
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

CARLO DOLCINI, BIANCAMARIA DOLCINI

Impiego del beta-naftol-violetto per la colorazione delle proteine separate all'elettroforesi su carta

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 34 (1963), n.3, p.
312-313.*

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1963_8_34_3_312_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 beta-naftol-violetto per la colorazione delle proteine separate all'elettroforesi su carta* (*). Nota di CARLO DOLCINI e BIANCAMARIA DOLCINI, presentata (**) dal Socio G. AMANTEA.

Sempre più numerosi compaiono in letteratura lavori eseguiti usando per determinazioni quantitative dirette od eseguite sugli eluati i metodi ormai classici di sviluppo dei ferogrammi, nonostante le critiche e le riserve che da qualche tempo e da più parti vengono avanzate nei confronti di tale applicazione, pienamente giustificata soltanto entro i limiti della rivelazione qualitativa dei materiali proteici separati all'elettroforesi su carta (1).

Ma per le critiche e le riserve di cui sopra si può affermare come non sempre siano sufficientemente chiare e radicali, spesso concludendosi con proposte di soluzioni assolutamente parziali - vedi tutti i lavori che si occupano dei fattori di correzione - e ciò, invece di indurre a maggior ponderazione, incoraggia addirittura a procedere nella direzione errata, facendo apparire fondata su solide basi, perché molto discussa e studiata, una tecnica i cui presupposti essenziali propongono problemi ancora da risolvere: ed es. quello relativo al reperimento di un colorante tale per cui la *colorabilità* (C), intesa come rapporto tra *quantità del colorante* $Q_{(col.)}$ e *quantità di proteina colorata* $Q_{(pr.)}$, sia *costante*, cioè non venga influenzata da fattori che intervengono negli esperimenti di separazione elettroforetica su supporto solido.

In tale situazione il nostro Istituto ha iniziato l'esecuzione di un piano di lavoro articolantesi nei seguenti punti:

1° definizione teorico-sperimentale dei criteri che devono essere soddisfatti perché un metodo di colorazione possa essere utilizzato a scopi quantitativi nelle due modalità in cui tale possibilità sussiste, fotometria diretta delle strisce di carta opportunamente diafanizzate e fotometria degli eluati;

2° ampliamento del campo di scelta dei materiali usati, sia del tipo classico, coloranti che si fissano alle proteine per adsorbimento, sia di sostanze reagenti con il materiale da colorare in via chimica, nella direzione cioè indicata da Martin (2), che ha recentemente proposto una tecnica di diazotazione. Studi e ricerche relativi a quanto di cui al punto 1° ci hanno permesso di accertare come $C = Q_{(col.)}/Q_{(pr.)}$ varii in funzione della *concentrazione superficiale* che il materiale proteico assume sulla carta d'elettroforesi, nel caso dell'impiego dei coloranti *blu di bromofenolo, amido nero, verde cresolo*,

(*) 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 », 30, 127 (1961).

(2) N. H. MARTIN, Ciba Foundation, *Symposium on Electrophoresis*, 165 (1956).

verde di lissamina, rendendo le tecniche relative manifestamente inadeguate per determinazione quantitative ⁽¹⁾; e ciò giustifica lo sviluppo delle ricerche di cui al punto 2° del programma ⁽³⁾ ⁽⁴⁾: in questa Nota presentiamo appunto risultati ottenuti lavorando in tale direzione.

Riferiamo di seguito i dettagli di tecnica del procedimento studiato, precisando che nella messa a punto abbiamo fatto costantemente uso di *ovoalbumina* cristallizzata secondo il metodo di Kekwich e Cannan ⁽⁵⁾, e che per la denaturazione del materiale deposto sulle strisce di carta da filtro abbiamo proceduto all'immersione delle stesse, previo passaggio in corrente di aria calda, in una *soluzione satura di HgCl₂*; tale trattamento, della durata di un'ora, completa la denaturazione e fa sì che i rapporti del materiale proteico con la carta risultino più stabili, il che facilita le successive operazioni di lavaggio.

IMPIEGO DEL BETA-NAFTOL-VIOLETTO.

1) *Colorazione*. — Si ottiene mediante immersione delle strisce per 20' in un bagno costituito da *beta-naftol-violetto* allo 0,1% in alcool metilico.

2) *Decolorazione del fondo ed asportazione dell'eccesso della sostanza dalle macchie*. — Si ottiene mediante lavaggi delle strisce in acqua corrente, nel tempo di 30' circa. Dopo tale trattamento le macchie si presentano colorate di rosa pallido ed il fondo completamente bianco.

3) *Eluzione*. — Si ottiene in 3 h con *metanolo-NaOH* 4% in parti uguali (V : V).

4) Per misure densitometriche dirette è opportuno far virare le macchie mediante nebulizzazione di una soluzione alcalina costituita da NaOH allo 0,01% e contenente NaCl al 10%.

5) Le letture fotometriche degli eluati si effettuano ad una lunghezza d'onda compresa tra 500–540 m μ . Alla lunghezza d'onda di massima estinzione, pari a 525 m μ la legge di Lambert e Beer è valida fino a concentrazione del colorante di 13 γ /ml.

I risultati di cui già disponiamo comprovano l'idoneità e l'efficienza del *beta-naftol-violetto* per lo sviluppo dei ferogrammi proteici; prima di prendere in considerazione l'eventuale impiego della tecnica a scopi quantitativi, attendiamo i risultati di ricerche in corso, relative al comportamento della *colorabilità* in funzione della *concentrazione superficiale*, eseguite su frazioni isolate di plasma-proteine umane, deposte su carta d'elettroforesi, denaturate al calore e colorate con *beta-naftol-violetto* secondo le modalità riferite.

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

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

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