

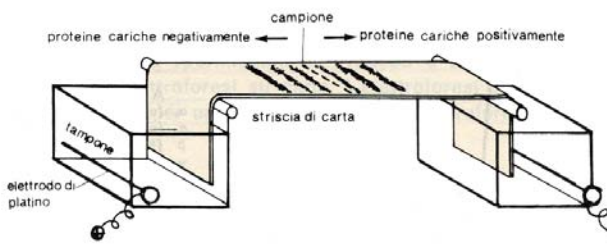


**Elettroforesi a zone**

Si basa sul movimento di particelle cariche in una soluzione tampone trattenuta da un mezzo solido di natura porosa. In questo il movimento delle particelle è determinato non solo dalla presenza delle cariche ma anche dall'effetto elettrosmotico. Per elettrosmosi si intende la migrazione di un liquido contenuto in un sistema capillare verso uno degli elettrodi. Esistono vari tipi di elettroforesi a zone che si differenziano per i mezzi solidi impiegati. Questi possono essere: relativamente inerti come la carta, l'acetato di cellulosa, agar-gel e in questo caso la separazione dipende unicamente dalla corrente e dalla massa delle molecole, oppure in grado di esercitare un influsso positivo sulla separazione come i gel d'amido e quelli di acrilamide. Questi ultimi si devono considerare come un mezzo poroso" (setacci molecolari) e quindi la separazione delle varie sostanze può essere dovuta non solo ai diversi rapporti carica/massa ma anche alla differente grandezza delle molecole (effetto di setacciamento).

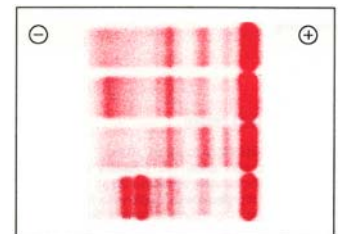
**Elettroforesi su carta**

In questo metodo la cella elettroforetica è sostituita da una striscia di carta da filtro inumidita da un tampone, sulla quale viene deposta la miscela in esame. Stabilendo una differenza di potenziale tra le due estremità, i singoli composti si muovono a una velocità determinata dalla corrente disponendosi a distanze varie dal punto di origine. L'apparecchio consiste in una vasca di plexiglas a forma parallelepipedica suddivisa in due scomparti contenenti gli elettrodi. All'interno è posto un sostegno su cui vengono appoggiate le strisce in modo che le due estremità

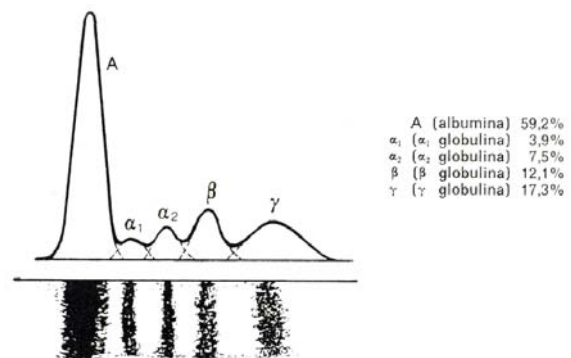
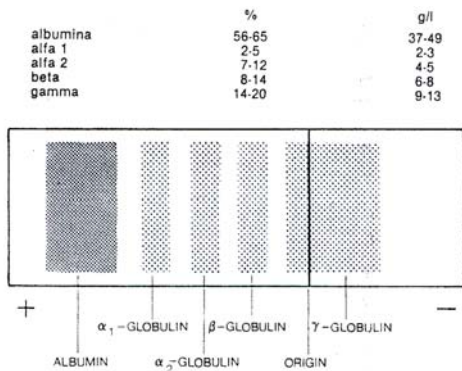


Schema di un apparecchio per l'elettroforesi su carta.

peschino nella vasca. Tale vasca è riempita di tampone. Il campione contenente le sostanze da separare viene deposto in piccolissime quantità (20-50 µl) sotto forma di una piccola banda a qualche centimetro dal polo di segno uguale a quello delle particelle. La vasca viene coperta allo scopo di ridurre l'evaporazione e si collegano gli elettrodi ad un alimentatore in grado di fornire corrente continua di intensità e voltaggio costante. Terminata l'elettroforesi le strisce



vengono rimosse dalla vasca, asciugate e le sostanze evidenziate con mezzi opportuni. Per esempio per rivelare le proteine la striscia viene immersa per 15 minuti in una soluzione di rosso Ponceau e quindi viene lavata più volte con la miscela acido acetico-metanolo. Si formano così sulla striscia una serie di bande ciascuna delle quali corrisponde ad un componente della miscela in esame. Dalla posizione delle bande si può avere una valutazione qualitativa delle sostanze separate mentre dall'ampiezza delle bande e dalla loro intensità di colore una valutazione quantitativa. Ponendo uguale a cento la somma delle aree di tutti i picchi, l'area di ogni picco ne rappresenterà una certa percentuale.



## Elettroforesi su acetato di cellulosa

I principi su cui si basa l'elettroforesi su membrana di acetato di cellulosa (Cellogel) e le attrezzature impiegate sono essenzialmente gli stessi dell'elettroforesi su carta. Questa tecnica offre, rispetto alla precedente, il vantaggio di dare separazioni più nette in quanto, essendo minore l'assorbimento, le zone risultano meglio delimitate; inoltre richiede tempi minori e più piccole quantità di materiali.

### Conservazione delle strisce

Il Cellogel nella sua confezione originale sigillata può essere conservato indefinitamente a qualsiasi temperatura compresa tra -20°C a + 40° C. Dopo l'apertura del pacchetto immergere le strisce in una vaschetta contenente Metanolo:Acqua dist. nel rapporto 30:70 e coprire la vaschetta. Non lasciare seccare il Cellogel perché la disidratazione può distruggere la struttura del gel (perdita dell'acqua di costituzione e diminuzione delle dimensioni del film e dei pori).

### Tamponamento delle strisce

Riempire le camere con circa 400 ml di tampone; per una perfetta impregnazione nel tampone di migrazione immergervi le strisce per almeno 10 minuti evitando a mezzo agitazione occasionale la formazione di un sandwich di più strisce.

### Posizionamento delle strisce sul ponte

Rimuovere l'eccesso di tampone tra 2 fogli di carta da filtro e subito dopo posizionare le strisce ben tese sul ponte della camera elettroforetica tenendo presente che la superficie penetrabile dalle proteine è quella più opaca, individuabile anche dall'angolo tagliato. Questo angolo tagliato deve essere visto in basso a destra.

## ELETTROFORESI SEMIMICRO DELLE SIEROPROTEINE:

### Materiale:

Attrezzatura	Reattivi
Camera umida	Tampone: Tris Ippurato pH 8,8 diluito 200 ml a 1000 ml con H <sub>2</sub> O dist.
Applicatori per semimicroelettroforesi	Colorante: Ponceau S
Cellogel strisce	Decolorante: Ac. Citrico
Vetrini portaoggetto	Trasparentizzante a caldo
Alimentatore	

### Deposito

Distribuire il campione sulla dima, prelevando premendo sul pulsante dell'applicatore. Effettuare il deposito al catodo (polo negativo) in posizione C della dima. Attendere che il campione sia completamente assorbito dalla striscia prima della migrazione.

### Migrazione

Voltaggio 200 V, tempo 33 min.

### Colorazione delle sieroproteine

Colorare nel Ponceau S per 5 minuti con agitazione occasionale (immergere rapidamente e non lasciar galleggiare le strisce sul colorante).

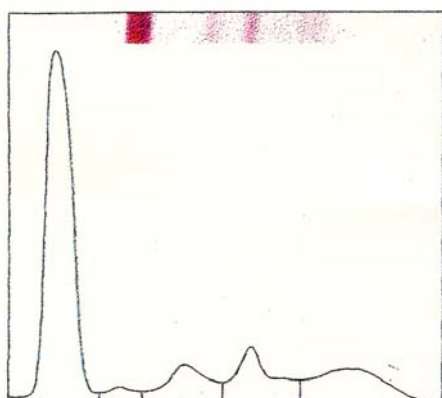
### Decolorazione

3 bagni successivi in Acido Citrico

### Trasparenza a caldo con adesione

Immergere 1 striscia alla volta nel trasparentizzante per 20-30 secondi. Tenere la striscia con una pinzetta ed estrarla adagiandola su un vetrino portaoggetti pulito. Eliminare l'eccesso di trasparentizzante con un rullo. Riscaldare a 80°C in termostato sino a completa trasparenza per circa 5'.

### Elettroforesi delle Proteine



Frazione	Normale		Normale	
	%	%	g/L	g/L
Albumina	63.4	53-58	4.44	3.70-4.80
Alfa 1	2.4	2-5	0.17	0.14-0.35
Alfa 2	9	7-11	0.83	0.48-0.80
Beta	11.6	8-13	0.81	0.58-0.90
Gamma	13.6	12-19	0.95	0.84-1.35
Proteine Totali:	7 g/L			
Rapporto Alb/Glob:	1.73			