

Elettroforesi su strato sottile dei DNS-amminoacidi

I dansil-derivati, preparati per reazione degli amminoacidi con l'1-dimetil-naftalen-5-sulfonilcloruro (dansilcloruro o DNSCl), sono molto resistenti all'idrolisi acida e presentano una forte fluorescenza gialla. Questi derivati sono stati usati da GRAY & HARTLEY^{1,2} per una tecnica di determinazione dei gruppi NH₂ terminali di proteine e di peptidi e per un metodo di degradazione sequenziale secondo Edman accoppiato a dansilazione. Il procedimento, che può essere considerato il naturale successore del metodo dei DNP-derivati di SANGER³ ha una sensibilità 100 volte maggiore ed offre anche il vantaggio di essere estremamente semplice e riproducibile. Recentemente sono state riportate un certo numero di utili tecniche cromatografiche ed elettroforetiche per la separazione e la identificazione delle miscele dei dansil-derivati degli amminoacidi (DNS-amminoacidi). BOULTON & BUSH⁴ hanno ottenuto buone separazioni con un procedimento di cromatografia su carta, usando un sistema di quattro solventi non molto polari per un tempo variabile tra 12 e 15 ore. Altri autori⁵⁻⁹ hanno invece utilizzato la cromatografia su strato sottile di gel di silice, che, come è noto, presenta generalmente il vantaggio di una maggiore sensibilità e rapidità. È stata impiegata una tecnica bidimensionale, usando nella prima corsa un sistema solvente a carattere acido e nella seconda un sistema a carattere basico. Molto recentemente WOODS & WANG¹⁰ hanno descritto i vantaggi dell'uso della poliammide come supporto per una tecnica cromatografica bidimensionale su strato sottile. Un metodo di elettroforesi zonale è stato invece usato da GRAY & HARTLEY^{1,2}; nel procedimento sono impiegati come supporto la carta, corrente ad alto voltaggio e tre sistemi di tamponi a differenti pH. A pH 4,4 (80V/cm, 15°C) è possibile ottenere una buona risoluzione di quasi tutti i DNS-amminoacidi in un tempo medio di circa 3 ore; i derivati che non sono separabili possono essere risolti se sottoposti successivamente ad altre elettroforesi a pH 1,9 (50V/cm, 2h, 20°C) oppure a pH 12,7 (20V/cm, 3h, 15°C). Il metodo elettroforetico su carta comporta tuttavia la necessità di dover usare una apparecchiatura complessa e costosa; inoltre non è utilizzabile il sistema che prevede il raffreddamento dell'apparecchio con solventi organici, data la solubilità in questi dei DNS-amminoacidi.

Nella presente nota riportiamo un metodo di separazione elettroforetica rapida utilizzando un apparecchio a piastra refrigerata su supporto di gel di silice.

Parte sperimentale.

DNS-amminoacidi. — Sono ottenuti per reazione dell'amminoacido, disciolto in NaHCO₃ 0,2M, con un ugual volume di una soluzione di DNSCl (2,5 mg/ml di acetone), a 37° per 1h. Dopo aver portato a secco in corrente d'azoto la miscela di reazione, i campioni sono estratti con piccoli volumi (50 µl per volta) di etilacetato saturato con acqua, per purificarli della maggior parte dei prodotti secondari di reazione e sono riportati a secco con azoto. L'estrazione non viene effettuata solo nel caso dei DNS-derivati di Arg, Lys, His e CySO₃H perchè non solubili in etilacetato. Tutti i campioni sono poi disciolti in un conveniente volume di piridina-acetone 50 % v:v e deposti sulla piastra in piccole quantità (1 µl = 1µmole).

Apparecchiatura. — L'apparecchio usato (Shandon Thin Layer Electrophoresis Apparatus) è stato collegato ad una centralina di refrigerazione che permette di portare e mantenere la piastra alla temperatura costante di 0°C.

TABELLA I.

Mobilità elettroforetica in cm dei DNS-amminoacidi ai pH 4,4 e 1,9.

DNS-amminoacido	Ala	Arg	Asp	CysSO ₃ H	Glu	Gly	His	Ileu	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	DNS-NH ₂	Prodotti secondari di reazione
pH 4,4	3,3	1,1	4,4	6,3	4,2	3,6	0,5	2,3	2,5	0,4	3,2	2,3	2,1	3,5	3,2	1,7	3,1	2,4	0	5,5
pH 1,9	4,4	6,4	3,7		4,8	5,0	5,8	3,4	3,6	2,7	3,4	3,5	2,4	4,1	4,5	3,8	2,6	3,7	4,5	0,3

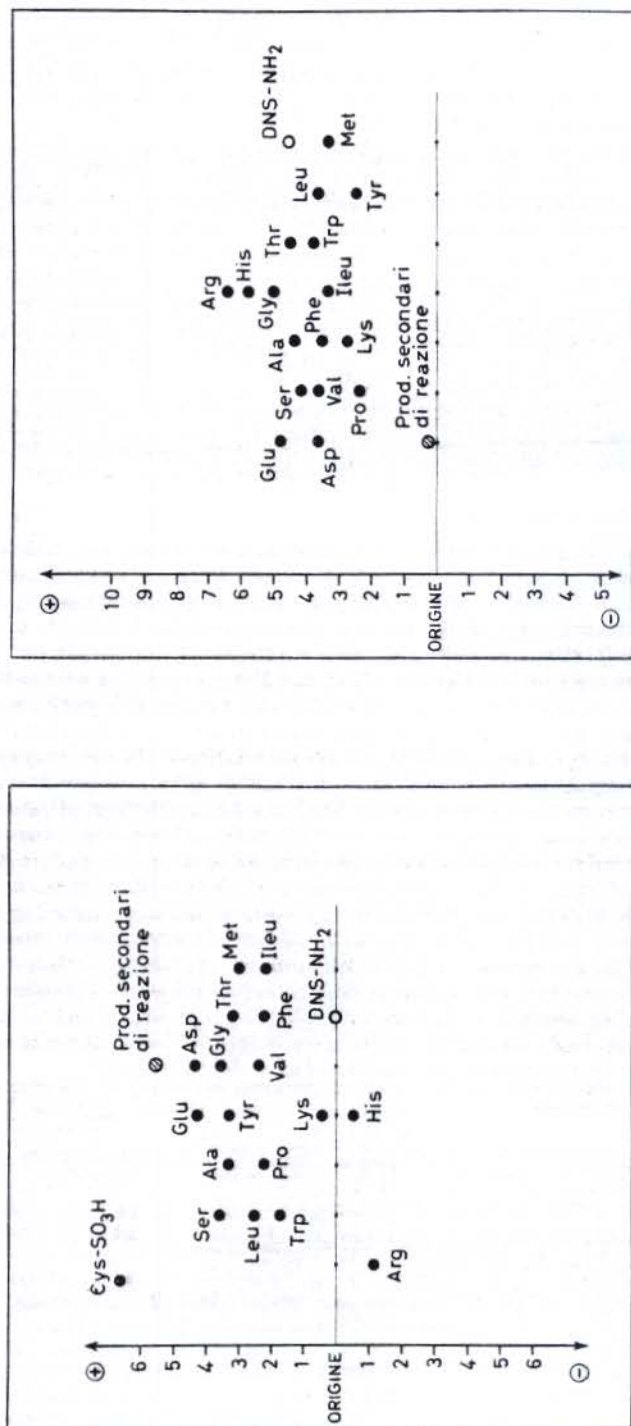


Fig. 1. — Separazione elettroforetica di DNS-amminoacidi a pH 4,4 (a) e a pH 1,9 (b). (Con Lys e Tyr si indicano i di-derivati di questi amminoacidi).

Supporto. — Le separazioni dei campioni sono effettuate su piastre di vetro 20×20 cm, ricoperte con gel di silice G Merck, con strato dello spessore di 250 μ .

Elettroforesi. — Sono usati i seguenti tamponi: pH 4,4: piridina-acido acetico glaciale-acqua 4:8:1000 v:v:v; pH 1,9: acido formico 8% in acqua; pH 12,7: Na_3PO_4 0,1M — NaOH 0,1M.

Il collegamento fra la piastra e le vasche, contenenti ciascuna 200 ml di tampone, è effettuato con ponti di carta Whatman 3MM di 20×6 cm, poggiati per 1 cm sulla piastra di vetro. Prima della corsa, la piastra viene spruzzata con lo stesso tampone dell'elettroforesi, collegata alle vasche con i ponti, ricoperta con un'altra lastra di vetro delle stesse dimensioni per formare una camera di saturazione efficiente e lasciata poi ad equilibrare per 5-10 min; è stato controllato sperimentalmente che tale periodo di tempo non comporta alcuno spostamento dei campioni dall'origine.

La corsa elettroforetica è limitata ad un'ora. Per ogni pH sono usati i seguenti voltaggi: pH 4,4: 45V/cm 34 mA iniziali; pH 1,9: 27V/cm 34 mA iniziali; pH 12,7: 14V/cm 34 mA iniziali.

Al termine della elettroforesi, la piastra è asciugata in stufa per 10 min, esposta per qualche istante ai vapori di NH_3 per ripristinare la fluorescenza dei derivati e visualizzata alla luce ultravioletta (365 m μ).

Risultati e conclusioni

pH 4,4. — A questo pH si ottengono separazioni abbastanza soddisfacenti e si può dire che, come su carta, anche su gel di silice questo tampone offre la migliore risoluzione per i dansil-derivati degli amminoacidi. Un quadro tipo della separazione che si ottiene a questo pH è riportato in Fig. 1 (a) e le relative mobilità elettroforetiche in Tab. 1. Si può notare che a questo pH non si separano i seguenti gruppi: Asp-Glu; Gly-Ser; Thr-Ala-Met-Tyr; Leu-Ileu-Val-Phe-Pro. Per separare questi gruppi è necessario ricorrere ad un pH più acido.

pH 1,9. — La separazione tipo ottenibile con questo tampone è riportata in Fig. 1 (b) e le mobilità elettroforetiche relative in Tab. 1. A questo pH i DNS-derivati degli amminoacidi sono tutti protonati e migrano quindi verso il polo negativo. Come si vede, confrontando le Fig. 1a e 1b, a pH 1,9 si ottiene la separazione di tutti i gruppi tranne che per Ala-Thr e Leu-Ileu-Phe-Val per i quali è quindi necessario ricorrere ad uno dei tanti sistemi cromatografici descritti in letteratura.

pH 12,7. — Le esperienze effettuate hanno dimostrato la impossibilità di usare questo sistema tampone a pH 12,7. Infatti, nelle condizioni sperimentali del metodo, il flusso elettrosmotico diretto in senso inverso a quello della migrazione è tanto forte da far spostare i dansil-amminoacidi, totalmente dissociati nell'ambiente fortemente alcalino del tampone fosfato e quindi carichi negativamente, verso il polo negativo anziché verso quello positivo. Lo strato di gel di silice, inoltre, a questo pH non resta compatto, ma tende a disgregarsi specialmente nelle zone prossime agli elettrodi impedendo un regolare flusso del tampone.

20 marzo 1969.

ADRIANA MASSA, RENATA COCCHIERI
e LEONARDO TENTORI
Laboratori di Biologia

- ¹ GRAY, W. R. & B. S. HARTLEY. *Biochem. J.*, **89**, 59P (1963).
- ² GRAY, W. R. & B. S. HARTLEY. *Biochem. J.*, **89**, 379 (1963).
- ³ SANGER, F. *Biochem. J.*, **39**, 507 (1945).
- ⁴ BOULTON, A. A. & I. E. BUSH. *Biochem. J.*, **92**, 11P (1964).
- ⁵ SEILER, N. & J. WIECHMANN. *Experientia*, **20**, 559 (1964).
- ⁶ DEYL, Z. & J. ROSMUS. *J. Chromatog.*, **20**, 514 (1965).
- ⁷ COLE M., J. C. FLETCHER & A. ROBSON. *J. Chromatog.*, **20**, 616 (1965).
- ⁸ MORSE, D. & B. L. HORECKER. *Anal. Biochem.*, **14**, 429 (1966).
- ⁹ CROSHAW, K., S. J. JESSUP & P. W. RAMWELL. *Biochem. J.*, **103**, 79 (1967).
- ¹⁰ WOODS, K. R. & K. T. WANG. *Biochim. Biophys. Acta*, **133**, 369 (1967).