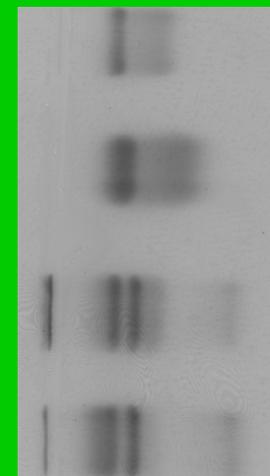
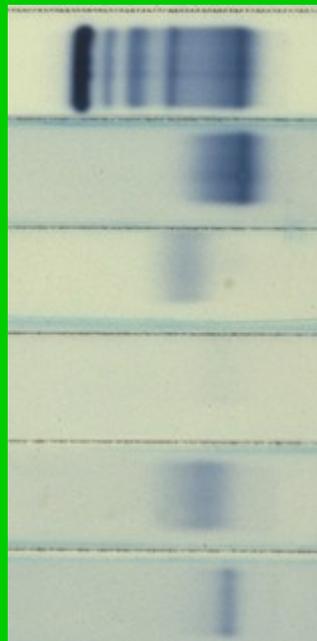
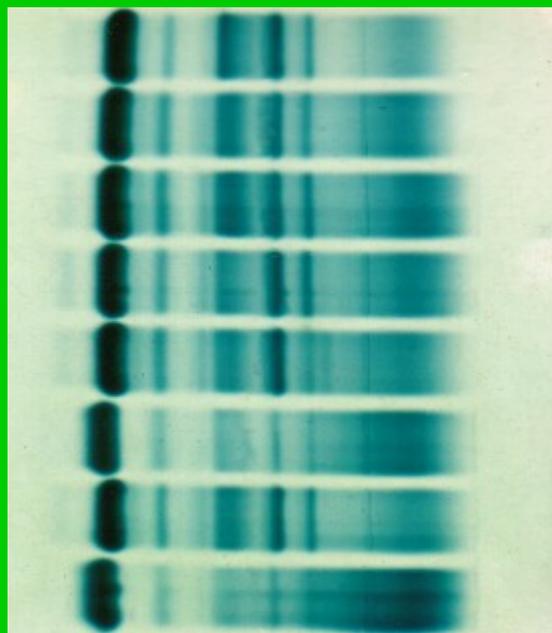
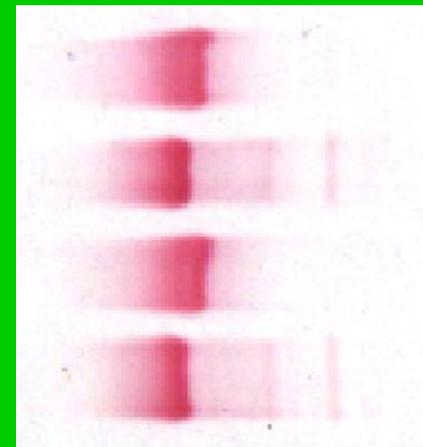
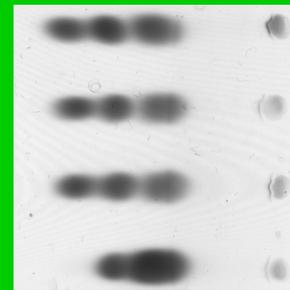
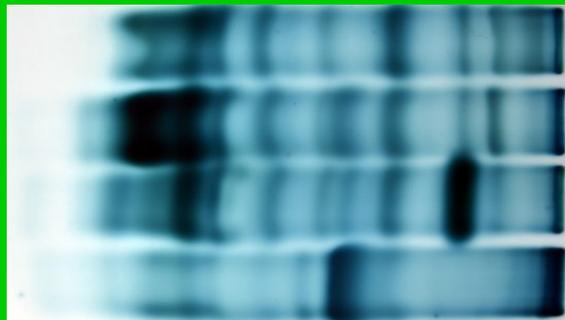
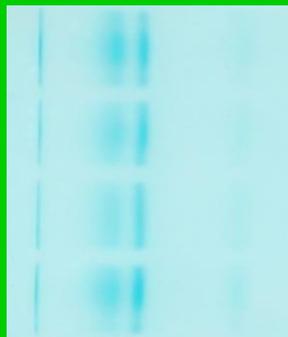


# ***Elettroforesi***

*Approfondimento sulle principali problematiche  
relative all'elettroforesi delle proteine*

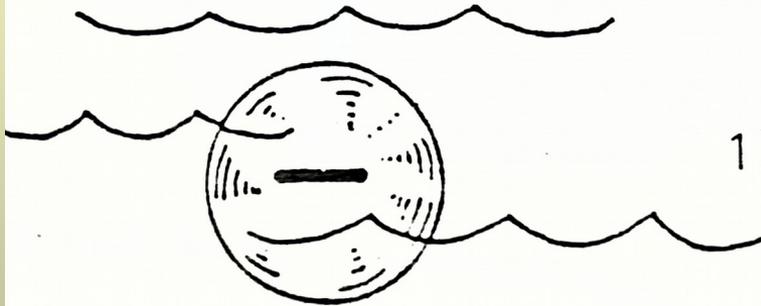
# Elettroforesi varie



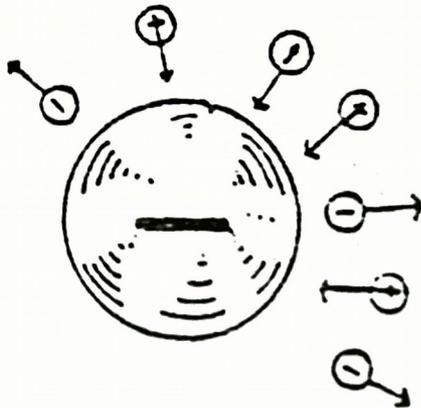
# Le proteine: caratteristiche elettroforetiche

- Le proteine hanno natura anfotera.
- Possono cioè agire da acidi o da basi.
- La molecola proteica, infatti, costituita da catene di aminoacidi, è dotata di gruppi polari che assumono una diversa carica elettrica in rapporto al pH della soluzione.
- Quando la molecola proteica viene posta in soluzione in mezzo di pH uguale al suo **punto isoelettrico**, i gruppi polari di carica positiva e negativa si equivalgono e la molecola, in un campo elettrico non ne viene influenzata e quindi non migra verso l'anodo, ne verso il catodo.
- Se la proteina viene posta in soluzione in un mezzo più acido, gli idrogenioni del solvente inducono una carica positiva sugli aminogruppi e la proteina tende a migrare verso il catodo-.
- Viceversa se viene posta in ambiente più alcalino, migra verso l'anodo+ (ed è questo il caso più frequente nell'elettroforesi clinica).

# Formazione del doppio strato diffuso



1) la molecola proteica in tampone a pH alcalino acquista carica negativa



2) essendo negativa attira a sè gli ioni del tampone con carica di segno opposto



3) si ha così la formazione del doppio strato diffuso

# Fattori principali che influenzano la migrazione

- Voltaggio applicato
- mobilità elettroforetica  
(caratteristica di ogni proteina e dipendente da punto isoelettrico massa e ingombro sterico)
- lunghezza del supporto
- pH del tampone Forza Ionica (F.I.) del tampone
- Porosità del mezzo
- Diffusione
- Elettroendoosmosi
- Effetto Joule

# Effetto del Voltaggio

Direttamente proporzionale alla lunghezza totale della migrazione (*intesa come distanza tra la banda più veloce ed il punto di deposizione*), ma al di sopra di un valore critico inizia a diminuire la lunghezza di migrazione relativa (*intesa come distanza tra la banda più veloce e quella più lenta*), accorciando di fatto la lunghezza di migrazione utile.

# Mobilità Elettroforetica

Direttamente proporzionale alla  
lunghezza di migrazione

# Effetto della lunghezza del supporto

Inversamente proporzionale alla  
lunghezza totale della migrazione

(N.B.: per lunghezza del supporto si intende anche la  
lunghezza della parte emersa di eventuali pescanti)

# Effetto del pH del tampone sulla lunghezza di migrazione

La distanza di migrazione di una proteina è direttamente proporzionale alla **differenza tra il pH del tampone e quello del punto isoelettrico** della proteina stessa

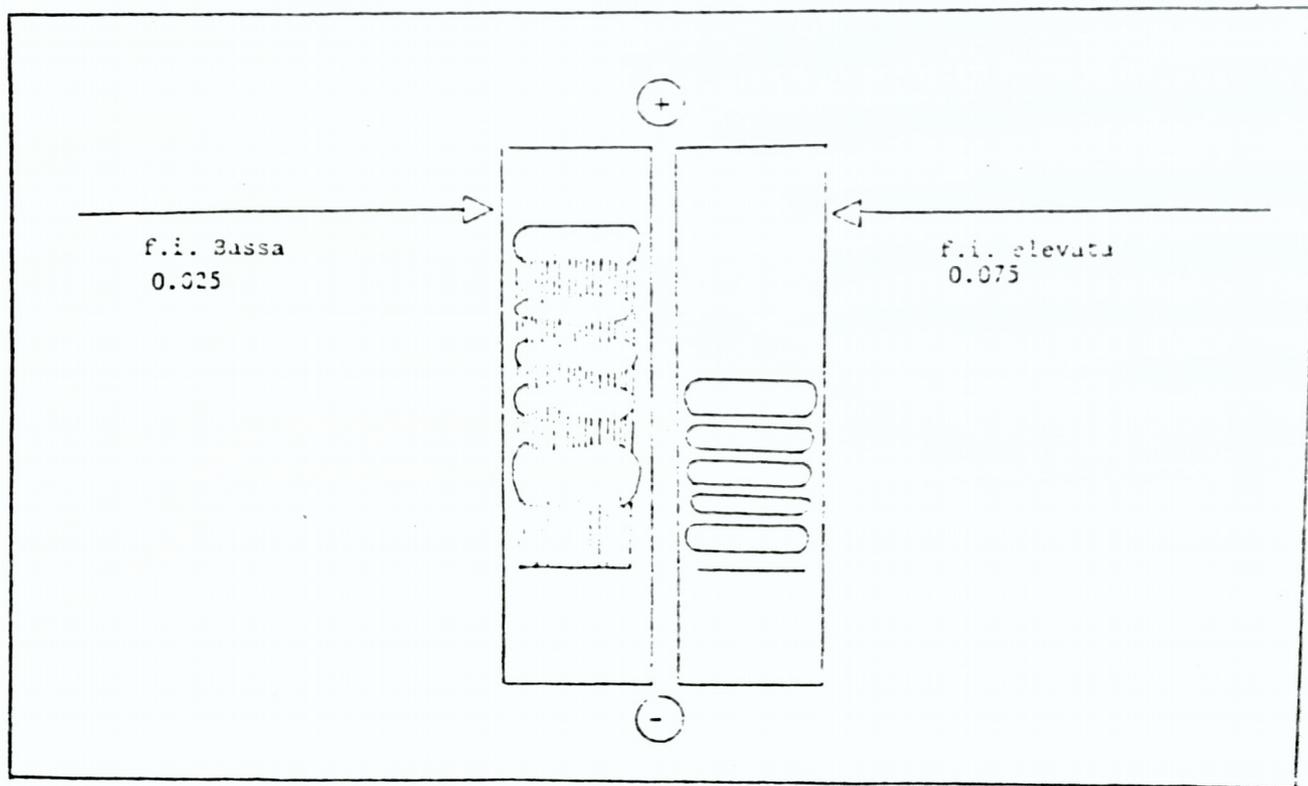
# Effetto della Forza Ionica (concentrazione del tampone)

La distanza di migrazione è  
*inversamente proporzionale*  
alla concentrazione del tampone

# Effetto della F.I. sulla migrazione

Il pH del tampone governa la carica ed il movimento iniziale della molecola proteica, mentre la mobilità dipende dalla forza ionica.

Dalla Fig. 8 si può notare la differenza significativa che si ottiene nei tracciati, variando la forza del tampone.



# Effetto della porosità del mezzo sulla distanza di migrazione

La dimensione dei pori agisce selettivamente sulla distanza di migrazione delle proteine, rallentando o addirittura bloccando quelle di ingombro sterico maggiore

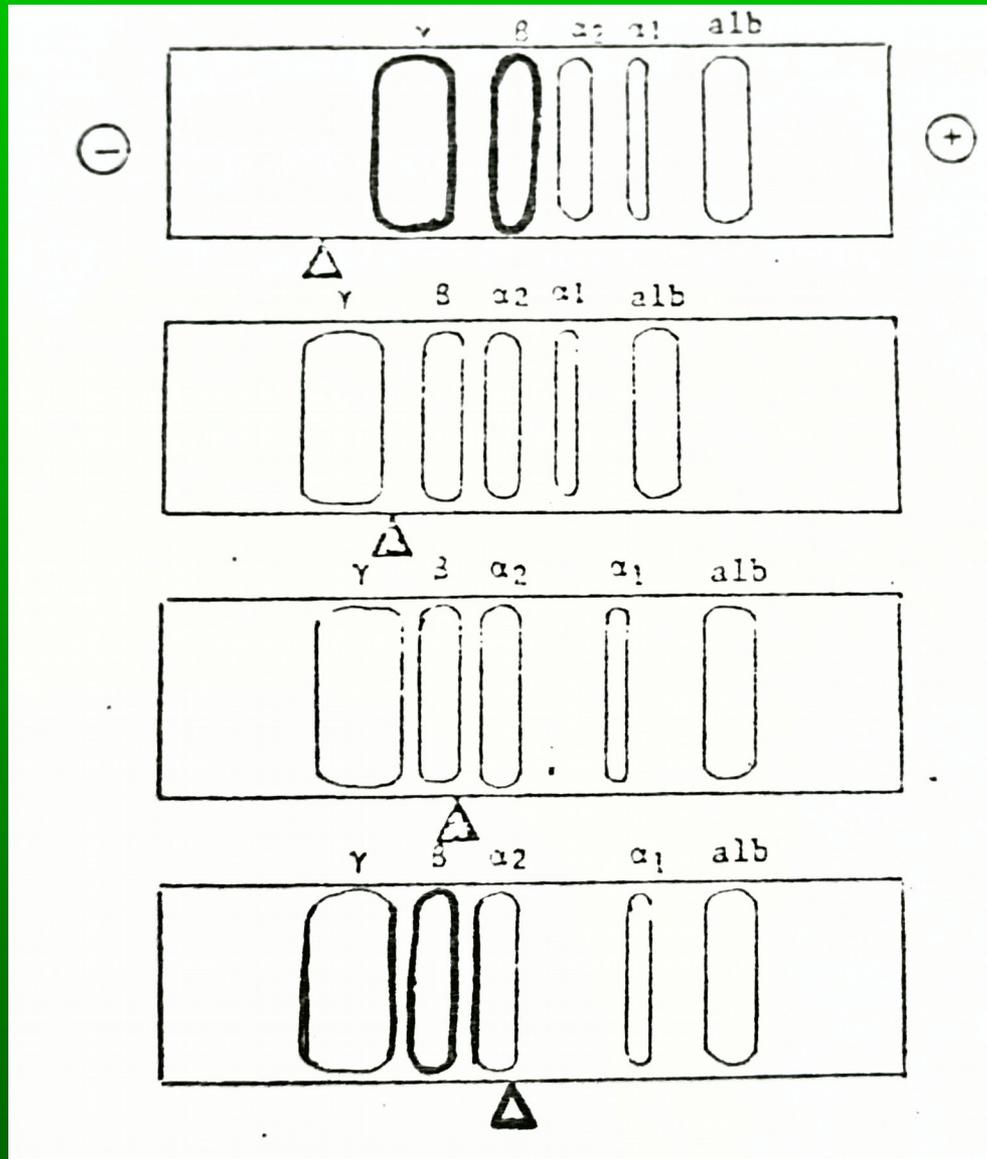
# Effetto della diffusione

Nessun effetto sulla lunghezza di migrazione, ma solo sulla definizione delle bande

# Effetto della elettroendoosmosi

- Rallentamento delle bande con punto isoelettrico più vicino a quello del tampone (p.es. le Gamma)
- In qualche caso retromigrazione

# Effetto del punto di applicazione sulla migrazione



# Effetto Joule

Il riscaldamento durante l'elettroforesi può provocare:

- Aumento della diffusione con diminuzione della definizione delle bande
- Disidratazione del supporto
- Distorsioni in caso di disidratazione irregolare

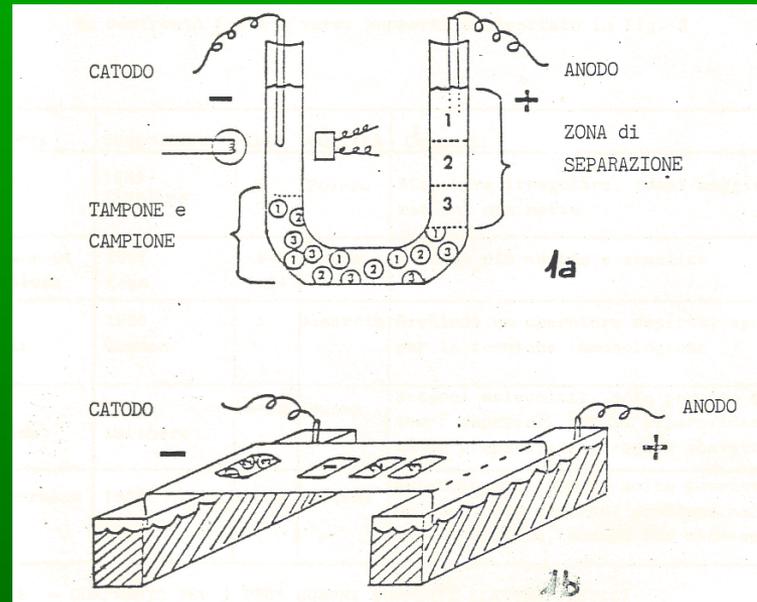
# Elettroforesi in fase libera

La prima tecnica ampiamente usata fu quella di Tiselius (1937, 1939). Separò le proteine in un elettrolita liquido contenuto in un tubo ad "U" di quarzo, e determinò la posizione e le dimensioni di diverse frazioni

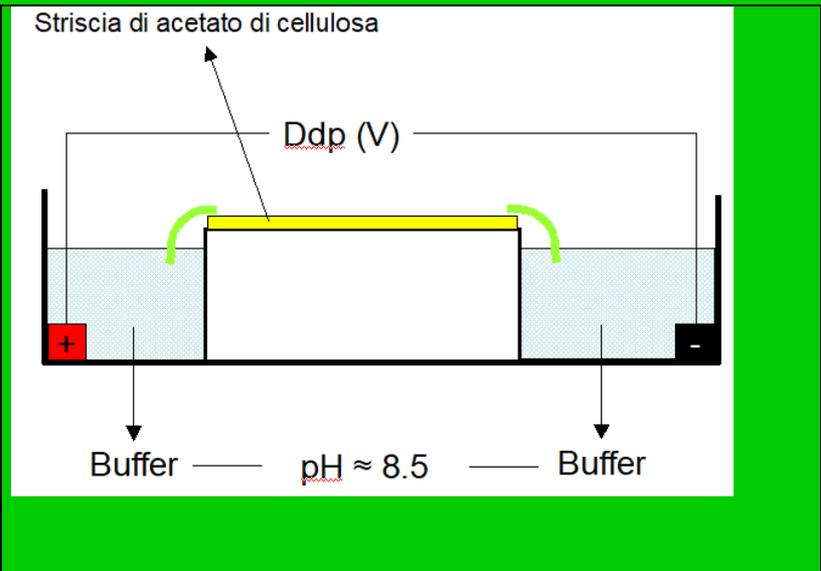
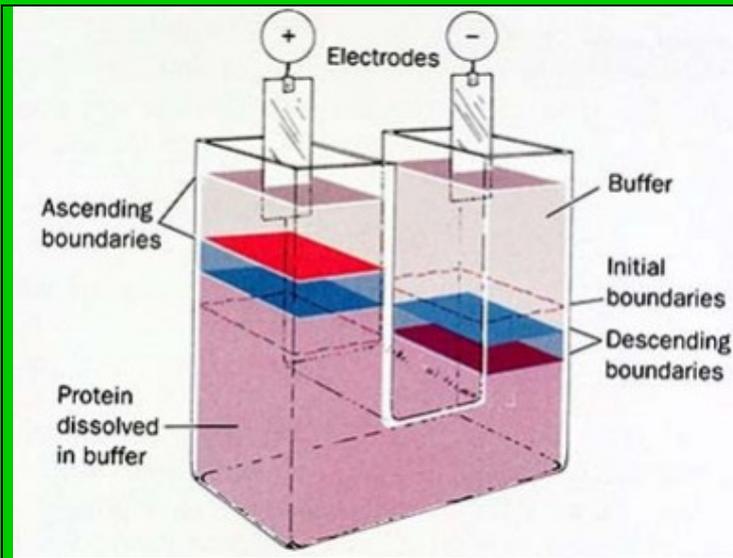
**(per il momento 4: Albumina, Alfa, Beta, Gamma)**

osservando le variazioni dell'indice di rifrazione alla frontiera tra le bande proteiche. Questo tipo di separazione in una soluzione omogenea è stata definita "elettroforesi a frontiera mobile" a "confine mobile", "frontale" o "in fase libera". Gli apparecchi per l'esecuzione di tale tecnica erano complessi e costosi ed è per questo che sono stati usati relativamente poco.

# Elettroforesi in fase libera e confronto con Elettroforesi su supporto solido



# Differenze sostanziali



# Elettroforesi in fase libera



# Elettroforesi zonale

<b>Tipo supporto</b>	<b>Gel di amido</b>	<b>Gel di agar</b>	<b>Gel di agarosio</b>	<b>Acetato di cellulosa</b>	<b>Gel di poliacrilammide</b>
Condizioni elettriche	varie	34 v/cm	100-400 v	180-300 v	Alti voltaggi
Tempi di Migrazione	30-60'	30-60'	6-45'	10-25'	60' e oltre
Risoluzione	5-10 bande	5-6 bande	5-6 bande o in Hr 7-12 bande	5-6 bande o in Hr 7-12 bande	Moltissime bande
Sensibilità	ottima	buona	ottima	buona	eccellente
Riproducibilità e standardizzazione	Variab.	Variab.	Ottima	Buona	Ottima

# Principali Additivi per Tamponi

- Calcio Lattato
- Calcio Acetato
- EDTA
- SDS (sodiododecilsolfato)

# Effetto del Calcio Lattato e del Calcio Acetato

- Gli Ioni  $\text{Ca}^{++}$  favoriscono la separazione delle frazioni Beta1 e Beta2
- La distanza tra le due frazioni è direttamente proporzionale alla concentrazione degli ioni  $\text{Ca}^{++}$

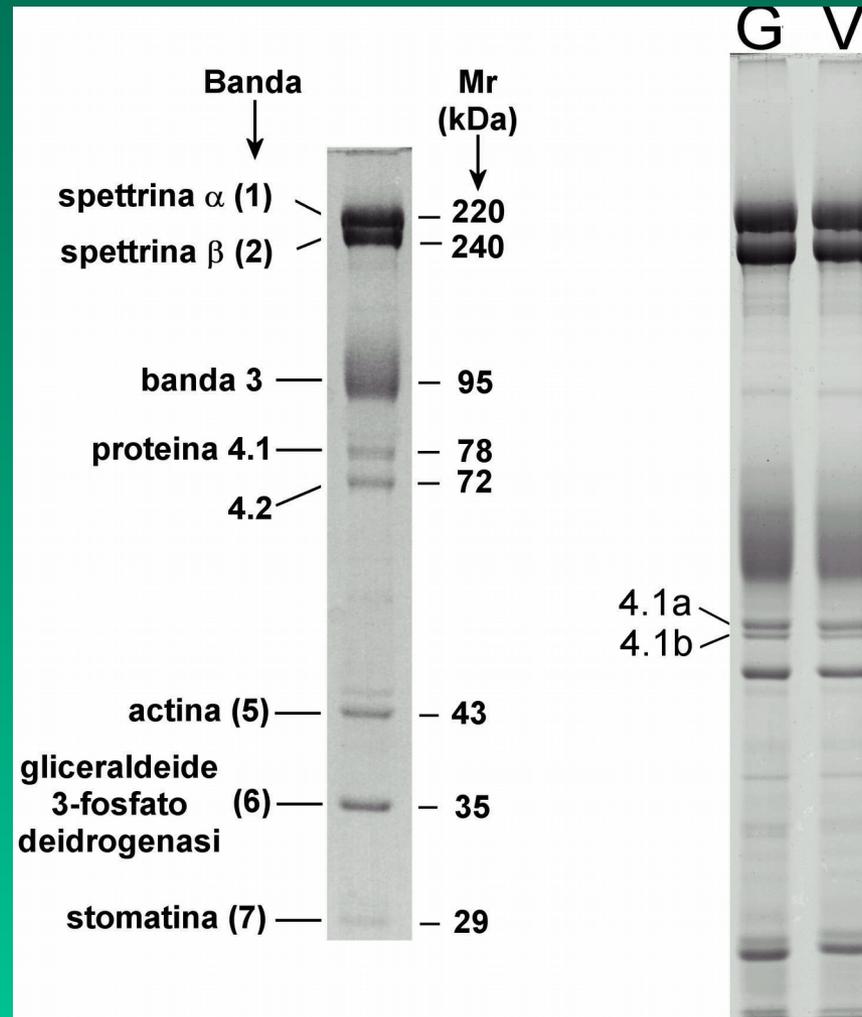
# Effetto dell'EDTA

- L'EDTA (disodico o di sodio e potassio) agisce come chelante del Calcio, e pertanto sottrae gli ioni  $\text{Ca}^{++}$  al campione inibendo così la separazione delle Beta1 e Beta2

# Effetto dell'SDS

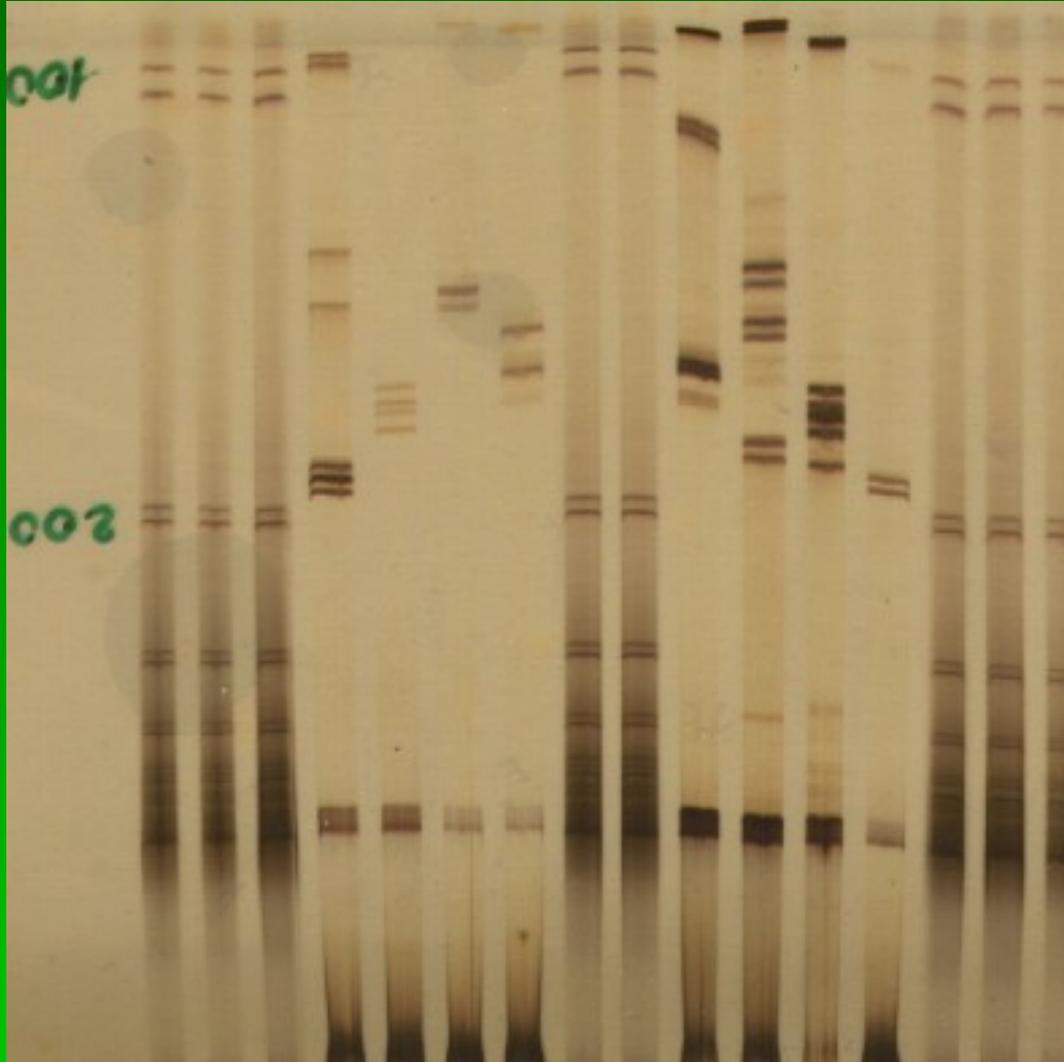
- Il Sodiodecilsolfato satura tutte le cariche delle proteine
- In questo modo la separazione non avviene più in base alla carica elettrica, ma solo in base alla massa delle proteine stesse (o meglio, in base ad una combinazione tra massa e l'ingombro sterico dato dalla forma)

# Effetto di migrazioni con SDS



*Esempio di migrazioni in base al peso molecolare*

# Effetto di migrazioni con SDS



*Il punto di applicazione è in basso, le bande più veloci sono le più leggere*

# Elettroforesi su carta

## Elettroforesi zonale

Con l'elettroforesi, Frederick Sanger riuscì a determinare la sequenza proteica degli aminoacidi dell'insulina. Iniziò riducendo l'insulina in frammenti più piccoli, attraverso la digestione ottenuta con l'aggiunta di tripsina. Ne depositò quindi una piccola quantità su un foglio di carta da filtro ed utilizzò una tecnica mista elettroforesi-cromatografia. In base alla loro solubilità ed alla carica elettrica i diversi frammenti di insulina migrarono in differenti posizioni sulla carta, creando distinti pattern. Sanger chiamò questi pattern "fingerprints" "impronte digitali", in quanto identificativi di ogni proteina. Ri assemblando i frammenti nelle sequenze di aminoacidi, dedusse la struttura completa dell'insulina, concludendo che l'insulina ha una precisa sequenza di aminoacidi. Per questo, Nobel per la chimica nel 1958.

Fu proprio in seguito all'introduzione della carta da filtro, che la diffusione dell'elettroforesi divenne più consistente, anche se la vera e propria diffusione dell'elettroforesi, come tecnica di routine, si potuta registrare con l'avvento di tecniche più semplici e che maggiormente si prestano ad un utilizzo massivo.

Già con l'introduzione dell'elettroforesi su carta molti laboratori cominciarono ad adottarla negli anni 60 e 70; tuttavia la tecnica presentava alcune difficoltà pratiche, che ne limitarono l'utilizzo:

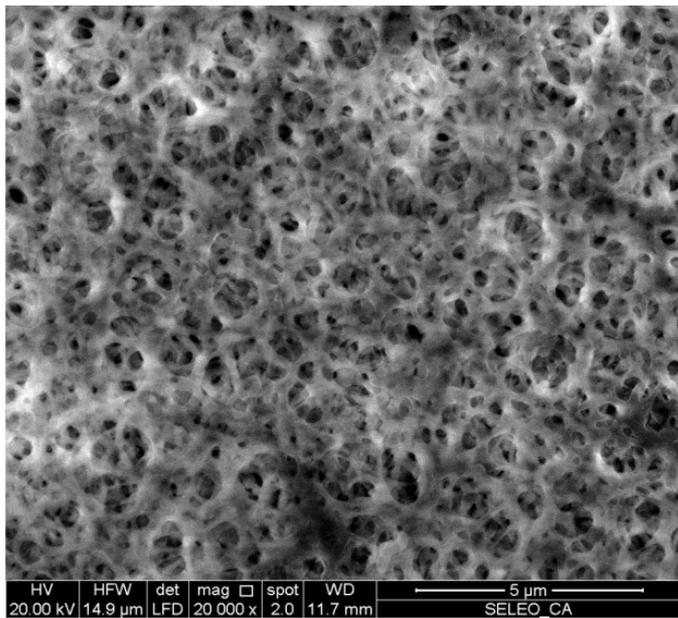
**La separazione richiedeva alti voltaggio (dell'ordine di 10000 Volt).**

Per ottenere risultati apprezzabili erano necessari tempi molto lunghi (tipicamente tutta la notte). Le bande ottenute (albumina, alfa, beta e gamma) apparivano sfumate e la risoluzione non era tale da garantire accuratezza e ripetibilità dei risultati. Per la quantificazione delle bande era preferibile **eluirle sciogliendole in acido acetico**, poi leggere le assorbanze allo spettrofotometro ed infine calcolarne manualmente le percentuali e le concentrazioni, o in alternativa leggere direttamente su densitometri commerciali.

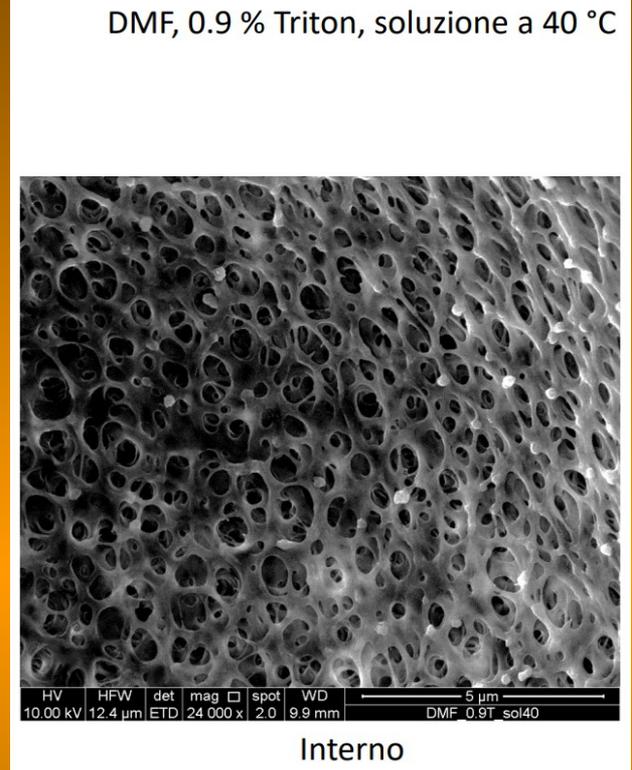
# Elettroforesi su gel di amido, poliacrilammide, acetato di cellulosa, agarosio

<b>Tipo supporto</b>	<b>Gel di amido</b>	<b>Gel di agar</b>	<b>Gel di agarosio</b>	<b>Acetato di cellulosa</b>	<b>Gel di poliacrilammide</b>
Condizioni elettriche	varie	34 v/cm	100-400 v	180-300 v	Alti voltaggi
Tempi di Migrazione	30-60'	30-60'	6-45'	10-25'	60' e oltre
Risoluzione	5-10 bande	5-6 bande	5-6 bande o in Hr 7-12 bande	5-6 bande o in Hr 7-12 bande	Moltissime bande
Sensibilità	ottima	buona	ottima	buona	eccellente
Riproducibilità e standardizzazione	Variab.	Variab.	Ottima	Buona	Ottima

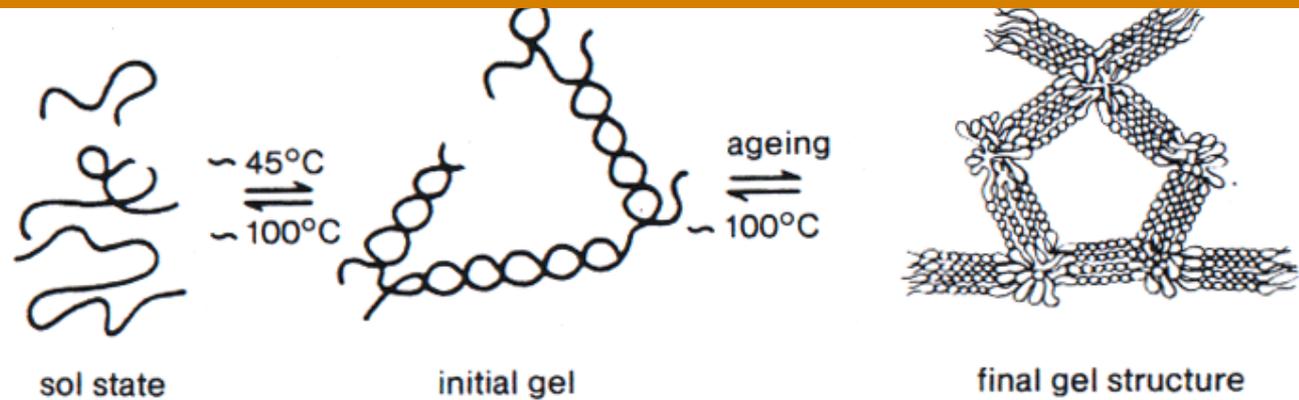
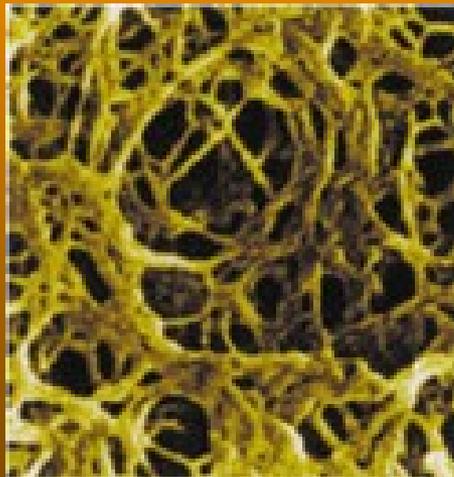
# Acetato di Cellulosa<sub>(in alto)</sub> e Agarosio<sub>(in basso)</sub>



Superficie



Interno



# Acetato di cellulosa

Le pellicole di acetato di cellulosa potevano essere prodotte con un buon livello di standardizzazione allo spessore di circa 0,15-0,20 mm e con una porosità di circa 40-45 micron.

Le aziende italiane si orientarono inizialmente per la produzione di membrane conservate in umido, in una soluzione di alcool metilico (Cellojel della Chemetron del Dr. Del Campo, dagli anni '60, Poliphor della Elvi, Pherostrips ecc.), mentre quelle tedesche (Sartorius, Schleicher & Schuell), americane (Gelman, Helena) e giapponesi (Fuji) misero a punto dei metodi di stratificazione che permettevano la conservazione a secco delle membrane.

Già alla fine degli anni settanta, inoltre, le due principali aziende americane iniziarono a stratificare l'acetato anche su supporti di Mylar, ed una delle due (Gelman) sperimentò anche la stratificazione su Mylar del **nitrate** di cellulosa, come alternativa all'acetato. Seguirono anche le due aziende tedesche, con risultati inferiori alle aspettative, dal punto di vista commerciale, e qualche problema tecnico di troppo.

Bisogna attendere la seconda metà degli anni 80 per trovare anche aziende italiane impegnate nella produzione dell'acetato secco di cellulosa (prima la Sclavo, e poi la Me.Dia.) sia supportate in Mylar che non. Le aziende italiane, comunque sono state sempre presenti, e in alcuni casi all'avanguardia nel settore dell'elettroforesi.

# Acetato di cellulosa

- Facilmente utilizzabile
- Separazioni a voltaggi relativamente bassi
- Bassi Amperaggi
- Effetto Joule facilmente controllabile
- Tempi brevi di separazione (inizialmente 30-45' ora 12-15')
- Bande sufficientemente nette
- Risultati abbastanza riproducibili
- Letture e quantificazioni relativamente semplici
- Costo basso

# Agarosio

Le lastre di Gel di Agarosio possono essere prodotte con un buon livello di standardizzazione allo spessore di circa 0,5-0,6 mm e con una porosità **FACILMENTE CONTROLLABILE** perché dipendente dalla concentrazione del Gel.

La conservazione è – finora – sempre in umido, ed il confezionamento è sempre singolo per ogni lastra, e quindi un impegnativo confezionamento comporta un sensibile aumento dei costi.

Le principali aziende presenti sul mercato oltre alla PhoreGel, sono l'Helena la Sebia (proprietaria anche dell'Interlab), e la Hellabio (greca) che produce Gel compatibili con vari apparecchi.

Era ottimo anche il Gel che veniva prodotto dalla Ciba-Corning (di cui ora non si trova più traccia sul mercato) con un rivoluzionario metodo di produzione che stampava una coppia di Gel direttamente sul Blister di confezionamento finale con un notevole risparmio generale.

I metodi di produzione sono relativamente semplici, ed in ogni caso si tratta di stratificare un liquido sulla superficie - resa idrofila- di un foglio di Poliestere (Mylar).

Si può utilizzare uno stampo maschio-femmina, un metodo ad immersione con vetri e spessori.

La PhoreGel utilizza il metodo ad immersione a vari strati con guarnizioni che determinano lo spessore del Gel.

# Agarosio

- Qualche difficoltà di maneggiamento
- Separazioni a voltaggi Medio Alti
- Alti Amperaggi
- Effetto Joule controllabile con Raffreddamento
- Tempi brevi di separazione (inizialmente 6 -15’)
- Bande nette
- Risultati riproducibili
- Letture e quantificazioni relativamente semplici
- Costo relativamente basso se rapportato ad un elevato numero di campioni/lastra
- Produzione senza uso di sostanze pericolose

# Stratificazione di Acetato di cellulosa:

## Sostanze necessarie:

### Soluzione di lavoro

%)

- 10 g di cellulosa acetato (acetyl content 39.0
- 60 g di acetone
- 20 g di -DMF
- 3 ml DIETILFTALATO
- 400 ul di TRITON
- 45 g metossietanolo con 2 g alcol stearilico
- SDS 0.5 g
- bagno di coagulo in acqua + TRITON

\* colore === = Prodotto pericoloso

# Stratificazione di Acetato di cellulosa:

## Attrezzature necessarie:

- Vetreria
- Bilance
- Agitatore magnetico
- Dr.Blade o stratificatore ermetico

*N.B.: è necessario maneggiare e smaltire sostanze molto pericolose*

# Stratificazione di Gel di Agarosio:

## Sostanze necessarie:

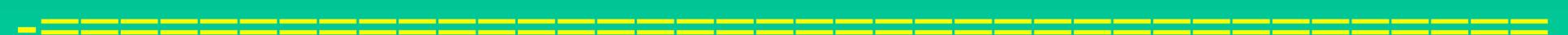
- Agarosio in polvere
- Tampone per elettroforesi
- Urea
- Conservante
- Gellano o eventuali additivi

# Stratificazione di Gel di Agarosio:

## Attrezzature necessarie:

- Vetri e vetreria
- Bilancie
- Spessori stampati in 3d o fustellati da fogli di plastica
- Termostato a 60-80 °C
- Forno a microonde e agitatore magnetico
- Vaschette

*N.B.: non è necessario maneggiare e smaltire sostanze molto pericolose*

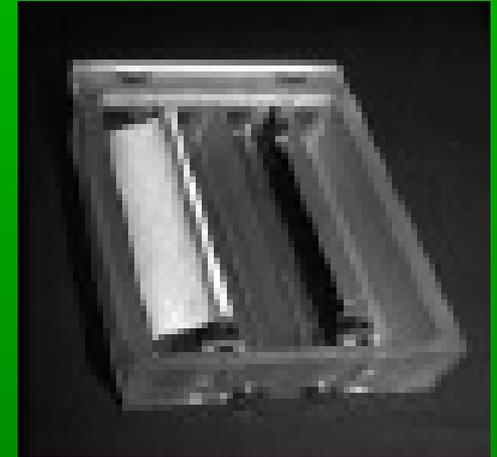


# Camere umide

Esempio di camere umide con elettrodi in platino e in carbonio: gli elettrodi in platino sarebbero perfetti perché sicuramente inerti, ma a causa del costo sarebbe proibitivo utilizzarli di spessore troppo ampio, mentre quelli in carbonio non hanno di queste limitazioni



# Camere umide



A sinistra camera per acetato di cellulosa, al centro e a destra camere per acetato di cellulosa supportate in Mylar

# Elettroforesi su Acetato di cellulosa

- **Acetato Umido**

Era il più usato fino agli anni '90 quando ancora molti laboratori lavoravano in manuale. Veniva fornito in bustine da 25 strisce intrise di metanolo ed aveva un prezzo relativamente basso, ma aveva l'inconveniente di costringere a conservare in metanolo le strisce residue di un pacchetto aperto.

## Acetato secco

E' il più usato per tecniche manuali, dato che chi lavora in manuale, oggi, fa poche analisi, e quindi ha bisogno di poter prendere dalla confezione anche una sola striscia alla volta, senza problemi di conservazione. Era utilizzato in grandi quantità anche dai sistemi automatici di produzione giapponese (Cosmo Olympus ecc) che sfruttavano la tecnologia di fotocopiatrici e stampanti per prendere un foglio di acetato alla volta.

- **Acetato supportato in Mylar**

E' il più usato, nella la maggior parte dei sistemi automatici. Consiste nella stratificazione dell'acetato su un foglio di plastica rigida e trasparente (Mylar = foglio di poliestere con una superficie idrofoba ed una idrofila su cui si stratifica l'acetato) che facilita le movimentazioni meccaniche per spostare la membrana, generalmente montata su un telaio, durante le varie fasi di lavoro.

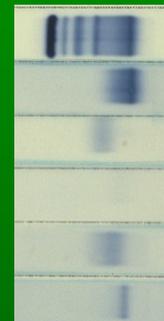
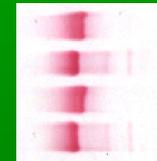
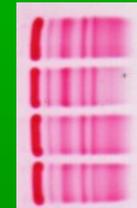
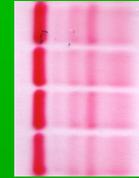
# Elettroforesi su Acetato di cellulosa

## *Principali tecniche ad uso clinico:*

- Sieroproteine a 5 bande
- Sieroproteine a 6 bande
- Emoglobine (HB)
- Immunofissazione

*...Ed in misura minore*

- Lipoproteine
- Isoenzimi



# Sieroproteine su Acetato di Cellulosa

## Tecnica manuale:

### INTRODUZIONE

L'interpretazione molecolare delle sieroproteine frazionate costituisce, oggi, il metodo più efficace per la valutazione qualitativa delle singole individualità proteiche presenti nel tracciato elettroforetico; la valutazione quantitativa delle singole proteine viene invece largamente eseguita con metodiche in turbidimetria, nefelometria, RID, dove la reazione positiva tra proteina ed antisiero monospecifico garantisce la più accurata quantificazione della proteina stessa.

In molti casi, tuttavia, la particolare natura di alcune proteine e/o la presenza di componenti proteiche abnormi non consentono ai soli metodi immunologici di dare una risposta quantitativa affidabile; quando infatti le proteine, a parità di specificità antigeniche, differiscono tra loro per caratteristiche chimico-fisiche è necessario, per la loro quantificazione, ricorrere nuovamente alla tecnica elettroforetica in modo che le frazioni fisicamente separate ed opportunamente evidenziate possano finalmente essere quantificate densitometricamente. In pratica, le cosiddette componenti monoclonali (cioè prodotte da un singolo clone di cellule devianti) proprio per la loro natura anomala non possono essere quantificate con precisione da metodi immunologici, ed in quel caso l'elettroforesi diventa il metodo “meno impreciso” per una misurazione efficace.

Peraltro, per i complessi fenomeni chimico-fisici che regolano la separazione in campo elettrico delle proteine, i risultati analitici risentono spesso di una variabilità eccessiva specie tra laboratori, che induce a standardizzarne strettamente le condizioni operative per migliorarne l'affidabilità.

Con quest'obiettivo, PhoreGel propone, dopo un accurato studio metodologico, le condizioni operative ottimali con l'uso dei suoi reagenti e strumentazioni per consentire una più corretta quantificazione delle separazioni elettroforetiche con l'utilizzo di 2 diversi tamponi per ottenere separazioni in 5 o 6 bande.

# Sieroproteine su Acetato di Cellulosa

Tecnica manuale:

## Fasi di Lavoro

- 1) Idratazione in tampone della striscia (Membrana)
- 2) Eliminazione dell'eccesso di Tampone
- 3) Inserimento della membrana sul ponte e Camera Umida
- 4) Applicazione dei Campioni
- 5) Migrazione
- 6) Fissazione/Colorazione
- 7) Decolorazione
- 8) Diafanizzazione (Trasparentizzazione) – solo se prevista
- 9) Lettura e refertazione

# Fase 1

## Idratazione in tampone della striscia (Membrana)

- L'acetato di cellulosa secco viene conservato disidratato, (anche l'acetato umido non è del tutto idratato, ma conservato in soluzione alcolica di Metanolo) e pertanto va rinvenuto nel tampone prima di essere utilizzato.
- Per accelerare questa fase è possibile lasciarlo galleggiare sulla superficie del liquido una trentina di secondi e poi immergerlo per qualche minuto.
- In ogni caso occorre evitare che un'immersione troppo rapida lasci incorporare delle bolle d'aria, creando delle zone che saranno escluse dalla migrazione e che quindi presenteranno delle irregolarità.
- Per facilitare l'imbibizione può essere buona norma aggiungere al tampone di imbibizione una piccola quantità di alcool etilico (0.5 ml – 1,0 ml per ogni 100 ml di tampone); in questo modo si aumenterà la permeabilità della membrana e verranno velocizzate tutte le fasi di lavoro: imbibizione, colorazione, decolorazione e - se prevista – anche la trasparentizzazione (o diafanizzazione). Anche la migrazione risulterà di migliore qualità.

## Fase 2

# Eliminazione dell'eccesso di Tampone

Si può eliminare l'eccesso di tampone in 2 modi diversi:

### 1) Tra due fogli di carta bibula o 2 cartoncini

I fogli di carta bibula devono assorbire in modo costante, e non devono deformarsi al punto da creare pieghe che non garantiscano il mantenimento di un'umidità costante

### 2) All'aria con un tempo di attesa sufficiente ad evitare che la membrana sia vistosamente madida di tampone

Metodo generalmente usato su sistemi automatici nei quali sarebbe di difficile applicazione l'asciugatura tra due fogli di carta. Buon sistema, che necessita, però, di variazioni stagionali nell'impostazione dei tempi di attesa.

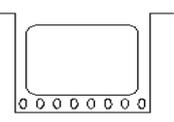
## Fase 3

# Inserimento della membrana sul ponte e Camera Umida

- La membrana, asciugata come descritto, ma non disidratata (non deve presentare macchie bianche di eccessiva asciugatura), va centrata sul ponte in modo che i bordi in esubero fuoriescano liberi. Per mantenerla della giusta umidità e tensione meccanica, vanno inumidite con tampone le scanalature presenti sulle parti basse del ponte stesso, e in questo modo va inserita nella camera umida.



# Fase 4: Applicazione dei Campioni

<p>A doppio filo, con utilizzo di base portacampioni.</p>	<p>Acetato</p>	<p>Economico</p>	<p>Poco riproducibile facilmente deformabile</p>
<p>2) A metallo poroso, con utilizzo di base portacampioni.</p> 	<p>Acetato</p>	<p>Robusto; ottimo contatto col supporto</p>	<p>Progressivo deterioramento dei pori assorbenti</p>
<p>3) A tre lamine, con utilizzo di base portacampioni.</p> 	<p>Acetato/Agaroso</p> 	<p>Ottima standardizzazione della quantità di campione depositato;</p>	<p>Costo più elevato; può deformarsi in caso di urto.</p>
<p>4) A pozzetto, senza utilizzo di basi portacampioni.</p>	<p>Agar / Agaroso / Poliacrilamide</p>	<p>Massima praticità ed economicità: non richiede applicatori, ma la deposizione è diretta</p>	<p>Rimane il segno della deposizione come artefatto. E' trascurabile solo se lontano dalla zona di migrazione vera e propria.</p>
<p>5) A maschera di applicazione, senza utilizzo di basi portacampioni.</p>	<p>Agaroso</p>	<p>Pratico ed economico non richiede depositori.</p>	<p>Richiede un'ottima manualità per evitare la formazione di bolle; può provocare artefatti nell'assorbimento del colorante in zone limitrofe alla deposizione.</p>
<p>6) Utilizzo di lamine in materiale plastico, preferibilmente monouso.</p>	<p>Acetato/Agaroso</p>	<p>Buon sistema se usato una sola volta.</p>	<p>Può deformarsi facilmente; costoso se monouso.</p>
<p>7) Utilizzo di materiali porosi non metallici, monouso, senza utilizzo di basi portacampioni.</p>	<p>Agaroso</p>	<p>Molto pratico, non richiede base di applicazione, ma il campione va deposto direttamente sull'applicatore</p>	<p>Soggetto a qualche sporadico inconveniente può richiedere incubazione aggiuntiva in camera umida; è stato criticato per una teorica filtrazione selettiva del campione; è costoso in quanto monouso.</p>
<p>8) A lamina singola microforata, con utilizzo di base portacampioni.</p> 	<p>Agaroso</p>	<p>Ottimo metodo permette una standardizzazione quasi perfetta della quantità di campione depositato.</p>	<p>Funziona meglio solo con spessori inferiori a 0,1 mm (ideale 0,05 mm), ma l'acciaio così sottile può deformarsi facilmente; necessita di lavaggio accurato per evitare l'otturazione dei pori.</p>

# Fase 5- Migrazione: Camere umide

Esempio di camere umide con elettrodi in platino e in carbonio: gli elettrodi in platino sarebbero perfetti perché sicuramente inerti, ma a causa del costo sarebbe proibitivo utilizzarli di spessore troppo ampio, mentre quelli in carbonio non hanno di queste limitazioni



# Camere umide per Acetato di Cellulosa: Caratteristiche

- Presenza di 2 emivasche contenenti il tampone, separate da un setto centrale per isolare elettricamente le due sezioni

Le due emivasche devono essere costruite in modo tale da permettere la presenza di un'adeguato volume di liquido, in modo che il potere tampone consenta il mantenimento di un pH sufficientemente costante anche durante il passaggio di corrente e che la temperatura del sistema non tenda a salire troppo in rapporto alla potenza da dissipare.

Se le dimensioni della camera sono troppo ridotte, si possono adottare alcune strategie costruttive, come creare degli ulteriori setti separativi in ognuna delle emivasche in modo da aumentare la lunghezza del percorso che separa gli elettrodi dal punto di immersione della membrana.



- Presenza di 2 elettrodi in materiale inattaccabile dal tampone

Gli elettrodi migliori dovrebbero essere di Platino o in altro materiale inossidabile oltre che eccellente conduttore.

Specialmente con i tamponi alcalini, inoltre, l'anodo deve avere una sezione sufficientemente grande da prevenire l'eccessivo accumularsi di materiale insolubile che vi deposita durante la migrazione, ed al tempo stesso evitare che un eccessivo assottigliamento ne pregiudichi la funzionalità, tenendo conto che il metallo, invece, migra e tende a depositarsi al Catodo. In conclusione, il platino potrebbe risultare troppo costoso per utilizzarlo con la sezione che sarebbe necessaria a garantirne una lunga durata, mentre ottime alternative possono essere il carbonio, e particolari leghe di acciaio inossidabile.

- Presenza di un ponte fisso o mobile per consentire alla striscia (o membrana) di chiudere il circuito

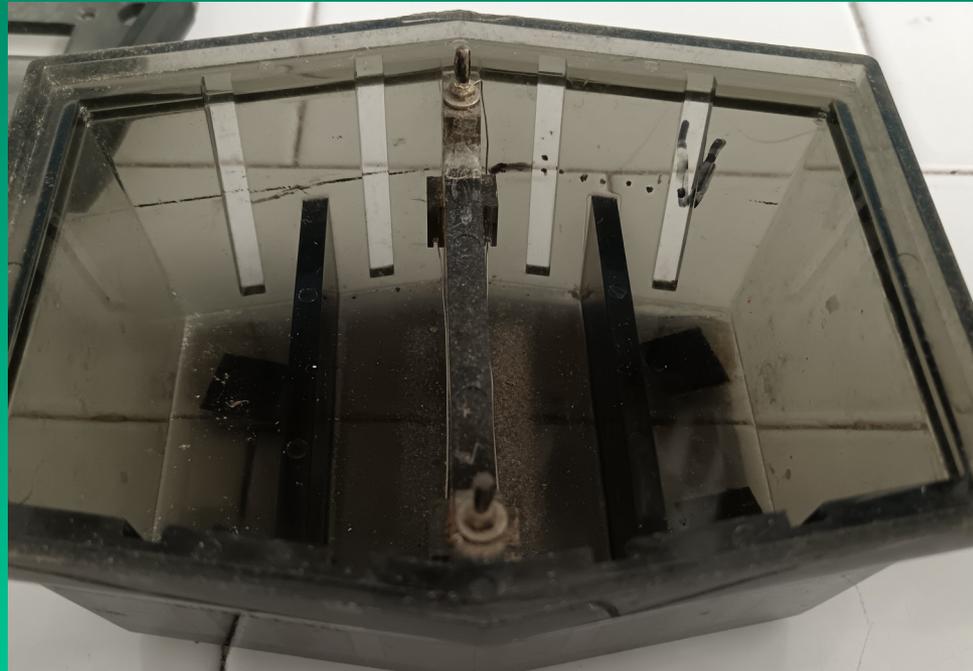
Il ponte deve garantire che la striscia peschi in ciascuna delle due emivasche, in una zona sufficientemente lontano dagli elettrodi in modo da limitare il più possibile distorsioni del campo elettrico. La membrana non deve subire eccessive tensioni meccaniche e deve poter mantenere una forma piana nella zona di migrazione. E' possibile, qualora lo si ritenga economicamente vantaggioso, utilizzare dei pescanti in materiale diverso dall'Acetato di cellulosa per il contatto diretto con il tampone (p.es. cata da filtro, feltro, spugne o altro materiale inerte).



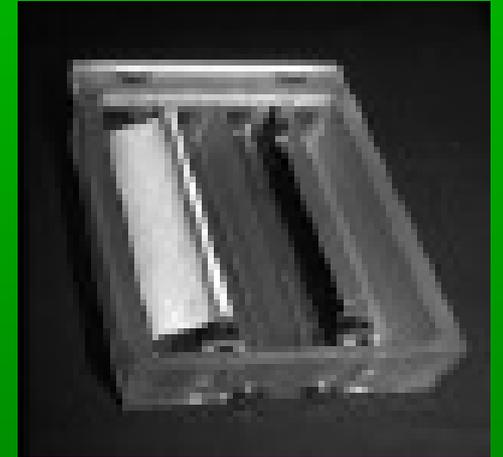
# Camere umide: Caratteristiche

**A sinistra elettrodo in platino**

**A destra particolare di suddivisione dell'emivasca in due ulteriori setti**



# Camere umide



A sinistra camera per acetato di cellulosa, al centro e a destra camere per acetato di cellulosa supportate in Mylar

# Camere Umide per tecniche manuali su Acetato di cellulosa



# Fase 6 Fissazione - Colorazione

- Dopo la migrazione la striscia va tolta dal ponte e va inserita in una soluzione che provoca la denaturazione delle proteine in modo da bloccarle nelle “maglie” dell’Acetato così che possano essere colorate nella posizione in cui si trovano.
- Nel caso delle Sieroproteine su acetato di cellulosa, è possibile unificare queste due operazioni in modo che fissazione e colorazione avvengano contemporaneamente dato che il colorante Rosso PonceauS è perfettamente solubile in una soluzione di TCA (acido Tricloroacetico) al 5% che risulta essere un ottimo fissativo. Anche l’acido Solfosalicilico è un buon fissativo ma in soluzione del 10-15% e si presta meglio ad essere usato su apparecchiatura automatiche, dato che non danneggia i tubi di silicone.

# Fase 7 - Decolorazione

- Dopo la Colorazione occorre eliminare tutto il colorante dal fondo della striscia e lasciare soltanto quello fissato sulle proteine migrate.
- Il prodotto migliore sarebbe l'Acido Acetico, tipicamente al 5%, che infatti è stato usato per molti anni: presenta, però l'inconveniente di danneggiare le tuberie dei sistemi automatici, che sono spesso in silicone, ed ha un cattivo odore. Per questi due motivi si utilizzano decoloranti alternativi, ma altrettanto efficaci, a base di Acidi Fosforico o Acido Citrico.

# Fase 8 – Diafanizzazione (Trasparentizzazione)

- Dopo la Decolorazione la membrana può essere inserita in un bagno che la renda trasparente.
- Si tratta di un passaggio piuttosto invasivo, che modifica la struttura stessa dell'Acetato ed utilizza sostanze antipatiche da maneggiare, dalla scheda di sicurezza piuttosto impegnativa.
- Fortunatamente è un passaggio che non è più necessario se non con l'utilizzo su alcune apparecchiature obsolete, anche se non del tutto scomparse
- In ogni caso, si immerge la striscia nel diafanizzante per un paio di minuti, poi si stende su un vetrino, si elimina l'eccesso di diafanizzante con un altro vetrino, e si mette in termostato a 80-90°C, fino a completatrasparentizzazione ed asciugatura.

# Principali sostanze chimiche utili per la produzione di Kits e reagenti

PRODOTTO	TCA	Saponina	Tris	NaOH	Calcio Lattato	EDTA	Acido acetico	Acido Citrico	Acido Ippurico	Colorante Rosso P.in polvere	Colorante Amido N.in polvere	Colorante Violet in polvere	Colorante Coomassie in polvere	Acido fosforico	Glicina	Sodio Idrato	Diacetonalcol	Campo di Applicazione
Rosso Ponceau S	X								X									Siero & HB su Acetato
Nero D'amido							X			X								Siero & HB su Agarosio
Fast Violet							X				X							Siero & HB su Agarosio
Coomassie							X					X						Siero & HB su Agarosio
Decolorante Conc.+													X					Siero & HB su Acetato
Decolorante Conc.-													X					Siero & HB su Acetato
Decolorante pronto all'uso													X					Siero & HB su Acetato
Diafanizzante													X			X		Siero & HB su Acetato
Gel Agarosio								X								X		Siero & HB
Tampone HR			X	X		X		X								X		Siero su Acetato & Agarosio
Tampone 8.7 (Neutro)			X	X				X								X		Siero su Acetato & Agarosio
Tampone HB			X			X								X				Siero su Acetato & Agarosio
Tampone siero pronto			X	X		X		X								X		Siero su Acetato & Agarosio
Tampone HB pronto			X			X								X				HB su Acetato & Agarosio
Additivo x Tampone B1B2					X													
Emolizzante	X																	HB su Acetato & Agarosio

# Sviluppo di prodotti specifici

- **Alimentatori**
- **Camere umide**
- **Applicatori**
- **Densitometri**
- **Sistemi di lettura tramite Scanner o Fotocamera**
- **Sistemi automatici**

# Alimentatori

- Tensione costante
- Corrente costante
- Potenza costante
- Gestiti da Pc o microcontrollori

# Alimentatori

- **Tensione costante**

- **Bassa tensione - fino a 400V –**
- **Alta tensione – oltre 400V**

- Ottimi risultati a patto di mantenere costanti le condizioni di lavoro: potenza in aumento con conseguente aumento progressivo dell'effetto Joule



- **Corrente costante**

- Utile soprattutto per compensare problemi di standardizzazione delle condizioni di lavoro – elettroforesi con potenza in diminuzione

- **Potenza costante**

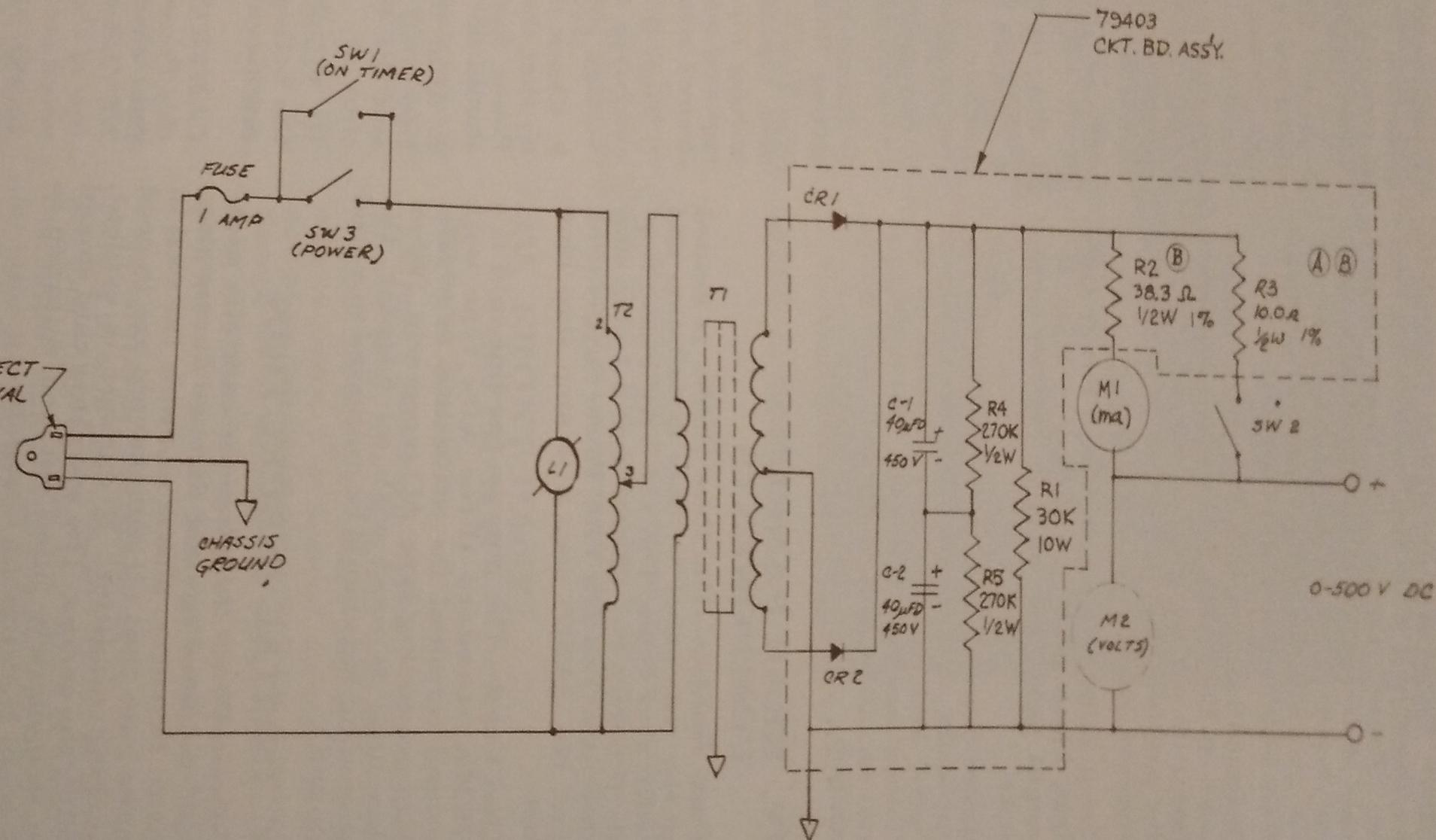
- Metodo ottimo ma più costoso, standardizza la lunghezza di migrazione, ed è utile soprattutto nei casi in cui si sviluppino potenze considerevoli (Agarosio o Poliacrilammide)

- **Gestiti da Pc o microcontrollori**

- Ottima alternativa al precedente con hardware molto economico e software relativamente semplice per gestire tensione, corrente, potenza, o funzioni complesse.

# Esempio di Schema

## Alimentatore Tensione costante 0-500V



# Camere Umide



**Uniformità del campo elettrico**

Tipo elettrodi; numero elettrodi (2, 3 o più)

Setto divisorio emivasche.

**Capacità di mantenere l'umidità del supporto**

Coperchio; livello del tampone; forma

**Volume di tampone**

Deve garantire che il tampone mantenga il potere tampone durante la migrazione

**Ponti**



Utilizzati soprattutto con acetato di cellulosa non supportato, concorrono a determinare la lunghezza e il tempo di migrazione.

**Sistema di sicurezza**

Deve impedire il passaggio di corrente a coperchio sollevato.

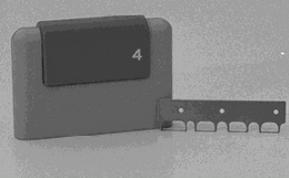


# Camere Umide

- Elettrodi in platino
  - Elettrodi in acciaio inox
  - Elettrodi in carbonio
  - Emivasche suddivise da un setto
  - Spugne imbevute
  - Gel a contatto diretto
- Ottimo conduttore, ma troppo sottile a causa del costo elevato; può provocare problemi se non percorre tutta la lunghezza della camera. Si consuma all'anodo (per migrazione)
  - Buona alternativa al platino permette a costi bassi, una maggior superficie di scambio, specie se usato in nastro o barra.
  - Molto usati per migrazioni su agarosio o acetato supportato, è forse il miglior metodo per migrazioni a potenze elevate. Unici difetti: possono rompersi e nel tempo si consuma.
  - Indispensabili per garantire un campo elettrico uniforme nelle camere di dimensioni ridotte
  - Possono sostituire la camera di migrazione vera e propria e permettono migrazioni limitate dal volume di tampone contenuto.
  - Metodo del tutto analogo alle spugne ma assolutamente non riutilizzabili.

**Camere con sistemi di sicurezza ad interruttori magnetici (sopra) e a sicurezza intrinseca (la tensione è sul coperchio)**





# Depositori/Applicatori/Basi



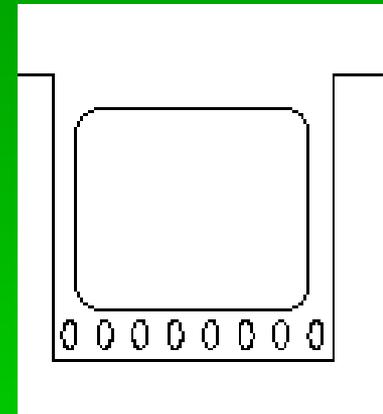
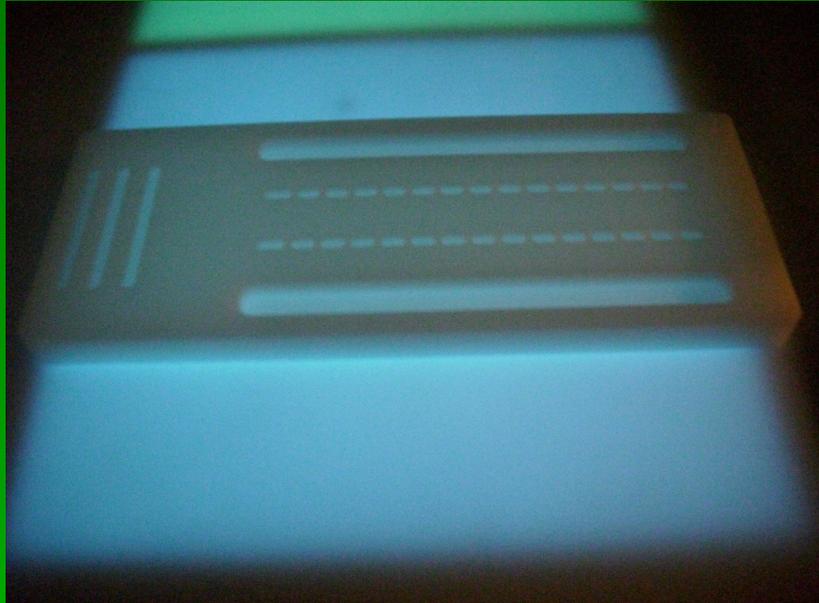
<b>Metodo a doppio filo</b>	Acetato
<b>Metodo a metallo poroso</b>	Acetato
<b>Metodo a tre lamine</b>	Acetato / Agarosio
<b>Metodo a pozzetto</b>	Agar Agarosio Poliacrilammide
<b>Metodo a maschera di applicazione</b>	Agarosio
<b>Utilizzo di materiali non metallici, monouso</b>	Agarosio
<b>Metodo a lamina singola microforata</b>	Agarosio

# Basi per applicatori

Deposizione su rilievo	Acetato	
Deposizione su solco	Acetato Agarosio	
Deposizione diretta su applicatore	Agarosio	



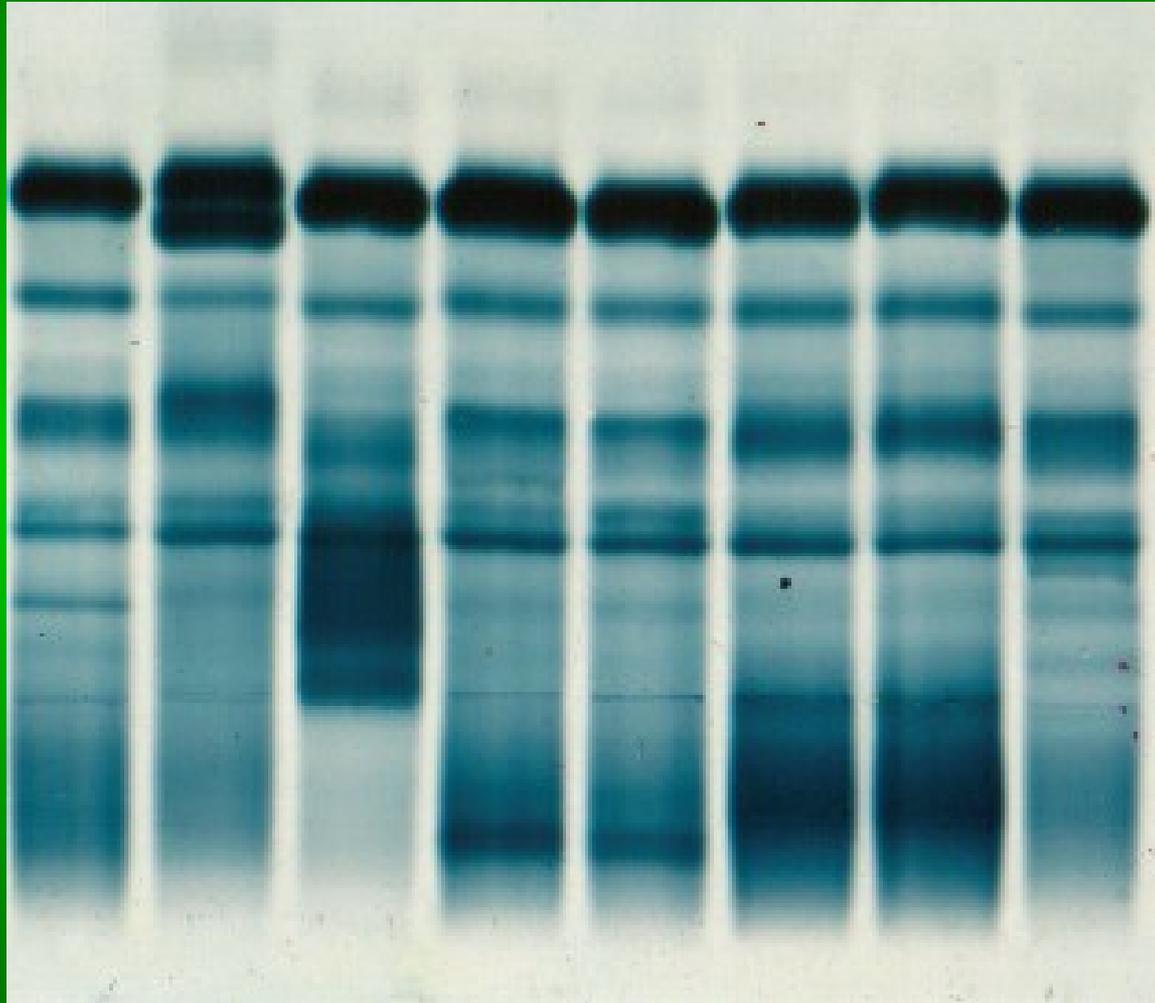
# Applicatori per Agarosio



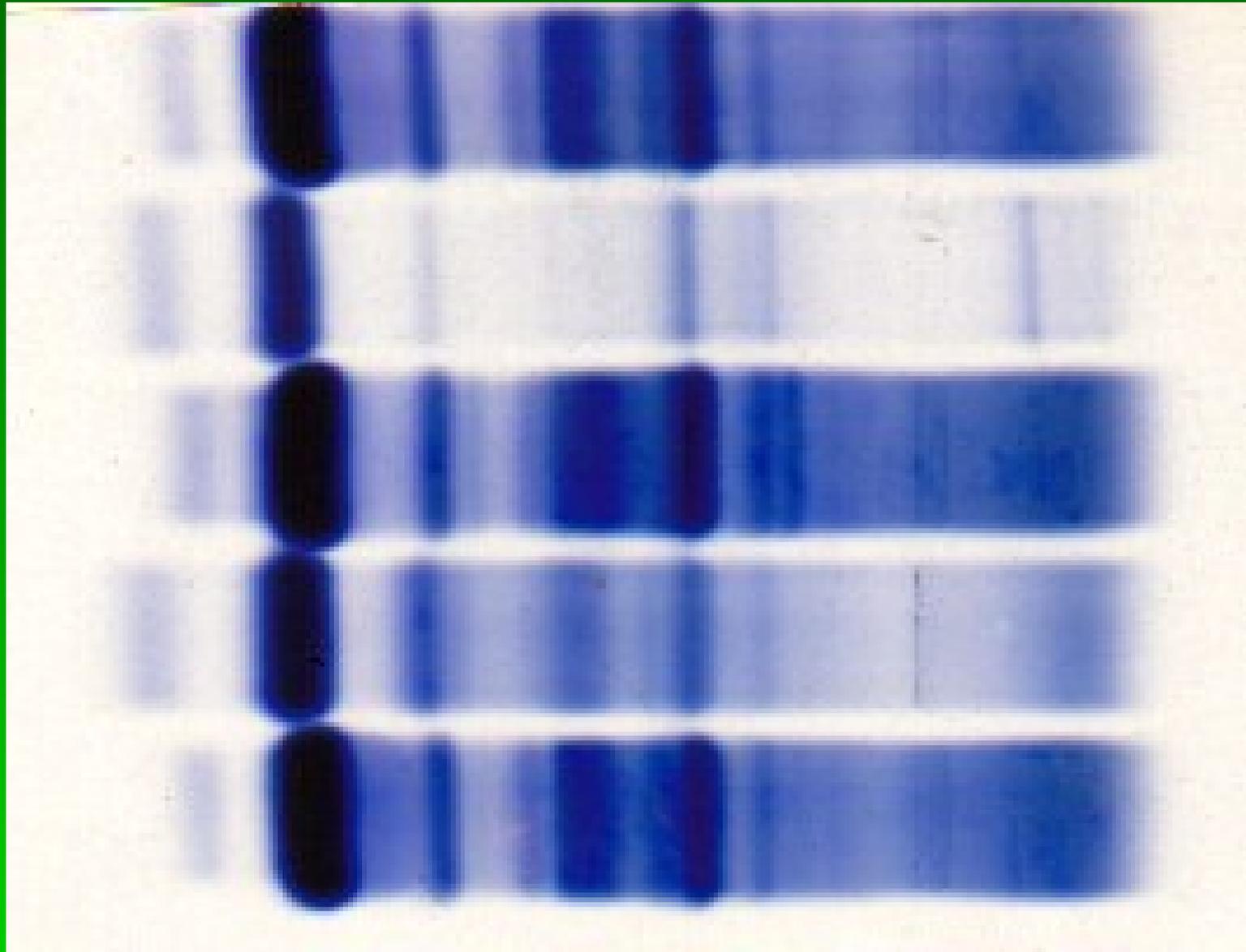
# Proteine del siero

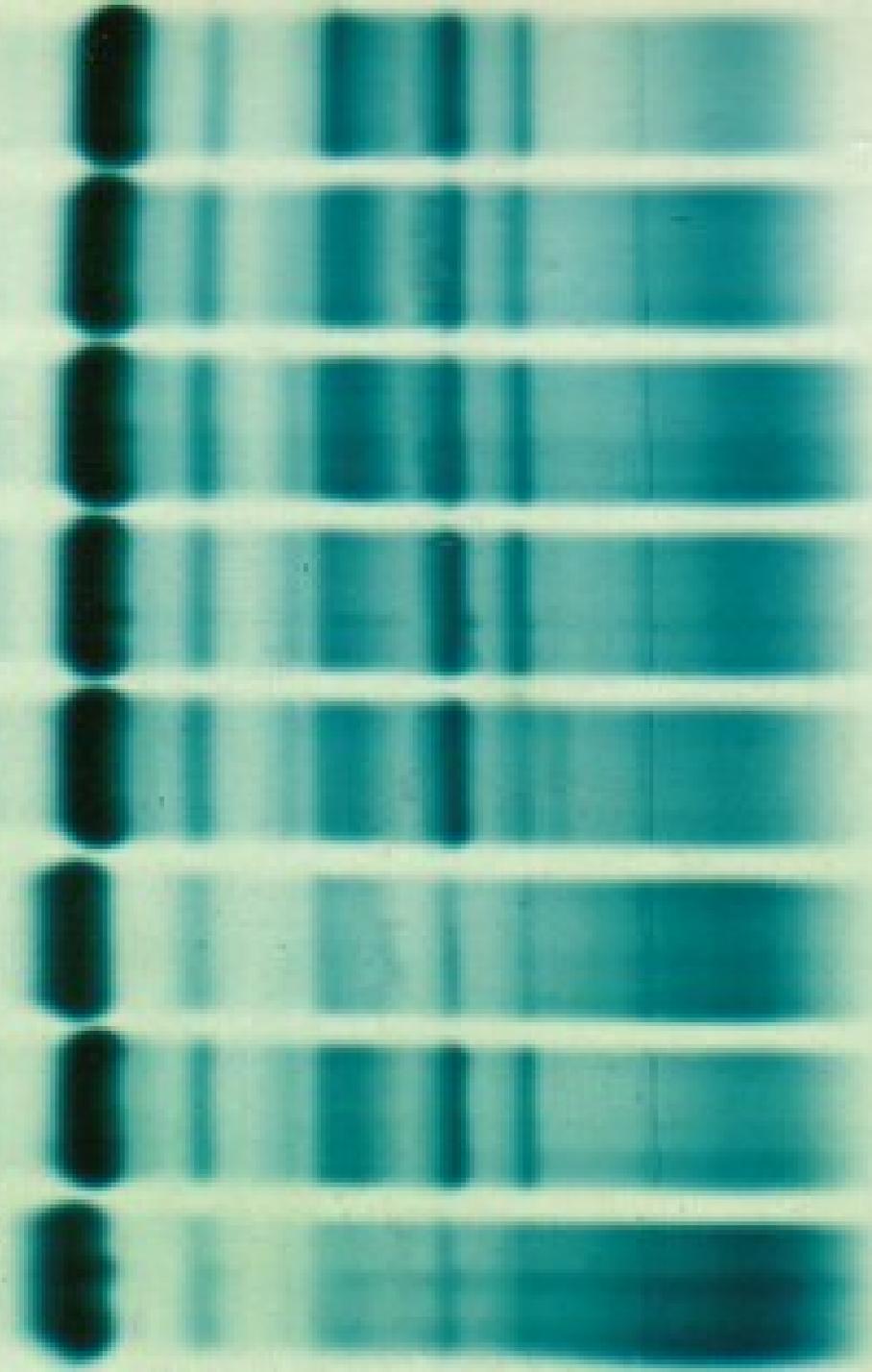


# Proteine del siero



# Proteine del siero e del liquor



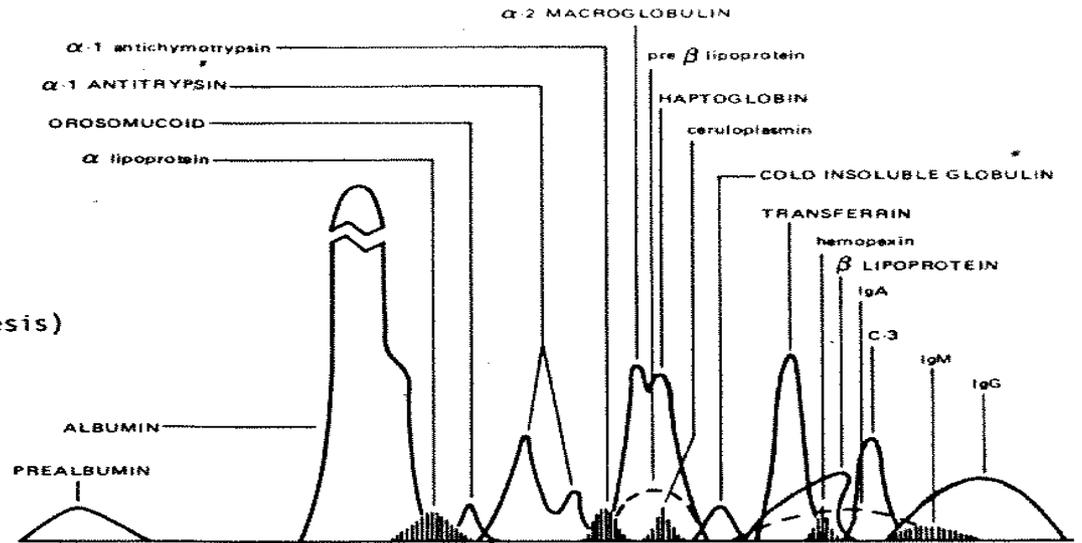


# Massima risoluzione su acetato e agarosio

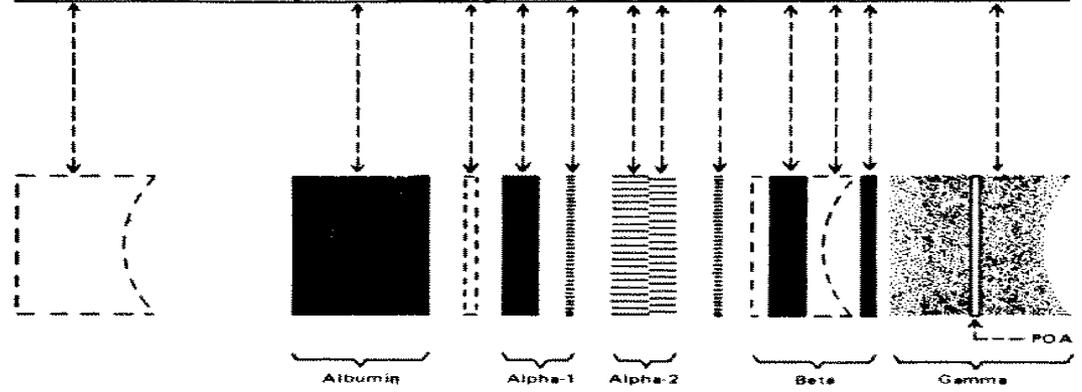
Fig. 2 High resolution electrophoresis of serum on cellulose acetate.

a) The electrophoretic composition.

(determined by immunofixation and immunosubtraction electrophoresis)



b) The normal or frequently observed pattern.



# Elettroforesi su Acetato di Cellulosa

- Campione Utilizzato: Siero fresco (per la tecnica a 6 bande se entro tre ore dal prelievo)
- Metodica delle Sieroproteine PhoreGel – Reagenti:

<i>REAGENTI</i>	<i>CODICE</i>	<i>PREPARAZIONE</i>
<i>1)-Acetato di cellulosa cm 5,7x14</i>	<i>AM0100 /AMP100</i>	<i>Idratare in tampone per 10'</i>
<i>2)-Tampone (5 bande/6 bande)</i>	<i>LTC025/LTCB25*</i>	<i>Portare al vol. di 1000 ml con H<sub>2</sub>O deionizzata (solo per i tamponi concentrati)</i>
<i>3)-Colorante Rosso Ponceau S</i>	<i>LTC0L10/LC0R05</i>	<i>Pronto all'uso in tutte le confezioni</i>
<i>4)-Soluzione decolorante</i>	<i>LD0010/LD0002</i>	<i>Pronto all'uso / opp.conc.20x</i>
<i>5)-Soluzione diafanizzante</i>	<i>LD00D1</i>	<i>Pronto all'uso</i>

# Elettroforesi su Acetato di Cellulosa

- Metodica delle Sieroproteine PhoreGel –

<b>MATERIALI E STRUMENTI</b>	<b>CODICE</b>
1)-Camera umida per elettroforesi	M010C2
2)-Applicatore semimicro per 8 campioni	M010D8
3)-Applicatore semimicro per 4 campioni	M010D4
4)-Alimentatore per elettroforesi	MSTC30
5)-Vetrini per densitometria	M010V1
6)-Cartoncini assorbenti	M010C1
7)-Sistema di lettura tramite scanner PhoreFix	SFT002
8)-Ponte per camera umida	M010P1

# Elettroforesi su Acetato di Cellulosa

- Metodica delle Sieroproteine PhoreGel –

<i><b>FASI DI LAVORO</b></i>	<i><b>SEMIMICRO/ MICRO</b></i>
<i>Volume di campione nel pozzetto</i>	<i>10-20 <math>\mu</math>l semimicro/5-10 <math>\mu</math>l micro (secondo il tipo di applicatore le quantità possono variare)</i>
<i>Asciugatura striscia</i>	<i>tra 2 cartoncini assorbenti</i>
<i>Volume di tampone in camera</i>	<i>200 ml (con camera PhoreGel 2 ponti; 400 ml con camere a 4 ponti)</i>
<i>Prelevamento campioni</i>	<i>5"</i>
<i>Applicazione campio</i>	<b>è importante che il contatto tra depositore e striscia duri almeno 20 secondi</b>
<i>N° applicazioni</i>	<i>1</i>
<i>Tensione</i>	<i>220 V</i>
<i>Tempo migrazione</i>	<i>25' semimicro/20-22' micro</i>
<i>Tempo colorazione</i>	<i>5-10'</i>
<i>Tempo decolorazione</i>	<i>a vista (2-3 lavaggi, in totale circa 5')</i>
<i>Tempo diafanizzazione</i>	<i>4-5'</i>
<i>Tempo essiccamento a 90°</i>	<i>10' (o fino a completa trasparentizzazione)</i>
<i>Lettura densitometrica con Scanner</i>	<i>525 nm</i>

# Elettroforesi su Acetato di Cellulosa

- Metodica delle Sieroproteine PhoreGel –

## ***ITER OPERATIVO E FASI DI LAVORO***

- 1) Versare circa 200ml di tampone in camera di migrazione (la quantità può variare secondo il modello di camera utilizzato), avendo cura di pareggiare il livello delle due emivasche inclinando per qualche istante la camera fino a pareggiare i livelli di liquido.
- 2) Prelevare dal pacchetto una membrana in acetato di cellulosa, identificare la superficie più opaca orientandola verso l'alto (in genere così come si presentano nella confezione), e disporla con decisione sulla superficie del tampone, in un'apposita vaschetta, o in alternativa, in una delle due emivasche della camera di migrazione. È necessario prestare attenzione ad evitare difetti nella imbibizione, assicurandosi che non ci siano porzioni più bianche del resto della membrana: per evitare questo rischio e facilitare la completa e omogenea imbibizione, può essere utile aggiungere al tampone 2 ml di alcool (anche denaturato). Una trascurabile percentuale di alcool etilico modifica, infatti, la tensione superficiale del tampone, facilitando l'uniformità dell'imbibizione, senza interferire con il procedimento analitico.
- 3) Lasciare che la membrana galleggi per almeno 30'' e solo successivamente affondarla agitando lievemente la vasca. Lasciarla nel tampone almeno 5'
- 4) Nel frattempo preparare la basetta con i sieri: dispensare 10ul con l'applicatore micro (8 campioni max) o 20 ul con il semimicro (4 campioni max). Il campione n.1 è più largo, per consentirne il riconoscimento indipendentemente dal posizionamento della striscia nei successivi passaggi.
- 5) Dispensare 2 ml di H<sub>2</sub>O distillata nel solco della basetta destinato al lavaggio del depositore.
- 6) Prelevare la striscia in acetato di cellulosa dal tampone, disporla tra 2 cartoncini assorbenti contenuti nel kit o acquistati separatamente (Cat.M010C1 – cartoncini assorbenti cm 7x 14), ed asciugarla delicatamente, in modo che rimanga umida, ma non ci sia un eccesso di liquido.
- 7) Posizionare velocemente la striscia sul ponte - evitando che passi troppo tempo e si asciughi completamente formando delle macchie, e tenderla delicatamente, dopo aver inumidito di tampone i solchi presenti sulla base del ponte in modo da permettere alle pendici della striscia di aderire per capillarità.
- 8) Posizionare l'applicatore sulla basetta contenente i sieri, ed agire sul setto centrale mobile per prelevare i campioni.
- 9) Posizionare l'applicatore sul ponte e tenere premuto il setto centrale in modo da assicurare il contatto tra le lamine contenenti il siero, e la superficie della membrana. Mantenere tale contatto per circa 20''
- 10) Inserire il ponte all'interno della camera di migrazione rispettando la polarità.

# Elettroforesi su Acetato di Cellulosa

## • Metodica delle Sieroproteine PhoreGel –

- 11) Collegare i cavetti della camera di migrazione all'alimentatore, rispettando la polarità.
- 12) Accendere l'alimentatore, impostare il voltaggio (220V) ed il tempo (20-22' per la tecnica micro e 25' per la semimicro), e premere start.
- 13) Chiudere il coperchio della camera ed assicurarsi che passi la corrente, tenendo premuto l'apposito pulsante sull'alimentatore. In caso contrario verificare il posizionamento del coperchio, che se non è inserito bene non permette il passaggio di corrente, a causa del sistema di sicurezza che ne impedisce il passaggio in caso di chiusura inadeguata.
- 14) Inserire il depositore nell'alloggiamento di lavaggio e premere più volte; asciugare su carta bibula.
- 15) Preparare una vaschetta con una congrua quantità di colorante Rosso Ponceau S. La vaschetta deve essere in vetro o in materiale plastico resistente agli acidi.
- 16) Al termine della migrazione prelevare il ponte dalla camera di migrazione, avendo cura di evitare che qualche goccia di tampone possa raggiungere la zona di migrazione. È meglio asciugare delicatamente la parte di ponte rimasta immersa nel tampone. Estrarre la striscia ed adagiarla delicatamente sulla superficie del colorante Rosso Ponceau S. In questa fase, per i primi istanti, si potrà osservare il "negativo" della separazione proteica. Dopo circa 30" immergere completamente e lasciare senza agitare per circa 5'.
- 17) Prelevare la membrana, con l'aiuto di una pinzetta in acciaio, e spostarla nella vasca di decolorazione. La vasca di decolorazione può essere di vetro o di altro materiale plastico.
- 18) Agitare fino a decolorazione (qualche minuto, a vista), sostituire 2 volte il decolorante, sempre agitando di tanto in tanto, anche manualmente.
- 19) Assicurarsi che ci sia una fonte di calore (preferibilmente una stufa a temperatura controllata) pronta a 80-90 °C.
- 20) Togliere la striscia dal decolorante, ed immergerla nel diafanizzante per circa 4-5'.
- 21) Stendere la striscia su un vetrino, tagliare le code eccedenti con l'aiuto dello spigolo di un altro vetrino, e sempre con l'aiuto di un secondo vetrino eliminare l'eccesso di diafanizzante.
- 22) Inserire la striscia nella stufa e lasciarla in posizione verticale o obliqua fino a completa trasparentizzazione.
- 23) Verificare che la striscia non sia "appiccicosa", e solo quando completamente asciutta inserirla nello scanner.
- 24) Verificare che lo scanner sia orientato con l'apertura verso l'operatore: il posizionamento del vetrino contenente la membrana trasparentizzata, nello scanner, deve essere fatto in modo che il primo campione si trovi versoso l'apertura, e l'albumina (la banda più densa) si trovi a sinistra.
- 25) Entrare nel programma "Elettroforesi" ed effettuare la lettura come descritto nel manuale.

# Elettroforesi su Acetato di Cellulosa

- Metodica delle Sieroproteine PhoreGel –

## **POSSIBILI INCONVENIENTI E PROBABILI CAUSE RIFERITE ALLE FASI DI LAVORO**

- 1) *una quantità eccessiva di liquido quando anche non arrivi a causare un corto circuito nella camera può provocare un'eccessivo passaggio di corrente con sviluppo di calore che può deformare il fronte della migrazione, o spostarlo tutto in avanti; una quantità troppo scarsa, può provocare una scarsa separazione della zona veloce (Albumina / Alfa1).*
- 2) *Un'imbibizione irregolare è fonte di distorsioni; depositare sulla zona più lucida rende difficile l'assorbimento del siero.*
- 3) *Affondare subito la membrana comporta un aumento dei tempi necessari alla perfetta equilibratura in tampone; questo inconveniente si può manifestare attraverso un rigonfiamento della migrazione.*
- 4) *Una quantità eccessiva di siero può provocare una deposizione irregolare con un accumulo di siero al centro o sui bordi ed una colorazione esagerata; una quantità insufficiente non permette la completa deposizione del siero.*
- 5) *Se manca l'acqua distillata il depositore non viene lavato e si può incrostare di siero.*
- 6) *Il grado di asciugatura della striscia incide sulla qualità della deposizione del siero: se troppo umida produce una migrazione pallida con una goccia al centro della migrazione (il siero viene "diluìto" dal tampone); se troppo asciutta la striscia presenta delle macchie, diventa troppo "avida" di siero e la migrazione sarà irregolare.*
- 7) *Se la striscia non aderisce bene alle pareti del ponte, o si stacca, può fare corto circuito con il setto centrale della camera, e la migrazione sarà di pessima qualità.*
- 8) *Se il depositore non combacia con la basetta, la deposizione non avviene.*
- 9) *Se il contatto è irregolare la deposizione lo sarà di conseguenza; se troppo breve, il siero non verrà assorbito, e, potrà essere "richiamato" nelle lamine dell'applicatore, ricadendo poi in forma di "goccia" irregolare.*
- 10) *Se la polarità viene invertita si otterrà una migrazione irregolare, con un forte rigonfiamento dell'Albumina, dovuto ad un'esagerata elettroendoosmosi; può essere utile, invece invertire appositamente la polarità, di tanto in tanto – per aumentare la durata degli elettrodi – ma in tal caso si dovrà invertire anche il posizionamento del ponte.*



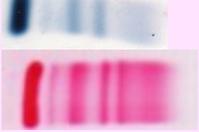
# Elettroforesi su Acetato di Cellulosa

- Metodica delle Sieroproteine PhoreGel –

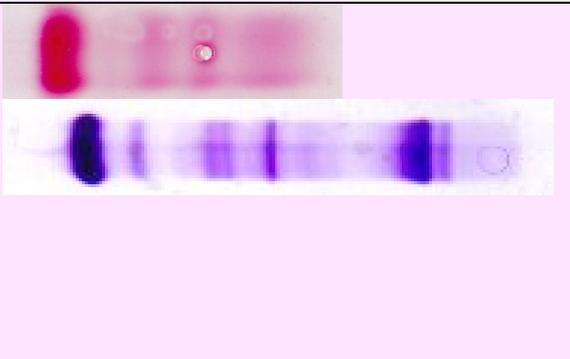
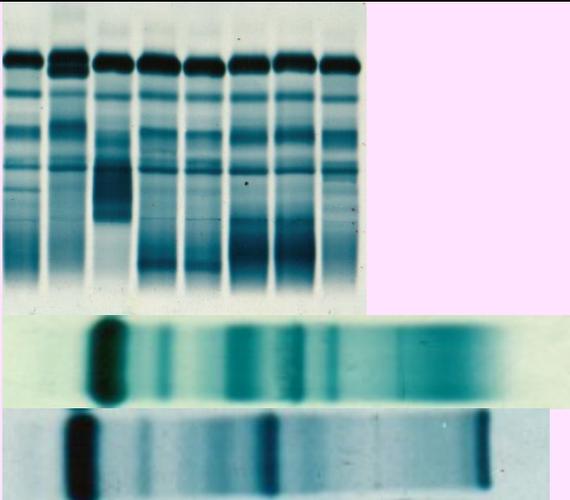
*Possibili inconvenienti e probabili cause riferite alle fasi di lavoro*

- 11) Il sistema di sicurezza – obbligatorio per il rispetto delle norme anti infortunistiche - è basato sulla cosiddetta “sicurezza intrinseca” oppure sull’uso di magneti ed interruttori di prossimità; tuttavia c’è un po’ di tolleranza sul posizionamento del coperchio, per consentire il passaggio di un minimo d’aria, data la formazione di vapore, e minime quantità di ossigeno ed idrogeno per elettrolisi, pertanto è possibile che in qualche caso il coperchio non chiuda perfettamente, impedendo il passaggio di corrente; verificare sempre – nei primi istanti della migrazione - che la corrente passi, ed in caso contrario riposizionare il coperchio.
- 12) Non dimenticare di lavare l’applicatore: non metterlo mai sotto l’acqua corrente, ed in caso di dimenticanza provvedere ad un lavaggio extra con ipoclorito di sodio, utilizzando sempre il solco presente sulla base portasieri. La base portasieri può essere invece lavata sotto acqua corrente, eventualmente con amuchina o ipoclorito, e poi sempre con acqua distillata.
- 13) Vasche di plastica non adatte possono essere intaccate dall’acido contenuto nel Rosso Ponceau S che potrebbe perdere così la capacità di fissare le proteine provocando perdite proteiche irregolari e macroscopiche soprattutto a carico di frazioni deboli come l’Alfa1.
- 14) Se la striscia viene subito immersa nel colorante – e non lasciata almeno 30” sulla superficie dello stesso - va mantenuta in colorazione per un tempo maggiore (10-15’).
- 15) Non toccare il colorante con le mani!
- 16) Mentre nel colorante non si deve mai agitare la striscia, per evitare di interferire con la fase di fissaggio, in decolorazione una buona agitazione può abbreviarne la durata.
- 17) Una temperatura troppo scarsa può favorire la formazione di aloni; una troppo alta la formazione di bolle, o addirittura un viraggio di colore.
- 18) Non superare i tempi di diafanizzazione indicati, per evitare diffusioni anomale di colore che possono interferire con i risultati.
- 19) Non eliminare l’eccesso equivale a prolungare il tempo di diafanizzazione con tutte le conseguenze già esaminate.
- 20) Le stufe a circolazione d’aria forzata sono le migliori; altrimenti inclinare il vetrino su una delle pareti.
- 21) Toccando un angolo di striscia non deve rimanere impronta!
- 22) Eseguire la lettura densitometrica per la quale si rimanda al manuale del programma PhoreFix.

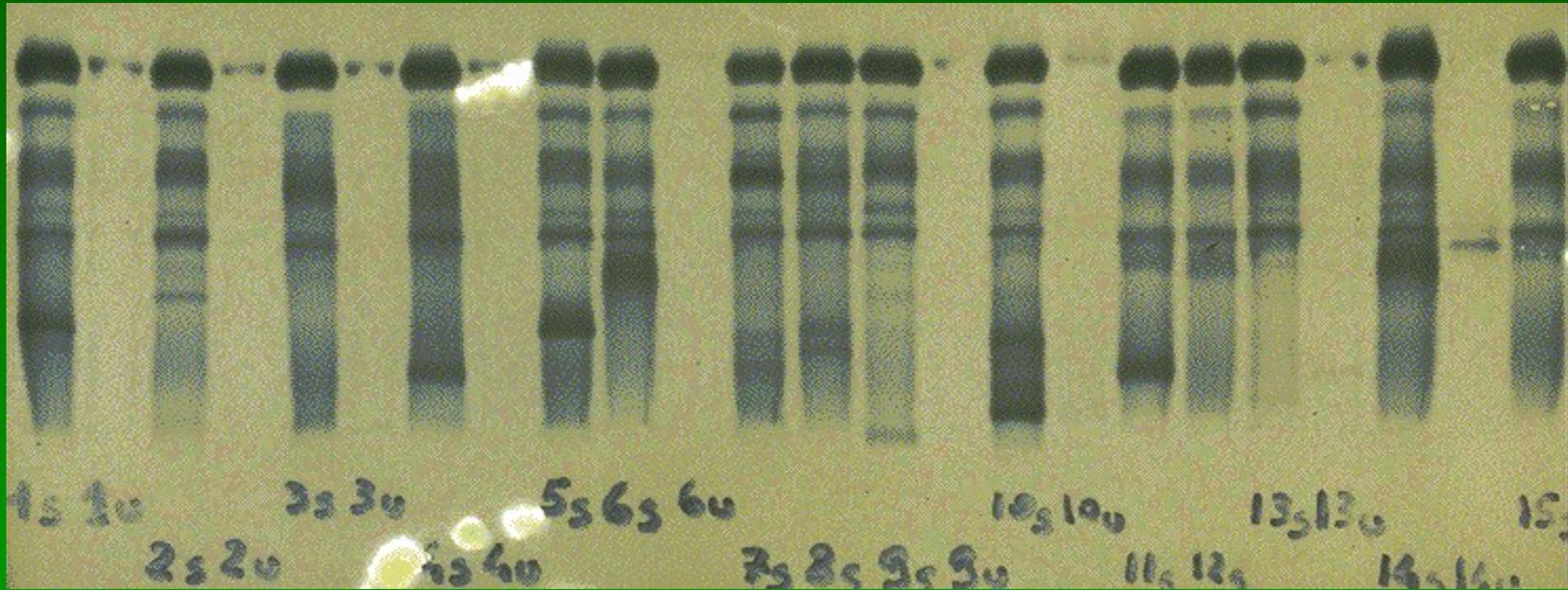
# Problematiche Ricorrenti

problematiche ricorrenti	Probabili Cause	Aspetto
1) <b>Deposito irregolare:</b>	a) depositore sporco: provvedere alla pulizia straordinaria b) scarsa quantità di campione nei pozzetti c) siero evaporato.	
2) <b>Accumulo di siero al centro dell'applicazione con migrazione più chiara:</b>	a) troppo siero nei pozzetti; b) troppa acqua in base di lavaggio applicatore (applicatore troppo umido); c) acetato (o agarosio) troppo umido, incapace di assorbire il campione correttamente; d) pescanti (se previsti) troppo umidi e) tempo di applicazione campioni troppo breve; f) viscosità del siero eccessiva (per campioni mielomatosi ripetere eventualmente diluendo il siero con soluzione	
3) <b>Scarsa separazione Albumina/Alfa1:</b>	a) il tempo di migrazione impostato è troppo breve (controllare metodica) b) l'assorbimento di corrente (o il voltaggio) è troppo basso; c) il tampone è esaurito; d) il tampone di imbibizione è inquinato o esaurito.	
4) <b>Distorsioni o banda dell'Albumina troppo stretta (in maniera molto evidente):</b>	a) pescanti (se presenti) troppo asciutti, montati male o utilizzati troppo; b) supporto troppo asciutto controllare l'asciugatura iniziale; c) il contatto elettrico è irregolare; controllare ed eventualmente aver maggiore cura della pulizia della camera di migrazione e del posizionamento dei supporti; d) la forza ionica del tampone è troppo elevata (si presume per concentrazione); e) la migrazione è avvenuta con una potenza troppo elevata;	
5) <b>Scarsa colorazione o scarsa definizione delle frazioni proteiche:</b>	a) il colorante è esaurito: il potere fissante dell'agente precipitante (TCA, solfosalicil. o altro) è compromesso; b) il diafanizzante (ove ne sia previsto) l'uso si è troppo concentrato; c) il decolorante ha un pH troppo elevato, e parte del materiale proteico fissato si ridiscioglie parzialmente	
6) <b>Presenza di una riga rossa sulle Gamma (nei sistemi a trattamento verticale del supporto):</b>	a) il tampone d'imbibizione è scarso o inquinato; b) il livello del diafanizzante (se previsto) è troppo basso o concentrato per evaporazione; c) il livello del colorante è troppo basso;	

# Problematiche Ricorrenti

<p><b>6) Presenza di una riga rossa sulle Gamma (nei sistemi a trattamento verticale del supporto):</b></p>	<p>a) il tampone d'imbibizione è scarso o inquinato;  b) il livello del diafanizzante (se previsto) è troppo basso o concentrato per evaporazione;  c) il livello del colorante è troppo basso;</p>	
<p><b>7) Presenza di bolle sui supporti, o scarsa decolorazione:</b></p>	<p>a) Il supporto è stato immerso nel tampone di imbibizione troppo rapidamente: l'aggiunta di alcol etilico al tampone, nella misura dell'1% ne aumenta la tolleranza a questo inconveniente;  b) aloni chiari possono indicare la caduta di gocce di condensa in zona migrazione: migrazione a potenza troppo elevata per il livello di tampone usato /va diminuito);  c) nei supporti diafanizzati può indicare una temperatura troppo elevata in stufa, o un tempo eccessivo di permanenza nel diafanizzante.</p>	
<p><b>8) Scarsa separazione della zona Bera1-Beta2</b></p>	<p>a) siero conservato troppo a lungo (parziale attivazione in vitro del C3);  b) assenza di ioni calcio nel tampone (un chelante del calcio come l'EDTA impedisce la separazione transferrina-C3, mentre l'aggiunta di lattato di calcio la favorisce);</p>	
<p><b>9) eccessiva retromigrazione della zona Gamma (se non desiderata)</b></p>	<p>a) forza ionica del tampone troppo bassa;  b) campo elettrico insufficiente;  c) deposizione troppo anodica;  In alcuni casi la retromigrazione della zona gamma viene espressamente ricercata, p.es. agarosio ad alta o media endoosmosi, al fine di escludere la coincidenza del puntino di applicazione con piccole bande catodiche.</p>	

# Massima Risoluzione su Acetato di Cellulosa



# Emoglobine su Acetato di Cellulosa

## Tecnica manuale:

### INTRODUZIONE

L'interpretazione molecolare delle sieroproteine frazionate costituisce, oggi, il metodo più efficace per la valutazione qualitativa delle singole individualità proteiche presenti nel tracciato elettroforetico; la valutazione quantitativa delle singole proteine viene invece largamente eseguita con metodiche in turbidimetria, nefelometria, RID, dove la reazione positiva tra proteina ed antisiero monospecifico garantisce la più accurata quantificazione della proteina stessa.

In molti casi, tuttavia, la particolare natura di alcune proteine e/o la presenza di componenti proteiche abnormi non consentono ai soli metodi immunologici di dare una risposta quantitativa affidabile; quando infatti le proteine, a parità di specificità antigeniche, differiscono tra loro per caratteristiche chimico-fisiche è necessario, per la loro quantificazione, ricorrere nuovamente alla tecnica elettroforetica in modo che le frazioni fisicamente separate ed opportunamente evidenziate possano finalmente essere quantificate densitometricamente. In pratica, le cosiddette componenti monoclonali (cioè prodotte da un singolo clone di cellule devianti) proprio per la loro natura anomala non possono essere quantificate con precisione da metodi immunologici, ed in quel caso l'elettroforesi diventa il metodo “meno impreciso” per una misurazione efficace.

Peraltro, per i complessi fenomeni chimico-fisici che regolano la separazione in campo elettrico delle proteine, i risultati analitici risentono spesso di una variabilità eccessiva specie tra laboratori, che induce a standardizzarne strettamente le condizioni operative per migliorarne l'affidabilità.

Con quest'obiettivo, PhoreGel propone, dopo un accurato studio metodologico, le condizioni operative ottimali con l'uso dei suoi reagenti e strumentazioni per consentire una più corretta quantificazione delle separazioni elettroforetiche con l'utilizzo di 2 diversi tamponi per ottenere separazioni in 5 o 6 bande.

# Emoglobine su Acetato di Cellulosa

## Tecnica manuale:

### Fasi di Lavoro

- 1) Preparazione del Campione (Emolisato)
- 2) Idratazione in tampone della striscia (Membrana)
- 3) Eliminazione dell'eccesso di Tampone
- 4) Inserimento della membrana sul ponte e Camera Umida
- 5) Applicazione dei Campioni
- 6) Migrazione
- 7) Fissazione/Colorazione
- 8) Decolorazione
- 9) Diafanizzazione (Trasparentizzazione) – solo se prevista
- 10) Lettura e refertazione

# Fase 1

## Preparazione del Campione (Emolisato)

- **Tipo di campione:**
- Emolisato ricavato da sangue raccolto in EDTA ed esaminato entro le 24 ore dal prelievo.
  
- **Preparazione emolisato:**
- aggiungere ad una parte (200  $\mu$ l) di pappa di eritrociti (centrifugati e lavati 3 volte), tre parti (600  $\mu$ l) di reagente emolizzante.
- Agitare la provetta per alcuni secondi su Vortex per la completa emolisi delle emazie.
- Per ottenere una miglior standardizzazione del metodo, si consiglia di misurare al contaglobuli la concentrazione dell'emoglobina sull'emolisato così ottenuto, e diluire con acqua distillata, calcolando la diluizione in modo tale da ottenere una concentrazione emoglobinica finale di circa 4 g/dl  
**(4g/dl : conc.emol.= vol.iniziale : vol.finale).**

# Fase 1: Esempio di Preparazione dell'Emolisato)

- Si centrifuga per 10' un campione con concentrazione di Emoglobina di 15 g/100 ml
- Al termine si elimina la parte surnatante di plasma lasciando solo la “pappa” di Emazie “impaccate” sul fondo della provetta.
- Si riempie con soluzione fisiologica, la provetta da centrifuga contenente le emazie e si centrifuga nuovamente. Al termine si elimina la parte chiara surnatante.
- Ripetere 3 volte il procedimento appena descritto “lavando” in questo modo le emazie, in modo che vengano eliminate le tracce di proteine del plasma che potrebbero interferire con il procedimento elettroforetico.
- Al termine si ottiene una cosiddetta “pappa” di Emazie purificata da ogni traccia di proteine del plasma.
- A questo punto si prendono – ad esempio – 100 ul di emazie ed in un'altra provetta vi si aggiungono 300 ul di reagente emolizzante (o quantità diverse, ma rispettando le proporzioni)
- Si agita su Vortex (agitatore ellittico) per 30” o fino a viraggio di colore.
- Si misura al contaglobuli il valore dell'Emoglobina (HB)
- Considerando che il campione aveva 15 g/dl di HB si può ipotizzare che il valore della pappa di Emazie concentrata sia dell'ordine di grandezza del doppio, quindi circa 30 g/dl;
- ...che diluito 1:4 (una parte + 3 parti di Reagente Emolizzante) diventano 7,5 g/dl. In realtà sarà certamente un po' di meno, in quanto le Emazie non saranno mai perfettamente impaccate, perciò va misurata al contaglobuli.
- A questo punto supponiamo di rilevare al contaglobuli il valore di 6.8 g/dl, dovremo applicare la formuletta:  
**4g/dl : conc.emol.= vol.iniziale : vol.finale** e quindi , prelevando ad esempio 100 ul di soluzione così emolizzata, otterremo che

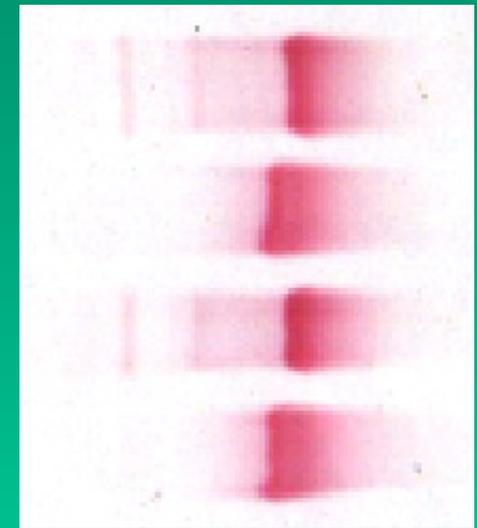
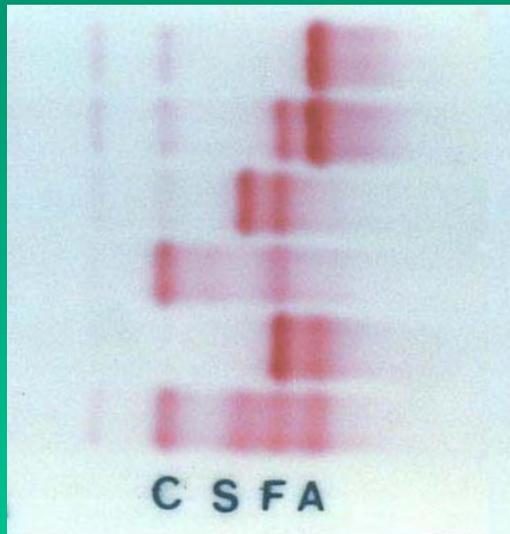
$$4.0 : 6.8 = 100 : \text{Vol.Finale}$$

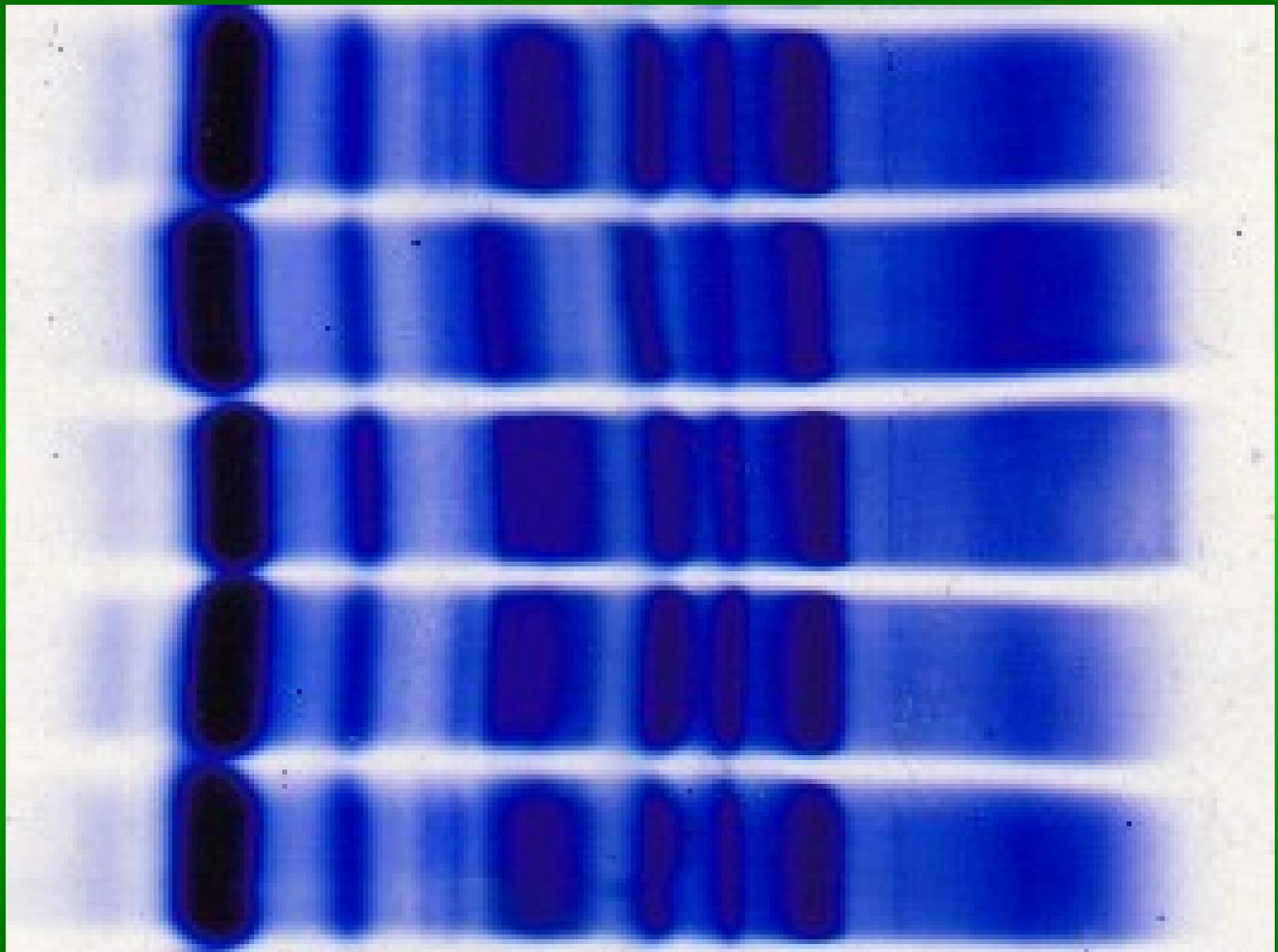
$$\text{Vol.Finale} = 100 * 6.8 / 4.0 = 170$$

Quindi, dovremo aggiungere ai nostri 100ul, acqua distillata per 70ul in modo da ottenere il volume finale di 170 ul

# Fase 1: Esempio di Migrazione dell'Emolisato)

- Nei campioni normali identifichiamo soltanto la banda A1 A2 e in qualche caso la F, mentre nei campioni che presentano anomalie sono state identificate circa 300 diverse varianti. In basso un controllo con Emoglobine C,S,F,A1.
- A sinistra una serie di campioni patologici, oltre al controllo, e a destra due campioni normali ripetuti in doppio.





# Elettroforesi su Agarosio

Caratteristiche generali e range operativi:

Dimensioni lastra:	101x101 o altro per esigenze strumentali
Asciugatura lastra carta assorbente:	Manuale
Tempo Applicazione dei campioni	10-30''
N° Applicazioni (2x8 campioni)	1-4
Migrazione:	5-20' a T costante (range 16-30°C)
Elettrodi	scelta tra 2 e 3 elettrodi
Volume di liquido scambiato:	0,9-2 ml (necessari 2,8 ml sulle spugne)
Alimentatore	V cost e con controllo via software
Volt	70-400V
mA	5-200mA
W	2-40W
WT	possibilità impostare Tempo x Potenza
Essiccazione/denaturazione	6-30' a T costante (60-70 °C)
Colorazione	2-10'
Decolorazione	1-10'
N. di Decolorazioni	1-5
Asciugatura dopo decolorazione	1-10' a T. costante (50-80°C) con ventola
Lettura (rosso)	610um

# Elettroforesi su Agarosio

## Sequenze di lavoro nell'elettroforesi su Gel di Agarosio:

- |                                |                                                    |
|--------------------------------|----------------------------------------------------|
| 1) Asciugatura lastra          | manuale                                            |
| 2) Applicazione campioni       | depositori molleggiati e microforati da 0,05-0,1mm |
| 3) Migrazione e Raffreddamento | 2 celle peltier                                    |
| 4) Migrazione                  | Opzioni: V.cost; mAcost.; Wcost.; WTcost.          |
| 5) Denaturazione               | sul piano di migrazione                            |
| 6) Colorazione                 | 1-10'                                              |
| 7) Decolorazione               | 1-10' per 3 cicli                                  |
| 8) Asciugatura                 | ad aria                                            |
| 9) Lettura                     | su 2 fronti a 610 nm                               |

# Elettroforesi su Gel di Agarosio

- Fase 1) – Asciugatura lastra

La lastra si estrae delicatamente dalla confezione, ed è bagnata di tampone;

va posta su una superficie asciutta (meglio su un foglio di carta tipo scottex o similare) e coperta con **precisione**, da un foglio di carta bibula (le dimensioni devono tipicamente essere per ogni lato di circa un mm più larghe della lastra, allo scopo di agevolarne l'estrazione), evitando di intrappolare bolle d'aria e senza pieghe, per evitare anomalie nell'asciugatura. **Si tratta di una fase critica.**

Dopo qualche secondo, estrarre il foglio di carta bibula facendo attenzione che il Gel non si stacchi dal foglio di Mylar per aderire alla carta stessa, danneggiando in questo modo, in maniera irreversibile l'esito dell'analisi. **Fare molta attenzione, si tratta di una fase critica.**

# Elettroforesi su Agarosio

## Fase 2) – Applicazione dei campioni

La lastra viene posta sul piano di migrazione intelaiata o no, a seconda del tipo di strumento utilizzato.

E' buona norma, prima di appoggiare la lastra sul piano di migrazione inumidire il piano stesso con qualche goccia di H<sub>2</sub>O distillata, per migliorare il contatto con la superficie e garantire lo scambio termico. Su alcune macchine questo passaggio non serve, perché dotate di una pompa pneumatica che tiene la lastra in contatto con il piano.

Il depositore contiene una unica lamina in acciaio, dotata di minuscoli microfori che hanno la funzione di trattenere il campione che dovrà essere rilasciato all'interno del Gel, a differenza di quanto avviene nell'acetato di cellulosa in cui, invece, il campione viene rilasciato sulla superficie del supporto.

A questo punto si può effettuare la deposizione dei campioni: indipendentemente dal fatto che si faccia manualmente o in un sistema automatico, occorre immergere per pochi secondi i “denti” del depositore nei pozzetti della base contenente i campioni da analizzare. Il quantitativo di campione nei pozzetti non deve essere eccessivo (non deve superare la linea contenente i microfori dell'applicatore), né troppo scarso (deve lasciar immergere i microfori) – tipicamente 25-30ul –

Adesso, con l'applicatore carico di campioni, si può effettuare la deposizione: la lamina deve entrare a coltello nel Gel, rilascia il campione e, dopo un contatto di 10-15” viene estratta per essere sottoposta a lavaggio.

Esistono, tuttavia, anche metodi alternativi, come ad esempio:

Il rilascio del campione sulla superficie del Gel, attraverso un materiale morbido monouso (acetato o nitrato di cellulosa);

La deposizione tramite una sottile lamina di materiale plastico forato;

L'applicazione diretta su pozzetti stampati sul gel al momento della solidificazione.

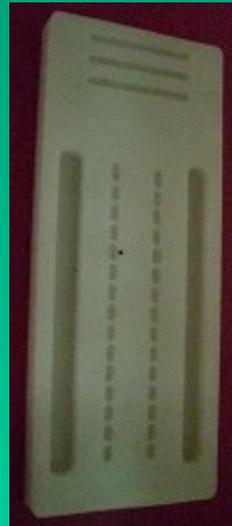
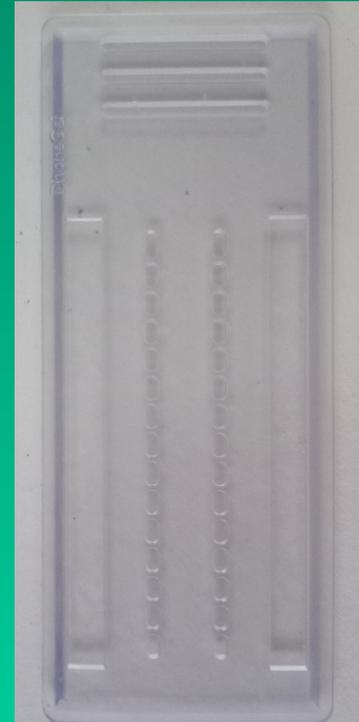
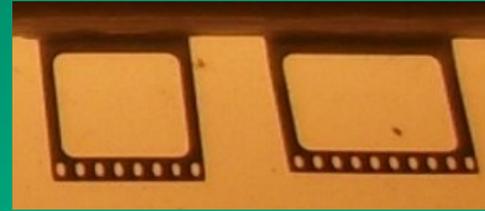
# Elettroforesi su Agarosio

## Fase 2) – Applicazione dei campioni

Gli applicatori, sono costituiti da un supporto in materiale plastico che può essere anche stampato in 3D e una o più lamine in acciaio microforato; le lamine vengono immerse nei pozzetti di una basetta portacampioni su cui l'operatore ha depositato 25-30  $\mu$ l di liquido biologico per ogni campione da analizzare.

I microfori catturano il liquido biologico per capillarità, e le lamine, così caricate dei relativi campioni, si lasciano poi entrare a coltello nel gel, per rilasciarli nelle posizioni previste.

Le lamine sono molto sottili (0,05-0,1 mm) e in questo modo consentono al gel di richiudere le fessure createsi con l'inserimento delle lamine, senza lasciare (o quasi) traccia.



# Elettroforesi su Gel di Agarosio

- Fase 3/4) – Migrazione e Raffreddamento

Il raffreddamento durante la migrazione si rende necessario per dissipare il calore prodotto da un passaggio di corrente dell'ordine di grandezza di 10 volte quello dell'acetato di cellulosa.

Per migliorare la qualità della migrazione e ottenere un livello di standardizzazione maggiore, è possibile utilizzare alimentatori oltre che a tensione costante, a corrente costante, a potenza costante, o in alternativa, considerando che la lunghezza base della migrazione è proporzionale al prodotto della potenza per il tempo, sarebbe auspicabile poter impostare il parametro  $W \cdot T$  in modo da poter garantire una lunghezza di migrazione fissa, non dipendente da fattori che incidono sulla conducibilità (p.es.: grado di asciugatura, spessore dello strato di Gel, imbibizione delle spugne per i contatti, ecc.) creando indeterminazioni nel risultato finale.

In questo modo si danno dei limiti a corrente e voltaggio, e si mantiene costante il prodotto della potenza per il tempo in modo da standardizzare la lunghezza di migrazione, ed ammortizzare, così variazioni di umidità o, in parte, di spessore della lastra, che potrebbero creare aberrazioni nella corrente o nel voltaggio.

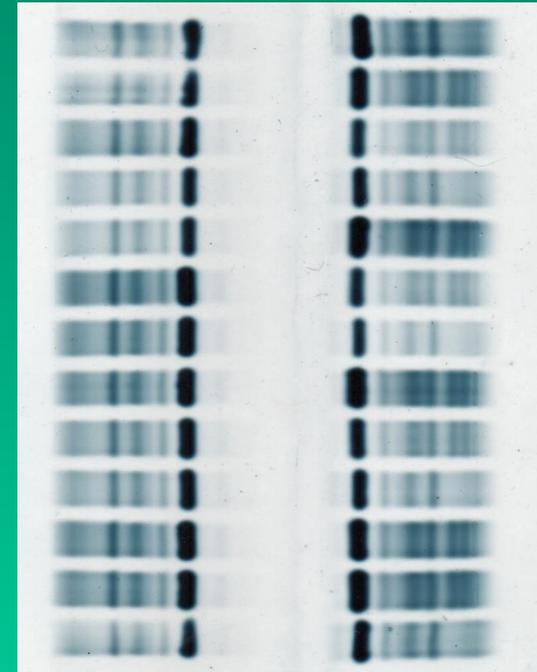
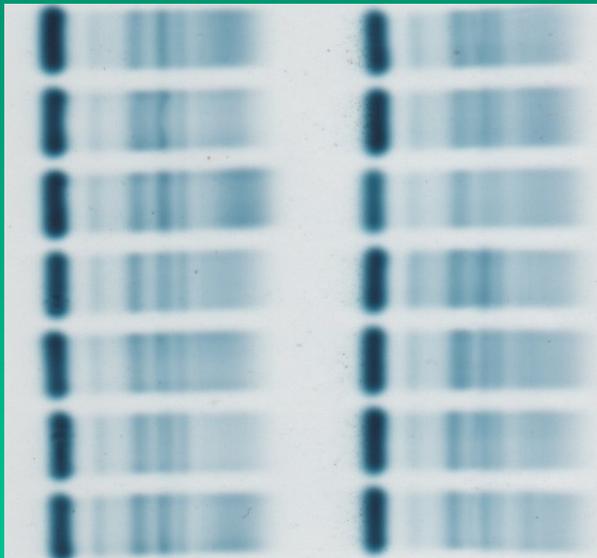
(p.es.: si imposta la potenza a  $20W \times 8'$ , ma si inserisce la condizione che se si superano i 100 mA o i 200V si abbassa il voltaggio e si modifica il tempo fino a raggiungere lo stesso valore di  $W \cdot T$ ; se invece i mA saranno inferiori ad 80 mA si aumenterà il voltaggio, sempre nei limiti del valore massimo previsto e si modificherà conseguentemente il Tempo).

Sarebbe utile, anche se attualmente non ci sono apparecchi che lo prevedano, porre dei limiti al voltaggio in funzione della temperatura effettivamente raggiunta durante la migrazione.

# Elettroforesi su Gel di Agarosio

- Fase 3/4) – Migrazione e Raffreddamento

Le doppie serie di migrazioni a 2 elettrodi avvengono nello stesso verso, mentre quelle con i sistemi a 3 elettrodi avvengono specularmente rispetto all'elettrodo centrale (in questo caso l'anodo).



# Elettroforesi su Gel di Agarosio

- Fase 3/4) – Migrazione e Raffreddamento

La camera di migrazione può contenere il tampone come nelle classiche camere per acetato, o può avere dei supporti in materiale spugnoso o cartaceo imbevuti di tampone che contengono il materiale necessario a garantire una migrazione; è possibile anche fare migrazioni con la lastra completamente immersa nel tampone. Gli elettrodi possono essere in platino, in lega, o in carbonio. Può essere previsto un sistema di raffreddamento a celle peltier o a circolazione di liquido. Se non c'è alcun sistema di raffreddamento è necessario limitare la potenza di lavoro, e quindi il voltaggio ed il passaggio di corrente. Di sotto alcuni esempi di camere di migrazione, con elettrodi in platino, in carbonio, con spugne imbevute di tampone e con gel immerso nel tampone e raffreddamento a liquido refrigerante.



# Elettroforesi su Gel di Agarosio

## Fase 5) – Denaturazione

La denaturazione delle proteine è indispensabile per bloccarle nella posizione raggiunta dopo la migrazione. Nell'acetato di cellulosa questo avviene chimicamente, attraverso l'azione dell'acido Tricloroacetico (TCA) o Solfosalicilico contenuti nella soluzione colorante (Rosso PonceauS), ma nel gel di Agarosio, per evitare danni che gli agenti precipitanti potrebbero causare alla struttura del Gel, si preferisce utilizzare l'azione del calore.

La lastra posta sul piano di migrazione intelaiata o no, a seconda del tipo di strumento utilizzato, viene sottoposta a riscaldamento allo scopo di modificare la struttura delle proteine che precipitando in una fase bidimensionale, rimangono intrappolate nelle maglie del Gel.

Contemporaneamente si ottiene anche la disidratazione del gel che, nei casi in cui lo spessore nativo del gel sia inferiore a 0,8 mm, solidifica definitivamente assottigliandosi fino a trasformandosi in una pellicola aderente al Mylar senza cristallizzare in modo irregolare; questo procedimento predispone anche la lastra ad una veloce colorazione ed altrettanto rapida decolorazione, passaggi che altrimenti dovrebbero durare alcune ore.

La temperatura ideale per questo trattamento è di circa 65°C, ma su alcuni apparecchi ritroviamo anche delle temperature inferiori (55°C)

# Elettroforesi su gel di AGAROSIO

## Fase 6) – Colorazione

La denaturazione delle proteine le ha fatte precipitare in una fase bidimensionale, e queste sono ormai intrappolate nelle maglie dell'Agarosio, che non si trova più allo stato di Gel, ma è ora una pellicola solida.

Il processo, però, non è completamente irreversibile, e va mantenuto inalterato in tutte le fasi successive in modo da bloccare le proteine così come sono arrivate al termine della migrazione, senza diffondere o spostarsi.

Per ottenere questo risultato occorre che durante la colorazione l'ambiente rimanga sufficientemente acido ma senza esagerare, in modo da scongiurare il ridiscioglimento delle proteine.

Il Nero d'Amido in soluzione debolmente acetica, si presta perfettamente a questo scopo: colora in tempi brevi (1-2'), non lascia importanti colorazioni di fondo, e colora in modo abbastanza lineare le varie bande proteiche.

### **Si possono usare anche altri coloranti come:**

Il Blue Brillante di Coomassie, ottimo per tecniche multifrazionate ad alta risoluzione, poiché è molto sensibile e colora anche le più piccole frazioni, tuttavia è poco lineare nella risposta densitometrica e quindi va bene solo per valutazioni qualitative;

Il Violet 17 è una buona alternativa, ma necessita di decoloranti più aggressivi per eliminare i residui dal fondo.

La Nigrosina sarebbe perfetta ma comporta tempi di colorazione esagerati (alcune ore)

Tutti i coloranti possono essere “spostati” e quindi sostituiti con successive colorazioni dopo la decolorazione.

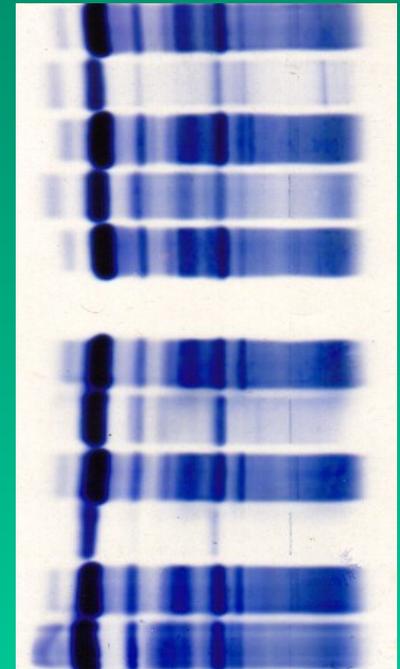
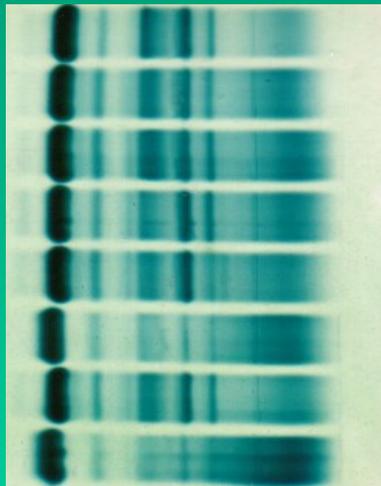
*N.B.: il passaggio della colorazione non è davvero indispensabile, perché le proteine sono già colorate nell'UV spinto (Lambda max 280nm circa) ma sarebbe necessario un sistema di lettura nell'UV.*

# Elettroforesi su gel di AGAROSIO

## Fase 6) – Colorazione

Esempi di differenti colorazioni:

- in alto a sinistra Colorazione con Violet;
- al centro Nero D'Amido;
- in basso a sinistra Nero D'Amido modificato con pre-fissazione in Acido Picrico;
- in Basso a destra Ri-Colorazione con Blue Brillante di Coomassie



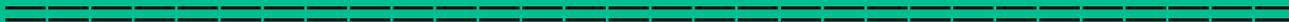
# Elettroforesi su Gel di Agarosio

- Fase 7) – Decolorazione

Con il Nero D'Amido la colorazione del materiale proteico presente sulla lastra denaturata, con il Gel ormai ridotto ad una pellicola sottilissima, avviene senza coinvolgere troppo il fondo, per cui in un passaggio velocissimo, suddiviso, per sicurezza in 2-3 bagni, si ottiene la completa decolorazione di tutta la parte non interessata dalla presenza di proteine.

La fase di decolorazione non è particolarmente critica, a patto che si verificino alcune condizioni:

- 1) La denaturazione deve essere avvenuta in maniera completa, in modo che sulla lastra non siano presenti rigonfiamenti in rilievo, contenenti un residuo di umidità con una parte di Agarosio non solidificato completamente. In questo caso, sarebbe stato necessario un supplemento di denaturazione dato che in queste condizioni non sono possibili colorazione e decolorazione in tempi brevi, ma bisognerebbe prolungarle di parecchie ore.
- 2) Lo spessore del Gel iniziale non deve essere eccessivo (max 0,8 mm) perché altrimenti la colorazione del fondo non è più del tutto trascurabile, e potrebbe essere necessario prolungare la decolorazione, o “rinforzare” il decolorante con una componente acetica.



# Sistema di lettura con Eluizione

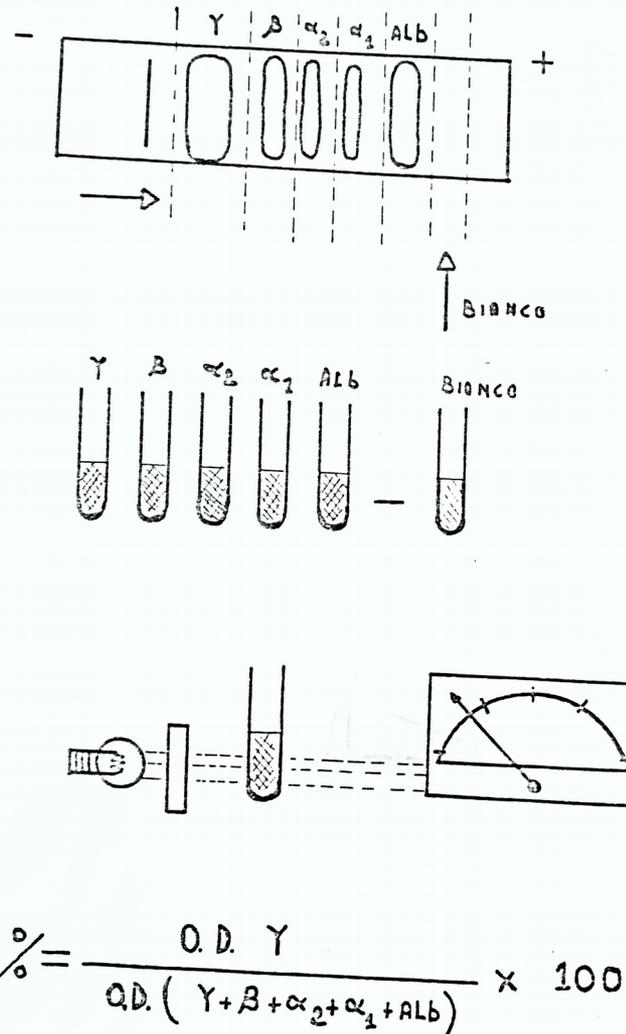


Fig.14 SCHEMA PROCEDURALE PER IL CALCOLO PERCENTUALE DELLE FRAZIONI CON LA TECNICA DELL'ELUIZIONE

# Sistema di lettura densitometrici

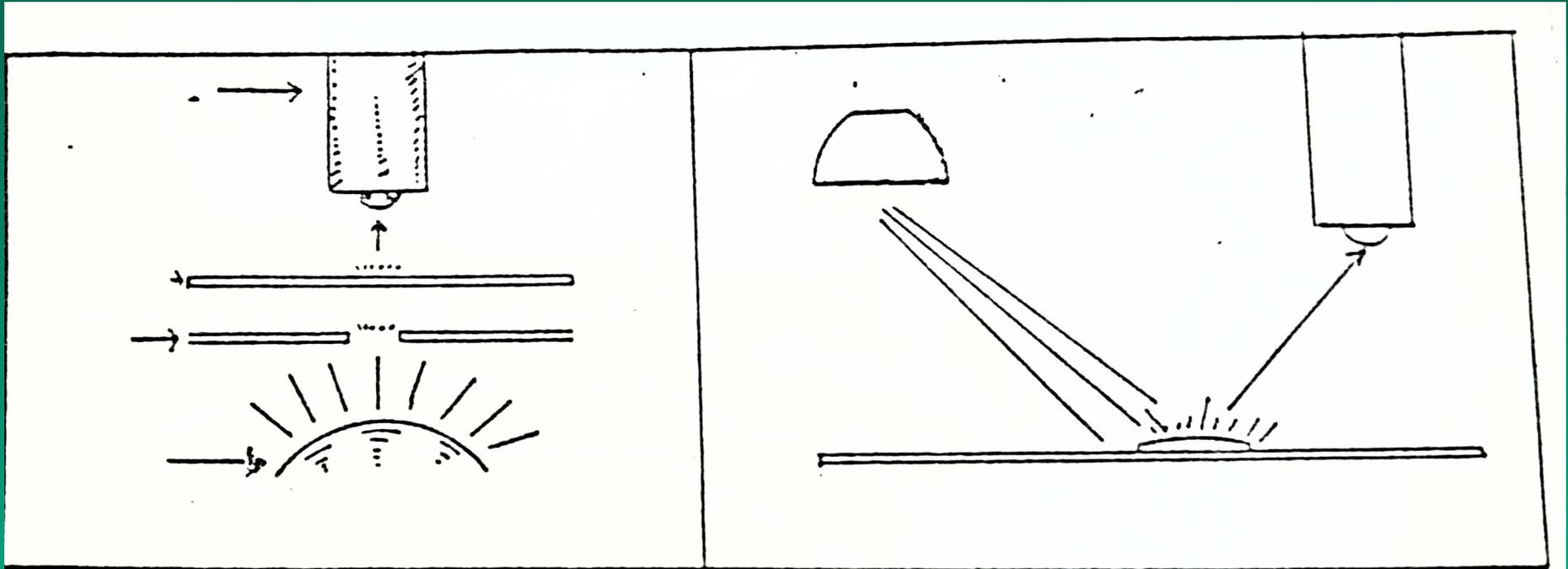
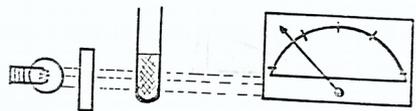
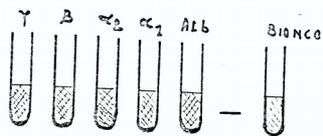
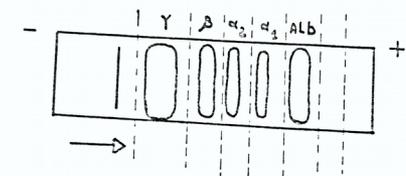


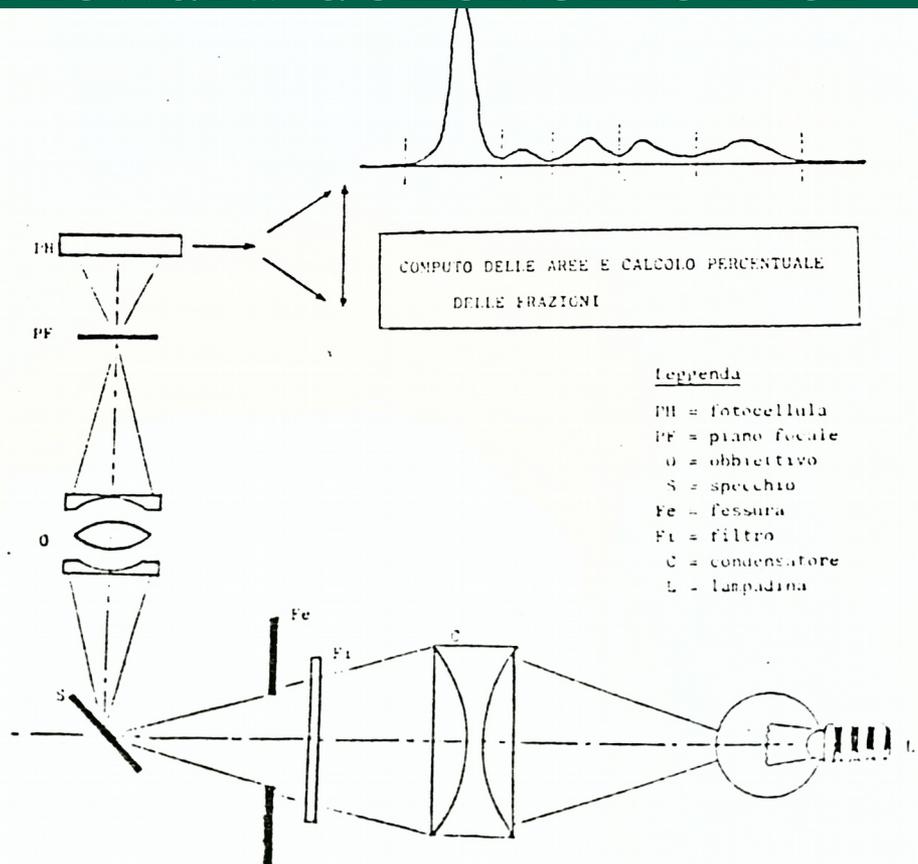
Fig. 1. DENSITOMETRIA PER  
TRASMITTANZA

DENSITOMETRIA PER  
RIFLETTANZA

# Sistemi di lettura densitometrici



$$\% = \frac{O.D. \gamma}{O.D. (\gamma + \beta + \alpha_2 + \alpha_1 + ALB)} \times 100$$



- Leggenda
- PH = fotocellula
  - PF = piano focale
  - O = obiettivo
  - S = specchio
  - Fe = fessura
  - Ft = filtro
  - C = condensatore
  - L = lampadina

Fig.14 SCHEMA PROCEDURALE PER IL CALCOLO PERCENTUALE DELLE FRAZIONI CON LA TECNICA DELL'ELUIZIONE

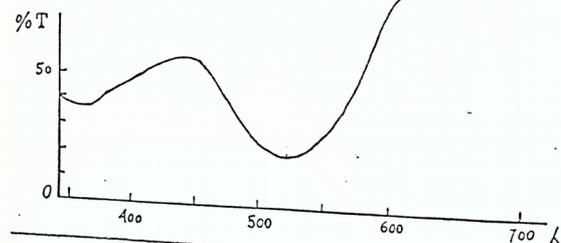
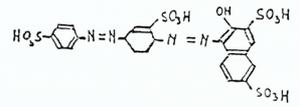
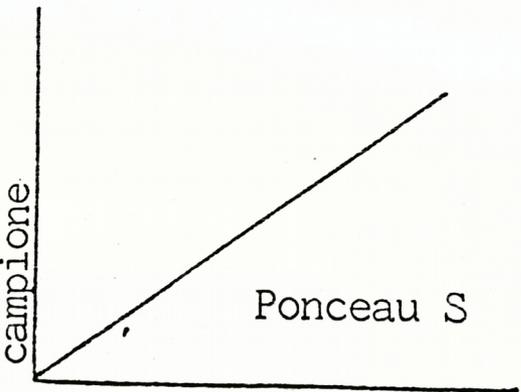
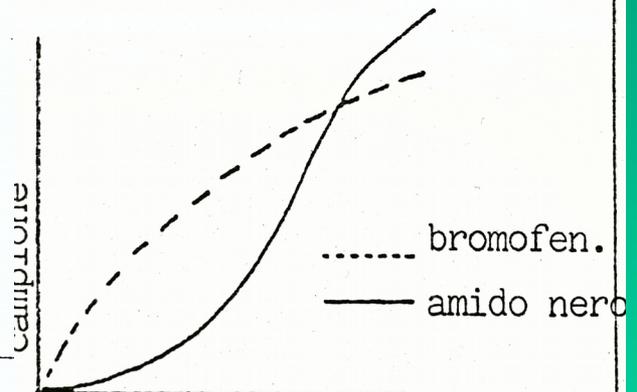
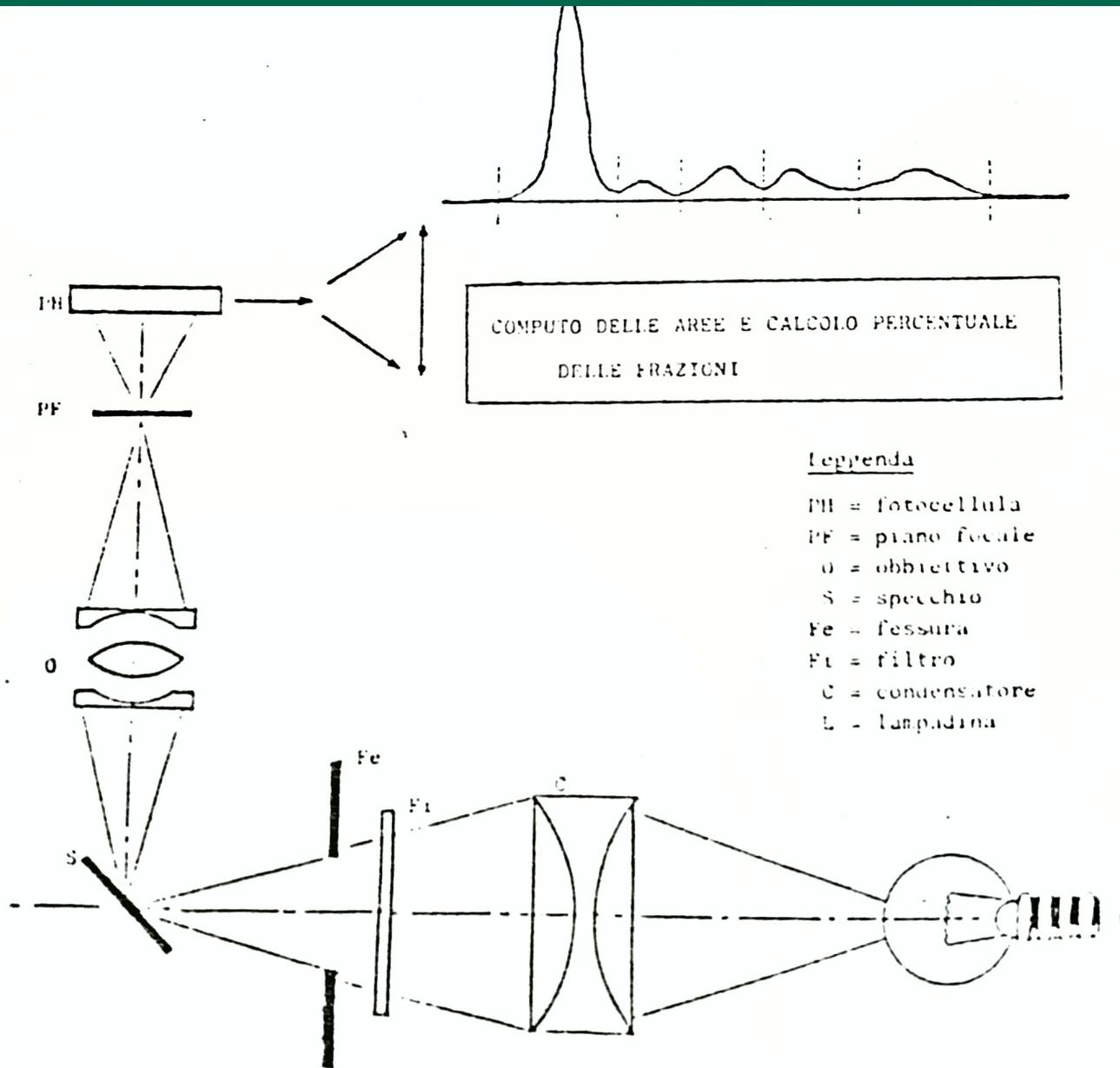


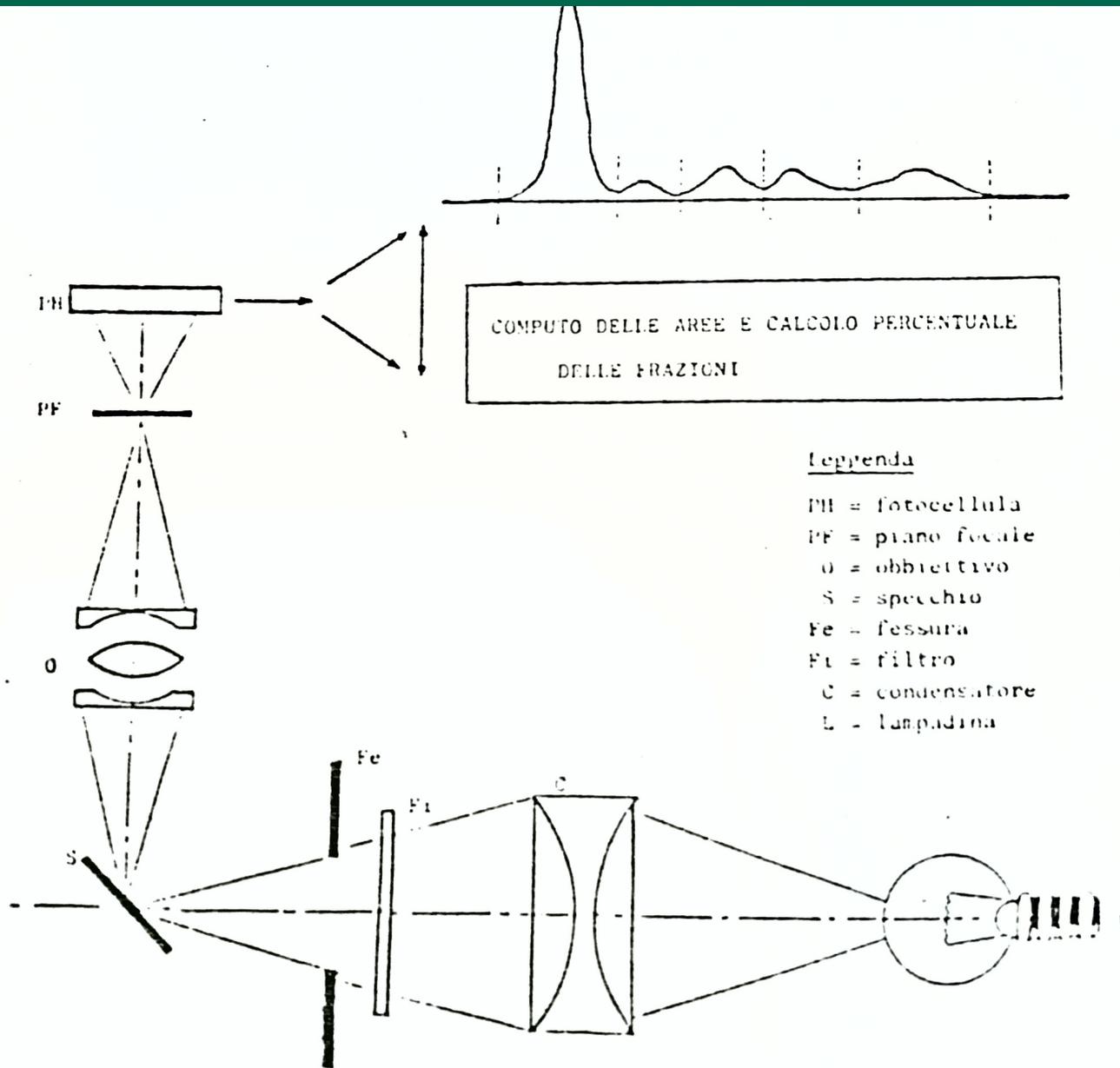
Fig.12 FORMULA DI STRUTTURA E SPETTRO D'ASSORBIMENTO DEL PONCEAU S



# Sistemi di lettura densitometrici



# Sistemi di lettura densitometrici

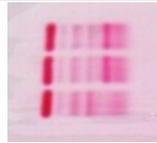


# PhoreFix: Sistema di lettura tramite Scanner

**Tabella di comparazione tra un densitometro tradizionale ed un sistema di lettura tramite scanner (Software PhoreFix con scanner Canon serie Lide)**

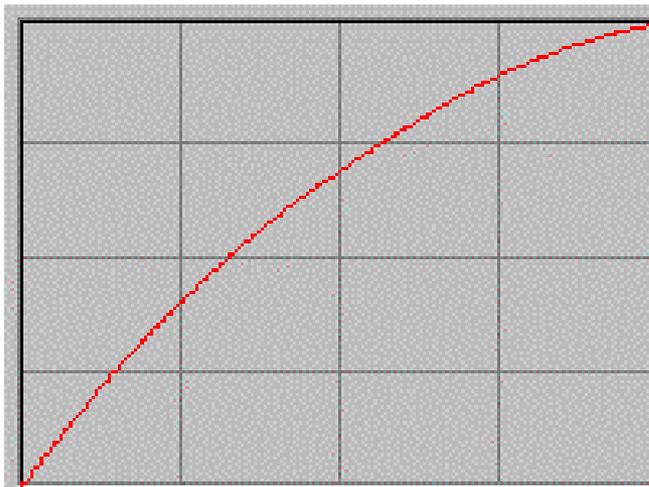
<i>Caratteristiche</i>	<i>Sistema tradizionale</i>	<i>Sistema di lettura con scanner</i>
<b>Lunghezza di scansione</b>	- 1,5 – 6 cm      --	-0.5 – 21 cm      ++
<b>- Risoluzione</b>	200-300 punti/inch      --	oltre 600 punti/inch      ++
<b>- Profondità di scala</b>	- 8-12 bit (256-4096 punti di scala O.D.) ---	- 12-21 bit (4096-2000000 punti di scala O.D.) +++
<b>- Interasse (distanza tra i campioni)</b>	- Vincolato a distanze predefinite/in alcuni casi libero  =	- Sempre libero      +=
<b>- lettura supporti non trasparenti</b>	- non possibile/possibile con limitazioni - =	- Sempre possibile      +
<b>- Fattore di correzione albumina (numerico)</b>	- Presente      =	- Presente      =
<b>- Correttore esponenziale di linearità</b>	- Non presente      --	- Presente      ++
<b>- costo hardware</b>	- elevato      ---	- molto basso      +++

# Densitometria

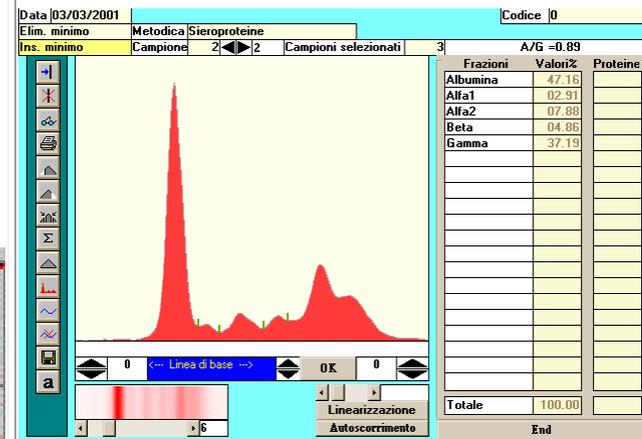


*Esempio di striscia in acetato supportato contenente tre tracciati, di cui due ripetizioni riferite ad un campione con un picco monoclonale in zona beta2-gamma. Abbiamo preso in esame il secondo tracciato.*

Metodica	L.onda	Exp	FMA	Cntr	Add
1 Sieroproteine	525	0.8	1.2	5	4
2 Sieroproteine II	525	1.2	1	5	1
3 Emoglobine	525	1	1	5	4
4 Igfix	525	1.8	1	5	4
5 Siero HR	610	1.2	1	5	4
6 Lipo	610	1	1	5	10
7 Pragma	525	1	1	5	1
8 altro	525 & 610	1.5	1	5	1



*Modifica della linearità con il fattore  $Exp=0.8$*



*Avendo a disposizione oltre 48 bit, è possibile usufruire di un software che gestisce un parametro di correzione esponenziale (Exp) che agisce sulla linearità di risposta, quindi anche sul vero e proprio grafico; va usato solo in presenza di campioni a titolo noto (controlli o calibratori), allo scopo di mettere a punto le condizioni operative relative alla metodica in uso. Impostando un valore minore di 1 si aumenta la sensibilità alle densità ottiche più basse (cresce l'area delle globuline e del picco in questione, mentre diminuisce, ad esempio l'Albumina o, nel caso dell'emoglobina la A1).*

*I densitometri tradizionali invece, di solito riescono a gestire solo un fattore di correzione dell'Albumina (o in qualche caso un fattore per ogni frazione) ed agisce **solo sui valori numerici**. Tale tipo di correzione è comunque disponibile anche con il software PhoreFix.*

# Confronto tra le letture effettuate con un densitometro tradizionale e con il sistema

## PhoreFix, considerazioni:

**Dal confronto tra le letture effettuate con un densitometro tradizionale e con il sistema PhoreFix, emergono alcune considerazioni:**

- 1) La lettura nei densitometri tradizionali avviene generalmente attraverso lo spostamento di un gruppo ottico (o del supporto da analizzare) tramite un motore passo-passo. Il motore avanza a "scatti" e quando si trova nella fase di "fermo" è pronto per una lettura. A mano che il motore avanza di un passo (o di un numero di passi stabiliti dal costruttore), viene preso in considerazione il dato analogico rilevato da una fotocellula. Il segnale ancora "analogico" viene convertito in segnale "digitale" da un apposito convertitore A/D. Questa operazione viene ripetuta ad ogni intervallo di lettura.
  - 2) I vari costruttori hanno trovato diverse soluzioni, ma nella maggior parte dei casi utilizzano 256 letture ( $2^8$ ) per tutta la lunghezza del tracciato. Per semplificare possiamo dire, ad esempio, che tipicamente, un tracciato di 25,6 mm potrebbe avere circa 10 letture per millimetro, ovvero 254 letture per pollice. La risoluzione più frequentemente utilizzata pertanto, è di circa 200-300 punti/pollice.
  - 3) Abbiamo detto che ogni punto di lettura, inoltre, viene convertito in segnali digitali. In base alle caratteristiche del convertitore A/D si può stabilire la capacità massima del densitometro di distinguere 2 diverse densità ottiche. In realtà sono le trasmissioni di luce (trasmittanza) a produrre i segnali analogici che poi vanno convertiti in segnali digitali e trattati per ottenerne l'inverso del logaritmo che da l'effettiva misura della densità ottica proporzionale alla concentrazione delle proteine, per cui bisognerebbe dire, in pratica, che la vecchia scala 0 – 100% di trasmittanza va suddivisa in tanti "scalini" in base alla capacità del convertitore A/D. Un convertitore da 8 bit ci dà 256 scalini ( $2^8$ ). La maggior parte dei densitometri utilizzavano A/D da 8 bit, ma i migliori mai costruiti disponevano di A/D converter da 12 bit e quindi avevano la capacità di distinguere, in una scala, 4096 diversi livelli di trasmittanza, il che significa la possibilità di una buona ripetibilità con una scarsa "indeterminazione" anche in condizioni estreme.
- 
- 1) I sistemi di lettura tramite scanner utilizzano un hardware prodotto su vasta scala, in milioni di esemplari, e pertanto permettono performances sempre più elevate. La tecnologia utilizzata è molto sofisticata (motore passo-passo, encoder, barra CCD) ma anche estremamente economica, proprio a causa della produzione su scala.
  - 2) Qualunque scanner è oggi in grado di ottenere una risoluzione di molto superiore ai 600 punti/inch; pur non essendo necessario nella maggioranza dei casi superarne 300, per campioni particolari può tornare utile.
  - 3) Uno scanner di medio livello e basso costo (ad esempio Canon serie Lide 100) dispone di 48 bit che tuttavia vanno ripartiti tra le 3 lunghezze d'onda principali in cui viene scomposta l'immagine. Il risultato è comunque, per una singola lunghezza d'onda, pari a 16 bit ( $2^{16}$ ), il che vuol dire che potenzialmente uno scanner commerciale di basso costo, è in grado di suddividere la vecchia scala 0-100% di trasmittanza in 65536 "scalini", ovvero ben 16 volte più del miglior densitometro tradizionale mai costruito, o addirittura 256 volte più della maggior parte dei densitometri tradizionali!!! Naturalmente per ottenere risultati apprezzabili che permettano realmente di sfruttare le potenzialità degli scanner commerciali è necessario seguire alcune semplici regole:
- 
- 1) Preferire scanner con una sorgente luminosa a stato solido, per evitare che lampade a gas possano modificare nel tempo il livello di luminosità
  - 2) Usare i drivers originali della casa, solo dopo aver disattivato ogni eventuale correzione automatica della tonalità, del contrasto o altro che possa introdurre un'arbitraria modifica dell'immagine rilevata: usare solo eventuali correzioni disponibili all'interno del programma di elettroforesi.
  - 3) Assicurarci che la superficie di contatto con il supporto elettroforetico sia perfettamente pulita.
  - 4) Assicurarci che il supporto sia perfettamente asciutto, o completamente bagnato, ed in quest'ultimo caso avere cura di utilizzare una busta in plastica per proteggere il piano dello scanner.

