

ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMIDE IN PRESENZA DI SODIO DODECILSOLFATO (SDS-PAGE)

L' SDS-PAGE è la tecnica di più largo impiego per l'analisi qualitativa di miscele di proteine. Prevede l'impiego del sodio dodecilsolfato (SDS) un detergente anionico che si lega alle proteine (ogni 2 aa legano una molecola di SDS) distruggendone quasi tutte le interazioni non covalenti. Le proteine vengono in questo modo distese in catene pressoché lineari e presenteranno una carica globale negativa proporzionale alla loro massa.

Inoltre, l'aggiunta di riducenti quali il ditionitrito (DTT) o il 2-mercaptoetanololo provoca la riduzione di eventuali legami disolfuro presenti tra i residui di cisteina.

Per la separazione delle proteine si usa un supporto costituito da un gel di poliacrilamide.

I gel di poliacrilamide: sono i mezzi di supporto più utilizzati poiché:

1. chimicamente inerti
2. la porosità può essere controllata variando la percentuale di acrilamide e bisacrilamide che formano legami trasversali nel processo di polimerizzazione.

I complessi SDS-proteina sottoposti ad elettroforesi in gel di poliacrilammide, contenente SDS, migrano tutti

verso l'anodo e, vengono separati in base al loro peso molecolare per l'effetto di setaccio molecolare del gel di poliacrilammide dovuto alle dimensioni dei pori del gel. Ciò fa sì che le proteine più piccole migrano più rapidamente attraverso il gel, mentre quelle di dimensioni maggiori migrano più lentamente.

Nella SDS-PAGE si utilizza un gel discontinuo composto da *stacking gel* nel quale vengono formati i pozzetti in cui vengono depositati i campioni da analizzare, e da *running gel* (gel di corsa) che è la matrice in grado di separare le singole macromolecole.

Lo *stacking gel* ha la funzione di impaccare, comprimere e quindi concentrare i componenti proteici, mentre il *running gel* è la matrice in cui avviene la vera e propria separazione.

I campioni da analizzare devono essere previamente solubilizzati in un tampone contenente SDS, agenti riducenti (ad es. β -mercaptoetanolo), un addensante (saccarosio o glicerolo) ed un tracciante colorato (blu di bromofenolo) che permette di seguire l'andamento della corsa elettroforetica.

Soluzioni

1) *Soluzione di acrilammide al 30%*

Disponibile in commercio già pronta per l'uso.

2) *Tampone Tris 1.5 M pH 8.8*

3) *Tampone Tris 1.0 M pH 6.8*

4) *Tampone di corsa pH 8,6:*

Tris 15.1 g

Glicina 72.0 g

SDS 5 g

Portare a 5 litri con H₂O.

Soluzione per la preparazione del gel Running (12% di acrilammide):

Soluzione di acrilammide al 30% 4.0 ml

Tris 1.5 M pH 8.8 2.5 ml

H₂O 3.3 ml

TEMED 10 µl

Persolfato di ammonio (APS) (10%) 100 µl

Soluzione per la preparazione del Stacking gel (5% di acrilamide):

Soluzione di acrilammide al 30%	0.83 ml
Tris 1.0 M pH 6.8	0.63 ml
H ₂ O	3.4 ml
TEMED	16 µl
Persolfato di ammonio (APS) (10%)	50 µl

Tampone per la solubilizzazione dei campioni:

Tris 50 mM pH 6.8	100 ml
SDS	2 g
Glicerolo	10 g
2-mercaptoetanololo	5 ml
Blu di bromofenolo	tracce

Bollitura dei campioni (100 °C per 10 min)

Per la completa denaturazione delle proteine.

Soluzione per la colorazione del gel:

Coomassie Blue R-250	0,5 g
Acido acetico	70 ml
Metanolo	500 ml

Portare ad un litro con H₂O deionizzata, lasciare in agitazione e filtrare.

Soluzione per la decolorazione del gel:

H ₂ O	600 ml
Acido acetico	100 ml
Metanolo	300 ml