

Elettroforesi

Questa tecnica permette la separazione di molecole cariche in soluzione sfruttando la loro migrazione differenziata in un campo elettrico in base al loro rapporto carica/massa e alla loro forma. L'elettroforesi viene infatti utilizzata per separare aminoacidi, peptidi, proteine e acidi nucleici.

Le tecniche elettroforetiche sono di diversi tipi a seconda del supporto, della cella elettroforetica e delle condizioni sperimentali utilizzate.

Esempi di separazioni elettroforetiche:

elettroforesi del siero su nitrato di cellulosa;

elettroforesi delle proteine condotta su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti.

Elettroforesi del siero su nitrato di cellulosa

Materiale occorrente

Supporto: nitrato di cellulosa: Super Sephaphore® Gelman

Camera elettroforetica Gelman

Tampone: TGS tris-glicina-acido salicilico, pH 8.8

Soluzione colorante: rosso Ponceau 0.5% in acido acetico 7%

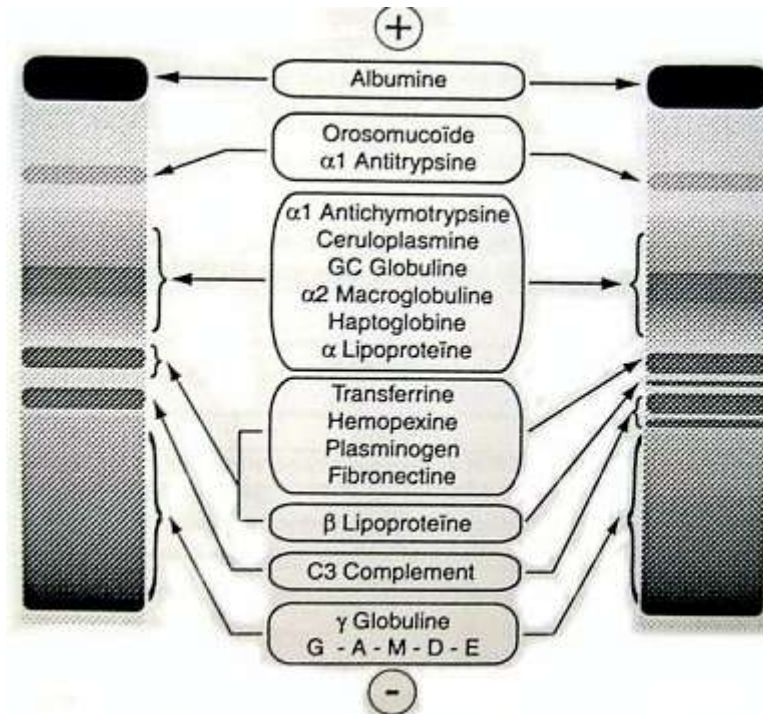
Soluzione decolorante: acido acetico 7%

Carta da filtro

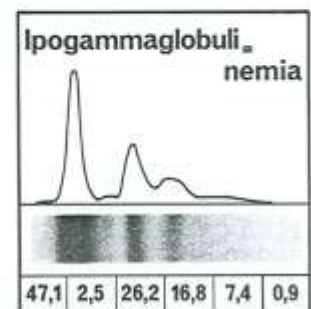
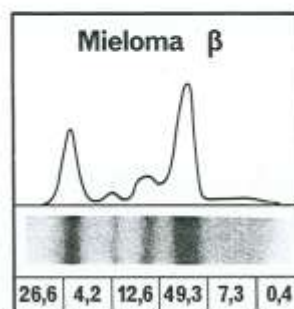
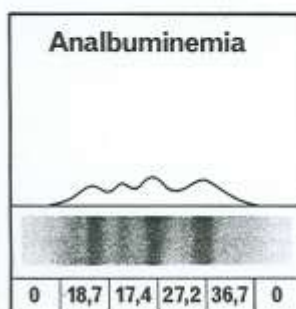
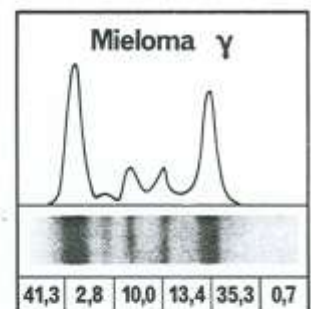
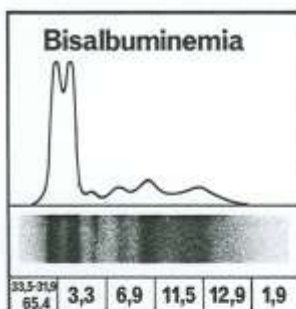
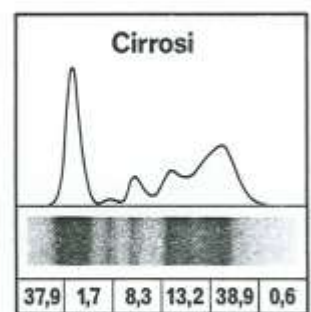
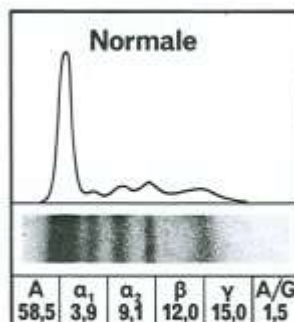
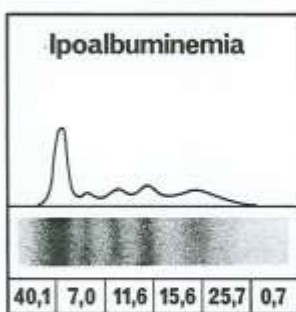
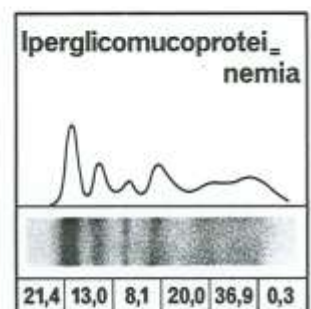
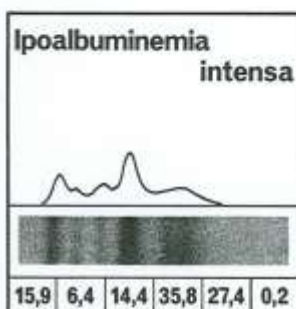
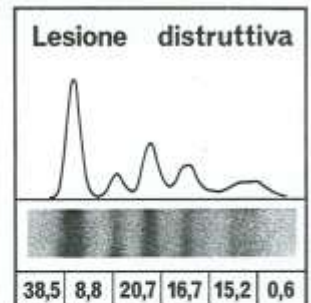
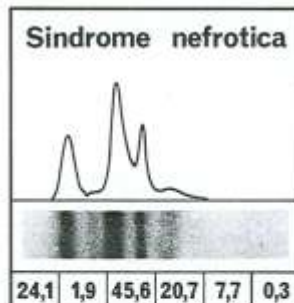
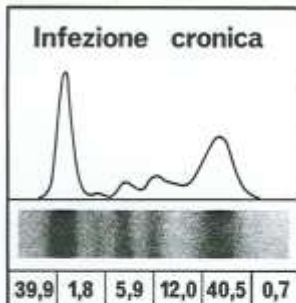
Procedura

- Immergere la striscia nel tampone di corsa; dopo averla tamponata con carta da filtro inserirla correttamente sul ponte.
- Seminare 20 µl di ciascun campione (già diluito 1/3 nello stesso tampone di corsa) sugli appositi pozzetti dell'applicatore.
- Seminare i campioni (con l'applicatore) sulla striscia.
- Mettere il ponte nella camera di migrazione.
- Applicare una d.d.p. di 220 V per 35 min.
- Al termine della corsa immergere la striscia nel colorante (funziona anche da fissativo) per 5' minuti; decolorare la striscia con la soluzione di decolorante.

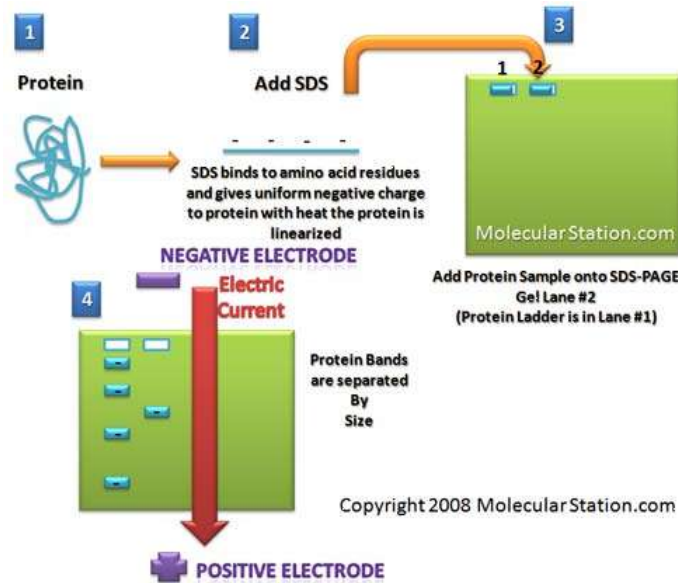
Tipico schema di separazione elettroforetica delle proteine del siero.



Variazioni nel profilo densitometrico delle proteine plasmatiche, associate a stati patologici



SDS-PAGE



Apparato per elettroforesi verticale

Sono disponibili in commercio vari sistemi per elettroforesi costituiti da:

- 1- Un alimentatore in grado di fornire corrente continua a potenza costante e voltaggi elevati.
- 2- Due lastrine di vetro rettangolari di 8 x 10 cm (per mini-gel).
- 3- Due spaziatori di plastica, spessi di solito 1 mm, per tenere distanziate le lastrine.
- 4- Un pettine di teflon a 10 denti dello spessore degli spaziatori, per i pozzetti dei campioni.
- 5- Pinze per tenere insieme le lastrine distanziate.
- 6- Supporto per la gelificazione.
- 7- Camera per la corsa elettroforetica.

Soluzioni e reagenti per la preparazione di 2 mini gel verticali aventi densità pari al 12%

Preparazione di 12 ml di separating gel di densità pari a 12%:

Soluzione al 30% di acrilamide/bis-acrilamide (37.5:1)	4.8 ml
1.5M Tris-HCl, pH 8.8	3.0 ml
Soluzione SDS 10%	0.12 ml
Acqua bidistillata	4.0 ml
Ammonio Persolfato 10%	0.12 ml
TEMED	0.0048 ml

Preparazione del gel di impaccamento

Soluzione al 30% di acrilamide/bis-acrilamide (37.5:1)	0.75 ml
0.5M Tris-HCl, pH 6.5	2.5 ml
Soluzione SDS 10%	0.05 ml
Acqua bidistillata	1.65 ml
Ammonio Persolfato 10%	0.05 ml
TEMED	0.0025 ml

Si procede preparando la soluzione del gel di separazione. Si mescolano tutti i componenti tranne persolfato di ammonio e TEMED (N, N, N', N'-tetrametil-etilendiammina) che si aggiungono dopo aver degasato la soluzione sotto vuoto per 5 - 10 min. La soluzione di ammonio persolfato deve essere preparata al momento dell'uso.

Questi due componenti scatenano la reazione di gelificazione nella soluzione, che si versa immediatamente nella cassetta lasciandone 1 - 2 ml in una provetta per controllare la polimerizzazione del gel.

Quasi tutta la cassetta è occupata dal gel di separazione inferiore.

A polimerizzazione completata si prepara la soluzione per il gel di impaccamento con le stesse modalità e si versa sopra al gel di separazione. Si inserisce il pettine che determina nel gel superiore la formazione dei pozzetti per il caricamento dei campioni di proteine.

Terminata la polimerizzazione si toglie la cassetta dal supporto e si inserisce nella camera di elettroforesi, si rimuove il pettine e si aggiunge il tampone per la corsa TrisHCl-glicina SDS.

I campioni da caricare nei pozzetti nel gel deve essere diluita 1:1 con tampone salino contenente SDS, blu di bromo fenolo e glicerolo con l'eventuale aggiunta di beta mercaptoetanololo come riducente dei ponti disolfuro delle proteine. La miscela, così preparata, deve essere scaldata a 100°C per 5 minuti prima di caricarla sul gel.

La separazione in SDS PAGE può avvenire in condizioni denaturanti e riducenti (in presenza di SDS e di agente riducente) o in condizioni denaturanti e non riducenti (in presenza di SDS e assenza di agente riducente).

In uno o più pozzetti si caricano miscele di proteine a peso molecolare noto.

L'elettroforesi si inizia accendendo l'alimentatore, che fornisce una corrente a potenza costante impostata a seconda delle dimensioni e spessore del gel.

Si interrompe la corsa elettroforetica quando il blu di bromofenolo contenuto nel campione dista pochi millimetri dal bordo inferiore.

Il gel viene rimosso dalla cassetta prima di procedere alla colorazione delle bande con blu Coomassie.