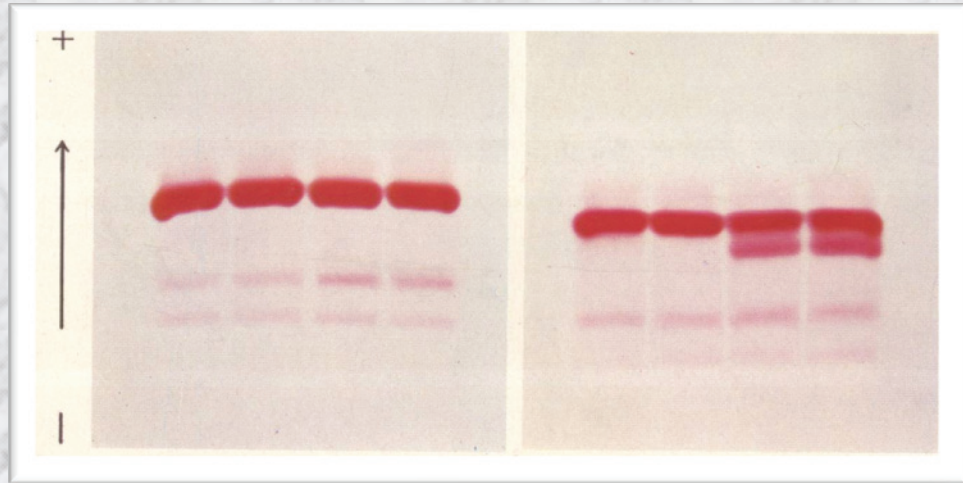
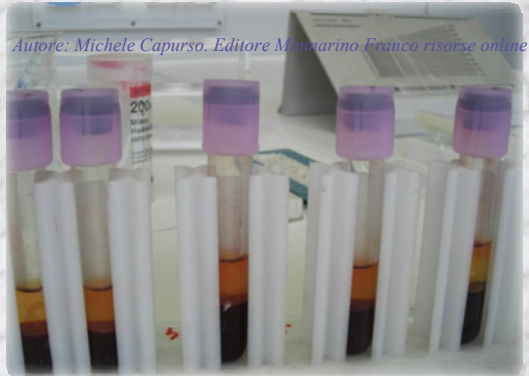


ANALISI CLINICHE

ELETTROFORESI



ANALISI CLINICHE

Elettroforesi

PRINCIPIO DELL'ELETTROFORESI

L'elettroforesi è un metodo di separazione basato sulla diversa velocità di migrazione di varie sostanze elettricamente cariche, quando esse si trovano sotto l'influenza di un campo elettrico e sono poste nelle condizioni di potersi spostare.

Molte sostanze infatti, hanno nella molecola dei gruppi facilmente ionizzabili quando siano portate in soluzione; esse possono avere gruppi o tutti ACIDI o tutti BASICI o un insieme dei due.

Le molecole ionizzate, se hanno cariche tutte o in stragrande maggioranza dello stesso segno, si comportano come dei grossi ioni e quindi si muovono verso il polo positivo del campo elettrico se hanno carica negativa, e viceversa se hanno carica positiva.

Questo è il fenomeno *elettrocinetico* che spiega la conducibilità ionica degli elettroliti e, l'elettroforesi ne è un caso particolare.

ANALISI CLINICHE

Elettroforesi

MOBILITA' DELLE PARTICELLE

E' funzione diretta:

- della **intensità del campo elettrico** (tensione agli elettrodi, conducibilità del supporto);
- della **carica elettrostatica netta** (cioè la differenza fra le cariche opposte della particella);
- della **temperatura** dell'elettrolita.

E' funzione inversa:

- del **peso**, della **dimensione** e della **forma** della particella;
- della **viscosità** del mezzo in cui si muove.

La mobilità elettroforetica è caratteristica di ogni sostanza e la sua misura è data dalla distanza percorsa da una particella in un dato intervallo di tempo quando, sottoposta ad un certo valore di d.d.p.

ANALISI CLINICHE

Elettroforesi

Applicando una differenza di potenziale opportuna le molecole dotate di carica elettrica migrano in base alla loro mobilità (μ).

Tale parametro è definito dalla seguente relazione:

$$\mu = v / E$$

dove v = velocità espressa in cm/sec

E = volt/cm

poiché : $v = E \times Q / 6\pi\eta\gamma$ dove η = viscosità del mezzo

Q = numero di cariche elettriche

γ = raggio ionico

e poiché η ha un determinato valore per ogni analisi, tutto il prodotto $6\pi\eta$ è una costante che si può indicare con K . Quindi

$$\mu = Q / K\gamma$$

Appare chiaro che la mobilità elettroforetica dipende *dal rapporto tra carica e raggio della molecola.*

ANALISI CLINICHE

Elettroforesi

Dalla relazione $\mu = v/E$ si deduce che ad un aumento di voltaggio consegue un aumento della velocità di migrazione e quindi una riduzione del tempo necessario per la separazione. Un voltaggio superiore a quello consigliato per le varie procedure, non è raccomandabile poiché comporterebbe una maggiore corrente con conseguente aumento del calore per effetto Joule. Questo calore potrebbe denaturare molecole proteiche e far evaporare il tampone dalla striscia determinando conseguenze negative sulla separazione.

Il tempo di migrazione è *funzione della lunghezza della striscia, della distanza di migrazione che si vuole ottenere, del voltaggio applicato e della mobilità elettroforetica* secondo la seguente relazione:

$$t = l \times d / E \times \mu$$

dove l = lunghezza della striscia

d = distanza di migrazione

E = voltaggio applicato

μ = mobilità elettroforetica

ANALISI CLINICHE

Elettroforesi

TECNICHE ELETTROFORETICHE

Le tecniche elettroforetiche si possono distinguere in due grandi gruppi:

-ELETTROFORESI IN FASE LIBERA

-ELETTROFORESI ZONALE

Classificata in base al tipo di supporto che può essere:

- a) liquido (per elettroforesi capillare)
- b) solido (carta e acetato di cellulosa) e agarosio ,c) gel (agar poliacrilammide)

ANALISI CLINICHE

Elettroforesi

ELETTROFORESI IN FASE LIBERA

La migrazione delle particelle avviene liberamente in un dato liquido (tampono) contenuto in un tubo ad U alla cui estremità è applicata una d.d.p.

Le particelle si dispongono in zone diverse lungo le bande del tubo a seconda dell'attrazione subita da parte degli elettrodi in funzione della loro carica.

Le diverse frazioni vengono valutate in modo piuttosto complesso, misurando la variazione dell'indice di rifrazione della soluzione in corrispondenza delle zone di localizzazione delle diverse frazioni.

Questo metodo, non è più usato in quanto richiede apparecchiature costose, molto materiale e molto tempo.

ANALISI CLINICHE

Elettroforesi

ELETTROFORESI ZONALE

La migrazione avviene su un supporto solido poroso imbevuto di tampone che permette il passaggio di corrente e quindi la separazione delle varie specie molecolari a diversa mobilità in tratti ben distinti, da cui il nome di elettroforesi zonale.

L'acetato di cellulosa è attualmente il mezzo più diffuso per l'analisi elettroforetica; grazie alle sue caratteristiche di praticità, versatilità di impiego ed al suo elevato potere risolutivo, ha sostituito altri mezzi quali: la carta, l'amido, l'agar, la poliacrilammide, l'agarosio.

Ha inoltre il vantaggio di poter essere trasparentizzato se trattato con una miscela di alcool metilico e acido acetico in proporzione di 86 cc. e 14 cc.

L'agente trasparentizzante è l'acido acetico, questo trasforma l'acetato di cellulosa in celluloido.

La separazione in bande ben distinte permette di seguire con facilità i successivi passaggi analitici (colorazione, quantificazione delle singole frazioni).

ANALISI CLINICHE

Esperienza di
laboratorio

Elettroforesi dell'emoglobina

INTRODUZIONE

L'emoglobina è una proteina coniugata costituita da un gruppo *prostetico*, l'*EME*, che è un complesso ferroporfirinico e da una componente *proteica*, la *GLOBINA*.

Negli individui normali sono presenti tre tipi di Hb: **A1, A2, F.**

Essendo il gruppo eme identico in tutte le varianti di Hb umana, è la parte proteica, costituita da un tetramero di catene polipeptidiche, che ne determina le differenze strutturali.

Le emoglobine umane cambiano a seconda degli stadi di sviluppo.

L'elettroforesi della emoglobina ci consente di controllare **anomalie qualitative** (presenza di emoglobine anomale e patologiche) e **anomalie quantitative** (aumento di HbA2 e HbF).

ANALISI CLINICHE

Esperienza di
laboratorio

Elettroforesi dell'emoglobina

PRINCIPIO

La separazione delle emoglobine è basata sulle proprietà di carica elettrica della globina (eteroproteina associata a un gruppo prostetico chiamato "eme" contenente ferro). La globina può possedere una carica globale positiva o negativa come risultato delle differenti cariche elettriche degli aminoacidi costituenti la proteina.

Mutazioni sulla catena della globina introducono modifiche di carica elettrica per cui si hanno differenze di migrazione che permettono di evidenziare le anomalie.

ANALISI CLINICHE

Esperienza di laboratorio

Elettroforesi dell'emoglobina

Materiale necessario

Micropipetta
Vaschette da colorazione
Pinza
Centrifuga
Camera elettroforetica
Applicatore semimicro
Ponte
Alimentatore
Agitatore a piatto piano rotante
Stufa
Fotodensitometro

Reagenti

Soluzione fisiologica
Toluolo o cloroformio
Tampone pH 9
Colorante Rosso Ponceau:
(sciogliere 0,5 g in polvere in 100 ml di acido tricloroacetico 5%)
Decolorante:
(acido acetico 5%)
Trasparentizzante:
(soluzione composta da 86 ml di metanolo e 14 ml di acido acetico).

ANALISI CLINICHE

1° FASE: Preparazione dell'emolisato

Il sangue eparinato o trattato con EDTA o altri anticoagulanti, deve essere usato entro poche ore dal prelievo.

Il campione dovrebbe essere contrassegnato con i dati di identificazione, età, sesso, osservazioni cliniche ed ematologiche, quindi sottoposto alle seguenti operazioni di preparazione.

- Centrifugare per 5' a 3000 giri per separare il plasma dalla parte corpuscolata.
- Aspirare il plasma e i globuli bianchi.
- Lavare i globuli rossi sospendendo 1 volume di globuli rossi in 4-5 volumi di soluzione fisiologica (NaCl allo 0,9%).
- Centrifugare a 3000 giri per 5' e aspirare il sovrantante.
- Ripetere il lavaggio 4-5 volte.
- Lisare i globuli sospendendo 1 volume di globuli rossi in 1,5 volumi di H₂O + 0,5 volumi di toluolo o cloroformio.
- Agitare energicamente.
- Centrifugare 15-20' a 5000 giri ed eventualmente filtrare in modo da ottenere un emolisato perfettamente limpido.

Controllare colorimetricamente la concentrazione di emoglobina che dovrebbe essere circa 10 gr/100 ml.

ANALISI CLINICHE

2° FASE: Esecuzione dell'elettroforesi

- Tamponare le strisce per 15 minuti. Una lunga permanenza delle strisce provoca una deacetilazione che può rendere difficile o incompleta la trasparentizzazione.
- Eliminare l'eccesso di tampone asciugando leggermente le strisce tra due fogli di carta da filtro; porle quindi sul ponte con la superficie penetrabile rivolta verso l'alto (coincide con la faccia meno lucida, contrassegnata dall'angolo smussato in basso a destra).
- Bloccare le strisce tenute tese con un ferma strisce; introdurre il ponte nella camera nella quale è stato posto una quantità sufficiente di tampone in entrambi gli scomparti.

ANALISI CLINICHE

2° FASE: Esecuzione dell'elettroforesi

Deposizione del campione

-Servendosi dell'applicatore semimicro, caricare lo stesso con una piccola quantità di emolisato. Tenendo questo a contatto con la superficie della striscia a circa 2 cm dal bordo negativo, effettuare la semina. La posizione del punto di deposizione rispetto alla piegatura della striscia, varia a seconda del tipo di tracciato che si vuole eseguire (macro, semimicro, micro).

-Coprire la camera con il coperchio e collegarla all'alimentatore a 200 V per 90'.

ANALISI CLINICHE

2° FASE: Esecuzione dell'elettroforesi

Colorazione

-Togliere le strisce dal ponte e immergerle per 10 minuti in una soluzione di rosso Ponceau.

Decolorazione

- Decolorare passando le strisce in un bagno di una soluzione di acido acetico al 5% per 4 lavaggi successivi, agitando contemporaneamente durante il periodo di permanenza.

A questo punto la striscia è pronta per il riconoscimento delle frazioni separate.

-Trasparentizzare ponendo le strisce per 30 secondi in una soluzione di metanolo e acido acetico nel caso che lo scopo dell'esame sia la determinazione quantitativa delle frazioni.

- Stendere le strisce su una lastra di vetro; eliminare l'eccesso di soluzione facendo attenzione che non si formino bolle sottostanti e porle in stufa.

ANALISI CLINICHE

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Profilo normale adulto: HbA₂ = 3,5%

HbF = 1,0%

HbA = 96-99%

Profilo normale neonato: HbA₂ = 0%

**HbF in quantità decrescente dal 90%
sino a tracce all'età di 6 mesi.**

ANALISI CLINICHE

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Anomalie quantitative

1. Beta-talassemia:

- a) Talassemia major: assenza di sintesi della catena beta.
Presenza di HbF. Tasso elevato di HbA2.**
- b) Talassemia minor : sintesi parziale della catena beta.
Presenza di HbF.
Aumento dell'HbA2 (4-12%).**

2. Alfa-talassemia : assenza di catene alfa.

ANALISI CLINICHE

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Anomalie qualitative o emoglobinosi

Le emoglobinosi sono caratterizzate dalla presenza di bande Hb anomale (anomalie di carica elettrica della globina causate da variazioni della sequenza aminoacidica).

1. **Drepanocitosi o HbS**: presenza di una banda migrante tra l'HbA e l'HbA2 (mutazione sulla catena beta: aa Glu → Val).

Concentrazioni variabili:

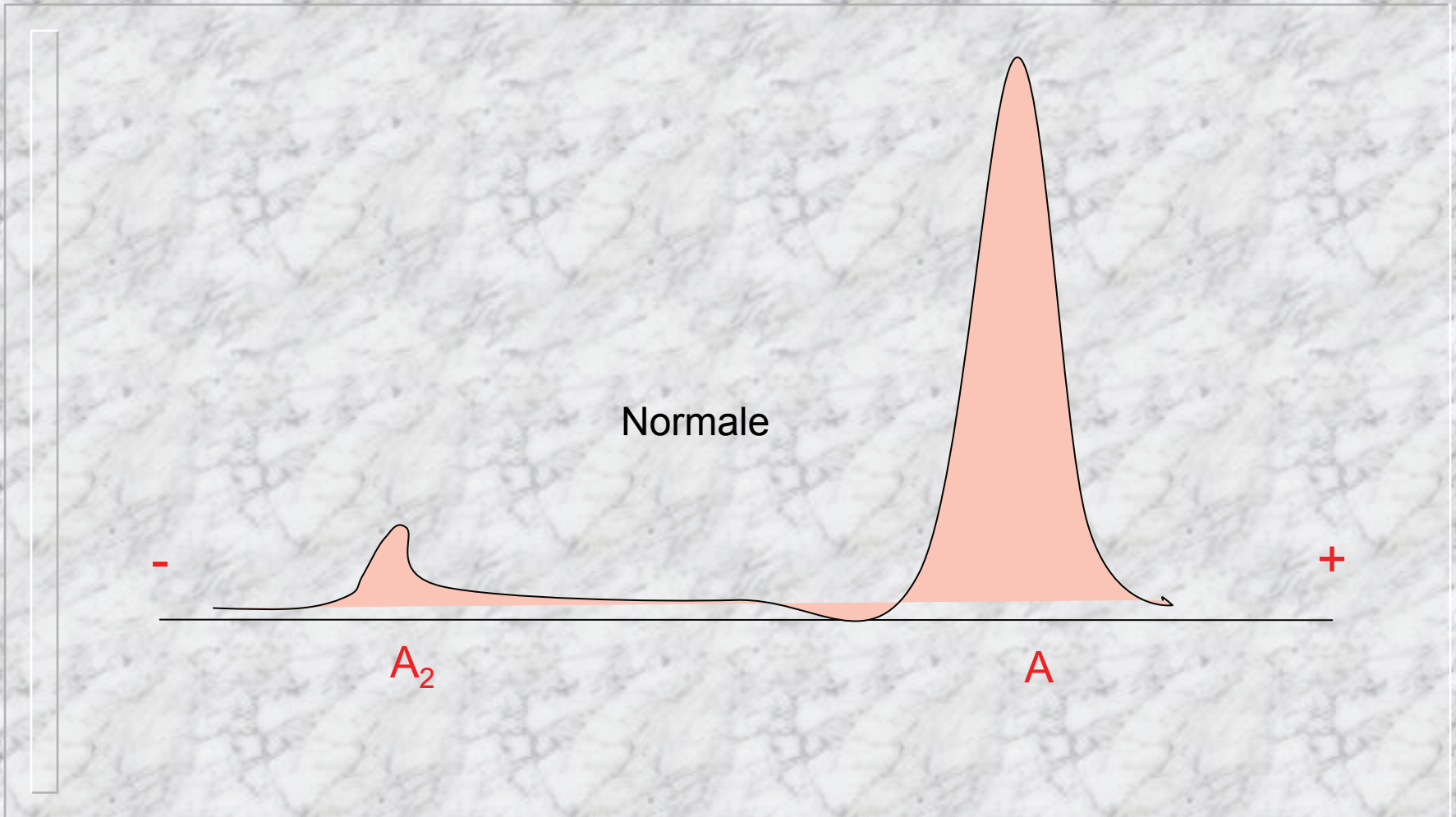
dall'80% al 100%	soggetti omozigoti
dal 25% al 60%	soggetti eterozigoti

2. **Emoglobinosi C o HbC**: presenza di una banda molto intensa al livello dell'HbA2 (mutazione aa Glu → Lys).

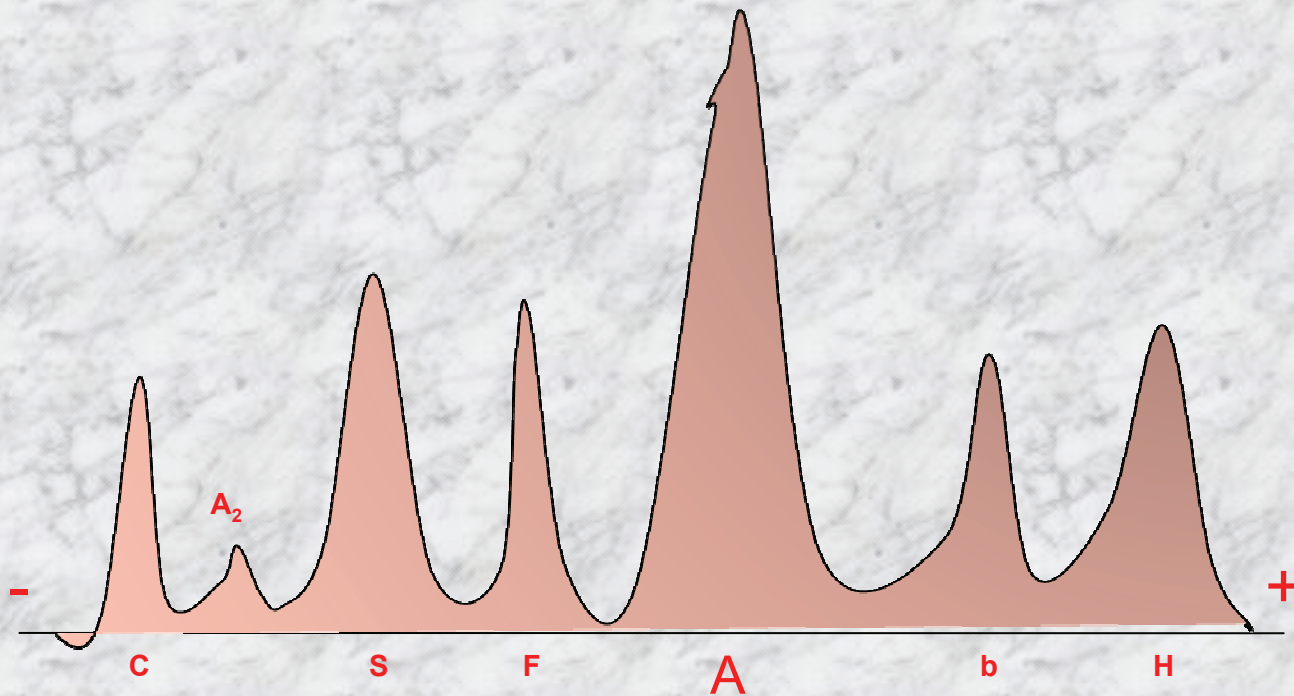
Concentrazioni variabili:

dall'80% al 100%	soggetti omozigoti
dal 25% al 60%	soggetti eterozigoti

ANALISI CLINICHE



ANALISI CLINICHE

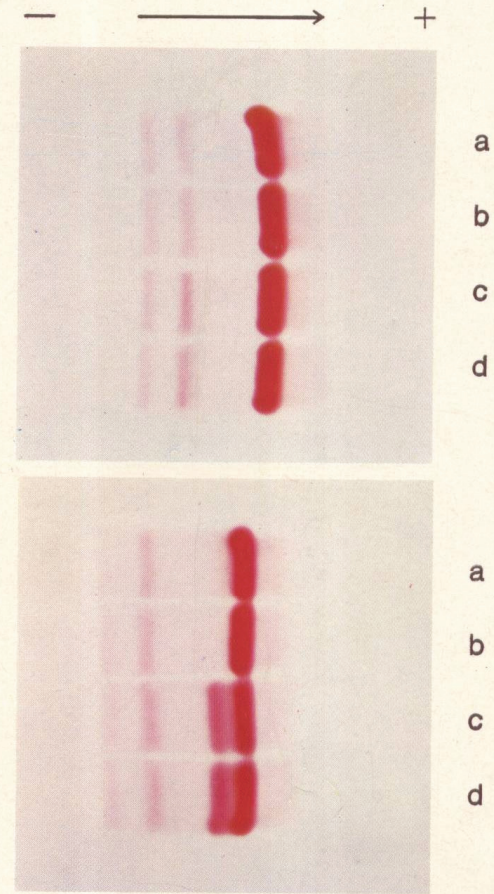


Mobilità relativa delle più comuni varianti di Emoglobine su acetato di cellulosa

ANALISI CLINICHE

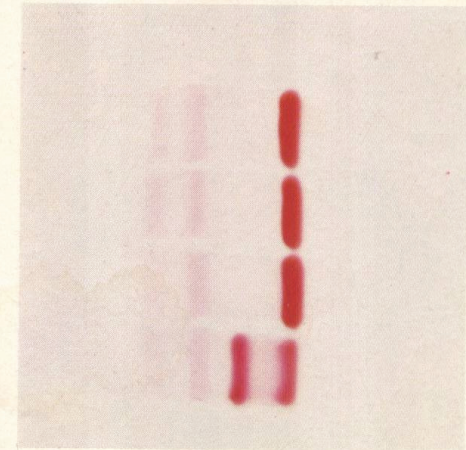
- a) Tracciato normale
- b) Tracciato normale
- c) Beta talassemia eterozigote
- d) Beta talassemia eterozigote

- a) Tracciato normale
- b) Tracciato normale
- c) Beta-Delta talassemia eterozigote
- d) Beta-Delta talassemia eterozigote



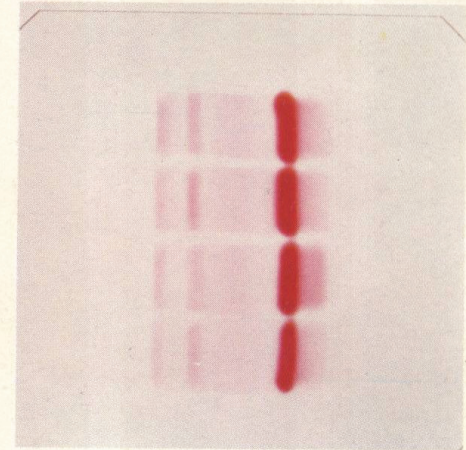
ANALISI CLINICHE

- a) Tracciato normale
- b) Tracciato normale
- c) Tracciato normale
- d) Hb S (eterozigote)



a
b
c
d

- a) Tracciato normale
- b) Beta talassemia (eterozigote)
- c) Hb Abidjan (Hb veloce)
- d) Tracciato normale



a
b
c
d

ANALISI CLINICHE

Tabella di riconoscimento delle frazioni emoglobiniche

	(-) Origine	A ₂	S	F	A ₁	(+)	% frazioni emoglobiniche
NORMALE					■	HbA A ₂	98% 2%
NEONATO				■		HbA F	10% 90%
β-Talassemia					■	HbA A ₂ F	Leggermente diminuita 3-12% Normale o aumentata
ANEMIA					■	HbA A ₂	Diminuita Leggermente diminuita