

Elettroforesi di proteine - SDS PAGE

Inviato da Prof. Lombardo
venerdì 09 maggio 2008
Ultimo aggiornamento giovedì 25 marzo 2010

L'elettroforesi è una tecnica che permette di separare, mediante l'applicazione di un opportuno campo elettrico, molecole presenti in soluzione sotto forma di specie elettricamente cariche. La separazione si basa sulla differente velocità di migrazione di queste specie cariche, che possono essere amminoacidi, peptidi, proteine, nucleotidi, acidi nucleici. In questo caso si propone l'elettroforesi di proteine su gel di poliacrilammide (PAGE) utilizzando il sodio dodecil solfato (SDS): quest'ultimo permette di eliminare l'effetto dovuto alle differenze di carica e alla diversa forma delle proteine, separando queste ultime solamente in base al loro differente peso molecolare (nel testo viene espresso in dalton con l'acronimo inglese MW, cioè molecular weight).

Avvertenze! L'acrilammide è un potente neurotossico! Questo esperimento si rivolge a personale esperto oppure guidato da un istruttore.

Utilizzare i guanti e la mascherina durante la preparazione dei reagenti. **LAVORARE SEMPRE SOTTO CAPPAAA!!!**
Le apparecchiature per l'elettroforesi possono erogare correnti elevate: quindi vanno manipolate **SEMPRE** con i cavi scollegati dall'alimentatore.

Procedimento

Prima di tutto si preparano i vetri: devono essere ben lavati e sgrassati (figura 1).

Lo spessore dei vetri utilizzati per questo esperimento è di 0,75 mm. Pulire i vetri, se necessario, con alcool etilico denaturato e montarli (figura 2).

Nella fase di montaggio bisogna assicurarsi che i vetri siano ben allineati in basso; ciò eviterà, durante la fase di versamento del gel, che il liquido fuoriesca. Tenere ben presente che i vetri si montano tenendo quello con il profilo dentellato con il verso opposto a quello dell'operatore, cioè verso l'interno. Ricordare che prima si carica il running gel (fino a circa ½ centimetro di distanza dai pozzetti) e poi lo stacking gel. Inserire il pettine e segnare con un pennarello vetrografico il livello inferiore del pozzetto; ciò servirà da riferimento per il running gel.

Preparazione del running gel (volume per apparecchiatura Scie-Plas)

Acrilamide stock 30% *
24 mL

Tris/ HCl 1,5 M pH 8,8
15 mL

Acqua Milli-Q
19,8 mL

SDS 10 %
800 μL

TEMED
20 μL

APS 10% (ammonio persolfato) **
1,2 mL

* Preparata pesando 60 g di acrilamide, 1,6 g di bis-acrilamide, portando il tutto a 200 mL con acqua deionizzata e filtrando la soluzione così ottenuta. Conservare al buio a 4 °C.

** L'ammonio persolfato deve essere preparato di fresco e conservato a 4°C.

Si mescolano bene i componenti e si versa il gel appoggiando la pipetta su uno degli angoli dei vetrini cercando di non formare bolle d'aria, fino a circa ½ cm dal livello precedentemente segnato. Mettere poi dell'acqua distillata fino al bordo superiore del vetrino. Attendere circa 30 minuti (dopo circa 20 minuti dovrebbe cominciare a polimerizzare).

Intanto si prepara lo stacking gel

Preparazione dello stacking gel

Acrilamide stock 30%
4 mL

Tris/HCl 0,5 M pH 6,8
8 mL

Acqua Milli-Q
15,8 mL

SDS 10 %
400 µL

TEMED
24 µL

APS 10% (ammonio persolfato)
600 µL

A polimerizzazione avvenuta del running gel, si asciuga l'acqua soprastante con della carta assorbente e si versa lo stacking gel con le stesse precauzioni viste prima per evitare le bolle d'aria. Si mette il pettine, sempre evitando le bolle d'aria (figura 3), e si attende la polimerizzazione di questo secondo gel (circa 30 minuti).

Intanto si prepara il running buffer

Preparazione del running buffer (1000 mL 10X*)

Tris base
30,3 g

Glicina
144 g

SDS
10 g

Portare a volume con acqua deionizzata

* prima dell'uso diluire 10 volte. Per l'apparecchiatura Scie-Plas ne servono 5 litri, prelevare quindi 500 mL della soluzione madre, e diluire con 4500 mL di acqua deionizzata.

Dopo la polimerizzazione dello stacking gel, infilare il tutto nelle apposite guide nel supporto portaelettrodi. Versare il running buffer prima nello spazio tra le due coppie di vetri (figura 4), assicurandosi della perfetta tenuta, e poi all'esterno, nella vasca. Il livello esterno deve essere circa a metà del gel (figura 5).

Quando si è pronti per seminare i pozzetti, si potrà aggiungere il buffer fino in cima. Prima però si prepara il sample buffer.

Preparazione del sample buffer (100 mL 2X*)

Glicerolo
20 mL

SDS
4 g

Tris base
1,513 g

Acidificare fino a pH 6,8

Portare a volume e filtrare

Aggiungere blu di bromofenolo

* il campione proteico va diluito con un pari volume di sample buffer.

Utilizzare β -mercaptoetanolo per i campioni riducenti nella proporzione di 30 μ L per 250 μ L di campione.

Come campione è stata preparata una soluzione di tre enzimi: fosfatasi acida (200 mg), fosfatasi alcalina (200 mg), invertasi (200 mg) portati a 100 mL con il sample buffer. La soluzione è stata diluita a 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16 (volume finale 500 μ L: in ogni provetta sono stati aggiunti 60 μ L di β -mercaptoetanolo e circa 10 gocce di blu di bromofenolo allo 0,03 %. Sono stati seminati 20 μ L di ogni campione in ogni pozzetto.

Altri due modi per preparare i campioni per la semina:

1) Si macina il materiale da cui estrarre il materiale proteico in un mortaio (circa 2 grammi): se necessario si aggiunge un po' di tampone Tris-HCl pH 6.8 125mM. Si centrifuga per 3 minuti e si preleva il surnatante. Miscelare 100 μ L di surnatante con una uguale quantità in volume di miscela denaturante così composta: Tris-HCl pH 6.8 125mM / 10% 2-mercaptoetanolo / 10% SDS / 10% glicerolo (aggiungere 2 o 3 gocce di blu bromofenolo come colorante tracciante). Nel caso in cui si ha un campione liquido miscelare 100 μ L di quest'ultimo con 50-100 μ L di miscela denaturante. ATTENZIONE: la miscela denaturante è puzzolente e tossica. Usare i guanti e lavorare sotto cappa. Prima di seminare i campioni trattarli a 95°C per 5 minuti in un bagnomaria.

2) Si miscela il campione proteico nella quantità 1:1 con un buffer concentrato 2x, contenente il 2% SDS, 20% di glicerolo, 20 mM Tris-Cl, pH 8, 2 mM EDTA, un agente riducente quale il ditiotreitolo o il 2-mercaptoetanolo, ed una piccola quantità di blu bromofenolo come colorante tracciante. I migliori risultati si ottengono facendo in modo che ci siano 2 mg/mL come concentrazione finale di proteina denaturata nel campione da seminare.

Quando si è pronti per la semina, come già detto si aggiunge il running buffer fino in cima, in maniera tale da sommergere completamente i pozzetti. Si seminano solo quelli in buono stato (quelli integri e con i bordi molto netti) con una siringa Hamilton (figura 6); per ogni pozzetto si utilizzano circa 15 μ L (con i vetri spessi 0,75 mm) di campione diluito secondo le istruzioni già descritte. Si semina anche uno standard costituito da una miscela di proteine diverse.

Nella prova descritta dalle foto è stato utilizzato il Prestained Protein Molecular Weight Marker #SM0441 della MBI Fermentas. Le proteine presenti in questo STD sono 6 ed hanno un peso molecolare medio che va da 20 KDa a 120 KDa. Sono, come dice il nome, pre-colorate, quindi in SDS-PAGE danno luogo a 6 bande diverse.

Si fa correre a V costante (120V) per circa 1 ora (figura 7). Controllare lo sviluppo di gas agli elettrodi (nel senso che se non si vedono le bollicine vuol dire che c'è qualcosa che non va).

Dopo circa 20 minuti i vari campioni e lo STD dovrebbero essere arrivati al running gel (figura 8).

Si può quindi aumentare il voltaggio, portandolo fino a 180 V (figura 9).

Quando il fronte del colorante è arrivato in fondo, si ferma la corsa. Si stacca prima di tutto la corrente (IMPORTANTE, altrimenti si fa una finaccia) e si aprono delicatamente (molto delicatamente) i vetrini. Il gel viene posto nello staining (ad esempio il Blu Coomassie) oppure, se si deve procedere con il western blotting, viene prima posto nel tampone di

trasferimento (transfer buffer). Ricordare che il Blu Coomassie ha una sensibilità di 50 μ g (limite di rilevabilità delle proteine).

Colorazione delle bande proteiche

Vengono qui suggeriti 2 metodi

1. Coomassie Brilliant Blue

Preparare il colorante secondo queste quantità: 400 mL di metanolo, 100 mL di acido acetico e 500 mL di acqua deionizzata. Sciogliere in questa miscela 2,5 g di Blue Coomassie R-250. Coprire il gel con la soluzione colorante, chiudere in una scatola di plastica e lasciare circa 30 - 40 minuti. Decolorare con la miscela decolorante così formulata: 400 mL di metanolo, 100 mL di acido acetico e 500 mL di acqua deionizzata, sotto agitazione tutta la notte. Per decolorare rapidamente si può usare dell'acqua distillata a circa 80 °C per circa 10-15 minuti.

2. Cloruro rameico (0.3M in CuCl₂)

Sciacquare il gel in acqua distillata, immergere nella soluzione salina per 20 minuti, sciacquare di nuovo con acqua distillata e immergere il tutto in sufficiente acqua distillata fresca, tenendo il tutto dentro una vaschetta chiusa (questo passaggio serve per decolorare).

Analisi dei risultati (derivanti da una prova successiva)

Le due bande a sinistra si riferiscono alla miscela di enzimi diluita a 1/2 (quantità approssimativa circa 60 μ g); le altre 3 bande si riferiscono alla miscela diluita a 1/4 (circa 30 μ g). Sono stati calcolati gli Rf ed è stato costruito un grafico log MW/Rf.

Invertasi SIGMA EC 3.2.1.26 (da lievito di birra) MW circa 270 kDa Rf=0,098

Fosfatasi alcalina SIGMA EC 3.1.3.1 (intestino di pollo) MW circa 140 kDa Rf= 0,392

Fosfatasi acida SIGMA EC 3.1.3.2 (patata) MW circa 55 kDa Rf = 0,931

Qui potete scaricare una tabella utile per la preparazione delle soluzioni (pdf).