

## Elettroforesi = migrazione in campo elettrico

Molte molecole di interesse biologico possiedono gruppi ionizzabili. In opportune condizioni di pH presentano una carica elettrica + o – e quindi sono in grado di migrare in un campo elettrico.

Se  $V$  = voltaggio applicato  
e  $d$  = distanza tra gli elettrodi

→  $E = V/d$  gradiente di potenziale

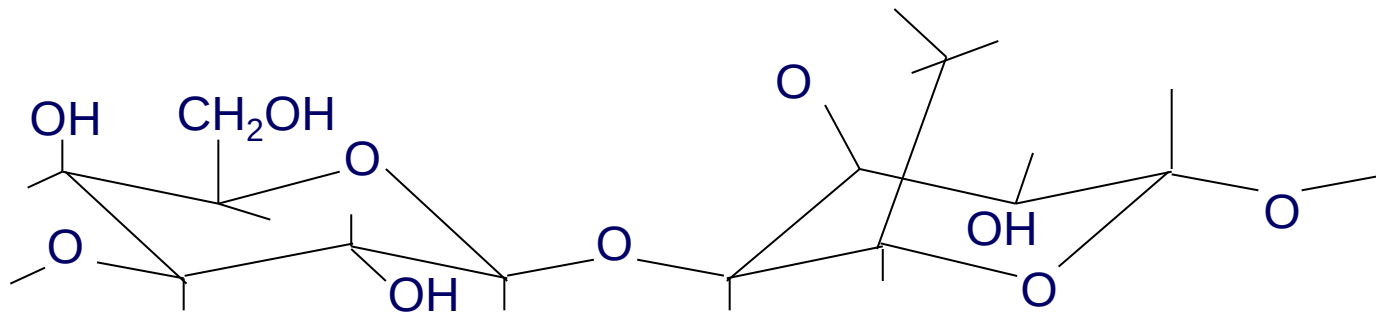
La molecola di carica  $q$  (coulomb) subisce una forza  $Eq$  (newton)  
Se  $f$  = coefficiente frizionale, la velocità di migrazione  $v$  è data da :

$$v = \frac{Eq}{f}$$

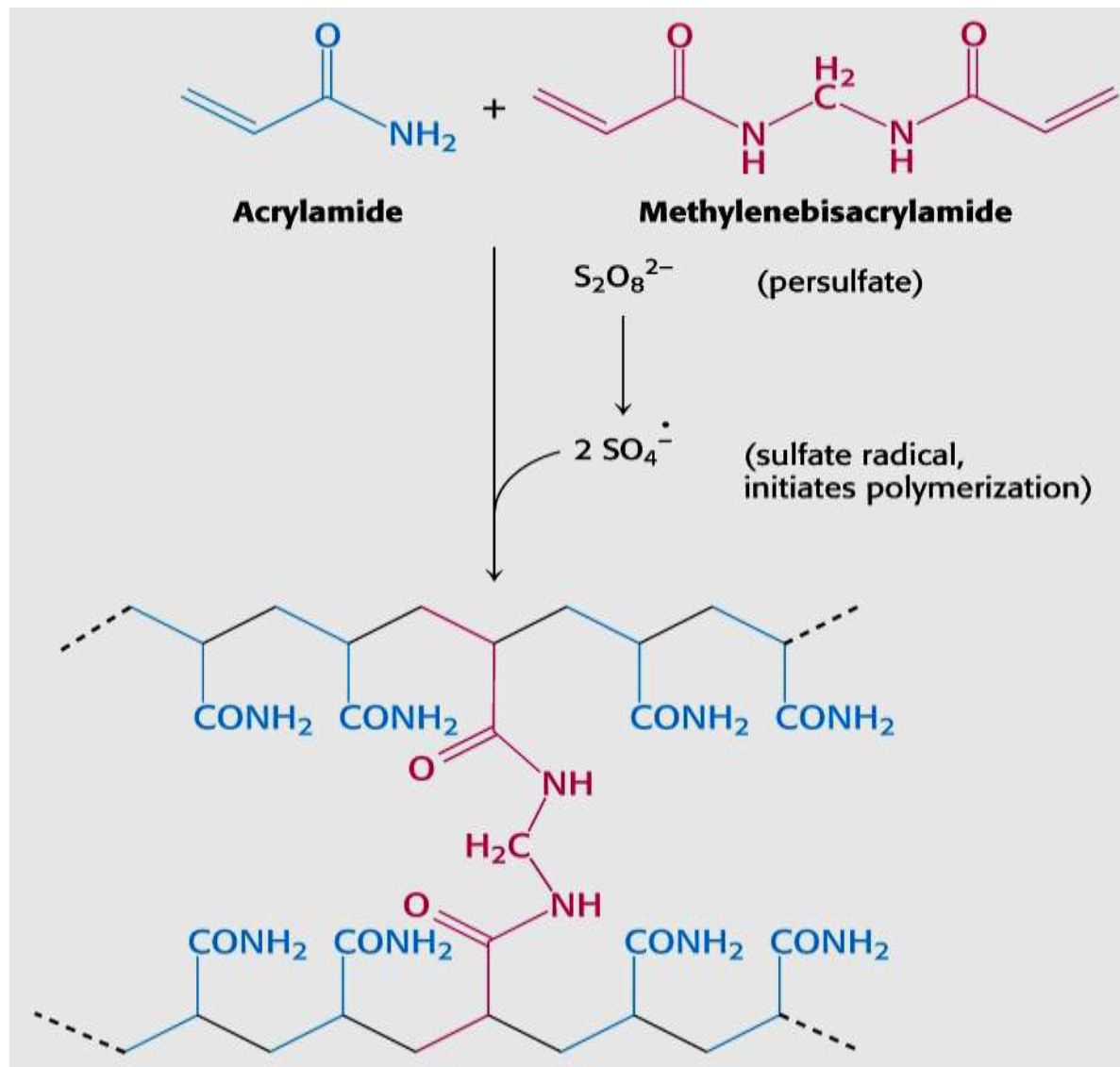
# Supporti per l'elettroforesi

- Agarosio

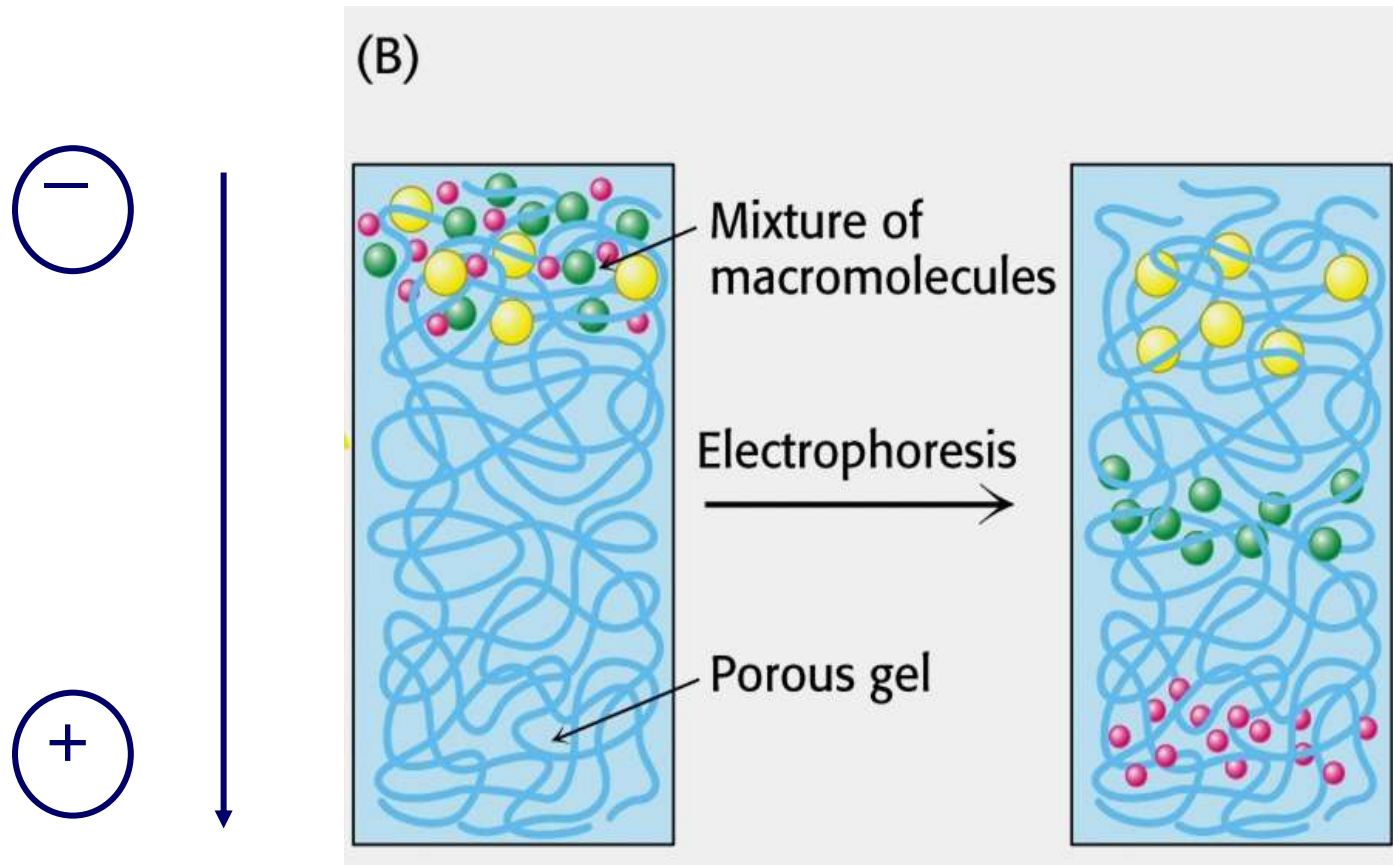
E' un **polimero** di agarobiosio (**polisaccaride** componente dell'agar).  
Viene sciolto al calore in opportuno tampone, versato nella cella elettroforetica e lasciato raffreddare

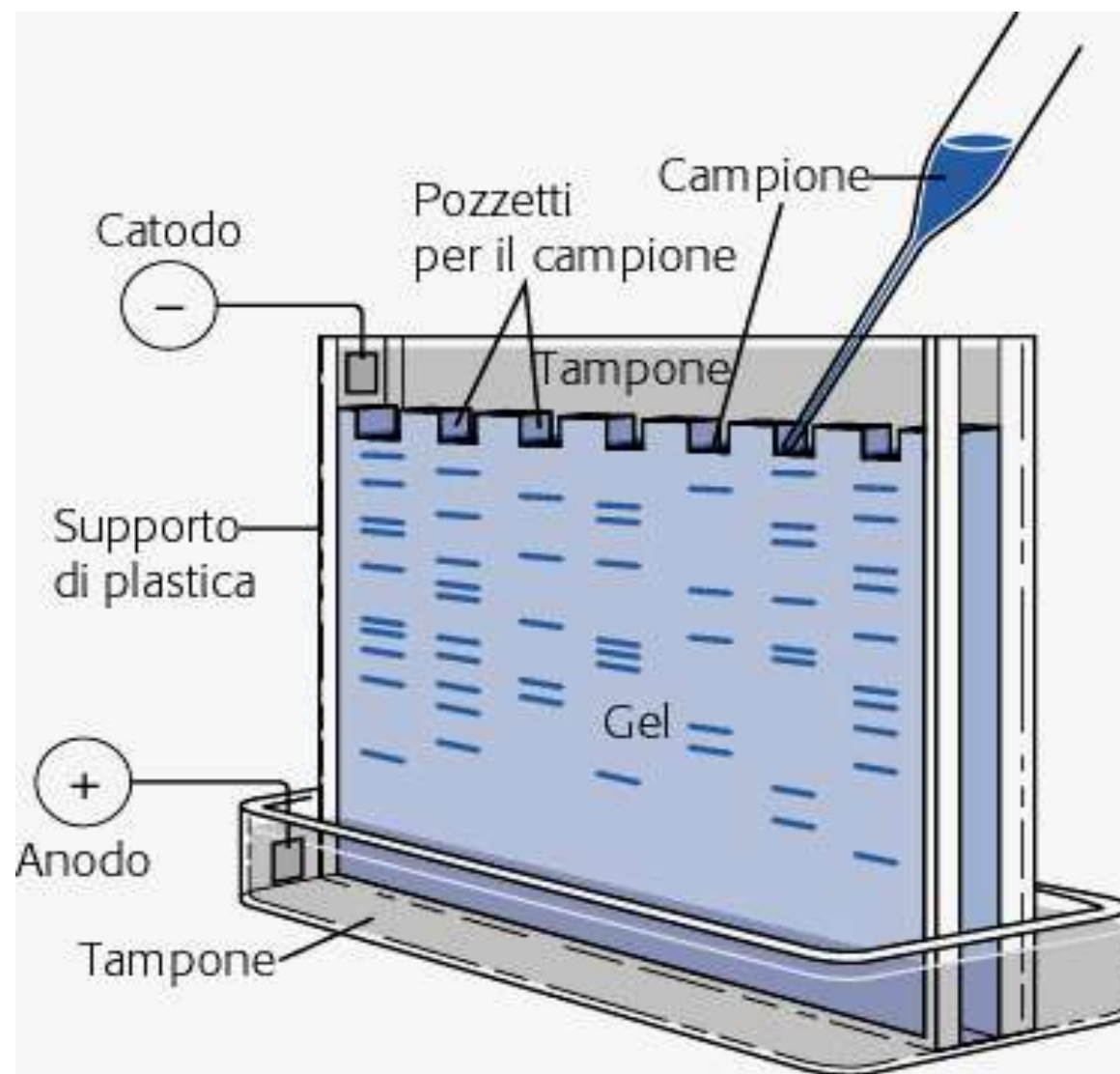


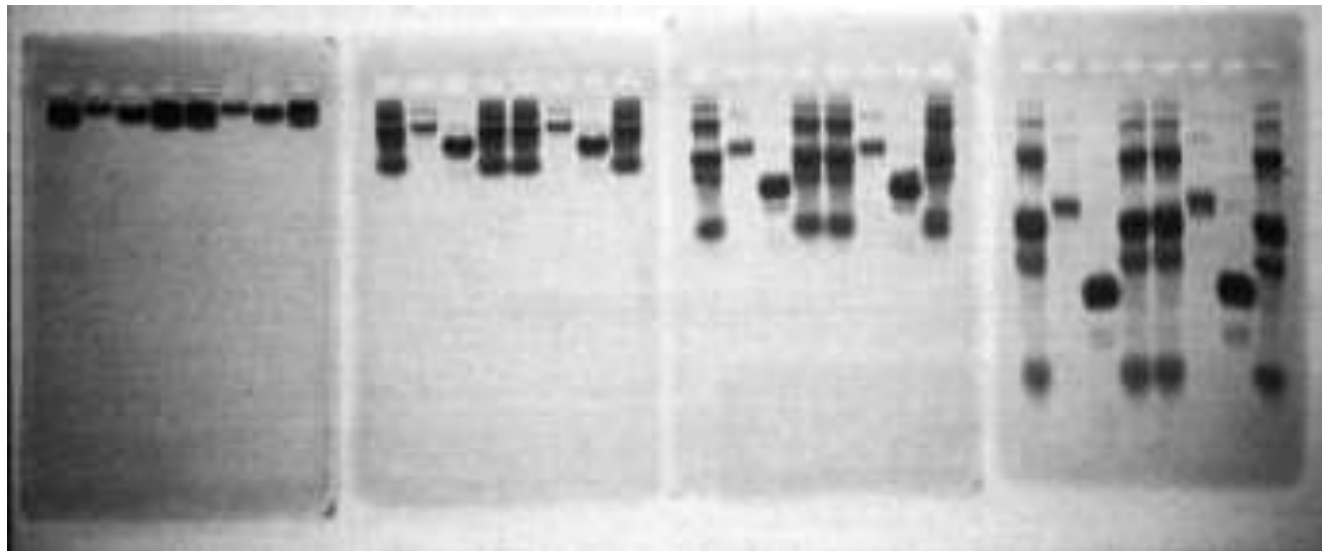
# Supporti per l'elettroforesi



## Il supporto agisce da setaccio molecolare







5

5

45

65

Electrophoresis Time (Minutes)

## Colorazione delle bande di proteine.1

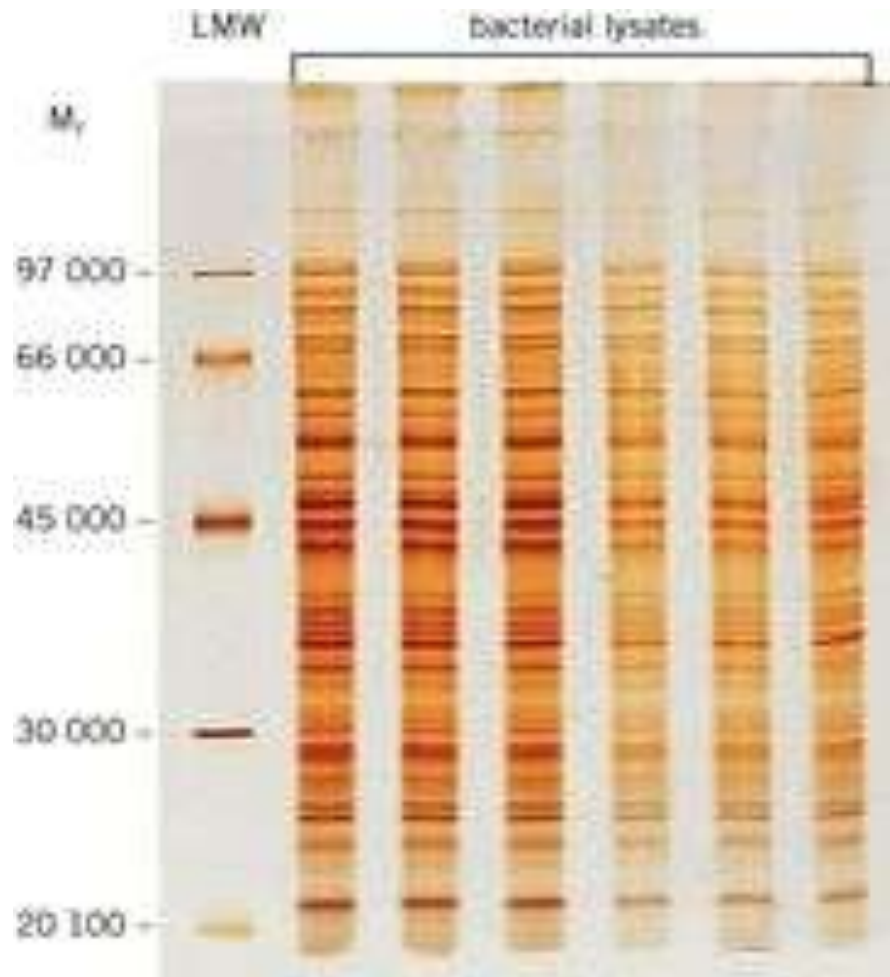


Blu di Coomassie



Rosso di Ponceau

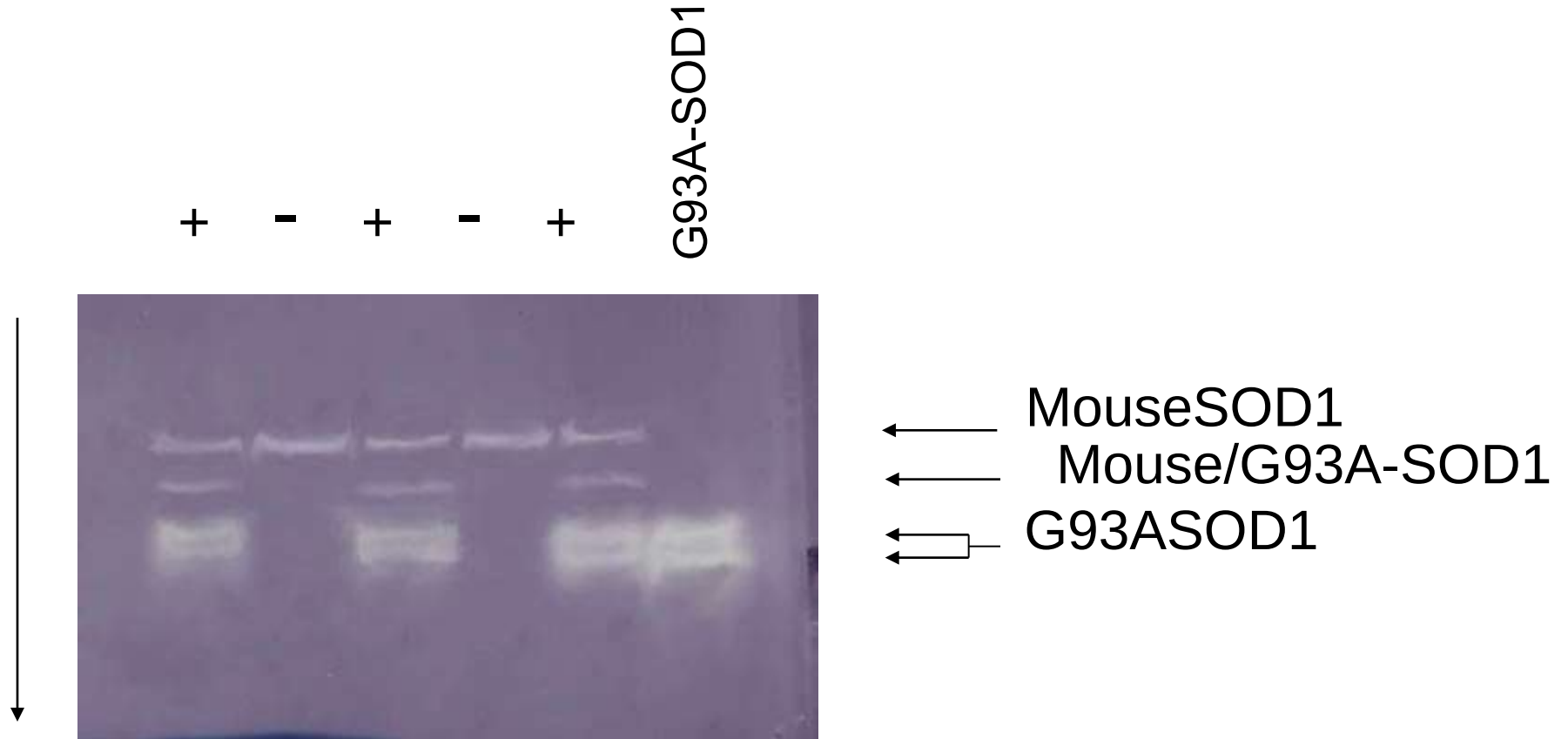
## Colorazione delle bande di proteine.2



Silver staining

## Colorazione delle bande di proteine.3

Individuazione di attività enzimatica mediante colorazione specifica

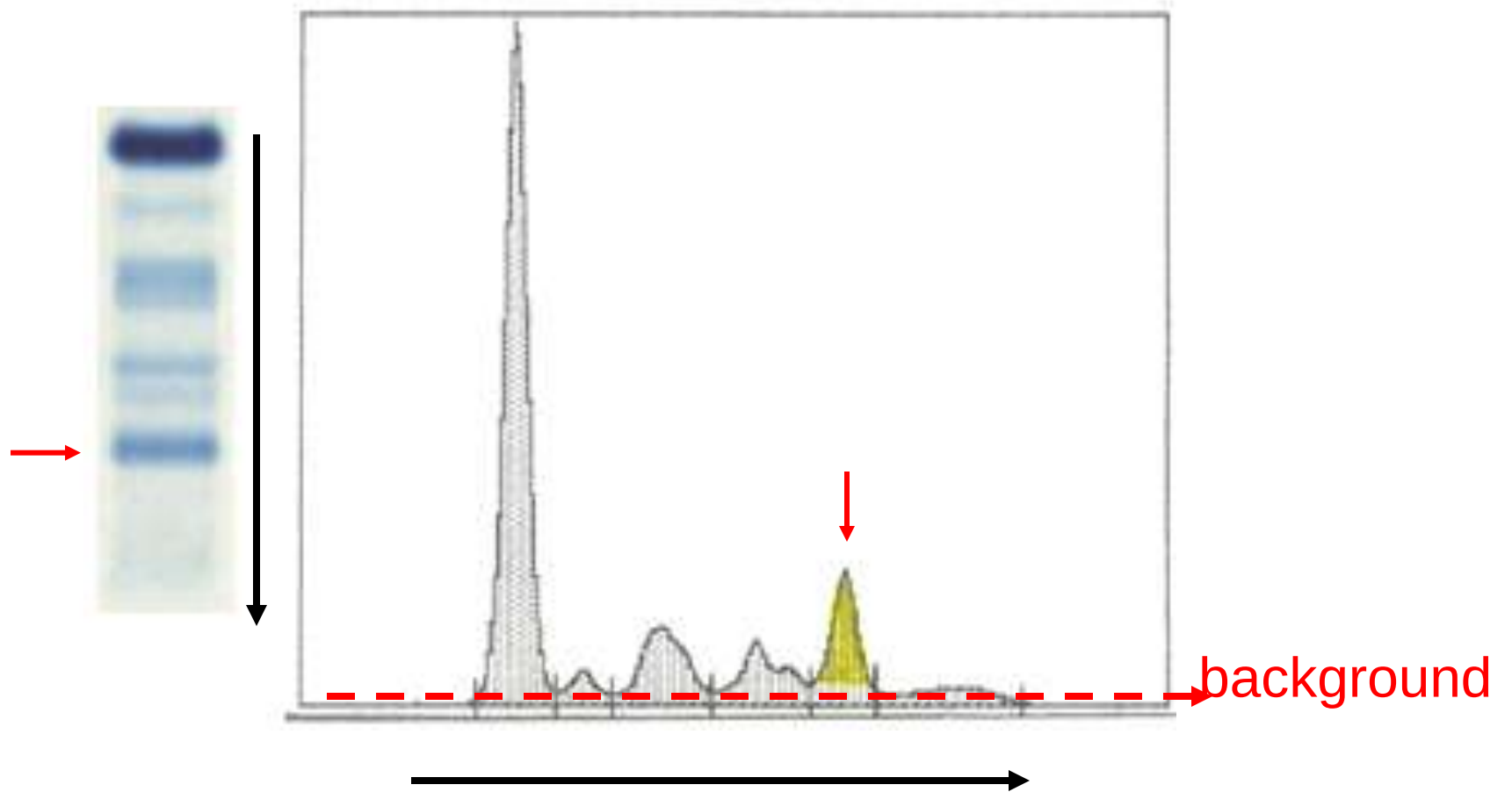


# Detection

Detection is the step where you generate and acquire signal. The signal can be captured using **autoradiography films, storage phosphor screens and image acquisition systems**, depending upon your **labeling method** and the required levels of sensitivity and resolution

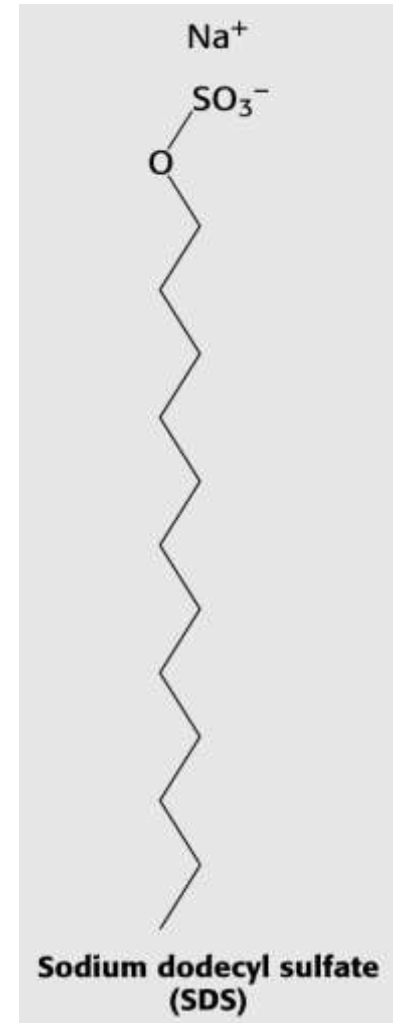
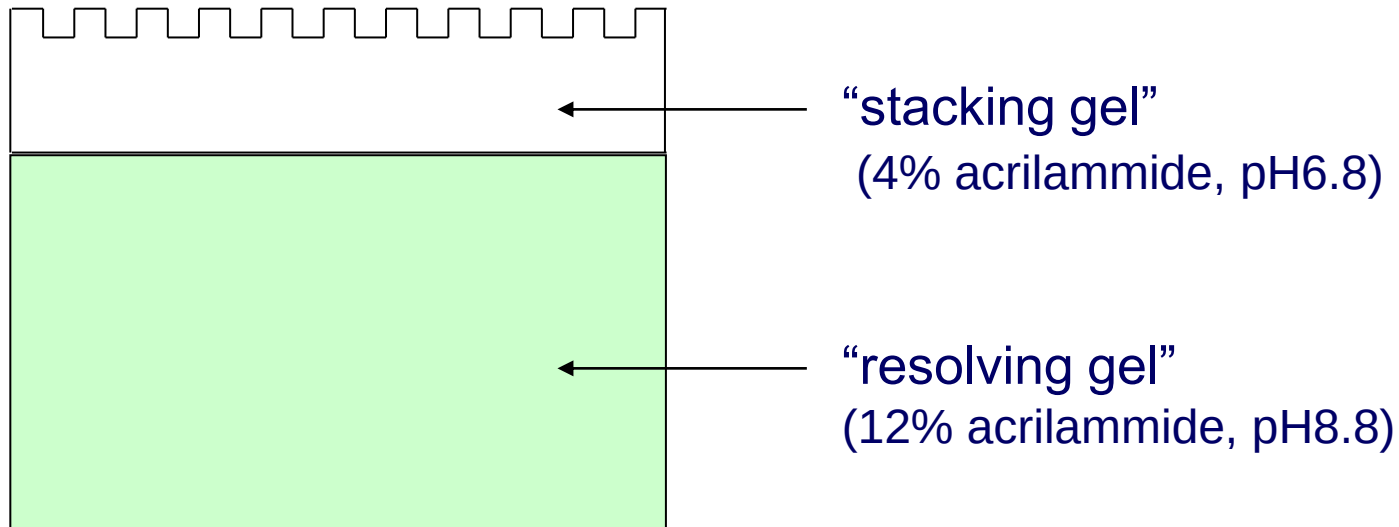


# Quantitation

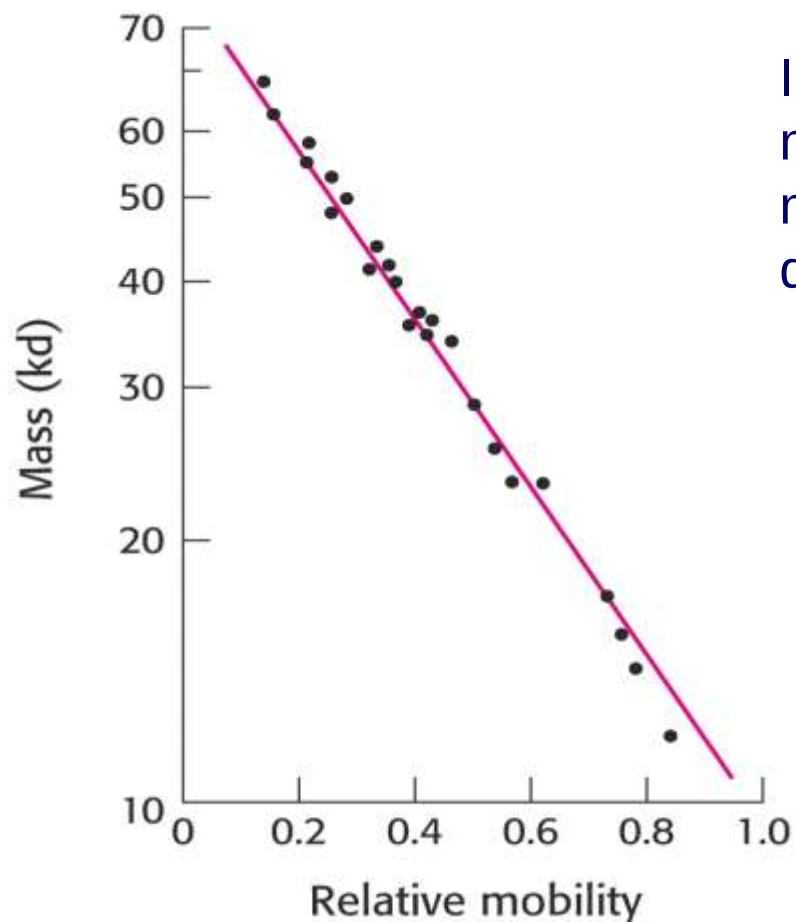


# Discontinuous SDS-PAGE

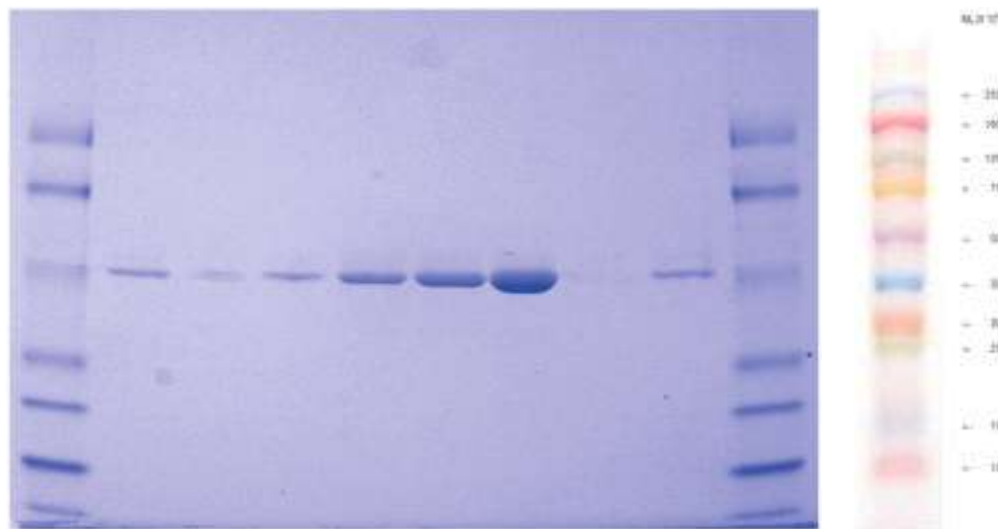
## Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis in SDS



# Determinazione del PM di una proteina mediante SDS-PAGE

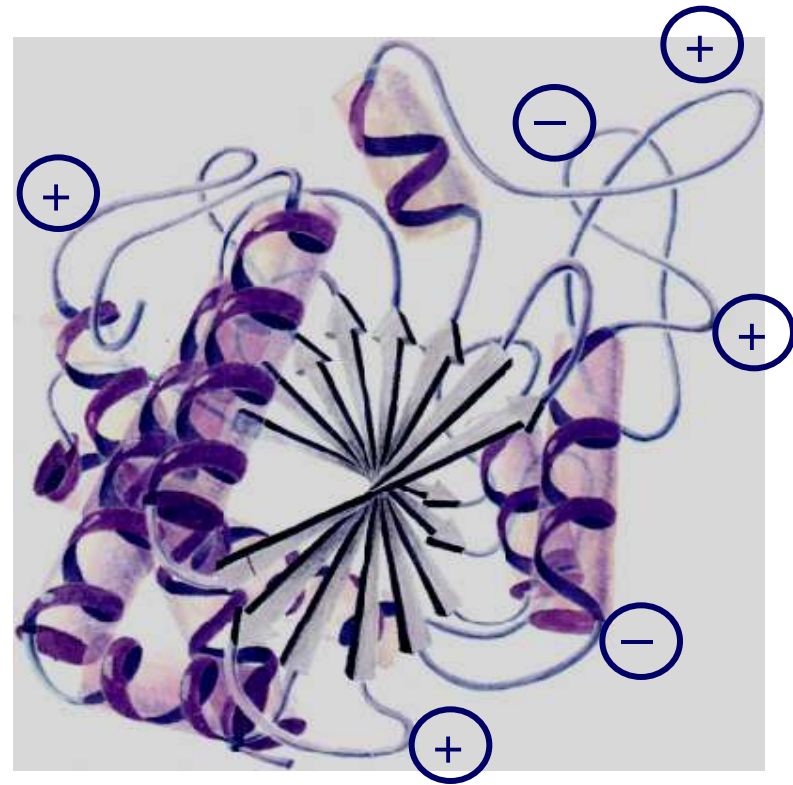
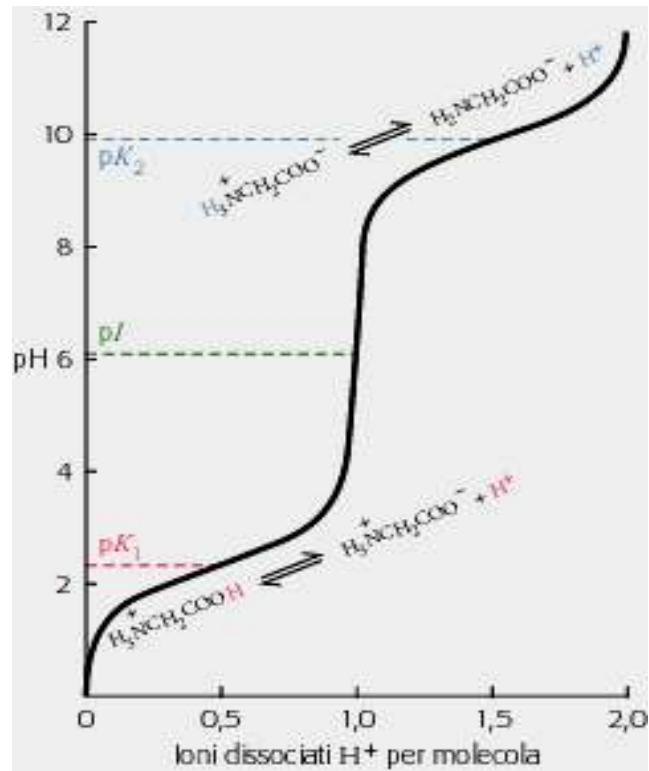


In un gel di acrilammide e SDS la mobilità relativa di una specie molecolare è proporzionale al log della massa molecolare.



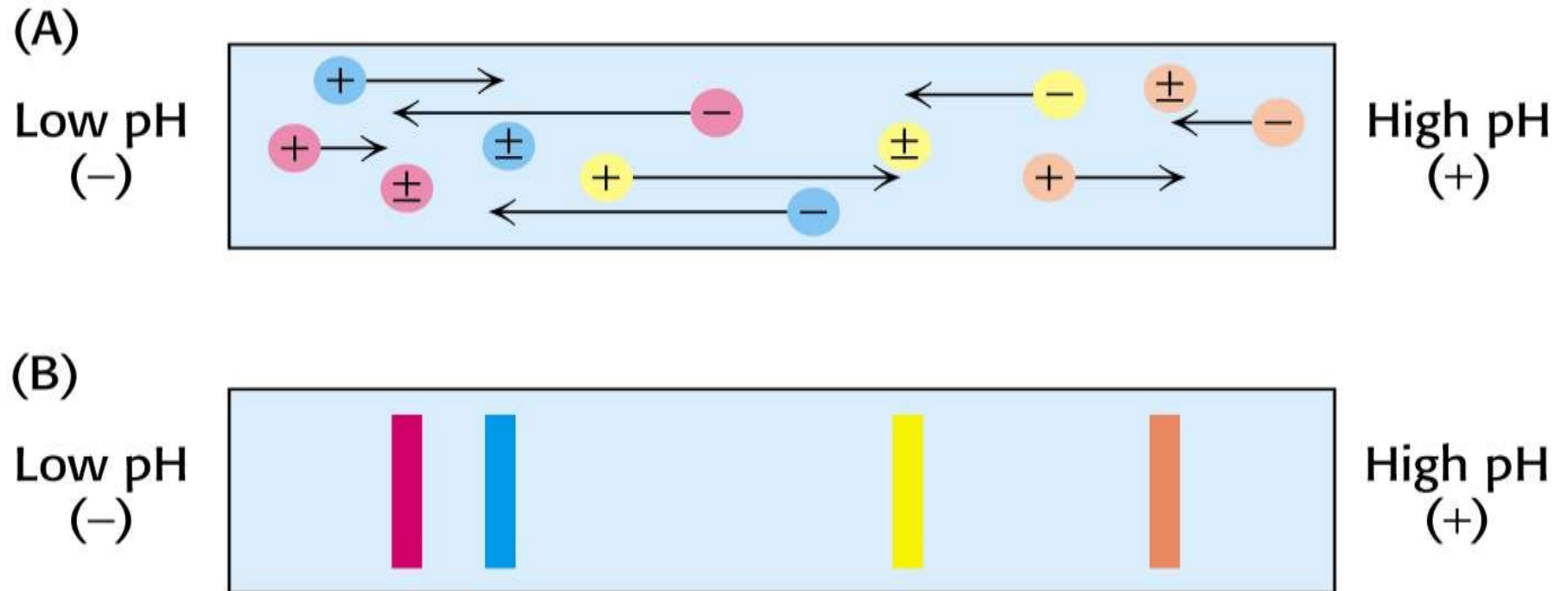
La carica elettrica di una proteina dipende dai residui aa carichi (acidi o basici) esposti sulla superficie.

Le proteine hanno un PUNTO ISOELETTRICO (pI) che corrisponde al valore di pH a cui hanno carica nulla.



# ISOELECTROFOCUSING

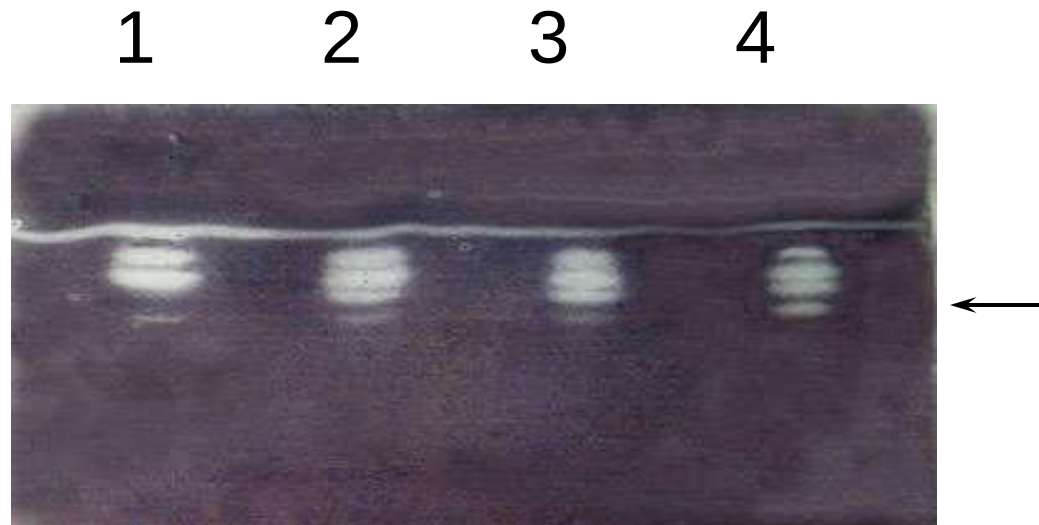
Le proteine si possono separare elettroforeticamente in base ai loro  $pI$



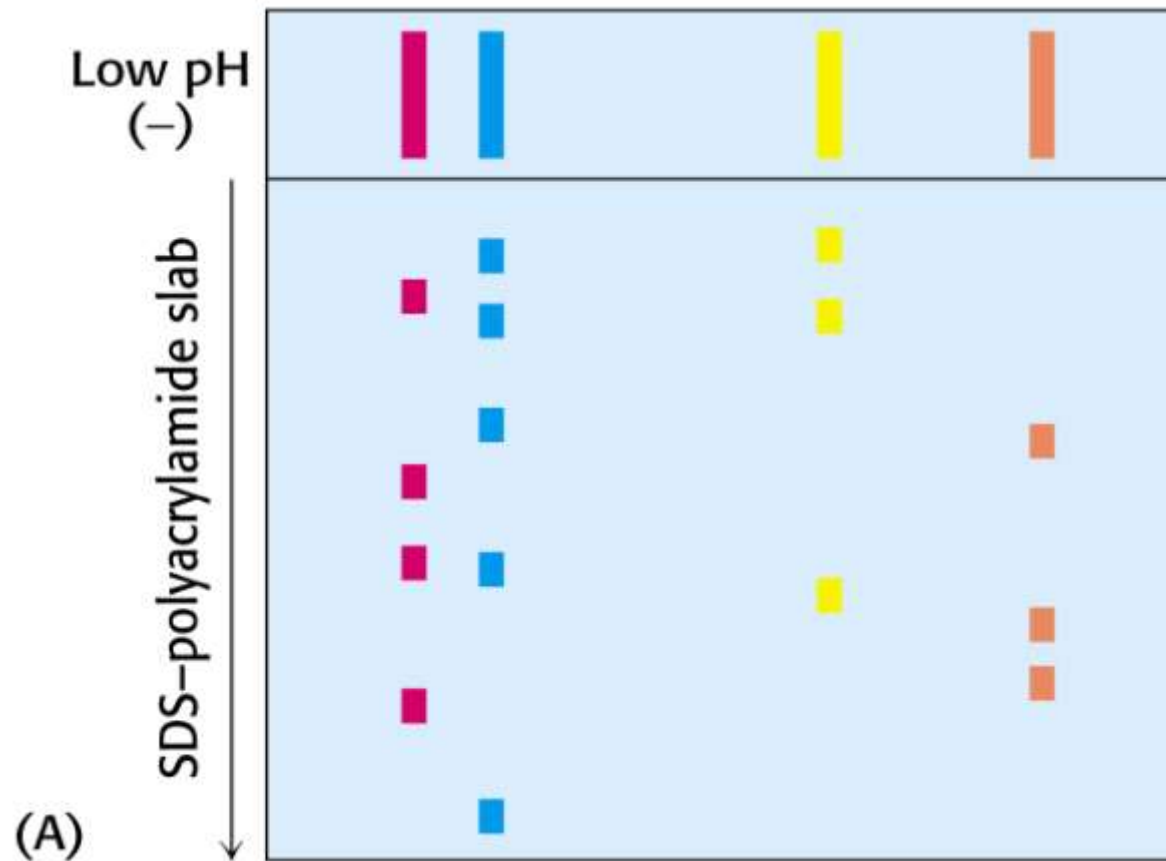
## IEF = Iso-Electro-Focusing = focalizzazione isoelettrica

La corsa elettroforetica viene effettuata in un gel in cui è stato preformato un **gradiente di pH** utilizzando una miscela di polianfoliti.

Al punto isoelettrico (pI) la carica netta è = 0 e pertanto la mobilità elettroforetica è = 0.



Sfruttando **contemporaneamente** due diverse proprietà delle proteine si può ottenere una migliore separazione elettroforetica di miscele molto complesse (ad es. estratti citoplasmatici totali).



**Elettroforesi bidimensionale**

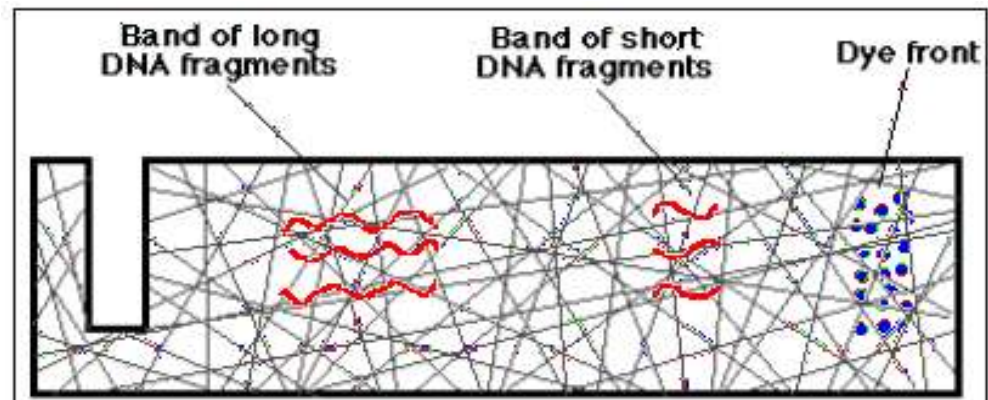
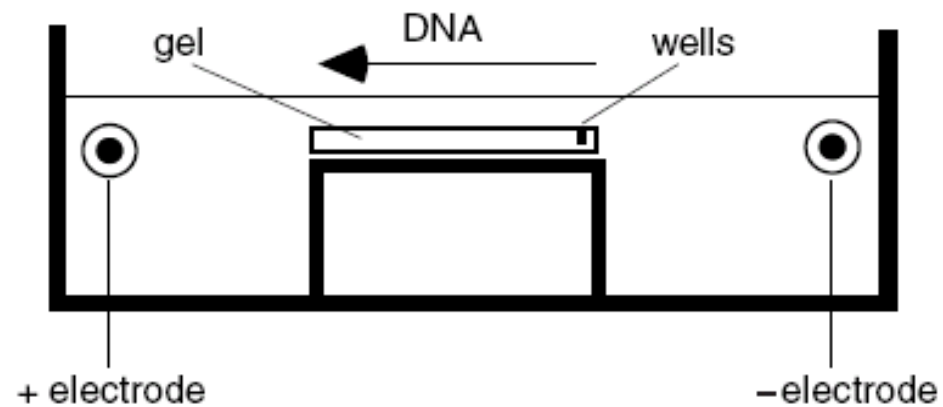
(B)

Isoelectric focusing

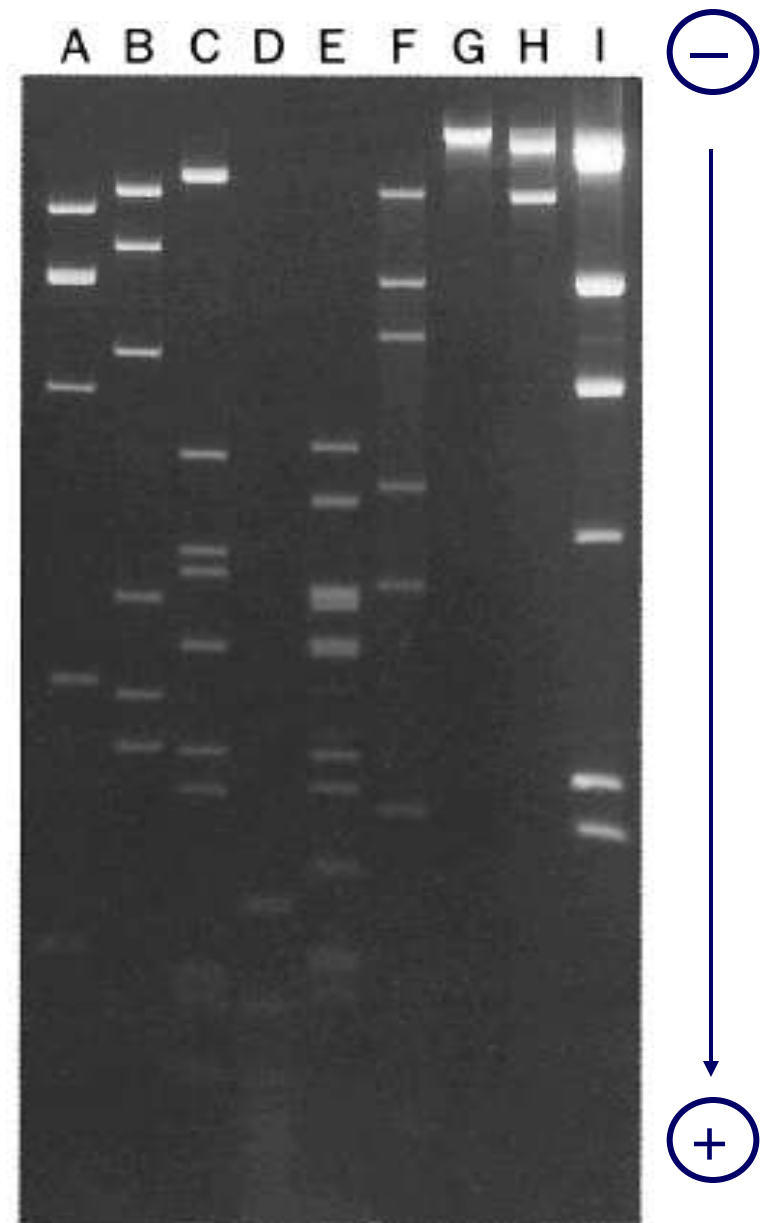
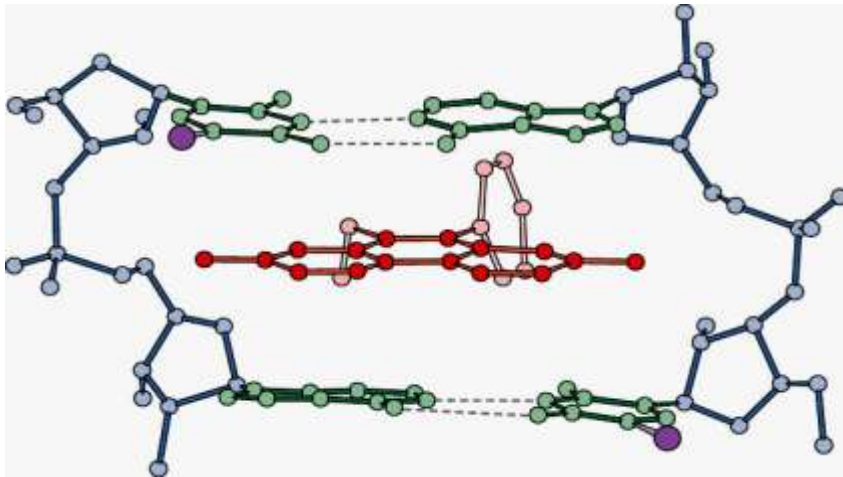
SDS-PAGE

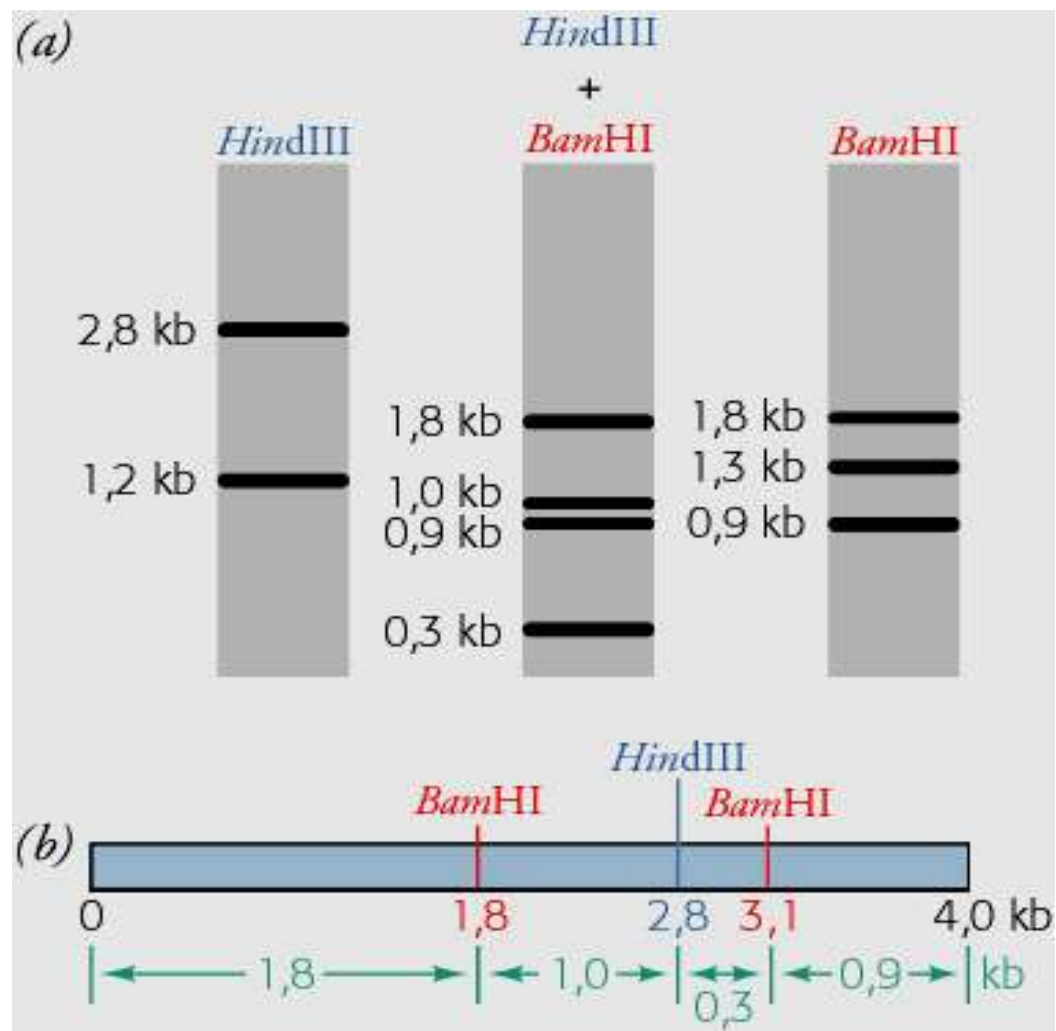


# Elettroforesi di DNA

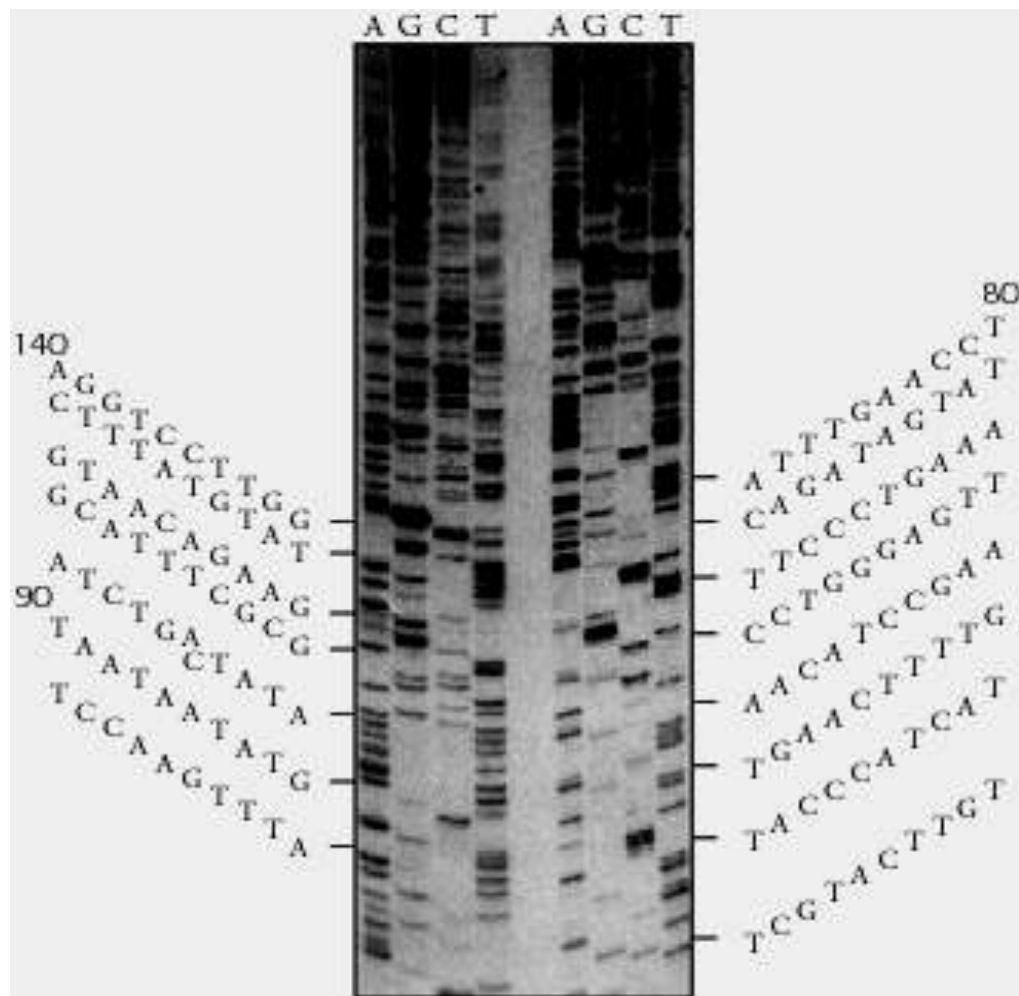


Separazione di frammenti di DNA  
mediante elettroforesi su gel di  
agarosio colorato con etidio  
bromuro





Si possono separare anche frammenti di DNA  
che differiscono di un solo nucleotide



# Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

