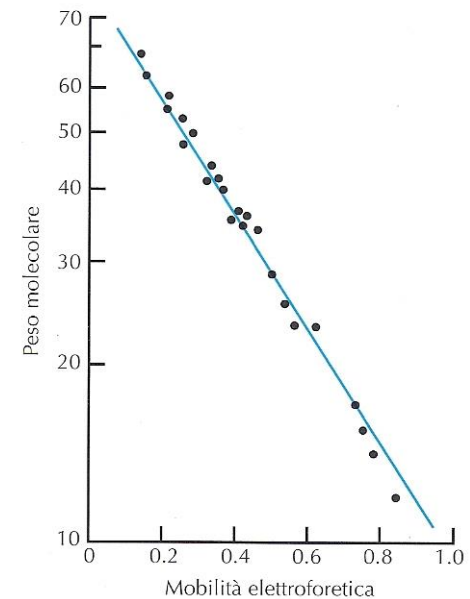
Fonte: Internet

**Apparente?** Le proteine possono migrare in modo anomalo a causa di modifiche post-traduzionali o in base a loro caratteristiche.

Il PM si determina utilizzando proteine standard (marker) a PM noto.

Esiste una relazione **lineare** tra **logaritmo del PM** e **mobilità elettroforetica relativa**.

**Mobilità elettroforetica relativa:** «calcolata» dal rapporto tra distanza percorsa dalla proteina incognita e del tracciante.



Fonte: Biochimica Applicata, Edises, 2012



# Isoelettrofocusing

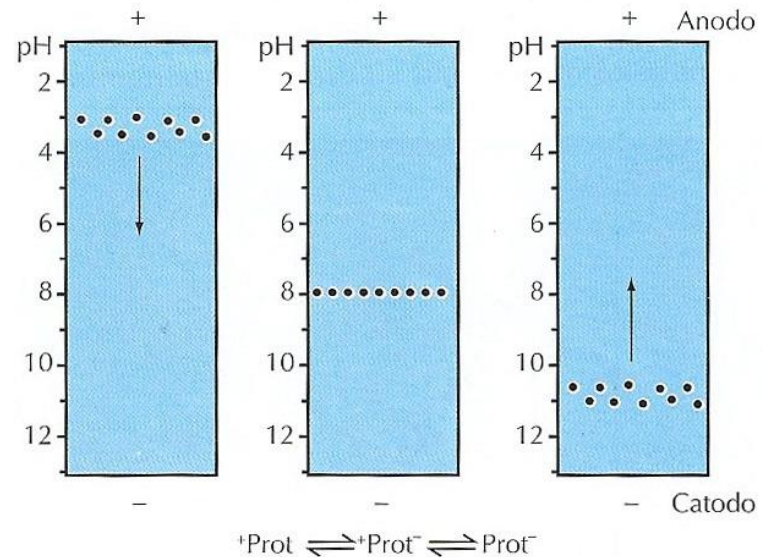
Sfrutta la separazione di molecole all'interno di un campo elettrico e di un gradiente di pH.

Viene utilizzata per separare le proteine in base al **punto isoelettrico** → pH a cui le proteine hanno una carica netta pari a **zero**.

$\text{pH} > \text{pI} \rightarrow$  carica negativa

$\text{pH} < \text{pI} \rightarrow$  carica positiva

$\text{pH} = \text{pI} \rightarrow$  carica = 0, la proteina non migra.



**Permette la separazione di proteine differenti ma simili in peso molecolare.**

# Western Blotting

Permette di trasferire proteine da un gel ad una membrana immobilizzante (nitrocellulosa o PVDF [PolyVinylDiFluoride]) → le proteine si legano alla membrana per interazioni idrofobiche o elettrostatiche.

Mediante reazione con un anticorpo specifico è possibile identificare una determinata proteina.

