

- a)  $m/z = 3569 \equiv (M + H)^+$   
quando  $m/z = 1785 \equiv (M + 2H)^{2+}$ , dando  $M = 3568$
- b)  $m/z = 3569 \equiv (2M + H)^+$   
quando  $m/z = 1785 \equiv (M + H)^+$ , dando  $M = 1784$
2. È possibile distinguere tra queste due opzioni considerando la LDMS dei prodotti di idrolisi. Si ottengono quattro valori di  $m/z$ : 766, 891, 953 e 1016. Ognuno è una specie protonata e la somma di queste masse, 3626, sarà dell'ordine della  $M$ , del peptide originale. Il valore di questa supporta l'opzione (a) al punto (1) sopra.
3. I dati di ionizzazione per elettrospray rappresentano ioni con carica multipla. Usando la formula standard, si può ottenere la  $M_r$  media.

$m_1 - 1$	$m_2 - m_1$	$n_2$	$m_2 - 1$	$M$	$z$
892.0	297.3	3.0003	1189.3	3568.3	3
713.6	178.4	4.0000	892.0	3568.0	4
594.7	118.9	5.0016	713.6	3569.2	5
509.7	85	5.9964	594.7	3566.1	6

$$\Sigma M = 14\,271.6; M_r \text{ media} = 3567.9$$

Questo valore più preciso conferma le conclusioni sopraesposte. Per una spiegazione della differenza di massa tra  $M_r$  e la somma dei prodotti idrolizzati, fare riferimento alla risposta alla domanda 4. I dati in (d) sono dimostrazioni cromatografiche a conferma che si ottengono solo quattro prodotti di idrolisi.

### 11.13 Letture consigliate

- CHAPMAN J.R. *Practical Organic Mass Spectrometry: A Guide for Chemical and Biochemical Analysis*. John Wiley and Sons, London 1995.  
Tratta in profondità la teoria e le applicazioni, con un'esauriente bibliografia.
- DAVIES R., FREARSON M. *Mass Spectrometry*. ACOL Series, John Wiley and Sons, London 1988.  
Un testo per coloro che vogliono approfondire i principi teorici.
- FENSELAU C. (Ed) *Mass Spectrometry for Characterization of Microorganisms*. American Chemical Society Symposium Series, 541, 1994.  
Una raccolta di lavori pubblicati, presentati in convegni, che danno una panoramica aggiornata della ricerca sull'argomento.
- GASKELL S.J. *Mass Spectrometry in Biochemical Research*. John Wiley and Sons, London 1986. Un testo avanzato su metodi e applicazioni specifiche.
- Molte applicazioni specifiche sono pubblicate dai costruttori come note delle applicazioni che sono, di solito, disponibili gratuitamente su richiesta. Due di particolare interesse appaiono in *VG Monographs in Mass Spectrometry Series*, pubblicato dalla VG Instruments (ora Micromass UK Ltd), Tudor Road, Altrincham, WA145RZ, UK.
- MELLON F.A. *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*, vol. 2, no. 1, 1991.
- ROSE M.E. *Modern Practice of Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, vol. 1, no. 1, 1990.

## Tecniche elettroforetiche

### 12.1 Principi generali

Il termine elettroforesi descrive la migrazione di particelle cariche sotto l'influenza di un campo elettrico. Molte importanti molecole di interesse biologico, come gli aminoacidi, i peptidi, le proteine, i nucleotidi e gli acidi nucleici, possiedono gruppi ionizzabili per cui, a ogni dato valore di pH, sono presenti in soluzione sotto forma di specie elettricamente cariche, sia come cationi (+) sia come anioni (-). Sotto l'influenza di un campo elettrico queste particelle cariche migrano o verso il catodo o verso l'anodo, a seconda della natura della loro carica.

L'apparecchiatura richiesta per l'elettroforesi è costituita fondamentalmente da due parti: un alimentatore e una cella elettroforetica. Sono disponibili celle elettroforetiche che funzionano con sistemi su gel verticale, o orizzontale. Si trovano in commercio celle elettroforetiche per separazione su gel verticale come quella mostrata nella figura 12.1, che vengono utilizzate di routine per separare proteine su gel di poliaccrilammide (12.2). Il gel viene formato tra due lastre di vetro che sono fissate insieme e tenute separate da spaziatori di plastica. Le dimensioni del gel sono solitamente 12 cm x 14 cm, con uno spessore di 0.5-1 mm. Un pettine di plastica viene sistemato nella soluzione del gel e viene tolto dopo la polimerizzazione, in modo da costituire i pozzetti per caricare i campioni. Quando l'apparecchiatura viene assemblata, il tampone della vasca elettroforetica inferiore circonda le lastre con il gel garantendone il raffreddamento. Un tipico sistema a gel orizzontale viene mostrato nella figura 12.2. Il gel viene preparato su una lastra di vetro o di plastica e appoggiato su una piastra refrigerante (una superficie isolata attraverso la quale viene fatta passare acqua di raffreddamento per dissipare il calore prodotto). La connessione tra il gel e il tampone in cui sono immersi gli elettrodi avviene attraverso l'uso di una sottile striscia di carta da filtro bagnata (vedi Fig. 12.2): si noti tuttavia che, nell'elettroforesi del DNA su gel di agarosio, il gel è immerso completamente nel tampone (cap. 9, 9.4.1). L'alimentatore fornisce una corrente continua tra gli elettrodi nella cella elettroforetica. Tutti i tipi di elettroforesi vengono condotti in un tampone appropriato, che è essenziale per mantenere costante lo stato di ionizzazione delle molecole da separare. Qualsiasi variazione nel pH potrebbe modificare la carica totale, quindi la mobilità (la velocità di migrazione nel campo applicato) delle molecole da separare.

Per capire completamente come le specie cariche si separino, è necessario ricordare alcune semplici equazioni relative all'elettroforesi. Quando si applica una differenza di potenziale (voltaggio) tra gli elettrodi, si genera un gradiente di potenziale,  $E$ , uguale al voltaggio applicato,  $V$ , diviso per la distanza,  $d$ , tra gli elettrodi. Quando questo gradiente di potenziale  $E$  vie-

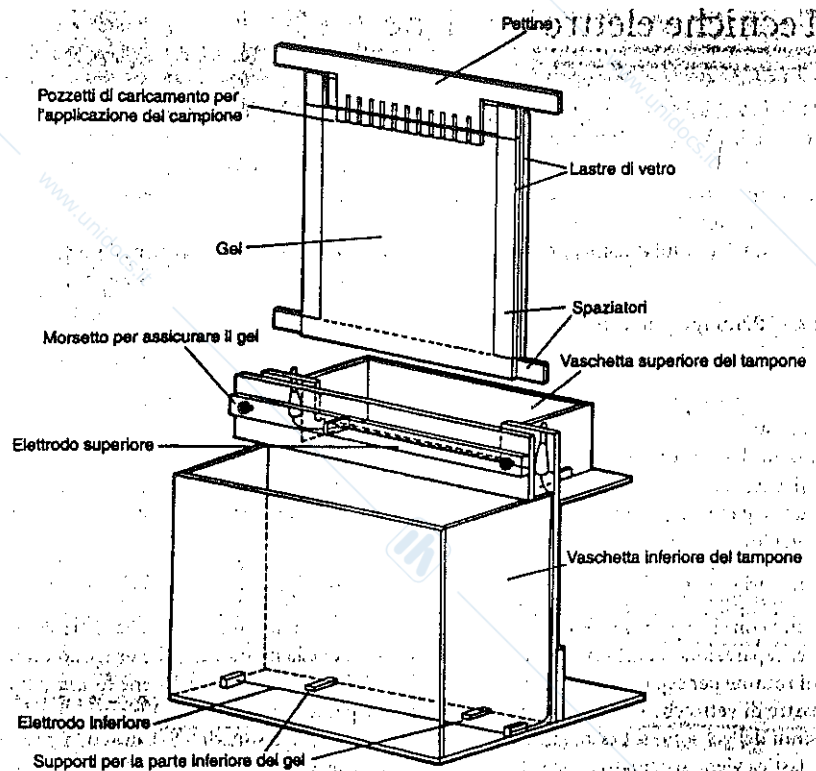


Figura 12.1 Tipico apparato verticale per l'elettroforesi su gel, come quello impiegato per separare proteine in un gel di poliacrilammide. Si noti che, una volta che il gel è polimerizzato, prima di eseguire l'elettroforesi viene tolto lo spaziatore inferiore.

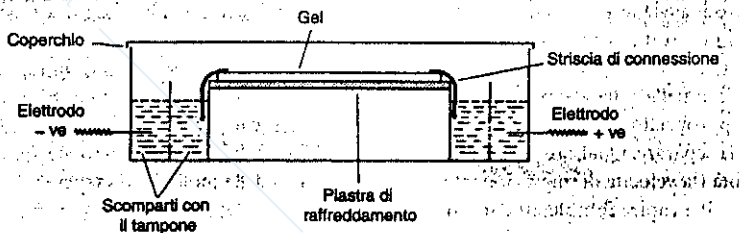


Figura 12.2 Tipico apparato orizzontale per elettroforesi su gel, come quello utilizzato per l'immuno-elettroforesi, l'isoelettrofocalizzazione e l'elettroforesi del DNA e dell'RNA su gel di agarosio.

ne applicato, la forza su una molecola di carica  $q$  (coulomb) è pari a  $Eq$  (misurata in newton). È questa forza che spinge una molecola carica verso un elettrodo. Tuttavia, esiste anche una resistenza frizionale che rallenta il movimento della particella carica; questa è una misura delle dimensioni idrodinamiche della molecola, della sua forma, delle dimensioni dei pori del mezzo in cui avviene l'elettroforesi e della viscosità del tampone. La velocità,  $v$ , di una molecola carica in un campo elettrico è quindi data dall'equazione:

$$v = \frac{Eq}{f} \quad \text{VELOCITÀ DI UNA MOLECOLA CARICA NEL CAMPO ELETTRICO} \quad (12.1)$$

dove  $f$  rappresenta il coefficiente frizionale.

Più comunemente viene utilizzato il termine mobilità elettroforetica ( $\mu$ ) dello ione, che consiste nel rapporto tra velocità dello ione e intensità del campo elettrico ( $v/E$ ). Pertanto, quando si applica una differenza di potenziale, molecole con carica totale differente iniziano a separarsi in funzione della loro diversa mobilità elettroforetica. Anche molecole con cariche uguali, ma con diverse dimensioni molecolari inizieranno a separarsi in quanto sottoposte a forze frizionali diverse. Come si vedrà in seguito, in alcune forme di elettroforesi la separazione delle molecole dipende quasi esclusivamente dalla differenza di carica, mentre altri metodi sfruttano la differenza di dimensioni molecolari e si basano su effetti frizionali per effettuare la separazione.

Se il campo elettrico viene tolto prima che le molecole nel campione abbiano raggiunto gli elettrodi, i componenti si separeranno a seconda della loro mobilità elettroforetica. Di conseguenza, l'elettroforesi è una forma incompleta di elettrolisi. I campioni separati vengono quindi visualizzati previo trattamento con opportuno colorante o, nel caso siano marcati radioattivamente, mediante autoradiografia (cap. 14, 14.2.3).

Nella soluzione tra gli elettrodi, la corrente viene condotta principalmente dagli ioni del tampone, mentre gli ioni del campione ne conducono una piccola parte. La legge di Ohm esprime la relazione tra l'intensità di corrente ( $I$ ), il voltaggio ( $V$ ) e la resistenza ( $R$ ):

$$\frac{V}{I} = R \quad (12.2)$$

Quindi, appare chiaro che è possibile accelerare una separazione elettroforetica aumentando il voltaggio applicato; ciò determina un corrispondente aumento del flusso di corrente. La distanza di migrazione degli ioni sarà proporzionale sia alla corrente sia al tempo. Tuttavia, in questo modo, non si tiene conto di uno dei problemi principali per la maggior parte delle forme di elettroforesi, vale a dire lo sviluppo di calore.

Durante l'elettroforesi la potenza ( $W$ , misurata in watt) generata nel mezzo di supporto è data dall'equazione:

$$W = I^2 R \quad (12.3)$$

La maggior parte di questa potenza sviluppata viene dissipata sotto forma di calore. Il calore sviluppato nel mezzo in cui avviene l'elettroforesi ha i seguenti effetti:

- 1) aumento della velocità di diffusione dei campioni e degli ioni del tampone, che comporta una definizione delle bande separate meno efficace;
- 2) comparsa di correnti convettive, che portano al mescolamento dei campioni separati;

- 3) instabilità termica dei campioni che sono piuttosto sensibili al calore. Questo può dar luogo alla denaturazione delle proteine e alla perdita di attività degli enzimi;
- 4) diminuzione della viscosità del tampone, quindi riduzione della resistenza del mezzo.

Se nel corso dell'elettroforesi viene applicato un voltaggio costante, la corrente aumenta per effetto della diminuzione della resistenza (vedi legge di Ohm, equazione 12.2); questo aumento di corrente incrementa ulteriormente il calore sviluppato. Per questa ragione, si utilizzano alimentatori stabilizzati, in grado di fornire una corrente costante e di eliminare, di conseguenza, le fluttuazioni di calore.

Il costante sviluppo di calore rimane comunque un problema. Una soluzione potrebbe consistere nell'eseguire l'elettroforesi a una potenza molto bassa (bassa corrente) per ovviare a ogni problema di riscaldamento, ma questo può portare a separazioni limitate, come conseguenza dell'aumento di diffusione dovuto al maggior tempo richiesto per la separazione. Si devono quindi trovare condizioni di compromesso con l'uso di ragionevoli potenze, per avere tempi di separazione accettabili, si deve inoltre utilizzare un buon sistema di refrigerazione per dissipare il calore prodotto. Nonostante sistemi del genere funzionino abbastanza bene, gli effetti del riscaldamento non sempre vengono eliminati completamente. Per esempio, nelle elettroforesi eseguite all'interno di tubicini cilindrici o su lastrine di gel, sebbene il calore sia generato in modo uniforme attraverso il mezzo, la sua dissipazione avviene solamente alle estremità; ciò si traduce in un gradiente di temperatura all'interno del gel, con la parte interna più calda rispetto alle parti esterne. Poiché il fluido più caldo nella zona centrale è meno viscoso, in questa regione le mobilità elettroforetiche sono più elevate (le mobilità elettroforetiche aumentano di circa il 2% per ogni aumento di temperatura di un grado); le bande elettroforetiche assumono una forma arcuata, con le zone centrali che migrano più velocemente rispetto ai bordi.

Un ultimo fattore, che può influenzare la separazione elettroforetica, è il fenomeno dell'elettroosmosi (noto anche come flusso elettroosmotico), dovuto alla presenza di gruppi carichi sulla superficie del mezzo di supporto. Per esempio, la carta presenta alcuni gruppi carbossilici, l'agarosio (in funzione del grado di purezza) contiene gruppi solfato e la superficie delle pareti di vetro, utilizzate nell'elettroforesi capillare (12.5), contiene silanoli (Si-OH). Nella figura 12.3 è descritto il fenomeno dell'elettroosmosi in un tubo capillare, anche se il principio è uguale per qualunque mezzo di supporto che presenti gruppi carichi sulla sua superficie. In un tubo capillare in silice fusa, a valori di pH superiori a 3, i silanoli sulla parete di silicio del capillare si ionizzano, generando siti carichi negativamente. Sono queste cariche a dare luogo all'elettroosmosi. I silanoli ionizzati creano un doppio strato elettrico, o regione di separazione di carica, all'interfaccia parete del capillare/elettrolita. Quando viene applicato un voltaggio, i cationi dell'elettrolita vicini alla parete del capillare migrano verso il catodo, trascinando con sé la soluzione elettrolitica. Ciò determina un flusso elettroosmotico netto verso il catodo.

*catodi → catodo*

## 12.2 Materiali di supporto

Gli studi pionieristici di A. Tiselius e dei suoi collaboratori, sull'elettroforesi, furono condotti in soluzione libera. Tuttavia, fu ben presto chiaro che molti dei problemi associati con questa metodica, in particolar modo gli effetti negativi della diffusione e delle correnti convettive, potevano essere limitati stabilizzando il mezzo. Questo risultato fu raggiunto ese-

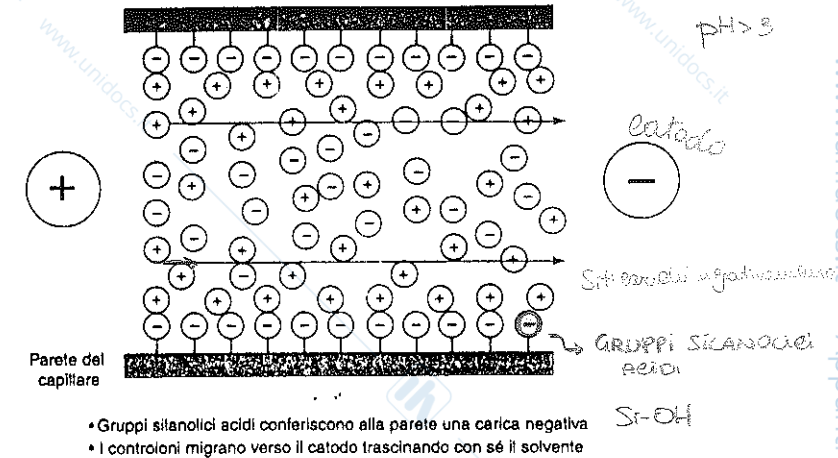


Figura 12.3 Flusso elettroosmotico in un capillare di vetro. I cationi dell'elettrolita sono attratti verso le pareti del capillare, dove formano un doppio strato elettrico. Quando si applica un voltaggio, il movimento netto della soluzione elettrolitica verso il catodo è noto come flusso elettroosmotico.

guendo l'elettroforesi su un supporto meccanico poroso, che veniva bagnato nel tampone per l'elettroforesi e all'interno del quale avveniva l'elettroforesi degli ioni del tampone e dei campioni. Il mezzo di supporto elimina le correnti convettive e la diffusione in modo che i componenti separati rimangono in bande strette. I primi supporti utilizzati erano costituiti da carta da filtro o strisce di acetato di cellulosa, imbevute nel tampone elettroforetico. Oggi questi supporti sono poco utilizzati, anche se l'acetato di cellulosa trova ancora applicazione (12.3.6). In particolare, per molti anni, molecole piccole come gli aminoacidi, i peptidi e i carboidrati, sono state separate e analizzate di routine con l'elettroforesi su supporti come carta o lastrine di cellulosa, silice o allumina. Al giorno d'oggi, benché tali tecniche siano ancora occasionalmente utilizzate, queste molecole vengono analizzate meglio con tecniche più moderne e sensibili come l'HPLC (cap. 13, 13.4). Mentre i supporti di carta o a strato sottile sono utili per determinare piccole molecole, la separazione di macromolecole, come le proteine o gli acidi nucleici, su questi supporti è scarsa.

Comunque, l'introduzione dell'uso del gel come mezzi di supporto ha determinato un rapido miglioramento nei metodi di analisi delle macromolecole. Il primo gel a essere utilizzato fu quello di amido; sebbene questo abbia ancora qualche utilizzo, la stragrande maggioranza delle tecniche elettroforetiche usate oggi impiega gel di agarosio o di poliacrilammide.

### 12.2.1 Gel di agarosio

L'agarosio è un polisaccaride lineare (massa molecolare relativa media di circa 12000) costituito di unità base ripetute di agarobiosio, intercalate da unità alternate di galattosio e di 3,6-anidrogallattosio (Fig. 12.4). L'agarosio è uno dei costituenti dell'agar, una miscela di po-

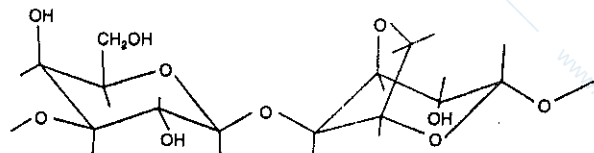


Figura 12.4 Agarobiosio, l'unità che si ripete nell'agarosio.

lisaccaridi isolati da alcune specie di alghe. L'agarosio viene di solito usato in concentrazioni comprese tra l'1 e il 3%. I gel di agarosio vengono formati sospendendo l'agarosio in polvere in un tampone acquoso, bollendo la miscela fino a ottenere una soluzione limpida, versando la soluzione e lasciandola raffreddare a temperatura ambiente per formare un gel rigido. Le proprietà gelificanti sono dovute ai legami idrogeno sia inter- sia intramolecolari tra le lunghe catene di agarosio. La struttura reticolata conferisce al gel buone proprietà anticongelative. Le dimensioni dei pori nel gel sono determinate dalla concentrazione iniziale di agarosio; pori di grandi dimensioni si formano partendo da basse concentrazioni, mentre pori più piccoli si ottengono con più elevate concentrazioni. Sebbene l'agarosio sia sostanzialmente privo di carica, si può verificare a vari gradi la sostituzione di alcuni gruppi degli zuccheri con gruppi carbossilici, metossile, piruvato e in special modo solfato. Questa sostituzione può dare luogo all'elettroendosmosi durante l'elettroforesi e a interazioni ioniche tra il gel e il campione, entrambi effetti indesiderati. Pertanto, l'agarosio viene venduto a diversi gradi di purezza, basati sulla concentrazione di solfati; più quest'ultima è bassa, maggiore è la purezza.

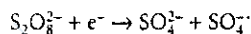
I gel di agarosio vengono utilizzati per l'elettroforesi sia delle proteine sia degli acidi nucleici. Per le proteine, le dimensioni dei pori di un gel all'1% sono sufficientemente larghe rispetto a quelle delle proteine. I gel di agarosio sono perciò utilizzati in tecniche come l'immunoelettroforesi (cap. 4, 4.4.1) o l'isoelettrofocalizzazione orizzontale (12.3.4), in cui le proteine devono muoversi senza ostacoli nella matrice di gel a seconda della loro carica nativa. Questi gel con pori larghi sono usati anche per separare molecole molto più grandi, come il DNA o l'RNA, in quanto le dimensioni dei pori sono ancora sufficienti per lasciar passare al loro interno anche queste molecole. In questo caso, però, le dimensioni dei pori e quelle delle molecole sono più confrontabili e gli effetti frizionali iniziano a giocare un ruolo importante nella separazione di queste molecole (12.4). Un vantaggio ulteriore nell'utilizzare l'agarosio consiste nella disponibilità di agarosio a bassa temperatura di fusione (62-65 °C). Come suggerisce il nome, questi gel possono essere resi nuovamente liquidi e in tal modo, per esempio, i campioni di DNA separati in un gel possono essere estratti da quest'ultimo, facendoli tornare in soluzione e, quindi, recuperandoli.

L'elettroforesi su supporti a disco, una tecnica che si presta all'uso con i gel di poliacrilammide, non viene utilizzata con l'agarosio a causa della scarsa elasticità dei corrispondenti gel e dei conseguenti problemi che si verificano a creare al momento di estrarli dai tubicini. Vengono perciò utilizzati gel orizzontali per l'isoelettrofocalizzazione o l'immunoelettroforesi in agarosio, sistemi impiegati di routine anche per il DNA e l'RNA (12.4), sebbene alcuni ricercatori utilizzino i sistemi verticali.

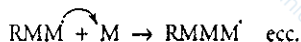
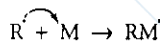
### 12.2.2 Gel di poliacrilammide

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide viene spesso chiamata PAGE, abbreviazione di *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*.

I gel di poliacrilammide con legami crociati vengono preparati mediante la polimerizzazione di un monomero di acrilammide in presenza di piccole quantità di *N,N'*-metilenbisacrilammide (chiamata di solito bis-acrilammide) (Fig. 12.5). Si noti che una molecola di bis-acrilammide, usata come agente in grado di formare legami crociati, è formata essenzialmente da due molecole di acrilammide legate da un gruppo metilene. La polimerizzazione dei monomeri di acrilammide è del tipo testa-coda, formando lunghe catene in cui occasionalmente si inserisce una molecola di bis-acrilammide; ciò fa sì che venga introdotto un secondo sito per l'estensione della catena. Procedendo in questo modo si forma una matrice con legami crociati di struttura ben definita (Fig. 12.5). La polimerizzazione dell'acrilammide è un esempio di catalisi radicalica e inizia con l'aggiunta di ammonio persolfato e della base *N,N,N',N'*-tetrametildiammina (TEMED). Il TEMED catalizza la decomposizione dello ione persolfato con la produzione di un radicale libero (cioè una molecola con un elettrone spaiato):



Se questo radicale libero viene rappresentato come  $R^{\cdot}$  (dove il punto rappresenta un elettrone spaiato) e  $M$  è una molecola di monomero di acrilammide, allora la polimerizzazione può essere rappresentata come segue:



I radicali liberi sono specie altamente reattive a causa della presenza di un elettrone spaiato, che deve accoppiarsi con un altro elettrone per stabilizzare la molecola.  $R^{\cdot}$  quindi reagisce con  $M$  e forma un legame singolo, condividendo il suo elettrone spaiato con uno proveniente dal gruppo esterno della molecola del monomero. Questo produce un nuovo radicale libero  $R-M^{\cdot}$ , che è ugualmente reattivo e che leggerà un'ulteriore molecola di monomero. In questo modo si formano lunghe catene di acrilammide, tenute insieme da legami crociati a seguito dell'introduzione di occasionali molecole di bis-acrilammide nella catena in crescita. Poiché l'ossigeno rimuove i radicali liberi, tutte le soluzioni di gel vengono di solito degassate prima dell'uso (le soluzioni sono poste per breve tempo sotto vuoto per rimuovere l'ossigeno disciolto).

La fotopolimerizzazione è un metodo alternativo che può essere utilizzato per la polimerizzazione dei gel di acrilammide. L'ammonio persolfato e il TEMED sono sostituiti dalla riboflavina e, quando il gel viene versato, lo si posiziona di fronte a una luce intensa per 2 o 3 ore. La fotodecomposizione della riboflavina genera un radicale libero che dà inizio alla polimerizzazione.

I gel di acrilammide vengono definiti in base alla percentuale totale di acrilammide presente; le dimensioni dei pori del gel variano cambiando le concentrazioni sia dell'acrilammide sia della bis-acrilammide. I gel di acrilammide possono avere un contenuto di acrilammide variabile tra il 3 e

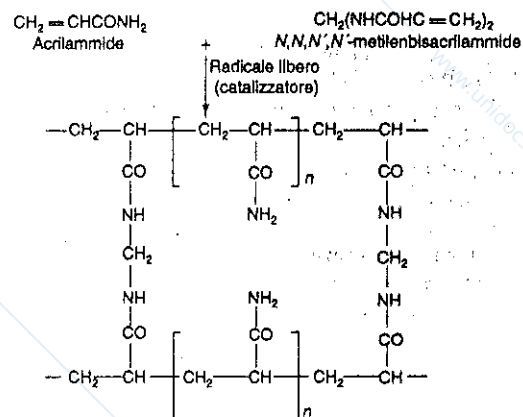


Figura 12.5 Formazione di un gel di poli(acrilammide) a partire da acrilammide e bis-acrilammide.

il 30%. Pertanto, gel a percentuale bassa (per esempio 4%) possiedono pori di grandi dimensioni e sono utilizzati, per esempio, nell'elettroforesi delle proteine quando venga richiesto il libero movimento delle proteine indotto dall'elettroforesi senza alcun effetto frizionale, per esempio nell'isoelettrofocalizzazione orizzontale (*flat-bed*) (12.3.4) o nei gel di impaccamento (*stacking gel*) nella SDS-PAGE (12.3.1). I gel a bassa percentuale di acrilammide sono usati anche per separare DNA (12.4). I gel con contenuto di acrilammide tra il 10 e il 20% vengono utilizzati in tecniche come la SDS-PAGE, dove le dimensioni più piccole dei pori introducono un effetto di filtrazione che contribuisce alla separazione delle proteine in base alla loro dimensione (12.3.1).

Originariamente le proteine venivano separate su gel di poli(acrilammide) fatti polimerizzare in tubi di vetro di circa 7 mm di diametro e 10 cm di lunghezza. Questi tubi erano facili da caricare e da usare e richiedevano l'impiego di apparecchiature semplici. Tuttavia, si poteva far correre solo un campione per ogni tubo e, poiché le condizioni di separazione potevano variare da tubo a tubo, il confronto dei risultati tra diversi campioni non sempre era accurato. Successivamente l'introduzione dell'elettroforesi verticale ha permesso di utilizzare, in una singola prova, fino a 20 campioni nelle medesime condizioni. Oggi l'elettroforesi verticale viene impiegata di routine sia per l'analisi delle proteine (12.3) sia per la separazione dei frammenti di DNA durante l'analisi della sequenza del DNA (12.4). Si tenga presente, comunque, che i tubi riempiti con il gel sono tuttora utilizzati per la prima dimensione nell'elettroforesi su gel bidimensionale (12.3.5).

## 12.3 Elettroforesi delle proteine

### 12.3.1 Elettroforesi su gel di poli(acrilammide) con sodio dodecil solfato (SDS-PAGE)

La SDS-PAGE è il metodo di più largo impiego per l'analisi qualitativa di miscele di proteine. È un metodo particolarmente utile per valutare la purezza delle proteine e, poiché è

basato sulla separazione delle proteine in base alle loro dimensioni, può essere utilizzato anche per determinare le masse molecolari relative delle proteine. Il **sodio dodecil solfato** (SDS),  $\text{CH}_3\text{---}(\text{CH}_2)_{10}\text{---CH}_2\text{OSO}_3\text{Na}^+$ , è un detergente anionico. I campioni da separare in SDS-PAGE vengono dapprima bolliti per 5 minuti in un tampone (*sample buffer*) contenente SDS e  $\beta$ -mercaptoetanolo. Il  $\beta$ -mercaptoetanolo riduce i ponti disolfuro eventualmente presenti, che tengono insieme la struttura terziaria della proteina, e l'SDS si lega fortemente alla proteina e la denatura. Con questo trattamento tutte le proteine della miscela vengono completamente denaturate e si aprono in una struttura filamentosa con una serie di molecole di SDS cariche negativamente lungo la catena polipeptidica. In media, una molecola di SDS si lega ogni due residui di aminoacido. La carica nativa originale della molecola viene quindi completamente eliminata dalle molecole di SDS cariche negativamente. La struttura filamentosa rimane, in quanto ogni rotazione che tende a chiudere la catena proteica determinerà una repulsione tra le cariche negative sulle diverse parti della catena proteica, che renderanno la conformazione di nuovo filamentosa. Il tampone del campione contiene anche un colorante tracciante ionizzabile, di solito il blu di bromofenolo, che permette di seguire l'andamento della corsa elettroforetica, e del saccarosio o glicerolo, che rendono la densità della soluzione campione tale da stratificare facilmente il campione attraverso il tampone elettroforetico sul fondo, quando viene iniettato nel pozzetto di caricamento (Fig. 12.1). Una volta che sono stati caricati tutti i campioni, viene fatta passare corrente attraverso il gel. I campioni che devono essere separati non vengono infatti caricati direttamente all'interno del gel di separazione (*running gel*). Quando quest'ultimo (di solito della lunghezza di 10 cm) viene versato tra le due lastre di vetro e fatto polimerizzare, un gel di impaccamento (*stacking gel*) più corto (approssimativamente 1 cm) viene versato sull'estremità superiore del gel di separazione; è in questo gel che si formano i pozzetti per il caricamento in cui vengono caricate le proteine. Lo scopo del gel di impaccamento è quello di concentrare il campione di proteine in una banda sottile prima che entri nel gel di separazione principale. Questo risultato si ottiene utilizzando forza ionica e pH differenti nel tampone elettroforetico e nel gel di impaccamento, fenomeno noto come isotacoforesi. Il gel di impaccamento ha pori di dimensioni molto grandi (4% acrilammide) che permettono alle proteine di muoversi liberamente e di concentrarsi, o impaccarsi, sotto l'effetto del campo elettrico. L'effetto di assottigliamento delle bande dipende dal fatto che gli ioni di glicinato, carichi negativamente (nel tampone elettroforetico), hanno una mobilità elettroforetica più bassa di quella dei complessi proteina-SDS che, a loro volta, hanno una mobilità inferiore di quella degli ioni cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) del tampone campione e del gel di impaccamento. Quando viene applicata la corrente, tutte le specie ioniche devono migrare alla stessa velocità, altrimenti si verifica un'interruzione nel circuito elettrico. Gli ioni glicinato possono muoversi alla stessa velocità dei  $\text{Cl}^-$  solo se sono in una regione con un campo elettrico più forte. L'intensità del campo è inversamente proporzionale alla conduttività, che a sua volta è proporzionale alla concentrazione. Il risultato è che le tre specie di interesse variano la propria concentrazione in modo che  $[\text{Cl}^-] > [\text{proteina-SDS}] > [\text{glicinato}]$ . Poiché i complessi proteina-SDS sono presenti solo in piccola quantità, essi tendono a concentrarsi in una banda molto stretta tra il glicinato e il  $\text{Cl}^-$ . Una volta che il glicinato ha raggiunto il gel di separazione, diventa completamente ionizzato nell'ambiente a pH maggiore e la sua mobilità cresce. (Il pH del gel di impaccamento è 6.8, quello del gel di separazione è 8.8.)

Perciò, i complessi proteina-SDS migrano meno velocemente rispetto agli ioni glicinato e  $\text{Cl}^-$  nel gel di separazione e vengono lasciati separare elettroforeticamente alle loro proprie velocità. I complessi SDS-proteina, carichi negativamente, continuano ora a muoversi verso l'anodo e, siccome hanno la stessa carica per unità di lunghezza, si spostano all'interno del gel di separazione, sotto il campo elettrico applicato, tutti con la stessa mobilità. Tuttavia, quando passano attraverso il gel di separazione, le proteine si separano a causa delle proprietà di setaccio molecolare del gel. In parole semplici, più piccola è la proteina, più facilmente potrà passare attraverso i pori del gel, mentre le proteine di dimensioni maggiori vengono ritardate dalla resistenza frizionale dovuta all'effetto di setaccio del gel. Il colorante blu di bromofenolo, essendo una molecola piccola, non viene assolutamente ritardato, quindi rappresenta il fronte di migrazione. Quando il colorante raggiunge il fondo del gel, viene tolta la corrente; il gel viene rimosso dalle due lastre di vetro, tenuto sotto agitazione per alcune ore in una soluzione colorante adatta (di solito Coomassie Brilliant Blue, 12.3.8) e lavato in una soluzione decolorante per una notte. La soluzione decolorante rimuove dal gel il colorante che non si è legato, lasciando le proteine visibili come bande blu su uno sfondo trasparente. Un processo di questo tipo prevede circa 1-1.5 ore per la preparazione del gel, 3 ore la separazione con una corrente di 30 mA, circa 2-3 ore per la colorazione e una notte per la decolorazione. Si fa sempre ricorso all'elettroforesi verticale, in quanto permette di caricare su un singolo gel fino a 20 campioni. Un tipico esempio di gel di poliacrilammide in presenza di SDS è illustrato nella figura 12.6.

Tipicamente, per il gel di separazione si utilizzano percentuali di poliacrilammide del 15%. Ciò determina dimensioni dei pori del gel tali che le proteine di massa molecolare relativa ( $M_r$ ) pari a 10 000 si muovono attraverso il gel quasi senza incontrare ostacoli, laddove proteine di 100 000 possono a malapena penetrare nei pori di questo gel. I gel al 15% di poliacri-

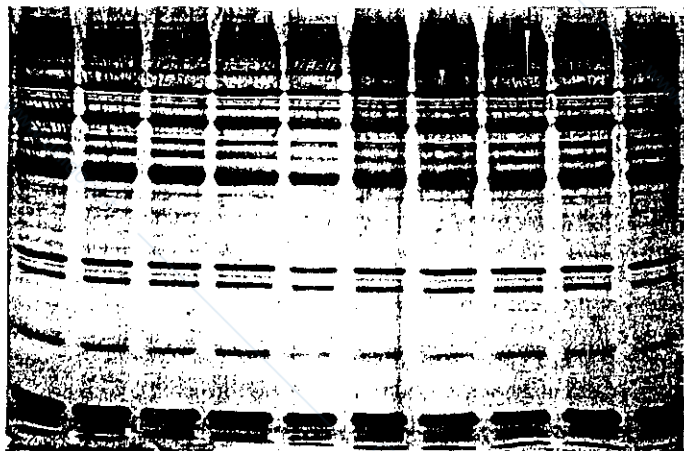


Figura 12.6 Tipico gel di poliacrilammide in presenza di SDS. I dieci pozzetti contengono la stessa miscela complessa di proteine. (Per gentile concessione della Bio-Rad Laboratories Ltd.)

lamide sono quindi utili per separare proteine con una massa molecolare relativa compresa tra 100 000 e 10 000. Quindi una proteina di 150 000, per esempio, non sarebbe in grado di penetrare in un gel al 15%. In questo caso si potrebbe utilizzare un gel con pori più larghi (per esempio un gel al 10% o anche al 7.5%), in modo da permettere a una proteina di queste dimensioni di penetrarvi e di essere quindi colorata e identificata. È ovvio, quindi, che la scelta del gel da utilizzare dipende dalle dimensioni della proteina che deve essere studiata.

La  $M_r$  di una proteina può essere determinata confrontando la sua mobilità con quella di una serie di proteine con  $M_r$  nota, che vengono separate sullo stesso gel. Mettendo in grafico la distanza di migrazione in funzione del  $\log M_r$  per ciascuna delle proteine standard, si può costruire una curva di calibrazione. Si misura poi la distanza di migrazione della proteina con  $M_r$  incognita e dalla curva di calibrazione si ottiene quindi l' $M_r$  cercata.

Questa tecnica viene spesso utilizzata dopo ogni passaggio di un protocollo di purificazione per valutare se il campione è più o meno puro. Una proteina pura dovrebbe dare una singola banda, a meno che la molecola non sia costituita da due subunità diverse. In quest'ultimo caso si vedranno due bande corrispondenti alle due subunità. Poiché per questa tecnica sono necessarie quantità molto piccole della proteina, dell'ordine dei microgrammi, solo una piccolissima frazione del materiale viene impiegata in questa per verificare la purezza e al tempo stesso determinare la massa molecolare relativa della proteina nello stesso esperimento (come descritto in precedenza), senza utilizzare ulteriore materiale.

### 12.3.2 Elettroforesi in condizioni native

Anche se l'SDS-PAGE è il sistema su gel utilizzato più frequentemente per studiare le proteine, tale metodo non è impiegabile se lo scopo dello studio è di individuare una particolare proteina (spesso un enzima) sulla base della sua attività biologica, perché la proteina (enzima) viene denaturata dal procedimento. In questo caso è necessario utilizzare condizioni non denaturanti. Nell'elettroforesi in condizioni native trovano ancora impiego i gel di poliacrilammide (normalmente al 7.5%), ma l'SDS è assente e le proteine non vengono denaturate prima del caricamento. Siccome tutte le proteine presenti nel campione che devono essere analizzate trasportano la loro carica nativa al pH del gel (di solito pari a 8.7), le proteine si separano in base alle loro differenti mobilità elettroforetiche e agli effetti di setaccio del gel. Anche se non è possibile predire quale comportamento avrà una determinata proteina, si raggiunge una buona risoluzione in conseguenza dell'ampio intervallo di cariche e dimensioni diverse delle proteine in una data miscela. L'enzima di interesse può essere identificato incubando il gel in una soluzione di substrato adatta, in modo che si sviluppi un prodotto colorato in corrispondenza della posizione occupata dall'enzima. Un metodo alternativo per rivelare un enzima consiste nell'includere il substrato in un gel di agarosio che viene poi versato sul gel di acrilammide e fatto polimerizzare. La diffusione e l'interazione dell'enzima e del substrato tra i due gel determina la formazione di bande colorate dove si trova l'enzima. Spesso vengono caricati sul gel duplicati del campione; il gel viene quindi tagliato in due e una parte viene colorata per l'attività, l'altra per le proteine totali. In questo modo si può analizzare il contenuto di proteine totali nel campione e identificare la banda corrispondente all'enzima in base all'informazione del gel colorato per l'attività.



di zwitterione, priva di carica netta, e quindi cessa di muoversi. In modo analogo, le sostanze che si trovano inizialmente in zone a pH superiore al loro punto isoelettrico si caricano negativamente e iniziano a migrare verso l'anodo, finché non raggiungono i loro punti isoelettrici e si arrestano. È da notare che, poiché le sostanze si muovono sempre verso i loro punti isoelettrici, il punto sul gel in cui si applicano i campioni non è un fattore critico. Per ottenere separazioni rapide (in 2-3 ore) vengono usati voltaggi relativamente alti (fino a 2500 V). Poiché si sviluppa una notevole quantità di calore, i gel vengono fatti correre su piastre refrigeranti (10 °C) e si fa ricorso ad alimentatori per stabilizzare la potenza prodotta e minimizzare le fluttuazioni termiche. Dopo l'elettroforesi, il gel deve essere colorato per rivelare le proteine. Tuttavia, questa operazione non può essere eseguita direttamente perché si colorerebbero anche gli anfiliti, dando un gel completamente blu. Il gel va quindi prima lavato con una soluzione fissante (per esempio, acido tricloroacetico al 10% v/v), che fa precipitare le proteine nel gel e permette di lavar via le molecole di anfilita molto più piccole. In seguito il gel viene colorato con Coomassie Brilliant Blue e quindi decolorato (12.3.8). Un tipico gel IEF viene mostrato nella figura 12.8. La tecnica è molto simile a quella del *chromatofocusing* (13.7.3).

Il pI di una particolare proteina può essere determinato convenientemente facendo correre una miscela di proteine con pI noti sullo stesso gel. In commercio si trovano diverse miscele di proteine con diversi valori di pI, che coprono l'intervallo di pH tra 3,5 e 10. Dopo la colorazione, viene misurata la distanza di ogni banda da un elettrodo e viene costruito un grafico di questa distanza per ogni proteina, in funzione del pI (in realtà il valore del pH in quel punto). Grazie a questa retta di calibrazione, si può determinare il pI di una proteina sconosciuta dalla sua posizione nel gel.

L'IEF è una tecnica molto sensibile, particolarmente utile per studiare le microeterogeneità di una proteina. Per esempio, una proteina può apparire come una singola banda su un gel contenente SDS, ma può dare tre bande su un gel IEF. Ciò può accadere, per esempio, quando una proteina esiste nelle forme mono-, bi- e trifosforilata. La differenza di uno o due gruppi fosfato non ha un effetto significativo sulla massa molecolare relativa totale della proteina, per cui nei gel contenenti SDS si ottiene una singola banda, ma la piccola differenza di carica introdotta su ogni molecola può essere rivelata dall'IEF.

Il metodo è particolarmente utile per separare gli isoenzimi (cap. 6, 6.2), cioè diverse forme dello stesso enzima che spesso differiscono soltanto per uno o due aminoacidi. Poiché le proteine sono nella forma nativa, gli enzimi possono essere rivelati nel gel lavando il gel non fissato e colorandolo con un substrato appropriato oppure sovrapponendo un gel di agarosio contenente il substrato. Questa metodologia ha trovato un particolare utilizzo nella scienza forense, dove tracce di sangue o di altri fluidi biologici possono essere analizzate e confrontate in base alla composizione di certi isoenzimi.

Sebbene l'IEF trovi impiego soprattutto nelle separazioni analitiche, può essere utilizzata anche per scopi preparativi. Nell'IEF verticale su colonna si usa una colonna verticale di vetro, raffreddata con acqua e riempita con una miscela di anfiliti sciolti in una soluzione di saccarosio che forma un gradiente di densità per prevenire la diffusione. Quando la separazione è completa, la corrente viene interrotta e i componenti del campione vengono eluiti attraverso una valvola alla base della colonna. In alternativa, l'IEF preparativa può essere eseguita su letti di gel granuloso, come il Sephadex G-75 (cap. 13, 13.8).

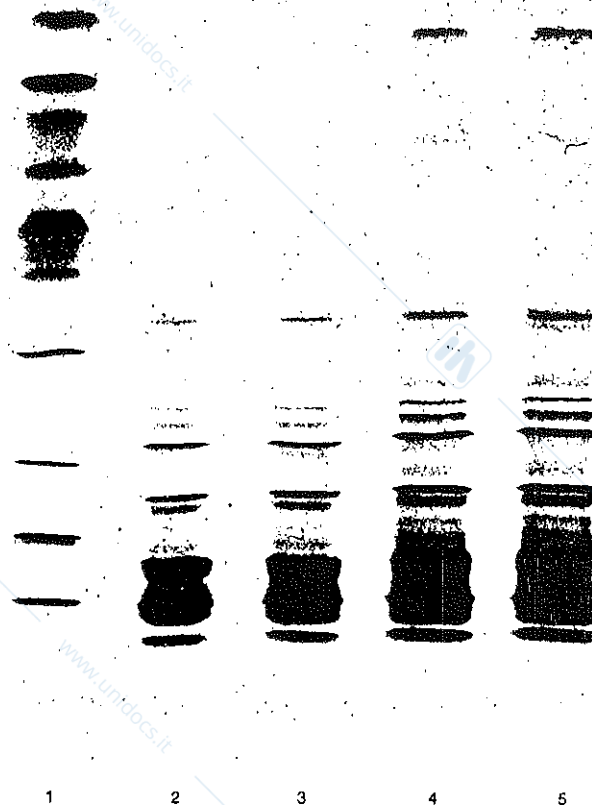


Figura 12.8 Tipico gel di isoelettrofocalizzazione. Il primo pozzetto contiene una miscela di proteine standard con punti isoelettrici noti. I pozzetti dal 2 al 5 contengono quantità crescenti di veleno di serpente. (Per gentile concessione della Bio-Rad Laboratories Ltd.)

### 12.3.5 Elettroforesi bidimensionale su gel di poliacrilammide

Questa tecnica combina l'IEF, che separa le proteine di una miscela in base alla carica (pI), con la SDS-PAGE, in cui la separazione avviene in base alle dimensioni. Queste due tecniche combinate insieme danno luogo all'elettroforesi bidimensionale su gel di poliacrilammide (2-D PAGE, *Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), la più sofisticata tecnica di separazione delle proteine disponibile. La prima dimensione (isoelettrofocalizzazione) viene eseguita su gel di poliacrilammide in tubi stretti (circa 1-2 mm di diametro interno) in presenza di anfiliti, urea 8 M e un detergente non ionico. Le proteine denaturate si separano nel

gel a seconda dei loro punti isoelettrici. Successivamente, il gel viene recuperato dal tubo applicando una piccola pressione a un'estremità, incubato per 15 minuti in un tampone contenente SDS (legando così l'SDS alla proteina denaturata), quindi posizionato lungo il gel di impaccamento di un gel contenente SDS (lineare o in gradiente) e infine fissato versando agarosio sciolto, in tampone elettroforetico, sul gel. Una volta che l'agarosio si è polimerizzato, si avvia l'elettroforesi: le proteine legate all'SDS entrano nel gel, si impaccano e si separano in base alle dimensioni (come descritto in 12.3.1). Un tipico gel 2-D di poliacrilammide viene mostrato nella figura 12.9.

Con questo metodo si possono risolvere di routine tra le 1000 e le 2000 proteine da una cellula intera o da un estratto di tessuto; usando gel 2-D con grandi formati (giganti), alcuni ricercatori sono stati in grado di risolvere tra le 5000 e le 10 000 proteine. Si calcola che ogni tipo di cellula esprima tra le 10 000 e le 20 000 proteine; oggi si è in condizione di poter "osservare" una parte significativa del contenuto proteico totale di una determinata cellula, con

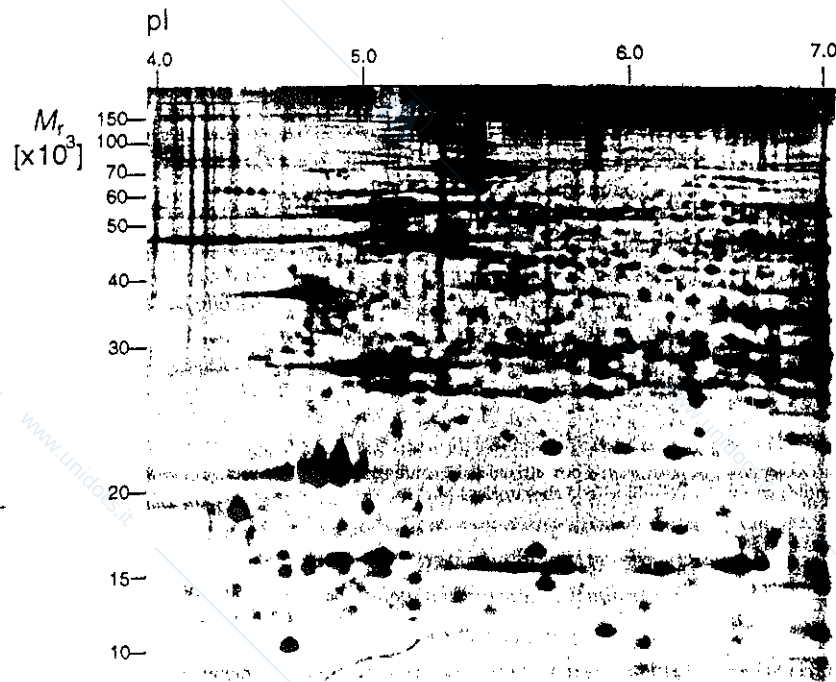


Figura 12.9 Tipico gel bidimensionale. Il campione applicato era costituito da 100 µg di proteine totali, estratte da un ventricolo di cane sano. La prima dimensione è stata ottenuta su un gel di isoelettrofocalizzazione a pH 4-7, la seconda su un gel verticale al 12% in SDS-PAGE. Il pattern è stato visualizzato per colorazione ad argento (silver stain). (Per gentile concessione di Monique Heinke e Dr Mike Dunn, Division of Cardiothoracic Surgery, Imperial College School of Medicine, Heart Science Centre, Harefield, UK.)

l'ausilio dell'elettroforesi bidimensionale (2-DE). In conseguenza di questo risultato è stato introdotto il termine di proteoma, che si riferisce a tutto l'insieme di proteine espresso dal genoma in un organismo (il termine è ovviamente analogo a "genoma", che è relativo al contenuto completo di acido nucleico di una specie). Tuttavia, sebbene la sequenza del DNA genomico permetta di dedurre quali proteine dovrebbero essere presenti, non permette di stabilire quali siano *realmente* espresse in ogni specifico tessuto o se esse subiscano modificazioni post-traduzionali (per esempio fosforilazione, glicosilazione, ecc.), né di indagare le loro funzioni. È l'analisi del contenuto proteico di una cellula o di un tessuto che fornisce informazioni di questo tipo.

Come si vedrà in seguito, la capacità di separare un gran numero di proteine per mezzo della 2D-PAGE e di identificare le singole proteine per mezzo dell'analisi parziale della sequenza, e la ricerca su database di questa sequenza si è tradotta in un rapido aumento della nostra conoscenza della componente proteica delle cellule. Chiaramente questo progetto va di pari passo con il Progetto Genoma Umano, che continua a produrre un database di sequenze di DNA (e quindi di sequenze di proteine) sempre più vasto, in cui si possono ricercare le analogie tra le sequenze. La complessità e la quantità di dati ottenibili dai pattern dei gel 2-D sono tali da intimidire, ma fortunatamente si trovano in commercio vari software d'analisi dei gel 2-D, compatibili con i personal computer, grazie ai quali si possono ricavare informazioni sia qualitative sia quantitative dai pattern dei gel e inoltre confrontare i pattern di due diversi gel 2-D. Ciò ha permesso la costruzione di alcuni database di espressione proteica quantitativa in una serie di tipi di tessuto e di cellule. Per esempio, un database di proteine del sistema cardiovascolare è stato costruito dall'Heart Sciences Centre, Imperial College School of Medicine all'Harefield College, in Gran Bretagna, a cui si può accedere rapidamente dal World Wide Web (WWW). Un ampio sistema di database 2-DE, conosciuto come SWISS-2D PAGE, fa capo all'Università di Ginevra ed è anch'esso accessibile tramite WWW. Questo servizio permette quindi a un laboratorio di confrontare il proprio database 2D di proteine con quelli di un altro laboratorio.

Oggi è possibile seguire i cambiamenti nell'espressione di *tutte* le proteine di una cellula o un tessuto, anziché di una o due come invece accadeva in passato. Le applicazioni potenziali dell'analisi del proteoma sono enormi. Innanzitutto si può produrre un mappa 2-D delle proteine espresse da un organismo, da un tessuto o da una cellula in condizioni "normali". Questa mappa e il database 2-D di riferimento possono essere quindi utilizzati per confrontare i dati ottenuti con informazioni simili ricavate da organismi, tessuti o cellule "anormali" o trattate. Si può per esempio confrontare un tessuto normale con uno malato (per esempio neoplasia maligna e non maligna), analizzare gli effetti del trattamento con farmaci o con tossine sulle cellule, osservare i cambiamenti della componente proteica della cellula nei diversi stadi del ciclo cellulare o durante l'apoptosi, studiare la risposta a stimoli extracellulari come ormoni o citochine, confrontare ceppi batterici patogeni o non patogeni. Come tipico esempio, un gruppo di ricerca che studia gli effetti tossici dei farmaci sul fegato può confrontare i pattern dei gel 2-D dei fegati "danneggiati" con la mappa di riferimento 2-D di un fegato normale, identificando i cambiamenti proteici che avvengono in seguito al trattamento farmacologico.

#### Caratterizzazione delle proteine separate mediante 2-DE

Dopo aver confrontato due tracciati 2-DE e identificato ogni macchia proteica di interesse, è necessario identificare ogni singola proteina. Questo scopo viene raggiunto ottenendo i dati

di parziale sequenza e poi cercando nei database di sequenze proteiche per identificare la sequenza. Sono disponibili database universali che raccolgono informazioni su tutti i tipi di proteine, ricavati da tutte le specie biologiche. Questi database possono essere divisi in due categorie: 1. database che rappresentano un semplice elenco di dati di sequenza, la maggior parte dei quali dedotti direttamente dalle sequenze di DNA, per esempio il database TrEMBL; 2. database con commenti, in cui, oltre alla sequenza, si trovano informazioni che il biologo (autore del commento) ha desunto dalla letteratura, da articoli su riviste ecc., per esempio il database SWISS-PROT. Al momento della stesura di questo libro, il database SWISS-PROT conteneva 65 000 sequenze tratte da più di 5000 diverse specie (sebbene la maggior parte delle annotazioni provenisse da circa 30 specie su cui si sono maggiormente concentrate le ricerche biologiche). I dati di sequenza si ottengono in uno dei modi seguenti:

1. Sequenziamento proteico diretto della macchia con la degradazione di Edman (cap. 6, 6.4.3). In questa tecnica, le proteine nel gel 2-D sono sottoposte a elettroblotting su un'adatta membrana, per esempio polivinilidene difluoruro (PVDF). Dopo la colorazione del blot, la macchia di interesse viene asportata e introdotta direttamente in un analizzatore di sequenza automatizzato, in modo da generare una sequenza aminoacidica a partire dall'estremità N-terminale della proteina.
2. Da profili di masse peptidiche. Questo metodo si basa sull'osservazione che le precise masse peptidiche, ottenute con le analisi di spettrometria di massa (cap. 11) di un digerito proteico (per esempio con tripsina) forniscono un'impronta caratteristica della proteina. La macchia proteica è quindi digerita *in situ* all'interno del gel o dopo elettroblotting sulla matrice. Dopo l'estrazione, i peptidi non separati possono essere analizzati con la MALDI-MS (cap. 11), che darà valori di massa molecolare relativa precisi per i peptidi prodotti. Questi dati di massa molecolare relativa ottenuti sperimentalmente possono essere utilizzati per il confronto con i database di masse molecolari relative dei peptidi generati da sequenze di proteine note (o da sequenze previste dedotte da sequenze nucleotidiche).
3. Determinazione di sequenza con la spettrometria di massa. I dati di sequenza parziale possono essere determinati con la spettrometria di massa e si può effettuare una ricerca sui database per l'identità della sequenza. La figura 12.10 illustra un esempio di questo approccio. Mediante 2-DE si è separato un lisato di  $2 \times 10^6$  cellule leucemiche basofile del ratto e per l'analisi la scelta è caduta sulla macchia 2. Quest'ultima è stata digerita *in situ* e le proteine risultanti sono state estratte, per poi essere analizzate con la MS tandem tramite uno strumento a tripetto e a quadrupolo (ESI-MS<sup>2</sup>). La spettrometria di massa della miscela peptidica mostra una serie di ioni molecolari relativi ai peptidi. Uno di questi ( $m/z$  890) è stato selezionato per un'ulteriore analisi, frammentandolo ulteriormente in uno spettrometro di massa a quadrupolo a dare frammenti di ioni con valori di  $m/z$  compresi nell'intervallo da 595.8 a 1553.6 (Fig. 12.10). Gli ioni con  $m/z$  pari a 1002.0, 1116.8, 1280.0, 1466.2 e 1553.6 probabilmente fanno parte della serie ionica Y (Fig. 12.11) dal momento che appaiono a  $m/z$  più elevati del precursore a  $m/z$  890. L'intervallo tra due ioni Y adiacenti dipende direttamente da un aminoacido, poiché i due ioni Y vicini risultano dalla rottura di due legami ammidici adiacenti. Quindi, conoscendo le masse molecolari relative di ciascuno dei 20 aminoacidi che si trovano in natura, è possibile determinare la presenza di uno specifico residuo in qualsiasi punto all'interno del peptide. La posizione dell'aminoacido assegnato si deduce in virtù del rapporto  $m/z$  dei due ioni. Leggendo diversi ami-

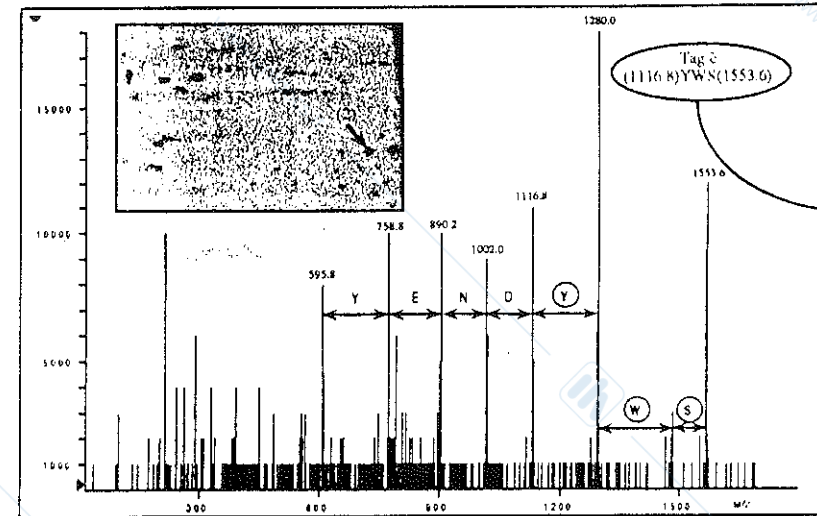


Figura 12.10 Spettro nano-ESI MS<sup>2</sup> di  $m/z$  890 dalla macchia 2 che mostra la costruzione di un tag di sequenza. L'asse delle ordinate mostra l'intensità relativa. (Per gentile concessione di Mr Malcolm Ward, Glaxo Wellcome Research and Development, Stevenage, UK.)

Index	Peptide/Start	Acc. Num.	MW (Da)	Protein Name
1	11504	P16858	35678.99	GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEH
2	11511	P04797	35705.07	GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEH

Figura 12.11 Schema di input del programma PeptideSearch<sup>TM</sup> e risultato della ricerca basata sui dati ottenuti dalla nano-ESI MS<sup>2</sup> di  $m/z$  890 della macchia 2. (Per gentile concessione di Mr Malcolm Ward, Glaxo Wellcome Research and Development, Stevenage, UK.)

noacidi, è possibile assemblare una sequenza di aminoacidi, in questo caso YWS (usando il codice a una lettera). La ricerca nel database è possibile utilizzando il peptide con  $M_r$  1778, la posizione dello ione con  $m/z$  più basso (1116.8), la sequenza aminoacidica proposta (YWS) e lo ione Y più alto a  $m/z$  1553. Questo produce un tag (etichetta) di sequenza, che si scrive (116.8)YWS(1553.6).

Una ricerca nel database SWISS-PROT (Fig. 12.11) dà due soli risultati da 40 000 sequenze, dai quali si deduce che la proteina in questione è la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi. La sequenza completa di questo peptide è LISWYDNEYGYSNR e i dati di frammentazione HS/MS sono in perfetto accordo. Altri peptidi presenti nel campione possono essere analizzati nello stesso modo, confermando l'identità della proteina.

### 12.3.6 Elettroforesi su acetato di cellulosa

Sebbene sia uno dei metodi più vecchi, l'elettroforesi su acetato di cellulosa vanta ancora un certo numero di applicazioni. In particolare continua a essere impiegata nell'analisi clinica dei campioni di siero. Rispetto alla carta, l'acetato di cellulosa ha il vantaggio di essere un mezzo molto più omogeneo, con pori delle stesse dimensioni, che non assorbe le proteine come fa la carta. Si ha quindi un minore effetto strisciato delle bande delle proteine e la risoluzione è migliore, anche se non ai livelli raggiunti con i gel di poliaccrilammide. Tuttavia, questo metodo è più semplice da impostare ed eseguire. Di solito campioni singoli vengono fatti correre su strisce di acetato di cellulosa ( $2.5 \times 12$  cm), anche se spesso vengono fatti correre più campioni utilizzando fogli più grandi. L'acetato di cellulosa viene dapprima imbevuto nel tampone per elettroforesi (pH 8.6 per campioni di siero); quindi il campione (1-2  $\mu$ l) viene applicato su una striscia larga 1 cm, posta a circa un terzo della lunghezza del supporto. Le estremità della striscia sono in contatto con le vaschette contenenti il tampone elettroforetico, tramite uno stoppino di carta da filtro che viene sovrapposto all'estremità della striscia di acetato di cellulosa; l'elettroforesi viene condotta a  $6-8 \text{ V cm}^{-1}$  per circa 3 ore. Dopo l'elettroforesi, la striscia viene colorata per evidenziare le proteine (12.3.8) e quindi decolorata; le bande vengono così visualizzate. Una tipica separazione delle proteine del siero presenta circa sei bande principali. Tuttavia, in molti stati patologici questo profilo delle proteine cambia, permettendo di ottenere, dal profilo alterato, informazioni sul quadro clinico del paziente. Sebbene sia ancora frequentemente utilizzata per l'analisi del siero, l'elettroforesi su acetato di cellulosa sta per essere soppiantata dai gel di agarosio, che danno risultati simili, ma risoluzione migliore. Un tipico esempio dell'analisi del siero su gel di agarosio è presentato nella figura 12.12. Pattern simili si ottengono utilizzando l'acetato di cellulosa.

Anche gli enzimi possono essere facilmente rilevati nei campioni sottoposti a elettroforesi su acetato di cellulosa, utilizzando la tecnica dello zimogramma. La striscia di cellulosa viene posta su una striscia di carta da filtro imbevuta di tampone contenente il substrato. Dopo un periodo di incubazione opportuno, le strisce vengono tolte e la carta viene trattata al fine di evidenziare l'enzima prodotto; da questo dato è possibile risalire alla posizione dell'enzima sulla striscia originaria. Un approccio alternativo, per la rilevazione e l'analisi semiquantitativa di qualsiasi proteina sulla striscia, consiste nel trattare quest'ultima come l'equivalente di un blot e di ricercare la proteina in esame usando anticorpi primari e poi anticorpi secondari coniugati a enzimi (12.3.9). Il colore sviluppato dal substrato indica la

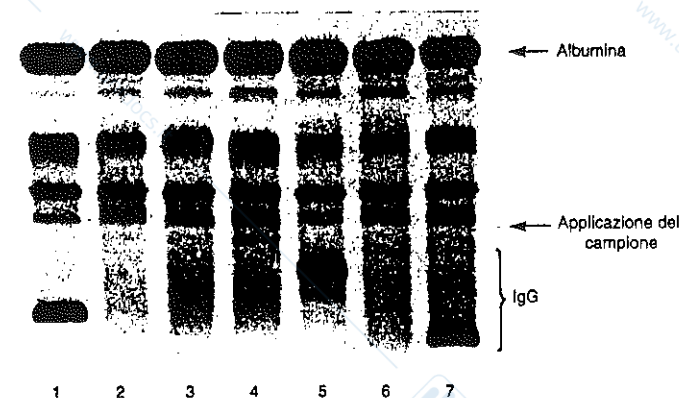


Figura 12.12 Elettroforesi di campioni di siero umano su gel di agarosio. I pozzetti 2, 3, 4 e 6 mostrano profili proteici di un siero normale, mentre i pozzetti 1, 5, 7 quelli di pazienti affetti da mieloma, che sono identificati dall'eccessiva produzione di un particolare anticorpo monoclonale trovato nella frazione IgG. (Per gentile concessione di Charles Andrews e Nicholas Cundy, Edgware General Hospital, London.)

presenza della particolare proteina e l'intensità raggiunta dopo un dato periodo di tempo fornisce una misura semiquantitativa della quantità della proteina. Così, per esempio, si può far correre su un foglio di notevoli dimensioni un grande numero di campioni di siero e quest'ultimo può essere analizzato usando anticorpi, identificando elevati livelli di una particolare proteina in alcuni campioni in base all'aumento dell'intensità del colore sviluppato proprio in questi campioni.

### 12.3.7 Elettroforesi a flusso continuo

L'elettroforesi a flusso continuo viene utilizzata per la separazione in soluzioni libere nelle produzioni su larga scala. L'elettroforesi è un processo continuo perché il materiale che si separa viene spinto verso l'alto da un flusso di tampone trasportatore, lungo lo spazio ad anello esistente tra due cilindri verticali concentrici (Fig. 12.13). Il cilindro esterno viene fatto ruotare per mantenere un flusso laminare stabile della soluzione tampone. Tra i due cilindri viene applicato un campo elettrico, che determina la separazione del materiale del campione in senso radiale man mano che esso viene sospinto verso l'alto dal flusso del tampone. Alla sommità del cilindro interno una serie di fenditure radiali permette di separare il flusso di tampone in un certo numero di frazioni, fino a 30.

È ora disponibile in commercio un'apparecchiatura per separazioni su larga scala. Tuttavia, occorre ricordare che la risoluzione non è certamente migliore, anzi è spesso peggiore, di quella che si può ottenere applicando la cromatografia a scambio ionico, una tecnica molto più semplice ed economica, oltre che molto adatta a operazioni su larga scala. Tuttavia, questo metodo ha utili applicazioni nella separazione delle particelle e delle cellule come gli eritrociti umani, separazione difficile da ottenere in altro modo.

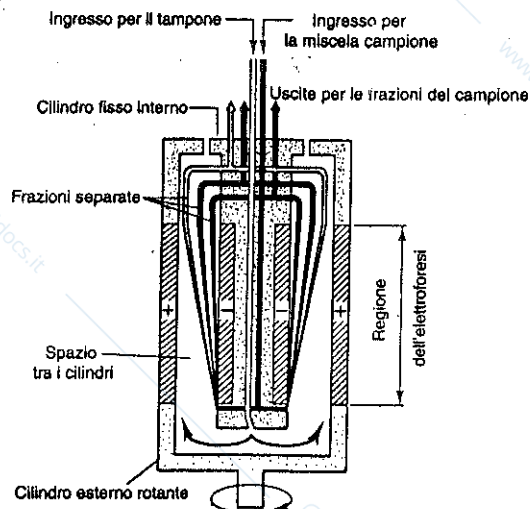


Figura 12.13 Cella per elettroforesi a flusso continuo. Il campione entra nell'intercapedine attraverso il foro di ingresso del campione ed è soggetto a un movimento verso l'alto dovuto all'elettroforesi. Il risultato è una separazione radiale in una serie di bande (frazioni) che possono essere raccolte attraverso una serie di fori di uscita per il campione. (Per gentile concessione di AERE Harwell.)

### 12.3.8 Rivelazione, stima e recupero delle proteine da gel

Il colorante più comunemente utilizzato per determinare le proteine nei gel è il colorante trimetilamminio solfato Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB). La colorazione viene eseguita usando CBB allo 0,1% (v/v) in metanolo, acqua e acido acetico glaciale (45:45:10, in volume). Questa miscela di acido e metanolo agisce come denaturante per precipitare o fissare la proteina nel gel, in modo da impedire che la proteina sia trascinata via durante la colorazione. Per la maggior parte dei gel la colorazione richiede circa 2 ore e la decolorazione, di solito della durata di una notte, viene condotta tenendo in leggera agitazione la stessa soluzione di acido e metanolo, ma senza il colorante. Il colorante Coomassie è molto sensibile; una banda poco intensa su un gel di poliacrilammide corrisponde a circa 0,1 µg (100 ng) di proteina. La colorazione con CBB non viene utilizzata per l'acetato di cellulosa (quindi per le proteine sottoposte a blot) perché il colorante si lega molto fortemente alla carta. In questo caso le proteine vengono denaturate previa immersione della striscia, per breve tempo, in una soluzione di acido tricloroacetico al 10% (v/v) quindi colorate tramite immersione in una soluzione con un colorante che non si leghi al materiale di supporto, per esempio Procion Blue, Amido Black o Procion S.

Nonostante la colorazione con Coomassie sia molto sensibile, molti ricercatori che richiedono una sensibilità superiore fanno ricorso a una colorazione ad argento (*silver stain*). I co-

loranti di quest'ultimo tipo si basano sulle tecniche sviluppate per l'istologia o sui metodi impiegati nel processo fotografico. In entrambi i casi, gli ioni argento ( $\text{Ag}^+$ ) sono ridotti ad argento metallico sulla proteina, dove l'argento si deposita formando una banda nera o marrone. La colorazione ad argento può essere utilizzata immediatamente dopo l'elettroforesi o, in alternativa, dopo la colorazione con CBB. In quest'ultimo approccio, si possono identificare le bande principali sul gel con CBB e risolvere le bande di minore intensità, che non sono rivelate dal CBB, usando il colorante ad argento. La colorazione ad argento è come minimo 100 volte più sensibile del Coomassie Brilliant Blue e rivela proteine in quantità fino a 0,1 ng.

Per la rilevazione delle proteine in un gel si è tradizionalmente utilizzata la colorazione di Schiff con acido periodico (PAS, *Periodic Acid-Schiff*). Questo tipo di colorazione permette di distinguere i componenti glicoproteici di una miscela. Tuttavia, il colorante PAS non è molto sensibile e spesso produce bande molto deboli, di colore rosso-rosa, difficili da distinguere su un gel. Oggi, un metodo molto più sensibile consiste nell'effettuare il Western blot del gel (12.3.9) e usare lectine per rivelare le glicoproteine. Le lectine sono molecole proteiche che legano i carboidrati; si è scoperto che lectine differenti hanno specificità diverse per diversi tipi di carboidrati. Per esempio, alcune lectine riconoscono il mannosio, il fucosio o la glucosamina terminale presenti nelle catene laterali di carboidrati delle glicoproteine. Il campione da analizzare è fatto correre in una serie di pozzetti su un gel SDS-poliacrilammide. Nei punti in cui le lectine si legano appaiono bande colorate se ogni pozzetto sottoposto a blot viene incubato con una diversa lectina, lavato, incubato con un anticorpo contro la lectina coniugato alla perossidasi di rafano e se quindi si aggiunge il substrato della perossidasi. In questo modo, effettuando il test per una proteina con una serie di lectine, è possibile non solo stabilire che la proteina è glicosilata, ma anche ottenere informazioni sul tipo di glicosilazione.

Si possono ottenere analisi quantitative (cioè misure delle quantità relative delle diverse proteine in un campione) con la densitometria a scansione. Esistono in commercio diversi tipi di densitometri a scansione che si basano sulla misurazione della luce trasmessa quando il raggio luminoso (laser) viene fatto passare attraverso il gel colorato. Si ottiene una rappresentazione grafica delle zone proteiche (picchi di assorbanza) in funzione della distanza di migrazione e si può calcolare l'area dei picchi per ottenere dati quantitativi. Tuttavia, questi dati devono essere interpretati con cautela, poiché esiste un intervallo ristretto di concentrazioni proteiche in cui c'è una relazione lineare tra assorbanza e concentrazione. Inoltre, non sempre quantità uguali di proteine diverse si colorano nello stesso modo con un dato colorante, per cui il confronto tra le quantità relative di proteina può essere solo semiquantitativo. Una soluzione alternativa, che rappresenta anche un sistema molto più economico di ottenere questi dati, consiste nel ritagliare le bande colorate di interesse, eluire il colorante per una notte, agitando in un volume noto di piridina al 50%, e misurare con uno spettrofotometro la quantità di colore rilasciato. Di recente sono stati messi a punto molti sistemi di documentazione su gel, che stanno soppiantando la densitometria a scansione. Questi sistemi da banco sono costituiti da un'unità video di imaging (collegata a un computer) e da una piccola "camera oscura", che offre la possibilità di scegliere luce bianca o ultravioletta (transilluminatore). Le immagini del gel possono essere archiviate in un computer, intensificate se necessario e stampate come richiesto con una stampante termica, eliminando così la necessità dello sviluppo in un bagno rivelatore, in una camera oscura costruita appositamente, come nel caso della normale fotografia.

Sebbene generalmente l'elettroforesi su gel trovi impiego come strumento analitico, la si può utilizzare anche per separare le proteine su gel al fine di ottenere la purificazione della proteina. Le bande di proteine possono essere ritagliate da blot e caricate in un sequenziatore di proteine per ottenere i dati della sequenza (cap. 6, 6.4.3). Le bande proteiche colorate possono essere ritagliate dai gel e la proteina può venire recuperata mediante elettroforesi estraendola dal pezzo di gel (elettroeluizione). Sono disponibili in commercio celle di diverso tipo per l'elettroeluizione, ma il metodo più semplice consiste forse nel porre il pezzetto di gel con tampone all'interno di un sacco da dialisi, che va poi collegato a due elettrodi in un tampone. Le proteine, che per effetto dell'elettroforesi fuoriescono dal pezzetto di gel per migrare verso l'appropriato elettrodo, vengono trattenute nel sacchetto da dialisi. Terminata l'elettroeluizione, la corrente viene invertita per qualche secondo, per fare in modo che le proteine eventualmente adsorbite dalla parete del sacchetto da dialisi si stacchino; infine si recupera la soluzione contenente la proteina all'interno del sacchetto.

### 12.3.9 Western blotting (delle proteine)

La tecnica PAGE, benché sia essenzialmente una tecnica analitica, in pratica effettua il frazionamento di una miscela di proteine durante il processo di elettroforesi. È possibile sfruttare questo frazionamento per esaminare ulteriormente le singole proteine separate. Il primo passaggio consiste nel trasferimento (o blot) del pattern di proteine separate dal gel su un foglio di nitrocellulosa. Tale metodo è conosciuto come protein blotting (trasferimento delle proteine) o Western blotting per analogia con il Southern blotting (cap. 2, 2.10), il metodo analogo per il recupero dei campioni di DNA dal gel di agarosio. Il trasferimento delle proteine dal gel alla nitrocellulosa si può ottenere in uno dei due modi seguenti. Nel capillary blotting, il gel viene posto su molti strati di carta da filtro bagnati, imbevuti nel tampone, mentre un foglio di nitrocellulosa viene posto sopra il gel. Viene fatto passare del tampone attraverso il gel posizionando un altro blocco di materiale assorbente asciutto (solitamente carta da filtro) e si applica un peso molto grande sul foglio di nitrocellulosa. Il passaggio del tampone attraverso il gel, per azione capillare, trasporta le proteine separate sul foglio di nitrocellulosa, con cui si legano in modo irreversibile per interazione idrofobica. Il processo di trasferimento dura una notte, ma a causa delle piccole dimensioni dei pori del gel di acrilammide solo una quantità limitata di tampone migra attraverso il gel in questo lasso di tempo, per cui solo una frazione (10-20%) di ogni proteina presente nel gel si trasferisce in questo modo. Un metodo di trasferimento più veloce (dura solo poche ore) e più efficiente è l'elettroblotting. Un sandwich di gel e nitrocellulosa viene compresso tra due fogli di plastica rigidi e immerso in un tampone tra due elettrodi paralleli (Fig. 12.14). Viene fatta passare una corrente in direzione perpendicolare al gel, provocando l'elettroforesi delle proteine separate che escono così dal gel ed entrano nel foglio di nitrocellulosa. La nitrocellulosa, su cui sono state trasferite le proteine, è chiamata in genere blot. Una volta trasferite sulla cellulosa, le proteine separate possono essere sottoposte a ulteriore esame. Ciò richiede l'analisi del blot, di solito facendo uso di un anticorpo per rivelare una specifica proteina. Il blot viene dapprima incubato in una soluzione proteica, per esempio albumina di siero bovino al 10% (w/v), o latte in polvere senza grassi al 5% (w/v) (la cosiddetta tecnica "blotto"), in modo da bloccare tutti i rimanenti siti di legame idrofobico sul foglio di nitrocellulosa. Il blot viene quindi incubato in una diluizio-

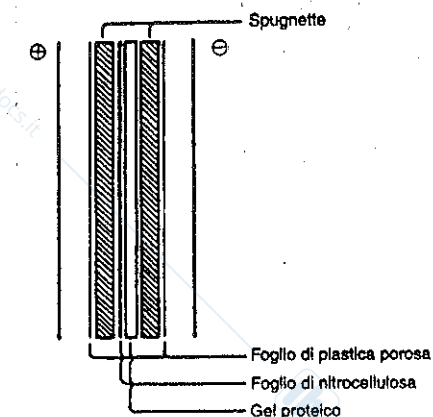
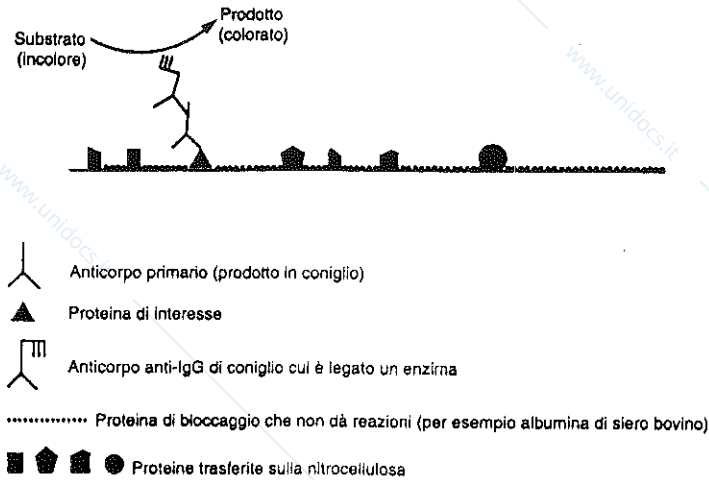


Figura 12.14 Schema di elettroblotting. Il gel da sottoporre a blot viene posto su una spugna imbevuta di tampone. Il foglio di nitrocellulosa viene quindi appoggiato sopra il gel. Una seconda spugna imbevuta di tampone viene posta sopra la nitrocellulosa. Questo "sandwich", tenuto insieme da due fogli di plastica porosa rigida legati da due elastici, viene poi posto tra due elettrodi paralleli al sandwich in un serbatoio con il tampone e viene fatta passare la corrente. Il sandwich deve essere sistemato in modo che il mezzo immobilizzante rimanga tra il gel e l'anodo per i gel di SDS-poliacrilammide, perché tutte le proteine hanno carica negativa.

ne di un antisiero (anticorpo primario) diretto contro la proteina di interesse. La molecola IgG si lega al blot solo se riconosce il suo antigene, identificando così la proteina di interesse. Per visualizzare questa interazione il blot viene ulteriormente incubato in una soluzione contenente un anticorpo secondario, che è diretto contro l'IgG della specie utilizzata come anticorpo primario. Per esempio, se l'anticorpo primario è ricavato da coniglio, allora l'anticorpo secondario sarà diretto contro le IgG di coniglio. Questo anticorpo secondario viene opportunamente marcato in modo che si possa visualizzare sul blot l'interazione tra l'anticorpo secondario e quello primario. Sono disponibili in commercio molecole anti-specie IgG, con una scelta di diversi marcatori a esse legati. Uno dei più comuni metodi di rivelazione consiste nel fare uso di un anticorpo secondario coniugato a un enzima (Fig. 12.15). In questo caso, dopo essere stato trattato con l'anticorpo secondario marcato con l'enzima, il blot viene incubato nella soluzione enzima-substrato, dove l'enzima converte il substrato in un prodotto colorato insolubile che precipita sulla nitrocellulosa. La presenza di una banda colorata indica, quindi, la posizione della proteina di interesse. Da confronti attenti del blot con un gel colorato dello stesso campione si può identificare la proteina di interesse. Come enzima coniugato agli anticorpi si usa di solito la fosfatasi alcalina, che converte il substrato 5-bromo-4-cloro-indolofosfato (BCIP) da incolore a un prodotto blu, oppure la perossidasi di rafano che, con  $H_2O_2$  come substrato, ossida il 3-amino-9-etilcarbazoio in un prodotto insolubile marrone e il 4-cloro-1-naftolo in un prodotto insolubile blu. Un approccio alternativo per la rivelazione della perossidasi di rafano consiste nell'applicare il metodo della chemiluminescenza intensificata (ECL, *Enhanced ChemiLuminescence*). In presenza di perossido di idroge-

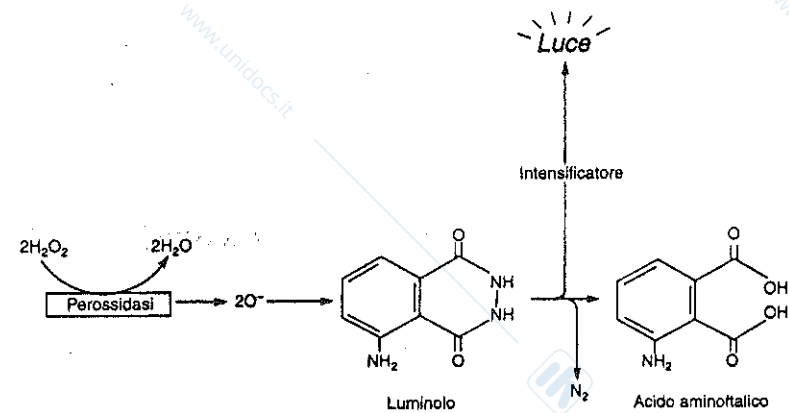


**Figura 12.15** Uso di anticorpi secondari coniugati a un enzima nell'immunodecorazione dei blot proteici. (1) L'anticorpo primario (ottenuto per esempio da un coniglio) riconosce la proteina di interesse nel blot. (2) Gli anticorpi anti-IgG di coniglio, cui è legato un enzima, riconoscono l'anticorpo primario. (3) L'aggiunta del substrato dell'enzima dà luogo a un prodotto colorato che si deposita sul blot nella posizione ove è presente la proteina di interesse.

no e del substrato chemiluminescente luminolo (Fig. 12.16), la perossidasi di rafano ossida il luminolo con la concomitante produzione di luce, la cui intensità aumenta di mille volte in presenza di un intensificatore chimico. La luce emessa può essere rilevata esponendo il blot a una lastra fotografica. Sono disponibili dei corrispondenti substrati ECL per essere usati con gli anticorpi marcati con la fosfatasi alcalina. Il principio alla base dell'uso degli anticorpi coniugati con un enzima per rilevare gli antigeni nei blot è analogo a quello sfruttato nei dosaggi immunoenzimatici (cap. 4, 4.7).

Sebbene gli enzimi siano i marcatori di uso comune per gli anticorpi secondari, possono trovare impiego anche altri marcatori. Questi includono:

1. **Anticorpi secondari marcati con  $^{125}\text{I}$ .** Il legame al blot viene determinato con l'autoradiografia (cap. 14, 14.2.3).
2. **Anticorpi secondari marcati con fluoresceina isotiocianato.** Questo marcatore fluorescente viene rivelato esponendo il blot alla luce ultravioletta.
3. **Proteina A marcata con  $^{125}\text{I}$ .** La proteina A, purificata da *Staphylococcus aureus*, si lega specificamente alla regione Fc delle molecole IgG. La proteina A marcata con  $^{125}\text{I}$  viene quindi utilizzata al posto di un anticorpo secondario e il legame con il blot viene rivelato con l'autoradiografia.
4. **Anticorpi secondari marcati con oro.** Sono disponibili in commercio anticorpi secondari (anti-IgG) rivestiti di minuscole particelle d'oro. Queste sono visibili direttamente dando una colorazione rossa quando si legano a un anticorpo primario sul blot.



**Figura 12.16** Uso della chemiluminescenza intensificata per rivelare la perossidasi di rafano.

5. **Anticorpi secondari biotinilati.** La biotina è una vitamina a basso peso molecolare che si lega fortemente all'avidina, una proteina dell'uovo ( $K_d = 10^{-15}$  M). Il blot viene prima incubato con un anticorpo secondario biotinilato, quindi con avidina coniugata a un enzima. Poiché molte molecole di biotina si possono legare a una singola molecola di anticorpo e molte molecole di avidina coniugata a un enzima si possono legare a una singola molecola di anticorpo biotinilato, si ottiene un segnale più intenso. L'enzima utilizzato è di solito la fosfatasi alcalina o la perossidasi di rafano.

Oltre agli anticorpi e alle proteine marcate, a volte si utilizzano altre sonde. Per esempio, il DNA marcato radioattivamente può essere impiegato per rilevare proteine leganti il DNA su un blot. Il blot viene dapprima incubato in una soluzione di DNA marcato radioattivamente, quindi viene lavato e se ne effettua un'autoradiografia. La presenza di bande radioattive, rilevate dall'autoradiografia, identifica le posizioni delle proteine leganti il DNA sul blot.

## 12.4 Elettroforesi di acidi nucleici

### 12.4.1 Elettroforesi su gel di agarosio del DNA

Per la maggior parte dei campioni di DNA, la separazione elettroforetica viene condotta su gel di agarosio. Ciò è dovuto al fatto che la maggior parte delle molecole di DNA e dei loro frammenti analizzati di routine sono considerevolmente più grandi delle proteine; poiché dunque non sarebbero in grado di penetrare in un gel di poliaccrilammide, necessitano di un gel di agarosio che ha pori di dimensioni maggiori. Per esempio, il plasmide pBR322, di comune impiego, ha una  $M_r$  pari a  $2.4 \times 10^6$ . Tuttavia, anziché usare numeri così grandi è più conveniente fare riferimento alle dimensioni del DNA in termini di numero di coppie di basi.

Sebbene originariamente ci si riferisse alle dimensioni del DNA in termini di coppie di basi (bp, *base-pairs*) o di kilo-coppie di basi (kbp, *kilo-base-pairs*), oggi è ormai diventata nomenclatura comunemente accettata abbreviare il termine kilo-coppie di basi semplicemente in kilobasi (kb) quando ci si riferisce a un DNA a doppia elica: pBR322 è quindi 4,36 kb. Anche un piccolo frammento di restrizione di 1 kb ha una  $M_r$  di 620 000. Quando si parla di un DNA a singolo filamento si preferisce definire le dimensioni in termini di nucleotidi (nt). Poiché la carica per unità di lunghezza (dovuta ai gruppi fosfato) è la stessa per qualsiasi frammento di DNA, quando viene applicato un campo elettrico tutti i campioni di DNA dovrebbero muoversi verso l'anodo con la stessa mobilità. Tuttavia, la separazione su gel di agarosio viene ottenuta in base alla resistenza al loro movimento causata dalla matrice del gel. Le molecole più grandi incontreranno maggiori difficoltà a passare attraverso i pori del gel (le molecole molto grosse possono anche non muoversi affatto), mentre le molecole più piccole risulteranno poco ritardate. Di conseguenza la mobilità delle molecole di DNA durante l'elettroforesi su gel dipenderà dalle dimensioni: le molecole più piccole si muovono più velocemente. Il fenomeno è analogo a quanto avviene per la separazione delle proteine nei gel di poliaccrilammide in presenza di SDS (12.3.1), sebbene l'analogia non sia perfetta, in quanto le molecole di DNA a doppia elica formano bastoncini relativamente rigidi e non è ancora del tutto chiaro come riescano a passare attraverso il gel, anche se è probabile che le lunghe molecole di DNA passino frontalmente attraverso i pori. Passando attraverso i pori, una molecola di DNA subirà un effetto di setaccio, per cui più lunga è la molecola, più sarà ritardata da ogni poro. I movimenti laterali possono diventare più importanti per il DNA a doppia elica molto piccolo e per il DNA a filamento singolo più flessibile. Risulta ovvio, da quanto appena detto, che le concentrazioni del gel devono essere scelte per adattarsi all'intervallo di dimensioni delle molecole da separare. I gel che contengono lo 0,3% di agarosio separeranno molecole di DNA a doppia elica di dimensioni comprese tra 5 e 60 kb, mentre i gel al 2% sono usati per campioni compresi tra gli 0,1 e i 3 kb. Molti laboratori usano di routine gel allo 0,8%, che sono adatti per separare molecole di DNA di 0,5-10 kb. Poiché i gel di agarosio separano il DNA in base alle dimensioni, la  $M_r$  del frammento di DNA può essere determinata in base alla sua mobilità elettroforetica, facendo correre una serie di marcatori di DNA standard con  $M_r$  nota sullo stesso gel. Ciò si può fare facilmente utilizzando un campione di DNA del batteriofago  $\lambda$  (49 kb) che è stato tagliato con un enzima di restrizione come *EcoRI*. Dal momento che è nota la sequenza di basi del DNA di  $\lambda$  e i siti di restrizione per *EcoRI*, si generano frammenti di dimensioni ben note (Fig. 12.17).

I gel di DNA vengono fatti correre in orizzontale e completamente immersi nel tampone (*submarine* o *submerged gel*). L'agarosio, sciolto nel tampone del gel per bollitura, viene versato su una piastra di vetro o di plastica, circondata da una parete di nastro adesivo o da una cornice di plastica in modo da avere un gel spesso 3 mm. I pozzetti di caricamento sono formati applicando un'apposita sagoma di plastica o un pettine nella soluzione di gel, e togliendolo quando il gel ha polimerizzato. Il gel viene posto nella vaschetta elettroforetica e coperto con il tampone; si caricano i campioni iniettandoli direttamente nei pozzetti. I campioni vengono preparati sciogliendoli in una soluzione tampone contenente saccarosio, glicerolo o Ficoll, che rendono la soluzione densa e fanno in modo che il campione raggiunga il fondo del pozzetto. Nella soluzione viene aggiunto anche un colorante come il blu di bromofenolo, che rende più facile vedere il campione che è stato caricato e agisce anche come marcatore del



Figura 12.17 Fotografia di quattro corsie di un *submarine gel* di agarosio allo 0,8%. Il gel è stato fatto correre a 40 V in un tampone Tris/borato/EDTA per 16 ore, colorato con bromuro di etidio e osservato con luce ultravioletta. I campioni caricati erano circa 0,5  $\mu\text{g}$  di DNA per corsia. Corsie 1 e 2: DNA del fago  $\lambda$  (49 kb); corsia 3: DNA del fago  $\lambda$  tagliato con l'enzima *EcoRI* per generare frammenti di dimensioni pari a 21,80, 7,52, 5,93, 5,54, 4,80 e 3,41 kb; corsia 4: DNA del fago  $\lambda$  tagliato con *HindIII* per generare frammenti di 23,70, 9,46, 6,75, 4,26, 2,26, 1,98 kb. (Per gentile concessione di Stephen Boffey, University of Hertfordshire.)

fronte elettroforetico. Non è necessario un gel di impaccamento (12.3.1) per l'elettroforesi del DNA perché la mobilità delle molecole di DNA è molto maggiore nei pozzetti che all'interno del gel, quindi tutte le molecole nel pozzetto si impilano pochi minuti dopo l'applicazione della corrente, formando una banda stretta all'inizio della corsa. I gel che vengono usati di solito sono lunghi all'incirca 25 cm e larghi 12 cm e sono fatti correre con un gradiente di voltaggio di circa 1,5 V  $\text{cm}^{-1}$  per tutta una notte. Un voltaggio più alto causerebbe un eccessivo surriscaldamento. Per analisi rapide, che non richiedono un'elevata separazione delle molecole di DNA, è pratica comune usare minigel di lunghezza inferiore ai 10 cm. In questo modo i risultati si possono ottenere in 2-3 ore.

Una volta che il sistema è stato fatto correre, occorre colorare e visualizzare il DNA nel gel. Il reagente più utilizzato è il colorante fluorescente bromuro di etidio. Il gel viene immerso con delicatezza in una soluzione di bromuro di etidio (0,5  $\mu\text{g cm}^{-3}$ ), quindi si visualizzano le bande con luce ultravioletta a una lunghezza d'onda di 300 nm. Il bromuro di etidio è una molecola ciclica planare che si lega tra le coppie di basi del DNA (è una sostanza intercalante) (cap. 2, 2.8.3). La concentrazione di bromuro di etidio, quindi, aumenta in corrispondenza delle bande di DNA e queste ultime esposte alla luce ultravioletta, emettono una fluorescenza arancio-rossa. Una quantità di DNA fino a 10 ng può essere visualizzata come una banda di 1 cm di larghezza. Si noti che un'osservazione prolungata del DNA in luce ultravioletta può comportare un danneggiamento del DNA per rottura o dimerizzazione di coppie di basi. Questo non ha conseguenze se il gel deve essere solo osservato ma, nel caso in cui il DNA debba essere recuperato (si veda più avanti), l'osservazione del gel deve ovviamente durare meno possibile. Quando si usa la luce ultravioletta è necessario proteggersi gli occhi indossando occhiali appositi. Se l'osservazione del gel nell'ultravioletto si protrae a lungo, si deve utilizzare una maschera di plastica che copra tutto il viso, per evitare scottature.

### 12.4.2 Gel per il sequenziamento del DNA

Sebbene l'elettroforesi del DNA su gel di agarosio sia una tecnica abituale per i biologi molecolari, quando si devono determinare le sequenze di DNA occorre utilizzare un tipo diverso di elettroforesi. Qualunque metodo di sequenziamento del DNA si adotti (cap. 2, 2.14), l'analisi finale di solito consiste nel separare le molecole di DNA a singolo filamento di dimensioni inferiori a circa 1000 nt e che differiscono in lunghezza per una sola base. Per raggiungere questo scopo è necessario avere un gel con pori di piccole dimensioni: per questo si usano i gel di acrilammide al posto di quelli di agarosio. Per esempio, i gel di poli(acrilammide) al 3.5% vengono utilizzati per separare il DNA nell'intervallo da 80 a 1000 nt e i gel al 12% per risolvere frammenti compresi tra 20 e 100 nt. Se si analizzano frammenti con lunghezze molto diverse è spesso conveniente far correre un gel in gradiente, per esempio dal 3.5 al 7.5%. I gel per il sequenziamento sono fatti correre in presenza di agenti denaturanti, urea e formamide. Quando è necessario separare molecole di DNA di dimensioni molto simili, i gel per il sequenziamento del DNA tendono a essere molto lunghi (100 cm), per massimizzare la separazione raggiunta. Un tipico gel per il sequenziamento del DNA viene mostrato nella figura 2.37.

Come è stato descritto in precedenza, l'elettroforesi in agarosio può essere usata come metodo preparativo per il DNA. Le bande di DNA di interesse possono essere tagliate dal gel e il DNA recuperato a) per elettroeluzione, b) sminuzzando il pezzo di gel in tampone, centrifugando e raccogliendo il surnatante, oppure (c) se viene utilizzato agarosio a basso punto di fusione, sciogliendo il pezzo di gel e diluendolo con tampone. In ogni caso, il DNA viene infine recuperato precipitando il surnatante con etanolo.

### 12.4.3 Pulsed-field gel electrophoresis

I metodi per il DNA che utilizzano il gel di agarosio descritti sopra possono frazionare DNA di 60 kb o meno. L'introduzione della *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e l'ulteriore sviluppo di varianti della tecnica di base permettono oggi la separazione di frammenti di DNA fino a  $2 \times 10^3$  kb. Ciò consente la separazione di cromosomi interi mediante elettroforesi. Il metodo di base consiste nell'elettroforesi in agarosio in cui due campi elettrici sono applicati alternativamente a diversi angoli per periodi di tempo definiti (per esempio 60 s). L'attivazione del primo campo elettrico provoca uno stiramento nel piano orizzontale delle molecole avvolte, che iniziano a muoversi attraverso il gel. L'interruzione di questo campo e l'applicazione di un secondo campo inducono la molecola a muoversi in una nuova direzione. Poiché c'è un comportamento di rilassamento, dipendente dalla lunghezza, quando una molecola a catena lunga viene sottoposta a cambiamento conformazionale in un campo elettrico, più piccola è la molecola, più velocemente si riallinea con il nuovo campo ed è capace di continuare a muoversi attraverso il gel. Le molecole più grandi impiegano più tempo per riallinearsi. In questo modo, con continue inversioni del campo, le molecole più piccole si allontanano da quelle più grandi e si separano in base alle dimensioni. La figura 12.18 mostra la separazione di cromosomi di lievito con dimensioni comprese tra 260 e 850 kb. Non c'è bisogno di aggiungere che i principi di progettazione di un sistema PFGE sono molto complessi e che in anni recenti numerosi sviluppi sullo stesso tema di base hanno dato origine a un'ampia gamma di tecniche correlate. Una descrizione dettagliata di queste tecniche esula dallo

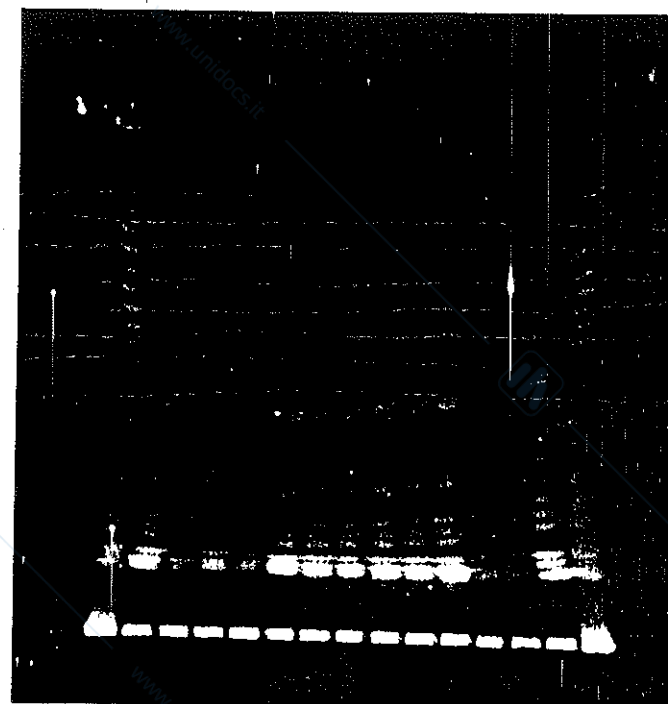


Figura 12.18 Elettroforesi su gel di tipo CHEF di cromosomi di lievito (campioni fatti correre nelle 13 corsie centrali) e di multimeri di batteriofago  $\lambda$  (*ladder*, campioni di riferimento nelle due corsie laterali). Ogni differenza di massa del ladder è di circa 43.5 kb e sono risolte 20 bande fino a 850 kb. Le dimensioni dei cromosomi di lievito sono pari a: 260, 290, 370, 460, 580/600, 700, 780, 820 e 850 kb. (Per gentile concessione di Margit Burneister, University of Michigan.)

scopo di questo capitolo; i nomi di alcune tra queste tecniche sono comunque sufficienti a indicare i principi su cui si basano, per esempio elettroforesi su gel con variazioni di campo ortogonali (OFAGE, *Orthogonal Field Alternating Gel Electrophoresis*), elettroforesi su gel con inversione di campo (FIGE, *Field Inversion Gel Electrophoresis*), elettroforesi su gel con alternanza di campo trasversale (TAFE, *Transverse Alternating Field gel Electrophoresis*), *Contour-Clamped Homogeneous Electric Field Electrophoresis* (CHEF) ed elettroforesi a campo rotante (RFE, *Rotating Field Electrophoresis*).

### 12.4.4 Elettroforesi di RNA

Come quella del DNA, l'elettroforesi dell'RNA viene di solito eseguita su gel di agarosio; anche il principio della separazione, basato sulle dimensioni, è lo stesso. Spesso si sente l'esigenza di un metodo veloce per la verifica dell'integrità dell'RNA subito dopo l'estrazione, ma prima di decidere se processarlo ulteriormente. È possibile fare ciò mediante elettroforesi su

gel di agarosio al 2% in circa un'ora. Gli RNA ribosomali (18S e 28S) sono chiaramente risolti e si possono osservare eventuali degradazioni (osservabili come una strisciata) o contaminazioni da DNA. Tuttavia, se è richiesta una maggiore risoluzione, un gel di acrilammide di piccole dimensioni viene utilizzato per esaltare la risoluzione, per esempio per risolvere l'RNA transfer (4S) dall'RNA ribosomale 5S. Ciò si può ottenere su un gel di acrilammide con un gradiente che va dal 2.5% al 5% con una corsa che dura una notte. In entrambi i metodi viene utilizzato RNA nativo. All'interno della molecola di RNA, esiste quasi sicuramente qualche struttura secondaria a causa di legami idrogeno intramolecolari (si consideri, per esempio, la struttura a quadrifoglio del tRNA, cap. 2, 2.2). Per questo motivo l'RNA nativo fatto correre sui gel può essere colorato e visualizzato con bromuro di etidio. Tuttavia, se l'obiettivo della ricerca è determinare, mediante l'elettroforesi su gel, la dimensione dell'RNA, allora è necessaria la completa denaturazione dell'RNA, per impedire la formazione di legami idrogeno all'interno dei polinucleotidi (ma anche tra essi), che possono influenzare la mobilità elettroforetica. Esistono tre agenti denaturanti (formaldeide, gliosale e metil-mercurio idrossido) compatibili sia con l'RNA, sia con l'agarosio. Si può incorporare nel gel di agarosio e nel tampone elettroforetico uno qualsiasi di questi e il campione viene denaturato con il calore in presenza dell'agente denaturante prima dell'elettroforesi. Prima della denaturazione, ciascuno di questi agenti forma degli addotti con i gruppi aminici della guanina e dell'uracile, prevenendo quindi il riformarsi di legami idrogeno a temperatura ambiente durante l'elettroforesi. È necessario utilizzare gel denaturanti anche se si vuole fare un blot di RNA (*Northern blot*, cap. 3, 3.5.1), per essere sicuri che la sequenza di basi sia riconosciuta dalla sonda. L'RNA denaturato si colora molto debolmente con bromuro di etidio, per cui, di solito, si usa arancio di acridina per visualizzare l'RNA su gel denaturanti. Tuttavia, va ricordato che molti ricercatori utilizzano RNA marcato radioattivamente identificando quindi le bande con l'autoradiografia. Un esempio dell'elettroforesi dell'RNA viene mostrato nella figura 12.19.

### 12.5 Elettroforesi capillare

Questa tecnica è chiamata con nomi diversi: elettroforesi capillare ad alta risoluzione (HPCE, *High Performance Capillary Electrophoresis*), elettroforesi capillare zonale (CZE, *Capillary Zone Electrophoresis*), elettroforesi capillare in soluzione libera (FSCE, *Free Solution Capillary Electrophoresis*) ed elettroforesi capillare (*Capillary Electrophoresis*, CE). Quest'ultimo è il termine più diffuso. L'elettroforesi capillare può essere impiegata per separare un'ampia gamma di molecole biologiche, inclusi gli aminoacidi, i peptidi, le proteine, i frammenti di DNA (per esempio gli oligonucleotidi sintetici) e gli acidi nucleici, come pure qualsiasi tipo di piccole molecole organiche come farmaci e anche ioni metallici (vedi oltre). Il metodo è stato applicato con successo al problema delle separazioni di molecole chirali (cap. 13, 13.6.5).

Come suggerisce il nome, l'elettroforesi capillare consiste nell'elettroforesi di campioni eseguita in tubi di diametro molto stretto (di solito 50  $\mu\text{m}$  di diametro interno e 300  $\mu\text{m}$  di diametro esterno). Uno dei vantaggi derivanti dall'uso di tubi capillari è che vengono ridotti i problemi connessi allo sviluppo di calore. In conseguenza del diametro ridotto del capillare, il rapporto tra la superficie e il volume è alto, il che esalta la capacità di dissipazione del calore.

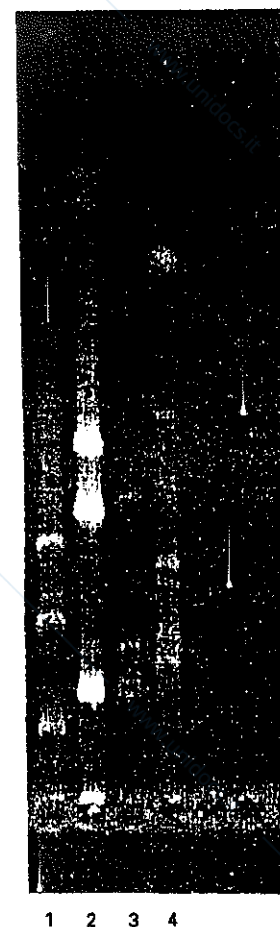


Figura 12.19 Elettroforesi di RNA su gel di agarosio all'1.4%. Corsa 1: RNA totale da piante di tabacco denaturato con gliosale prima della corsa; corsa 2: stesso campione, ma senza denaturazione; le due principali bande con mobilità maggiore sono gli RNA ribosomali 18S e 25S. La banda più lenta è DNA nucleare. Corse 3 e 4: standard di RNA con (3) e senza (4) il trattamento con gliosale. Le dimensioni dei marker sono: 0.24, 1.4, 2.4, 4.4, 7.5 e 9.5 kb. Si noti che, per ogni campione, la denaturazione comporta una minore mobilità dei frammenti di ogni campione. (Per gentile concessione di Debbie Cook e Robert Slater, Division of Biosciences, University of Hertfordshire.)

Questo aiuta a eliminare sia le correnti convettive sia l'allargamento delle zone in seguito all'aumentata diffusione causata dal riscaldamento. Non è quindi necessario includere nel tubo un mezzo stabilizzante e si può fare l'elettroforesi in fase libera.

Le considerazioni teoriche sull'elettroforesi capillare danno luogo a due importanti equazioni:

$$t = \frac{L^2}{\mu V} \quad (12.4)$$

dove  $t$  rappresenta il tempo di migrazione del soluto,  $L$  la lunghezza del capillare,  $\mu$  la mobilità elettroforetica del soluto e  $V$  il voltaggio applicato.

L'efficienza della separazione, in termini del numero totale di piatti teorici ( $N$ ), è data da:

$$N = \frac{\mu V}{2D} \quad (12.5)$$

dove  $D$  rappresenta il coefficiente di diffusione del soluto.

Da queste equazioni emerge, per prima cosa, che la lunghezza della colonna non influisce sull'efficienza di separazione, ma ha un'influenza importante sul tempo di migrazione, quindi sul tempo di analisi; in secondo luogo, alte efficienze di separazione sono raggiunte nel modo migliore attraverso l'uso di voltaggi elevati ( $\mu$  e  $D$  sono parametri relativi al soluto, quindi non facilmente manipolabili).

Appare allora evidente che la situazione ideale consiste nell'applicare un voltaggio il più alto possibile a un capillare il più corto possibile. Tuttavia, questo approccio comporta alcune limitazioni pratiche. Man mano che la lunghezza del capillare viene ridotta, aumenta la quantità di calore che deve essere dissipata, a causa della minore resistenza elettrica offerta dal capillare. Allo stesso tempo diminuisce l'area superficiale disponibile per la dissipazione del calore. Quindi, a un certo punto, gli effetti termici diventano significativi, costituendo un limite fisico a quanto può essere corto il tubo utilizzato. Inoltre, più è alto il voltaggio applicato, maggiore sarà la corrente, quindi il calore sviluppato. In termini pratici, è necessario un compromesso tra il voltaggio usato e la lunghezza del capillare. Comunemente si utilizzano voltaggi dai 10 ai 50 kV con capillari dai 50 ai 100 cm.

Nella figura 12.20 è riportato lo schema di un apparato di base per l'elettroforesi capillare. Una piccola quantità di soluzione campione (solitamente  $5-30 \mu\text{m}^3$ ) viene introdotta all'estremità anodica di un capillare in silice fusa contenente un tampone appropriato. Si può procedere al caricamento del campione in due modi: applicando un alto voltaggio o un'alta pressione.

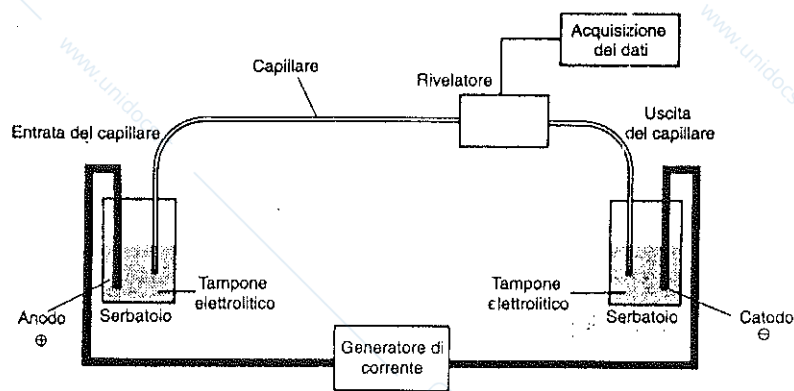


Figura 12.20 Schema di un tipico apparato per l'elettroforesi capillare.

1. **Iniezione con alto voltaggio.** Quando l'alto voltaggio è spento, il serbatoio contenente il tampone nel quale pesca l'elettrodo positivo viene rimpiazzato da un serbatoio contenente il campione. Una piccola quantità di campione (per esempio  $5-30 \mu\text{m}^3$  di una soluzione  $1 \text{ mg cm}^{-3}$ ) viene introdotta nel capillare applicando brevemente un alto voltaggio. Il serbatoio contenente il campione viene quindi rimosso, sostituendolo con quello del tampone e si applica nuovamente il voltaggio che fa iniziare la separazione.
2. **Iniezione con pressione.** Il capillare viene rimosso dal serbatoio anodico contenente il campione e inserito attraverso un tappo ad alta tenuta nella soluzione del campione. Un altro tubo fornisce la pressione alla soluzione del campione, che spinge il campione a entrare nel capillare. Il capillare viene quindi rimosso e riposizionato nel tampone anodico. Si applica quindi il voltaggio per iniziare l'elettroforesi.

Un alto voltaggio (fino a 50 kV) viene quindi applicato attraverso il tubo capillare e le molecole componenti nel campione iniettato iniziano a migrare a diverse velocità lungo il tubo capillare. La migrazione elettroforetica determina il movimento delle molecole cariche in soluzione verso un elettrodo di carica opposta. A causa di questa migrazione elettroforetica, le molecole positive e negative del campione migrano a velocità diverse. Tuttavia, sebbene gli analiti siano separati mediante la migrazione elettroforetica, essi sono spinti tutti verso il catodo dall'elettroendosmosi (12.1). Poiché questo flusso è abbastanza forte, essendo di solito la velocità del flusso elettroendosmotico molto più grande della velocità elettroforetica degli analiti, tutti gli ioni, indipendentemente dal segno della loro carica, e le specie neutre vengono trascinati verso il catodo. Le molecole cariche positivamente raggiungono il catodo per prime, in quanto la combinazione della migrazione elettroforetica e del flusso elettroendosmotico le fa muovere più velocemente. Quando sono vicine al catodo, le molecole separate devono passare attraverso una finestra, dove sono rilevate da un rivelatore all'ultravioletto che trasmette un segnale a un registratore, a un integratore o a un computer. Una separazione tipica dura da 10 a 30 minuti. Nella figura 12.21 viene presentato un tipico elettroferogramma.

Il metodo in soluzione libera è il più semplice e il più largamente utilizzato tra i modi di condurre l'elettroforesi capillare. Tuttavia, anche se la generazione di gruppi ionizzati sulla parete del capillare è vantaggiosa, in quanto determina l'introduzione di un flusso elettroendosmotico, a volte può anche rappresentare un problema. Per esempio, l'adsorbimento di proteine sulle pareti del capillare può avvenire mediante il legame tra i gruppi cationici sulla superficie della proteina e i silanoli ionizzati. Ciò può portare a uno scodamento della proteina man mano che essa passa nel capillare (riconoscibile da un allargamento del picco) o, ancora peggio, alla completa perdita della proteina dovuta al totale assorbimento sulle pareti. Alcuni ricercatori usano quindi tubi rivestiti in cui un gruppo neutro di rivestimento viene utilizzato per bloccare i gruppi del silanolo. Questo naturalmente elimina il flusso elettroendosmotico. Quindi, durante l'elettroforesi in capillari rivestiti, le specie neutre restano immobili mentre le specie acide migrano all'anodo e quelle basiche al catodo. Dal momento che la rilevazione avviene di solito a una sola estremità del capillare, solo una classe di specie alla volta può essere rivelata in un'analisi con capillare rivestito.

Esiste anche una gamma di variazioni di questa tecnica base. Per esempio, come descritto in precedenza, nell'elettroforesi capillare le molecole neutre non si separano, ma migrano tutte in una singola banda. Tuttavia, si può raggiungere una separazione delle molecole neutre introdu-

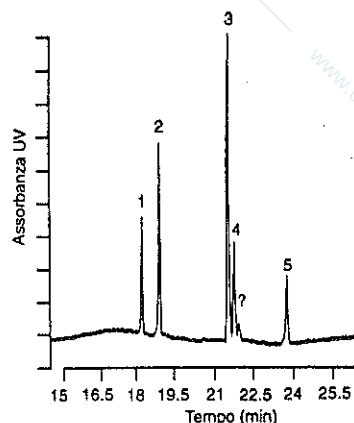


Figura 12.21 Elettroforesi capillare di cinque peptidi correlati strutturalmente. La lunghezza della colonna era di 100 cm e il voltaggio di separazione di 50 kV. I peptidi sono stati rilevati in base alla loro assorbanza nell'ultravioletto a 200 nm.

#### Peptide

1	Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
2	Met-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
3	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
4	Ser-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
5	Ile-Ser-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

(Per gentile concessione di Patrick Camilleri e George Okafo, SmithKline Beecham Pharmaceuticals Ltd.)

cendo nel tampone un tensioattivo come l'SDS. Al di sopra di una certa concentrazione, alcune molecole di tensioattivo si agglomerano formando micelle che, sotto l'influenza del campo elettrico applicato, migreranno verso l'elettrodo appropriato. I soluti interagiranno e verranno ripartiti tra le micelle in movimento. Un soluto che interagisce fortemente raggiungerà il rivelatore dopo uno che interagisce in modo più debole. Questo metodo è noto come elettroforesi capillare micellare elettrocinetica (MECC, *Micellular Electrokinetic Capillary Electrophoresis*). Poiché anche i soluti ionici migreranno sotto l'azione del campo elettrico, la separazione ottenuta con la MECC è dovuta a una combinazione dell'elettroforesi e della cromatografia.

In origine gli sviluppi dell'elettroforesi capillare si erano concentrati sulla separazione dei peptidi e delle proteine; in anni recenti questa tecnica è stata applicata con successo alla separazione di una gamma di altre molecole biologiche. Di seguito vengono forniti alcuni esempi.

In passato, l'analisi dei peptidi veniva eseguita di routine utilizzando l'HPLC a fase inversa, raggiungendo la separazione in base alle differenze di idrofobicità dei vari peptidi. Anche la separazione dei peptidi mediante elettroforesi capillare è ormai diventata un'analisi di routine ed è particolarmente utile, per esempio, come strumento di controllo della qualità

(purezza) di peptidi e proteine prodotti con l'HPLC preparativa. La figura 12.21 illustra l'impressionante grado di separazione che si riesce a ottenere per peptidi con strutture veramente simili.

Per una grande varietà di applicazioni è necessario usare degli oligodesossiribonucleotidi sintetici con un'elevata purezza: tra questi è incluso l'uso di sonde di ibridizzazione nella diagnostica e negli esperimenti di clonaggio dei geni, l'uso di primer per il sequenziamento del DNA e nella reazione polimerasica a catena (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), l'uso nella mutagenesi sito diretta e l'uso come terapeutico di sequenze antisense. Per esempio, l'analisi di un oligonucleotide antisense 18-mer contenente frammenti contaminanti (da 8-mer a 17-mer) si può ottenere in soli 5 minuti.

Con l'elettroforesi capillare si possono identificare mutazioni puntiformi nel DNA, come quelli che si riscontrano in molte patologie umane.

L'elettroforesi capillare può essere utilizzata per quantificare il DNA. Per esempio, l'analisi CE dei prodotti PCR da HIV-1 ha permesso l'identificazione di 200 000-500 000 particelle virali per centimetro cubo di siero.

I composti chirali possono essere risolti usando l'elettroforesi capillare. Molte ricerche sono state eseguite in soluzione libera usando ciclodestrine come selettori chirali.

Numerose piccole molecole, farmaci e metaboliti possono essere misurati in soluzioni fisiologiche come l'urina e il siero. Tra questi sono inclusi aminoacidi (oltre 50 sono stati trovati nell'urina), nucleotidi, nucleosidi, basi, anioni come cloruro e solfato ( $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ ) possono essere separati nel plasma umano) e cationi come  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ .

#### 12.6 Parole chiave

anfolti	elettroforesi a flusso continuo	isotacoforesi
anticorpo primario	elettroforesi bidimensionale su gel	mobilità elettroforetica
anticorpo secondario	di poliacrilammide	proteoma
blotting delle proteine	elettroforesi capillare	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
<i>capillary blotting</i>	elettroforesi in condizioni	silver stain
catalisi radicalica	native	sistemi di documentazione
chemiluminescenza intensificata	elettroforesi su gel	su gel
colorazione ad argento ( <i>silver stain</i> )	di poliacrilammide con sodio	<i>stacking gel</i>
densitometria a scansione	dodecilsolfato (SDS-PAGE)	<i>submarine gel</i>
elettroblotting	fotopolimerizzazione	<i>submerged gel</i>
elettroeluzione	gel di impaccamento	<i>tag di sequenza</i>
elettroendoosmosi	gel in gradiente	Western blot
	isoelettrofocalizzazione	zimogramma

#### 12.7 Problemi

##### DOMANDA 1

La tabella seguente mostra la distanza percorsa in un gel di poliacrilammide contenente SDS da una serie di proteine di riferimento di massa molecolare relativa nota ( $M_r$ ). Una proteina X purificata di recente, fatta correre sullo stesso gel, mostra una singola banda che percorre una distanza pari a 45 mm. Costruire un grafico di calibrazione del  $\log M_r$  in funzione della distanza percorsa per ciascuna delle proteine di riferimento, quindi determinare la  $M_r$  della proteina X.

Proteina	$M_r$	Distanza percorsa (mm)
Transferrina	78 000	6.0
Albumina da siero bovino	66 000	12.5
Ovoalbumina (albumina dell'uovo)	45 000	32.0
Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi	36 000	38.0
Anidraasi carbonica	29 000	50.0
Tripsinogeno	24 000	54.0
Inibitore della tripsina della soia	20 100	61.0
$\beta$ -Lactoglobulina	18 400*	69.0
Mioglobina	17 800	69.0
Lisozima	14 300	79.0
Citocromo c	12 400	86.5

\* Nota: la  $\beta$ -lactoglobulina ha una massa molecolare 36 800, ma è un dimero di due unità identiche di massa molecolare 18 400. In condizioni riducenti presenti nel tampone del campione, i ponti disolfuro che collegano le subunità vengono ridotti e le catene monomeriche vengono separate sul gel.

#### RISPOSTA

Dal grafico si dovrebbe riuscire a determinare una massa molecolare relativa per la proteina X di circa 31 000. Si noti che questo metodo ha un'accuratezza di  $\pm 10\%$ , per cui la risposta è  $31\,000 \pm 3100$ .

#### 12.8 Letture consigliate

- ALTRIA K.D. *Capillary Electrophoresis Guide Book*. Humana Press, Totowa, NJ 1996.  
Discussione dettagliata della teoria e delle procedure pratiche per l'analisi delle proteine, degli acidi nucleici e dei metaboliti.
- ANDREWS A.T. *Electrophoresis: Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications*. Oxford University Press, Oxford 1986.  
Testo veramente completo sulla teoria e sui dettagli pratici.
- DUNN M.J. *Gel Electrophoresis: Proteins*. Bios Scientific, Oxford 1993.  
Un buona introduzione all'elettroforesi su gel.
- HAWCROFT D.M. *Electrophoresis: The Basics*. IRL Press, Oxford 1996.  
Un testo eccellente sulla teoria alla base delle tecniche elettroforetiche.
- WALKER J.M. *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press, Totowa, NJ 1996.  
Un testo che dettagliatamente riporta teoria e protocolli di laboratorio per numerose tecniche elettroforetiche e di procedure di blotting.

## Tecniche cromatografiche

### 13.1 Introduzione

#### 13.1.1 Coefficienti di distribuzione

Il botanico russo Mikhail Tswett è considerato il primo ad aver sviluppato una tecnica di separazione che adesso riconosciamo come una forma di cromatografia. Nel 1903 egli ottenne con successo la separazione di una miscela di pigmenti delle piante utilizzando una colonna di carbonato di calcio e, durante questo processo, fu il primo ad accorgersi che la clorofilla non è un singolo composto chimico. Le moderne tecniche cromatografiche si presentano in forme multiple, la maggioranza delle quali può essere automatizzata e adattata per trattare quantità molto grandi o molto piccole di sostanze da separare e purificare.

La base di tutte le forme di cromatografia è il coefficiente di partizione o distribuzione ( $K_d$ ), che descrive il modo in cui un composto si distribuisce tra due fasi immiscibili. Per due fasi immiscibili A e B, il valore del coefficiente è una costante a una data temperatura ed è dato dall'espressione:

$$\frac{\text{concentrazione nella fase A}}{\text{concentrazione nella fase B}} = K_d \quad (13.1)$$

Il coefficiente effettivo di distribuzione viene definito come la quantità totale, distinta dalla concentrazione, di sostanza presente in una fase divisa per la quantità totale presente nell'altra: è, in pratica, il coefficiente di distribuzione moltiplicato per il rapporto dei volumi delle due fasi presenti. Se il coefficiente di distribuzione di un composto tra due fasi A e B è 1 e se questo composto è distribuito tra 10 cm<sup>3</sup> di A e 1 cm<sup>3</sup> di B, la concentrazione nelle due fasi sarà la stessa, ma la quantità totale del composto nella fase A sarà 10 volte superiore a quella nella fase B.

In generale, tutti i sistemi cromatografici sono costituiti da una fase stazionaria, che può essere un solido, un gel, un liquido o una miscela solido/liquida e che è immobilizzata, e una fase mobile, che può essere liquida o gassosa e che fluisce sopra o attraverso la fase stazionaria. La scelta della fase stazionaria e di quella mobile viene eseguita in modo tale che i composti che devono essere separati abbiano diversi coefficienti di distribuzione. Questo può essere ottenuto con:

- 1) un equilibrio di adsorbimento tra una fase stazionaria solida e una fase mobile liquida (cromatografia di adsorbimento, cromatografia ad interazione idrofobica);