

**CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA PER LA
SOSTENIBILITÀ**



**BIOCHIMICA APPLICATA
(6 CFU)**

LEZIONE 3

Prof. Paola Di Donato

Dipartimento di Scienze e Tecnologie

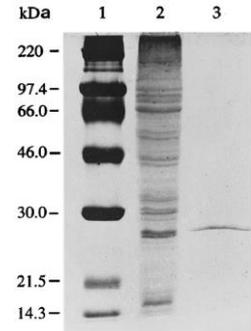
Stanza 520, V piano lato NORD

Tel. 081 547 6625

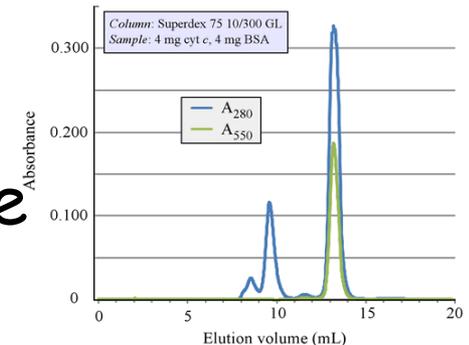
E-mail: paola.didonato@uniparthenope.it

Criteri di purezza

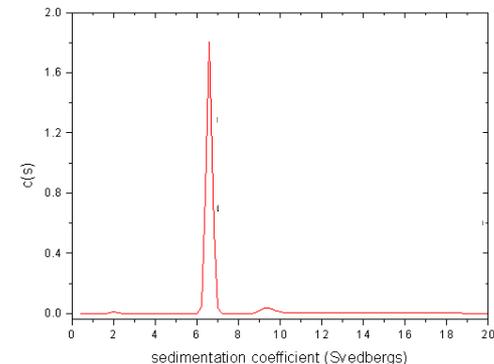
✓ Elettroforesi nativa e in SDS (SDS-PAGE)



✓ Cromatografia per esclusione molecolare

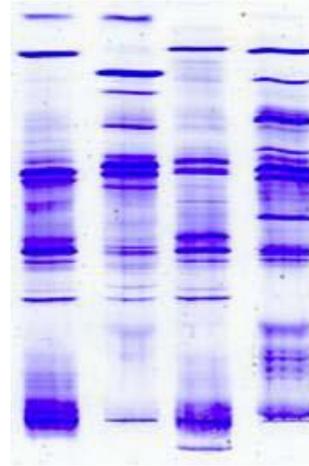


✓ Ultracentrifugazione analitica

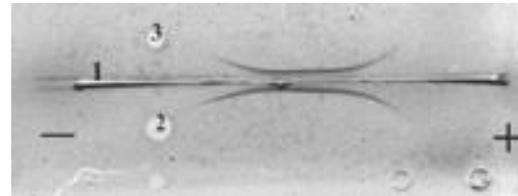


Criteri di purezza

✓ Focalizzazione al pI

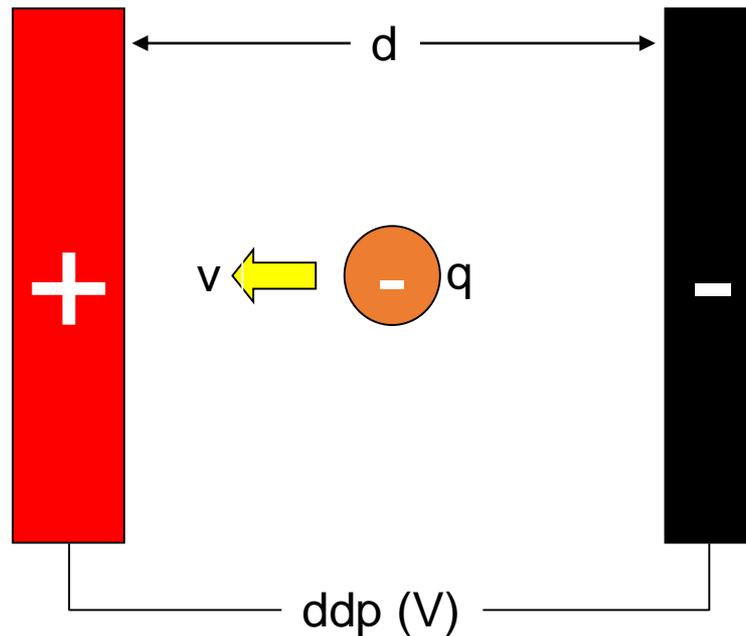


✓ Metodi immunochimici



ELETTROFORESI

*Migrazione di particelle cariche sotto l'azione di un campo elettrico.
Tecnica soprattutto **ANALITICA** ma anche **PREPARATIVA**.*



Una molecola con una carica netta non nulla posta tra due elettrodi di segno opposto migra verso l'elettrodo con segno opposto alla sua carica netta

ELETTROFORESI SU SUPPORTO (GEL)

Elettroforesi verticale

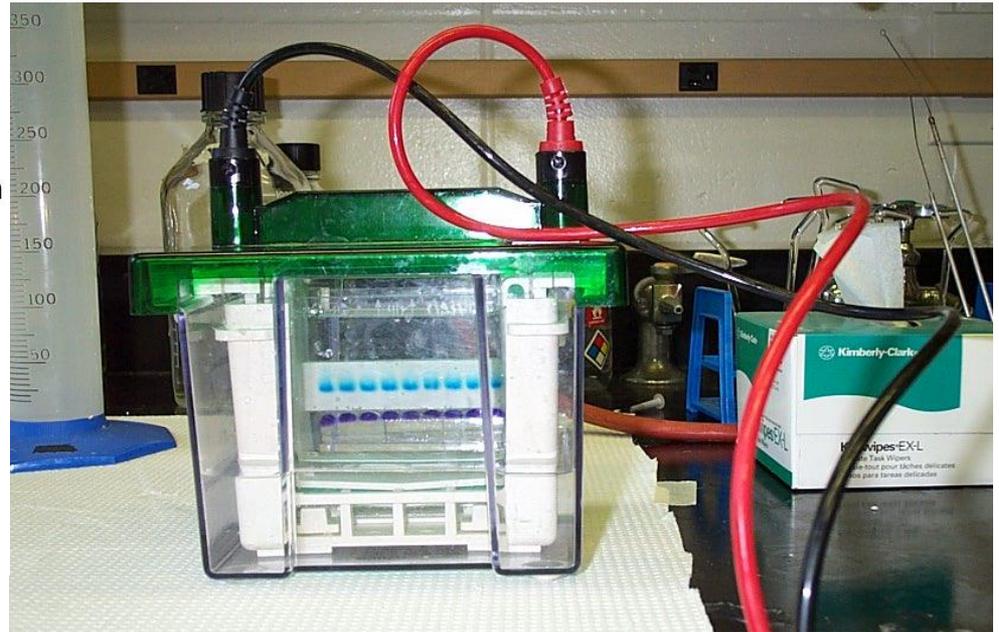
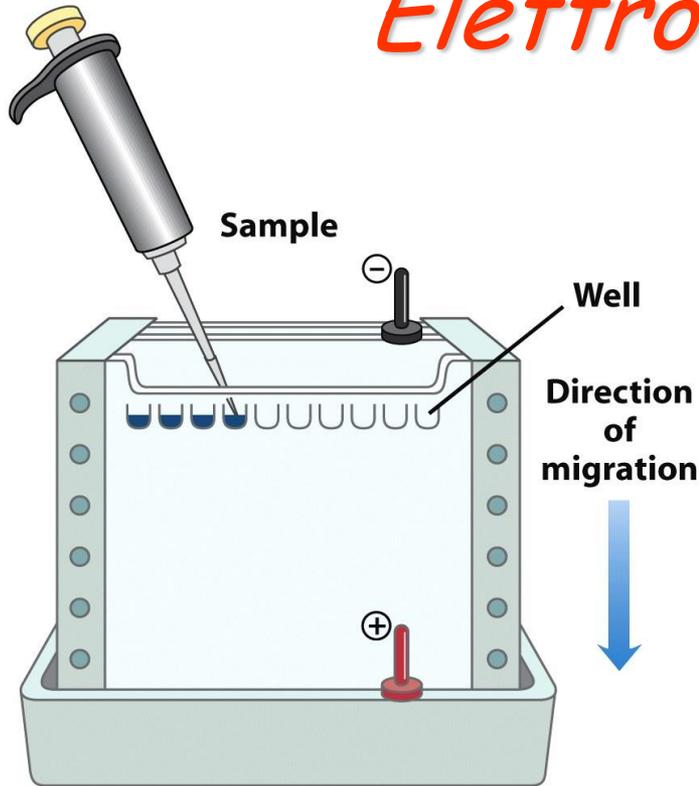
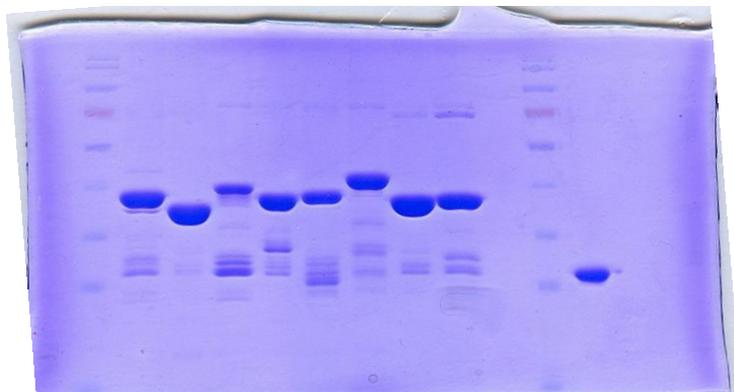


Figure 3-18a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Rivelazione, s:

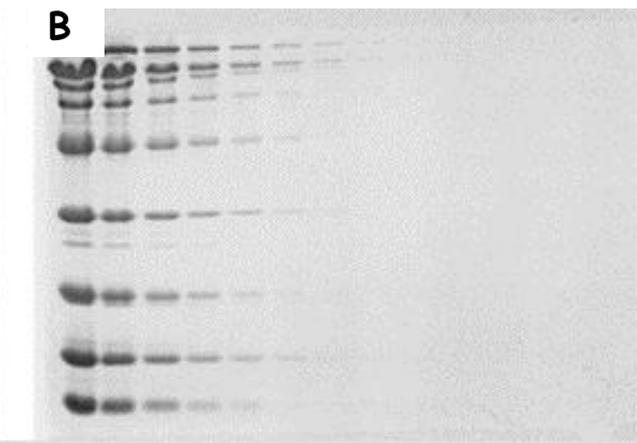
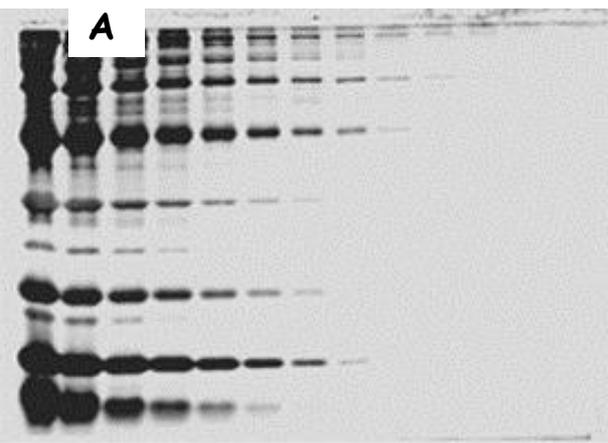
Alla fine della corsa il ael può essere colorato con blu Coomassie. Il



densito-
metria a
scansione

elettro-
eluizione

Comparison of the sensitivity achieved with Silver and Coomassie brilliant blue stains.



Identical polyacrylamide gels were stained with:

A) silver stain and

B) Coomassie brilliant blue stain, according to standard protocols.

The PageSilver™ (Silver Staining Kit) is a complete system for rapid and sensitive staining of proteins in polyacrylamide gels. Approximately, **0.05-0.6 ng of protein** per band can be visualized in an essentially clear background. This is **>100 times more sensitive** than traditional Coomassie Brilliant Blue R250 staining and allows for superior detection of low abundance proteins.

The PageSilver™ Silver Staining Kit is based on the use of silver nitrate to bind proteins at a weakly acidic pH and subsequent reduction of silver ions to metallic silver by formaldehyde at an alkaline pH

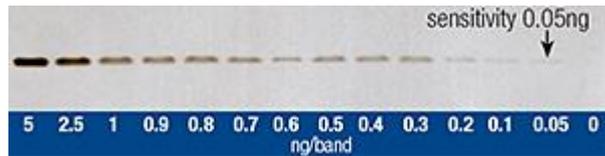


Figure 1. High sensitivity of staining with PageSilver™ Silver Staining Kit.

Different amounts of BSA were run on 4-12% Tris-glycine SDS-PAGE and stained with the PageSilver™ Silver Staining Kit

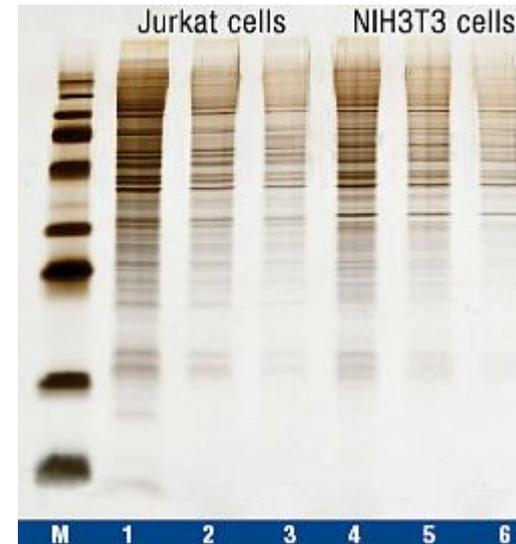


Figure 2. Highly sensitive protein staining with PageSilver™ Silver Staining Kit. Different amounts of cell lysates were separated on 4-12% Tris-glycine SDS-PAGE and stained with the PageSilver™ Silver Staining Kit.

M - PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder

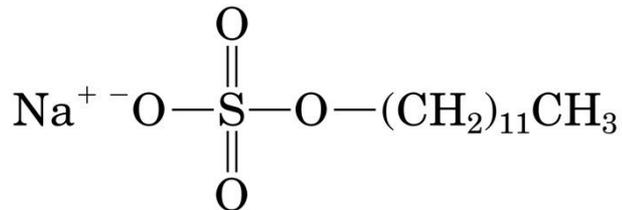
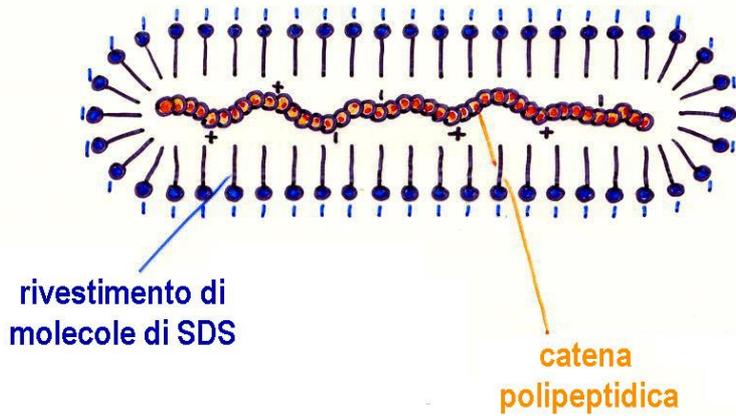
1, 4 - 500 ng of total protein

2, 5 - 200 ng of total protein

3, 6 - 100 ng of total protein

SDS-PAGE

(Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis)



Sodium dodecyl sulfate
(SDS)

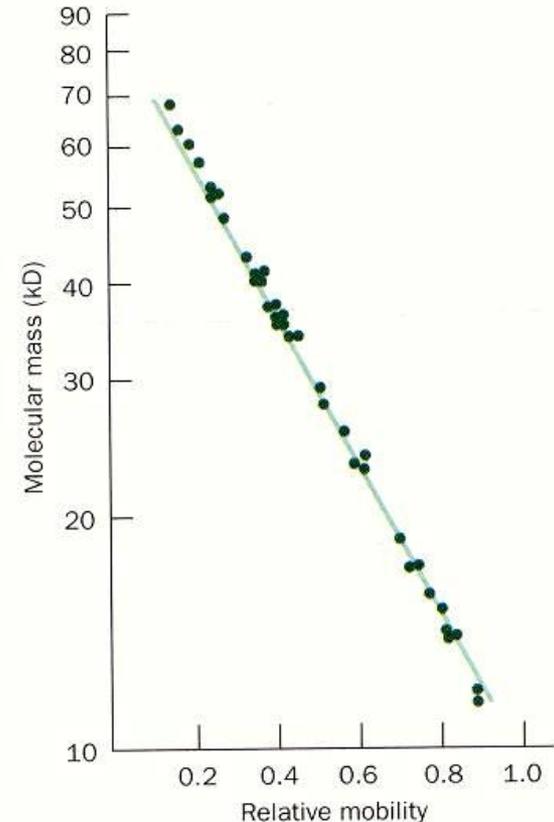
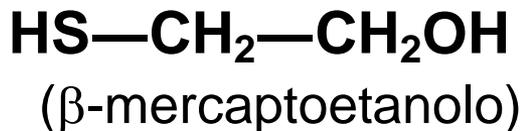
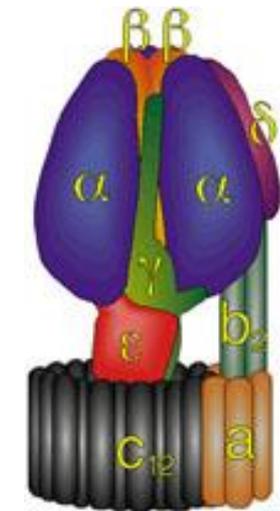


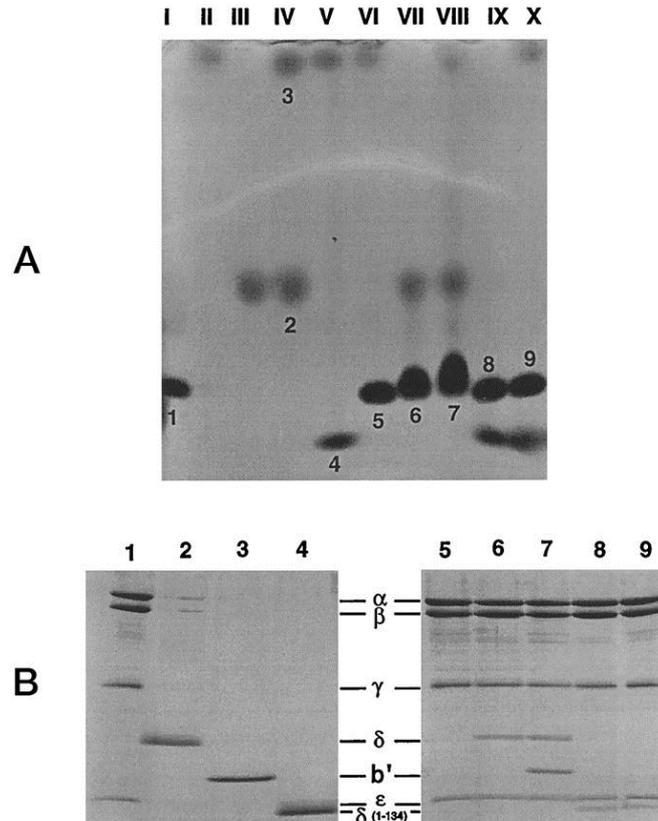
Figure 5-27

A logarithmic plot of the molecular masses of 37 different polypeptide chains ranging from 11 to 70 kD versus their relative electrophoretic mobilities on an SDS-polyacrylamide gel. [After Weber, K. and Osborn, M., *J. Biol. Chem.* **244**, 4406 (1969).]

Elettroforesi di proteine in condizioni native e denaturate



F₁F₀-ATPase



(A) Analysis of binding of the b subunit cytoplasmic domain (b_{sol}) to ECF₁ and ECF₁ (-δ).

Mixtures of polypeptides were first analyzed by native agarose gel electrophoresis (A) through a 1% agarose gel.

Lanes from left to right:

I, ECF₁ (-δ);

II, b_{sol} ; **III**, δ;

IV, b_{sol} + δ ;

V, b_{sol} + δ₍₁₋₁₃₄₎;

VI, b_{sol} + ECF₁ (-δ);

VII, δ + ECF₁ (-δ) + δ₍₁₋₁₃₄₎;

VIII, b_{sol} + δ + ECF₁ (-δ);

IX, ECF₁ (-δ) + δ₍₁₋₁₃₄₎;

X, b_{sol} + ECF₁ (-δ) + δ₍₁₋₁₃₄₎;

(B) Bands were excised from the agarose gel and separated on a 10-18% gradient of polyacrylamide in SDS.

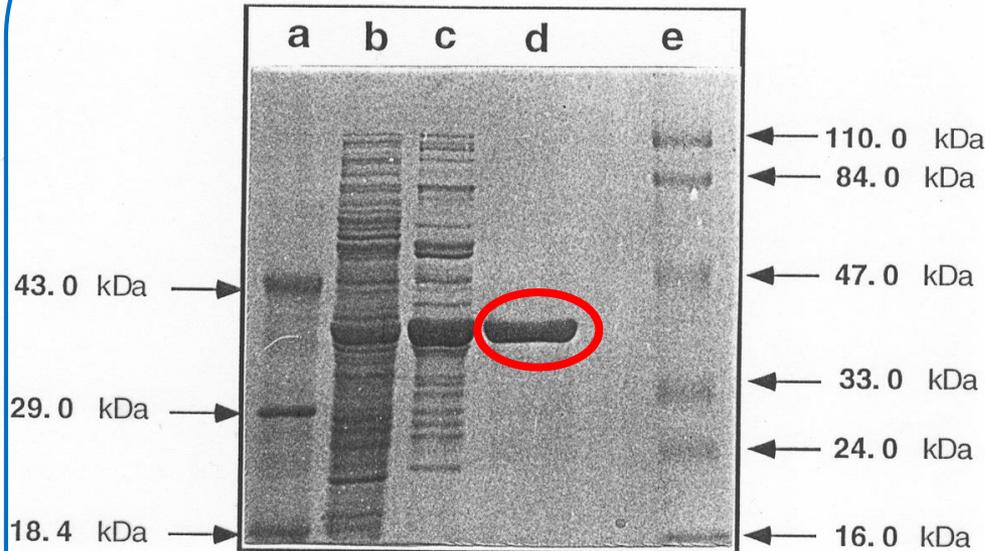
Rodgers et al (1997) J. Biol. Chem. 272: 31058

ECF₁ = *Escherichia coli* F₁-ATPase

Criteria di purezza: elettroforesi

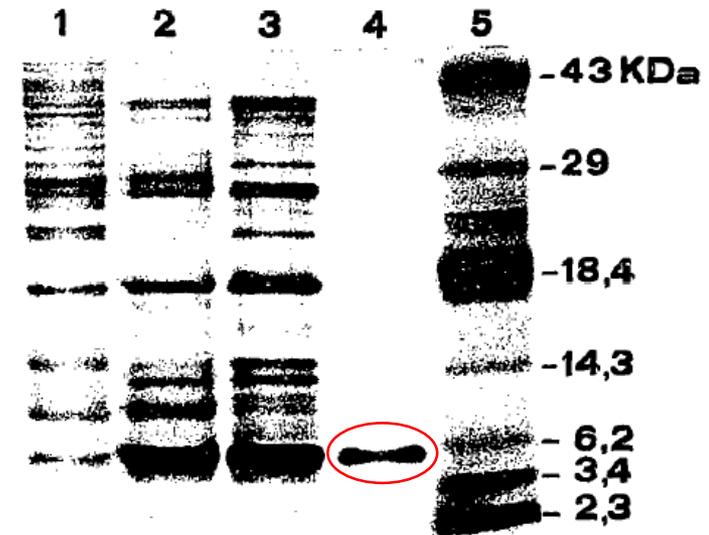
SDS-PAGE analysis of various steps in the purification of proteins

Proteina ricombinante ADH-hT



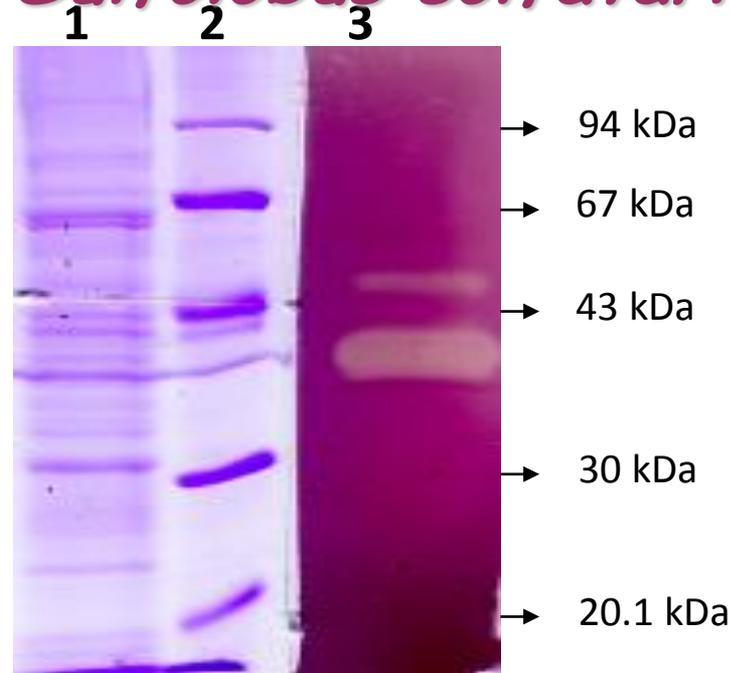
- a ed e.** Marker proteici di peso molecolare.
b. Omogenato di *E.coli* trasformate con il gene *adh-hT*
c. frazionamento al calore (due passaggi)
d. ADH-hT ricombinante dopo cromatografia di affinità.

Isolation of a thermostable enzyme catalyzing disulfide bond formation from *S.solfataricus*



- The samples (2 pg/lane) were:
- Crude extract (lane 1);
 - DEAE-Sepharose pool (lane 2);
 - Mono Q pool (lane 3);
 - Superdex 75 pool (lane 4);
 - Molecular weight markers (lane 5).

Analisi mediante CMC-SDS PAGE dell'attività cellulase nel mezzo di coltura di *Sulfolobus solfataricus*



corsia 1 : frazione proteica ottenuta dal soprannatante della coltura di *S. solfataricus* cresciuto in DSM182 + 0.2 % glucosio

corsia 2: marcatori di peso molecolare

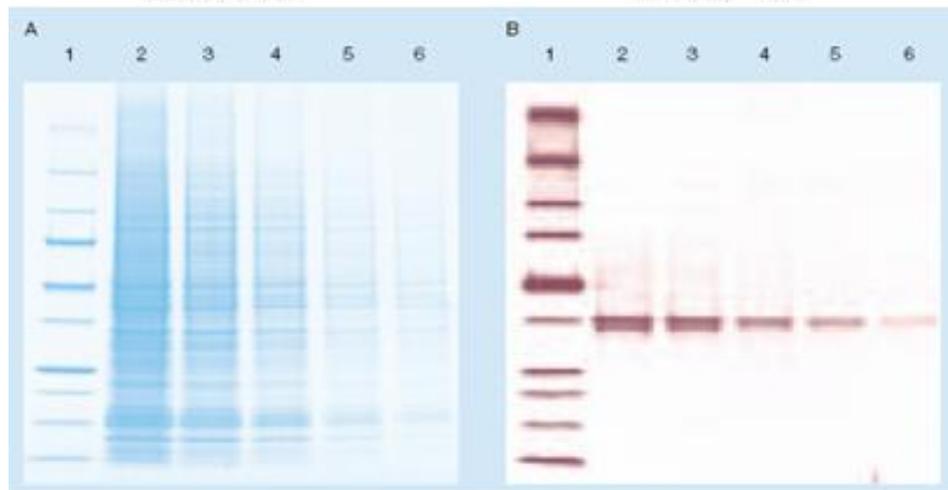
corsia 3: analisi mediante zimografia della frazione proteica caricata nella corsia 1

SDS PAGE and Western Blot to detect a protein of interest

HeLa Cell Lysate

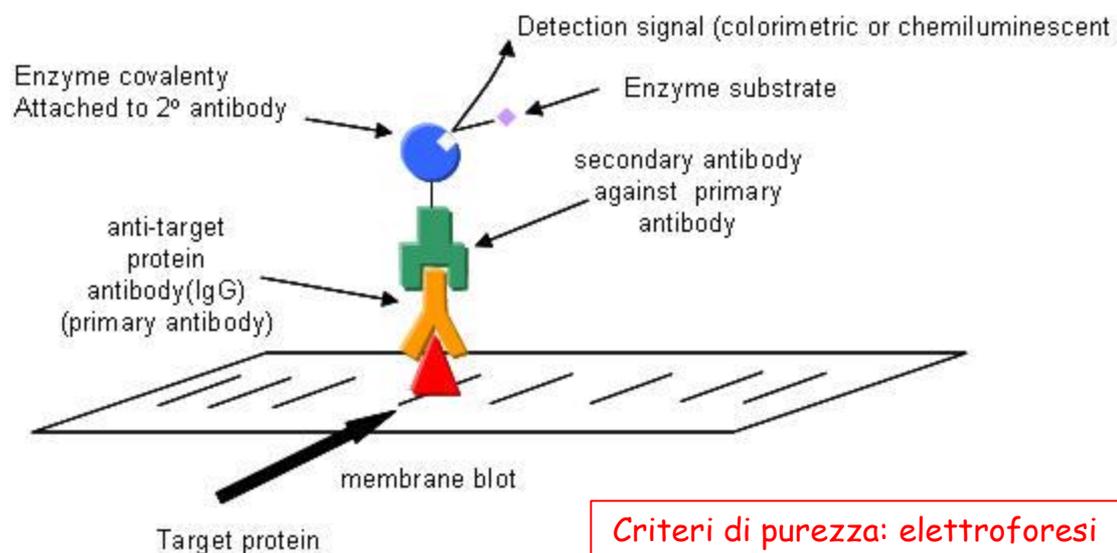
SDS-PAGE

Western Blot



Chemiluminescent Detection of CDK7
BioRad Bulletin 2032

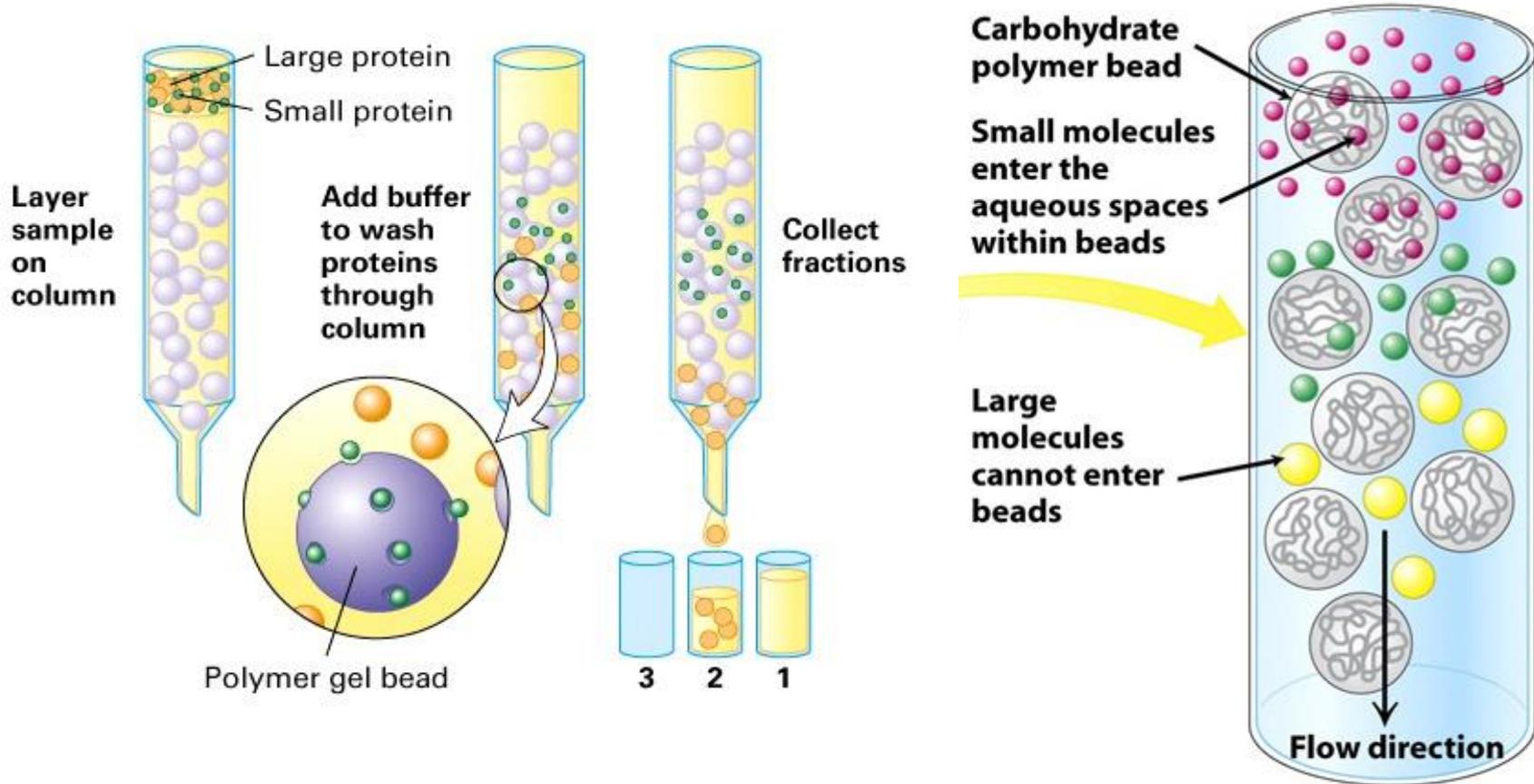
Detection in Western Blots



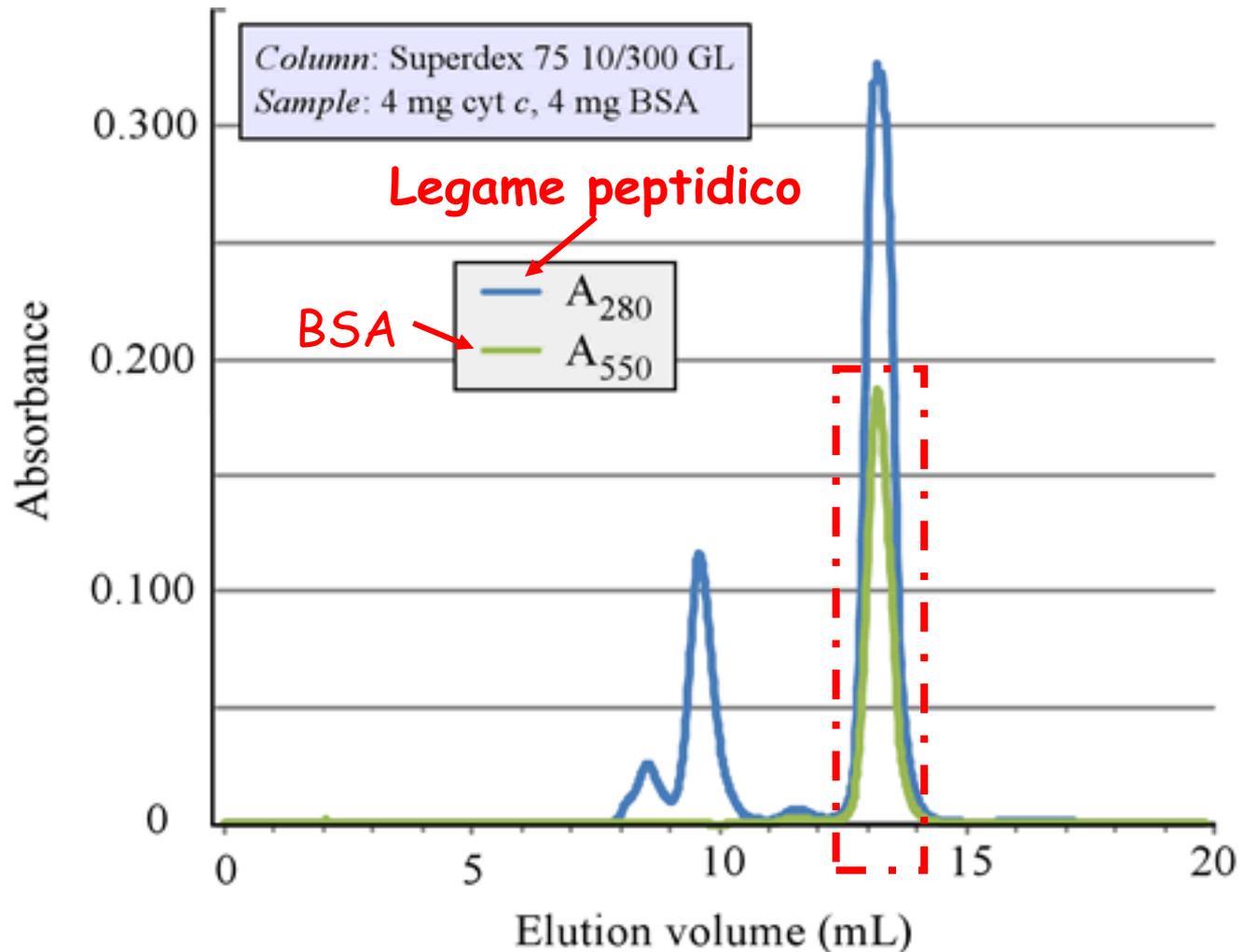
Criteria di purezza: elettroforesi

Esclusione molecolare

(a) Gel filtration chromatography



Esclusione molecolare



Esclusione molecolare

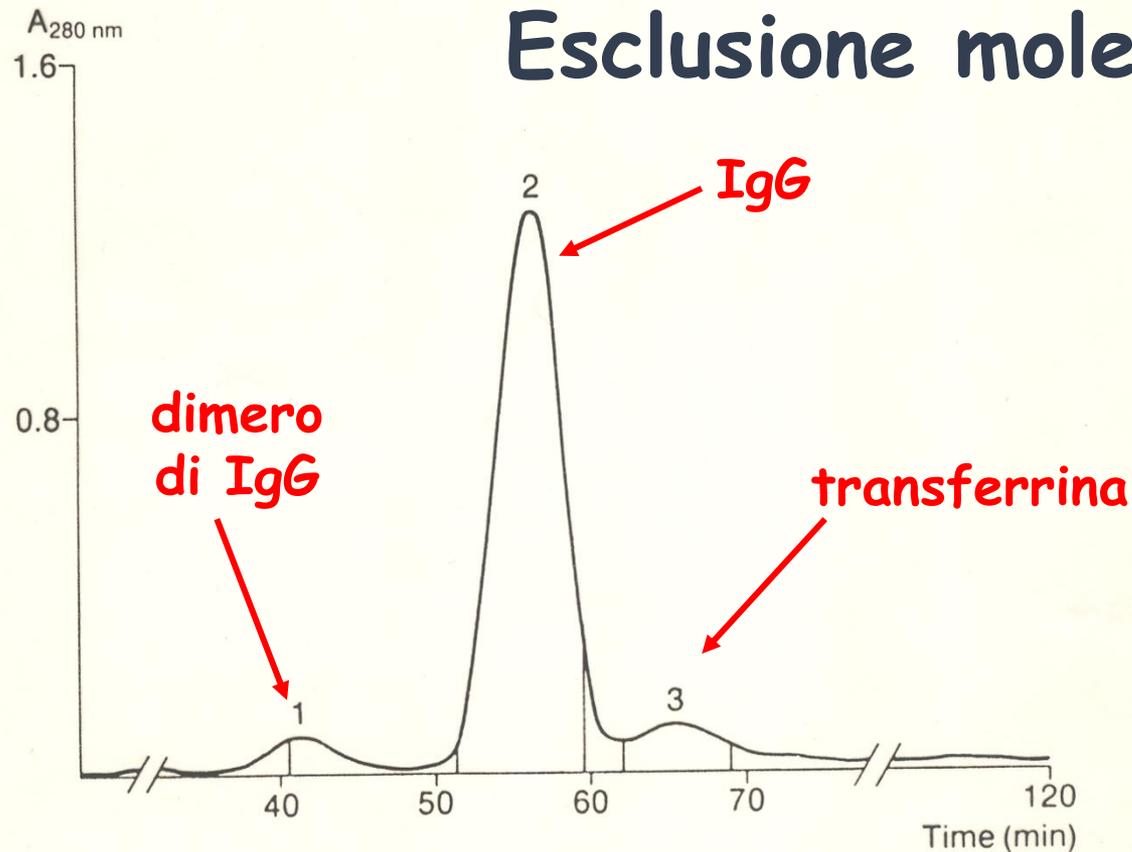


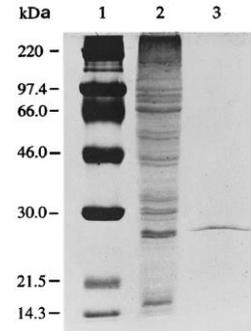
Fig. 7. Final purification of a mouse monoclonal antibody, IgG2a, on Superdex 200 prep grade.

Hybridoma cell culture supernatant was concentrated by ultrafiltration and clarified by centrifugation and passage through a 0.22 μm filter. The concentrate was desalted and purified initially by cation exchange on BioPilot Column S Sepharose High Performance 60/100.

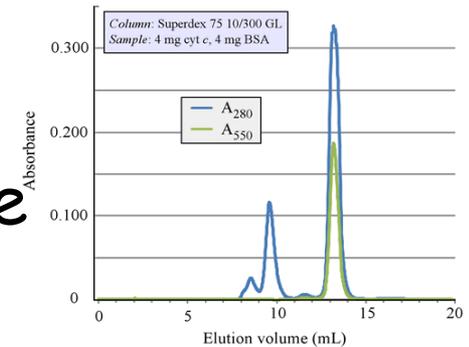
Peaks, 1. IgG dimers; 2. IgG monomers; 3. transferrin; column, BioPilot Superdex 200 prep grade 60/600; sample concentration, 11.37 mg/ml; sample volume, 50 ml; eluent, PBS (pH 7.5) containing sodium azide (0.05 %); flow rate, 14 ml/min. Work by Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden.

Criteri di purezza

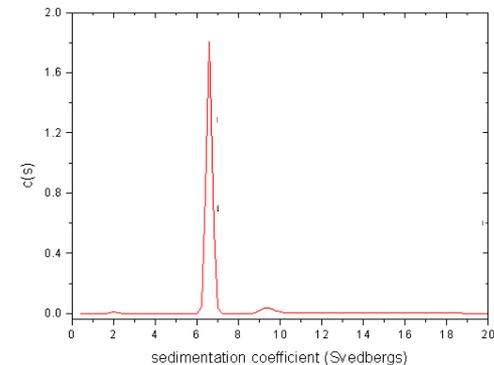
✓ Elettroforesi nativa e in SDS (SDS-PAGE)



✓ Cromatografia per esclusione molecolare



✓ Ultracentrifugazione analitica



Ultracentrifugazione analitica

- Determinazione del grado di purezza delle macromolecole

DNA, virus, proteine

i principi della sedimentazione: il campo centrifugo

La sedimentazione di una particella in soluzione avviene per effetto del CAMPO CENTRIFUGO (G)

La velocità con cui una particella sedimenta è direttamente proporzionale al campo centrifugo applicato

Il campo centrifugo generato all'interno di un rotore è pari a:

$$G = r \omega^2$$

ω = velocità angolare del rotore

r = distanza radiale (cm) della particella dall'asse di rotazione

i principi della sedimentazione: il campo centrifugo

Una rivoluzione del rotore è pari a 2π radianti, pertanto la velocità angolare del rotore, in radianti al secondo, può essere espressa in termini di rivoluzioni al minuto (**rpm**), ovvero:

$$\omega = \frac{2\pi \text{ rpm}}{60}$$

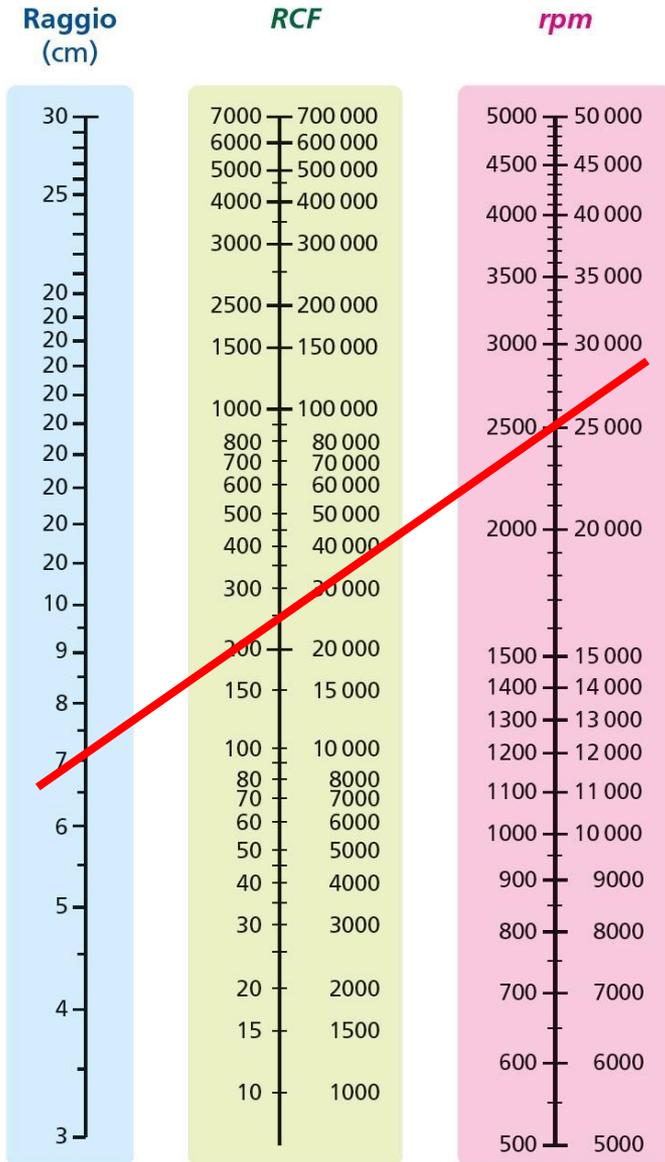
i principi della sedimentazione: il campo centrifugo relativo

- Rapporto tra campo centrifugo G , ad uno specifico raggio, e la velocità di accelerazione normale g
- Rapporto tra il peso della particella sottoposta al campo G ed il peso in presenza della sola forza di gravità terrestre

$$\text{RCF} = \frac{G}{g} = \frac{4\pi^2 (\text{rpm})^2 r}{3600 \times 981}$$

- Relazione che consente di mettere in rapporto la dimensione del campo centrifugo a cui è sottoposta una data particella con la velocità (espressa in rpm) con cui si muove un rotore

i principi della sedimentazione: il campo centrifugo relativo



NOMOGRAMMA

Consente di ricavare il campo centrifugo a partire dal raggio del rotore e dalla sua velocità angolare

Il campo centrifugo relativo è una misura di quante volte il campo centrifugo è superiore al campo gravitazionale.
Maggiore è la forza centrifuga, minore è il tempo di separazione.

l'azione del campo centrifugo

Nel corso della sedimentazione la particella è sottoposta ad una forza netta verso l'esterno, la FORZA CENTRIFUGA (F), che è data dall'espressione:

$$F = \frac{4}{3}\pi r_p^3 (\rho_p - \rho_m) \omega^2 r$$

$\frac{4}{3}\pi r_p^3$ = volume della particella di raggio r_p (supposta sferica)

ρ_p = densità della particella

ρ_m = densità del mezzo

r = distanza della particella dal centro di rotazione

Le particelle, in base a tale forza, all'interno della soluzione si muovono di moto uniformemente accelerato, tuttavia esse generano attrito quando migrano attraverso la soluzione per effetto della viscosità del mezzo e della velocità.

l'azione del campo centrifugo

Il processo di sedimentazione di particelle con geometria sferica può essere descritto mediante l'equazione di Stokes, che descrive la forza di attrito cui è soggetta una sfera in un dato campo gravitazionale:

$$F_0 = v f_0$$

v = velocità di sedimentazione;

f_0 = coefficiente d'attrito

$$f_0 = 6\pi\eta r_p$$

η = coefficiente di viscosità del mezzo

r_p = raggio della particella sferica

Il tempo di sedimentazione

Una particella dotata di simmetria sferica accelera fino a quando la forza di sedimentazione diventa uguale alla forza d'attrito che oppone resistenza al movimento del mezzo ($F=F_0$) e, a questo punto, la particella non accelera più, avendo raggiunto la velocità massima che la porta a sedimentare con una velocità costante, e si ha:

$$4/3\pi r_p^3(\rho_p - \rho_m) \omega^2 r = 6\pi\eta r_p v$$

F

F_0

Il tempo di sedimentazione

Integrando l'equazione $F=F_0$ si ottiene il **tempo di sedimentazione** espresso come funzione delle variabili implicate e della lunghezza del percorso compiuto dalla particella nella provetta da centrifuga:

$$t = \frac{9\eta}{2 \omega^2 r_p^2 (\rho_p - \rho_m)} \ln (r_b / r_t)$$

r_t = distanza radiale dall'asse di rotazione al menisco del liquido

r_b = distanza radiale dall'asse di rotazione al fondo della provetta

NB: *nel caso in cui la particella non sia sferica occorre considerare il rapporto di attrito (f/f_0), cioè il rapporto tra il coefficiente di attrito f della particella 'reale' ed il coefficiente di attrito per una particella perfettamente sferica e non idratata, f_0*

La velocità di sedimentazione

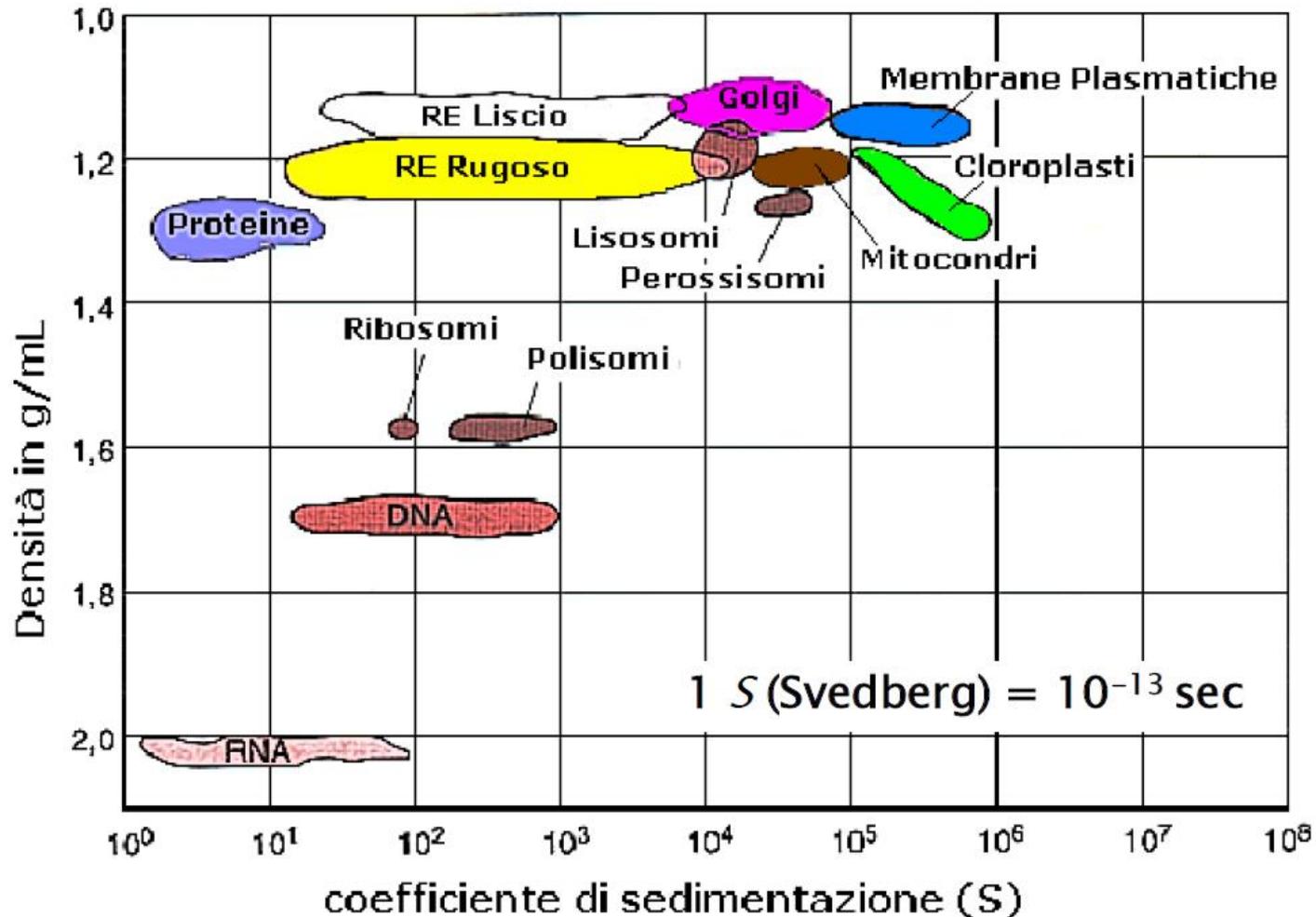
La velocità di sedimentazione può anche essere espressa in termini di velocità di sedimentazione per unità di campo centrifugo applicato, comunemente detto "coefficiente di sedimentazione"(s):

$$s = v / \omega^2 r$$

$$s = 2r_p^2 (\rho_p - \rho_m) / 9\eta$$

- il valore ottenuto sperimentalmente viene corretto nel valore che si otterrebbe in un mezzo la cui viscosità e densità fossero pari a quelle dell'acqua a 20°C, espresso come "coefficiente di sedimentazione standard" ($S_{20,w}$)
- i coefficienti di sedimentazione della maggior parte delle strutture biologiche assumono valori molto piccoli, per convenzione viene adottata un'unità di misura specifica per le particelle biologiche, lo **Svedberg (S)** che equivale a 10^{-13} secondi.
- In generale una particella più grande ha una unità Svedberg maggiore e quindi una maggiore velocità di sedimentazione.
- La centrifugazione può essere adoperata per separare molecole con diversi coefficienti di sedimentazione

Coefficienti di sedimentazione



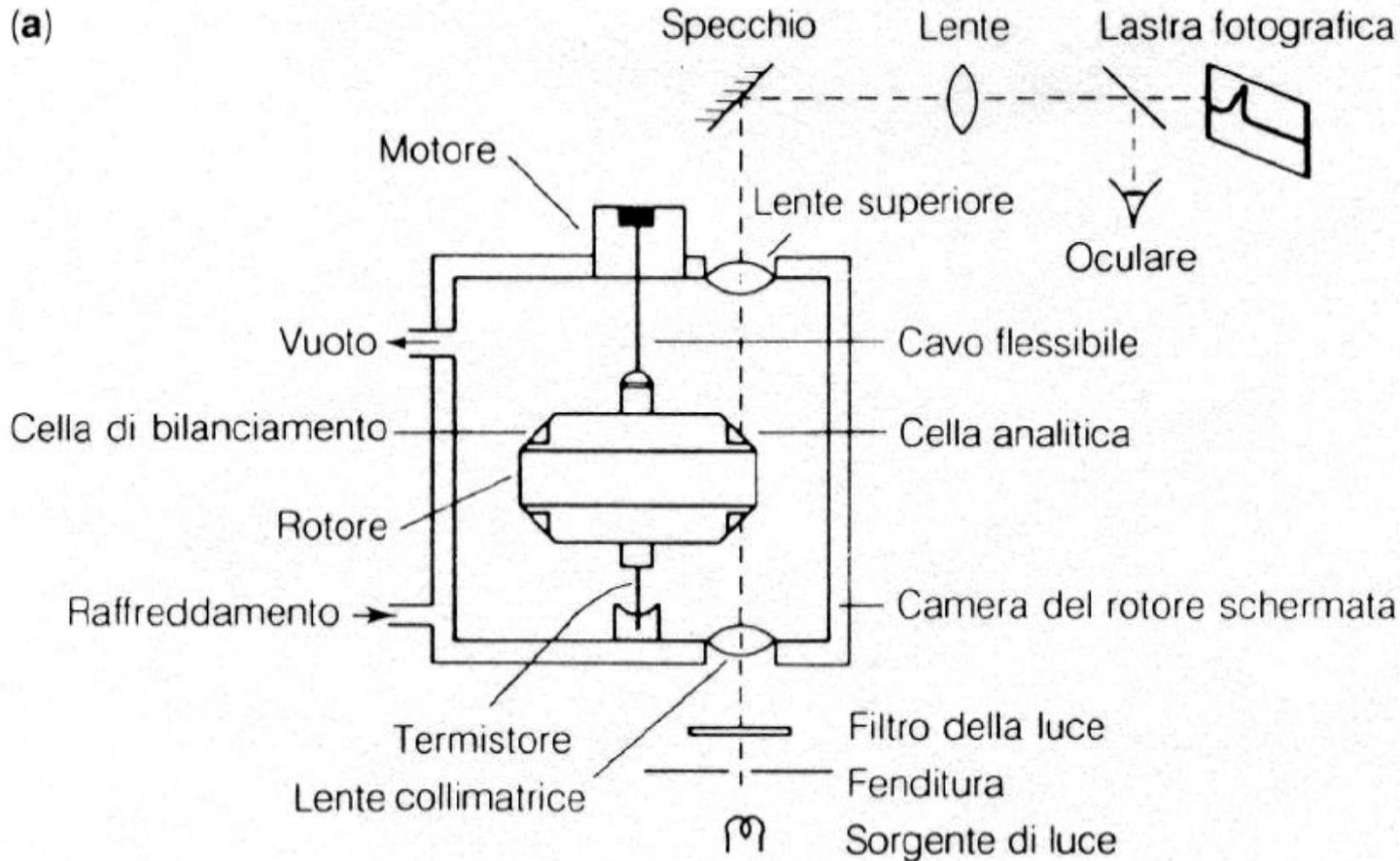
Ultracentrifuga analitica

- Temperatura e velocità controllata
- Vuoto
- Fino a 250 000 -1 000 000g
- Cella per campione resistente ad alta forza centrifuga
- Cella permette lettura assorbimento ottico del campione
nella direzione di sedimentazione
- Misure di velocità e coefficiente di sedimentazione

Ultracentrifuga analitica: applicazioni

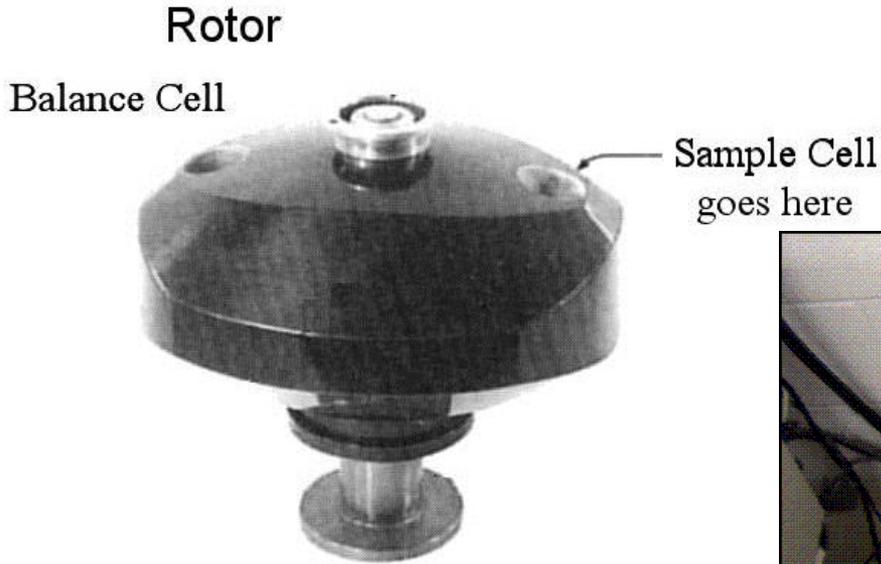
- Determinare il coefficiente di diffusione e il coefficiente di sedimentazione di una proteina
- Determinare la massa molecolare nativa di una proteina, con un margine di errore del 5%
- Calcolare con precisione la stechiometria di una proteina multimerica (stato di aggregazione)
- Studiare l'assemblaggio di un complesso proteico, aggiungendo i componenti uno per uno
- Avere informazioni sulla forma e sulla conformazione di una proteina, mediante il metodo della velocità di sedimentazione
- Studiare processi di *binding* con il metodo dell'equilibrio di sedimentazione

Schema di ultracentrifuga analitica



I raggi prodotti dalla sorgente luminosa attraversano la cella del rotore e vengono analizzati dal sistema ottico; le immagini risultanti possono essere fotografate a vari intervalli di tempo.

Esempio di ultracentrifuga analitica



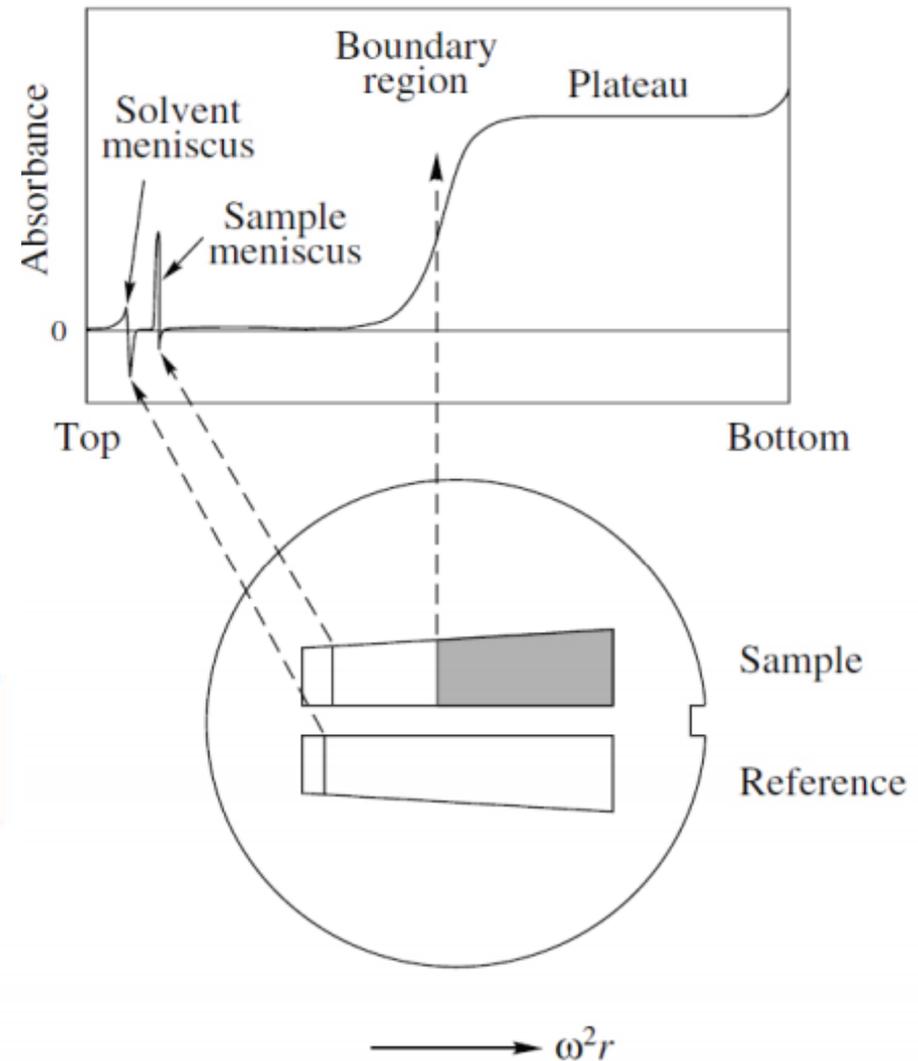
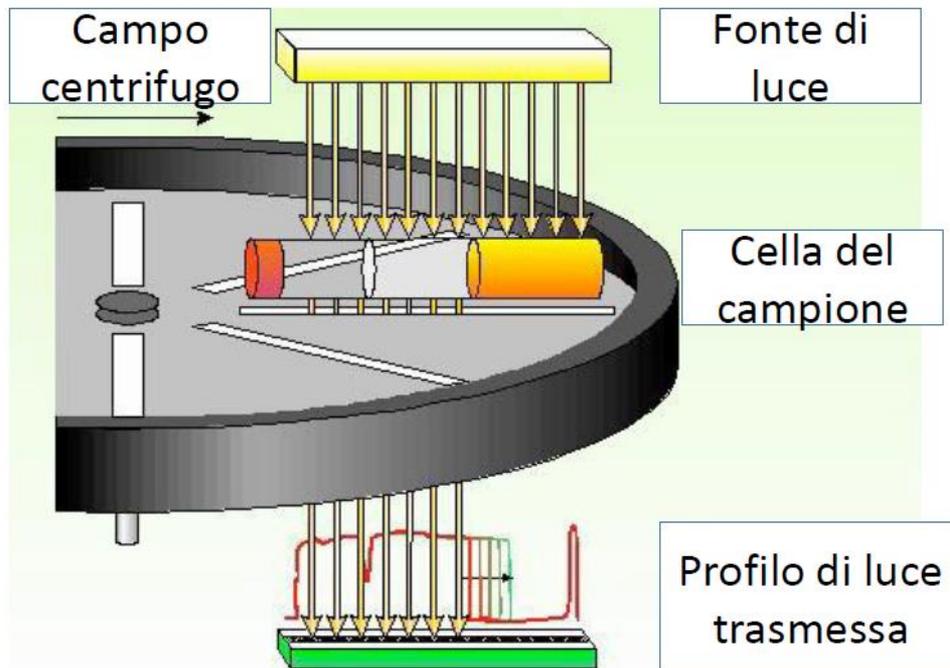
Rotore

**Ultracentrifuga
analitica**



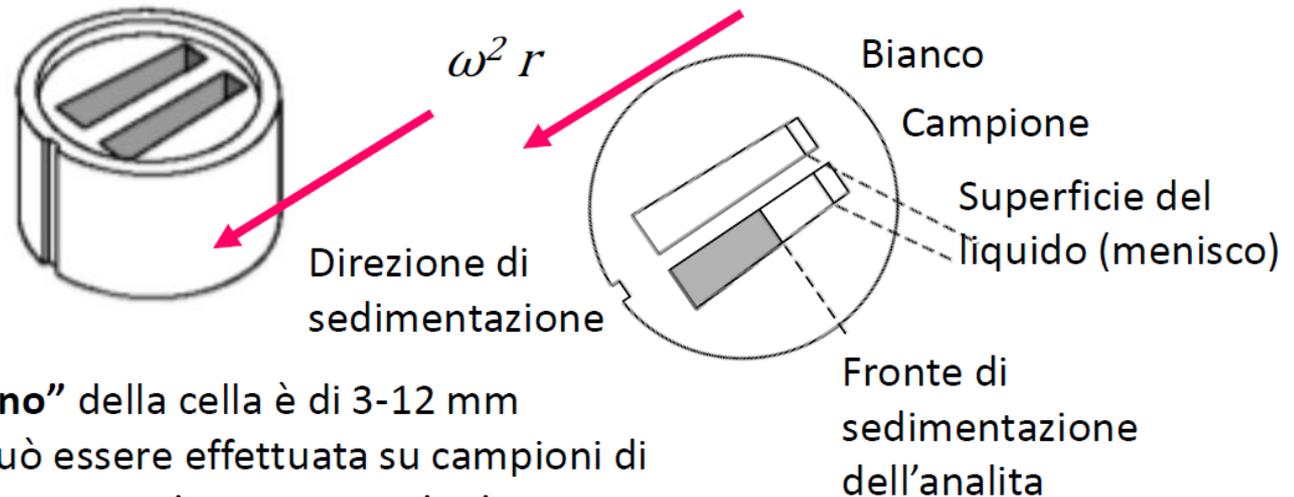
Criteri di purezza: ultracentrifugazione

Schema di ultracentrifuga analitica



Schema di ultracentrifuga analitica: la cella del campione

Doppio alloggiamento
(campione e tampone)
Pareti in quarzo, parallele
al campo centrifugo

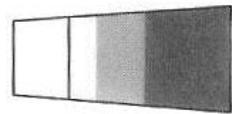
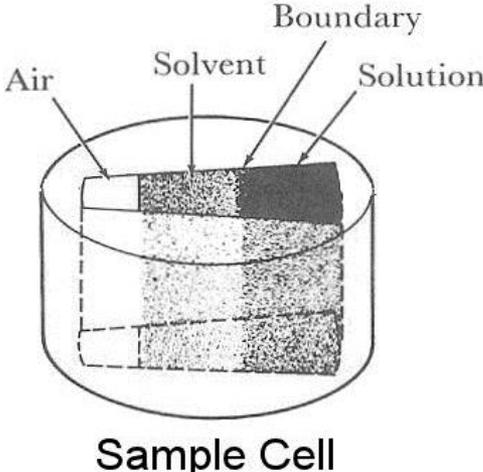


Il “cammino” della cella è di 3-12 mm
L’analisi può essere effettuata su campioni di
proteina pura a varie concentrazioni

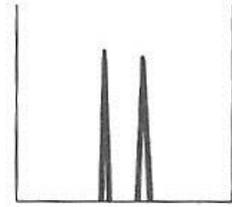
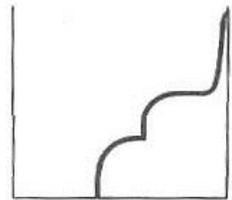
Quantità di proteina tipicamente necessaria:
150 μ l di campione puro a $OD_{280} = 0.3$ (~ 50 μ g)

AUC è applicabile a proteine di ~ 2.5 kDa - 1.5 MDa
Errore: entro 5% del peso teorico.

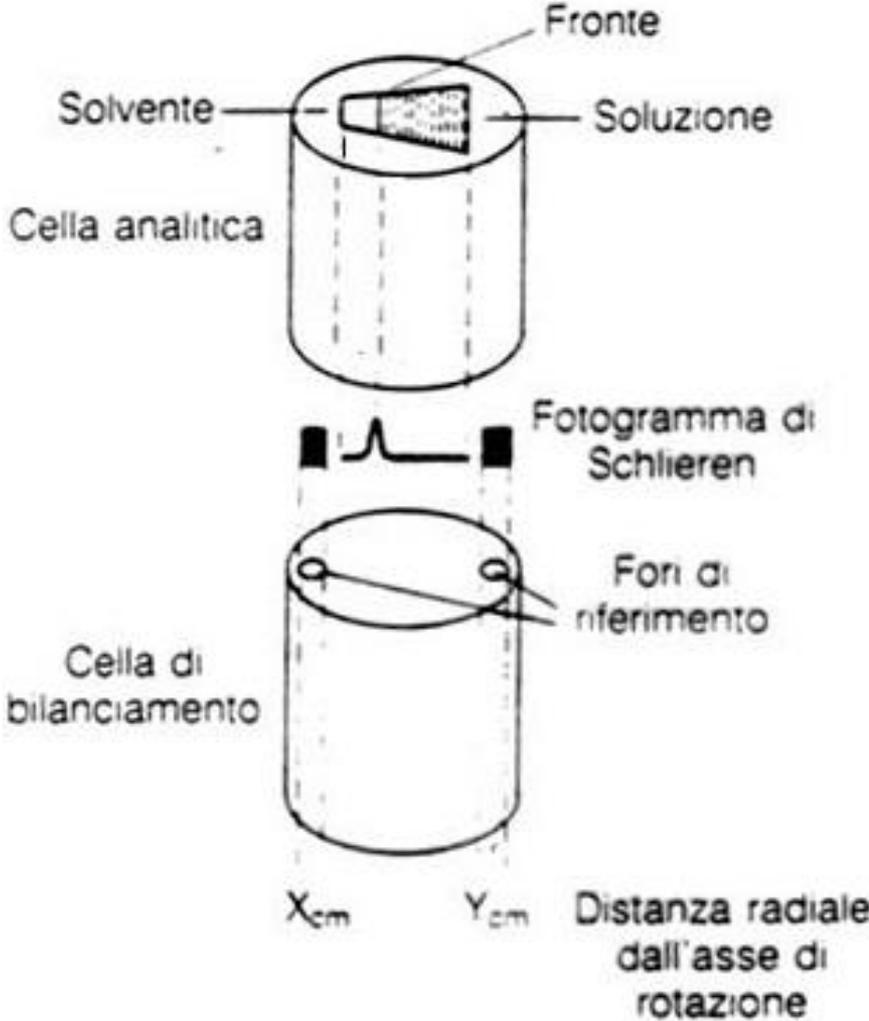
Schema di una cella analitica e di una cella di riferimento



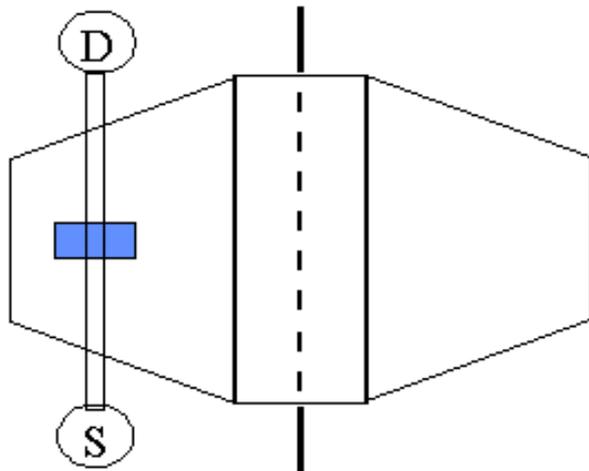
Schlieren Optics (schematic)



Centrifugal force →

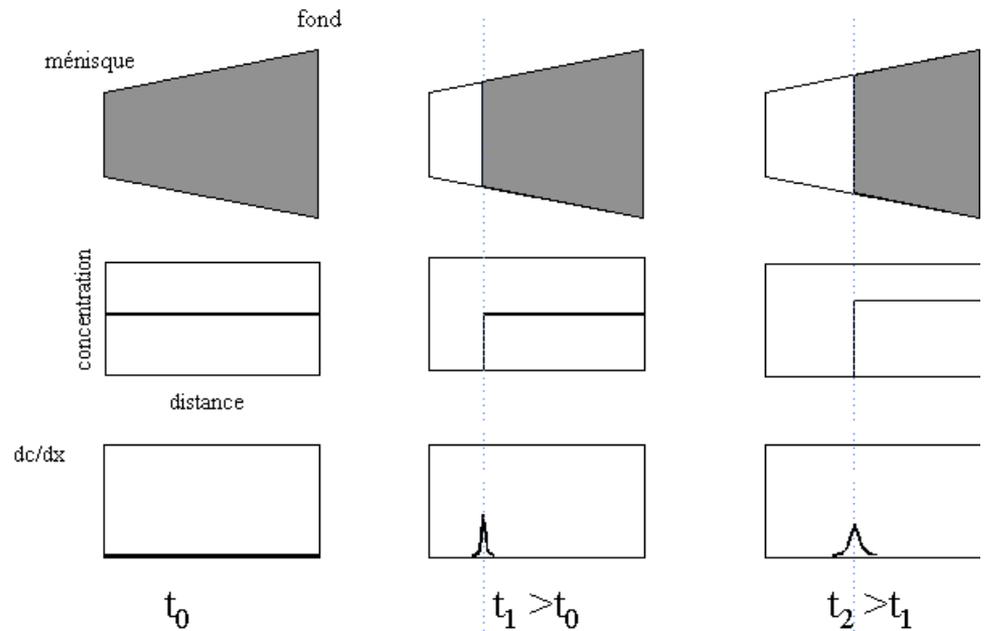


Rotore analitico



cellule vue du dessus

Fronte mobile



Critéri di purezza: ultracentrifugazione

La cella del campione: sistemi ottici

Sistema interferometrico di Rayleigh: misura le differenze nell'indice di rifrazione nei due settori

Nel sistema di Schlieren: registra la variazione dell'indice di rifrazione che la luce subisce passando il confine tra due zone a diversa densità

Assorbanza luce UV: la luce attraversa la cella analitica e l'intensità della radiazione trasmessa viene registrata in continuo da un sistema fotoelettrico.

Immagine ottiche della sedimentazione nell'ultracentrifuga

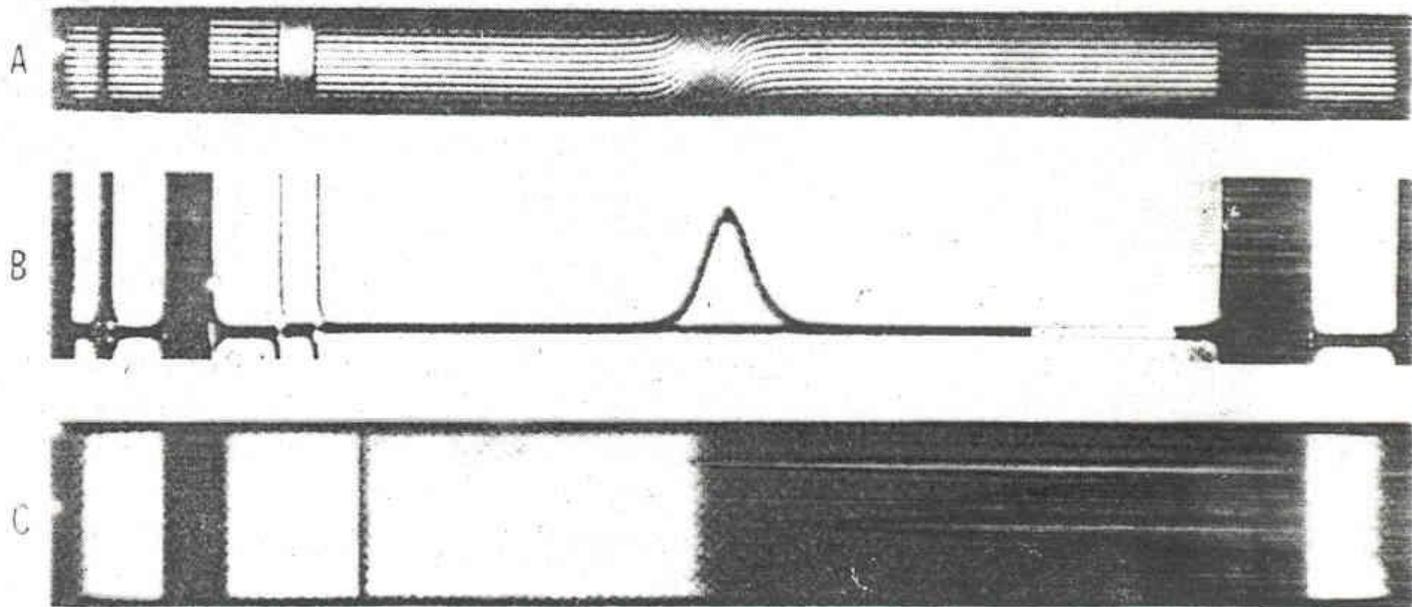
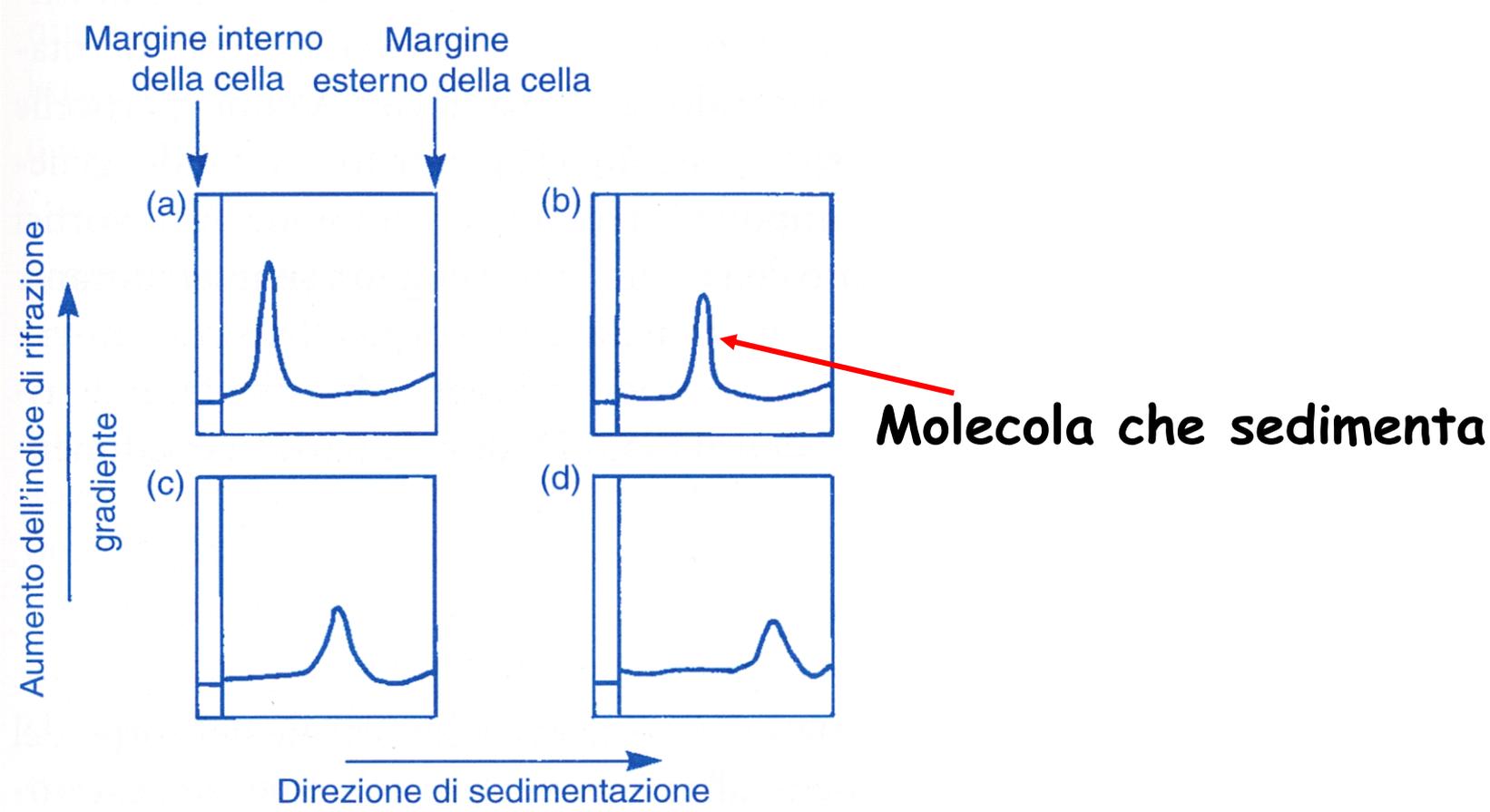


Fig. 1.11 - Immagini ottiche della sedimentazione nell'ultracentrifuga. A, sistema ottico dell'interferenza; B, sistema ottico schlieren; C, assorbimento nell'ultravioletto.

Profili di sedimentazione di una macromolecola rilevati mediante il sistema ottico di Schlieren



Ultracentrifuga analitica: applicazioni

- misura del coefficiente di sedimentazione: mediante determinazione della velocità di sedimentazione
- misura del peso molecolare di proteine o complessi proteici: mediante equilibrio di sedimentazione

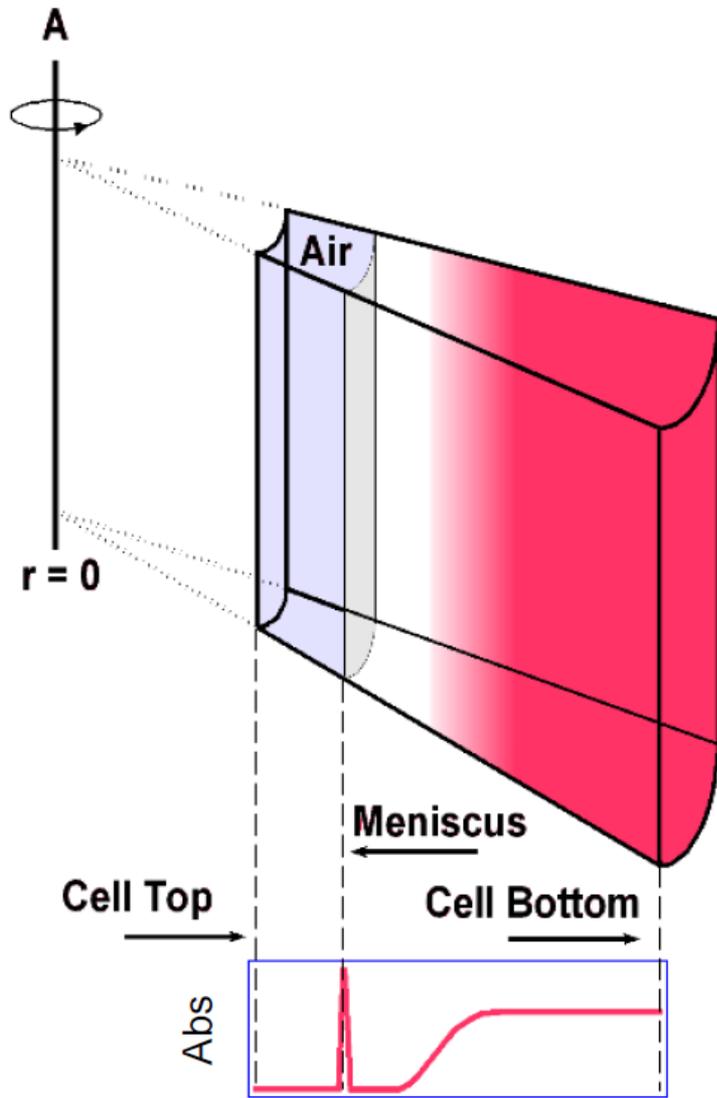
misura del coefficiente di sedimentazione

- No gradiente di densita'
- No equilibrio
- Concentrazione dell'analita inizialmente omogenea
- **Alta velocità di rotazione** per contrastare diffusione
- Impoverimento analita regione "alta"
- Formazione di un fronte di sedimentazione
- Velocità di movimento del fronte è funzione di S

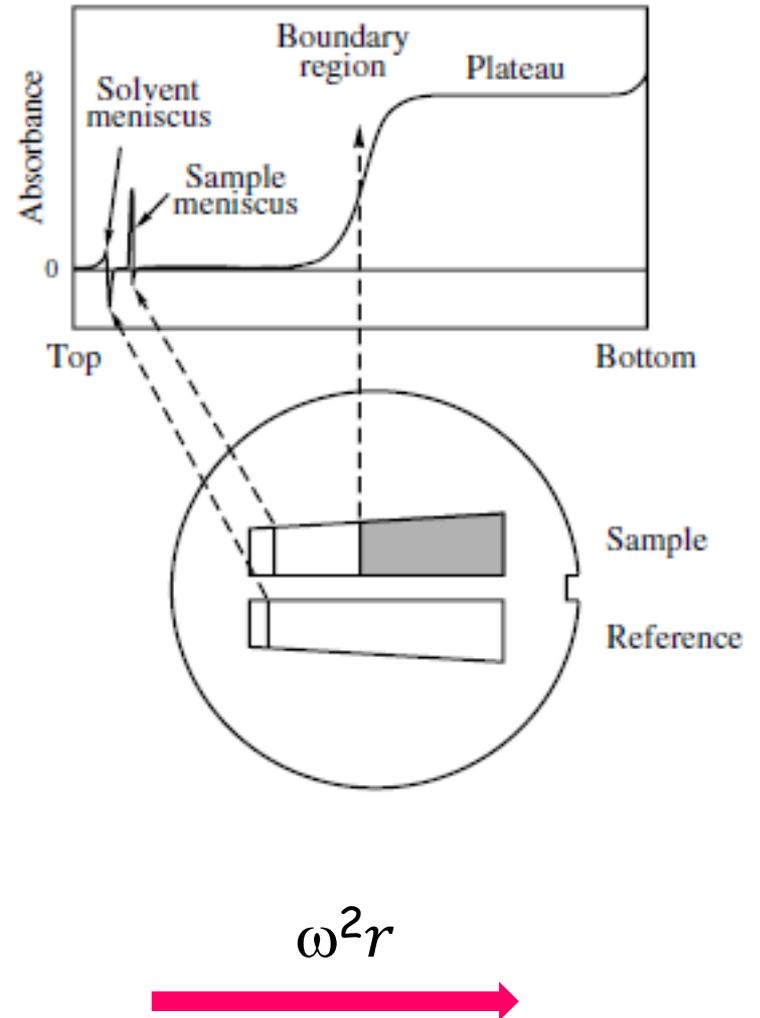
misura di S (coefficiente di sedimentazione)

$$v = s \omega^2 r$$

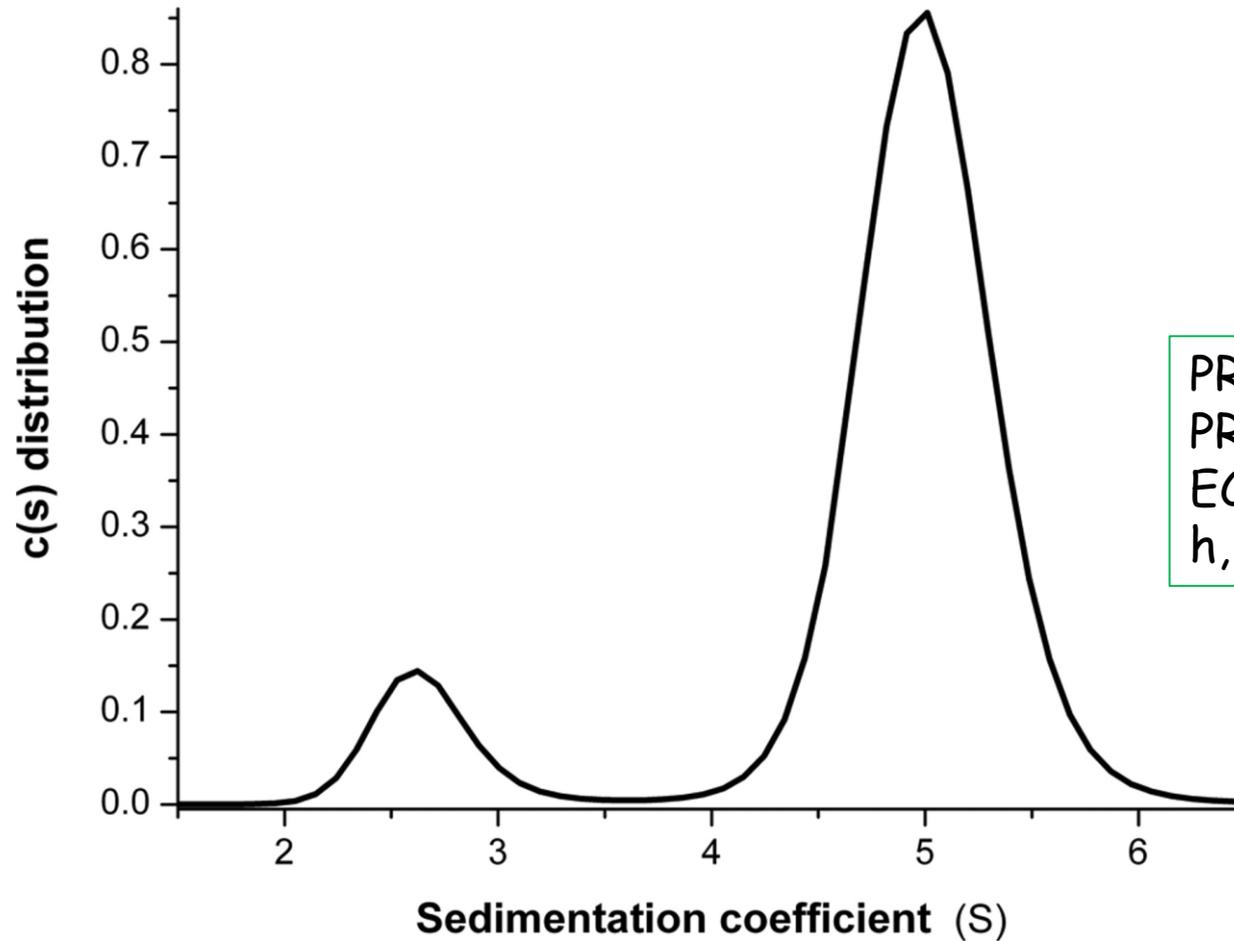
misura del coefficiente di sedimentazione



Distanza dall'asse di rotazione



Analytical ultracentrifugation analysis of the hPRL · rPRLR-ECD assembly in solution



PRL: prolactin;
PRLR, prolactin receptor;
ECD, extracellular domain;
h, human;

Broutin I et al. J. Biol. Chem. 2010;285:8422-8433

jbc

Analytical ultracentrifugation experiments were conducted to further characterize the hPRL: rPRLR-ECD complex.

Both hPRL and rPRLR-ECD sedimented as single species compatible with a monomeric form, with respective sedimentation coefficients of 2.4 ± 0.2 S and 2.5 ± 0.1 S.

The hPRL:rPRLR-ECD mixture (1/3 ratio), was then analyzed, revealing, apart from residual free species, a larger species with a sedimentation coefficient of 5.0 ± 0.3 S (compatible with a 1:2 complex).

PRL: prolactin;
PRLR, prolactin receptor;
ECD, extracellular domain;
h, human;

misura del peso molecolare

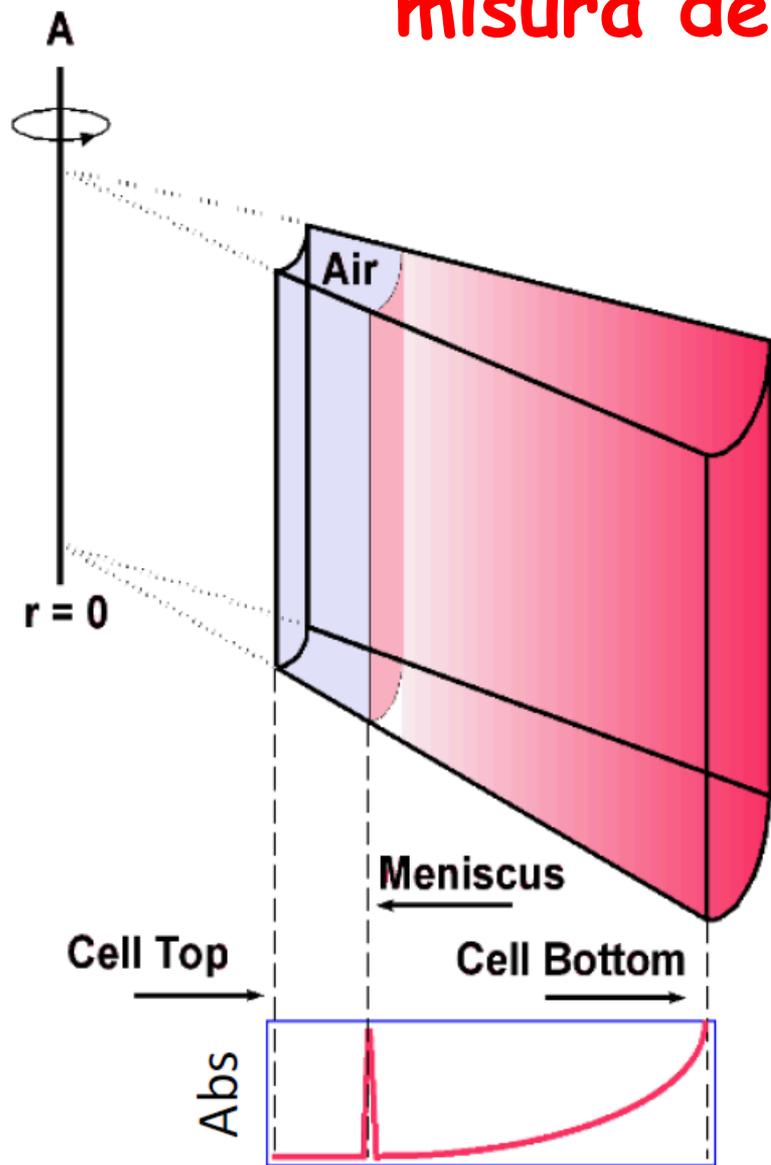
- No gradiente di densita'
- Concentrazione analita inizialmente omogenea
- Bassa velocità di rotazione
- Esaltati fenomeni di diffusione
- Il processo di diffusione si oppone a quello di sedimentazione, fino a che si raggiunge un equilibrio (migrazione nulla)

$$v = 0$$

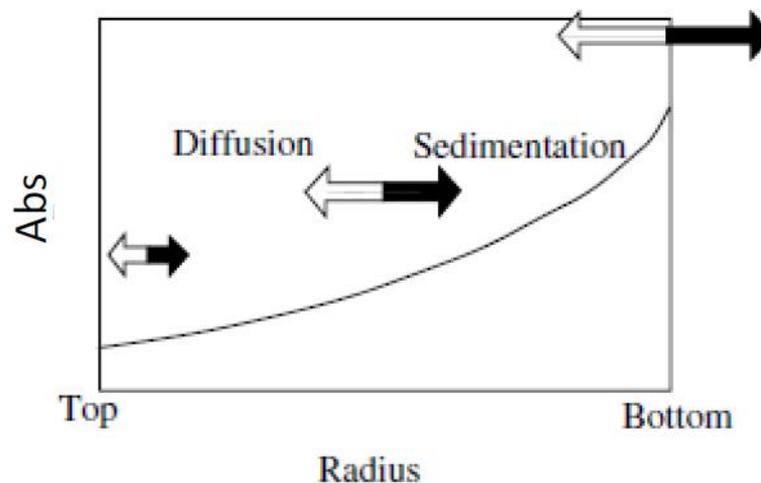
Vale a dire

- 1) densità particella = densità mezzo
- 2) equilibrio tra sedimentazione e diffusione

misura del peso molecolare



Distanza dall'asse di rotazione



- Per effetto del campo centrifugo, la concentrazione del soluto aumenta esponenzialmente verso il fondo della cella
- All'equilibrio, diffusione e sedimentazione sono bilanciate e si forma un gradiente di concentrazione dell'analita
- Distribuzione concentrazione finale dipende solo da MW
- Determinazione accurata del MW
- In condizioni non denaturanti si ottiene il MW nativo (struttura quaternaria)

Ultracentrifuga analitica

Beckman Coulter's next generation analytical ultracentrifuge, Optima AUC.

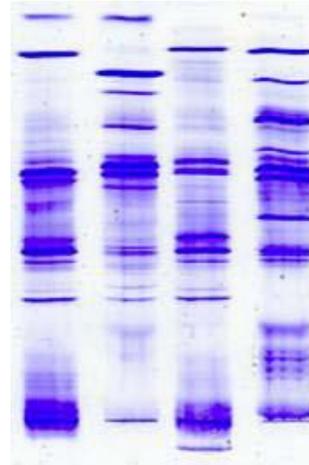
The unit is a fast, sophisticated and easy-to use analytical research tool. A 38.1 cm (15" diagonal), touchscreen display eases operation and boosts efficiency. In addition, intuitive software enables simple run-monitoring and data exports performed either locally or remotely. **The optics are contained outside the rotor chamber, making it easier to clean, and reducing the impact of the g-force on the optics.** The analytical ultracentrifuge allows molecules to float free and unbound so that researchers are able to characterize them in their native state. **This technology determines molecular weight, size, shape, and polydispersity, and is capable of interactions between particles in a native, matrix-free environment.** The unit now allows multi-wavelength analysis. Additionally, the instrument's modular design allows for the development of new detection systems, opening up the possibility for unique detection capabilities.



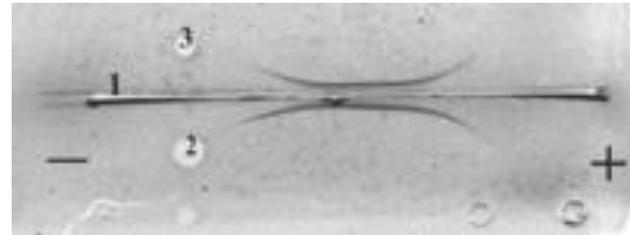
Criteria di purezza: ultracentrifugazione

Criteri di purezza

✓ Focalizzazione al pI

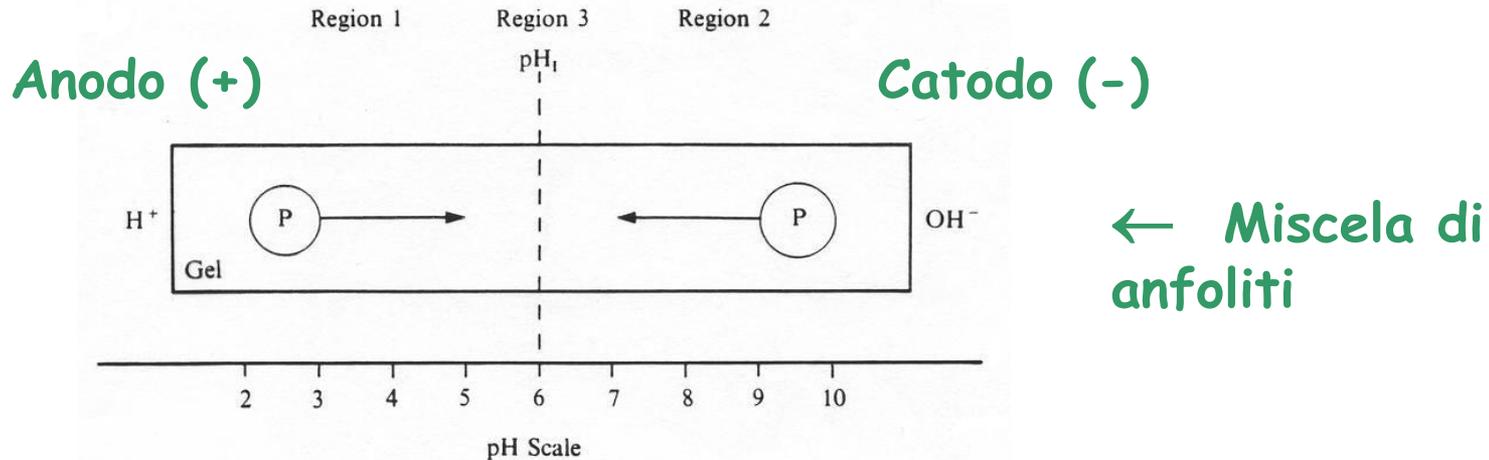


✓ Metodi immunochimici

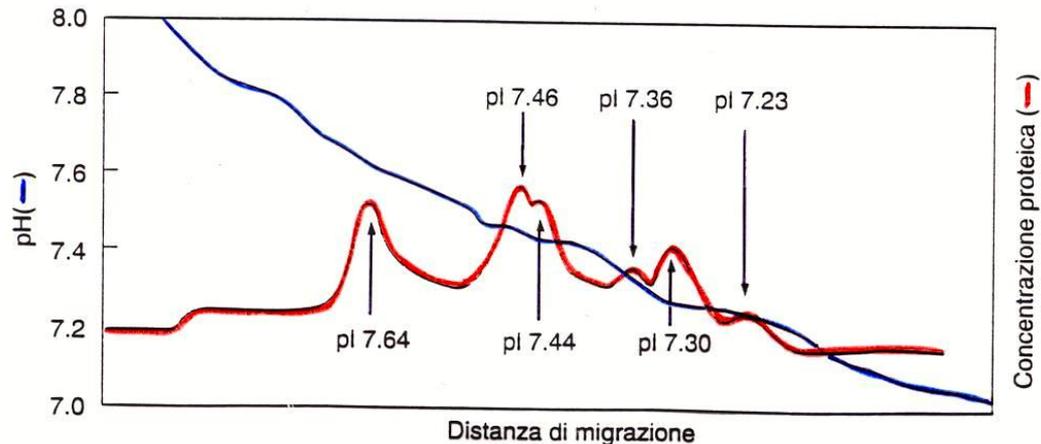


FOCALIZZAZIONE ISOELETTRICA

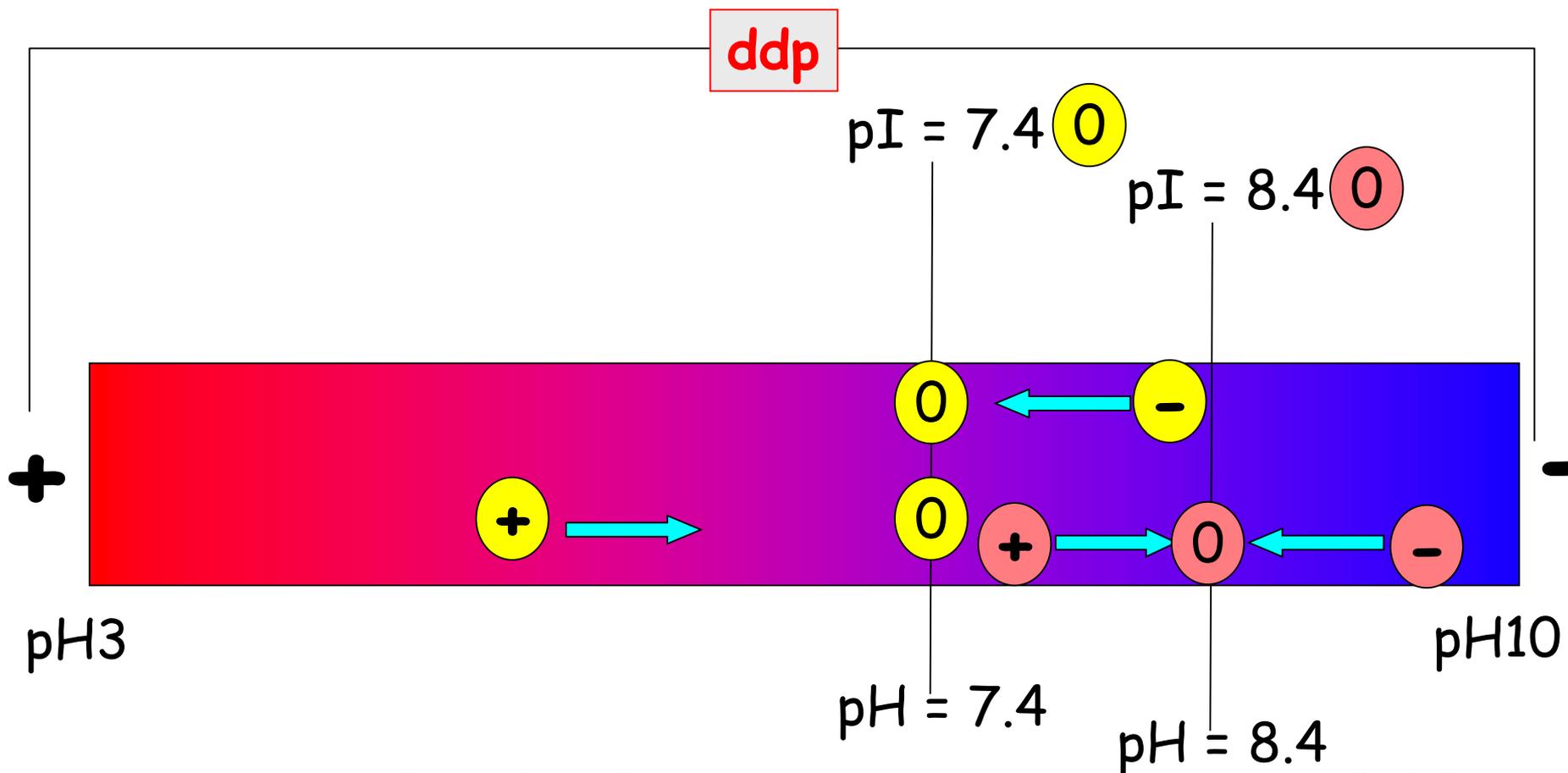
Un'altra tecnica, oltre alla cromatografia a scambio ionico, che permette la separazione di macromolecole sulla base della loro carica. Estremamente risolutiva



Focalizzazione isoelettrica di alcune varianti della stessa proteina, l'emoglobina :



Criteria di purezza: focalizzazione



Una proteina in un gradiente di pH, ha carica netta positiva, negativa oppure nulla (ad un pH pari al suo pI). Sottoposta all'azione di un campo elettrico **opportunamente orientato** si muoverà, a seconda della carica verso l'elettrodo di segno opposto, fino a raggiungere il pH pari al suo pI. In questo punto assume carica netta nulla. Se si diffonde a dx o a sx, allontanandosi dalla regione dove $pH=pI$, assume carica e viene nuovamente focalizzata. Questo determina l'alta risoluzione delle analisi di isoelettrofocalizzazione. Più distante una proteina si trova dal suo pI (in termini di pH) maggiore sarà la sua carica e anche la sua mobilità elettroforetica; mano a mano che si avvicina al pH pari al suo pI la carica netta diminuisce e quindi diminuisce anche la sua mobilità elettroforetica.

Isolettrofocalizzazione

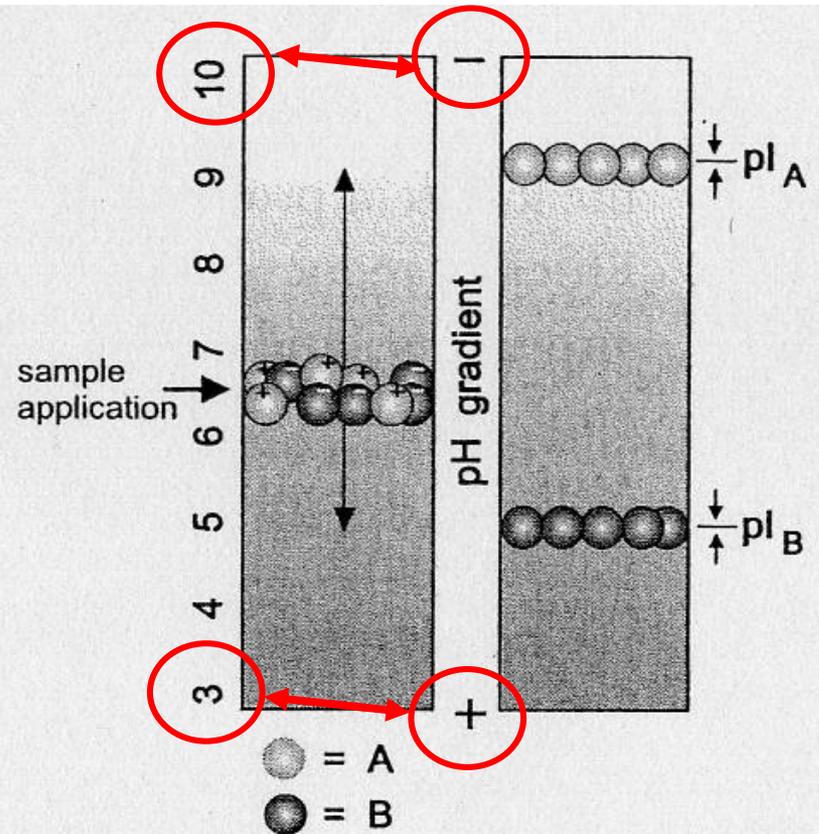
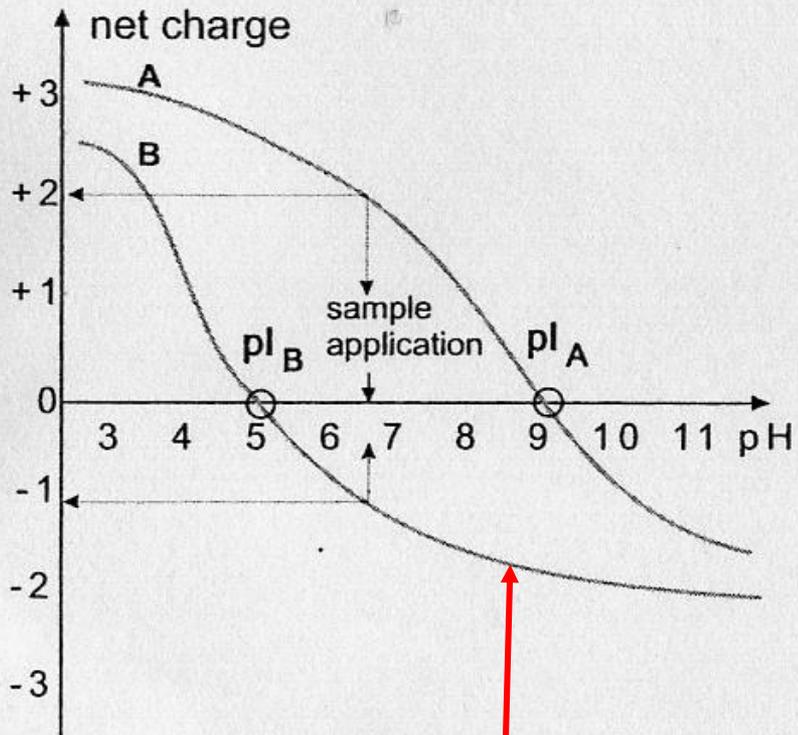
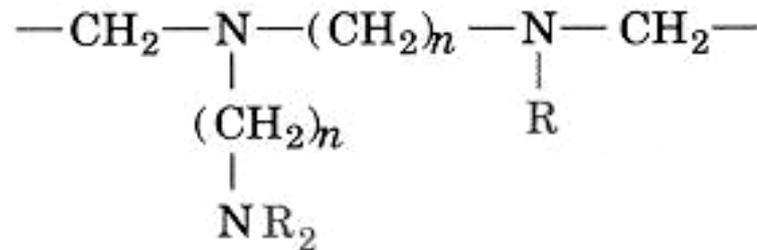


Fig. 6: The principle of isoelectric focusing. *Left:* Net charge curves of two model proteins A and B. At the point of application, A will have two positive,

B will have one negative charge(s). *Right:* Migration of A and B to their pIs in the pH gradient of an isoelectric focusing gel.

Il gradiente di pH è formato dall' introduzione nel gel di composti conosciuti come "anfolti", che sono miscele complesse di acidi poliammino-policarbossilici sintetici.

Gli anfolti sono disponibili per diversi range di pH, sia a banda larga (ad es. da pH 3 a pH 10) che a banda stretta (ad es. da pH 7 a pH 8)



$$n = 2 \text{ or } 3$$

$$R = \text{H or } \text{---(CH}_2\text{)}_n\text{---COOH}$$

Figure 5-28

The general formula of the carrier ampholytes used in isoelectric focusing.

Sviluppo del gradiente

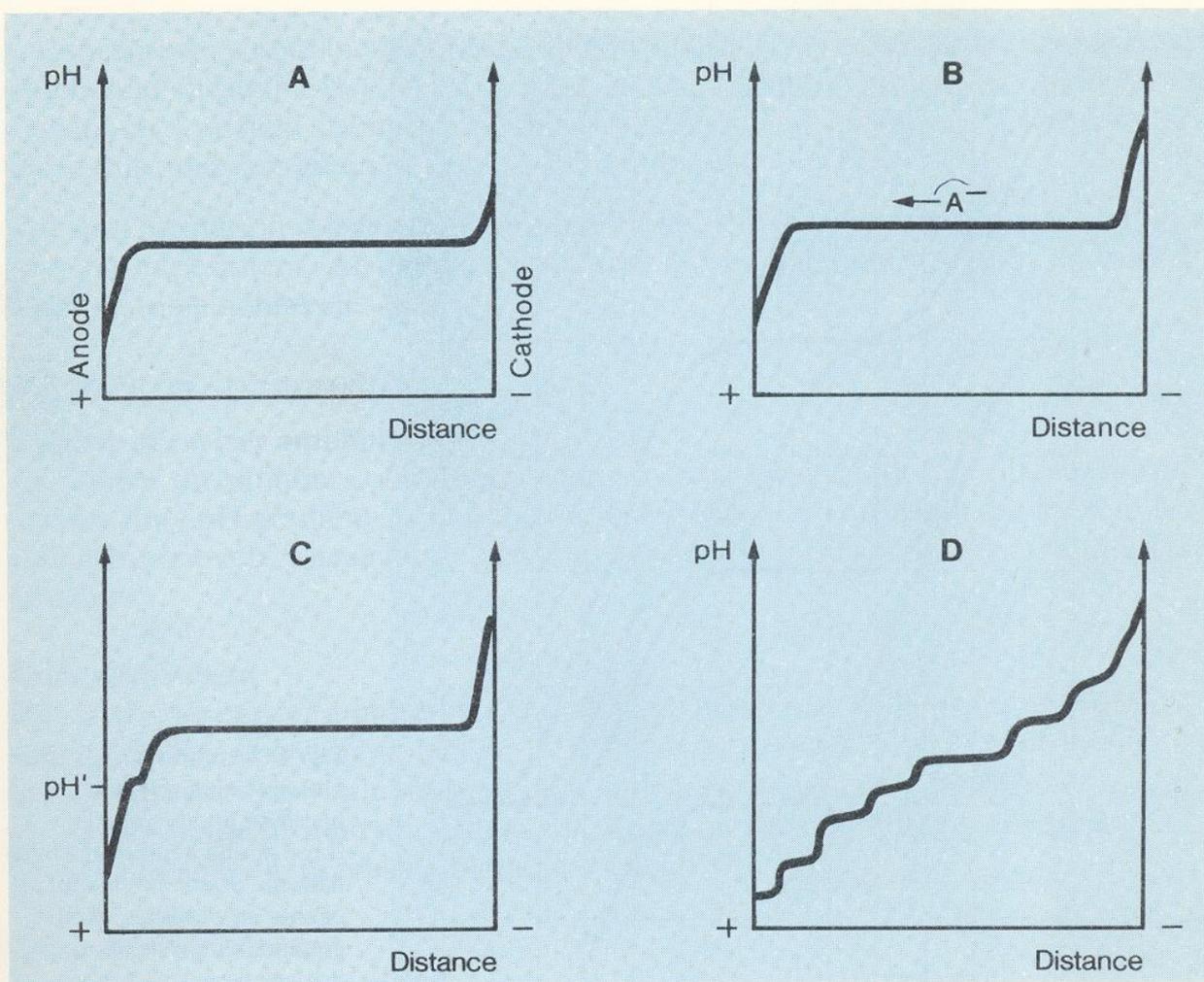


Fig. 3. Development of the natural pH gradient using carrier ampholytes.

ISOELETTROFOCALIZZAZIONE

SESSSKSSQP LASKQEKDGT EKRGRGRPRK QPPVSPGTAL VGSQKEPSEV PTPKRPRGRP

KGSKNKGA AK TRKTTTTTPGR KPRGRPKKLE KEEEEGISQE SSEE EQ

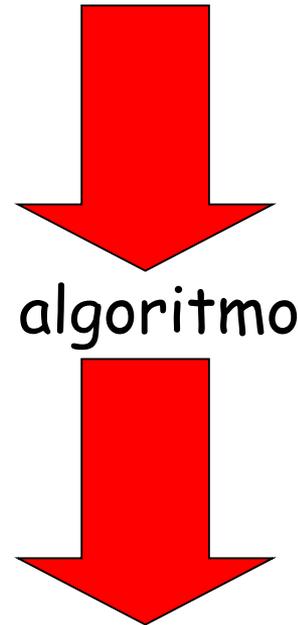
Number of amino acids: 106

Molecular weight: 11544.8 1 N-term + 11 R + 1 D + 14 E + 16 K + 1-Cterm

Theoretical pI: 10.31

Amino acid composition:

Ala (A)	4	3.8%
Arg (R)	11	10.4%
Asn (N)	1	0.9%
Asp (D)	1	0.9%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	6	5.7%
Glu (E)	14	13.2%
Gly (G)	11	10.4%
His (H)	0	0.0%
Ile (I)	1	0.9%
Leu (L)	3	2.8%
Lys (K)	16	15.1%
Met (M)	0	0.0%
Phe (F)	0	0.0%
Pro (P)	13	12.3%
Ser (S)	14	13.2%
Thr (T)	8	7.5%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	0	0.0%
Val (V)	3	2.8%



pI: pH al quale la carica netta della proteina = 0
Se sottoposta all'azione di un campo elettrico
non si muove

Focalizzazione - CONCENTRAZIONE

table 5–6

The Isoelectric Points of Some Proteins

Protein	pI
Pepsin	~1.0
Egg albumin	4.6
Serum albumin	4.9
Urease	5.0
β -Lactoglobulin	5.2
Hemoglobin	6.8
Myoglobin	7.0
Chymotrypsinogen	9.5
Cytochrome c	10.7
Lysozyme	11.0

Attrezzature per focalizzazione



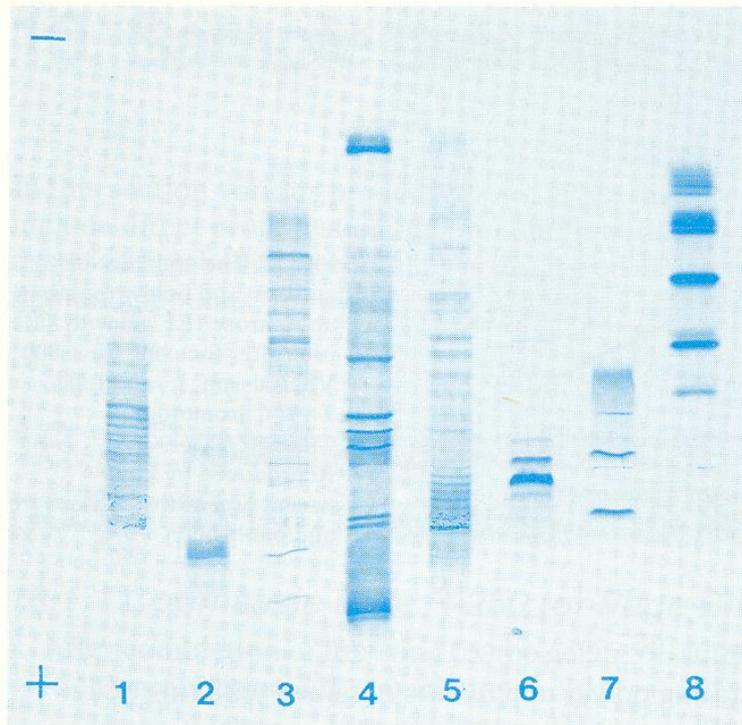
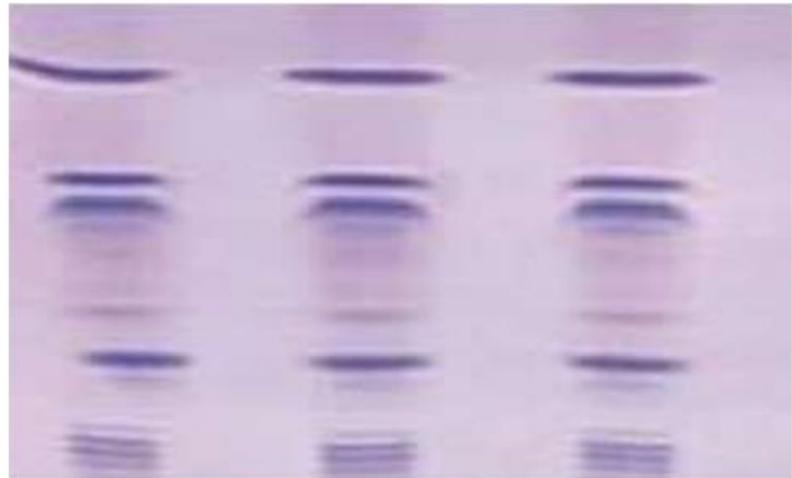


Fig. 74. Agarose IEF gel run in 8M urea for 1,800 Vh, 1,500 V, 50 mA, 10 W. The samples are from the left:

1. *E. coli* lysate.
2. Cellulase from *Trichoderma reesei* QM 9414.
3. Mackerel extract.
4. Cheese.
5. Soybean meal.
6. Soybean Lectin.
7. Lentil Lectin.
8. *Helix pomatia* Lectin (all lectins from Pharmacia Fine Chemicals).

The samples were dissolved in a final concentration of 8M urea and 2% β -mercaptoethanol. *E. coli*, mackerel and cheese were first mechanically disrupted in solution at low temperature. The samples were then frozen and thawed twice, and applied without further treatment. (Olsson, I., and Låås, T., J. Chromotogr. 215(1981)373–378. Reproduced by kind permission of the authors and publisher.)

Rivelazione: TCA 10% e Coomassie Brilliant Blue



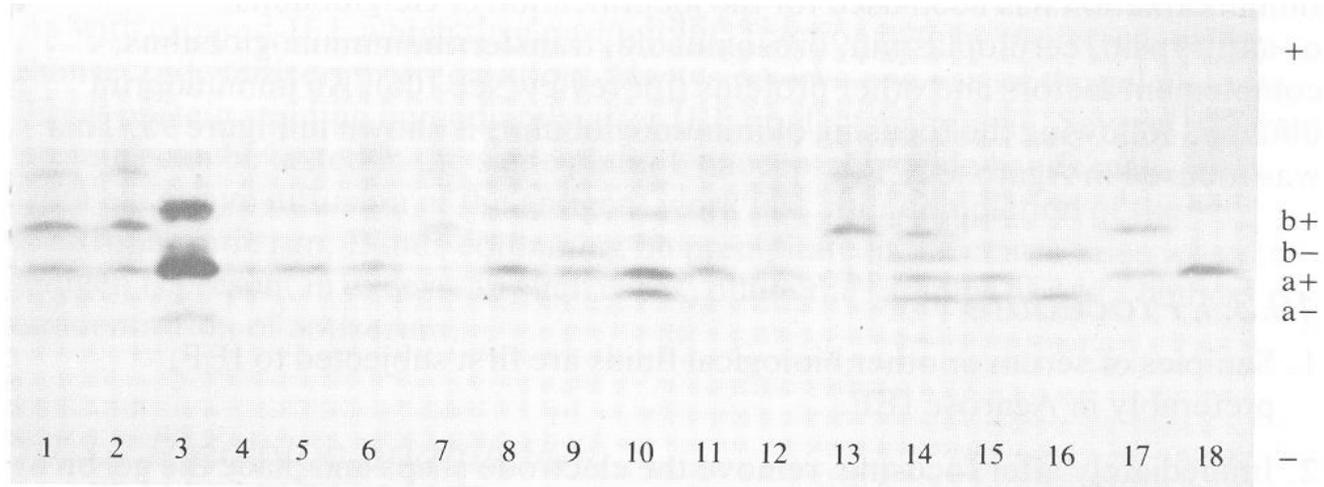


Fig. 80. Separation of isoenzymes of phosphoglucumutase by IEF using Pharmalyte 4–6.5 in Agarose IEF. The method used was that described on p.69, coupled to an enzyme overlay. The picture is taken from a dried, preserved gel. Samples 3, 5, 11 and 18 are type 1+; 1, 2, and 17 type 1+2+; 16 type 1–2–; 4, 6, 8, 10, 12, and 15 type 1+1–; 13 type 2+; 9 type 1+2–; 7 type 1–2+; and 14 control. The control is a mixture containing the a–, a+, b– and b+ isoenzymes. (Burdett, P.E., J. Forens.

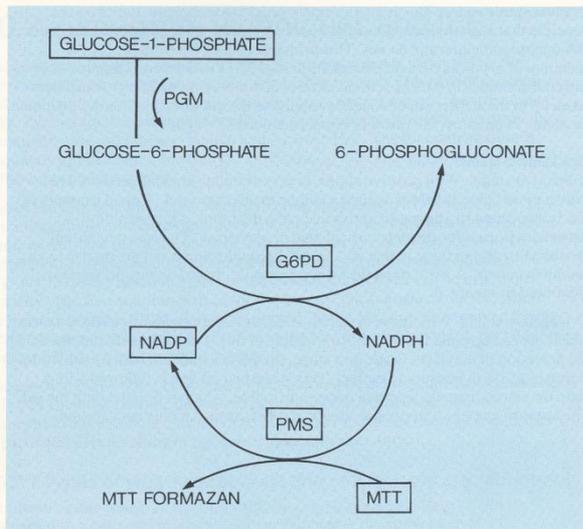


Fig. 79. Electron transfer dye staining method, shown in this instance for phosphoglucumutase. This method is applicable to many enzyme systems, which can be coupled, directly or indirectly to a dehydrogenase system. In this instance, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is added to link the reaction product from phosphoglucumutase. (PMS, phenazine methosulphate; MTT, (3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide).)

Rivelazione: Zimografia

PMS= 1-methoxy phenazine methosulfate

MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

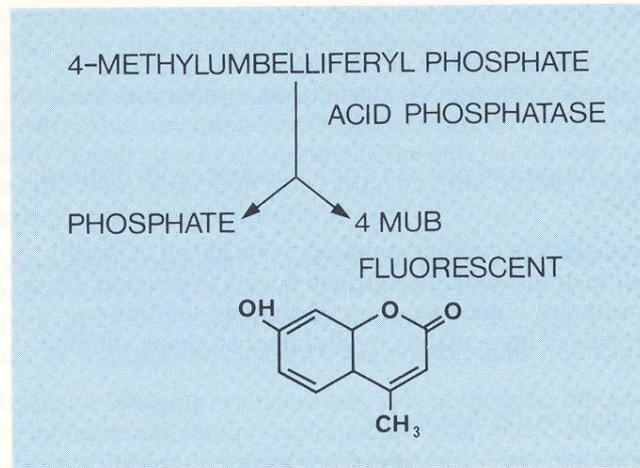
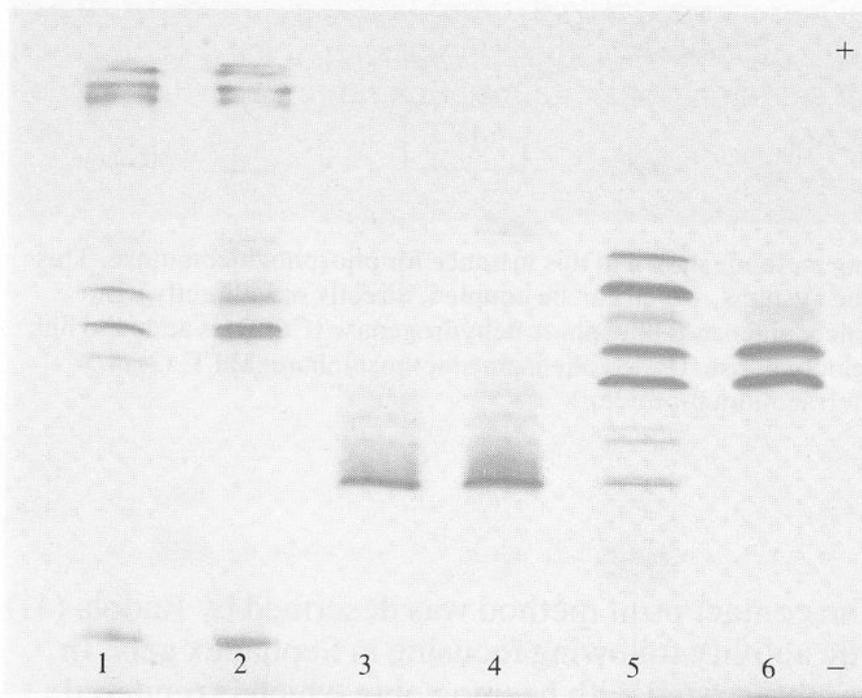


Fig. 77. Enzyme detection using a fluorogenic substrate, in which the non-fluorescent substrate is converted by action of the enzyme, to the fluorescent form, in this instance, 4-methyl umbelliferone (MUB).

Fig. 78. Detection of esterase activity from extracts of insects using both α and β naphthyl acetates, and Fast Red R. Samples are: 1 and, 2 two strains of *Oryzaephilus surinamensis*, 2 and 3 two strains of *Sitophilus granarius* and 5 and 6, two strains of *Rhyzoperta dominica*. Samples were prepared from crushed material by extraction in 1% sucrose containing 1% Triton X-100. After centrifugation, the supernatant was placed near the anode. The gel was pre-focused. Pharmalyte 3-10 was used. Detection mixture. 100 ml of 0.1 M Phosphate buffer, pH 6.2 containing 50 mg Fast Red R, to which was added 2 ml of 4% (w/v) α naphthyl acetate containing 1% (w/v) β naphthyl acetate, both dissolved in acetone. Enzyme activity was detected after 10-30 minutes (By kind permission of Matthews, W.