

Elettroforesi di proteine su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)

a cura di G. Nappo

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide è una tecnica che permette di separare le proteine in un campo elettrico attraverso una matrice composta da acrilammide e bisacrilammide. Le proteine da analizzare si trovano in un tampone contenente SDS (sodio dodecil solfato) e DTT (ditiotreitolo): l'SDS è un detergente anionico che denatura le proteine e le carica negativamente, mentre il DTT è un agente riducente che rompe i ponti disolfuro, contribuendo a distruggere la struttura terziaria della proteina. A differenza dell'elettroforesi del DNA, nell'SDS-PAGE le proteine corrono verticalmente, verso il polo positivo situato nella parte bassa della cella.

Obiettivo

Analizzare un campione proteico tramite elettroforesi condotta su gel di poliacrilammide. In questo esperimento utilizziamo un gel a gradiente 4-20% che ci permette di separare con buona risoluzione sia molecole grandi che piccole all'interno dello stesso gel.

Procedimento

1. Impostare il termoblock alla temperatura di 95°C.
2. Incubare per 5 minuti a 95°C i campioni da caricare (per la preparazione dei campioni vedi protocollo "Purificazione del lisozima da albume di uovo").
3. Centrifugare i campioni per 30 secondi alla massima velocità.
4. Estrarre dalla busta il gel di poliacrilammide e rimuovere il nastro protettivo verde posto in basso. Attenzione: se viene lasciato il nastro, il passaggio di corrente tra i due elettrodi risulta bloccato.
5. Posizionare il gel all'interno della cella elettroforetica.
6. Aggiungere il tampone di corsa fino al livello indicato sulla cella.
7. Rimuovere il pettine e caricare i campioni nei pozzetti del gel.
8. Collegare gli elettrodi al generatore di corrente e impostare il potenziale a 190 V.
9. Fermare la corsa dopo circa 45 minuti, prima che il colorante blu sia fluoriscito dal gel.
10. Le proteine possono essere evidenziate trattando il gel con coloranti specifici (vedi protocollo "Colorazione delle proteine con Comassie Instant Blue").



Tempo previsto

1 ora

Materiale e Reagenti

- ✓ Guanti
- ✓ Provette
- ✓ Portaprovette
- ✓ Puntali
- ✓ Gel di poliacrilammide a gradiente 4-20%
- ✓ Tampone di corsa (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS)
- ✓ Marcatore di peso molecolare

Strumentazione

- ✓ Micropipette
- ✓ Centrifuga da banco
- ✓ Termoblock
- ✓ Apparato di corsa elettroforetica verticale
- ✓ Generatore di corrente