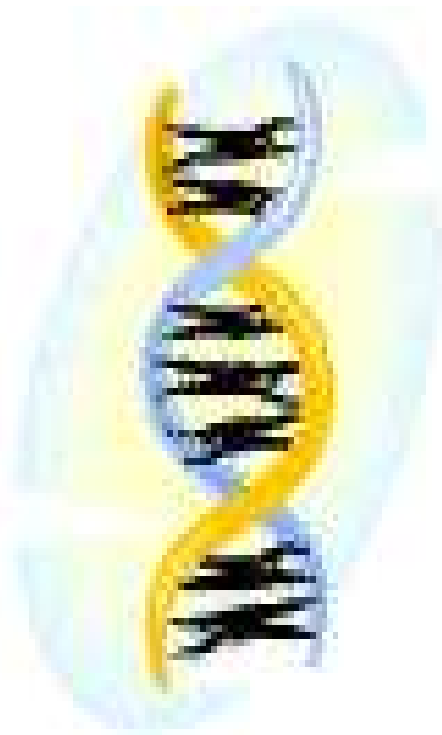


# Elettroforesi

## di Tamara Benincasa

---



L'elettroforesi è una metodologia utilizzata in laboratorio attraverso la quale molecole biologiche (amminoacidi, peptidi, proteine, nucleotidi ed acidi nucleici), dotate di carica elettrica, si muovono con differente velocità in un campo elettrico a seconda della loro carica e dimensione, riuscendo a separarsi le une dalle altre.

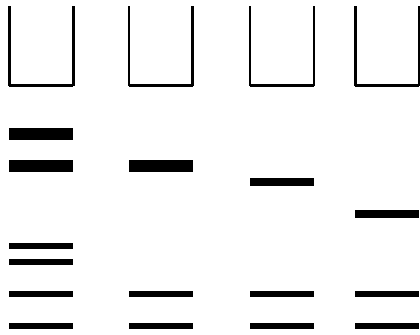
# Principio



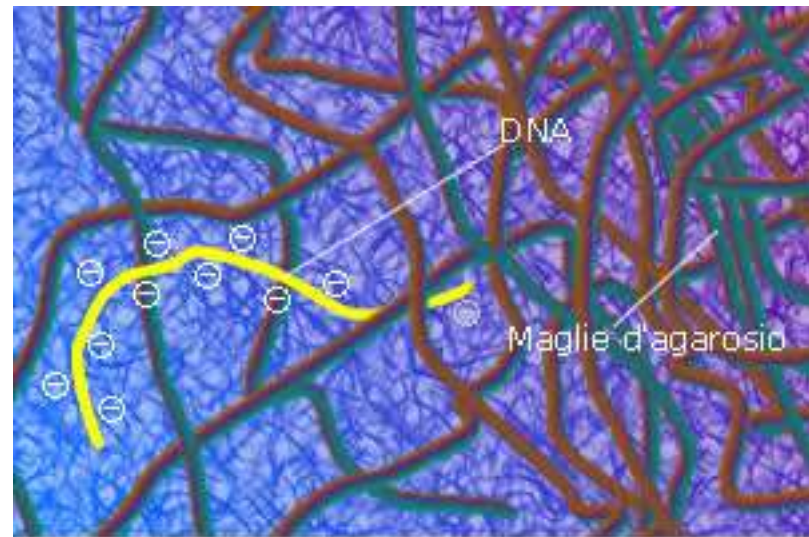
L'elettroforesi è un ottimo metodo di separazione per macromolecole quali proteine e frammenti di DNA. La sua semplicità e velocità rendono tale sistema il più diffuso ed utilizzato. La migrazione elettroforetica che avviene su un supporto di natura porosa imbevuto di una soluzione elettrolitica si chiama elettroforesi zonale, definita così perché le sostanze restano separate in zone ben distinte. Il principio su cui si basa l'elettroforesi è quello di un setaccio molecolare attraverso il quale le diverse molecole vengono fatte passare mediante un campo elettrico. La velocità di migrazione dipende dalle dimensioni, dalla carica, dalla massa e dalla forma delle varie particelle che si combinano per dare una precisa mobilità elettroforetica.

Alla fine della corsa elettroforetica poiché i frammenti più piccoli sono meno ostacolati nella corsa tra le maglie del gel, si muoveranno più velocemente rispetto a quei frammenti di dimensione più grande e si osserveranno nella parte più bassa del gel. Quelli più grandi si localizzeranno in prossimità dei pozzetti di caricamento del gel.

Pozzetti di caricamento



**Esempio di elettroforesi zonale. Le diverse bande si separano in zone differenti.**



Campo elettrico

- +

# Elementi generali

- **Alimentatore:** fornisce un flusso di corrente continua attraverso gli elettrodi applicati ad una cella elettroforetica, cosicché gli ioni positivi migrano verso il catodo (carico negativamente) e gli ioni negativi migrano verso l'anodo (carico positivamente).



- **Tampone:** soluzione utilizzata all'interno della cella elettroforetica per consentire la conduzione della corrente e per mantenere costante lo stato di ionizzazione delle molecole da separare. I tamponi più utilizzati contengono EDTA, Tris e acetato.



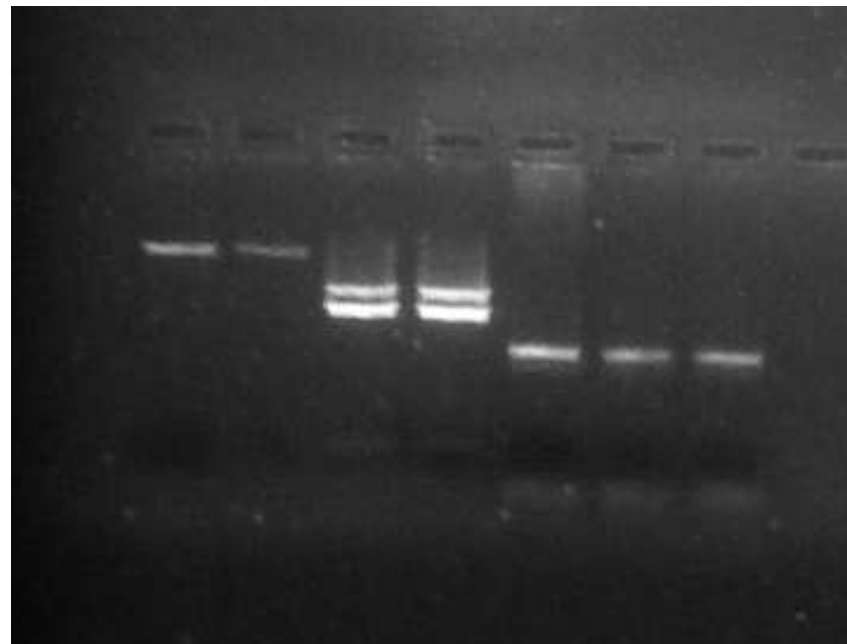
Cella o "vaschetta elettroforetica" contenente il tampone, nella quale viene riposto il gel.

- **Supporto:** è un materiale di natura porosa che permette la separazione di frammenti di molecole (quali DNA e proteine) in base alle loro dimensione.

Nell'elettroforesi zonale i supporti più comunemente usati sono l'agarosio e la poliacrilamide.

- **Trans-illuminatore:** apparecchiatura utilizzata per visionare il gel alla luce ultravioletta.

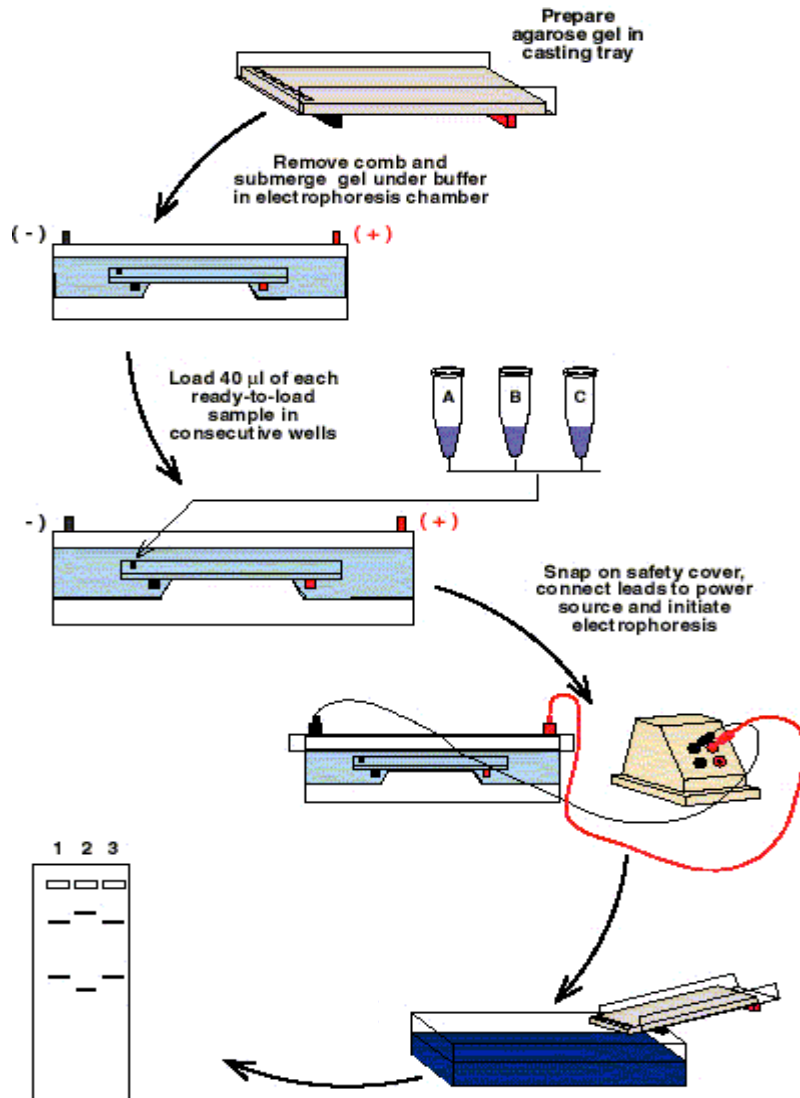
Esempio di gel di agarosio colorato con bromuro di etidio: si possono osservare i pozzetti in nero, e i frammenti di DNA separati secondo la loro grandezza molecolare.



- Dimensioni maggiori

- Dimensioni minori

# Preparazione e uso del gel d'agarosio



Si fa sciogliere l'agarosio con tampone TBE in un fornello a microonde. In seguito viene aggiunto **bromuro di etidio** (colorante fluorescente utilizzato per l'osservazione delle bande di DNA).

Si versa il gel sul vassoio adatto alla vaschetta e lo si lascia solidificare. Poi si inserisce nella cella elettroforetica con una quantita' di tampone che lo ricopre, consentendo il caricamento dei campioni nei pozzetti.

Per agevolare l'osservazione dei campioni caricati e seguirne la migrazione elettroforetica spesso si aggiunge al campione un colorante come il **blu di bromofenolo**. Fra i campioni ci puo' essere un marker di peso molecolare.

Si applica corrente al voltaggio e per il tempo desiderato.

Alla fine della corsa il gel e' osservato al transilluminatore, che eccita il bromuro di etidio utilizzando luce ultravioletta.

# Altre variabili



Una maggiore differenza di potenziale (voltaggio più alto) ed intensità di corrente permette di ridurre i tempi di esecuzione della corsa ma causa anche un aumento di calore, che potrebbe portare ad una alterazione dei materiali.

Il processo elettroforetico si accompagna sempre a fenomeni di diffusione. Ciò non incide sulla mobilità ma sulla larghezza delle bande, ponendo dei limiti alla possibilità di separazione.

# Altre tecniche elettroforetiche

**Elettroforesi capillare:** è una elettroforesi che viene eseguita su una colonna, similmente ad una cromatografia. Si usa un microcapillare in silice fusa riempito da una sostanza che funge da setaccio molecolare. Questo tipo di elettroforesi può essere utilizzato solo nel caso in cui si abbia una marcatura fluorescente: la regione terminale del capillare è attraversata da una luce laser, in grado di eccitare i fluorocromi e indurre una risposta captabile dai rilevatori.

**Elettroforesi dell'emoglobina:** permette di distinguere emoglobine anomale permettendo la diagnosi di diverse emoglobinopatie. E' utilizzata anche nella diagnosi delle talassemie.

**Elettroforesi delle siero-proteine:** permette di visualizzare su un grafico i principali gruppi di proteine: albumina, alfa-1-globulina, alfa-2-globulina, beta-globulina, gamma-globulina.