

Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica

A.A. 2006-2007

Principi basilari di colorimetria

La colorimetria è una tecnica usata per determinare la concentrazione di sostanze in una soluzione colorata. È un metodo rapido e non distruttivo che consente di identificare e quantificare un gran numero di sostanze a scopo diagnostico e di ricerca. Attualmente la tecnologia informatica ha reso automatici molti dei calcoli necessari per l'analisi colorimetrica che quindi può essere usata anche da personale poco esperto.

La colorimetria è una forma di spettroscopia. In generale essa misura la risposta di atomi e molecole esposte a radiazioni elettromagnetiche di una certa lunghezza d'onda e, quindi, di una certa energia. La colorimetria fa uso di lunghezze d'onda nella regione visibile dello spettro elettromagnetico e quindi è una tecnica di misura abbastanza familiare.

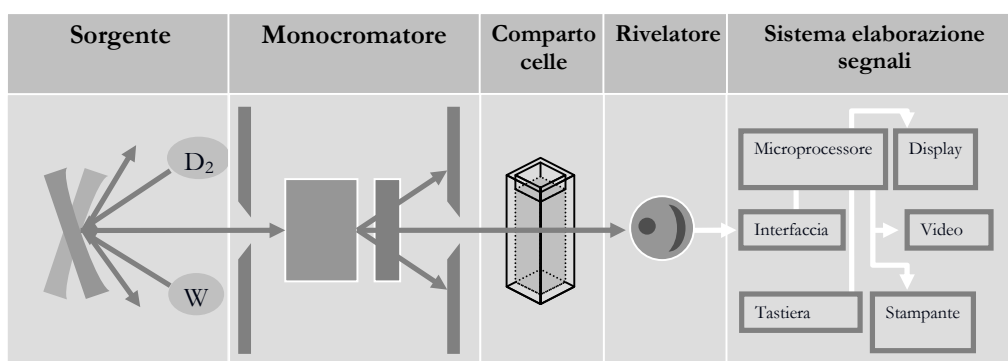
La soluzione da analizzare, inizialmente trasparente, viene colorata mediante aggiunta di un reattivo che reagisce con la sostanza cercata. La colorazione è tanto più intensa quanto più concentrata è la sostanza. Un raggio di luce di una determinata lunghezza d'onda (chiamato raggio incidente) attraversa la soluzione da analizzare che è contenuta in un recipiente di vetro o di quarzo detto *cuvetta*. Esso viene assorbito in maniera proporzionale alla saturazione del colore, ad esempio una soluzione di colore giallo assorbe luce vicina al blu. L'intensità del raggio che ha attraversato la soluzione (raggio trasmesso) viene misurato da un sistema fotorivelatore che trasforma l'energia del raggio trasmesso in una corrente elettrica proporzionale alla sua intensità.

Confrontando l'intensità del raggio incidente I_0 con quella del raggio trasmesso I_1 si può definire una grandezza, la trasmittanza, che è il rapporto I_1/I_0 . A scopo pratico si preferisce usare una grandezza logaritmica detta *assorbanza* o *densità ottica* definita come $A = \log (I_1/I_0)$.

Il vantaggio dell'assorbanza è che è una grandezza additiva, cioè l'assorbanza di due cuvette in serie risulta la somma delle due assorbanze. Gran parte della luce che non passa attraverso il campione viene da esso assorbita (una frazione trascurabile di energia è persa per diffusione). Pertanto una sostanza che trasmette la maggior parte della luce ad una particolare lunghezza d'onda ha una bassa assorbanza a quella lunghezza d'onda. Se le misure sono ripetute a lunghezze d'onda differenti si ha il cosiddetto spettro della sostanza. Gli spettri sono caratteristici di una particolare sostanza chimica e possono

essere impiegati per identificare soluzioni sconosciute per confronto con spettri di soluzioni note.

Una volta che si conosce lo spettro di assorbimento di una particolare sostanza nota, mediante l'analisi colorimetrica si può misurare la sua concentrazione in soluzione. Questa analisi si basa sulla legge di Lambert-Beer che, in termini semplici, mette in relazione l'intensità di colore di una soluzione con la sua concentrazione. Più precisamente la legge stabilisce che l'assorbanza è proporzionale ad $a \cdot c \cdot L$, dove a è l'assorbimento specifico di quella sostanza, C è la concentrazione della sostanza ed L è il cammino ottico, cioè il percorso del raggio luminoso dentro la cuvetta.



La determinazione quantitativa di una sostanza in soluzione viene effettuata mediante l'uso di uno spettrofotometro. Questo apparecchio è in grado di misurare la quantità di luce assorbita dalla soluzione: maggiore è la luce assorbita maggiore è la concentrazione della sostanza in esame. Uno spettrofotometro è formato da una sorgente luminosa (visibile o ultravioletta) che emette raggi di varie lunghezze d'onda. Un apposito filtro, chiamato monocromatore, permette di selezionare una lunghezza d'onda specifica: in tal modo origina un raggio incidente monocromatico che attraversa la cuvetta di vetro (per la luce visibile) o di quarzo (per la luce UV) dentro il quale si mette la soluzione da analizzare. Il raggio luminoso che fuoriesce dalla cuvetta viene letto da un sistema rivelatore rappresentato da una fotocellula la quale produce un segnale elettrico proporzionale alla quantità di luce. Un dispositivo digitale trasforma il segnale elettrico in una successione di numeri che vengono stampati o visualizzati su un monitor. Per usare lo spettrofotometro a scopi quantitativi occorre innanzitutto stabilire il picco di assorbimento della sostanza in esame. Per esempio l'emoglobina ossigenata ha un massimo di assorbimento a 412 nm: per garantire la specificità dell'analisi le letture dovranno essere fatte proprio a questo valore di lunghezza d'onda. Una parte dell'assorbanza totale è dovuta al solvente, al vetro della cuvetta e allo stesso spettrofotometro: per correggere questo effetto, accanto al campione da esaminare occorre effettuare anche un bianco cioè una lettura

spettrofotometrica senza il campione. Per calcolare la concentrazione di una sostanza occorre prima di tutto costruire una curva di taratura mediante soluzioni standard della sostanza a concentrazioni note; la concentrazione di una soluzione ignota viene poi ricavata per interpolazione. La maggior parte dei composti da analizzare non sono colorati; per ovviare a questo inconveniente si possono impiegare reazioni (chimiche o enzimatiche) che trasformano una sostanza incolore in un composto colorato: quest'ultimo verrà poi misurato con lo spettrofotometro. Queste reazioni colorimetriche possono essere end-point, cioè si aspetta che tutto il colore si sia sviluppato fino alla saturazione e solo allora si legge l'assorbanza; oppure si esegue una cinetica: il colore si sviluppa nel tempo e l'assorbanza viene letta man mano che procede la reazione: alla fine si calcola la variazione di colore nell'intervallo di tempo.

Spettrofluorimetro. Nello spettrofluorimetro la sostanza da dosare viene attraversata da un raggio luminoso che eccita le molecole ad emettere una diversa lunghezza d'onda. Il raggio trasmesso viene rilevato a 90° da quello incidente quindi le cuvette devono essere trasparenti nei 4 lati.

Tecniche centrifugative

Una centrifuga è un dispositivo che serve per separare particelle presenti in soluzione in base alla loro grandezza, alla forma, alla densità o alla viscosità del mezzo mediante l'applicazione di una forza superiore a quella di gravità. Tali particelle possono essere cellule, organuli sub-cellulari, virus, oppure macromolecole, quali ad esempio proteine ed acidi nucleici. Esistono varie tecniche centrifugative e innanzitutto bisogna distinguere tra centrifugazione analitica e centrifugazione preparativa: la differenza riguarda l'obiettivo della centrifugazione. La centrifugazione analitica comporta la misurazione di proprietà fisiche delle particelle quali il peso molecolare o il coefficiente di sedimentazione. L'apparecchiatura è dotata di un sistema ottico che, durante la centrifugazione, consente l'osservazione di macromolecole in soluzione che si muovono nel campo gravitazionale. I campioni da analizzare vengono introdotti in un rotore all'interno di provette con finestre di quarzo parallele al piano di rotazione. Quando il rotore gira a forte velocità l'immagine della provetta viene proiettata attraverso un sistema ottico in una pellicola o in un computer. La concentrazione della soluzione nei vari punti della provetta viene determinata per assorbanza della luce di lunghezza d'onda appropriata.

L'altro tipo di centrifugazione è detta preparativa ed ha l'obiettivo di isolare particelle specifiche che devono essere sottoposte ad ulteriori analisi. Esistono vari tipi di centrifugazione preparativa: zonale, differenziale e isopicnica. La centrifugazione si usa ad esempio per separare il sangue nei suoi

componenti: il plasma, cioè la parte liquida, e le cellule (globuli bianchi, globuli rossi e piastrine). Le centrifughe da laboratorio sono dotate di un *rotore* nel quale si trovano alloggiamenti adatti ad accogliere le provette e che viene fatto girare a velocità fissa o variabile. La velocità del rotore si esprime in genere in *rotazioni per minuto* (rpm).

Centrifugazione a bassa velocità / Ultracentrifugazione

A seconda della velocità alla quale gira il rotore si possono distinguere una centrifugazione a bassa velocità, al di sotto di 20.000 rpm, e una ultracentrifugazione, al di sopra di 20.000 rpm. Nella cosiddetta centrifugazione differenziale l'intera provetta è riempita del campione e le particelle si stratificano a seconda della forma, della grandezza o della densità. Molto usate in laboratorio sono le microcentrifughe, centrifughe a bassa velocità con rotori capaci di accogliere provette di polipropilene da 0,5 o 1,5 millilitri: la maggior parte di esse sviluppano velocità comprese tra 10.000 e 13.000 rpm.

Il rotore di una ultracentrifuga ruota in una camera nella quale è stato fatto il vuoto. La maggior parte delle sostanze di interesse biologico con peso molecolare intorno a 50 Dalton possono essere facilmente purificate con questo tipo di centrifuga.

Il calcolo della forza centrifuga relativa (o forza g) per una particolare centrifuga si fa a partire dal raggio del rotore (r) e dalla velocità di rotazione (n) in rpm in base alla formula seguente:

$$RCF = 1.118 \times 10^{-5} * r * n^2$$

La velocità di rotazione è determinata da:

$$rpm = \text{radice quadrata di } [RCF / (1.118 \times 10^{-5}) * r \text{ (cm)}]$$

Tecniche cromatografiche

La cromatografia è una tecnica chimico-fisica utilizzata per la separazione di miscele complesse mediante la distribuzione dei loro componenti fra due entità fisicamente distinte: una fase mobile (gas o liquido) e una fase stazionaria (mezzo di supporto). La fase mobile fa scorrere il soluto attraverso la fase stazionaria. L'attrazione differenziale del soluto per la fase mobile e stazionaria influenza la mobilità del campione. Una colonna di vetro o plastica viene riempita da una sostanza finemente granulata che offra la più ampia superficie possibile, come il gel di silice o l'allumina (fase staz.). Il

materiale da separare viene sciolto in un solvente (fase mobile) e fatto passare attraverso la colonna per gravità o per mezzo di una pompa. Le sostanze con maggiore affinità per l'adsorbente vengono trattenute nella parte alta della colonna e verranno eluite più lentamente.

Le applicazioni sono numerose: separazione di miscele complesse nei singoli componenti a scopo analitico o quantitativo; isolamento di una singola biomolecola in forma pura; eliminazione di contaminanti, etc.

I vari metodi si basano su precise caratteristiche chimico-fisiche: (1) la polarità del soluto, vale a dire l'ineguale distribuzione della carica in una molecola a causa di differenze in elettronegatività degli atomi che la compongono; (2) la natura ionica. Gruppi acidi/basici deboli presenti nella biomolecola possono essere neutri o carichi a seconda del pH della soluzione. Gruppi carichi possono interagire col mezzo di supporto che contiene gruppi carichi di segno opposto (cromatografia a scambio ionico); (3) le dimensioni della molecola. Biomolecole con massa molecolare diversa possono essere separate per filtrazione su gel; infine (4) la forma della molecola. Molte biomolecole si legano ad altre molecole in maniera specifica a causa di una affinità di struttura, ed esempio enzima/substrato, ormone/recettore, DNA/RNA, etc. Questa proprietà può essere sfruttata per isolare biomolecole specifiche (cromatografia di affinità).

Una volta separate le biomolecole possono essere quantificate ricorrendo a reazioni colorimetriche, all'analisi spettrofotometrica, a metodi radioattivi, etc.

Cromatografia su carta. La fase stazionaria è costituita da una striscia di cellulosa imbibita di soluzione tampone, la fase mobile è una miscela di solventi, es. butanolo, cloroformio. Si usa per separare molecole simili, ad es. aminoacidi. I campioni vengono applicati sotto forma di macchie discrete (spots) e fatte asciugare. I soluti che presentano una maggiore solubilità nella fase stazionaria si muovono meno rapidamente lungo la striscia di carta rispetto a quelli con maggiore solubilità nella fase mobile. La velocità di migrazione (RF) è una misura della mobilità di un dato composto relativamente alla mobilità del solvente. È il rapporto tra la distanza percorsa dal composto a partire dall'origine e la distanza percorsa dal solvente, sempre a partire dall'origine. Il confronto della RF di campioni sconosciuti con quelli di standard noti può consentire l'identificazione dei campioni.

La cromatografia su strato sottile, assai veloce e sensibile, si esegue su una lastra nella quale viene stratificato del gel di silice. Dopo aver riscaldata la lastra in stufa a secco per attivarla si semina il campione sciolto in un solvente organico, quindi si immerge verticalmente lo strato sottile nel solvente. La separazione avviene sia in base all'affinità per l'adsorbente sia in funzione della distribuzione tra fase staz. e fase mobile.

Cromatografia gas-liquida. Il soluto si ripartisce tra due fasi, ad es. gassosa e liquida di un dato solvente. La fase stazionaria è un liquido aderente a particelle solide inerti, la fase mobile è un flusso gas attraverso una colonna o un capillare. Il campione da analizzare viene vaporizzato e introdotto nella fase gassosa, i componenti si distribuiscono tra la fase mobile e la fase stazionaria: i componenti volatili vengono eluiti per primi mentre i componenti che hanno affinità per la fase stazionaria sono ritenuti in colonna.

La cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) utilizza pompe capaci di spingere la fase mobile entro la colonna a pressioni di 1000-2000 psi. In tal modo aumenta la risoluzione della miscela e si riduce il tempo di esecuzione dell'analisi.

Cromatografia a scambio ionico. È una forma di cromatografia nella quale soluti di natura ionica interagiscono con una fase stazionaria carica attraverso legami elettrostatici. La fase stazionaria è in genere una resina sintetica alla quale sono legati gruppi funzionali carichi positivamente o negativamente. Tale resina attira ioni carichi di segno opposto e l'eluzione avviene per mezzo di ioni che "competono" con quelli legati alla resina. Viene utilizzata una colonna riempita di una resina particolare contenente gruppi carichi: quando passa la fase mobile col campione una parte degli ioni in esso contenuti vanno ad occupare il posto degli ioni di uguale carica legati alla resina. La separazione dipende in questo caso dalla diversa capacità delle molecole cariche del campione di essere scambiate con quelle della resina.

Filtrazione su gel. Quale fase stazionaria, vengono utilizzati materiali allo stato di gel con struttura porosa. Al passaggio della fase mobile col campione le molecole piccole passano facilmente attraverso i pori e vengono eluite mentre le molecole grandi passano con difficoltà e vengono eluite più tardi. Con questo metodo cromatografico si possono separare proteine, carboidrati e acidi nucleici in base alla loro massa molecolare. È detta anche cromatografia di esclusione e si basa sul fatto che il gel forma una sorta di "setaccio moleolare" che lascia passare le molecole in base alla loro grandezza. La filtrazione

su gel viene adoperata per separare miscele di proteine, per allontanare i sali da una soluzione di proteine e anche per determinare la massa molecolare relativa di un composto. Il gel deve essere chimicamente inerte, deve avere un basso contenuto di gruppi ionici e deve formare pori di dimensioni il più possibile uniformi.

Nella cromatografia di affinità un reattivo specifico capace di legarsi alla sostanza biologica da separare viene fissato in modo irreversibile su di un supporto insolubile. Tale reattivo lega in modo specifico la sostanza e ne consente successivamente l'eluizione allo stato puro. Tra i reattivi specifici si usano antigeni, anticorpi, enzimi, inibitori enzimatici, ormoni, vitamine ed acidi nucleici. Questa tecnica, che può essere utilizzata su colonna o per immersione diretta del materiale cromatografico nella soluzione, viene usata per l'isolamento e la preparazione allo stato puro di numerose sostanze biologiche.

Tecniche elettroforetiche

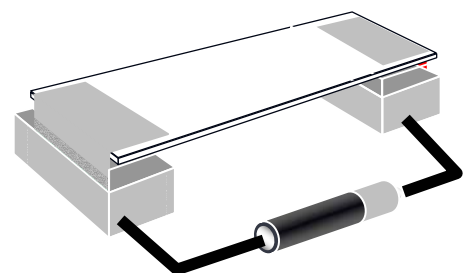
L'elettroforesi è una tecnica di separazione basata sulla migrazione di particelle cariche in una soluzione elettrolitica sotto l'azione di un campo elettrico applicato.

Il campione in soluzione viene depositato su un supporto (lastrine di materiale solido inerte) imbevuto di soluzione tampone. A questo punto viene applicato un campo elettrico che consente la migrazione delle specie ioniche presenti nella soluzione in esame verso gli elettrodi (anodo e catodo).

Si definisce mobilità elettroforetica la distanza che una particella carica percorre nell'unità di tempo in un campo elettrico di una data intensità. Quindi particelle a differente mobilità elettroforetica percorreranno tratti diversi consentendo in questo modo la loro separazione. Le frazioni separate del campione in esame, così ottenute, dopo opportuna colorazione, vengono rivelate con metodo fotometrico da uno strumento detto densitometro.

Nei laboratori viene utilizzata l'elettroforesi così detta zonale che, facendo uso di un supporto solido inerte, imbevuto di soluzione tampone, consente una buona separazione dei componenti del campione in bande, riducendo il fenomeno della diffusione.

La velocità di migrazione dei singoli componenti del campione viene influenzata da quattro diversi fattori che sono: (1) il campo elettrico applicato; (2) il campione; (3) la soluzione tampone; (4) il supporto.



Campo elettrico. Se a due elettrodi, a una certa distanza uno dall'altro, viene applicata una differenza di potenziale si ottiene un gradiente di potenziale. Un aumento di questo gradiente di potenziale determina un aumento della velocità di migrazione delle specie ioniche presenti in soluzione.

Campione. La velocità di migrazione dei componenti il campione è fortemente influenzata dalla dimensione, forma e carica delle molecole.

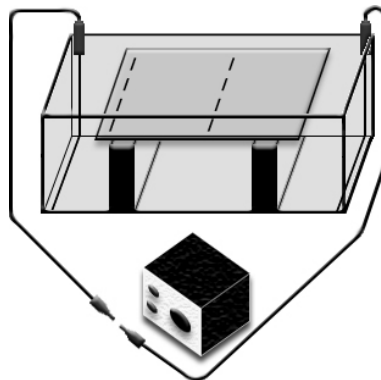
Soluzione tampone. Agisce come solvente per il campione ed inoltre mantiene costante il pH e la forza ionica del supporto solido. Il pH determina il grado di ionizzazione di composti dissociabili e, come nel caso degli amminoacidi, può influenzare sia la direzione che la velocità di migrazione.

I tamponi per elettroforesi maggiormente usati sono: Tris, acetato, fosfato, formiato, citrato, veronal, barbitale ed EDTA.

Supporto. Pur essendo costituito da materiale inerte può causare dei fenomeni non voluti, che alterano la velocità di migrazione, quali adsorbimento, filtrazione molecolare ed elettro-endosmosi. I supporti più comunemente usati sono la carta (poco usata), il gel di silice o allumina (strato sottile), il gel d'amido (per scopi preparativi), l'acetato di cellulosa (utilizzato per le sieroproteine), l'agar (per l'immunolettroforesi) e il gel di poliacrilammide (per la separazione di proteine ed acidi nucleici).

Le strumentazioni per elettroforesi si dividono in apparecchiature manuali ed automatiche. Nelle prime tutte le fasi di preparazione del campione, dalla deposizione fino alla colorazione devono essere effettuate dall'operatore. Nelle apparecchiature automatiche invece tutte le fasi di preparazione del campione vengono effettuate in maniera automatica dallo strumento ed in alcuni casi, sequenzialmente, si può avere la lettura densitometrica con relativa refertazione automatica. In questo tipo di apparecchiature esiste un preparatore dei supporti che consente di preparare i supporti per la migrazione elettroforetica tagliando le strisce e imbibendole nel tampone in maniera tale da poter assicurare il collegamento elettrico. Il depositore di campioni è costituito da un depositare capillare a più lamine in grado di dispensare più campioni contemporaneamente. I movimenti dell'applicatore, controllati da un microprocessore, sono assicurati da motori passo/passato ed inoltre un sistema automatico di lavaggio ed asciugatura del depositore previene l'inquinamento tra campioni diversi. Possono essere presenti una o più camere di migrazione regolabili in maniera indipendente, costituite da vasche riempite di soluzione tampone con alloggiamenti per i supporti e due elettrodi collegati ad un generatore di corrente esterno alla camera.

L'elettroforesi viene impiegata principalmente per la separazione di proteine, DNA ed RNA.

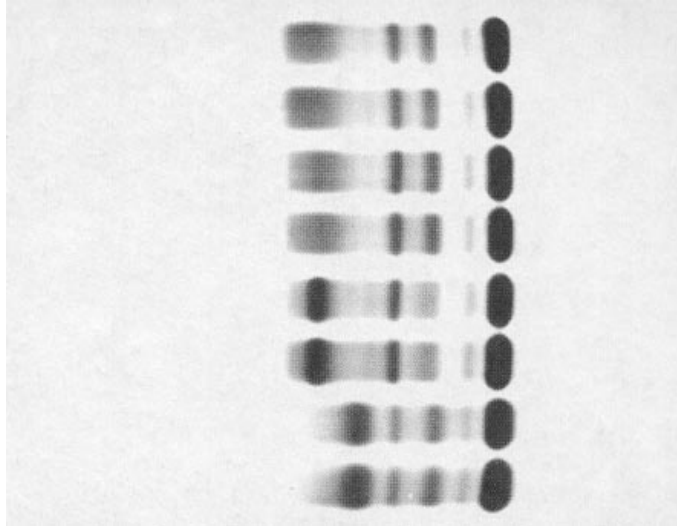


Per l'analisi delle proteine si possono usare numerose metodiche che consentono la separazione, la caratterizzazione e la successiva quantificazione. Uno studio analitico delle proteine è realizzabile sfruttando soprattutto le loro specifiche proprietà fisico-chimiche che si differenziano sulla base della 1. diversa sensibilità ad agenti precipitanti fisici e chimici (calore, soluzioni saline ipertoniche, metalli pesanti, alcool, reagenti non polari), 2. diversa mobilità in campi gravitazionali ottenuti mediante ultracentrifugazione, 3. diversa colorabilità da parte di coloranti specifici, 4. diversa migrabilità in campi elettrici su diversi substrati (elettroforesi su carta, su acetato di cellulosa, su agarosio, su amido, su acrilamide). Questa ultima caratteristica è quella più generalmente sfruttata nei laboratori diagnostici e tra le metodiche elettroforetiche quella su acetato di cellulosa è stata a lungo il metodo di scelta, mentre quello su agarosio o gel di poliacrilamide è riservato a centri più specializzati.

Qualunque sia il supporto adoperato un campione di siero viene fatto migrare in un campo elettrico e la velocità con cui le proteine si spostano entro il supporto dipende dalla carica netta della molecola, dalla massa oltre che dalla intensità del campo elettrico e dalla resistenza del supporto. La carica della proteina dipende dalla sua composizione in aminoacidi e quindi dalla esistenza di gruppi laterali di varia natura chimica; la maggior parte delle proteine si comportano come anioni (cariche negative) e durante l'elettroforesi migrano verso l'anodo (polo positivo). La funzione del mezzo di supporto è quella di trattenere il campione minimizzando per quanto possibile la diffusione (funzione passiva) oppure quella di agire da setaccio molecolare consentendo la separazione delle proteine in base alla massa.

Al termine della migrazione elettroforetica le proteine separate devono essere rivelate con metodiche appropriate. Tradizionalmente si usano coloranti specifici quali il Blu di Comassie e il Rosso Ponceau

che colorano praticamente tutte le proteine e consentono di evidenziarle sotto forma di bande sulla striscia del mezzo di supporto.



Inoltre se la proteina in esame è un enzima si può utilizzare una rivelazione di tipo colorimetrico che sfrutta la generazione di colore, se la proteina invece non è un enzima si può rivelare mediante immunofissazione con anticorpi specifici. Una volta colorate le proteine possono essere direttamente visualizzate oppure quantificate con metodo densitometrico: la striscia di acetato viene resa trasparente e sottoposta all'azione di un raggio luminoso che dopo aver attraversato le bande colorate viene raccolto da un detector fotometrico. Il segnale elettrico viene riportato sotto forma di tracciato su carta nel quale alle varie bande corrisponde una serie di picchi di varia altezza e la cui area è proporzionale alla concentrazione della rispettiva proteina nel siero. Nella elettroforesi tradizionale su acetato di cellulosa si riconosce un pattern caratteristico che permette la determinazione delle principali proteine del siero l'albumina e le globuline. Dato che ciascuna frazione proteica si muove con diversa velocità, ciò consente la separazione delle varie frazioni in quadri riconoscibili e misurabili così come di seguito riassunto: l'elettroforesi delle sieroproteine consente di separare le proteine del siero in base alla loro carica elettrica netta. Le proteine separate ed evidenziate mediante una colorazione specifica si distribuiscono a formare un tracciato a bande omogenee denominate albumina, alfa-1, alfa-2, beta e gamma. Ogni banda contiene a sua volta una o più sieroproteine.

Elettroforesi delle proteine del siero

Le proteine del siero costituiscono un insieme molto eterogeneo di molecole sostanzialmente diverse, anche se accomunati da proprietà fisico-chimico e strutturali simili. Le proteine vengono classificate

sulla base della molteplicità dei compiti e delle funzioni che svolgono e che possono essere distinte in regolatorie della pressione colloidale-osmotica, di trasporto, della coagulazione, enzimatiche e immunitarie, strutturali e nutrizionali. La molteplicità dei compiti fisiologici propri delle proteine suggerisce che lo studio del loro modo di agire ha notevole importanza nel campo clinico e diagnostico. Lo studio delle proteine del plasma consente di acquisire informazioni, direttamente ed indirettamente, sul funzionamento di diversi tessuti ed organi e più in generale sullo stato funzionale dell'organismo.

Per l'analisi delle proteine si possono usare numerose metodiche che consentono la separazione, la caratterizzazione e la successiva quantificazione. Uno studio analitico delle proteine è realizzabile sfruttando soprattutto le loro specifiche proprietà fisico-chimiche che si differenziano sulla base della **1. diversa sensibilità** ad agenti precipitanti fisici e chimici (calore, soluzioni saline ipertoniche, metalli pesanti, alcool, reagenti non polari), **2. diversa mobilità** in campi gravitazionali ottenuti mediante ultracentrifugazione, **3. diversa colorabilità** da parte di coloranti specifici, **4. diversa migrabilità** in campi elettrici su diversi substrati (elettroforesi su carta, su acetato di cellulosa, su agarosio, su amido, su acrilamide). Questa ultima caratteristica è quella più generalmente sfruttata nei laboratori diagnostici e tra le metodiche elettroforetiche quella su acetato di cellulosa è stato a lungo il metodo di scelta, mentre quello su agarosio o gel di poliacrilamide è riservato a centri più specializzati.

Qualunque sia il supporto adoperato un campione di siero viene fatto migrare in un campo elettrico e la velocità con cui le proteine si spostano entro il supporto dipende dalla carica netta della molecola, dalla massa oltre che dalla intensità del campo elettrico e dalla resistenza del supporto. La carica della proteina dipende dalla sua composizione in aminoacidi e quindi dalla esistenza di gruppi laterali di varia natura chimica; la maggior parte delle proteine si comportano come anioni (cariche negative) e durante l'elettroforesi migrano verso l'**anodo** (polo positivo). La funzione del mezzo di supporto è quella di trattenere il campione minimizzando per quanto possibile la diffusione (funzione passiva) oppure quella di agire da setaccio molecolare consentendo la separazione delle proteine in base alla massa.

Al termine della migrazione elettroforetica le proteine separate devono essere rivelate con metodiche appropriate. Tradizionalmente si usano coloranti specifici quali il *Blu di Comassie* e il *Rosso Ponceau* che colorano praticamente tutte le proteine e consentono di evidenziarle sotto forma di bande sulla

striscia del mezzo di supporto. Inoltre se la proteina in esame è un enzima si può utilizzare una rivelazione di tipo colorimetrico che sfrutta la generazione di colore, se la proteina invece non è un enzima si può rivelare mediante immunofissazione con anticorpi specifici. Una volta colorate le proteine possono essere direttamente visualizzate oppure quantificate con metodo densitometrico: la striscia di acetato viene resa trasparente e sottoposta all'azione di un raggio luminoso che dopo aver attraversato le bande colorate viene raccolto da un detector fotometrico. Il segnale elettrico viene riportato sotto forma di tracciato su carta nel quale alle varie bande corrisponde una serie di picchi di varia altezza e la cui area è proporzionale alla concentrazione della rispettiva proteina nel siero. Nella elettroforesi tradizionale su acetato di cellulosa si riconosce un pattern caratteristico che permette la determinazione delle principali proteine del siero l'albumina e le globuline. Dato che ciascuna frazione proteica si muove con diversa velocità, ciò consente la separazione delle varie frazioni in quadri riconoscibili e misurabili così come di seguito riassunto: l'elettroforesi delle sieroproteine consente di separare le proteine del siero in base alla loro carica elettrica netta. Le proteine separate ed evidenziate mediante una colorazione specifica si distribuiscono a formare un tracciato a bande omogenee denominate albumina, alfa-1, alfa-2, beta e gamma. Ogni banda contiene a sua volta una o più sieroproteine. Poiché il dosaggio delle singole proteine del siero viene eseguito con tecniche spettrofotometriche o nefelometriche, attualmente il principale impiego dell'elettroforesi è quello della ricerca di componenti monoclonali (CM). I risultati dell'elettroforesi sono espressi sia in termini quantitativi sia in termini descrittivi. I risultati quantitativi riguardano la determinazione in percentuale delle cinque frazioni.

1. L'Albumina, occasionalmente preceduta dalla pre-albumina, legante della tiroxina, viene sintetizzata dal fegato ed è il principale fattore che controlla la pressione colloidale osmotica nel plasma oltre che la funzione di trasporto per ioni e piccole molecole che non sono solubili in acqua, come bilirubina, acidi grassi, ormoni e farmaci.

2. La zona alfa-1 contiene una serie di inibitori delle proteasi dei liquidi biologici tra le quali la più importante è l'alfa-1-antitripsina. La mancanza o la carenza congenita aumenta la suscettibilità ad epatopatie ed enfisema polmonare. Un altro inibitore delle proteasi è l'alfa 1 antichimotripsina che aumenta marcatamente e precocemente nella fase acuta infiammatoria.

3. La zona alfa-2 contiene un certo numero di proteine dotate di varie funzioni fisiologiche tra cui la ceruloplasmina (trasporto del rame) l'aptoglobina (trasporto dell'emoglobina libera, complesso che viene rimosso dal plasma per fagocitosi da parte delle cellule reticolo endoteliali) e la alfa-2 macro globulina con funzioni inibitorie sulle proteasi, ma di scarso interesse clinico.

4. Le β -globuline sono un insieme di proteine di varia natura e funzione tra cui la transferrina (legame e trasporto del ferro), la frazione C3 del complemento e la frazione LDL delle lipoproteine.

5. Le gamma globuline contengono in primo luogo le immunoglobuline plasmatiche (IgG, A, M, D, E) coinvolte nei processi immunitari. In occasione di situazioni patologiche il quadro elettroforetico può subire cambiamenti più o meno marcati. Molti dei **quadri elettroforetici patologici** sono alquanto aspecifici e devono essere valutati assieme ad altre informazioni cliniche o di laboratorio per il corretto inquadramento diagnostico. Nella infiammazione acuta si osserva un aumento della frazione alfa-2 mentre l'albumina è normale e la gamma globuline sono normali o aumentate a seconda del coinvolgimento o meno di agenti infettivi. Nell'infiammazione cronica entrambe le frazioni alfa-1 e alfa-2 sono aumentate mentre la albumina è normale o diminuita e le gamma globuline sono invece sempre aumentate. Un quadro particolare si osserva nelle epatopatie infiammatorie e nella stessa cirrosi: a causa della insufficiente sintesi proteica si ha una forte diminuzione dell'albumina e un aumento diffuso delle gamma globuline ed in particolare della IgA presenti nella zona tra le beta e le gamma che da origine al quadro noto come fusione beta-gamma. Nelle malattie renali caratterizzate da dispersione di proteine nelle urine (sindrome nefrosica) accanto alla ipoalbuminemia si osserva spesso un aumento delle alfa 2 e delle beta globuline.

La parte descrittiva riguarda la segnalazione di bande anomale, principalmente dovute alla presenza di **componenti monoclonali**, vale a dire frammenti di catene immunoglobuliniche prodotte da un clone aberrante di linfociti B. Tale ricerca viene eseguita mediante ispezione visiva, come raccomandato dalla SIBioC (Società Italiana di Biochimica Clinica e di Biologia Molecolare Clinica). In tal modo è possibile apprezzare anche la presenza di lievi bande monoclonali in zona gamma, non osservabili sul tracciato densitometrico.

La conferma o l'esclusione di una componente monoclonale si ottiene solo con la tecnica denominata "**immunofissazione**", che combina la migrazione elettroforetica con la precipitazione selettiva mediante l'uso di antisieri specifici.

La scelta di utilizzare tecniche elettroforetiche ad alta sensibilità, che comportano la segnalazione di piccole bande presumibilmente di tipo monoclonale, va ricercata nel fatto che la componente monoclonale è da considerarsi comunque come un dato importante, da seguire nel tempo. Se all'ispezione visiva non si osservano alterazioni degne di nota, il referto riporta solo i risultati in percentuale delle 5 frazioni elettroforetiche ed il commento "componenti monoclonali non evidenti", senza allegare il tracciato.

Se all'ispezione visiva si evidenziano bande sospette, il tracciato allegato riporterà nelle osservazioni il risultato ottenuto. In particolare: se si osserva una lieve banda che non deforma il tracciato elettroforetico, caso comune delle persone anziane, l'allegato riporta l'osservazione "All'ispezione visiva si evidenzia una lieve banda, che non altera il tracciato densitometrico. E' possibile, a giudizio del medico curante, l'approfondimento diagnostico mediante immunofissazione." In tal caso una freccia indicherà la zona dove è stata osservata la lieve banda. Se si osserva una banda intensa che deforma il tracciato elettroforetico e che può essere quantificata, l'allegato riporta l'osservazione "All'ispezione visiva si evidenzia una banda quantitativamente rilevante per la quale si consiglia l'approfondimento diagnostico mediante immunofissazione." In tal caso l'area della banda verrà colorata ed il tracciato riporterà anche il suo dosaggio in g/dL.

Immunofissazione

É la principale tecnica di identificazione e tipizzazione delle componenti monoclonali (CM). La sua sensibilità nella ricerca delle CM è superiore a quella dell'elettroforesi delle sieroproteine in quanto utilizza anticorpi monoclonali specifici per ogni tipo di CM. Per questo motivo è da preferirsi all'elettroforesi nella ricerca delle piccole CM altrimenti non identificabili nella normale routine di laboratorio. I risultati sono presentati solo in termini descrittivi direttamente sul referto.

In particolare la presenza di componenti monoclonali che non alterano significativamente il tracciato densitometrico è descritta come "lieve componente monoclonale".

Il significato da attribuire alla rilevazione di una CM è complesso e deve essere valutato sia con l'aspetto clinico del paziente al momento della rilevazione che con il monitoraggio nel tempo della progressione della CM.

Poiché la CM è un marcatore spesso preclinico di decenni è importante che il laboratorio utilizzi tecniche elettroforetiche estremamente sensibili nella routine quotidiana e l'immunofissazione come tecnica elettiva nella ricerca e nella tipizzazione delle CM. E' importante comunque sottolineare che circa l'80% delle CM di riscontro occasionale è di modestissime dimensioni: non misurabile

densitometricamente nel 59% dei casi.

Le gammopatie monoclonali possono essere associate a forme cliniche occulte (come nelle gammopatie monoclonali di incerto significato (MGUS) o nelle gammopatie monoclonali transitorie), a forme clinicamente manifeste dovute alla presenza del clone neoplastico (es. **mieloma multiplo**, macroglobulinemia di Waldenström, leucemia linfatica cronica e malattia da catene pesanti), a forme clinicamente manifeste dovute agli effetti patologici delle CM (es. amiloidosi, malattia da deposizione di immunoglobuline o catene leggere systemic capillary leak syndrome). Pertanto una CM può essere indice di svariate condizioni.

Attualmente non vi sono tecniche in grado di discriminare precocemente le forme benigne da quelle maligne: pertanto la progressione clinica rimane il più valido criterio differenziale.

Elettroforesi capillare. A fronte di una richiesta sempre più pressante di tecniche di separazione e rivelazione particolarmente sensibili, sono state realizzate delle apparecchiature per elettroforesi capillare utilizzate principalmente nella ricerca biologica, ma anche per scopi clinici. Questo sistema, infatti, consente di raggiungere sensibilità elevate dell'ordine delle femtomoli (10^{-15} moli). Lo strumento utilizza un capillare di diametro 25-200 μm e di lunghezza 25-50 centimetri, riempito con un idoneo supporto, le cui estremità sono immerse in una soluzione elettrolitica, un alimentatore in grado di fornire potenziali elevati fino 30.000 V ed un sistema di rivelazione fotometrico che legge direttamente in colonna. La deposizione di minime quantità di campione, dell'ordine dei nanolitri, avviene di solito mediante un sistema idraulico