
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

CARLO DOLCINI, BIANCAMARIA DOLCINI

Riduzione del ferricianuro di potassio in presenza di cloruro ferrico a ferrocianuro ferrico (blu di Prussia) da parte delle frazioni proteiche 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.6, p. 700–702.

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1963_8_34_6_700_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). — *Riduzione del ferricianuro di potassio in presenza di cloruro ferrico a ferrocianuro ferrico (blu di Prussia) da parte delle frazioni proteiche separate all'elettroforesi su carta* (*). Nota di CARLO DOLCINI e BIANCAMARIA DOLCINI, presentata (**) dal Socio G. AMANTEA.

Nel programma delle ricerche che il nostro Istituto ha intraprese sulle questioni controverse in rapporto con la colorazione e soprattutto con la determinazione quantitativa delle frazioni proteiche separate all'elettroforesi su carta e di cui riferiamo in precedenti Note ⁽¹⁾ ⁽²⁾ ⁽³⁾ ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾ e più in particolare in altro lavoro ⁽⁶⁾, è previsto l'ampliamento del campo di scelta dei materiali coloranti usati, non limitatamente alle sostanze del tipo ormai ben noto, cioè fissantisi alle proteine per adsorbimento, bensì secondo l'indirizzo della sperimentazione di reagenti in grado di colorare le proteine in via chimica. Prima di riferire i risultati ottenuti in relazione alla seconda delle specificate possibilità, ricordiamo come ci si sia indirizzati in tal senso tenendo conto del nostro reperto relativo alla dipendenza della *colorabilità* (C) dalla *concentrazione superficiale* (*Conc. Sup.*) che il materiale proteico assume sulla carta in tutti i casi d'impiego di coloranti del primo tipo, ad esempio *blu di bromofenolo*, *amido nero*, etc.; infatti la variabilità di (C) compromette definitivamente ogni possibilità di determinazione fotometriche quantitative sia dirette che effettuate sugli eluati; il fatto poi che tale variabilità sia in dipendenza di un fattore (*Conc. Sup.*) incontrollabile negli usuali procedimenti di separazione elettroforetica, porta ad escludere a priori ogni tentativo di tener conto di tale variabilità ⁽⁶⁾.

Abbiamo pensato di utilizzare al nostro scopo il potere riducente delle proteine in gran parte dovuto alla presenza nella loro molecola dei gruppi —SH dell'amminoacido *cisteina*; in letteratura sono descritti metodi atti a rilevare mediante reazioni colorate la presenza dei gruppi —SH ed —SS—, potendo questi ultimi essere trasformati in —SH per trattamento con *cianuro di potassio*. Di tali metodi quelli proposti da Joyet e Bavergne ⁽⁷⁾, da Mattei e Dulzetto ⁽⁸⁾, da Giraud e Bulliard ⁽⁹⁾ si fondano sulla riduzione

(*) 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, B. DOLCINI, Questi « Rendiconti » 30, 392 (1961).

(3) C. DOLCINI, B. DOLCINI, Questi « Rendiconti », 34, fasc. 1 (1963).

(4) C. DOLCINI, B. DOLCINI, Questi « Rendiconti », 34, fasc. 3 (1963).

(5) C. DOLCINI, B. DOLCINI, Questi « Rendiconti », 34, fasc. 4 (1963).

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

(7) JOYET-BAVERGNE, « Biol. », 97 (1927); « Biol. », 98 (1928).

(8) MATTEI-DULZETTO, « Accademia Lincei » 8 (1928).

(9) GIRAUD-BULLIARD, « C. R. Aff. Anat. », 23 (1928); 24 (1929).

del *nitroprussiato sodico* in soluzione alcoolica. Con le ricordate tecniche abbiamo comunque ottenuto risultati negativi, nel senso che la colorazione rossa che si sviluppa sulle macchie proteiche deposte sulle strisce di carta da elettroforesi e denaturate al calore, è fugace; d'altra parte il procedimento proposto da Giraud e Bulliard che prevede, onde rendere stabile la colorazione, un trattamento preventivo con *acetato di zinco al 5%*, presenta l'inconveniente di ridurre la colorazione al di sotto dei limiti di sensibilità utilizzabili in pratica.

Chevremont e Fredericq ⁽¹⁰⁾ hanno descritto un metodo per la rivelazione dei gruppi —SH che utilizza il *ferricianuro di K*, il quale riducendosi in presenza di *cloruro ferrico*, si trasforma in *ferrocianuro ferrico* di colore blu (*blu di Prussia*).

I saggi preliminari condotti immergendo le strisce comprendenti macchie di proteine denaturate al calore in una soluzione costituita da *ferricianuro di K* allo 0,1% e *cloruro ferrico* all'1% in proporzione di 1 : 3, ci fornirono buoni risultati; altre prove eseguite trattando come sopra macchie di *ovoalbumina* denaturata in un bagno della durata di 1h in una *soluzione satura di HgCl₂*, ci consentirono poi di aumentare la sensibilità del *test* e portarla a limiti tali da permettere l'applicazione del metodo, senza svantaggi nei confronti delle tecniche già esistenti. L'intensità della colorazione non aumenta oltre la 12^{ma} ora di trattamento.

Ed appunto i risultati positivi ottenuti alle prove preliminari descritte ci hanno indotto a perfezionare una tecnica d'impiego del *ferricianuro di K* per la colorazione delle proteine sulla carta d'elettroforesi, tecnica di cui esponiamo di seguito i punti essenziali.

Denaturazione del materiale proteico. — Abbiamo fatto costantemente uso di *ovoalbumina* cristallizzata secondo la tecnica di Kekwich e Cannan ⁽¹¹⁾; aliquote di una soluzione della proteina al 3% erano deposte in macchie su strisce di carta *Wathman 1*, lavate in precedenza con acqua bidistillata e con versene. La denaturazione delle proteine era ottenuta mediante essiccamento delle strisce in corrente di aria calda e successivo bagno di 1h in una *soluzione acquosa satura di HgCl₂*.

Colorazione. — Si realizza immergendo le strisce in un bagno ottenuto mescolando *ferricianuro di K* allo 0,1% in acqua e *cloruro ferrico* all'1% in acqua, in proporzione di 1 : 3. Possibilmente le strisce vanno mantenute in posizione verticale nel recipiente di reazione e questo tenuto al buio. Dopo 12h di tale trattamento l'intensità della colorazione blu a livello delle macchie proteiche non aumenta ulteriormente.

Lavaggio. — Si esegue per 1h in acqua corrente onde asportare i reattivi ed il *ferricianuro ferrico* formatosi. Si fa seguire essiccamento in corrente di aria calda. Poiché la carta trattiene un po' di *ferricianuro ferrico* che successivamente all'aria si riduce, non si ottiene una completa decolorazione

(10) CHEVREMONT-FREDERICQ, « A. Biol. », 54 (1943); « Act. Biol. Belg. », 3 (1943).

(11) KEKWICH-CANNAN, « Biochem. J. », 30, 227 (1936).

del fondo che si presenta pertanto debolmente azzurro; il contrasto comune con le macchie proteiche è molto buono.

Eluzione. - Per quanto nei trattati di chimica sia riferito che il ferrocianuro ferrico è solubile in H_2SO_4 , HNO_3 *diluiti*, in HCl ed in *acido ossalico*, non ci è stato possibile eluire neppure in parte le nostre macchie in tali solventi. Il *blu di Prussia* rimane disciolto per qualche ora in H_2SO_4 quando si forma direttamente in tale ambiente. Non essendo pertanto riusciti in alcun modo ad eluire le macchie, abbiamo preso in considerazione possibilità chimiche di attacco della sostanza e di determinazione indiretta mediante dosaggi del ferro. Questi ultimi possono essere ottenuti dopo trattamento delle macchie con HCl *concentrato*, che libera ioni ferrici, per la determinazione dei quali si può procedere fotometricamente con la reazione del *solfocianato di K*, o mediante titolazione complessometrica.

In merito alla tecnica riferita e della quale per il momento possiamo garantire la bontà limitatamente alla rivelazione qualitativa dei materiali proteici, le ricerche continuano con lo studio della (C) in funzione della *Conc. Sup.* La costanza di (C) rappresenta infatti il requisito essenziale che legittimerebbe l'impiego di una tecnica per determinazioni quantitative.