

76. G. SCACCIA SCARAFONI, S. CARTA, L. TENTORI e G. VIVALDI. — **Apparecchiatura per elettroforesi su carta con impiego di alte tensioni.**

Riassunto. — Sono richiamati i principi e l'importanza della elettroforesi su carta per alcune analisi di laboratorio ed in particolare per indagini sulla struttura delle proteine e sono indicati i motivi che impongono l'impiego di alte tensioni.

Viene descritta un'apparecchiatura realizzata nell'I.S.S., che consente di condurre esperienze del genere suddetto con gradienti di tensione fino a 250 Volt/cm desiderabili per particolari tecniche di separazione di aminoacidi e di peptidi. Sono forniti i dati fondamentali del progetto con indicazione dei particolari accorgimenti tecnici adottati e dei materiali impiegati.

Infine, gli AA riportano i risultati delle misurazioni e dei controlli eseguiti sull'apparecchio funzionante. Il dispositivo, raggiunge caratteristiche molto superiori a quelle degli apparecchi prodotti dall'industria e viene impiegato nelle ricerche sulla struttura di proteine di interesse biologico che vengono condotte presso i Laboratori di Biologia dell'Istituto.

Summary. — Principles and importance of the paper electrophoresis for some laboratory's analysis and particularly for the investigations about the proteins' structure are mentioned and motives which impose high-voltage adoption are indicated.

In this communication the Authors describe an apparatus realized in the I.S.S., which allows to make experiences with voltage grades until 250 Volt/cm which are wanted for amino acids and peptides separation special techniques.

Design's essential data, with specification of the particular technical systems and the materials employed are exposed.

Finally, the Authors report the measures and controls' results accomplished on the running apparatus. The dispositive attains better work characteristics than these which are obtained in commercial apparatuses. It's employed in the researches about the structure of the proteins of biological interest which are now conducted in the Institut's Biological laboratories.

L'elettroforesi su carta è basata sulla differente mobilità di particelle o di ioni elettricamente carichi quando vengano sottoposti all'azione di un campo elettrico. Tale tecnica, sviluppata in epoca relativamente recente, ha costituito insieme alla cromatografia di ripartizione e di adsorbimento un valido mezzo per separare a scopo analitico un grande numero di sostanze importanti dal punto di vista biologico. Inizialmente, applicando bassi gradienti di potenziale dell'ordine di grandezza di 5-20 V/cm sono state ottenute buone separazioni di sostanze complesse ad alto peso molecolare, ma ben presto apparve chiaro che queste condizioni non erano adatte per ottenere una buona risoluzione di sostanze a basso peso molecolare poichè l'alta velocità di diffusione di queste pone un limite al valore analitico del metodo. Ne conseguì la necessità di applicare differenze di potenziale molto più elevate per migliorare la separazione: se ne ottennero risultati molto brillanti che incoraggiarono sempre nuovi miglioramenti della tecnica inizialmente sviluppata da WIELAND nel 1948.

Elettroforesi su carta ad alta tensione è definita quella tecnica di elettroforesi nel corso della quale viene applicato un gradiente di potenziale di almeno 50 V/cm. Tuttavia, per ottenere i più grandi vantaggi da essa è consigliabile di operare con gradienti superiori ai 100 V/cm anche se le difficoltà presentate dalla costruzione di una apparecchiatura capace di realizzare condizioni di questo ordine di grandezza, divengano progressivamente maggiori con l'aumentare della tensione. Poichè la migrazione in un dato periodo di tempo è proporzionale alla forza del campo elettrico applicato, l'uso della più alta tensione possibile consente di ottenere una notevole economia di tempo, una alta risoluzione dei componenti la miscela in esame ed un più facile riconoscimento di essi, anche se presenti in bassa concentrazione.

Questa tecnica non si è dimostrata però utile nella separazione delle proteine e questo fatto non è solo imputabile alla denaturazione di queste dovuta al calore sviluppato dal passaggio della corrente; infatti, sistemi di raffreddamento molto efficaci non migliorano i risultati; una buona separazione delle proteine in queste condizioni è probabilmente anche ostacolata dalla relativa secchezza della carta e dalla maggiore viscosità di queste sostanze.

La tecnica di elettroforesi su carta ad alta tensione ha trovato applicazioni per la separazione di un grande numero di composti a peso molecolare relativamente basso tra cui sostanze che reagiscono positivamente alla ninidrina come aminoacidi e peptidi, indoli, zuccheri, purine, pridimidine e derivati, acidi del ciclo dell'acido citrico, acidi fenolici, chetoacidi, amine alifatiche e aromatiche nonchè cationi inorganici.

Poichè le ricerche che alcuni di noi stanno conducendo sulla struttura di proteine di interesse biologico richiedono la applicazione di tecniche elettroforetiche per la separazione rapida di aminoacidi e di peptidi, è stato deciso di progettare e di costruire in Istituto un apparecchio che soddisfacesse nel modo migliore le esigenze del lavoro programmato.

Negli ultimi anni sono stati descritti numerosi dispositivi realizzati essenzialmente secondo due soluzioni: alcuni sono basati sul raffredda-

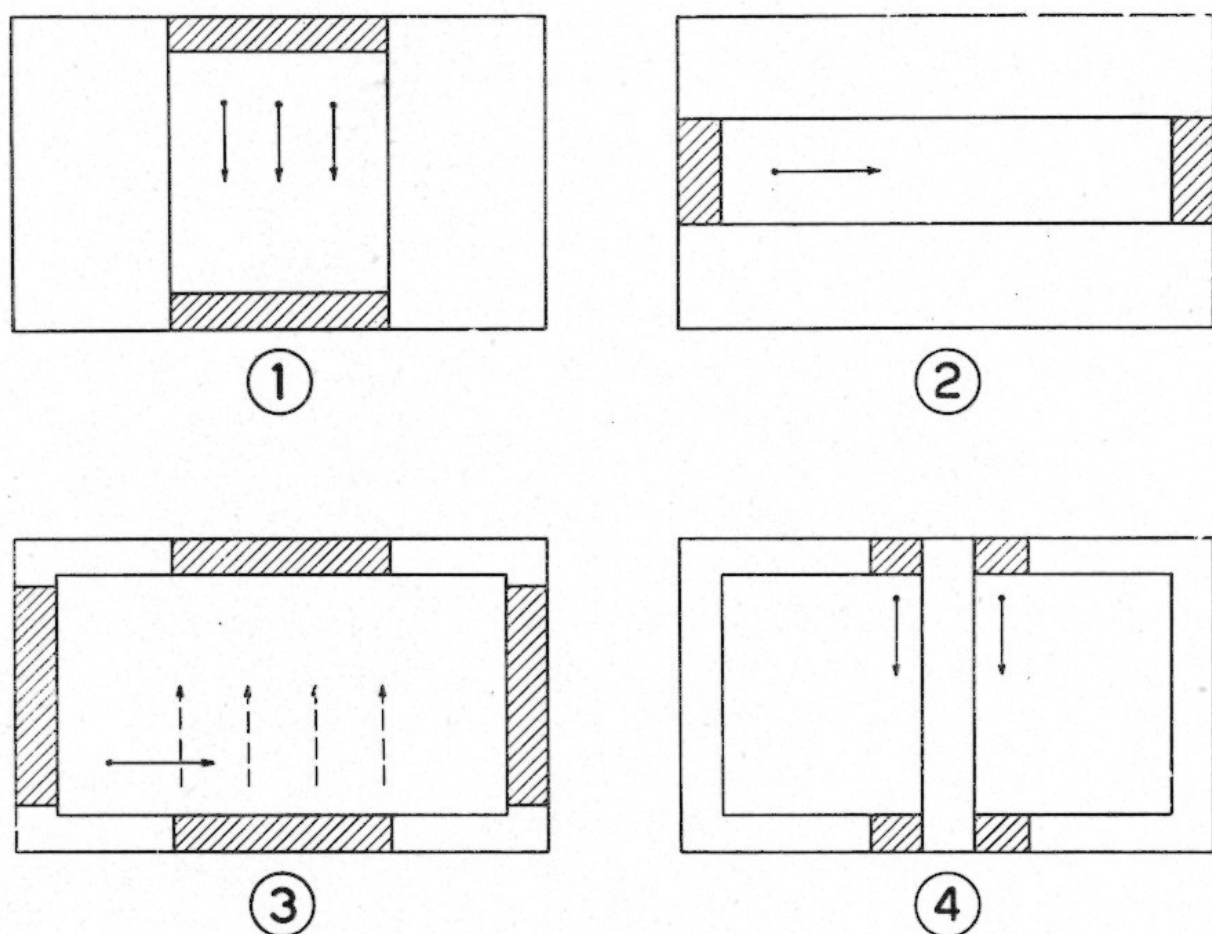


Fig. 1.

- 1 - Elettroforesi monodimensionale a gradiente elevato.
- 2 - Elettroforesi monodimensionale a corsa lunga.
- 3 - Elettroforesi bidimensionale.
- 4 - Finger printing.

mento diretto della carta da filtro per mezzo di un solvente organico, raffreddato o no, non miscibile con il campione nè con la soluzione acquosa di elettrolisi presente negli elettrodi, altri invece sono basati sul raffreddamento della carta ottenuto per contatto mediante piastre di metallo, vetro o plastica che, a seconda dei casi, vengono raffreddate con acqua corrente o con miscele refrigeranti.

Partendo dai dispositivi appartenenti a questa seconda categoria

proposti da C. E. Glover (Univ. Coll. Hospital Medical School-London), da D. Gross (Res. Lab. Tate & Lyle Ltd - Keston) e da altri, si è cercato di realizzare nell'Istituto Superiore di Sanità un'apparecchiatura che consentisse diversi tipi di prove, con una elevata sicurezza per gli operatori e senza eccessive complicazioni costruttive.

In pratica si è riscontrato che la refrigerazione del piano d'appoggio è fondamentale per il corretto funzionamento degli apparecchi di un tal tipo e per la stessa possibilità di applicare la tecnica della elettroforesi su carta con elevati gradienti di tensione.

Le dimensioni adottate per il piano d'appoggio suddetto sono state le seguenti: cm 65 × 40. Infatti, fu previsto di poter realizzare così, insieme con altri accorgimenti costruttivi, diverse disposizioni sperimentali, con notevoli vantaggi pratici ed economici: le disposizioni possibili sono quelle mostrate dagli schizzi schematici della fig. 1.

L'obiettivo principale tenuto presente nel progettare il piano refrigerante fu quello che fosse effettivamente assicurato in ogni punto della carta non solo una sufficiente asportazione del calore che si sarebbe sviluppato con una imprevedibile irregolarità, ma anche la maggiore uniformità possibile nella distribuzione della temperatura in qualunque fase della prova e questo per i motivi che verranno precisati in seguito.

La quantità di calore che deve essere allontanata in ogni unità di tempo dal piano è definita, a parte il valore di un coefficiente da determinare sperimentalmente, dalla legge di Joule:

$$q = K \frac{V \times I}{a}$$

essendo q la quantità di calore espressa in cal/ora, V la tensione applicata ai due elettrodi, I la corrente che attraversa l'apparecchio ed a il coefficiente numerico dell'equivalenza fra energia termica ed energia elettrica che — con le unità di misura adottate — è uguale a 1,162.

L'elemento sperimentale tiene conto del fatto che solo una parte dell'energia elettrica fornita all'apparecchio viene dissipata in calore da asportarsi dal piano refrigerante, mentre un'altra parte si trasforma in calore negli elettrodi e nei ponti di collegamento o in lavori elettrochimici negli elettrodi e nella stessa carta sperimentale.

Il valore di K , nelle condizioni normalmente adottate, è stato sperimentalmente determinato su valori da 0,20 a 0,30.

Si vede facilmente, sostituendo nella formula i valori di V e di I richiesti per le prove più onerose (10.000 volt e 300 mA), che la quan-

tità di calore da asportare dalla carta non è trascurabile, presso a poco pari al calore generato da un becco a gas:

$$q = 0,25 \frac{10^4 \cdot 0,300}{1,162} = 645 \text{ cal/ora}$$

La notevole superficie della carta in seno alla quale avviene la trasformazione (fino a 1500 cm²), se da un lato facilita il problema tecnico dell'asportazione del calore sviluppato, d'altro lato fa sorgere la preoccupazione che la temperatura prefissata resti entro limiti sufficientemente ristretti in ogni punto della carta su cui si sperimenta.

Infatti è stato rilevato da D. Gross e confermato da prove condotte sistematicamente sull'apparato che descrive, che variazioni di 1°C nella temperatura di operazione comportano variazioni dello stesso segno di circa il 3% nella velocità di migrazione ionica, nelle condizioni sperimentali usuali per la separazione delle sostanze di maggiore interesse.

Se poi si considera che differenze di temperatura locali sono ancor più negativamente influenti su la buona riuscita delle prove in quanto causano, oltre che una corrispondente variazione locale della velocità di migrazione degli ioni anche disordinati movimenti dell'elettrolita che imbibisce la carta a motivo dei fenomeni secondari di osmosi e di capillarità che si suscitano, risalta che una assoluta stabilità ed omogeneità nella temperatura della carta costituisce il presupposto fondamentale per la corretta realizzazione e la riproducibilità delle prove di elettroforesi.

Affinchè la riproducibilità dei singoli spostamenti rimanga entro valori di circa il 3%, è evidente la grande importanza che la temperatura a cui si opera venga sicuramente mantenuta entro i limiti di $\pm 0,5^\circ\text{C}$ in qualunque punto della carta ed in qualunque momento della prova.

Naturalmente, buone condizioni di stabilità devono essere raggiunte per tutti gli altri elementi che direttamente o indirettamente influiscono sulla mobilità degli ioni e cioè:

- gradiente di tensione e corrente elettrica;
- conduttività della carta, dei ponti e degli elettrodi;
- pH e forza ionica degli elettroliti;
- grado di imbibizione della carta;
- pressione esercitata sulla carta;
- evaporazione degli elettroliti;
- diffusioni osmotiche nella carta.

Dopo tali considerazioni è chiaro un altro importante vantaggio offerto dagli abbreviati tempi d'operazione consentiti dall'impiego di elevati valori di tensione nella tecnica della elettroforesi analitica e cioè quello di un più facile raggiungimento della costanza, entro limiti ristretti, dei diversi fattori sperimentali, a tutto vantaggio della risoluzione e della confrontabilità dei risultati analitici conseguiti.

Un elemento largamente influente su le condizioni sperimentali e che ha formato oggetto di approfondite discussioni e di prove è la temperatura d'operazione. Infatti, una relativamente alta temperatura della carta favorisce la velocità di migrazione degli ioni e quindi, in definitiva, abbrevia il tempo richiesto dalle prove; una bassa temperatura, per contro, riduce l'evaporabilità degli elettroliti ed evita ogni denaturazione delle sostanze in esame. E' ovvio che vanno escluse le temperature che diano pericolo di congelamento degli elettroliti usati.

I limiti della temperatura d'operazione della carta sono stati pertanto stabiliti in $+20^{\circ}\text{C}$ e $+5^{\circ}\text{C}$: la temperatura stessa può essere fissata preventivamente per ogni prova d'analisi con l'approssimazione di 1°C nel campo anzidetto e viene mantenuta dall'impianto refrigerante, con la tolleranza di $\pm 0,25^{\circ}\text{C}$, in qualunque condizione sperimentale e d'ambiente.

Nella progettazione del dispositivo sperimentale oggetto della presente comunicazione, sono state tenute in debito conto le condizioni essenziali anzidette cercando di raggiungerle con limitate complicazioni costruttive.

A differenza delle disposizioni adottate da altri sperimentatori, la parte essenziale dell'apparecchio è costituita da una sola piastra su cui la carta viene mantenuta premuta da un cuscino pneumatico: questa disposizione ha il grande vantaggio di rendere superflua una spinta precisione nella finitura della piastra e di dare la sicurezza di una uniforme pressione e di buon contatto fra carta e piastra in qualunque punto e in qualunque momento. Il disporre la carta fra due piastre refrigerate avrebbe creato gravi difficoltà di contatto: infatti, piastre di dimensioni relativamente grandi come quelle adottate si sarebbero sicuramente deformate sotto l'influenza delle sollecitazioni termiche e con il passare del tempo, rendendo vana la lavorazione precisa dei piani di contatto. D'altro canto risulta possibile sottrarre dalla carta con il contatto di una sola superficie convenientemente refrigerata e nelle condizioni che verranno appresso specificate, fino a 1 W/cm^2 con un salto medio di temperatura carta-piastra non superiore a $10^{\circ} \div 12^{\circ}\text{C}$.

Il piano è stato realizzato con una lastra di ottone ricotto dello spessore di 3 mm al fine di ottenere una buona resistenza meccanica insieme con una regolare distribuzione del calore.

La lastra è sostenuta da colonnine in acciaio inossidabile di disegno specialmente studiato per ridurre al minimo ogni possibile disuniformità nella inerzia termica e nella conducibilità della piastra. La faccia inferiore della lastra è a contatto con un cuscino di alcool il quale ha la funzione di trasmettere il calore comunicato dalla carta alla piastra d'appoggio ad una serpentina di rame nella quale avviene l'espansione di un fluido frigorifero.

Accorgimenti particolari sono stati escogitati per ottenere una distribuzione del calore per quanto possibile uniforme: la serpentina di evaporazione non ha nessun punto di contatto con la piastra e la tra-

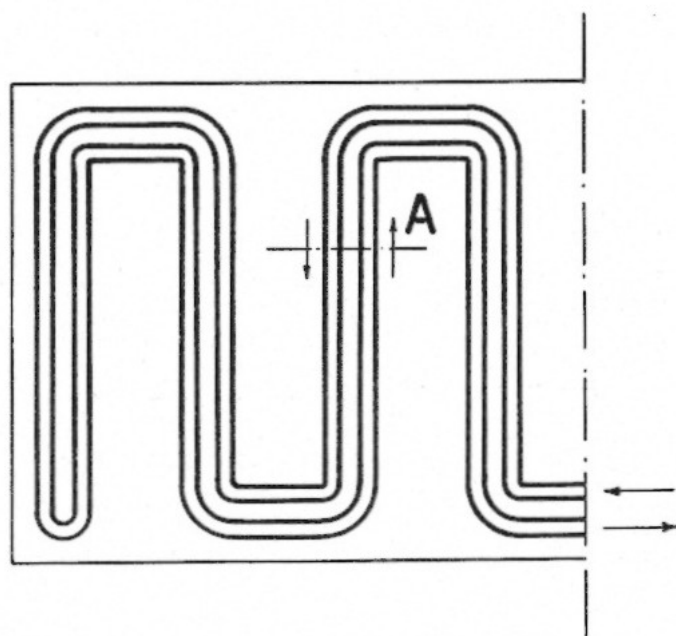


Fig. 2. - Andamento schematico della serpentina refrigerante.

missione del calore avviene solo attraverso il cuscino di alcool anzidetto. In seno a tale cuscino i moti convettivi sono relativamente attivi e contribuiscono a rendere uniforme la distribuzione del calore: infatti l'alcool presenta una cattiva conducibilità termica ($0,18 \text{ cal/ora.m.}^{\circ}\text{C}$) rispetto a quella dei metalli con cui è a contatto (ottone $100 \text{ cal/ora.m.}^{\circ}\text{C}$ — rame $300 \text{ cal/ora.m.}^{\circ}\text{C}$), una bassa capacità termica (circa metà di quella dell'acqua), un elevato coefficiente di dilatazione cubica e soprattutto un'alta fluidità anche a bassa temperatura.

La propagazione del calore dalla carta alla serpentina di rame contenuta nella piastra d'appoggio avviene essenzialmente per *adduzione* (carta $\rightarrow$ piastra) per *conduzione* (sup. esterna $\rightarrow$ sup. interna della piastra) per *conduzione* e per *convezione* (in seno alla massa dell'alcool). Tuttavia, in successiva approssimazione, non può essere trascurato il

fatto che una parte del calore viene trasmessa per *irraggiamento* e che la temperatura della serpentina va crescendo dall'entrata all'uscita del fluido refrigerante. Per ovviare a questi particolari tecnici e mantenere per quanto più possibile isoterma in regime permanente la superficie di contatto carta-piastra è stato escogitato un andamento particolare della serpentina (indicato schematicamente nella fig. 2) tale che in ogni punto di essa una sezione A comprenda un elemento della tubazione di andata ed un elemento della tubazione di ritorno: è chiaro che, se la temperatura lungo la tubazione va crescendo linearmente, come si può ritenere con buona approssimazione data la brevità della serpentina, la semisomma delle temperature nella sezione considerata è costante. La disposizione costituisce una sorta di by-pass termico fra andata e ritorno della tubazione, riducendo la resa complessiva dell'evaporatore ma, insieme con l'intermediario del cuscino liquido, ha risolto completamente il problema essenziale della uniforme distribuzione del calore e della eliminazione di punti caldi, che sarebbero causa di distorsioni nelle traiettorie delle sostanze e di danneggiamenti al sistema di isolamento elettrico della carta.

Il complesso costituito dalla lastra d'appoggio in ottone, dalla serpentina in rame, dal cuscino d'alcool e dalla scatola che lo contiene ha una notevole massa termica che, una volta a regime, assorbe con la sua inerzia i transitori generati dalla stessa esperienza in corso o dalle fasi di regolazione automatica del mezzo frigorifero.

Quale elemento refrigerante dell'insieme è stato adottato il gas Freon 22 lasciato espandere direttamente nella serpentina di rame anzidetta, dopo essere stato compresso e raffreddato da un gruppo frigorifero del tipo semiermetico marca UNIVERSAL della potenza di 800 frigorifici/ora, raffreddato ad acqua. Il gruppo è incorporato nello stesso tavolo che sostiene l'apparecchio sperimentale e si è dimostrato molto efficace per il rapido raggiungimento della temperatura di regime della piastra.

La regolazione della temperatura viene effettuata mediante una valvola equilibratrice barostatica inserita sulla tubazione di ritorno del gas: in ogni momento gli scarti di temperatura misurabili alla superficie della piastra in condizioni estreme, non superano il $0,1^{\circ}\text{C}$. Il sistema è dotato anche di un termostato per l'arresto automatico del gruppo in condizioni di non utilizzazione dello apparecchio, nonchè degli usuali accessori di manovra e di sicurezza.

L'equipaggiamento frigorifero anzidetto è stato adottato dopo alcune prove condotte facendo circolare nella serpentina un flusso continuo di alcool raffreddato e pompato da una apparecchiatura da laboratorio: tale sistema è stato abbandonato dopo le prime prove essendosi dimo-

strato di difficile regolazione, molto ingombrante ed anche pericoloso. La soluzione di ottenere il raffreddamento della piastra per mezzo della sola circolazione di acqua, raccomandato da alcuni ricercatori, è stata scartata fin dal principio perchè si calcolò che sarebbe occorsa una portata molto rilevante per sopperire alle massime potenze dissipate, senza alcuna pratica possibilità di raggiungere i bassi valori di sperimentazione ($4^{\circ} \div 5^{\circ}\text{C}$) desiderati, nè di regolare la temperatura sperimentale e mantenerne automaticamente la stabilità.

Il controllo della temperatura a cui si opera con l'apparato è reso possibile da una sonda a resistenza elettrica immersa nel cuscino di alcool: buoni risultati si sono ottenuti anche con sonde nelle quali l'elemento termosensibile è costituito da un microscopico termistore. Nel primo caso la temperatura è rilevata con uno strumento di misura a ponte, nel secondo con uno strumento a lettura diretta, di immediata consultazione.

Si ritiene che un termometro a mercurio del tipo a quadrante, con sonda flessibile, risulterebbe d'uso più pratico; disgraziatamente non è stato possibile inserire un simile strumento sull'apparecchiatura costruita, non essendo stato previsto nel cuscino refrigerante lo spazio per il bulbo che, nel particolare campo di misura, risulta relativamente voluminoso.

Nell'ultima parte del presente rapporto sono descritti i controlli effettuati per stabilire una relazione univoca fra le indicazioni del termometro di controllo e la temperatura in seno alla carta nel corso delle sperimentazioni.

Il sistema adottato per mantenere la carta sperimentale aderente alla piastra refrigerata con pressione uniforme e regolabile viene illustrato di seguito: con esso si è ottenuto anche che eventuali anomalie nella planarità della piastra d'appoggio non rivestono alcuna importanza per la regolarità della refrigerazione e della compressione della carta, restando in tal modo escluse le principali cause capaci di disturbare sensibilmente l'andamento delle prove. Tuttavia, in previsione di ulteriori applicazioni tecniche della piastra ed anche per acquisire un'esperienza specifica necessaria per la progettazione di altri apparecchi di maggiori dimensioni, che si prevede di dover realizzare in seguito, si è studiato ed adottato un sistema di ancoraggio della piastra su molti punti ad un supporto di marmo di grande rigidità. Questo sistema dà un'alta sicurezza riguardo alla indeformabilità della lastra metallica nel tempo e sotto le rilevanti sollecitazioni termiche e meccaniche imposte dalle condizioni di lavoro; inoltre consente di poter correggere, mediante l'introduzione di opportuni spessori, eventuali curvature o irregolarità iniziali della costruzione.

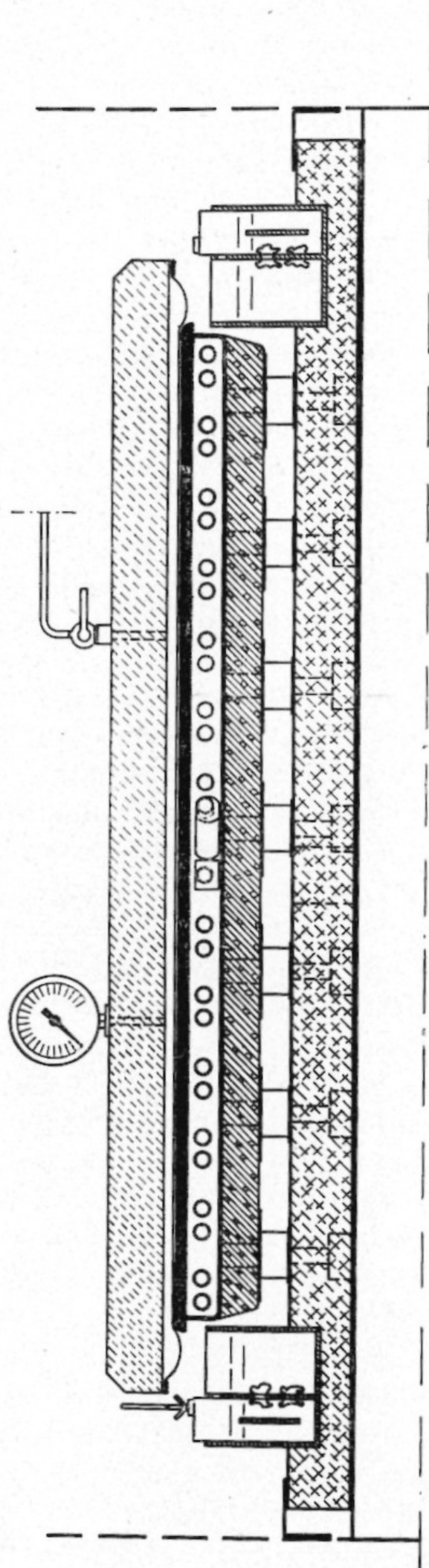


Fig. 3a. - Sezione verticale dell'apparecchio

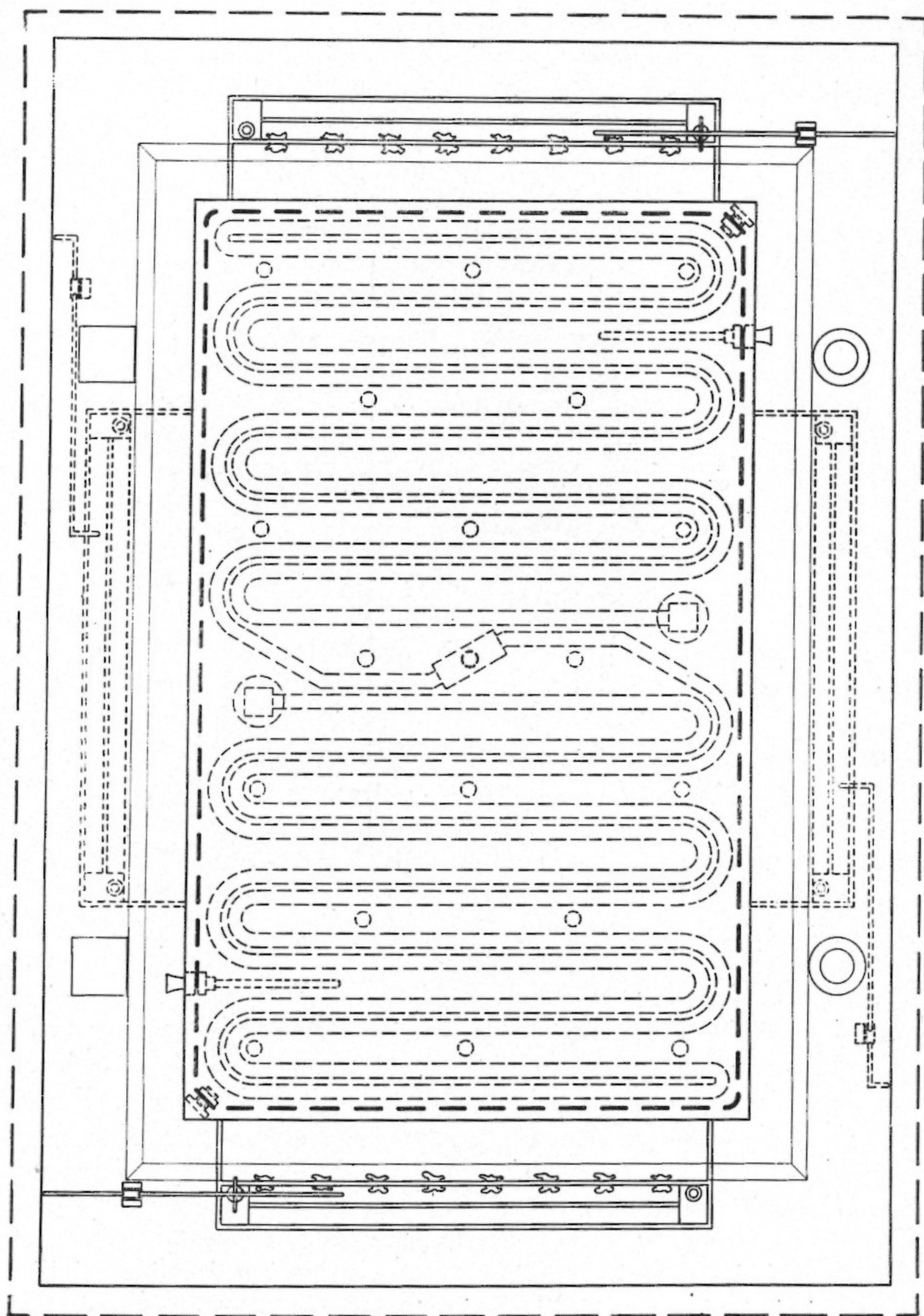


Fig. 3b. - Vista in pianta dell'apparecchio (tratteggiato l'andamento della serpentina interna).

La figura 3 mette in evidenza la disposizione di insieme e la figura 4 illustra il particolare di un supporto, i materiali impiegati e lo speciale disegno studiato per ridurre al minimo le variazioni di conducibilità e d'inerzia termica della lastra metallica in corrispondenza del supporto stesso. Si osserva di passaggio che, oltre alla scelta dei materiali di costruzione, particolari accorgimenti furono adottati nell'uso dei materiali di saldatura per raggiungere la necessaria robustezza meccanica e l'im-

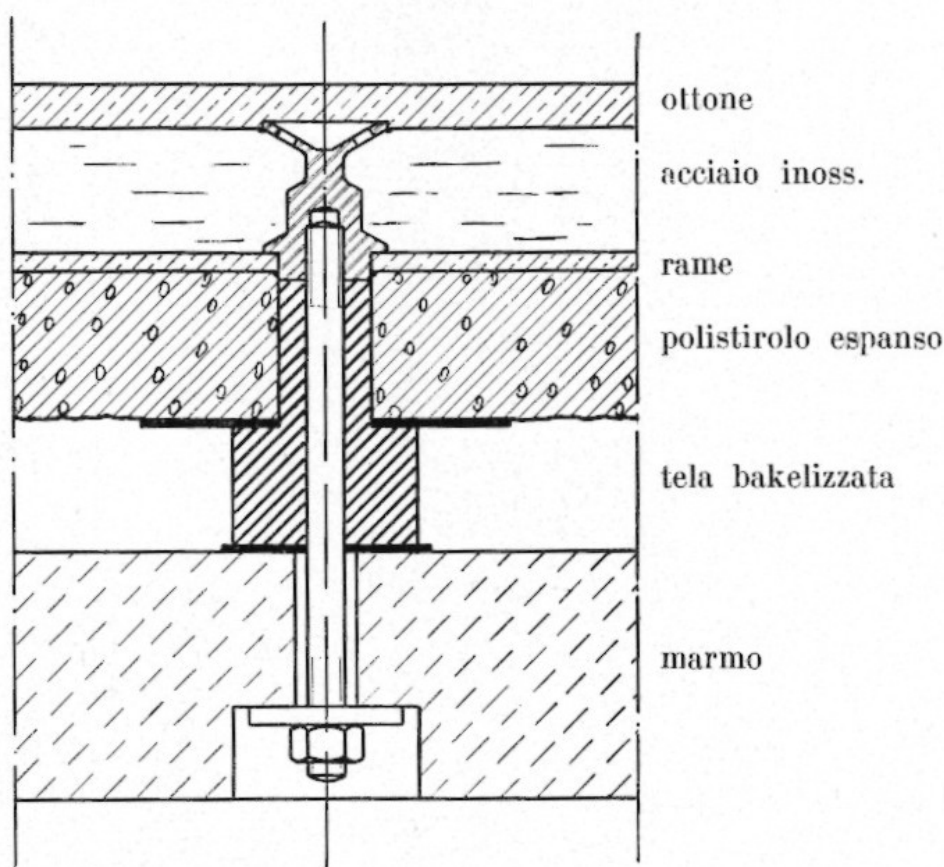


Fig. 4.

permeabilità dell'insieme nonchè la pratica realizzabilità della costruzione, anche in vista di eventuali modifiche o riparazioni.

Il piano di marmo anzidetto costituisce la base dello apparecchio e su di esso sono opportunamente inseriti anche le vaschette-elettrodi, i sostegni per il sistema di pressione, i dispositivi di sicurezza e gli altri accessori. Il piano stesso presenta una serie di forature per il passaggio delle tubazioni, dei cavetti elettrici, delle sonde di controllo e di quant'altro occorra per l'alimentazione e la manovra dell'apparecchio. In questo modo è stato possibile racchiudere il complesso sperimentale entro una gabbia metallica a rete fitta, tale da evitare ogni possibilità di manomissione da parte degli sperimentatori, fintantochè esso si trovi sotto tensione.

Il dispositivo per ottenere l'aderenza della carta alla piastra refri-

gerata è stato realizzato nel modo più semplice per mezzo di un cuscino pneumatico direttamente appoggiante sulla carta sperimentale.

Il sistema si è rivelato ottimo per assicurare l'aderenza della carta alla piastra e per annullare l'evaporazione dell'elettrolita di cui è imbibita la carta. Sono richiesti, per il migliore funzionamento dell'insieme valori bassissimi della pressione, inferiori a quelli riportati in letteratura da altri gruppi di studio, a tutto vantaggio della regolarità e della riproducibilità del procedimento.

Il cuscino anzidetto è stato realizzato con un foglio di polietilene dello spessore di 0,5 mm applicato lungo la periferia ad una tavola di perspex ed ermeticamente sigillato: questa ultima è a sua volta solidamente fissata alla base di marmo mediante robuste cerniere.

Il gonfiamento del cuscino si effettua con una semplice pera di gomma tramite un rubinetto a tre vie ed il valore della pressione si legge da un manometro direttamente avvitato su la tavola di perspex. Alla pressione massima di 0,5 atm corrisponde una spinta sulla piastra refrigerata di 1300 kg ma le pressioni sotto cui normalmente si sperimenta sono di $0,1 \div 0,25$ atm: il valore della pressione è sempre riportato fra i dati di partenza delle prove.

L'estrema semplicità del sistema di pressione adottato impone tuttavia la precauzione, se si opera a temperature sensibilmente inferiori a quella ambiente, di attendere alcuni minuti prima di iniziare l'esperimento, che l'indicazione del manometro si sia stabilizzata con il raffreddamento dell'aria contenuta nel cuscino a contatto con la piastra refrigerata. Altre sensibili variazioni di pressione nel corso delle prove normalmente non si verificano.

L'aria contenuta nel cuscino deve essere scaricata completamente perchè si possano aprire i ganci di bloccaggio alla fine di ogni esperienza. La trasparenza dei materiali usati per la costruzione del cuscino consente di seguire l'andamento delle prove e ciò si rivela utile specialmente per controllare le condizioni della carta nel corso dell'esperimento.

Da quanto si è detto finora si deduce che solamente l'alimentazione elettrica deve pervenire dall'esterno all'apparecchio e questo rappresenta un vantaggio di ordine pratico molto apprezzato in laboratorio.

La carta su cui si svolge l'esperienza di elettroforesi è sottoposta alla differenza di potenziale motrice attraverso due vaschette in perspex delle dimensioni di cm $34 \times 7 \times 8$ contenenti ciascuna circa 1500 cm³ di elettrolita tampone nel quale pescano i ponti di carta bibula. Gli elettrodi ai quali vengono applicati i conduttori di alimentazione sono costituiti da filo di platino da 0,32 mm avvolto su apposito telaio isolante e sono immersi in uno scompartimento delle vaschette: lo scompartimento contenente l'elettrodo è diviso da quello in cui pesca il pon-

te da un setto isolante, anch'esso in perspex, munito di numerosi fori in cui sono infilati tappi di spugna. In questo modo si ottiene una bassa resistenza elettrica dell'elettrodo e si rende assolutamente trascurabile la variazione di pH dell'elettrolita nel corso di ogni esperienza.

Oggetto di particolare attenzione e studio sono stati i dispositivi di isolamento e di sicurezza adottati per prevenire possibili accidenti agli sperimentatori, accidenti che, date le tensioni impiegate e la potenza degli apparati d'alimentazione, potrebbero avere conseguenze gravissime.

La carta su cui si svolge la prova di elettroforesi è normalmente isolata dal piano d'appoggio refrigerato da un foglio di polietilene di spessore appropriato in relazione alla massima tensione usata: si sono adottati senza inconvenienti spessori di 0,08 mm per ogni kV.

Una cura scrupolosa va posta nel controllo dello stato di conservazione del foglio isolante, potendo qualunque minima discontinuità provocare danneggiamenti non trascurabili all'apparecchio ed al dispositivo di alimentazione, oltre che alla perdita dell'esperienza e di tempo.

E' molto conveniente quindi rinnovare spesso il foglio d'isolamento eliminando quello ritenuto non più perfetto, anche in considerazione del suo minimo costo.

Per questo stesso motivo non si è preferito rivestire la piastra con uno strato isolante stabile — come per es. una verniciatura a base di teflon — ogni minimo danneggiamento del quale avrebbe messo fuori uso l'apparecchio e sarebbe stato di difficile e costosa riparazione.

Un leggero strato di olio al silicone disposto fra il foglio di polietilene e la piastra metallica si è dimostrato utile per migliorare sia l'isolamento elettrico che la trasmissione del calore.

Tutte le parti metalliche costituenti l'apparecchiatura sono con grande meticolosità elettricamente collegate a due prese di terra con conduttori indipendenti. Anche i cavi flessibili che portano la corrente agli elettrodi sono del tipo schermato e la calza esterna è messa a terra a ciascuna delle estremità.

La piastra, le vaschette-elettrodi e tutte le apparecchiature accessorie disposte sulla base di marmo sono racchiuse prima della messa in tensione e per tutta la durata dell'esperimento da una gabbia metallica collegata anch'essa alle prese di terra per mezzo di doppi conduttori flessibili.

Il collocamento della gabbia di sicurezza in posizione di lavoro provoca:

— la chiusura di due microswitch disposti in serie con l'interruttore che consente di dare tensione all'apparecchio;

— l'apertura di due coltelli che normalmente mantengono collegati a terra le vaschette-elettrodi ed i terminali dei conduttori.

Inoltre, il comando che mette sotto tensione l'apparecchio, quando si apre manualmente al termine di ogni esperienza, contemporaneamente cortocircuita i morsetti dell'alimentatore, eliminando ogni residua carica capacitiva.

La sistemazione definitiva dell'apparecchio sarà fatta in una stanza dei laboratori di biologia riservata alle esperienze di elettroforesi e di cromatografia, entro un box completamente vetrato nel quale dovranno avere accesso solamente i ricercatori esperti nel maneggio dell'apparecchio e delle alte tensioni elettriche. Le porte della stanza e del box possono essere chiuse a chiave ed una coppia di lampade spia, la cui accensione è determinata dalla stessa manovra di avviamento dell'apparato generatore di corrente ad alta tensione, emette luce intermittente rossa per tutto il tempo in cui l'apparato sperimentale resta sotto tensione.

Segnalazioni di tipo regolamentare sono applicate sulle porte d'accesso agli ambienti anzidetti e sembra che l'insieme dei provvedimenti sia tale da mettere al riparo dal rischio di incidenti fatali.

La fig. 5 mostra la distribuzione degli apparecchi principali negli ambienti suddetti.

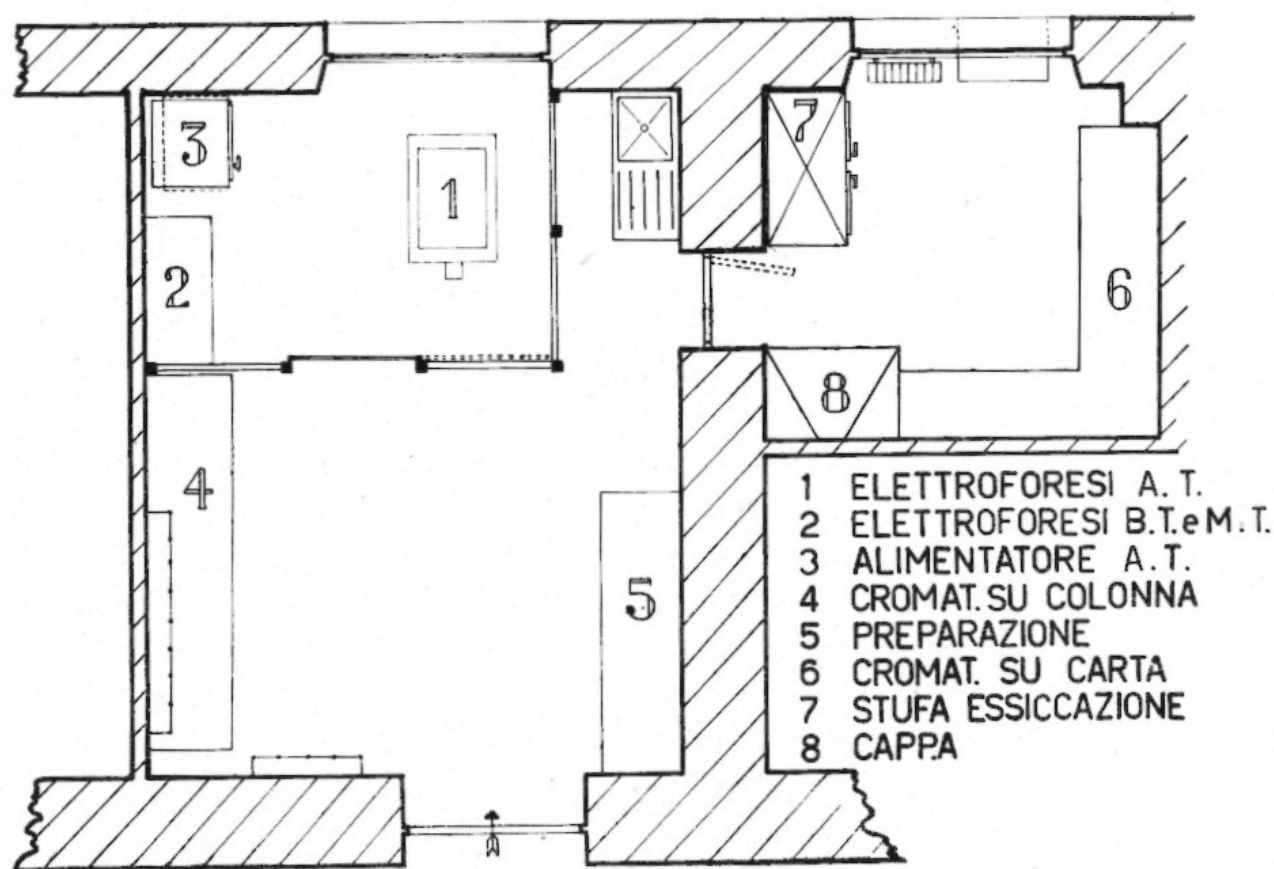


Fig. 5.

L'alimentazione elettrica dell'apparecchiatura descritta è assicurata normalmente da un impianto costruito dalla Soc. Westinghouse in base alle prescrizioni di massima assegnate dagli scriventi: si tratta di un alimentatore stabilizzato di corrente continua direttamente collegato alla rete.

Esso è in grado di alimentare l'apparato di sperimentazione erogando correnti elettriche di valore prestabilito compreso fra 0 e 300 mA ed alla tensione richiesta, fino al valore massimo di 10 kV.

L'impianto è costituito da un complesso di trasformazione trifase di potenza e di un gruppo raddrizzatore solido collegato a ponte trifase contenuti, insieme con un termostato, in un cassone metallico a bagno d'olio dal quale fuoriescono i due isolatori passanti per tensioni d'esercizio di 10 kV c.c. Il detto cassone è sistemato in alto su robuste mensole disposte a parete.

Sotto di esso, un armadio in lamiera contenente un autotrasformatore regolatore del tipo a rulli con relativo motore, un gruppo di automatismi per la stabilizzazione della corrente ed una serie di apparecchiature accessorie per il regolare funzionamento, per la protezione e per gli allarmi, reca sul pannello frontale gli indicatori di tensione e di corrente erogata nonché l'interruttore generale ed i comandi per la regolazione delle condizioni di funzionamento del complesso.

Il circuito elettrico interno comprende un dispositivo automatico di guida tale da permettere l'inserzione dell'apparecchio solo a tensione nulla, con tutti i circuiti ausiliari predisposti per una sequenza di manovre che escludono ogni possibilità di errore. La sequenza delle varie operazioni è garantita da opportuni blocchi elettrici in modo da rendere impossibile qualsiasi falsa manovra del quadro.

Lo schema elettrico dell'impianto è riportato nella fig. 6 ed il funzionamento ne è il seguente: la tensione di alimentazione del trasformatore principale viene paragonata con la tensione di riferimento corrispondente alla corrente voluta, impostata mediante manovra del potenziometro posto sul quadro dei comandi: la differenza fra il valore di tensione impostato e quello effettivo o « errore », dopo opportuna amplificazione, viene inviata agli avvolgimenti del motore dell'autotrasformatore regolatore di tensione il quale esegue la correzione dell'errore mantenendolo entro il $\pm 1\%$ rispetto al valore impostato. Tuttavia, il valore della tensione può essere variato manualmente anche sotto carico nel corso dell'esperienza.

La durata della prova viene comandata mediante un relais orario tarabile da zero a 12 ore: alla fine della prova esso effettua la disinserzione dell'apparato dalla rete di alimentazione.

Un microinterruttore provvede automaticamente alla disinserzione

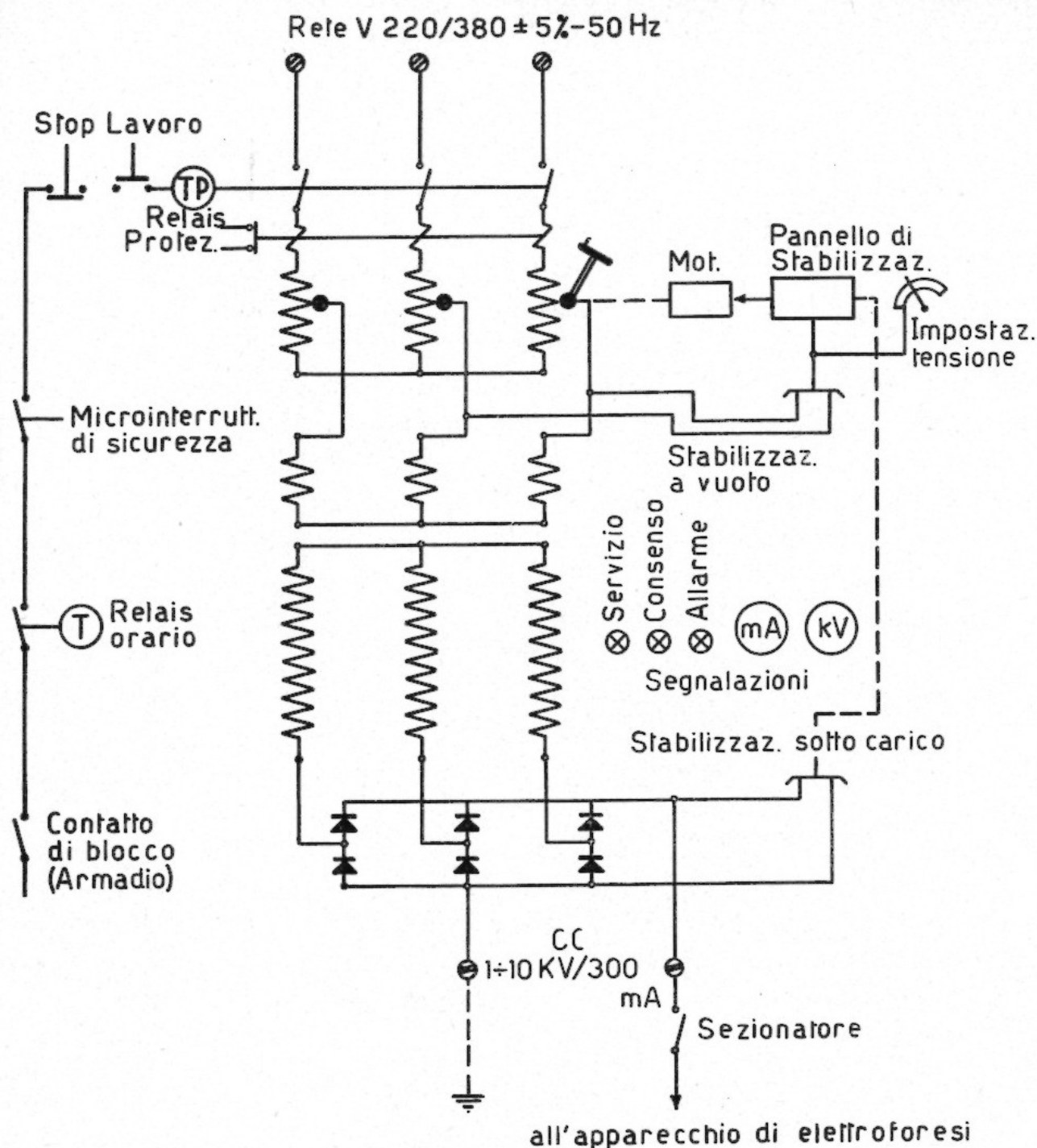


Fig. 6. - Schema elettrico dell'alimentatore ad alta tensione.

dell'apparato nel caso in cui venga aperta la porta del quadro di comando mentre l'apparecchio è in funzione. In generale, tutto il dispositivo elettrico è rispondente alle norme C.E.I. ed alle vigenti disposizioni antinfortunistiche. ,

Sul lato c.c. ad A.T. dell'impianto di alimentazione è disposto un sezionatore a manovra manuale mediante il quale il polo isolato di uscita dal cassone (positivo o negativo a seconda della prova in corso di effettuazione) è collegato a terra quando non alimenta il dispositivo sperimentale.

Il modo di funzionamento dell'apparato alimentatore « a corrente costante » è stato preferito a quello « a tensione costante », nella considerazione che la migrazione totale degli ioni di una determinata sostanza deposta sulla carta è, a parità delle altre condizioni sperimentali, conseguenza diretta della quantità di corrente elettrica che nello stesso intervallo di tempo ha attraversato la sezione conduttrice e che pertanto sia la omogeneità dei singoli spostamenti ionici che il confronto fra risultati diversi e la stessa riproducibilità di ogni esperimento sono assicurati dalla costanza della corrente elettrica per tutto il tempo dell'esperimento e non dal valore della tensione di alimentazione.

Infatti, essendo per definizione la mobilità ionica di ogni costituente espressa da

$$u = \frac{d \ S \ \chi}{I \ t}$$

in cui: d è la distanza percorsa nel tempo t

S la sezione retta della striscia conduttrice

I la intensità totale della corrente elettrica

χ la conducibilità specifica dell'elettrolita

consegue che lo spostamento di una qualunque frazione costituente la sostanza in prova, nello stato di dissociazione ionica in cui si trova ed a parità di ogni altra condizione, è dato dalla relazione

$$d = \frac{u \cdot t \cdot I}{S \cdot \chi}$$

ed è indipendente dalla tensione o dal gradiente a cui è sottoposta.

I controlli eseguiti sull'apparecchiatura costruita hanno mostrato che le caratteristiche desiderate sono state raggiunte. Tali controlli sono stati di due ordini: accertamenti tecnici sui componenti principali e verifiche del funzionamento generale.

Gli accertamenti tecnici principali sono stati i seguenti:

I - controllo delle caratteristiche geometriche e meccaniche della piastra e degli altri componenti essenziali. I risultati di tali controlli sono stati regolari e si omettono dal presente rapporto in quanto non

hanno messo in evidenza aspetti singolari o comunque interessanti gli obiettivi di ricerca;

II - controllo della uniformità della pressione esercitata dal cuscino sui vari punti della carta sperimentale. Tale controllo è stato effettuato per mezzo di due microdinamometri elettrici, appositamente costruiti, di diverso valore di risposta: in ogni caso lo spessore era di 2,5 mm e la superficie esplorata risultava di circa 1 cm². Poichè i dati che interessava conoscere erano di confronto dei vari punti della piastra e non assoluti, i dinamometri non sono stati tarati e ci si è limitati a verificare la costanza delle indicazioni nelle medesime condizioni d'impiego e la riproducibilità delle misure.

Spostando ad ogni misura tali dinamometri lungo la piastra, previamente divisa in quadri di 110 mm di lato, si immetteva aria nel cuscino e si leggeva ogni volta il valore della pressione indicata da un manometro a mercurio di precisione all'istante della chiusura del dinamometro. Scaricando lentamente l'aria dal cuscino si leggeva poi il valore della pressione nell'istante della riapertura: le differenze tra le due indicazioni sono sempre state inferiori al mm di Hg.

Dei risultati delle misure sono riportati nello schema seguente solamente quelli corrispondenti al campo d'impiego dell'apparecchiatura. Da esso si sono rilevate alcune disuniformità della pressione che si ritiene debbano essere attribuite ad errori strumentali.

158	174	160	164	172	174
167	156	168	175	178	178
171	167	175	171	175	175
156	158	160	163	170	162

(I dati sono espressi in mm di colonna di mercurio).

III - controllo della uniformità della temperatura nei diversi punti della carta di prova — a vuoto e nelle condizioni di sperimentazione — nonchè della rispondenza fra tale temperatura e le indicazioni della sonda termometrica inserita nell'apparecchio.

Un primo gruppo di rilievi è stato effettuato applicando sulla piastra, al vertice di quadri di 125 mm di lato, quindici coppie termoelet-

triche rame-costantana e registrandone le indicazioni, insieme con quelle date dalla coppia inserita nel cuscino refrigerante, mediante un apparecchio Leeds & Nortrup mod. SPEEDOMAX tipo G con possibilità di lettura di grado centigrado fra -50° e $+200^{\circ}$.

Queste misure sono state ripetute più volte per durate variabili fra una e cinque ore.

Le curve tracciate non hanno fornito elementi imprevisti: la temperatura del cuscino refrigerante nelle fasi di avviamento ha preceduto di $5 \div 6^{\circ}\text{C}$ quella media della superficie della piastra; una volta a regime, non è stato possibile apprezzare con l'apparecchio suddetto alcuno scarto di temperatura fra punto e punto della piastra nè fra questi e la temperatura del cuscino refrigerante.

Le curve mostrano che il regime termico dell'insieme, partendo da temperature ambienti di $24^{\circ} - 25^{\circ}\text{C}$, si raggiunge in circa 60 minuti.

Dall'esame dettagliato della sola curva relativa alle temperature date dalla termocoppia inserita nel cuscino refrigerante, si rileva una lieve ondulazione periodica con scarti di circa $\pm 1^{\circ}\text{C}$ dalla temperatura media e con un periodo intorno ai cinque minuti primi. Tali oscillazioni corrispondono evidentemente alle fasi di regolazione automatica del gruppo frigorifero e di esse non è assolutamente possibile riscontrare qualsiasi ripercussione nelle temperature misurate sulla faccia della piastra.

Un secondo gruppo di misure è stato fatto sull'apparecchio in funzione ed ha fornito dati interessanti. Le quindici coppie termoelettriche sono state applicate sopra una carta da filtro tipo WHATMAN N. 3 MM delle dimensioni di cm 57×30 con l'intermediario di un foglio isolante di polietilene da 0,2 mm di spessore. L'insieme era mantenuto premuto dal cuscino pneumatico, gonfiato alla pressione di 0,13 atm, sulla piastra refrigerante preventivamente portata alla temperatura di 1°C da oltre un'ora.

La carta, sottoposta ad una differenza di potenziale di 3000 V, è stata attraversata per due ore da una corrente elettrica il cui valore è passato da 60 mA a 75 mA a mano a mano che la prova procedeva. La temperatura rilevata dalla sonda immersa nell'alcool refrigerante si è elevata nel giro di 20' a 6°C e tale si è mantenuta per tutta la durata delle prove.

Invece, le temperature indicate dalle termocoppie applicate al di sopra della carta hanno mostrato alcune irregolarità: la temperatura della carta, registrata nelle condizioni e nel punto precisati sopra, è risultata mediamente di circa 21°C , superiore cioè di ben 15°C a quella registrata dalla sonda nell'alcool. Inoltre, si sono riscontrati tra i di-

versi punti della carta scarti assolutamente insospettati di $\pm 6/8^{\circ}\text{C}$ rispetto alla media, essendo le zone più calde sempre quelle centrali.

Tali risultati, che si sono ripetuti in tutte le prove, ci hanno lasciati perplessi e non siamo ancora in grado di dare al fatto una interpretazione pienamente soddisfacente, anche perchè mancano del tutto nella letteratura rilievi del genere i quali consentano di istituire confronti

IV - L'ultimo gruppo di controlli, eseguiti su carte sperimentali in condizioni funzionali definitive, non ha mostrato sensibili deviazioni ri-

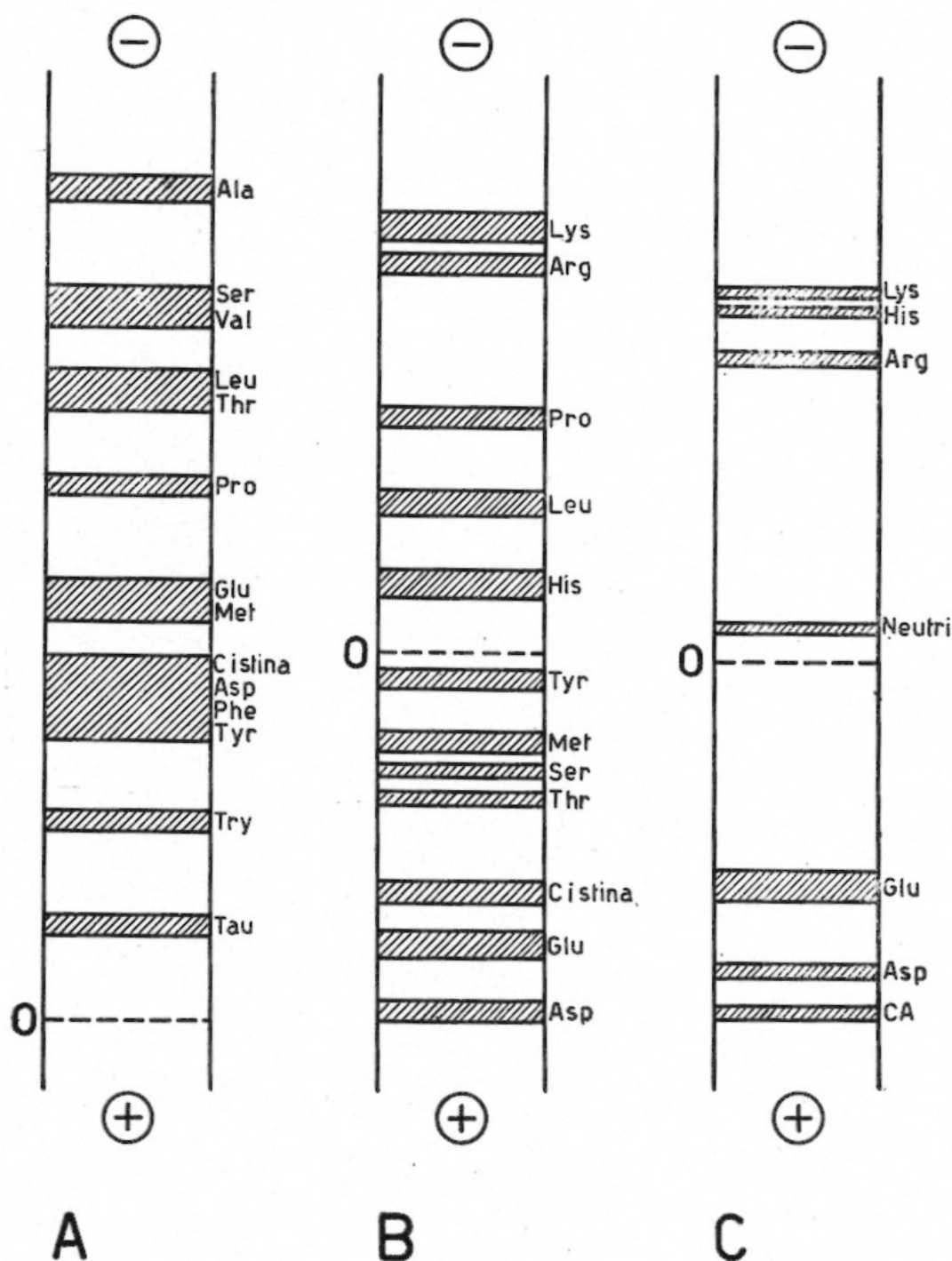


Fig. 7.

spetto ai risultati già noti e questo fatto lascia pensare che gli scarti di temperatura in seno alla carta di prova si verifichino normalmente ma che non siano finora stati messi in evidenza.

Sono state eseguite prove di separazione elettroforetica di aminoacidi da miscele sintetiche su carta Whatman n. 3 MM in fogli da cm 57×10 con tampone volatili a pH 2 e pH 5,2 e con tampone borato a pH 9,2.

In A della fig. 7 è rappresentata schematicamente la separazione di una miscela di alanina, serina, valina, leucina, treonina, prolina, acido glutammico, metionina, cistina, acido aspartico, fenilalanina, tirosina, triptofano e taurina ottenuta con tampone di acido formico 1,5 M + acido acetico 2 M in parti uguali a pH 2,0 e con gradiente di tensione di 50 Volt/cm per la durata di 90', essendo la temperatura della piastra di 6°C e la pressione esercitata sulla carta di 0,25 kg/cm².

B rappresenta invece la separazione di una miscela contenente lisina, istidina, arginina, acido glutammico, acido aspartico ed acido cisteico insieme con un gruppo di aminoacidi neutri: serina, valina, treonina, glicina ed alanina realizzata con un tampone piridina-acetato a pH 5,2 (2% di piridina in acido acetico acquoso all'1%) con un gradiente di tensione di 50 V/cm per 90', temperatura della piastra di 6°C e pressione esercitata sulla carta di 0,25 Kg/cm².

Infine, la separazione rappresentata in C è stata ottenuta da una miscela di lisina, arginina, prolina, leucina, istidina, tirosina, metionina, serina, treonina, cistina, acido glutammico ed acido aspartico con tampone borato di sodio 0,05 M pH 9,2 e con un gradiente di tensione di 50 volt/cm per 180', temperatura della piastra 6° e pressione esercitata sulla carta kg 0,25/cm².

Tutti gli elettroferogrammi sono stati sviluppati con l'usuale tecnica, usando il reagente alla ninidrina in acetone.

Sono in corso ulteriori esperienze di separazione di peptidi con il metodo dei « finger prints » secondo Ingram e di separazione rapida di aminoacidi e di peptidi con gradienti di tensione da 90 a 160 volt/cm; quanto riguarda i risultati analitici delle prove sopra cennate formerà prossimamente oggetto di una nota dettagliata.

Gli AA. ringraziano i sigg. Campanile e Amadori che hanno collaborato alla realizzazione dell'apparecchio nell'officina meccanica dell'Istituto.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Ingegneria e Laboratori di Biologia.

Direttore responsabile: Prof. DOMENICO MAROTTA

Reg. Stampa - Trib. di Roma n. 1534 del 14 luglio 1956