

Elettroforesi di proteine su gel di agarosio

a cura di G. Nappo

L'agarosio è una matrice generalmente utilizzata per condurre esperimenti di elettroforesi del DNA. Alcune particolari preparazioni di agarosio, però, sono adatte anche alla corsa di proteine perché formano gel dalle maglie più strette. Rispetto alla poliaccrilammide, infatti, l'agarosio presenta una serie di vantaggi: non è tossico e non necessita di additivi per la formazione del gel, inoltre, la corsa può avvenire orizzontalmente, utilizzando gli stessi apparati impiegati per l'elettroforesi del DNA. È possibile lavorare in condizioni native o denaturanti: nel primo caso le proteine migreranno verso uno dei due poli in base alla loro carica; nel secondo, si muoveranno tutte verso il polo positivo e si separeranno solo in base al peso molecolare poiché sono trattate con un detergente anionico che conferisce loro carica negativa.

Obiettivo

Analizzare un campione proteico tramite elettroforesi condotta su gel di agarosio. In questo esperimento utilizziamo un gel al 5% che permette di separare con buona risoluzione anche proteine di piccole dimensioni come il lisozima (circa 14 kDa).

Procedimento

1. Pesare 2.5 g di agarosio in polvere.
2. Aggiungere 50 ml di Tampone 1 e sciogliere la soluzione in un forno a microonde.
3. Allestire la slitta per l'elettroforesi.
4. Colare il gel nella slitta per elettroforesi opportunamente preparata.
5. Verificare l'assenza di bolle soprattutto all'altezza del pettine. Attendere il raffreddamento e la gelificazione dell'agarosio.
6. Trasferire il gel solidificato a 4°C per 30 minuti.
7. Impostare il termoblock alla temperatura di 95°C.
8. Incubare per 5 minuti a 95°C i campioni da caricare (per la preparazione dei campioni vedi protocollo "Purificazione del lisozima da albune di uovo").
9. Centrifugare i campioni per 30 secondi alla massima velocità.
10. Allestire la cella elettroforetica, aggiungendo il Tampone 2 fino al livello MAX.
11. Caricare il marcatore di peso molecolare in un pozzetto del gel.
12. Caricare il campione di proteine nel pozzetto accanto.
13. Collegare gli elettrodi al generatore di potenziale e impostare il generatore di potenziale a 100 V.
14. Fermare la corsa prima che il colorante blu sia fluoriscito dal gel.
15. Disassemblare la cella elettroforetica. Le proteine possono essere evidenziate trattando il gel con coloranti specifici (vedi protocollo "Colorazione delle proteine con Comassie Instant Blue").



Tempo previsto

Circa 2 ore

Materiale e Reagenti

- ✓ Guanti
- ✓ Provette
- ✓ Portaprovette
- ✓ Puntali
- ✓ Agarosio MetaPhor LONZA
- ✓ Tampone 1 (90 mM TRIS, 90 mM acido bórico)
- ✓ Tampone 2 (90 mM TRIS, 90 mM acido bórico, 0.1% SDS, pH 8.5)
- ✓ Marcatore di peso molecolare

Strumentazione

- ✓ Micropipette
- ✓ Forno a microonde
- ✓ Apparato di corsa elettroforetica
- ✓ Generatore di corrente
- ✓ Termoblock
- ✓ Centrifuga