
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

CARLO DOLCINI, BIANCAMARIA DOLCINI

Impiego della para-xilenol-sulfon—ftaleina 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.4, p. 447-448.

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1963_8_34_4_447_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 della para-xilenol-sulfon-ftaleina per la colorazione delle proteine separate mediante elettroforesi su carta* ^(*). Nota di CARLO DOLCINI e BIANCAMARIA DOLCINI, presentata ^(**) dal Socio G. AMANTEA.

Abbiamo già brevemente riferito in precedenti Note ^{(1) (2) (3)}, e dettagliatamente discusso in un recente lavoro ⁽⁴⁾ le ragioni che ci hanno indotto ad intraprendere ricerche sistematiche sulle tecniche di determinazione quantitativa delle frazioni proteiche separate mediante elettroforesi su carta.

In tali occasioni abbiamo anche illustrato il programma di lavoro che prevede, tra l'altro, l'estensione del campo di scelta dei materiali coloranti in considerazione della dimostrata inefficienza di quelli di più comune impiego, *amido nero 10 B*, *blu di bromofenolo*, ecc. ⁽⁴⁾, per le determinazioni quantitative. In questa parte del programma si inseriscono appunto i risultati di cui riferiamo nella presente nota.

TECNICA D'IMPIEGO DEL BLU DI PARA-XILENOLO.

Saggi preliminari, eseguiti con *blu di para-xilenolo* (*para-xilenol-sulfon-ftaleina*, $C_{23}H_{22}O_5S$, prodotto E. Merck, Darmstadt, sostanza generalmente impiegata come indicatore di pH) in soluzione alcoolica - 0,1% in metanolo - davano risultati positivi. Era infatti possibile ottenere la colorazione di proteine deposte in macchie su carta da filtro e denaturate, nonché, successivamente, la completa decolorazione del fondo mediante semplici lavaggi in acqua corrente. Su tali basi abbiamo messo a punto una tecnica d'impiego del *blu di para-xilenolo*, della quale diamo particolareggiata descrizione.

Materiale proteico e procedimento di denaturazione. - Abbiamo usato *ovoalbumina*, cristallizzata secondo la tecnica di Kekwich e Cannan ⁽⁵⁾ e frazioni di sieroproteine umane: *albumina* (soluzione stock al 30% - prodotta dalla Pentex Incorporated Kankakee, Illinois, Lot n. 47 FO 1), *alfa-globulina* (Fr. IV Lot n. 50 GO 8), *gamma-globulina* (Fr. II Lot 50 GO 8).

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

(**) Nella seduta del 12 gennaio 1963.

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

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

(3) C. DOLCINI e B. DOLCINI, questi « Rendiconti », 34, fasc. I (1963).

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

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

La denaturazione delle proteine, deposte in macchie su strisce di carta *Wathman I*, era ottenuta con un trattamento in corrente di aria calda e completata mediante immersione della durata di 1 h, in *soluzione satura di HgCl₂*.

Colorazione. - Si ottiene trattando le strisce per 12 h in un bagno di *para-xilenolo all'1% in metanolo*; le macchie proteiche assumono una tinta marrone.

Decolorazione. - L'eccesso di colorante trattenuto dalle macchie e dal fondo viene eliminato mediante lavaggio delle strisce in acqua corrente in 30'. Al riguardo è necessario fare molta attenzione a che il getto d'acqua non investa mai direttamente la superficie comprendente le macchie proteiche. Noi abbiamo eseguito il passaggio sospendendo le strisce in un cilindro e facendo pervenire l'acqua di rinnovo del bagno da un tubo immerso fino al fondo del recipiente.

Eluzione. - Si ottiene facilmente come di consueto in 3 h con *metanolo-NaOH 4%* in parti uguali (V : V). L'eluato, di colore blu, dà alle letture fotometriche valori massimi di densità ottica per lunghezze d'onda comprese tra 522-515 m μ . Qualora la colorazione blu che si sviluppa in tale ambiente fortemente alcalino non fosse abbastanza intensa, si può procedere mescolando una aliquota dell'eluato con tampone HCl-KCl di pH 1,5 e di forza ionica ($\mu = 15$); si ottiene così per viraggio una intensa colorazione rossa. In tal caso le letture fotometriche si eseguono a lunghezza d'onda di 460 m μ .

Fotometria diretta. - Per la fotometria diretta delle strisce non è necessario modificare la colorazione marrone che le macchie proteiche presentano al termine del procedimento descritto, colorazione di per sé abbastanza intensa e quindi tale da fornire buoni valori di densità ottica.

L'intensità della colorazione delle macchie, la perfetta decolorazione del fondo e quindi la bontà del contrasto che ne deriva, fanno sì che la tecnica descritta appaia al momento una delle migliori per la rivelazione o determinazione qualitativa delle frazioni proteiche separate all'elettroforesi su carta. Resta da vedere le prestazioni ottenibili con la medesima alle determinazioni quantitative; al riguardo vogliamo riferirci al nostro reperto ⁽⁶⁾ relativo alla dipendenza della *Colorabilità* (C), intesa come rapporto tra $Q_{(col.)}$, *quantità del colorante* e $Q_{(pr.)}$, *quantità di proteina*, dalla *concentrazione superficiale* che il materiale proteico assume sulla carta (Conc._(pr.)), relativamente all'impiego di coloranti che si fissano alle proteine per adsorbimento, in particolare: *amido nero 10 B*, *blu di bromofenolo*, ecc. Siccome evidentemente il *para-xilenolo* si fissa alle proteine con un meccanismo del genere, si tratta di poter escludere sperimentalmente tale eventualità, prima di procedere a determinazioni quantitative con la tecnica descritta; in tale direzione appunto procedono le ricerche che vengono eseguite impiegando le già ricordate frazioni proteiche.

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