

TECNICHE ELETTROFORETICHE

1. SCOPO DELLA METODICA

L'elettroforesi è il fenomeno per cui le particelle dotate di carica e immerse in un mezzo conduttore sono indotte a muoversi per effetto di un campo elettrico applicato al mezzo stesso.

Le molecole biologiche, una volta solubilizzate in un opportuno mezzo e indotto il movimento elettroforetico (**corsa elettroforetica**) per applicazione di un campo elettrico uniforme, la loro migrazione dipende da una serie complessa di parametri, comprendenti sia fattori sperimentali sia caratteristiche strutturali delle specie ioniche in movimento.

Per distinguere e identificare biomolecole, anche in miscele complesse, sono state messe a punto carie tecniche elettroforetiche.

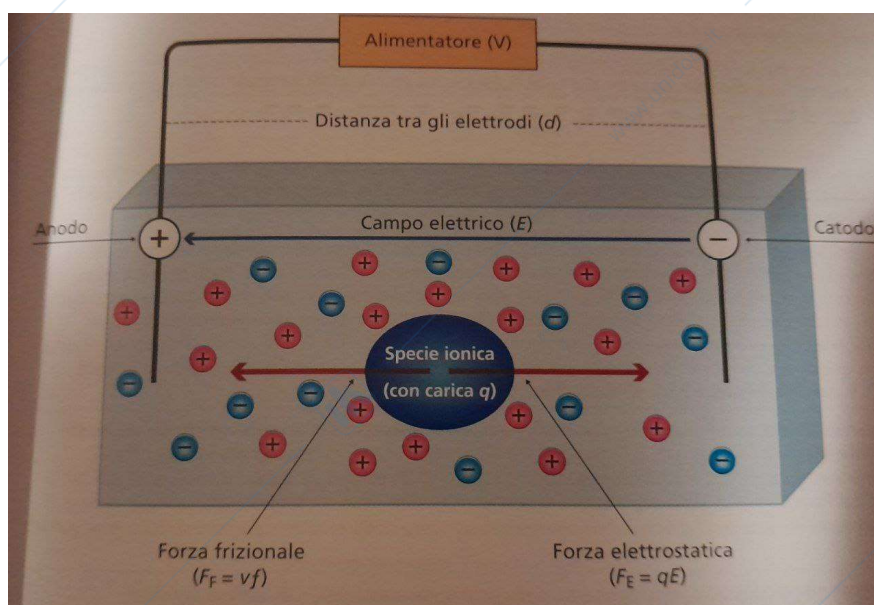
Lo scopo finale resta, comunque, quello di sfruttare la migrazione elettroforetica nelle stesse condizioni sperimentali per separare le biomolecole presenti nel campione in singole frazioni, distinte per la carica o per le proprietà strutturali.

Le posizioni raggiunte da biomolecole note al termine di un'elettroforesi possono essere utilizzate per costruire **curve di calibrazione**, utili alla determinazione di quel parametro in altre molecole simili.

L'elettroforesi è comunemente applicata nella biochimica clinica all'analisi comparativa di **profili quantitativi** di liquidi fisiologici a scopi diagnostici.

2. PRINCIPI GENERALI

Se una **forza elettromotrice (f.e.m.)** prodotta da un generatore di corrente, viene applicata a due elettrodi immersi in un mezzo fluido conduttore all'interno di un contenitore (**cella elettroforetica**), in esso verrà generato un campo elettrico.



Questo campo elettrico agisce su ogni specie chimica ionica immersa, applicando una forza (**potenziale elettrico**) che la spinge verso l'elettrodo (**polo elettrico**) di segno opposto, in modo proporzionale sia al valore del campo elettrico $[E]$ sia alla carica dello ione stesso $[q]$. Tuttavia, la presenza del mezzo produce anche una forza contraria a questo movimento (**resistenza frizionale**),

che dipende sia dalla natura del fluido in cui ha luogo il movimento (es. costante dielettrica e viscosità), sia dal tipo di molecola in movimento (es. dimensioni idrodinamiche e forma).

2.1 GRANDEZZE E RELAZIONI MATEMATICHE

In un campo elettrico costante, le due forze vettorialmente opposte del campo elettrico e della resistenza frizionale si bilanciano.

Il risultato è una migrazione degli ioni verso il polo opposto con una velocità costante, chiamata **velocità elettroforetica**:

$$v = E \frac{q}{f}$$

Dove:

- E = campo elettrico
- q = carica dello ione
- f = coefficiente frizionale, parametro che pesa l'effetto dei fattori che si oppongono al movimento elettroforetico.

Per ogni specie ionica si può così definire una **mobilità elettroforetica** [μ], intesa come la velocità [v] acquisita per unità di campo elettrico [E] ed espressa:

$$\mu = \frac{v}{E}$$

La mobilità elettroforetica, non essendo dipendente dal campo elettrico, è una proprietà intrinseca di ogni molecola carica. Poiché la velocità elettroforetica è espressa in cm/s , e il campo elettrico in V/cm , [μ] ha le dimensioni di cm^2/sV ed è misurabile dalla migrazione dello ione per un'unità di tempo.

Se sostituiamo, in termini di velocità, la prima equazione alla seconda, avremo:

$$\mu = \frac{q}{f}$$

Si può, quindi, concludere che: nel corso di una migrazione elettroforetica, la mobilità espressa da ogni componente ionica è di valore dipendente *esclusivamente* dalla sua carica e dal coefficiente frizionale nel mezzo fluido in cui si realizza l'esperimento.

Quando una specie in movimento si può considerare equivalente a una sfera di raggio r , detta η la viscosità del mezzo, il suo coefficiente di resistenza frazionale f sarà pari a $6\pi\eta r$.

Quindi, a parità di tutte le altre condizioni, le molecole di raggio minore hanno una mobilità elettroforetica inferiore.

Queste equazioni sono la base dell'applicazione dell'elettroforesi come metodologica separativa. Quando nella stessa cella elettroforetica è presente una miscela di specie chimica, per ottenere una loro separazione si possono regolare le condizioni sperimentali che influenzano in modo selettivo le specifiche mobilità elettroforetiche.

2.2 FATTORI CHE INFLUENZANO LA MIGRAZIONE ELETTROFORETICA

- Un incremento della differenza di potenziale applicata ai poli, oltre ad avere un notevole effetto sulla riduzione dei tempi di esecuzione della corsa, permette di indurre anche la migrazione di molecole con elevato coefficiente frizionale (per esempio gli acidi nucleici). D'altra parte, in presenza di campi elettrici elevati, si osserva un aumento del calore prodotto a causa del cosiddetto **effetto joule**, da tenere sotto controllo sia per l'effetto denaturante sulle macromolecole, sia per l'induzione di **moti convettivi** che limitano il **potere di risoluzione**, ovvero la capacità di distinguere le diverse componenti di una miscela.
- La scelta della soluzione elettrolitica è critica: l'uso generalizzato di tamponi è legato alle loro proprietà dissociative, in grado sia di assicurare un'efficace conduzione della corrente sia di determinare lo stato ionizzato delle molecole oggetto di analisi. In particolare, per aminoacidi, peptidi e proteine la migrazione elettroforetica dipende dal loro specifico valore di **punto isoelettrico [pI]**, ovvero il valore del pH nel mezzo in cui sono disciolti al quale essi assumono carica nulla. A valori di pH superiori o inferiori al loro pI queste assumono rispettivamente una carica netta negativa o positiva.

2.3 PRINCIPALI TECNICHE ELETTROFORETICHE

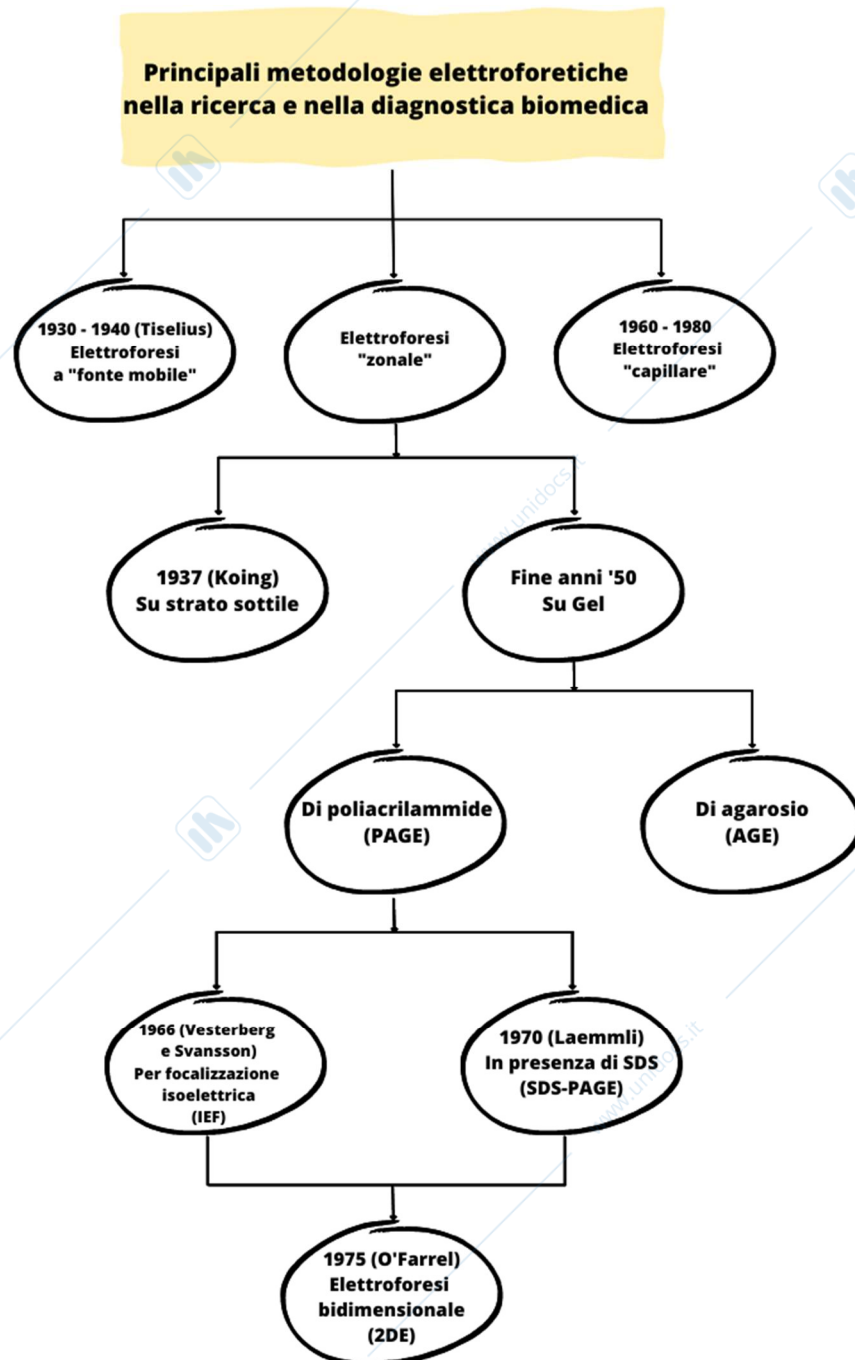
Un parametro particolarmente rilevante nello sviluppo della tecnica elettroforetica è il mezzo in cui si realizza la separazione, in base al quale oggi possibile distinguere numerose varianti dell'elettroforesi.

Nell' **elettroforesi in fase liquida**, la metodica con cui Tiselius riuscì ad ottenere le prime separazioni elettroforetiche, il mezzo in cui ha luogo la migrazione delle specie ioniche è totalmente in **fase liquida**. La soluzione contenente le molecole da separare elettroforeticamente è messa a contatto con la soluzione tampone nelle due sezioni di un apparato a forma di U, in ognuna delle quali sono immersi il catodo e l'anodo. Una volta applicato il campo elettrico, la migrazione elettroforetica verso l'elettrodo a carica opposta induce la penetrazione delle particelle cariche all'interno di uno dei due contenitori del tampone.

L'applicazione di questo tipo di metodologia a una miscela di analiti non comporta la completa separazione dei diversi elementi della miscela fra loro, ma solo la realizzazione di regioni a diversa concentrazione di soluti carichi nei due tamponi (rispettivamente anodo e catodo). La direzione e la velocità di migrazione delle particelle sono determinate monitorando i cambiamenti *dell'indice di rifrazione* nella fase a confine tra queste regioni in ognuno dei due bracci dell'apparato. Per queste caratteristiche tale variante elettroforetica è definita anche **l'elettroforesi a fronte mobile**.

L'elettroforesi in fase liquida ha mostrato in passato evidenti limitazioni nel potere di risoluzione a causa di rilevanti **moti convettivi**. Inoltre, una volta interrotta l'applicazione nel campo elettrico, l'elevato grado di diffusione delle molecole in una fase liquida omogenea ne comporta il rapido rimescolamento impedendone la separazione definitiva in frazioni fisicamente distinte. Per contrastare questi effetti negativi, sono state sviluppate versioni elettroforetiche in cui la soluzione elettrolitica è imbevuta in un materiale **polimerico** e **insolubile**. Le estremità del supporto elettroforetico sono immerse in due contenitori (**vasche elettroforetiche**) riempiti di tampone e contenente gli elettrodi, mentre il campione, sciolto in un minimo volume, è depositato in un punto preciso del supporto stesso. Come risultato del contrasto alla **diffusione** e ai **moti convettivi**, una volta applicato il campo elettrico, le molecole cariche migrano verso gli elettrodi di segno opposto, concentrate in zone discrete. Inoltre, al termine della migrazione le specie chimiche sono trattenute all'interno della struttura porosa e facilmente rilevabili con tecniche diverse. Per queste

caratteristiche, tutte le varianti elettroforetiche che utilizzano un **supporto poroso** sono definite come **elettroforesi zonali**.



Tra i materiali porosi utilizzati nella separazione di miscele di aminoacidi, nucleotidi e peptidi a basso peso molecolare è compresa la **cellulosa** (sotto forma di semplice carta da filtro). Tuttavia, anche questa metodologia oggi ha un solo significato storico, essendo stata sostituita dall'**elettroforesi su acetato di cellulosa**, realizzata su un supporto più economico, resistente alla manipolazione e al calore, conservabile per lunghi tempi e in grado di risolvere non solo molecole a basso peso molecolare, ma anche proteine e acidi nucleici di dimensioni maggiori.

Nell'uso dei supporti porosi, il **potere di risoluzione** può essere alterato da fenomeni di **assorbimento** (causati dalla ritenzione delle molecole in movimento da parte di gruppi esposti alla superficie del supporto con conseguente presenza di code nella migrazione delle specie ioniche) oppure di **elettrosmosi** (fenomeno causato dal movimento verso il catodo della massa di molecole

del solvente acquoso, adsorbite sulla superficie del materiale poroso con conseguente creazione di un **flusso elettromotico** che induce il trascinamento anche di molecole non cariche).

Per questo motivo attualmente per la caratterizzazione delle macromolecole si usa **l'elettroforesi su gel**, in cui il supporto operoso su cui ha luogo la migrazione elettroforetica è rappresentato da una struttura molecolare tridimensionale con una tendenza trascurabile all'assorbimento e all'elettrosmosi. La caratteristica più distintiva introdotta è la sovrapposizione di un effetto di **filtro molecolare** alla migrazione delle macromolecole, analogamente a quanto avviene nel caso della cromatografia per filtrazione molecolare.

Anche nell'elettroforesi su gel la distribuzione della dimensione dei pori è il fattore critico nel determinare l'intervallo di dimensioni molecolari delle macromolecole separabili.

Molecole di dimensioni ridotte, come aminoacidi e nucleotidi, non sono separabili con le tipologie di elettroforesi su gel ad oggi; al contrario, questa variante elettroforetica trova ampia applicazione per macromolecole come proteine e acidi nucleici.

Sono due i tipi di gel prevalentemente utilizzati a questo scopo:

- Il **gel di agar**: miscela del polimero lineare di agarosio e del polimero ramificato agaropectina.
- Il **gel di amido**: una miscela del polimero lineare di amilosio e del polimero ramificato amilopectina.
- Il **gel di agarosio**: costituito dalla sola componente lineare la cui unità fondamentale è il disaccaride (1,3)- β -D-galattopiranosio-(1,4)-3,6-anidro- α -L-galattopiranosio.

La catena polimerica lineare forma fibre elicoidali che restano isolate in una soluzione acquosa mantenuta elevate temperature (**stato sol**). Riducendo la temperatura queste fibre si aggregano spontaneamente in una struttura tridimensionale (**stato gel**) mantenuta tale tramite la formazione di legami idrogeno.

Questi tipi di gel danno origine a una struttura semirigida, la cui porosità varia in base alla concentrazione del polimero lineare utilizzato nella fase di aggregazione.

Tutte queste caratteristiche rendono **l'elettroforesi su gel di agarosio (AGE)** una tecnica molto utilizzata nella caratterizzazione strutturale del DNA.

I gel di **poliacrilammide** sono formati a seguito di una reazione chimica, in particolare per la polimerizzazione radicalica di monomeri di acrilammide. Questo processo da solo porterebbe a catene polimeriche molto lunghe invece che a un gel tridimensionale. Quest'ultima struttura è determinata dall'aggiunta alla miscela di polimerizzazione di N,N'-metilenbisacrilammide, che si traduce nella formazione di legami covalenti trasversali tra le catene lineari. La reazione è innescata dal persolfato di ammonio e catalizzata dalla presenza di N,N,N,N-tetrametiletildiammina (TEMED).

In alternativa si può ricorrere alla fotopolimerizzazione aggiungendo riboflavina e illuminando la soluzione per 2-3 ore. La dimensione media dei pori del gel di poliacrilammide corrisponde a un valore utile per la separazione di acidi nucleici a catena ridotta e di un ampio spettro dimensionale di catene polipeptidiche.

Oggi **l'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE)** è uno strumento analitico ampiamente utilizzato anche grazie alla sua particolare resistenza meccanica. Tra le sue varianti spiccano in particolar modo la **focalizzazione isoelettrica (IEF)** il cui il parametro discriminante nella

separazione è il *pI* di una sostanza anfotera e la **SDS-PAGE** che utilizza il **sodio dodecilsolfato (SDS)** in una PAGE classica per determinare il peso molecolare delle proteine.

Negli anni '60, c'era l'**elettroforesi capillare (CE)** in cui la migrazione elettroforetica è realizzata in fase liquida, utilizzando l'unico contenitore cilindrico del diametro dell'ordine di decine di micron (*capillare*) di **silice pura**, rivestita esternamente di poliammide per renderla maneggiabile.

La CE potrebbe essere considerata un'evoluzione dell'elettroforesi in fase liquida. Per questo motivo viene anche definita **elettroforesi zonale di tipo capillare (CZE)** o **elettroforesi capillare in soluzione libera (FSCE)**.

3. STRUMENTAZIONE

Lo schema base di ogni tipo di apparato elettroforetico è piuttosto semplice. Oltre a un alimentatore di corrente in grado di sviluppare una differenza di potenziale (d.d.p.) costante, l'elemento principale è la cosiddetta **camera di migrazione**. Un apparato elettroforetico è generalmente completato da un sistema di controllo della temperatura (ad *acqua* o a *piastre di metallo*).

3.1 APPARATI PER ELETTROFORESI ZONALE

Nonostante le differenze in misura e forme, tutte le camere di migrazione per lo sviluppo dell'elettroforesi zonali sono distinguibili in due tipi di tipologie base.

Per lo sviluppo di elettroforesi su supporti porosi, strutturati in *fogli sottili* (sheet) per campioni multipli e in *strisce* (strips) per campioni singoli, si preferisce ricorrere ad **apparati da sviluppo orizzontali**. Le due estremità del supporto sono immerse ciascuna in uno dei due contenitori (*vasche*) in cui sono alloggiati il tampone e i poli, mentre il resto è posto a ponte tra di esse; nel caso in cui il supporto sia un gel la polimerizzazione ha luogo speciale contenitori appositamente sagomati o **vassoi**.

Più complesso è l'allestimento degli **apparati a sviluppo verticale** che trovano la loro principale applicazione nell'elettroforesi su gel di poliacrilammide. La polimerizzazione del supporto ha luogo tra due lastre di *vetro* (o di materiale plastico idoneo) separate da due *spaziatori laterali* che definiscono lo spessore finale del supporto. La lastra di gel così ottenuta è immersa nel tampone all'interno della cellula elettroforetica verticalmente rispetto ai due elettrodi, grazie all'aiuto di un accessorio definito **modulo di migrazione**. Sono richiesti particolari accessori per il caricamento del campione e la rilevazione del tracciato di migrazione elettroforetica.

La metodologia dell'elettroforesi zonale, richiede che il campione, sciolto in un minimo volume, sia depositato in una fenditura appositamente praticata del supporto poroso detta *pozzetto*.

Nell'elettroforesi su gel, per costituire un numero di pozzetti definito e di volume uniforme, si ricorre all'uso di una *barr*a di materiale inerte (teflon o plastica) che, per la sua forma, è noto come *pettine* (comb) ed è un accessorio essenziale per tutti gli apparati elettroforetici zonali.

Il pettine è inserito dentro la soluzione di agarosio o di poliacrilammide ancora non solidificata. Una volta completata la struttura dell'apparato, il pettine è rimosso e ogni pozzetto è riempito con una soluzione tampone contenente il campione da analizzare e una sostanza che aumenta la densità della soluzione (es. glicerolo) semplificandone il caricamento.

Poiché nella maggior parte delle applicazioni le molecole da separare non sono visibili, è necessario aggiungere al campione anche una minima quantità di cosiddetto **indicatore**, ovvero una sostanza colorata e di dimensioni tali da migrare insieme ai componenti più veloci, e per questo rileva in tempo reale il raggiungimento del limite fisico della corsa elettroforetica. Tra gli indicatori del fronte

elettroforetico più utilizzati ricordiamo il colorante anionico **blue di bromofenolo**.

Una volta collegati gli elettrodi all'alimentatore, ogni componente della miscela del pozzetto migrerà (in orizzontale o verticale) lungo la cosiddetta *corsia* (lane), verso l'elettrodo opposto alla sua carica. Se le molecole sono state marcate precedentemente con isotopi radioattivi di energia sufficiente, esse possono essere rilevate direttamente per **autoradiografia**.

Il metodo più comunemente utilizzato nell'elettroforesi zonale è quello della colorazione. Una volta conclusa la migrazione elettroforetica, il supporto elettroforetico (striscia, foglio, lastra o tubicino) è immerso in opportuni reagenti, i quali consentono di distinguere le regioni in cui sono concentrate le diverse specie molecolari (**bande elettroforetiche**).

Nel caso delle proteine, sono in commercio diverse sostanze intercalate capaci di legarsi con elevata affinità al legame peptidico e di conferirgli colore (come alcuni Coomassie) o fluorescenza (Sypro).

Un altro metodo più sensibile, ma laborioso, è quello di trarre vantaggio dalla capacità delle proteine di reagire con il **nitrato d'argento** per dare origine a evidenti precipitati di argento metallico in corrispondenza delle regioni in cui le specie molecolari si sono concentrate alla fine di una corsa elettroforetica.

Il DNA, se non precedentemente colorato con fluorofori, è tipicamente rilevabile per colorazione con **bromuro di etidio**, un agente intercalate fluorescente; mentre, per la rilevazione di acidi nucleici a singola catena (RNA), è più efficiente ricorrere alla tecnica di riconoscimento specifica **Northern blotting**.

Per una misura delle abbondanze relative, una strumentazione molto semplice è rappresentata dal **densitometro**, in cui un raggio luminoso scorre a velocità costante lungo il supporto, registrando per *trasmissione* o *riflessione* la presenza dei diversi analiti sul supporto insolubile (**tracciato elettroforetico**).

In modo analogo, nei **transilluminatori**, un raggio laser UV induce l'emissione di fluorescenza da fluorofori presenti nelle molecole in esame o aggiunti successivamente come marcatori.

I segnali così ottenuti sono, in ogni caso, trasformati da un sistema di elaborazione dati nei cosiddetti **elettroferogrammi**, grafici che riportano la risposta del rilevatore utilizzato come funzione del tempo (ascissa) e dell'intensità del segnale (ordinata).

3.2 STRUMENTAZIONI PER L'ELETTROFORESI CAPILLARE

Lo schema base di queste apparecchiature prevede due celle di volume ridotto contenenti ognuna il tampone e due elettrodi. Il capillare è posto a ponte, con le due estremità libere immerse rispettivamente nella **cella sorgente** (polo positivo) e nella **cella destinazione** (polo negativo). In questo polo negativo migrano tutte le specie chimiche grazie al contributo del flusso elettromotico. La cella sorgente funge anche da porta campione nelle fasi di caricamento della miscela da analizzare, che può aver luogo per **iniezione elettronica cinetica o a pressione**. La maggior parte delle strumentazioni di elettroforesi capillare in commercio usa luce ultravioletta (UV) o UV-visibile per monitorare la migrazione elettroforetica. In questi sistemi, la poliammide di rivestimento di una sezione dell'estremità catodica del capillare è eliminata per renderla otticamente trasparente. È così possibile rilevare le specie chimiche sulla base della loro mobilità elettroforetica all'estremità del capillare. Questa modalità richiede tamponi volatili e l'utilizzo di software specifici. Una volta applicata la d.d.p. richiesta, i tempi di migrazione dei metaboliti più lenti sono comunque compresi nell'ordine dei minuti; è richiesta, quindi, un'istantanea trasmissione dal rilevatore a un sistema di raccolta dati veloce per la successiva trasformazione in un tipico elettroferogramma. Per applicazioni

in cui è richiesta l'analisi di un numero elevato di campioni (come nel sequenziamento a elevato parallelismo del DNA), sono oggi commercialmente disponibili apparecchiature in grado di analizzare contemporaneamente anche 96 capillari.

4. APPLICAZIONI E RILEVANZA BIOMEDICA

L'elettroforesi è ampiamente utilizzata sia nella ricerca di base sia in diagnostica biomedica.

4.1 IL PROTIDOGRAMMA

L'elettroforesi delle **proteine del siero** è un'analisi relativamente semplice, la cui interpretazione ha una notevole rilevanza diagnostica. Il campione di siero può essere analizzato per elettroforesi su acetato di cellulosa, su gel di agarosio o per elettroforesi capillare.

In ognuna di queste varianti lo scopo è separare per carica e dimensioni molecolare le proteine seriche in cinque frazioni principali, denominate in base al componente più abbondante:

- frazioni di albumina
- globulina Alfa -1
- globulina Alfa- 2
- globulina Beta
- globulina Gamma

nell'ordine di migrazione verso il catodo.

Ognuna di queste bande viene quantificata in termini percentuali rispetto al totale. Lo specifico profilo elettroforetico che si ottiene, definito, appunto, **protidogramma** può essere associato a determinate patologie o disordini.

(es. Diminuzione albumina è indice di sofferenza epatica; aumento Alfa globulina associabile a processi infiammatori, infettivi e immunitari; aumento della Beta globulina indicativa di situazioni di disturbo del metabolismo lipidico.)

4.2 DIAGNOSI MOLECOLARE DI EMOGLOBINOPATIE

Il termine **emoglobinopatia** indica una vasta gamma di disordini genetici in cui si osservano un'espressione anomala delle catene emoglobiniche. Tipicamente, la diagnosi molecolare prevede il confronto di un profilo elettroforetico della catena emoglobinica (*trait*), isolate dal sangue di un paziente, con quello di una miscela di varianti emoglobiniche note.

Le elettroforesi più utilizzate sono quelle su acetato di cellulosa a pH alcalino e l'elettroforesi su agar in tampone citrato. I progetti di screening di popolazione sono rappresentati dall'elettroforesi capillare.

4.3 DETERMINAZIONE DEL PESO MOLECOLARE DELLE MACROMOLECOLE

Il peso molecolare di una macromolecola è un importante parametro biochimico utilizzabile per comprendere aspetti metabolici e strutturali. Il metodo più accurato per determinare le dimensioni di una macromolecola, sulla base della sua velocità di migrazione elettroforetica è l'applicazione di questa relazione:

$$D = a - b(\log M)$$

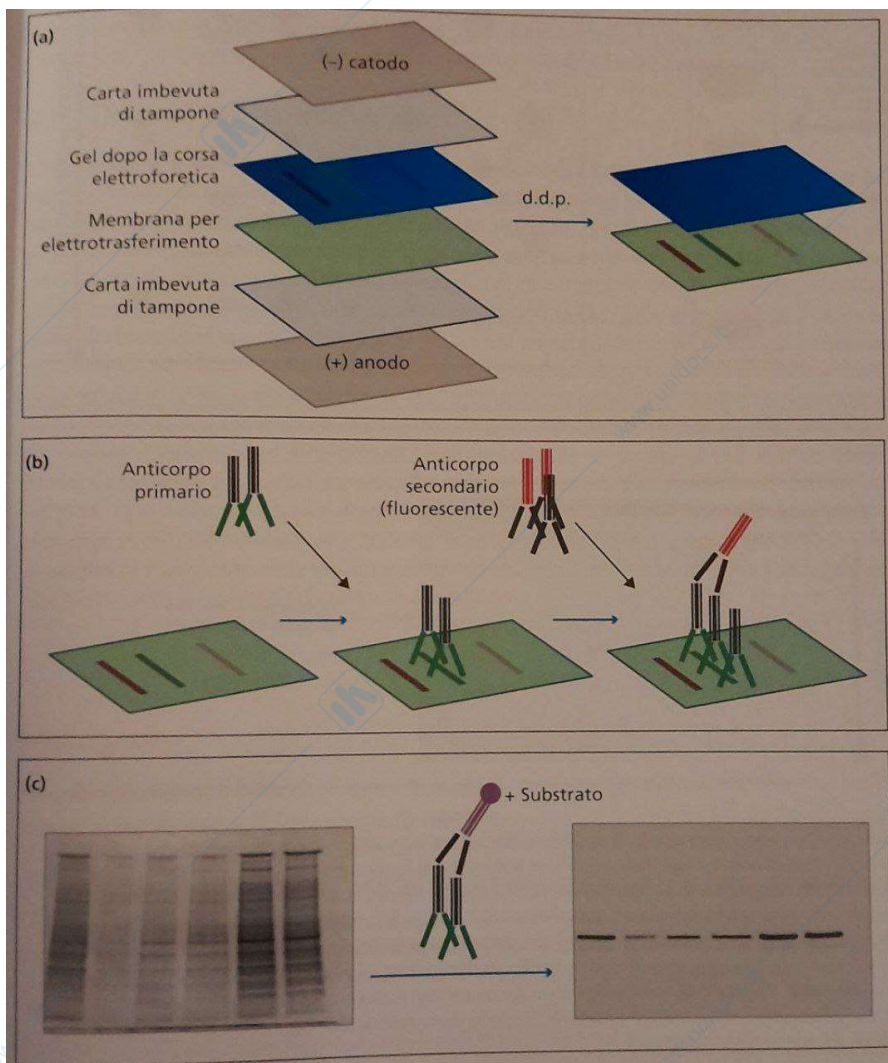
Dove:

- D = distanza percorsa,
- M = massa molecolare,
- a e b = costanti che dipendono dalle condizioni di elettroforesi.

4.4 ELETTROTRASFERIMENTO

Per individuare selettivamente una specifica componente all'interno di un profilo elettroforetico di macromolecole si può ricorrere ad **affinità selettive**, quali *l'ibridizzazione* o la *reazione anticorpale (immunoaffinità)*. Ad elettroforesi completata, tutte le bande ottenute sono trasferite per applicazione di un campo elettrico dalla matrice del gel (*polo negativo*) su fogli di materiale inerte (*polo positivo*) ma con proprietà adsorbenti (*membrane come di nitrocellulosa*). Al termine di questo **elettrotrasferimento** (o *elettroblotting*) la membrana è trattata con una soluzione contenente una sequenza nucleotidica complementare (sonde di DNA a singola catena con Southern blot; sonde di RNA con Northern blot) o con uno specifico anticorpo verso una proteina antigenica (**Western blot**).

La posizione della specie molecolare di interesse nel profilo elettroforetico, così riprodotto sul foglio della membrana, è rilevata solidamente mediante analisi della fluorescenza liberata da cromofori legati alla sonda, o per **chemiluminescenza**.



4.5 MAPPE PROTEOMICHE

L'elettroforesi è uno dei cardini della **proteomica**, disciplina nata con l'obiettivo di catalogare il contenuto proteico espresso nei diversi tipi cellulari di un organismo in condizioni fisiologiche o patologiche.

A causa dell'elevato numero di proteine potenzialmente esprimibili, per ottenere un catalogo più comprensivo possibile è necessario ricorrere **all'elettroforesi bidimensionale (2DE)**.

In questa tecnica sono applicate in successione sullo stesso campione e ortogonalmente una rispetto all'altra due tecniche elettroforetiche in grado di separare le proteine con due principi complementari: **carica elettrica netta (IEF)** e dimensioni molecolari **SDS-PAGE**.

Alla fine di questa separazione elettroforetica si genera una distribuzione bidimensionale o **mappa**, in cui ognuna delle frazioni separate (**macchia** o **spot**) corrisponde a proteine con una ben definita coppia di valori di **pI** e di massa molecolare.

La determinazione della mappa proteomica mediante 2DE è una strategia ampiamente applicata nell'identificazione di biomarker delle trasformazioni molecolari sia fisiologiche e sia patologiche, che hanno luogo a carico della proteina cellulare.

