

LE BANDE ELETTROFORETICHE DELLE PROTEINE PLASMATICHE NELLA IMMUNOSOTTRAZIONE SU GEL DI AGAROSIO •

GIAMPAOLO MERLINI * ° FRANCO PAVESI * OMAR VALENTINI **
RENZO EPIS ° IRENE ZORZOLI ° REMIGIO MORATTI *
EDOARDO ASCARI ° FRANCESCO AGUZZI °°

Servizio di Analisi Chimico-Cliniche, Policlinico S. Matteo, Pavia °

Istituto di Patologia Medica I, Università degli Studi di Pavia °

*Istituto di Genetica Biochimica ed Evoluzionistica, CNR, Pavia ***

Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche, Ospedale di Broni e Stradella, Stradella (Pavia) °°

L'interpretazione molecolare del tracciato elettroforetico delle proteine plasmatiche, sempre più diffusa nei laboratori di chimica clinica, consiste nel valutare, per mezzo dell'ispezione visiva, le modificazioni delle singole proteine. Presupposto di questo approccio interpretativo, che offre un maggior numero di spunti semeiologici rispetto al tradizionale tracciato densitometrico, è l'identificazione delle proteine plasmatiche specifiche che determinano le bande del tracciato elettroforetico.

Le proteine specifiche che compongono il tracciato sono note da tempo⁴⁶, ma nessuna dimostrazione sperimentale diretta è stata riportata fino ad oggi. Una tecnica utile per l'analisi delle bande elettroforetiche è l'immunosottrazione¹ (IS), che è basata sull'immunoprecipitazione delle singole proteine, per mezzo di antisieri monospecifici, prima della separazione elettroforetica¹. Questa tecnica consente di rimuovere e di sottrarre singole proteine senza peraltro alterare il tracciato elettroforetico¹. Gli antisieri sono generalmente disponibili come sieri totali degli animali in cui sono stati prodotti e contengono, oltre alle gammaglobuline, altre frazioni proteiche. È pertanto necessario rimuovere dall'antisiero le componenti non- γ , che altrimenti migrerebbero con le componenti del siero in esame rendendo così illeggibile il tracciato elettroforetico. Questo risultato si ottiene per mezzo di un'elettroforesi preliminare dell'antisiero che separa la zona γ dalle altre frazioni.

• Poster presentato al 3rd European Meeting on 'Plasma Proteins in Clinical Diagnosis', Milano.

La Ricerca Clin. Lab. 12 (Suppl. 2), 33, 1982.

MATERIALI E METODI

L'elettroforesi è stata eseguita su piastre 20 x 10 cm di gel di agarosio, dello spessore di 1 mm, alla concentrazione di 0,8 g/dl in tampone barbiturato 75 mM, pH 8,6, contenente lattato di calcio 2 mM. Gli antisieri specifici sono stati forniti dall'*Istituto Behring* e dalla ditta Meloy (Springfield, USA). La soluzione fissante è costituita da 15 g di acido picrico in 1 l di H₂O e, dopo filtrazione, vengono aggiunti 200 ml di acido acetico glaciale. Per la colorazione si utilizza *Coomassie R-250* 0,2% in soluzione decolorante (metanolo, acido acetico, H₂O: 9:2:9).

La tecnica di IS si svolge in due fasi: 1. purificazione elettroforetica della frazione γ dell'antisiero; 2. migrazione elettroforetica del campione attraverso gli anticorpi purificati.

L'antisiero (10-20 μ l) è applicato con microsiringa su gel di agarosio per mezzo di una mascherina di plastica con fessure di 1x10 mm a 2 cm dal bordo anodico della piastra. Gli antisieri sono applicati in posizioni alternate lasciando la posizione adiacente libera per il siero di controllo non 'immunosottratto'. Dopo elettroforesi a 22 V/cm per 45 min, una striscia di gel di agarosio larga 1,5 cm e per tutta la lunghezza è asportata dal lato anodico della piastra al fine di rimuovere le frazioni non- γ dell'antisiero. Una nuova ed identica striscia di gel rimpiazza quella asportata. I campioni (5 μ l) a varie diluizioni (1:2, 1:6) vengono depositi sia nella posizione in cui è stato prima depositato l'antisiero sia in quella adiacente lasciata libera, cosicché sia il campione sottoposto a IS che quello adiacente di riferimento migrano in parallelo. La piastra viene ruotata di 180° nella camera elettroforetica in modo da impedire l'inquinamento da proteine non- γ dell'antisiero; queste proteine

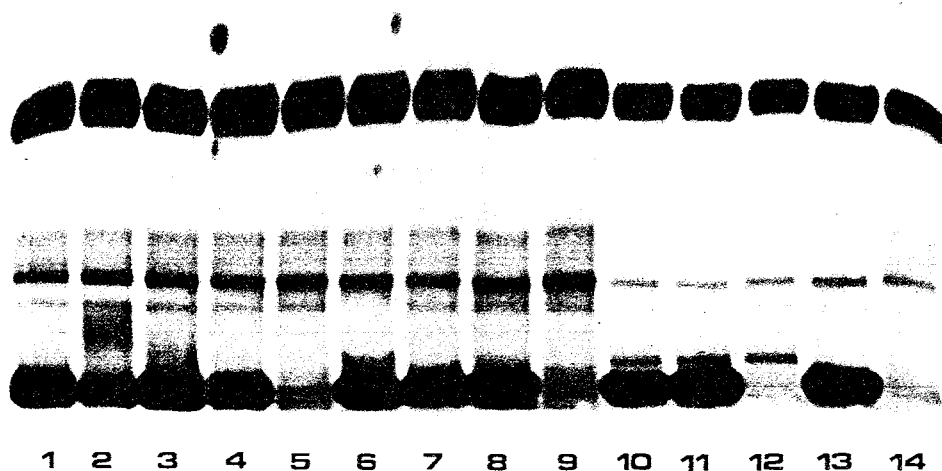


Fig. 1 - Campioni (5 μ l): 1-9 = siero normale diluito 1:3; 10-12 = siero normale diluito 1:6 con aptoglobina tipo 1:1; 13-14 = siero normale diluito 1:6 con aptoglobina tipo 1:2. Antisieri (15 μ l): 1 = anti- α_1 -antichimotripsina; 2 = anti- α_1 -antitripsina; 3 = anti- α -lipoproteina; 4 = anti-prealbumina; 6 = anti-C3; 7 = anti-emopessina; 8 = anti-fibronectina; 10 = anti- α_2 -macroglobulina; 11-13 = anti-aptoglobina.

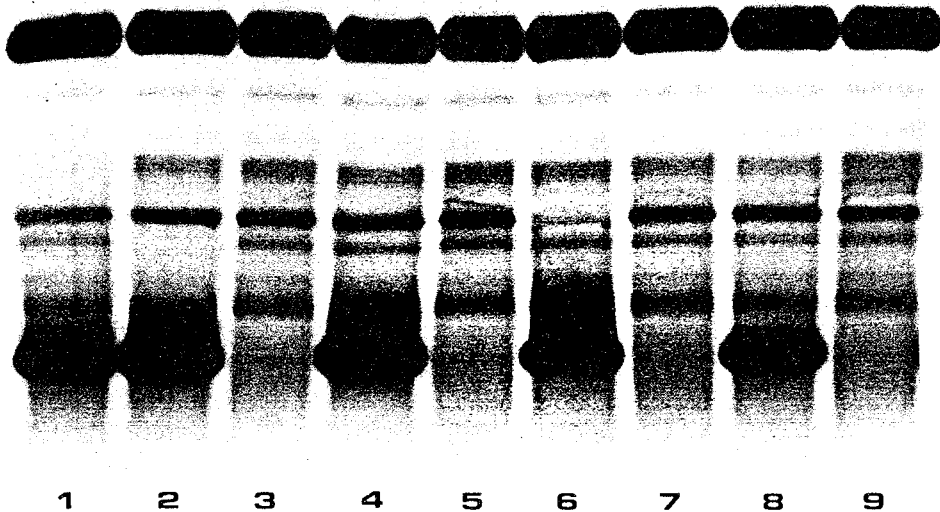


Fig. 2 - Campioni (5 μ l): 1-9 = plasma normale diluito 1:3. Antiseri (10 μ l): 1 = anti- α_2 -macroglobulina; 2 = anti-C3; 4 = anti-orosomucoide; 6 = anti-transferrina; 8 = anti-ceruloplasmina.

potrebbero essere migrate nel tampone durante la precedente corsa elettroforetica. Si applica quindi una bassa tensione, 10 V/cm per 15 min, al fine di facilitare la reazione antigene-anticorpo; per i rimanenti 30-40 min il voltaggio rimane quello usuale di 22 V/cm. La piastra viene quindi fissata per 20 min, pressata, essiccata e colorata.

RISULTATI

I risultati sono illustrati dai tracciati elettroforetici delle figg. 1 e 2. Nella piastra della fig. 1, lo stesso siero normale è stato applicato nelle posizioni da 1 a 9. Non vi sono modificazioni apprezzabili fra campione 'immunosottratto' e controllo nella posizione 1 (antisiero anti- α_1 -antichimotripsina), 3 (anti- α -lipoproteina) e 7 (anti-emopessina). Al contrario, la banda anodica all'albumina (anti-prealbumina, posizione 4), α_1 (anti- α_1 -antitripsina, posizione 2) e β_2 (anti-C3, posizione 6) scompaiono con l'antisiero specifico. L'IS con anti-fibronectina provoca scomparsa (posizione 8) di una tenue banda nell'interzona $\alpha_2\beta_1$ presente nel siero di riferimento. Una marcata attenuazione della banda α_2 si osserva con anti- α_2 -macroglobulina (posizione 10), mentre l'anti-aptoglobina (posizioni 11 e 13) provoca solo una modesta attenuazione della stessa banda.

Non si osserva alcuna modificazione dopo IS con anti-C5. Una leggera 'wavy band' nell'interzona $\beta_1\beta_2$ è rimossa con anti- β -lipoproteine (tracciati non riportati).

Nella piastra della fig. 2, dove è stato posto lo stesso plasma normale in tutte le posizioni, si può osservare marcata attenuazione della parte anodica della zona α_2 nella posizione 1 (anti- α_2 -macroglobulina), scomparsa della banda β_2 nella posizione 2 (anti-C3), nessuna modificazione nelle posizioni 4 e 8 (anti-orosomucoide ed anti-ceruloplasmina rispettivamente) e la scomparsa della banda β_1 in posizione 6 (anti-transferrina). Un plasma normale è stato immunosottratto con anti-fibrinogeno con scomparsa della banda nell'interzona β_2 - γ (tracciato non riportato).

L'IS con anti-albumina provoca scomparsa della banda specifica ad alte diluizioni del campione (1:20, 1:50). Le due bande attenuate immediatamente anodiche alla zona α_2 scompaiono con anti-Gc (tracciato non riportato). L'IS di altre proteine presenti a basse concentrazioni, quali il C4, l' α_2 HS-glicoproteina, l'inter- α -inibitore della tripsina (tracciati non riportati), non sembra modificare il tracciato elettroforetico.

Le componenti fondamentali delle singole bande elettroforetiche su gel di agarosio, identificate con IS, sono (dall'anodo): prealbumina, albumina, α_1 -antitripsina per la banda α_1 , componente Gc per le due tenui bande anodiche a quella di α_2 , α_2 -macroglobulina ed, in misura inferiore, aptoglobina per la banda α_2 , fibronectina per la banda attenuata nell'interzona α_2 - β_1 , transferrina per la β_1 , C3 per la β_2 e fibrinogeno per la banda omonima.

DISCUSSIONE

L'immunoprecipitazione delle singole proteine plasmatiche con antisieri monospecifici prima della migrazione elettroforetica (immunosottrazione) consente di determinare le proteine effettivamente responsabili del tracciato. Ciò non è invece ottenibile con l'immunofissazione^{2,3,7,8}, che evidenzia anche proteine presenti a basse concentrazioni e che quindi verosimilmente non contribuiscono in modo apprezzabile alla formazione delle bande. La determinazione delle proteine maggiormente responsabili del quadro elettroforetico non è d'altra parte possibile, a priori, dai dati di posizione e concentrazione delle varie proteine plasmatiche, in quanto il tracciato può anche non rispecchiare fedelmente la concentrazione dei singoli elementi. L'affinità per il colorante può infatti differire da proteina a proteina (l'orosomucoide, ad es., non è colorato con i comuni coloranti), e ciò impedisce di stabilire, dai soli dati di concentrazione, il contributo di ciascuna proteina al tracciato elettroforetico. L'attenuazione o la scomparsa di una banda elettroforetica nell'IS consente l'immediata individuazione della proteina responsabile della banda stessa.

I risultati con gel di agarosio sono analoghi a quelli ottenuti da AGUZZI e POCCHI¹ con acetato di cellulosa: alcune bande risultano determinate in pratica da una singola proteina, mentre nelle stesse bande l'immunofissazione rileva la presenza di diverse proteine. Ciò assume notevole importanza pratica per l'interpretazione del tracciato a fini diagnostici.

Oltre che nell'analisi del tracciato normale, l'IS può essere impiegata per identificare componenti anomale del tracciato elettroforetico. Il metodo non è applicabile alla regione γ , poiché in essa si verifica sovrapposizione dell'immunoprecipitato con le frazioni a bassa mobilità elettroforetica dell'antisiero e del siero o plasma esaminati. Questo fenomeno non riveste eccessiva im-

portanza pratica poiché le alterazioni della regione γ sono generalmente dovute a componenti immunoglobuliniche la cui identificazione e quantificazione sono rese possibili dall'impiego di varie tecniche immunoelettroforetiche.

BIBLIOGRAFIA

1. AGUZZI F., POGGI N.: Immunosubtraction electrophoresis: a simple method for identifying proteins producing the cellulose acetate electrophoretogram - *Boll. Ist. sieroter. milan.* 56, 202, 1977.
2. ALPER C. A., JOHNSON A. M.: Immunofixation electrophoresis: a technique for the study of protein polymorphism - *Vox Sang. (Basel)* 17, 445, 1969.
3. CAWLEY L. P., MINARD B. J., TOURTELLOTTE W. W., MA B. I., CHELLE C.: Immunofixation electrophoretic techniques applied to identification of proteins in serum and cerebrospinal fluid - *Clin. Chem.* 22, 1262, 1976.
4. JEPPSSON J.-O., LAURELL C.-B., FRANZÉN B.: Agarose gel electrophoresis - *Clin. Chem.* 25, 629, 1979.
5. JOHANSSON B.: Agarose gel electrophoresis - *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 29 (Suppl. 124), 71, 1972.
6. LAURELL C.-B.: Composition and variation of the gel electrophoretic fractions of plasma, cerebrospinal fluid and urine - *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 29 (Suppl. 124), 71, 1972.
7. PEDERSEN N. S., AXELSEN N. H.: Detection of M-components by an easy immunofixation procedure: comparison with agarose gel electrophoresis - *J. immunol. Meth.* 30, 257, 1979.
8. RITCHIE R. F., SMITH R.: Immunofixation. I. General principles and application to agarose gel electrophoresis - *Clin. Chem.* 22, 497, 1976.

Richieste di estratti vanno indirizzate a:

GIAMPAOLO MERLINI
Istituto di Patologia Medica I
Università degli Studi di Pavia
Policlino S. Matteo
27100 Pavia - Italia