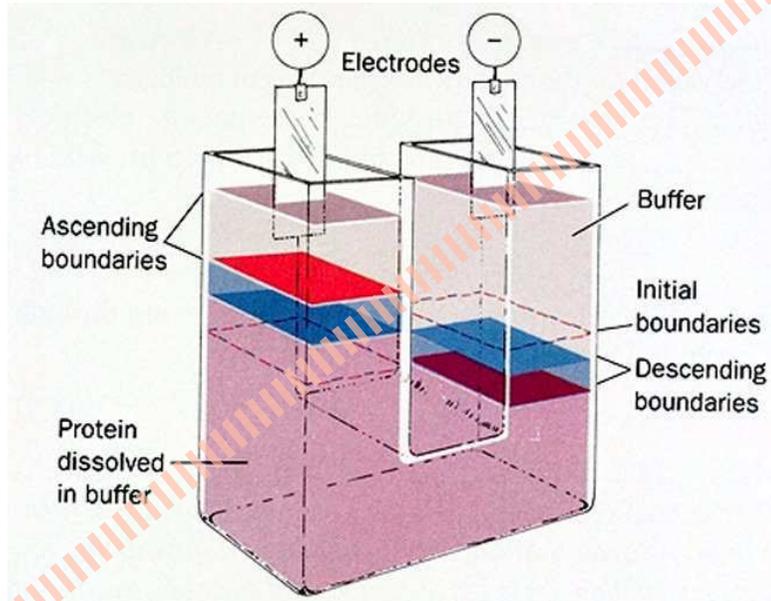


# ELETTROFORESI

Electron = ambra + phoresis = trasporto

I greci chiamavano l'ambra *electron* per le sue proprietà di accumulare elettricità statica dopo sfregamento

Migrazione di particelle  
sotto l'influenza di  
un campo elettrico



## Primo sistema elettroforetico: Elettroforesi in fase libera (Tiselius, 1937)



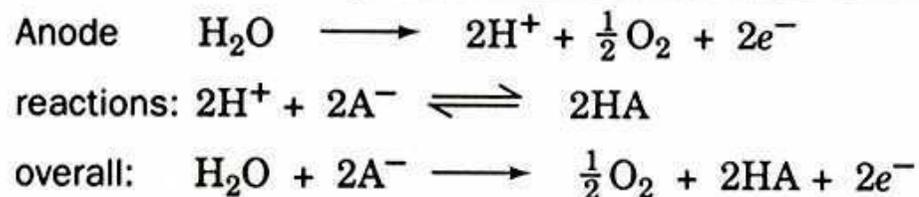
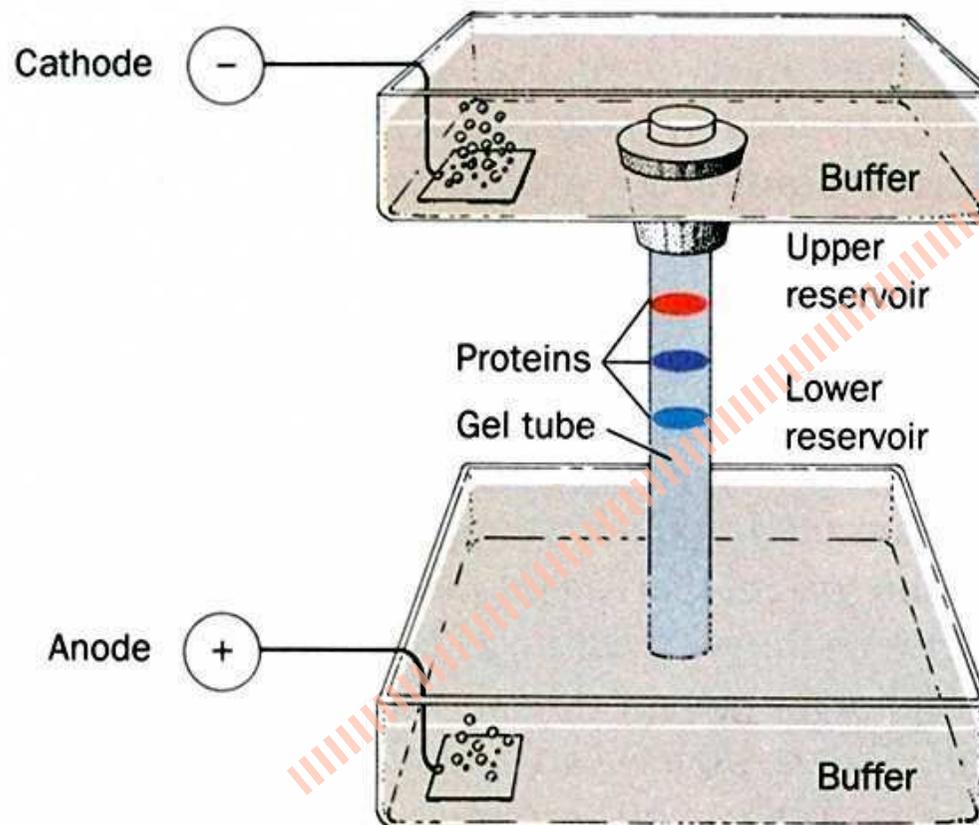
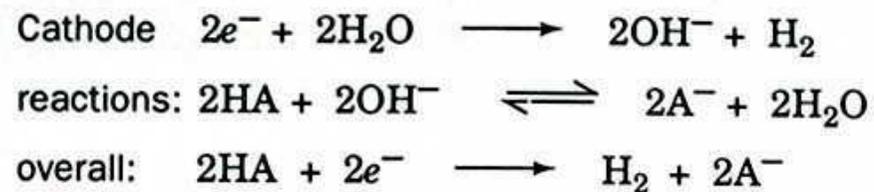
**Arne Wilhelm Kaurin Tiselius**

1902-1971

Nobel per la Chimica 1948  
per gli studi sull'elettroforesi  
e le proteine del plasma

1. Proteine in soluzione
2. Elevata velocità di migrazione
3. Scarsa risoluzione (diffusione, moti convettivi)
4. Sviluppata oggi nella elettroforesi capillare

# Elettroforesi: reazioni agli elettrodi



# Velocità di migrazione, $v$

Dipende:

- direttamente dalla carica della particella,  $q$  (in coulomb);
- direttamente dal campo elettrico,  $E$  (in volt  $\text{cm}^{-1}$ );
- inversamente al coefficiente d'attrito,  $f$

$$v = \frac{qE}{f} = \frac{qE}{6\pi\eta r_p}$$

# Esempi di elettroforesi

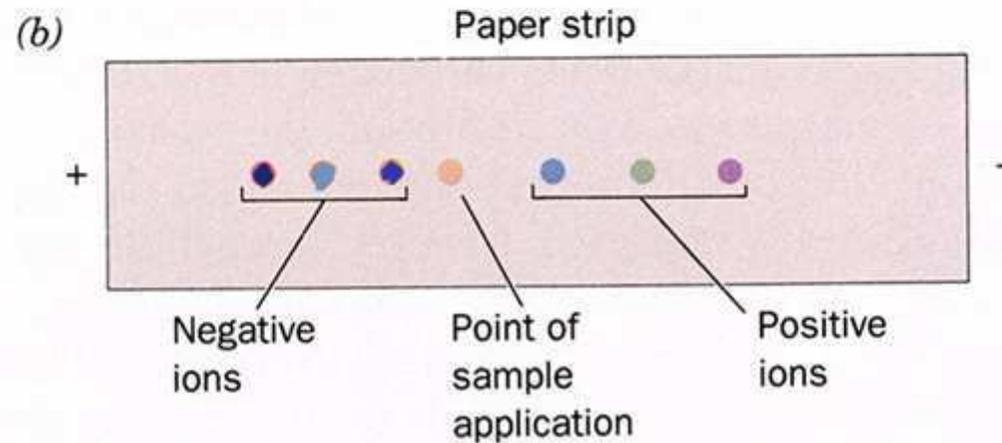
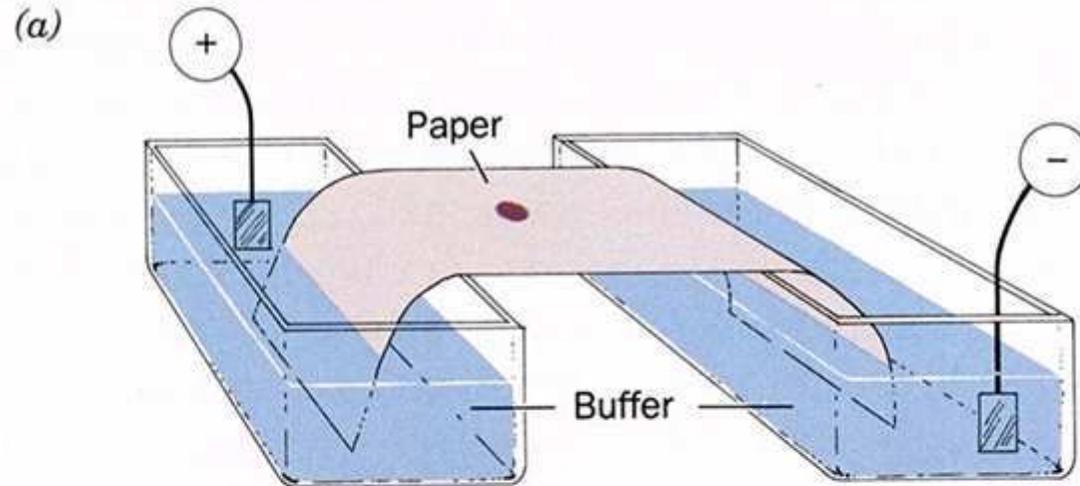
# Elettroforesi su carta

Corsa in tampone alcalino (es pH 8.7)

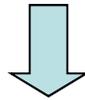
Corsa: 200 V per 30 min

Fissaggio in acido

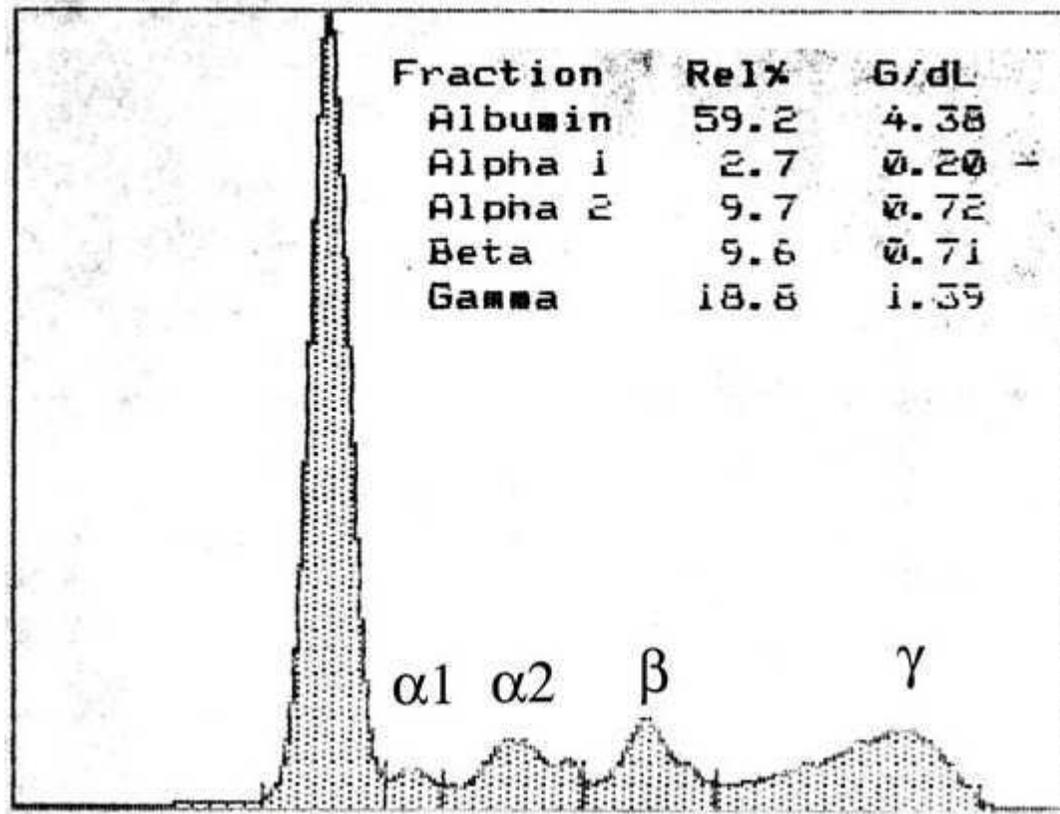
Colorazione:  
es. amido black



# Proteine del siero

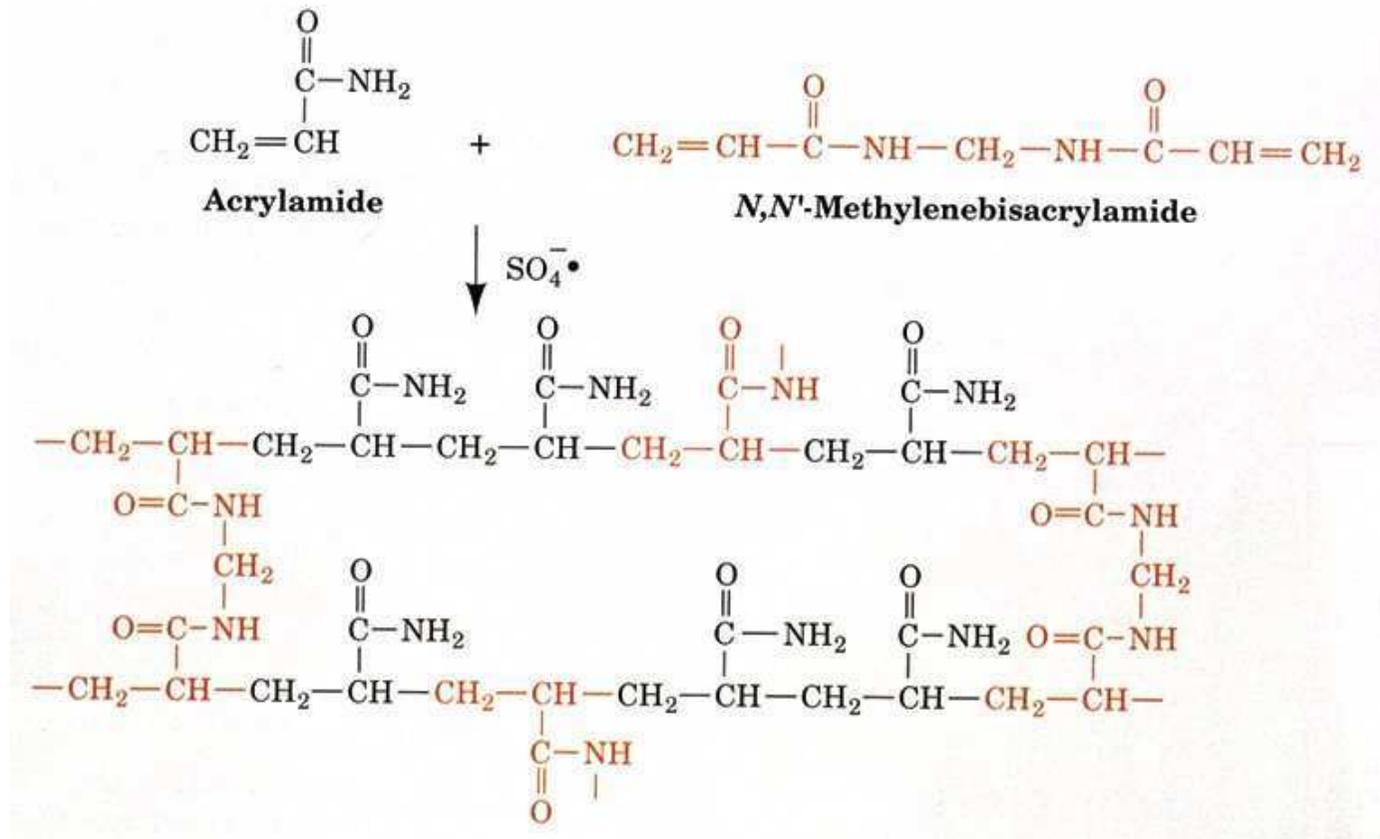


Scanner o densitometro a trasmissione

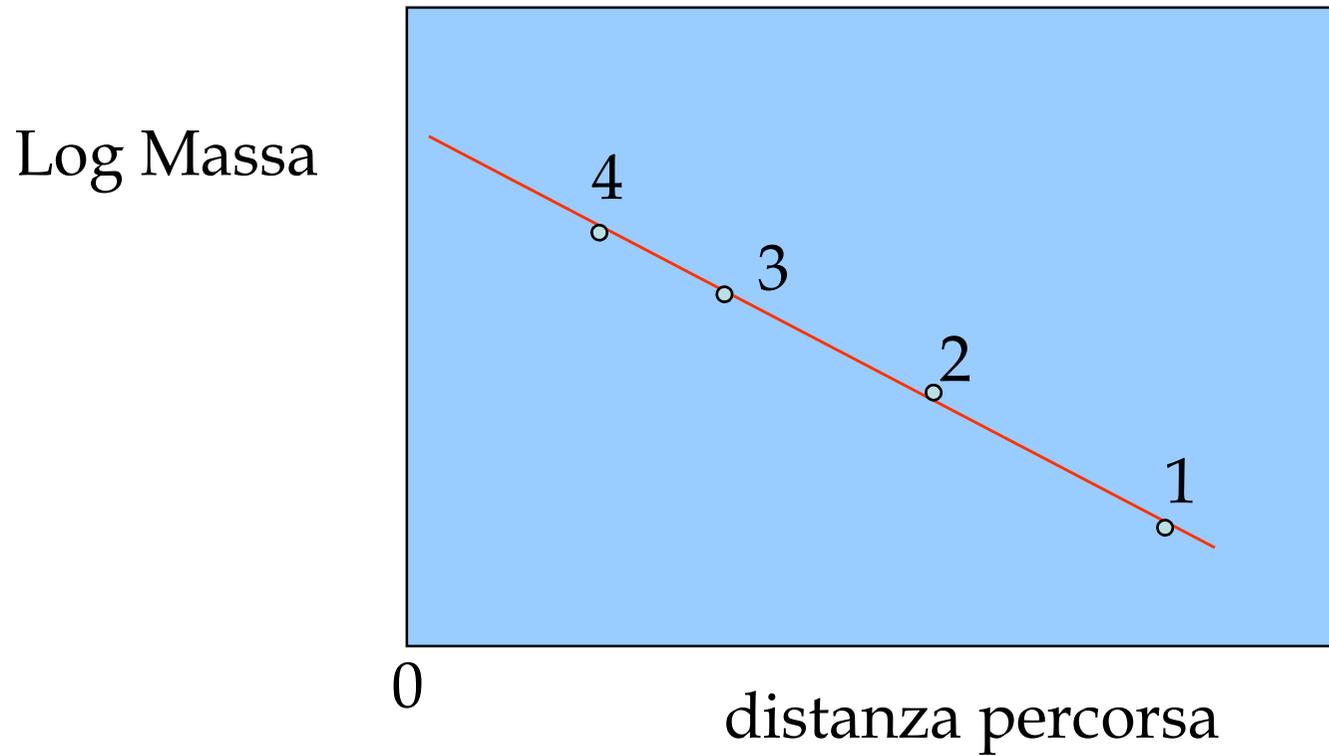


valori normali %  
55 - 64  
2.3 - 4.5  
7-9  
14 - 18  
9 -13

# Elettroforesi su matrice setacciante



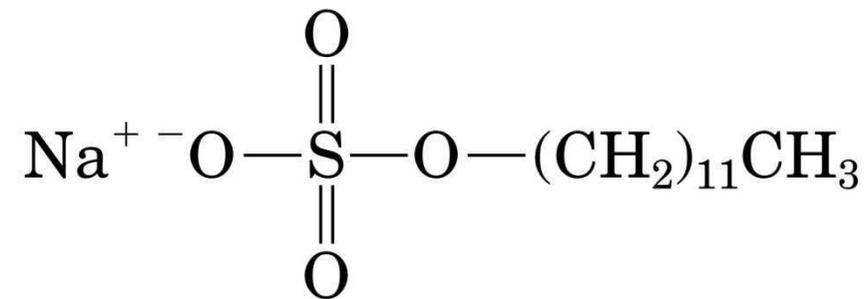
## Grafico di Ferguson (peptidi artificiali)



Se il rapporto carica/massa è costante l'andamento è lineare

# SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

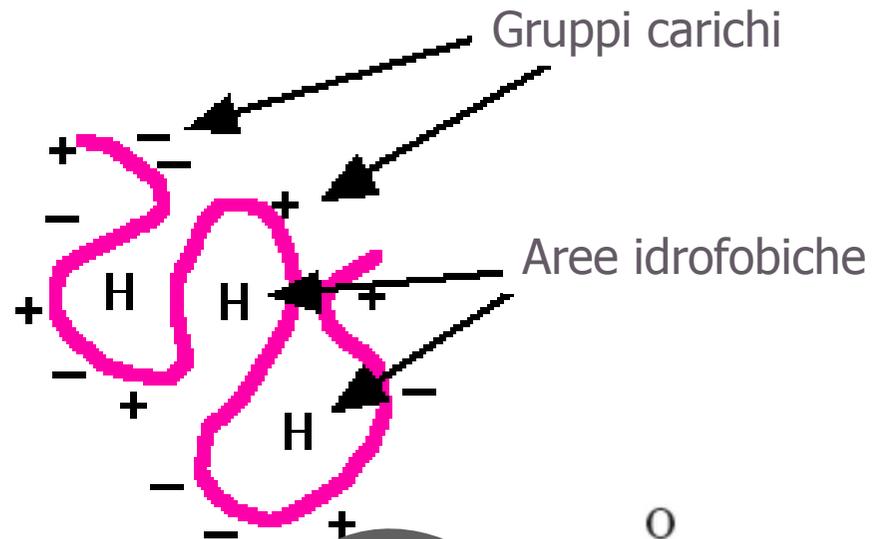
l' SDS consente di mantenere costante il rapporto carica/massa



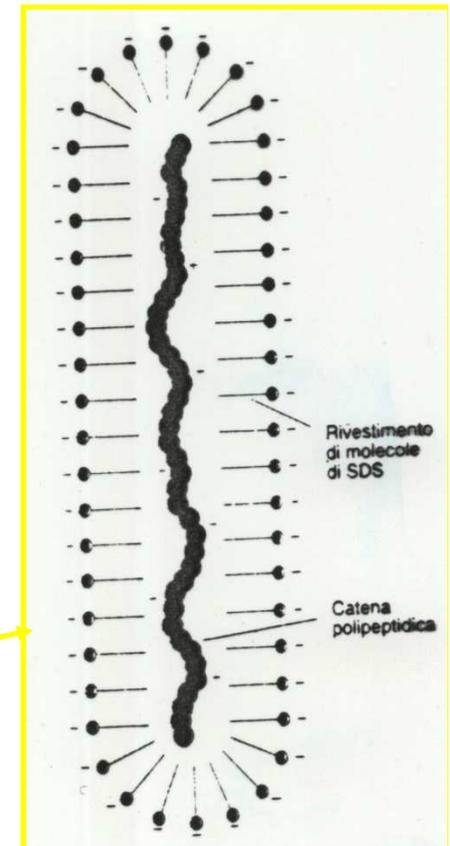
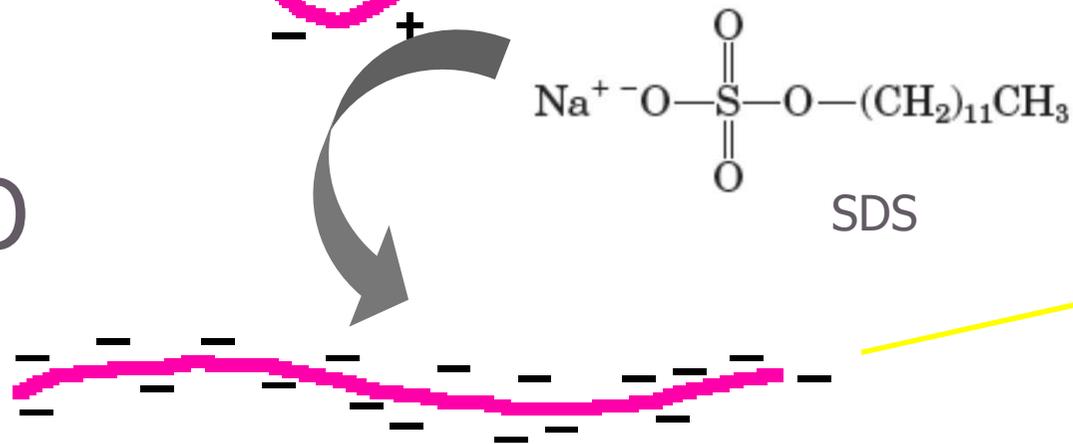
Sodium dodecyl sulfate  
(SDS)

# Trattamento con SDS

PRIMA



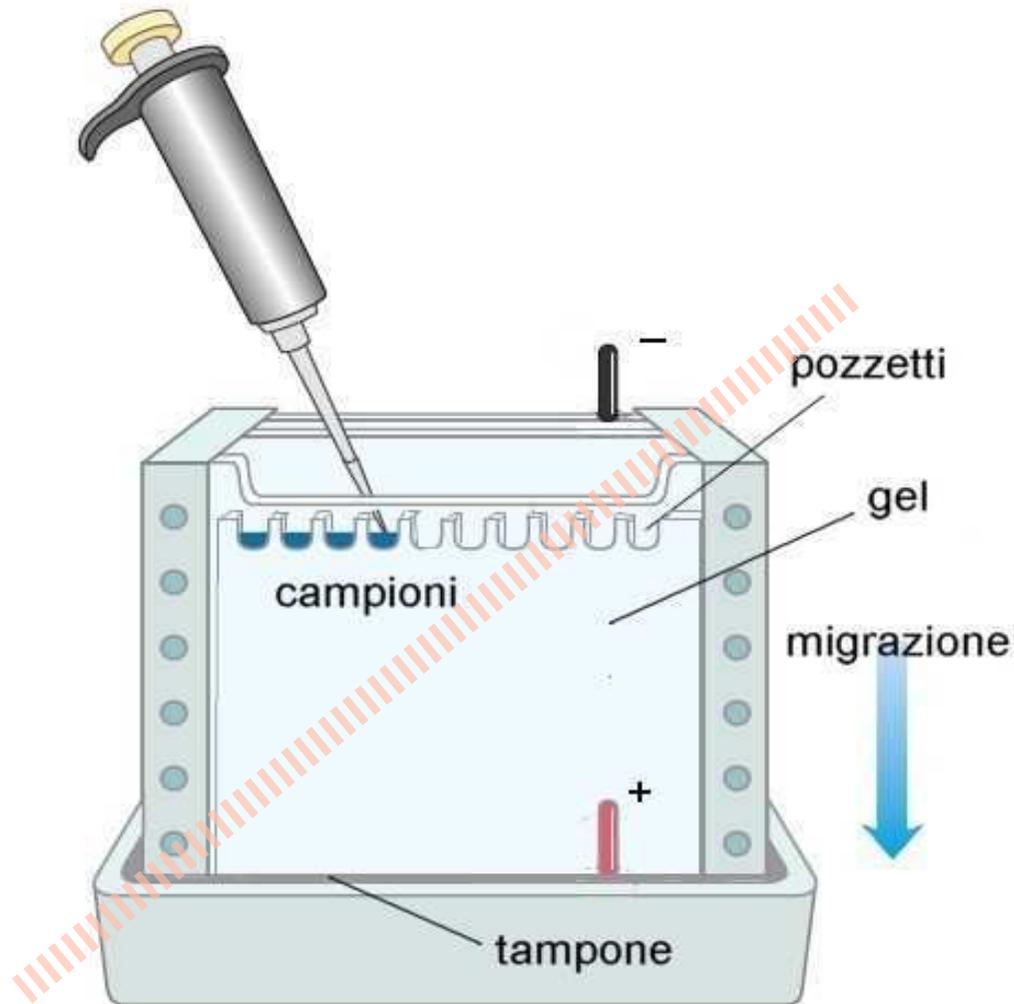
DOPO



# Principali impieghi della SDS-PAGE

1. Controllo di **omogeneità** (purificazione di proteine)
2. Caratterizzazione (**determinazione del peso molecolare**)
3. Proteomica (analisi dell'insieme delle proteine di una cellula)
4. Preliminare ad analisi con anticorpi (western blotting)

Il gel presenta dei pozzetti per la deposizione dei campioni  
(analisi di molti campioni contemporaneamente)



# Preparazione del campione

Diluizione del campione con soluzione contenente:

## 1. SDS

1. denatura le proteine (stessa forma a “bastoncino”)
2. conferisce la stessa densità di carica (negativa)

## 2. $\beta$ -Mercaptoetanololo $\text{HS-CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

1. rompe eventuali legami disolfuro

## 3. Glicerolo

1. appesantisce i campioni depositandoli nel pozzetto

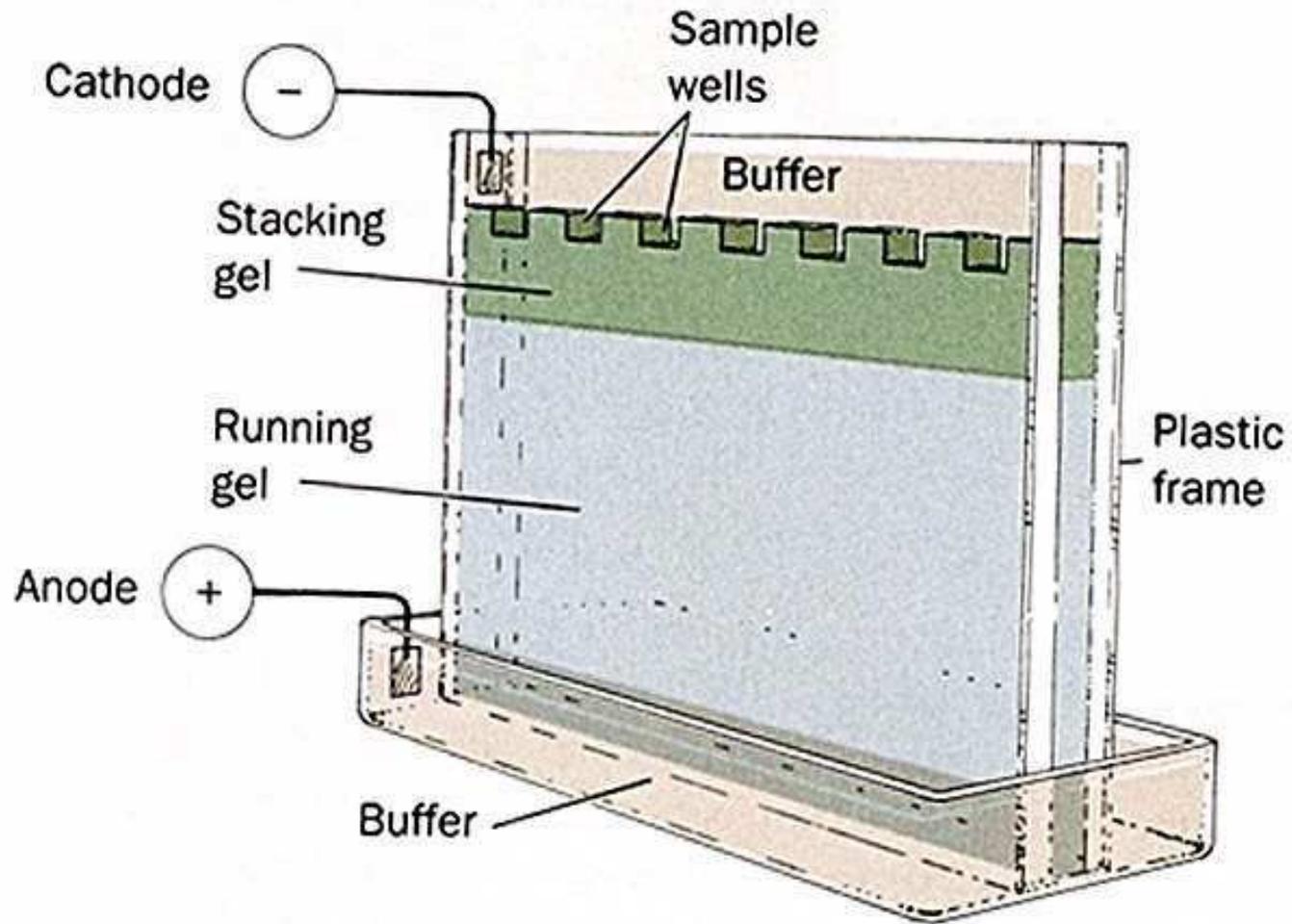
## 4. Blu di bromofenolo

1. visualizza i campioni e va a costituire il fronte di migrazione

Bollitura (100 °C per 2-3 min)

accelera la completa denaturazione

Per ottimizzare la risoluzione delle bande l' SDS PAGE è eseguita su un gel discontinuo:  
si distingue un gel impaccatore o di accumulo (*stacking gel*) e un gel di corsa (*running gel*)



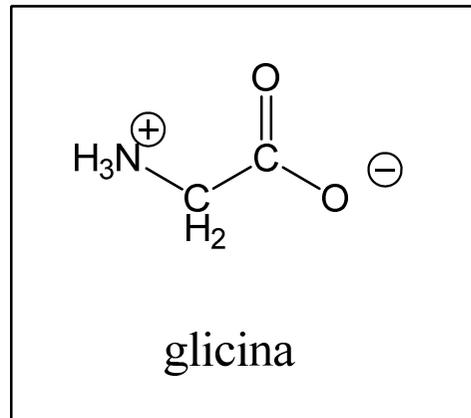
Stacking gel, al 4% (a maglie larghe) a pH 6.8,  
mobilità relativa degli ioni:

Cl<sup>-</sup>, blu di bromofenolo > proteine > glicina

(il pI della glicina è 6.0, per cui ha una debole carica negativa e quindi una bassa mobilità)

Running gel, 7-15% (a maglie strette) a pH 8.8,  
mobilità relativa degli ioni:

Cl<sup>-</sup>, blu di bromofenolo > glicina > proteine

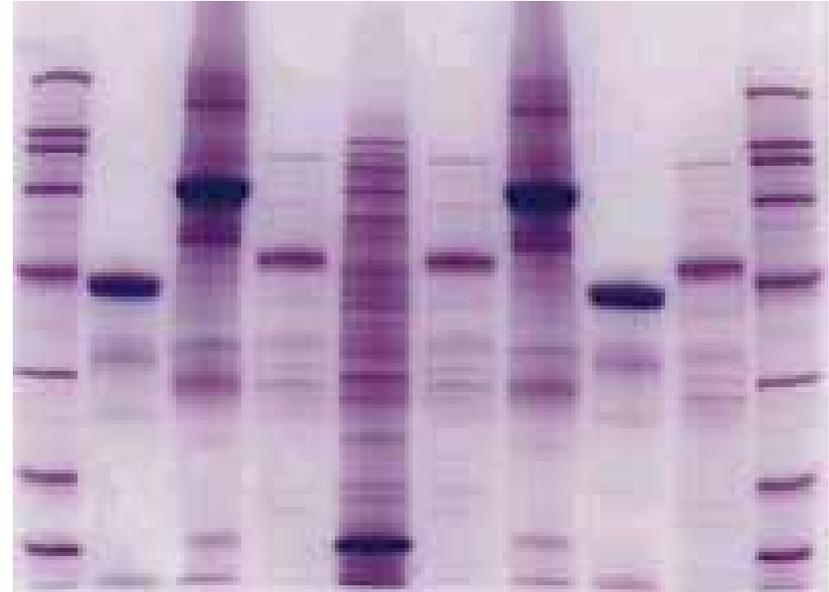


## Teoria della separazione su disc-elettroforesi

1. ioni glicina migrano dal tampone pH 8.0 (recipiente superiore) nello stacking gel a pH 6.8; il pH vicino al pI e gli ioni sono quasi scarichi (elettroforeticamente quasi immobili).
2. Ciò determina una diminuzione dei trasportatori di carica (= elevata resistenza  $R$ ), che, per il continuo rifornimento di una corrente costante attraverso il circuito elettrico ( $E = IR$ ), determina un aumento localizzato del campo elettrico  $E$ ; di conseguenza:
3. gli anioni macromolecolari proteici migrano rapidamente per tutto lo stacking gel senza separarsi in base alla massa,
4. Appena le proteine entrano nel running gel, la loro migrazione diminuisce per l'effetto della gel filtrazione.
5. Questo fatto consente agli ioni glicina di raggiungere le macromolecole e poiché il pH del running gel è più alto, essi possono riassumere la loro forma completamente carica (1 carica netta negativa) appena entrano nel gel.
6. Scompare il difetto di trasportatori di carica e le macromolecole proteiche prima si accumulano a ridosso del running gel in dischi molto vicini (circa 0,01 mm) e poi si separano nel running gel secondo la loro mobilità.

## Rivelazione di proteine

– Blu Coomassie



– Argento nitrato

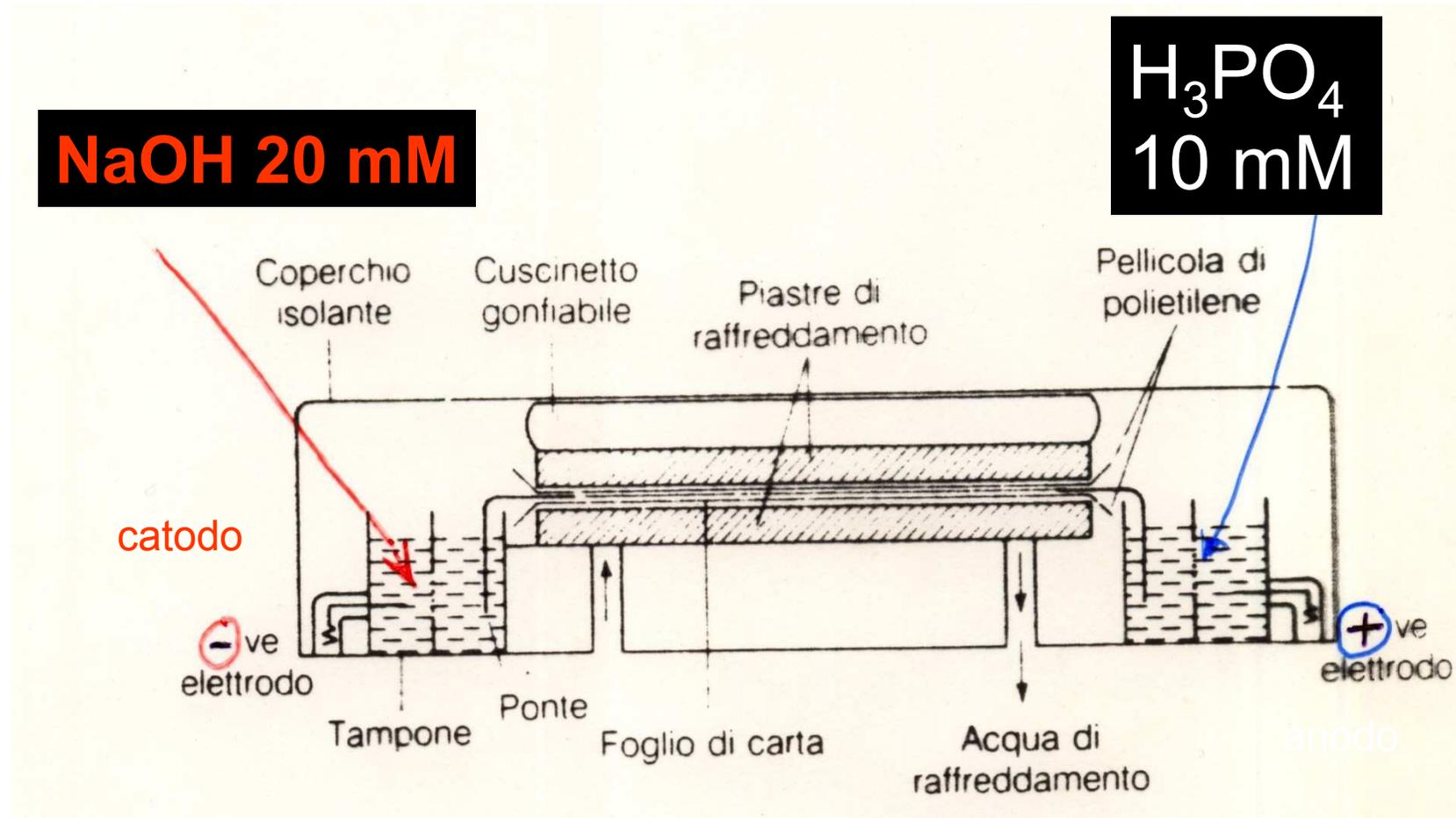




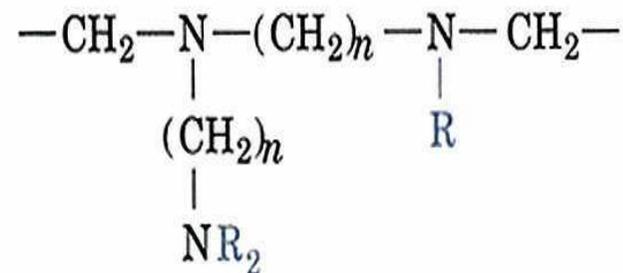
# Elettroforesi per focalizzazione isoelettrica (IEF)

1. Separazione senza SDS in presenza di un gradiente di pH.
2. Tecnica all'**equilibrio**
3. La corrente è portata dalle proteine; richiede alti voltaggi (2.500-3000 V)
4. Permette di misurare il pI di proteine
5. Combinabile con PAGE-SDS (2-DGE)

# Schema di apparato per isoelettrofocalizzazione



Il gradiente di pH creato dalle 2 soluzioni acida e basica viene stabilizzato dall'aggiunta al gel di sostanze anfotere, le anfoline:



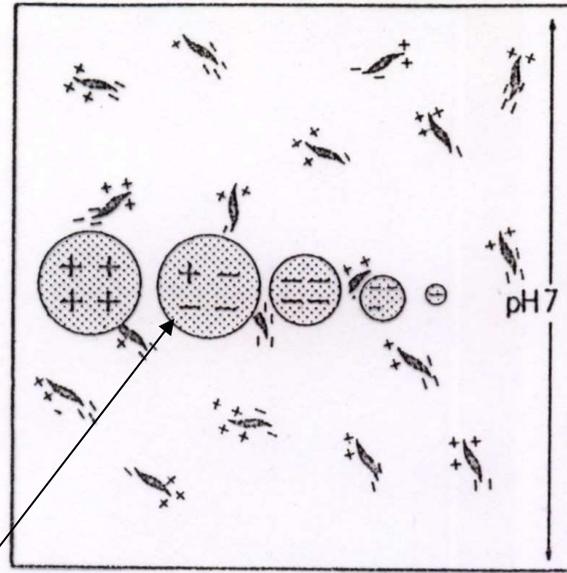
$$n = 2 \text{ or } 3$$

$$R = \text{H or } \text{---(CH}_2\text{)}_n\text{---COOH}$$

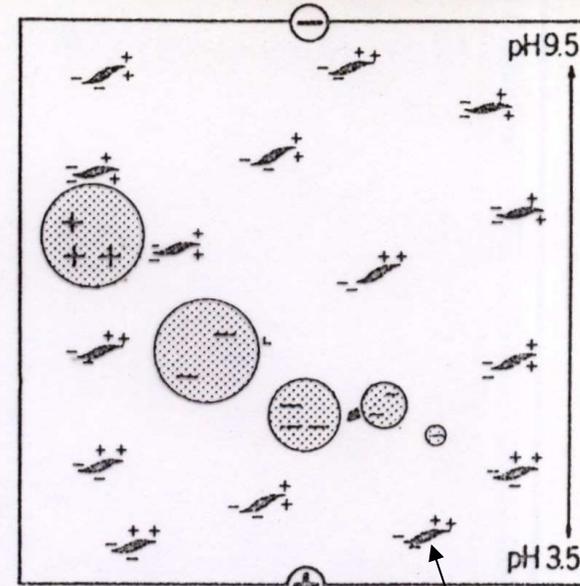
catodo



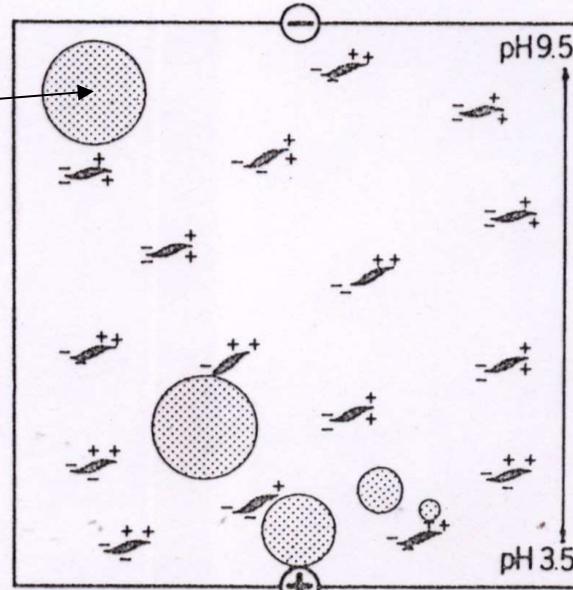
anodo



(a) inizio



(b) corsa



(c)

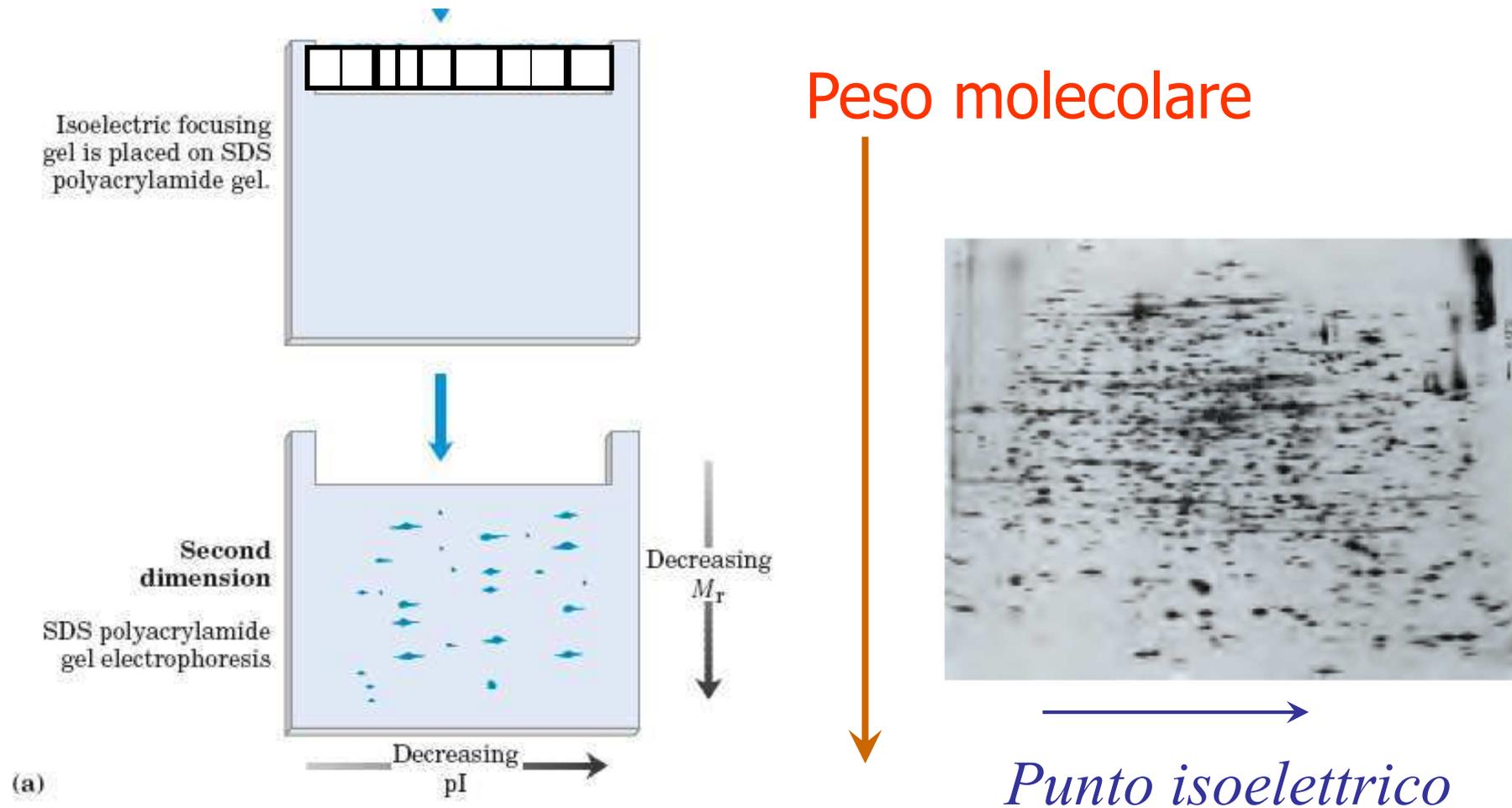
proteine

anfoline

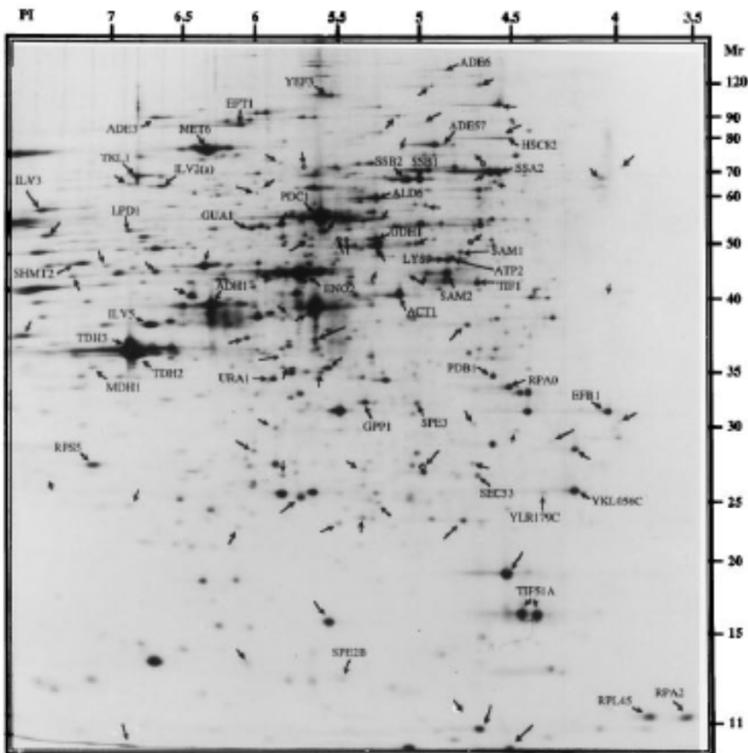
focalizzazione = equilibrio

# Elettroforesi bidimensionale

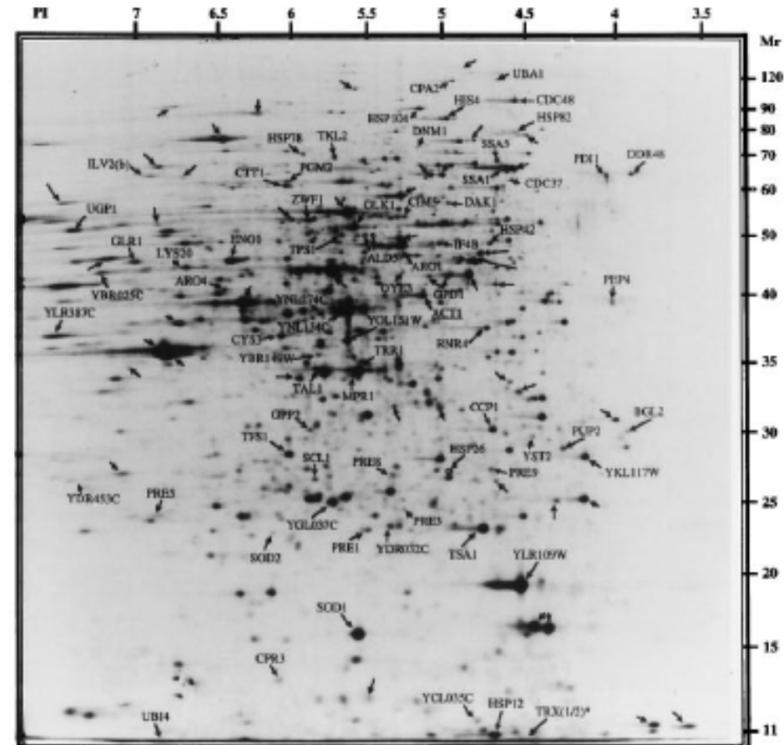
## IEF + SDS-PAGE



# Individuazione di biomarker biochimici



controllo



stato patologico o  
trattamento