

Genomica e Proteomica

- Genomica: sequenziamento del DNA presente in un organismo e analisi dei geni (bioinformatica)

- Proteomica: analisi delle proteine di un organismo:

Quali proteine in un dato momento dello sviluppo?

Come interagiscono tra di loro?

In quali localizzazioni cellulari sono presenti?

Quali sono le proprietà biofisiche, biochimiche e strutturali di singole proteine e/o complessi?

Elettroforesi bidimensionale

- ❖ Tecnica di elezione per lo studio del **proteoma**
- ❖ Consiste nell'accoppiare in maniera sequenziale due sistemi di separazione.
 - Focalizzazione Isoelettrica
 - SDS - PAGE (SodioDodecilSolfato-PoliAcrilamide Gel Elettroforesi)
- ❖ Separa le proteine sulla base di due caratteristiche chimico-fisiche indipendenti: la carica e la massa
- ❖ Ha un elevato potere risolutivo

Elettroforesi bidimensionale

Formula della velocità di migrazione di una particella carica in un campo elettrico

$$v = \frac{z E}{f}$$

v = velocità di migrazione

z = carica della particella

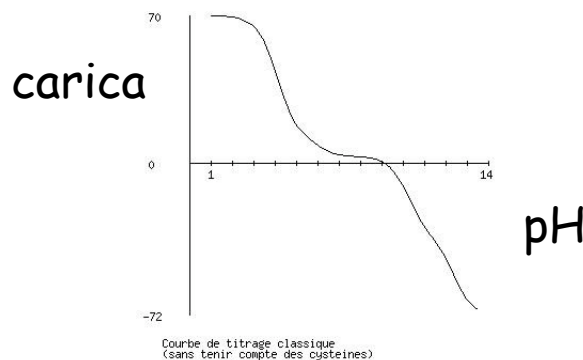
E = campo elettrico

f = caratteristiche intrinseche della particella e del mezzo

Elettroforesi bidimensionale

Focalizzazione isoelettrica

I polipeptidi sono separati in un **gradiente continuo di pH** dove migrano in base alla carica fino a raggiungere il proprio punto isoelettrico (pI) cioè quel valore di pH al quale la carica netta è nulla. Tutti i polipeptidi di una determinata specie si concentreranno o focalizzeranno in un zona estremamente ristretta, questa caratteristica rende la IEF una tecnica ad elevata risoluzione.



Elettroforesi bidimensionale Focalizzazione isoelettrica

Necessità di avere **un supporto** che non influenzi la migrazione

Agarosio

Non tossico

Solidificazione

Limitata capacità separativa

Ottimo per molecole ad alto peso

DNA

Acrilamide

Tossica

Polimerizzazione più complessa

Maggiori possibilità di separazione

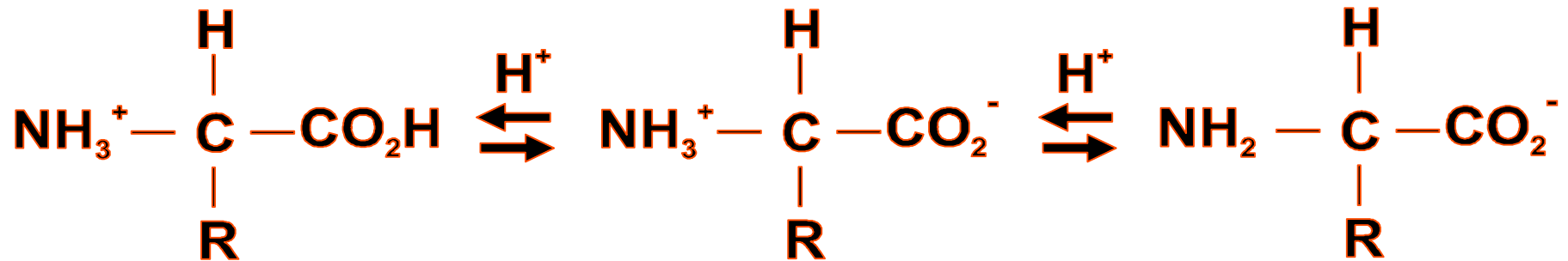
Possibilità di separare molecole di basso peso.

Proteine

Elettroforesi bidimensionale

Focalizzazione isoelettrica

Ogni polipeptide assume una carica positiva o negativa relativamente al pH in cui si trova.



Carica positiva

Carica nulla

Carica negativa

pH acido
alta $[\text{H}^+]$

pI

pH basico
bassa $[\text{H}^+]$

Elettroforesi bidimensionale Focalizzazione isoelettrica

- ❖ Una tecnica all'equilibrio, indipendente da:
 - sistema di applicazione del campione
 - quantità di proteina caricata
 - dal tempo di corsa
- ❖ Permette di misurare il **pI** dei polipeptidi
- ❖ Permette un'eccellente risoluzione di polipeptidi con pKa che differiscono di 0.01 unità di pH o addirittura di 0.001 se utilizziamo gradienti immobilizzati

Elettroforesi bidimensionale Focalizzazione isoelettrica

Immobiline

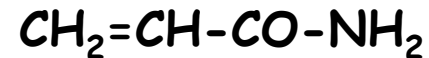
Sono molecole con una struttura chimica simile a quella dell'acrilamide che gli permette di polimerizzare e quindi fissarsi alla matrice gelatinosa creando **un gradiente di pH immobilizzato (IPG)**.

Immobiline:



R = un **gruppo carbossilico** (-COOH)
o una **ammina terziaria** (-NH₂)

Acrilamide:

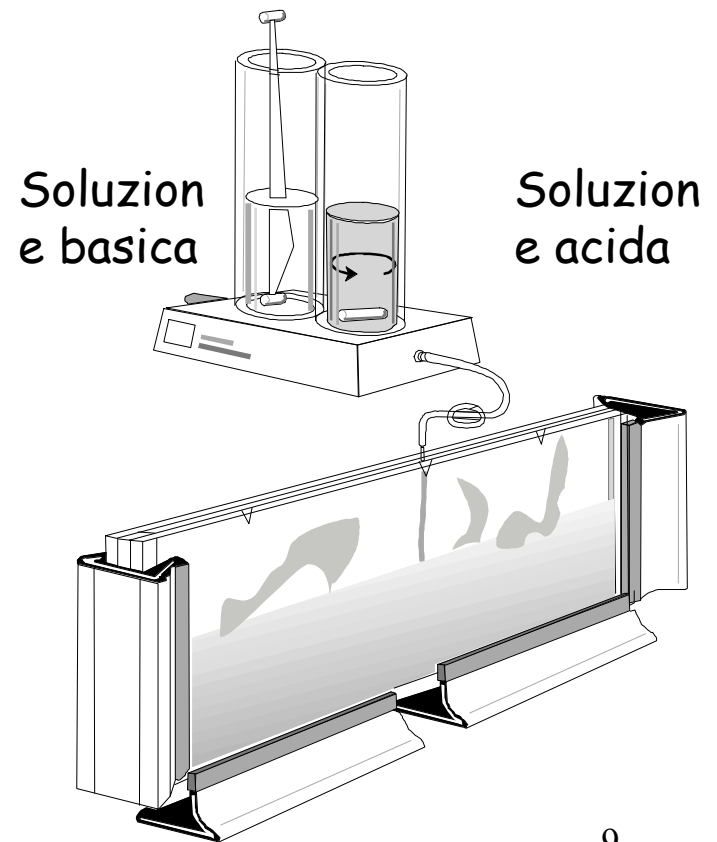


Elettroforesi bidimensionale

Focalizzazione isoelettrica

Immobiline

I gel di immobiline sono generalmente polimerizzati su supporti di plastica (gel bond) con una concentrazione di acrilamide estremamente bassa 3-4% . La creazione di un gradiente con le appropriate soluzioni di immobiline è ottenuta con un **forma gradienti**



Elettroforesi bidimensionale Focalizzazione isoelettrica

Immobiline

Esistono in commercio gel di immobiline che coprono svariati range di pH.
I gel sono venduti disidratati e congelati a -20°C

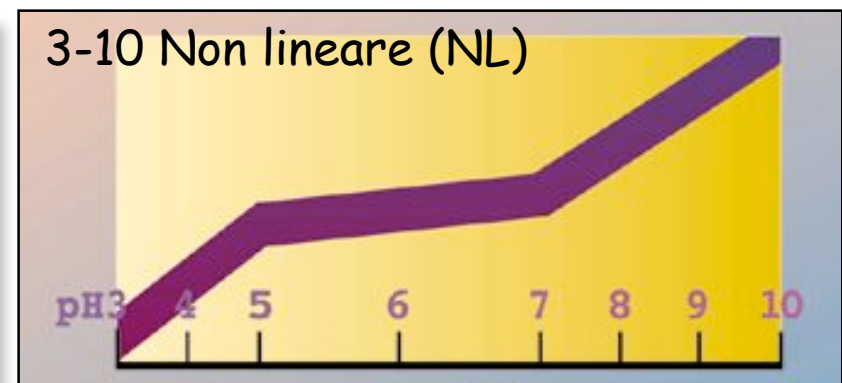
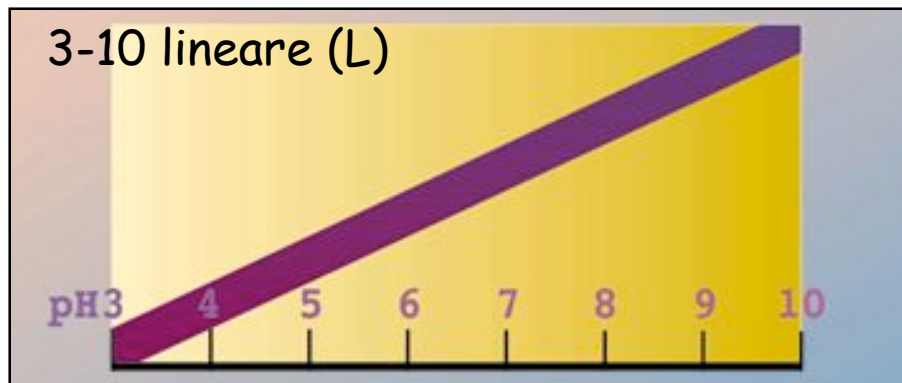


Range di pH:
3-10 L. e NL., 4-7, 6-11,
3.5-4.5, 4-5, 4.5-5.5, 5-6

Dimensioni:
7, 11, 18, 24 cm

Elettroforesi bidimensionale Focalizzazione isoelettrica

I gradienti espansi e le dimensioni delle strisce di immobiline producono una migliore risoluzione del campione da analizzare. La scelta iniziale deve però cadere sul tipo di intervallo più ampio e solo in seguito scegliere intervalli più stretti.



Elettroforesi bidimensionale

Focalizzazione isoelettrica

Il tempo minimo di focalizzazione deve essere determinato empiricamente in quanto dipendente da vari fattori come:

- Il campione
- Composizione della soluzione di reidratazione
- Lunghezza delle strisce
- Tipo di gradiente

Elettroforesi bidimensionale Focalizzazione isoelettrica

Denaturante o nativa?

Denaturante

Proteine:

- Si presentano in un'unica conformazione
- Sono evitate le interazioni proteina-proteina
- Sono mantenute in soluzione
- **pI teorici** sono paragonabili a quelli sperimentalmente ottenuti

Elettroforesi bidimensionale Focalizzazione isoelettrica

Denaturazione

La soluzione di denaturazione *non deve contenere* sostanze che possono influire sulla separazione ovvero molecole cariche o ionizzabili.

- Urea
- Detergenti non ionici o zwitterionici
- Riducenti

Elettroforesi bidimensionale

SDS-PAGE

I polipeptidi migrano in presenza di un capo elettrico su un supporto di acrilamide e sono separati in base alla loro mobilità relativa (M_r) che in questo caso è dipendente dal peso molecolare.

Elettroforesi bidimensionale

SDS-PAGE

$$V = \frac{z E}{f}$$

V = velocità di migrazione
z = carica della particella
E = campo elettrico
f = caratteristiche intrinseche
della particella e del mezzo

Affinché la separazione tenga conto solo delle dimensioni della proteina bisogna che le proteine abbiano tutte **la stessa carica** e forma devono cioè essere completamente denaturate.

Elettroforesi bidimensionale

SDS-PAGE

Carica

SDS

- **detergente anionico forte** che solubilizza quasi tutte le proteine denaturandole
- Rompe i legami idrogeno e le interazioni idrofobiche distruggendo le strutture secondarie e terziarie
- **fornisce alle proteina una carica netta costante per unità di massa pari a 1.4 g SDS / 1 g proteina.**
- "Maschera" la carica apportata dagli aminoacidi della proteina.
- Può essere aggiunto alla soluzione di polimerizzazione.

Elettroforesi bidimensionale SDS-PAGE

Forma

Riducenti

Distruggono i **ponti disolfuro** fra cisteine rendendo la catena aminoacidica lineare, sono generalmente dei tioli come il β -mercaptoetanolo od il ditioneitrato (DTT).

Non possono essere aggiunti alla soluzione di polimerizzazione in quanto inibiscono la polimerizzazione.

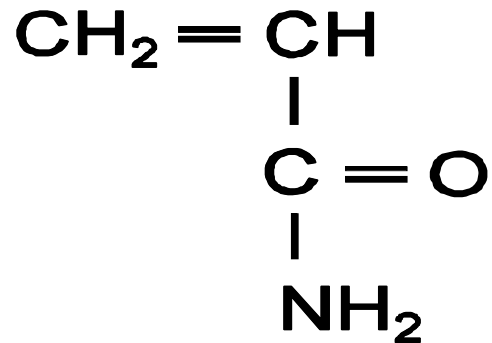
Sfortunatamente fenomeni ossidativi ovvero di riformazione dei ponti di solfuro possono accadere durante la corsa

Elettroforesi bidimensionale

SDS-PAGE

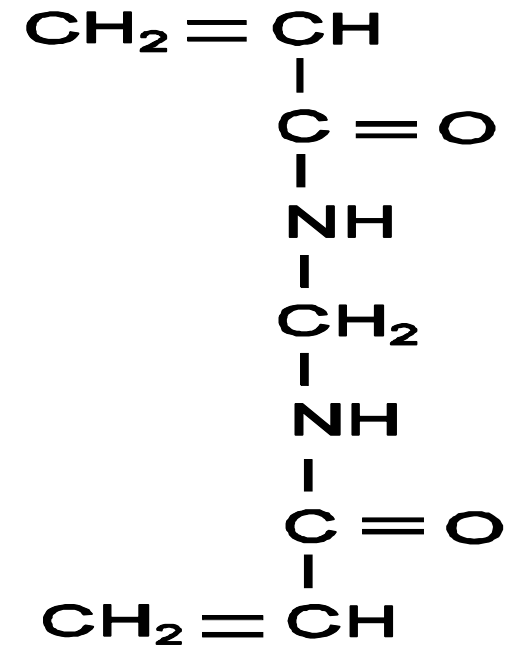
Supporto della separazione

Monomeri di
acrilamide



+
APS
TEMED

NN'-metilenbisacrilamide



Elettroforesi bidimensionale SDS-PAGE

Reazione di polimerizzazione

- La reazione di polimerizzazione avviene con l'aiuto di due molecole che hanno la funzione di catalizzatori:

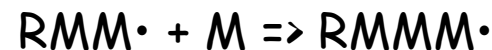
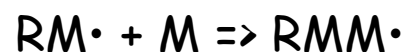
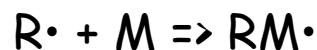
Ammonio persolfato (APS)

N,N,N',N'- tetrametilanediamine (TEMED)

- La reazione comincia con la creazione di radicali liberi.

Il TEMED catalizza la decomposizione dello ione persolfato per ottenere un radicale libero che reagisce con un monomero di acrilamide cominciando la polimerizzazione

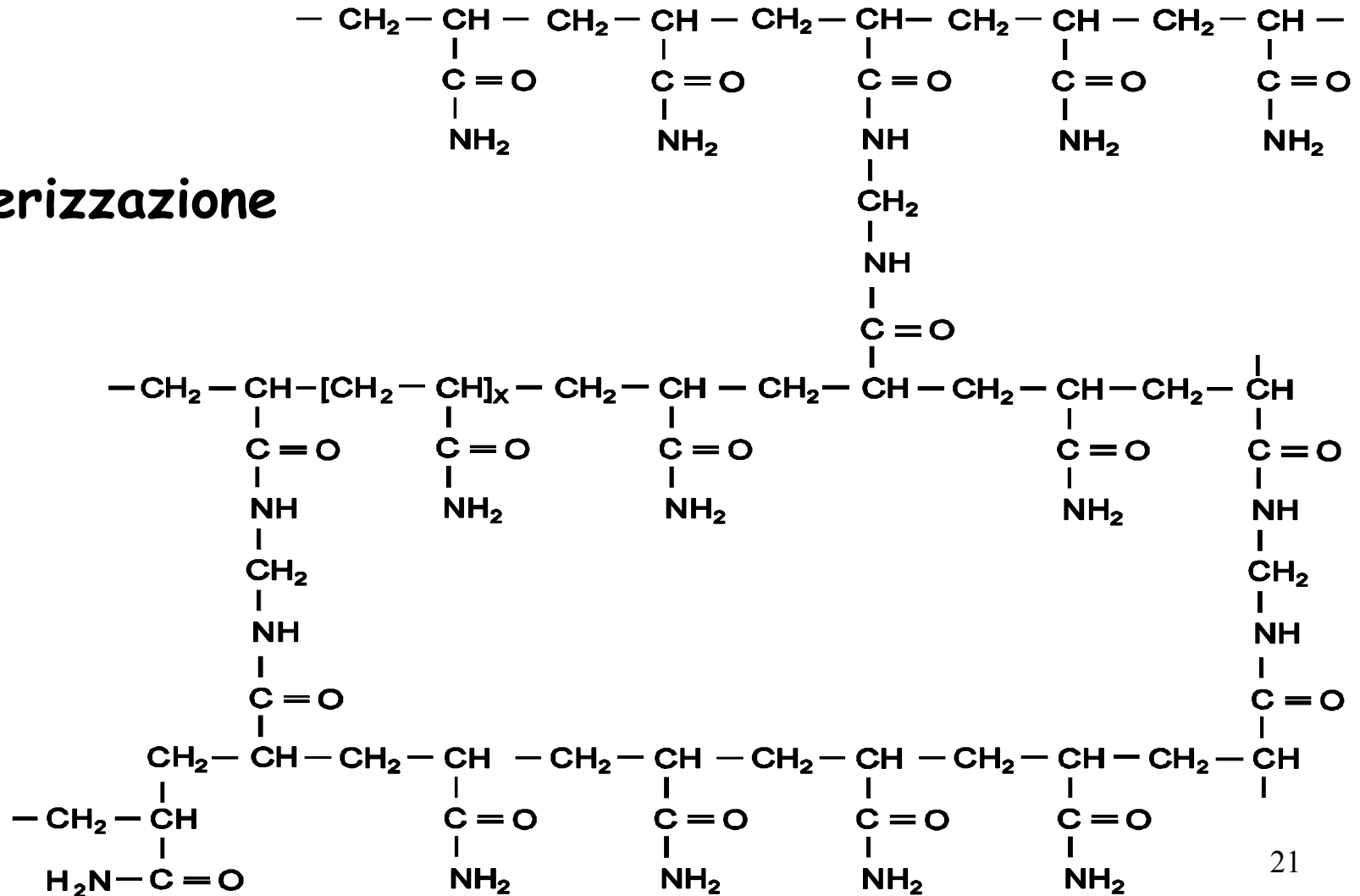
- Di fondamentale importanza non ossigenare la soluzione essendo l'ossigeno altamente reattivo con i radicali liberi



Elettroforesi bidimensionale

SDS-PAGE

Polimerizzazione



Elettroforesi bidimensionale

SDS-PAGE

Le dimensioni delle maglie può essere perfettamente controllata conoscendo la concentrazione totale di acrilamide (T) e la concentrazione del cross-legante (C) espressi come percentuale.

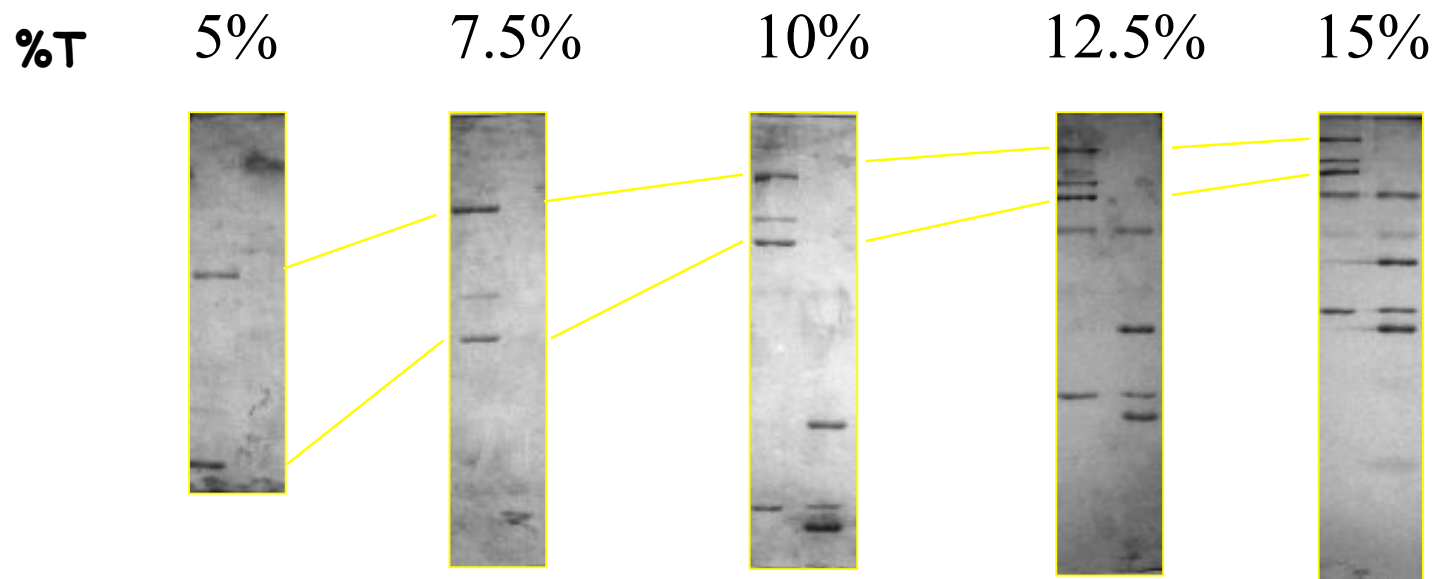
$$\%T = \frac{\text{gr acrilamide} + \text{gr bisacrilamide}}{\text{ml della sol. di polimerizzazione}} \times 100$$

$$\%C = \frac{\text{gr bisacrilamide}}{\text{gr acrilamide} + \text{gr bisacrilamide}} \times 100$$

Elettroforesi bidimensionale SDS-PAGE

Agendo su *T* e su *C* cambiamo le dimensioni dei pori e quindi possiamo migliorare la separazione

Mantenendo costante *C* e cambiando la concentrazione di *T*, cambiamo in maniera inversa le dimensione dei pori



Elettroforesi bidimensionale SDS-PAGE

Gel con pori di dimensioni ridotte (alta % T)

- Sono restrittivi per le proteine di grande dimensione, a tal punto che alcune di esse possono anche non entrare nel gel.
- Migliorano la separazione delle proteine a basso peso molecolare

Gel con pori di grandi dimensioni (bassa % T)

- Sono meno restrittivi per le proteine di grande dimensione, e ne migliorano la separazione.
- Proteine a basso peso molecolare migrano con il fronte del gel e non si separano

Elettroforesi bidimensionale SDS-PAGE

Scelta dell'intervallo di separazione

<u>%T</u>	<u>%C</u>	<u>Range di Mr risolti [kDa]</u>
5	2.6	da 25.000 a 300.000
10	2.6	da 15.000 a 100.000
15	2.6	da 12.000 a 50.000

Con i gel a concentrazione fissa spesso non riusciamo a separare in maniera ottimale tutte le proteine presenti

Elettroforesi bidimensionale

SDS-PAGE

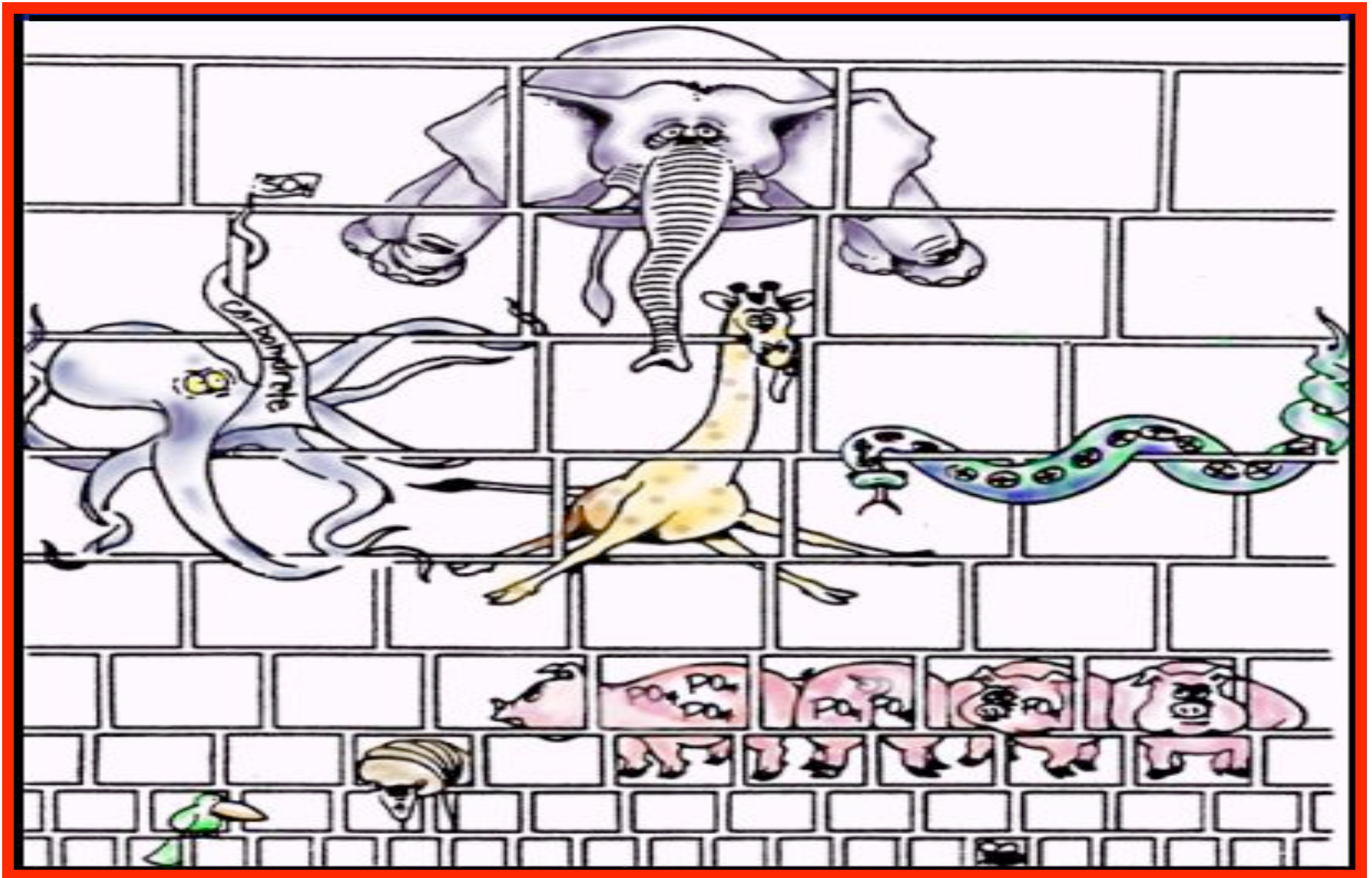
Gradiente

Per la separazione di campioni complessi è vantaggioso utilizzare gradienti:

- Aumenta l'intervallo di separazione dei MW
- Separa sia proteine ad alto che a basso peso molecolare

Elettroforesi bidimensionale

SDS-PAGE



Elettroforesi bidimensionale

SDS-PAGE

è necessario l'utilizzo di un marcatore per la visualizzazione delle proteine. Il marcatore maggiormente impiegato è il Blu di Bromofenolo che ha la caratteristica di essere carico negativamente e di piccole dimensioni in maniera da migrare con il fronte del gel. La corsa viene fermata quando il Blu di Bromofenolo raggiunge la fine del gel. Il Blu di Bromofenolo fa parte del tampone di denaturazione del campione

Elettroforesi bidimensionale

SDS-PAGE

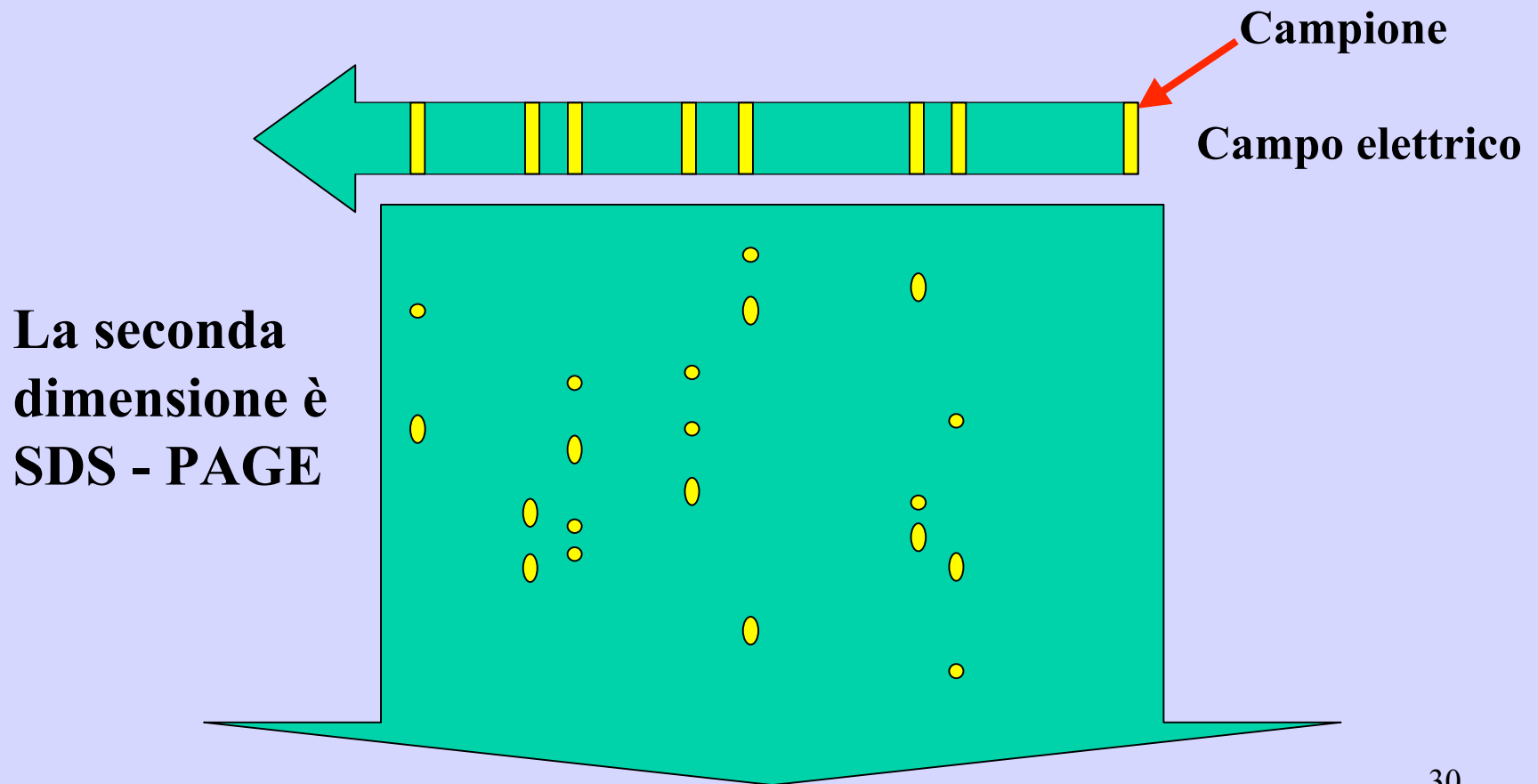
Tampone di denaturazione è composto da:

Tris-HCl	0.125 M, pH 6.8
SDS	2% (p/v)
β -mercaptoetanololo	5% (v/v)
Glicerolo	10% (p/v)
(BB	0.001% (p/v))

Il campione è poi **bollito** per 5 min. prima di essere caricato su gel

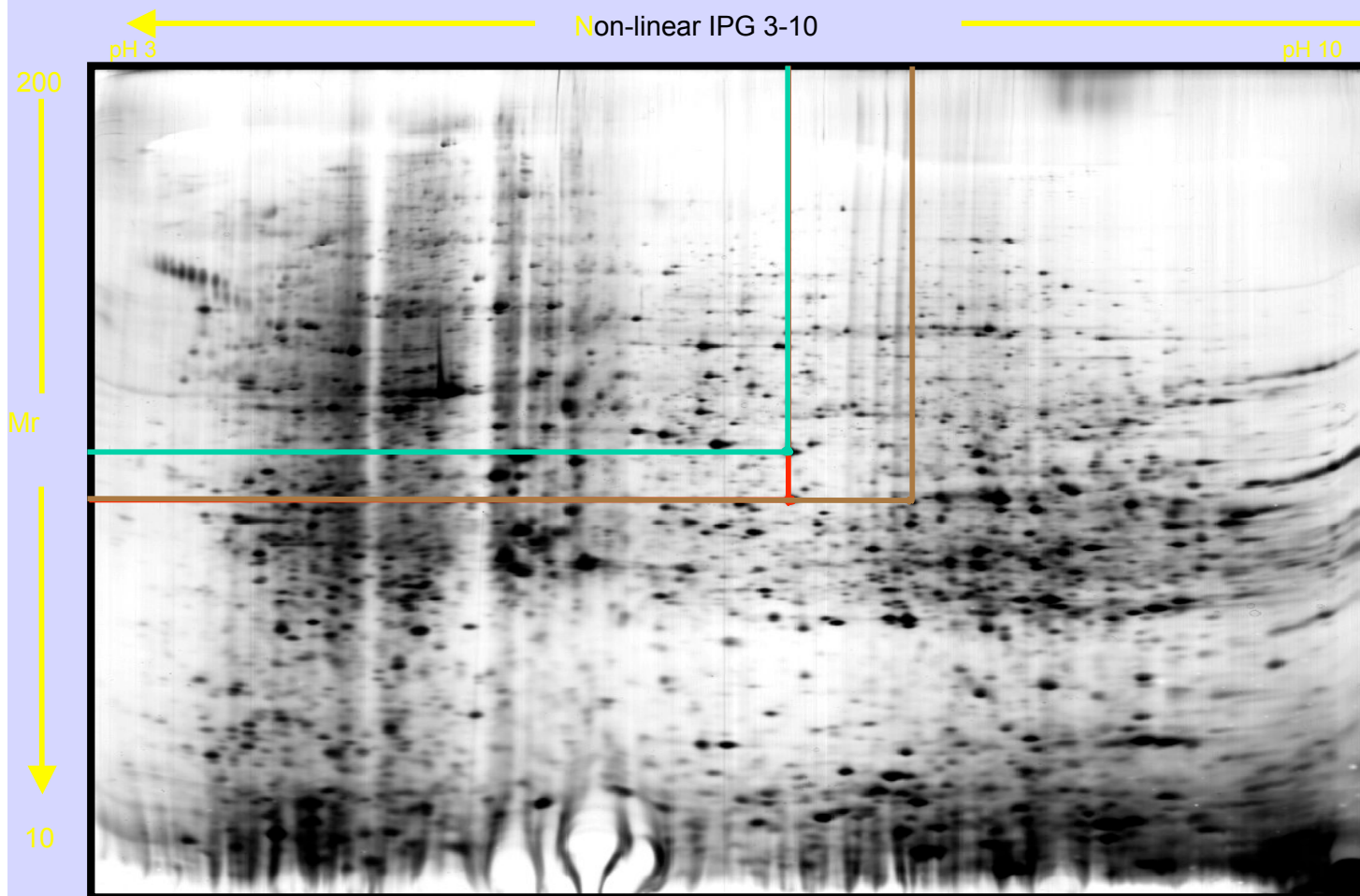
Elettroforesi bidimensionale

La prima dimensione è la focalizzazione isoelettrica



Elettroforesi bidimensionale

Ogni polipeptide separato tramite 2D è riconducibile ad un punto in un asse cartesiano dove le coordinate sono rispettivamente il pI e il Mr



**Potere
risolutivo
dell'elettroforesi
bidimensionale
è il prodotto dei
poteri risolutivi
dell' IEF e del
SDS-PAGE**