

**L'elettroforesi su gel di poliacrilamide. Applicazione della tecnica della « elettroforesi discontinua » alla separazione di alcune emoglobine anomale umane**

ADRIANA MASSA (\*), LEONARDO TENTORI e GIROLAMO VIVALDI

*Laboratori di Biologia*

**Riassunto.** — Le varianti anomale della emoglobina umana sono dovute alla sostituzione di un aminoacido in una delle due coppie di subunità di cui è costituita la molecola di questa emoproteina. Queste anomalie vengono trasmesse ereditariamente come caratteri mendeliani semplici codominanti e possono essere la causa di differenti sindromi morbose dovute alla insufficienza funzionale della emoglobina.

Il metodo più semplice per rivelare una variante anomala della emoglobina è rappresentato dalla elettroforesi zonale qualora la sostituzione dell'aminoacido nella catena polipeptidica comporti un cambiamento della carica elettrica. La tecnica più largamente usata a questo scopo e che dà i migliori risultati è stata quella della elettroforesi su gel d'amido. Nella presente nota vengono riferiti i risultati ottenuti applicando la nuova tecnica della « elettroforesi discontinua » alla separazione di alcune varianti anomale della emoglobina umana in confronto con quelli che si ottengono con la usuale tecnica di elettroforesi su gel d'amido. I risultati hanno dimostrato che la tecnica della « elettroforesi discontinua » offre il vantaggio di una maggiore rapidità di esecuzione e consente una più precisa determinazione quantitativa dei differenti tipi di emoglobina presenti negli emolisati di individui eterozigoti portatori dell'anomalia.

**Summary.** (*Polyacrylamide-gel electrophoresis. The application of « disc electrophoresis » technique for the separation of some human hemoglobins.*) — The abnormal variants of human hemoglobin are due in most cases to the substitution of an aminoacid residue in one of the two pairs of sub-units of the molecule. These variants are inherited as a simple codominant mendelian

---

(\*) Borsista dei Laboratori di Biologia.

character. The resulting functional inadequacies cause a variety of hematological diseases.

Zone electrophoresis represents the simplest method to reveal the presence of a variant in the hemolysates, provided that the aminoacid substitution in the polypeptide chain causes a change in its electric charge. Starch-gel electrophoresis has been so far the most popular method for the electrophoretic detection of hemoglobin variants.

In the present series of investigations, we have compared the separation of some human hemoglobin variants obtained with « disc electrophoresis » and starch-gel electrophoresis.

The results have shown that « disc electrophoresis » has some advantages over starch-gel electrophoresis : it allows an equally good separation in a shorter period of time (Fig. 1), and a more accurate quantitative determination of the different hemoglobins in the hemolysates of individuals who are heterozygous for the variants (Fig. 2).

---

L'elettroforesi zonale ha costituito in questi ultimi anni un metodo di larghissimo impiego per la separazione di miscele di proteine, peptidi ed aminoacidi. Come è noto, la principale caratteristica della elettroforesi zonale è rappresentata dall'uso di un supporto allo scopo di impedire o ridurre al massimo la convezione. Sono state descritte diverse tecniche che sfruttano diversi supporti : carta da filtro, blocco d'amido, gel d'amido, gel di agar, gel di poliacrilamide, acetato di cellulosa. In alcune di queste tecniche la separazione dipende solamente dalle differenze nella mobilità elettroforetica degli ioni che compongono la miscela ; in questo caso, del quale sono esempi l'elettroforesi su carta da filtro, su blocco d'amido e su gel di agar, non è possibile ottenere una buona separazione di sostanze quando le differenze nelle loro mobilità elettroforetiche siano piccole. Tuttavia, l'introduzione di supporti, come il gel d'amido ed il gel di poliacrilamide, ha permesso un sostanziale miglioramento delle separazioni nel caso delle proteine, poichè le dimensioni dei pori dei supporti sono abbastanza vicine a quelle degli ioni presenti nella miscela e questi ultimi vengono quindi più o meno ritardati a seconda delle loro maggiori o minori dimensioni ; la separazione, in questi casi, è dovuta non solo alla mobilità elettroforetica, ma anche alle dimensioni molecolari dei componenti della miscela.

In particolare, le tecniche di elettroforesi su gel di poliacrilamide sono state descritte indipendentemente da Davis e Ornstein (DAVIS & ORNSTEIN, 1959 ; DAVIS, 1964 ; ORNSTEIN, 1964) e da RAYMOND & WEINTRAUB (1959). I vantaggi che il gel di poliacrilamide presenta sul gel d'amido sono rappresentati dal fatto che il primo è trasparente, termostabile, relativamente



inerte dal punto di vista chimico e non contiene gruppi ionici laterali ; inoltre le dimensioni dei pori del gel di poliacrilamide possono essere variate variando opportunamente la concentrazione del monomero, cosicchè è teoricamente possibile adattare le dimensioni dei pori alle dimensioni delle molecole delle sostanze che debbono essere separate. Dal punto di vista analitico pertanto l'elettroforesi su gel di poliacrilamide è senz'altro superiore, per il suo potere risolutivo e per la sua sensibilità, alla elettroforesi su gel d'amido ; tuttavia la bassa resistenza elettrica del gel di poliacrilamide ne limita per ora l'impiego ed i migliori risultati si ottengono in fase analitica con colonne molto piccole, anche se recentemente sono stati fatti tentativi per l'impiego di questo supporto in fase preparativa (LEWIS & CLARK, 1963 ; RACUSEN & CALVANICO, 1964 ; JOVIN, CHRAMBACH & NAUGHTON, 1964 ; MAIZEL, 1964).

Il gel di poliacrilamide viene usato per separazioni elettroforetiche su piastra in sistemi mono e bidimensionali (RAYMOND, 1964), a basso e ad alto voltaggio (WIEME, 1964), ma l'applicazione di questo substrato più nota e che ha portato a risultati veramente importanti nella separazione di miscele proteiche molto complesse è quella che ha preso il nome inglese di « disc electrophoresis ». La denominazione inglese dovrebbe essere tradotta in italiano « elettroforesi discontinua » poichè il prefisso « disc » è stato usato per indicare la discontinuità del supporto e solo per coincidenza potrebbe essere considerato allusivo alla forma discoide che assumono le zone dei differenti componenti della miscela a separazione avvenuta. Non è pertanto accettabile la traduzione italiana comunemente usata di « elettroforesi a disco » poichè tale dizione non tiene conto della caratteristica principale di questa tecnica elettroforetica rappresentata appunto dalla discontinuità del supporto.

Si tratta di una tecnica di elettroforesi su colonne, in genere di dimensioni molto ridotte, di gel di poliacrilamide ; nelle colonne il substrato è discontinuo poichè viene disposto in due stratti distinti : gel concentratore e gel separatore. Il gel concentratore, a pori più larghi, viene usato per operare la concentrazione dei componenti della miscela in uno strato sottilissimo alla superficie di contatto fra il gel concentratore ed il gel separatore ; nel gel concentratore infatti avviene una prima fase elettroforetica nel corso della quale i componenti della miscela si muovono esclusivamente in dipendenza della carica da essi posseduta, poichè i pori del gel sono troppo larghi per operare fra di essi una selezione in base alle dimensioni molecolari. Nel gel separatore invece avviene la separazione elettroforetica vera e propria poichè le dimensioni dei pori sono più piccole e, come si è detto, possono essere adattate alle dimensioni molecolari dei componenti della miscela.

Nel presente lavoro vengono riferiti i risultati che sono stati ottenuti applicando la tecnica della elettroforesi discontinua alla separazione di alcune emoglobine anomale umane.

## MATERIALI E METODI

*Preparazione del campione.* — Dai campioni di sangue raccolti erano separate per centrifugazione le emazie, che venivano poi lavate con soluzione salina isotonica (9‰). L'emolisi era effettuata per aggiunta di acqua distillata v : v e di 0,4 v. di tetracloruro di carbonio.

La soluzione di emoglobina veniva separata dal tetracloruro e dagli stromi per centrifugazione a 30900xg per 10'. Tutte le operazioni di centrifugazione erano eseguite a 4°C; la concentrazione di emoglobina delle soluzioni veniva determinata in base al coefficiente di estinzione del derivato ciano-meta a 540 m $\mu$  (SALVATI, TENTORI & VIVALDI, 1965).

Le soluzioni di emoglobina erano conservate alla temperatura di + 4°C ed erano sottoposte agli esperimenti di elettroforesi entro 24 h dalla loro preparazione.

*Tecnica elettroforetica.* — L'elettroforesi veniva effettuata in sistema verticale su colonnine di gel di poliacrilamide. Il sistema era essenzialmente quello descritto da DAVIS & ORNSTEIN (1959) e realizzato commercialmente dalla Canal Industrial Corporation (Canalco) - Bethesda. Per la separazione delle bande veniva usato gel di poliacrilamide alla concentrazione del 7% (gel separatore) in tampone Tris a pH 8,9 secondo Davis, polimerizzato con persolfato d'ammonio per 30'. Come gel concentratore venivano stratificati al di sopra del gel separatore 150  $\mu$ l di una soluzione di poliacrilamide al 2,5% in tampone Tris a pH 6,7 secondo Davis; la polimerizzazione veniva ottenuta alla luce ultravioletta in 30'. Nelle vasche degli elettrodi era contenuto tampone tris-glicina pH 8,3 secondo Davis. I campioni di emoglobina, opportunamente diluiti per raggiungere una concentrazione di circa il 2% venivano mescolati con una soluzione di gel concentratore non polimerizzato contenente il 20% di saccarosio. Aliquote di questa soluzione contenenti circa 250  $\mu$ g di emoglobina venivano stratificate sulla superficie del gel concentratore.

La corsa elettroforetica veniva eseguita applicando alle colonnine una corrente continua di 5,0 mA per 25'.

*Densitometria e fotografia.* — Le colonnine non venivano sottoposte ad alcuna colorazione, poichè il colore naturale dell'emoglobina permette di misurare direttamente le intensità delle zone. La densitometria veniva eseguita automaticamente con il Microdensitometer Model E (Canal. Ind. Corp.) inserendo nel cammino ottico un filtro interferenziale LKB n. 5917 B33 con un massimo di 5500 Å ed una larghezza di banda di 130 Å.

Le fotografie delle colonnine venivano eseguite con un sistema polaroid incorporato nel microdensitometro.



RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella fig. 1 sono riportati i risultati ottenuti sottoponendo ad elettroforesi discontinua cinque campioni di sangue umano contenenti emoglobine anomale (\*). Come è noto, le emoglobinopatie sono dovute ad una alterazione della struttura della molecola della emoglobina e vengono trasmesse ereditariamente come caratteri mendeliani semplici e codominanti. Con il n. 4

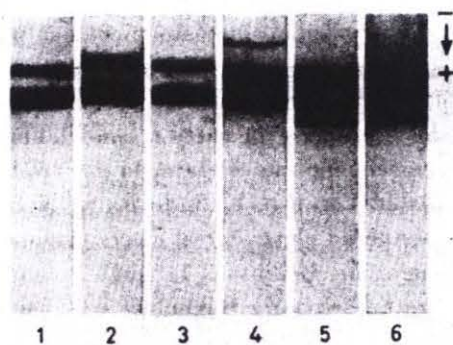


Fig. 1. — Quadro elettroforetico degli emolisati di individui portatori di emoglobine anomale :

1. — Emoglobina di un portatore della anomalia Hb<sub>Beilinson</sub>.
2. — Emoglobina di un portatore della anomalia Hb D<sub>Punjab</sub>.
3. — Emoglobina di un portatore della anomalia Hb S.
4. — Emoglobine normali A ed A<sub>2</sub>.
5. — Emoglobina di un portatore della anomalia Hb H.
6. — Emoglobina di un portatore della anomalia Hb J<sub>Oxford</sub>.

nella figura viene riportato, come termine di confronto, il quadro elettroforetico che si ottiene sottoponendo l'emoglobina umana normale alla elettroforesi discontinua ; è bene evidente la risoluzione in una grossa banda rappresentata dalla emoglobina A e in una banda minore corrispondente alla emoglobina A<sub>2</sub>. Come è noto, le varianti anomale della emoglobina umana vengono distinte, dal punto di vista della mobilità elettroforetica, in emoglobine lente, quando la loro mobilità è inferiore a quella della emoglobina A, ed emoglobine rapide, quando la loro mobilità è maggiore. Nel caso delle emoglobine la mobilità non viene influenzata dalle dimensioni dei pori del gel di poliacrilamide, poichè le alterazioni della loro struttura, che sono la causa della loro anomalia, non comportano modificazioni delle loro dimensioni molecolari ; pertanto la mobilità elettroforetica in questo caso è dovuta esclusivamente a differenze nella carica delle differenti emoglobine. Nella fig. 1

(\*) Le emoglobine sono state inviate dai Centri per lo studio delle talassemie di Padova, di Cosenza e di Cagliari per la caratterizzazione della anomalia strutturale.

sono rappresentate, a sinistra della emoglobina umana, normale, tre esempi di emoglobine lente contrassegnate con i numeri 1, 2 e 3; a destra invece, con i numeri 5 e 6, sono contrassegnate due emoglobine rapide. L'origine della corsa elettroforetica è in alto in corrispondenza del polo negativo: è evidente che anche su gel di poliacrilamide le emoglobine esaminate conservano il carattere di lentezza o di rapidità elettroforetica rispetto all'emoglobina A che dimostrano in esperimenti elettroforetici eseguiti su altri supporti. C'è da osservare che quando la percentuale della frazione anomala che si desidera mettere in evidenza è piuttosto piccola è necessario sottoporre ad elettroforesi una quantità maggiore di emolisato; da questo fatto derivano le differenze nello spessore e nella intensità della banda corrispondente alla emoglobina A, che è presente in tutte le emoglobine esaminate, poichè tutti gli individui la cui emoglobina è stata da noi studiata erano portatori eterozigoti della anomalia. Con il n. 1 è indicata nella figura la separazione che si ottiene sottoponendo ad elettroforesi discontinua un campione di emolisato contenente emoglobina Beilinson, la quale, come è noto, è identica alla emoglobina Ferrara descritta da Baglioni e coll. (MASSIMO *et al.*, 1964); l'anomalia di questa emoglobina consiste nella sostituzione del residuo acido aspartico presente normalmente nella posizione 47 della catena alfa con un residuo glicina; questa sostituzione implica un cambio di carica della molecola dell'emoglobina e precisamente una diminuzione della carica negativa dovuta al gruppo carbossilico in posizione 2 dell'acido aspartico; pertanto l'emoglobina Beilinson migra verso l'anodo più lentamente della emoglobina A a pH alcalino.

Le stesse considerazioni valgono per l'emoglobina D<sub>Punjab</sub> contrassegnata nella figura dal numero 2 in cui la anomalia è rappresentata dalla sostituzione dell'acido glutammico in posizione 121 della catena beta con un residuo glutamina, e per l'emoglobina S, caratteristica dell'anemia a cellule falciformi, indicata nella figura con il N. 3, nella quale il residuo acido glutammico in posizione 6 della catena beta è sostituito da un residuo valina.

Passando alle emoglobine rapide, con il numero 5 è contrassegnata l'emoglobina H; questa emoglobina si trova negli eritrociti degli individui affetti da alfa-talassemia e, come è noto, è costituita da quattro sub-unità identiche fra loro e precisamente da quattro catene beta. Le catene beta hanno una carica negativa maggiore delle catene alfa, pertanto l'emoglobina H o  $\beta_4$ , dimostra una mobilità maggiore verso l'anodo della emoglobina normale A,  $\alpha_2\beta_2$ . Infine, con il n. 6 è indicata l'emoglobina di un soggetto portatore eterozigote della anomalia indicata con il nome di emoglobina J<sub>Oxford</sub>. In questo caso la glicina in posizione 15 della catena alfa è sostituita da un residuo acido aspartico e la molecola di emoglobina che ne risulta presenta un aumento della carica negativa dovuta al carbossile in posizione 2 dell'acido aspartico, il che spiega la sua maggiore mobilità verso l'anodo.

Nella Fig. 2 viene riportato un esempio di tracciato densitometrico relativo alla separazione elettroforetica su gel di poliacrilamide della emoglobina contenuta negli eritrociti di un individuo normale adulto, in paragone con

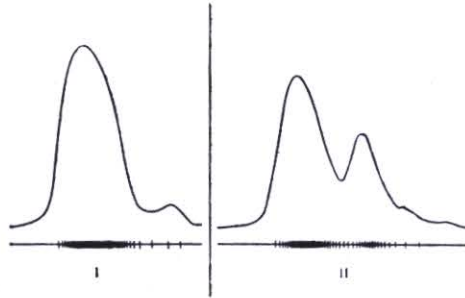


Fig. 2. — Tracciato densitometrico di due degli elettroferogrammi riportati nella Fig. 1.  
 I — Emoglobine normali A ed A<sub>2</sub>.  
 II — Emoglobina di un portatore della anomalia Hb<sub>Beilinson</sub>.

quello corrispondente alla emoglobina contenuta negli eritrociti di un portatore eterozigote di emoglobina Beilinson.

Negli esperimenti rappresentati nella figura le percentuali trovate sono state di 98,2 % per l'emoglobina A e di 1,8 % per l'emoglobina A<sub>2</sub> nel caso dell'emolisato normale, mentre nell'emolisato contenente l'emoglobina anomala l'emoglobina A è presente nella proporzione del 65,0 % e l'emoglobina Beilinson nella proporzione del 35,0 %. Nella Tab. 1 sono riportati i dati quantitativi ottenuti sottoponendo a densitometria gli elettroferogrammi rappresentati nella Fig. 1.

In conclusione, l'elettroforesi su gel di poliacrilamide permette, nel caso delle emoglobine, di ottenere delle risoluzioni altrettanto buone quanto quelle

TABELLA 1.

Proporzioni relative della emoglobina A e delle emoglobine anomale nei campioni di sangue umano riportati nella Fig. 1.

n. 1	Hb A	65,0 %	Hb Beilinson	35,0 %
n. 2	Hb A	58,0 %	Hb D <sub>Punjab</sub>	42,0 %
n. 3	Hb A	59,3 %	Hb S	40,7 %
n. 4	Hb A	98,2 %	Hb A <sub>2</sub>	1,8 %
n. 5	Hb A	93,5 %	Hb H	6,5 %
n. 6	Hb A	69,5 %	Hb J <sub>Oxford</sub>	30,5 %



che possono essere ottenute usando come supporto il gel d'amido, tuttavia presenta su quest'ultima tecnica dei vantaggi che sono rappresentati sia dalla maggiore rapidità di esecuzione, sia dalla possibilità di una più precisa determinazione quantitativa dei risultati ottenuti, data la notevole trasparenza del gel di poliacrilamide. Questo secondo vantaggio è particolarmente importante nel caso di una ricerca sistematica sulle emoglobine anomale; come è stato detto sopra, queste emoglobinopatie vengono trasmesse ereditariamente come caratteri mendeliani semplici codominanti. Dal punto di vista teorico nel sangue di un portatore eterozigote di emoglobina anomala dovrebbero essere contenute l'emoglobina normale A e l'emoglobina anomala nella proporzione del 50 % ciascuna. Tuttavia, nella maggior parte dei casi, questa proporzione non è rispettata. Gli ematologi ritengono che gli eritrociti che contengono l'emoglobina anomala in alta percentuale abbiano una vita più breve degli eritrociti che contengono l'emoglobina normale, soprattutto quando l'emoglobina anomala presenta una capacità funzionale inferiore; come conseguenza il portatore presenterebbe un grado maggiore o minore di anemia ed i rapporti fra le due emoglobine nel sangue sarebbero alterati nel senso che il sangue del portatore contiene una quantità tanto minore di emoglobina anomala quanto maggiore è il difetto funzionale della stessa. La conoscenza delle proporzioni in cui la emoglobina anomala è contenuta negli emolisati potrebbe, secondo questa interpretazione, fornire indirettamente delle informazioni sulla capacità funzionale della particolare emoglobina studiata. È necessario d'altra parte sottolineare che una spiegazione più razionale della presenza delle emoglobine anomale negli emolisati in percentuale minore rispetto alla emoglobina normale, potrebbe essere fornita della minore espressività dei geni varianti rispetto all'allele normale.

30 marzo 1967.

#### BIBLIOGRAFIA

- DAVIS, B. J. & L. ORNSTEIN, 1959. Comunicazione al « Meeting of the Society for the Study of Blood », New York Academy of Medicine.
- DAVIS, B. J., 1964. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404.
- JOVIN, T., A. CHRAMBACH & M. A. NAUGHTON, 1964. *Anal. Biochem.*, **9**, 351.
- LEWIS, U. J. & M. O. CLARK, 1963. *Anal. Biochem.*, **6**, 303.
- MAIZEL, J. V., 1964. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 382.
- MASSIMO, L., C. BAGLIONI, G. LA MEDICA, C. BORRONE & B. COLOMBO, 1964. *Atti XXX Congresso Italiano di Pediatria*, p. 129.
- ORNSTEIN, L., 1964. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 321.
- RACUSEN, D. & N. CALVANICO, 1964. *Anal. Biochem.*, **7**, 62.
- RAYMOND, S., 1964. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 350.
- RAYMOND, S. & L. S. WEINTRAUB, 1959. *Science*, **130**, 711.
- SALVATI, A. M., L. TENTORI & G. VIVALDI, 1965. *Clin. Chim. Acta*, **11**, 477.
- WIEME, R. J., 1964. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 365.