
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

CARLO DOLCINI, BIANCAMARIA DOLCINI

Impiego del blu timolo per la colorazione delle proteine separate mediante elettroforesi su carta

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 34 (1963), n.1, p. 75–76.*

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1963_8_34_1_75_0

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Fisiologia (Chimica fisiologica). — *Impiego del blu timolo per la colorazione delle proteine separate mediante elettroforesi su carta* (*). Nota di CARLO DOLCINI e BIANCAMARIA DOLCINI, presentata (**) dal Socio G. AMANTEA.

La diffusione delle tecniche di determinazione quantitativa delle proteine separate all'elettroforesi su carta ed evidenziate mediante impiego di coloranti quali *Amido nero 10 B*, *blu di bromofenolo*, *Azocarminio B* ed altri, che si adsorbono sul materiale proteico denaturato, è in continuo sviluppo, nonostante le critiche e le riserve che da qualche tempo e da più parti vengono avanzate in proposito.

Onde portare un contributo al chiarimento di una situazione indubbiamente contraddittoria, abbiamo di recente iniziato l'esecuzione di un piano di lavoro articolantesi nei punti seguenti: 1° Definizione teorico-sperimentale dei criteri che devono essere soddisfatti perchè un metodo di colorazione possa essere utilizzato a fini quantitativi nelle due modalità in cui tale possibilità sussiste, cioè: *a*) fotometria diretta delle strisce di carta opportunamente diafanizzate e *b*) fotometria degli eluati. 2° Ampliamento del campo di scelta dei materiali usati. A questo riguardo ci siamo occupati sia di coloranti del tipo classico, fissantisi cioè alle proteine per adsorbimento, sia di sostanze reagenti in via chimica con il materiale da colorare.

I risultati sperimentali già conseguiti ⁽¹⁾ in rapporto al punto 1-a del programma ci hanno permesso di dimostrare la dipendenza della *colorabilità* ⁽²⁾ dalla *concentrazione superficiale* del materiale proteico sulla carta nel caso dell'impiego di *amido nero*, *blu di bromofenolo*, *verde cresolo* e *verde di lissamina*. Tale reperto indica esplicitamente l'inadeguatezza a fini quantitativi delle tecniche ricordate e sottolinea la necessità dello sviluppo della ricerca nella direzione indicata al punto 2.

I risultati esposti in questa Nota si riferiscono appunto a tale indirizzo e si aggiungono a quelli di cui già abbiamo dato notizia, relativi alle tecniche d'uso del *blu di bromotimolo* ⁽³⁾, e dell'*etero-poli-acido fosfo-molibdico giallo* ⁽⁴⁾.

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Fisiologia Umana dell'Università di Perugia.

(**) Nella seduta del 12 gennaio 1963.

(1) C. DOLCINI e B. DOLCINI, « Rivista di Biologia », 53, 127 (1961).

(2) Per *colorabilità* (C) si intende il rapporto tra la *quantità del colorante* Q (col.) e la *quantità di proteina colorata* Q (pr.).

(3) C. DOLCINI e B. DOLCINI, Questi « Rendiconti », 30, 271 (1961).

(4) C. DOLCINI e B. DOLCINI, Questi « Rendiconti », 30, 392 (1961).

TECNICA D'IMPIEGO DEL BLU TIMOLO.

Il *blu timolo* (*timol-sulfon-ftaleina*, $C_{27}H_{30}O_5S$), generalmente usato come indicatore di pH, si presenta in soluzione acida (pH 1,2-2,8) di colore arancione, in soluzione alcalina (pH 8-9,6) di colore azzurro.

Saggi preliminari ci avevano mostrato che la sostanza disciolta in metanolo si adsorbe sulle proteine deposte su carta da elettroforesi, colorando debolmente anche il fondo, e che l'eccesso del colore delle macchie e della carta è facilmente asportabile mediante lavaggi in acqua corrente. Tali risultati, la facile decolorazione del fondo e quindi la colorazione elettiva delle proteine, ci hanno poi indotto a mettere a punto la tecnica che descriviamo di seguito.

Materiale proteico e procedimento di denaturazione. - Abbiamo fatto costantemente uso di *ovo-albumina* cristallizzata secondo il metodo di Kekwich e Cannan. ⁽⁵⁾ La denaturazione era ottenuta per immersione delle strisce d'elettroforesi, dopo passaggio in corrente d'aria calda, in una *soluzione satura di HgCl₂*; il trattamento, della durata di 1 h, fa sì che i rapporti del materiale proteico con la carta risultino più stabili, il che facilita le successive operazioni di lavaggio.

Colorazione. - Si ottiene mediante 6h di trattamento delle strisce in un bagno di *blu timolo* (prod. E. Merk, Darmstadt) *allo 0,2% in metanolo*. Le macchie proteiche ed in minor grado anche il fondo assumono una tinta arancione.

Decolorazione. - L'eccesso di *blu timolo* fissato dalle proteine e trattenuto dal fondo viene asportato mediante lavaggio in acqua corrente protratto per 30', tempo necessario perché nel bagno non appaia più traccia di colore.

Eluzione. - Si ottiene in 3h con una soluzione di *metanolo-NaOH 4%* in parti uguali (V : V). L'eluato si presenta di colore blu. Le letture fotometriche si eseguono ad una lunghezza d'onda pari a 600 m μ ; la legge di Lambert e Beer è valida fino a concentrazioni della sostanza pari a 13 γ /ml.

L'impiego della tecnica descritta per la rivelazione delle frazioni proteiche separate all'elettroforesi su carta fornisce risultati indubbiamente non inferiori a quelli ottenibili con gli altri metodi tuttora in uso, metodi che, come abbiamo ricordato, sono assolutamente inadeguati per l'impiego a fini quantitativi.

Per il *blu timolo* stiamo appunto saggiando tale possibilità d'uso mediante esperimenti predisposti in modo da rivelare il comportamento della *colorabilità* in funzione della *concentrazione superficiale* che il materiale proteico (frazioni pure di plasma-proteine umane) assume sulla carta da elettroforesi.

(5) KEKWICH e CANNAN, « Biochem. J. », 30, 227 (1936).