

CDL BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE (BCM)

Corso di Biochimica Applicata (6 CFU)

Prof.ssa **Alessandra Olianas**



Dott.ssa Alessandra Olianas



Dip. Scienze della Vita e dell'Ambiente

Sezione Biomedica (laboratorio di Biochimica)

Tel. 0706754507 (studio)

Ricevimento studenti: **si riceve per appuntamento**

olianas@unica.it

Tecniche elettroforetiche **su gel di poliacrilamide:**

- 1) In condizioni native (PAGE nativa)
- 2) **In condizioni denaturanti in presenza del detergente ionico SDS (SDS-PAGE)
separa le proteine unicamente in base al PM**
- 3) **In gradiente di pH (Isoelettrofocalizzazione: IEF)
separa le proteine unicamente in base al pI**
- 4) Elettroforesi in condizioni denaturanti (AUT-PAGE)
- 5) Elettroforesi Bidimensionale (2D-PAGE)= IEF e SDS
separa le proteine in base al pI e al PM

Focalizzazione isoelettrica (IEF)

Tecnica elettroforetica altamente risolutiva per la **separazione di molecole anfotere** (proteine) che vengono separate unicamente in funzione del loro **punto isoelettrico** (pI).

Richiede la presenza di un **gradiente di pH** lungo il gel (poliacrilamide o agarosio).

Può essere effettuata:

- in condizioni native
- dopo denaturazione delle proteine, ma senza alterare la carica nativa (no SDS)

Per preparare un gel di poliacrilamide x IEF, miscelare:

- Monomeri di acrilamide e bis acrilamide**
- Agenti catalizzatori**
- no soluzione tampone**
- miscela di acidi alifatici sintetici poliamino-policarbossilici a diverso pI (anfoliti)**

- si usano gel di spessore ridotto
- si utilizzano sistemi di raffreddamento (4°C)



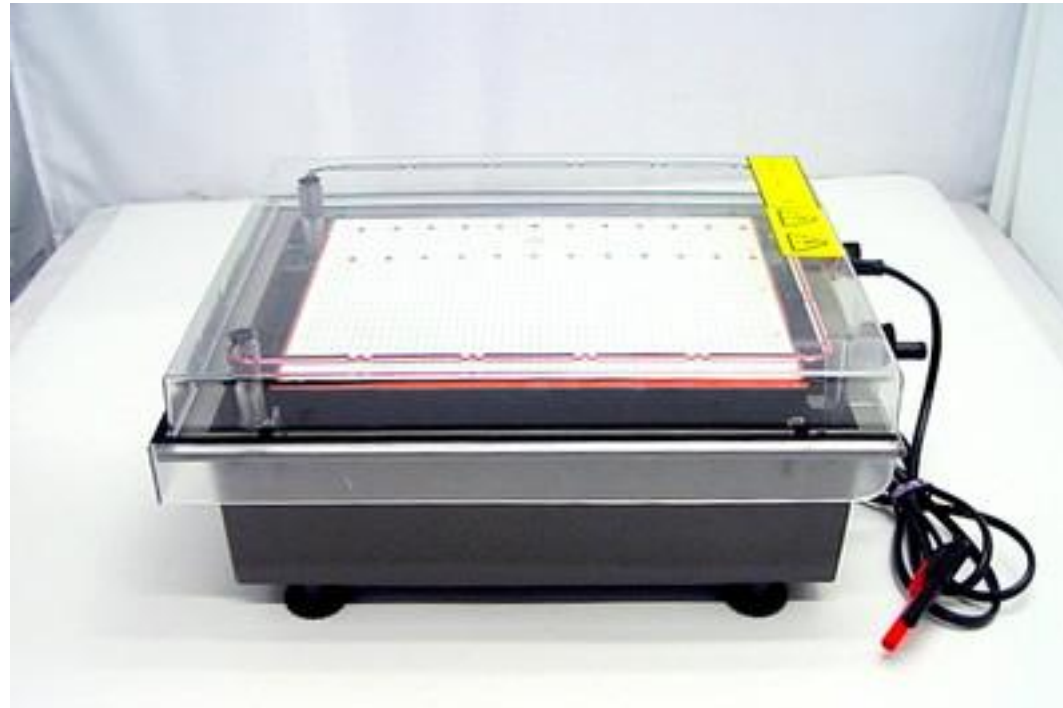
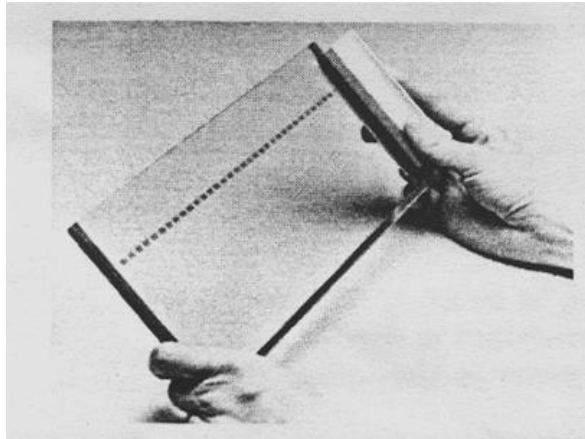
Bagnetto refrigerante cella elettroforetica alimentatore

**La separazione deve avvenire solo in funzione del pI:
le proteine devono muoversi liberamente tra le maglie del gel**

→ **gel con maglie larghe (T= 4%)** per evitare il fenomeno del setaccio molecolare

→ **gel di spessore ridotto (0.15 mm)**

→ **corsa elettroforetica in orizzontale** (per supportare dal basso il gel sottile)



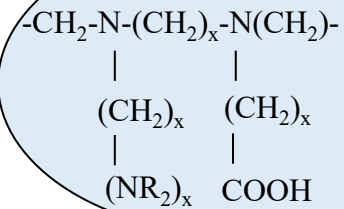
In commercio sono disponibili miscele di **anfoliti** con pI che coprono intervalli di pH ampi (p.es. 3-10) o ristretti (p.es. 7-8).



•Alta risoluzione: differenze di pI sino a 0.01 unità di pH

Anfoliti:

Composti a basso peso molecolare che contengono un numero variabile di gruppi aminici e carbossilici

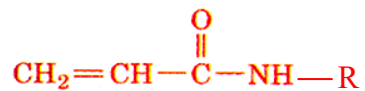


R= H oppure $\text{-(CH}_2\text{)}_x\text{-COOH}$

x= 2 o 3

Immobiline

Derivati dell'acrilamide



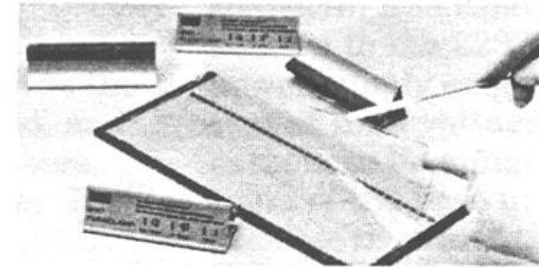
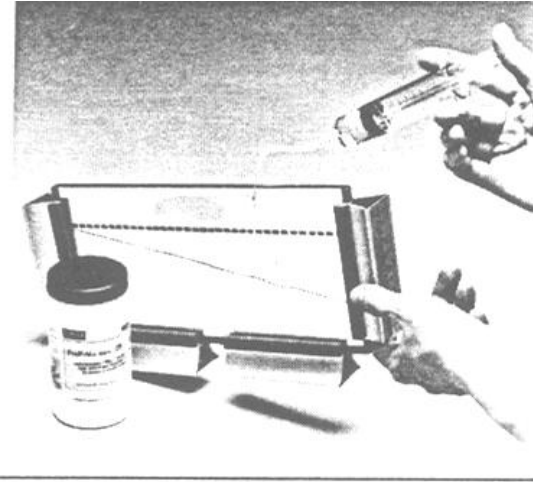
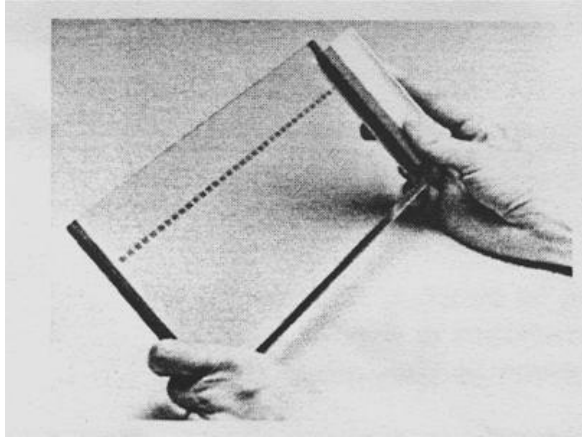
R = gruppi carbossilici e/o aminici

pka = 0.8-4.6

pka = 6.2-12

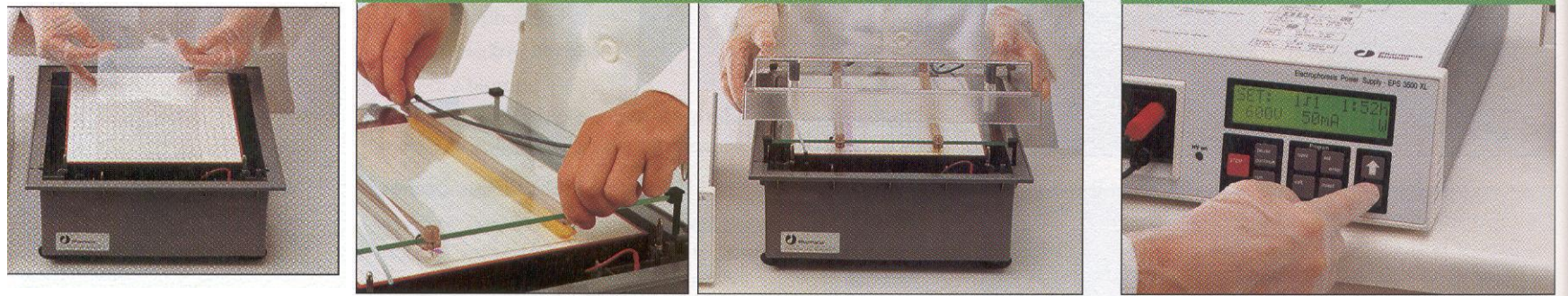
•Alta risoluzione: differenze di pI sino a 0.001 unità di pH

- **Monomeri di acrilamide e bis acrilamide**
- **Agenti catalizzatori**
- **no soluzione tampone**
- **miscela di acidi alifatici sintetici poliamino-policarbossilici a diverso pI (anfolti)**



Pre-elettroforesi

il gel polimerizzato viene sottoposto ad un campo elettrico
 gli anfolti migrano in base al loro pI e generano un gradiente di pH lungo il gel

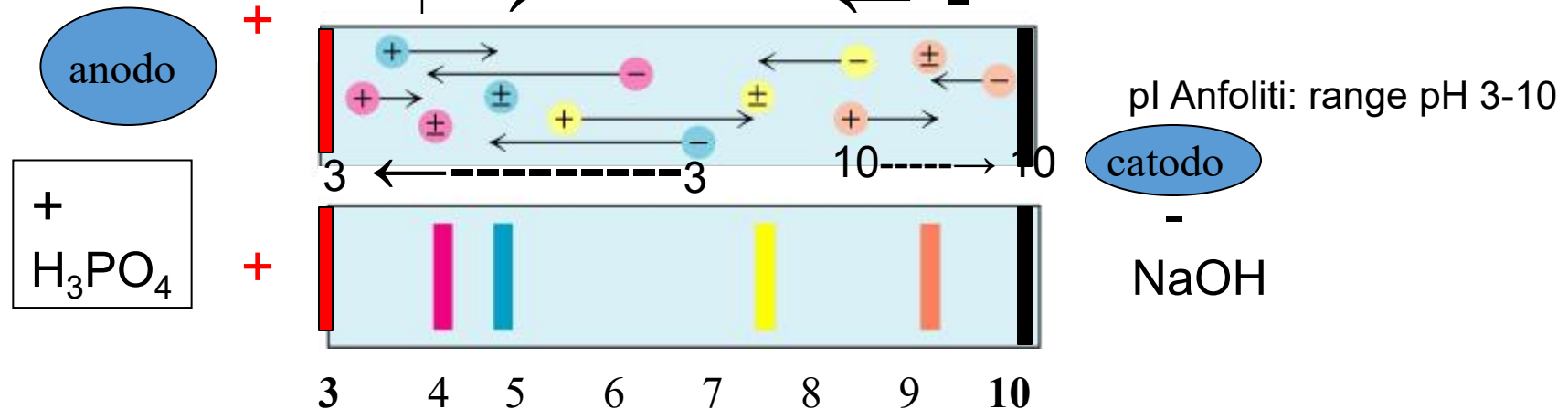


+ -
 H_3PO_4 NaOH

$pH > pI$ (-)
 $pH < pI$ (+)

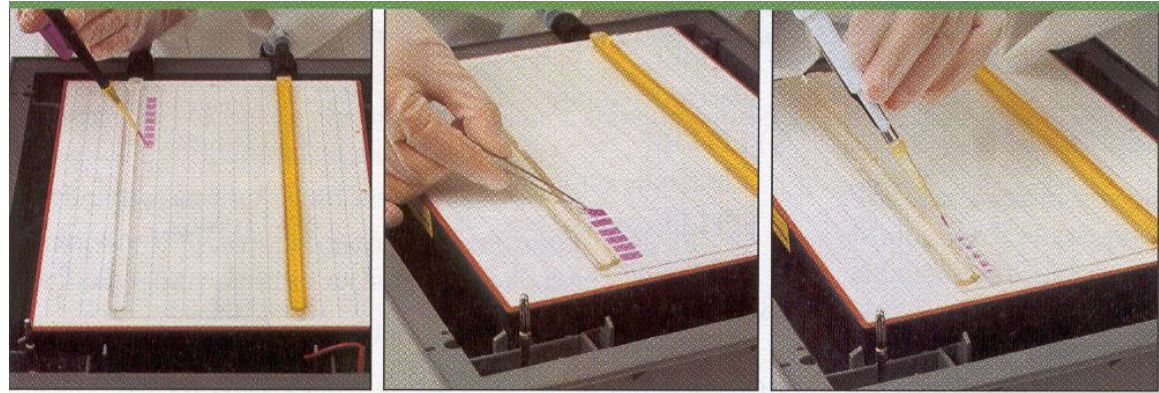
Valore medio pH del gel = $\frac{3 + 10}{2} = 6.5$

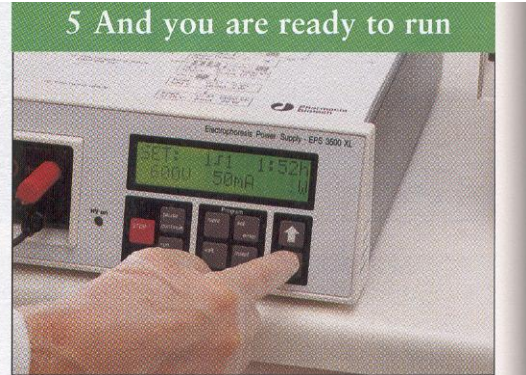
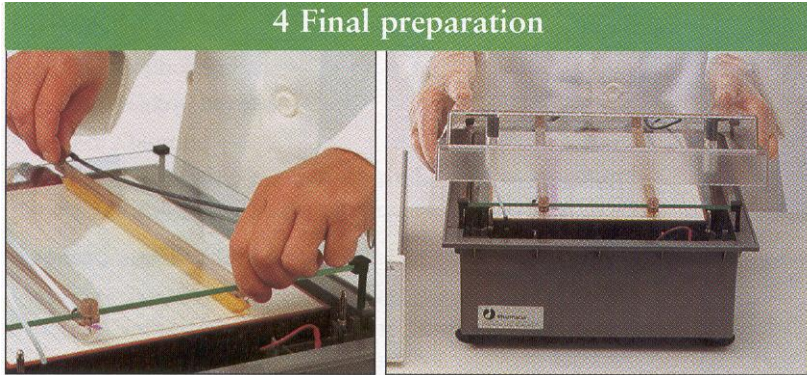
Anfoliti $pI < 6.5$ (-) Anfoliti $pI > 6.5$ (+)



Semina dei campioni mediante:

- Pozzetti
- Quadratini di carta da filtro imbevuti di ciascun campione
- Goccia sul gel mediante pipetta

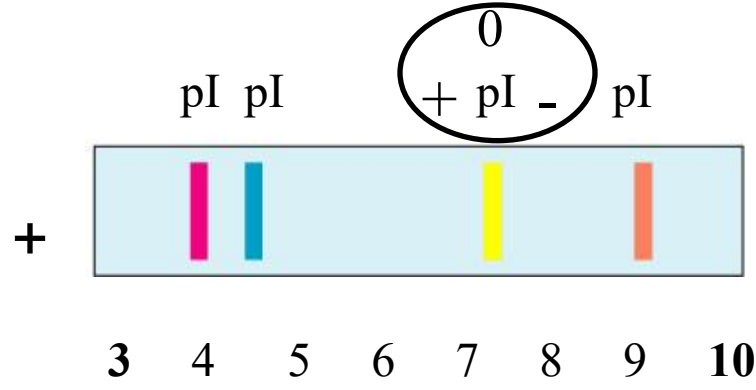
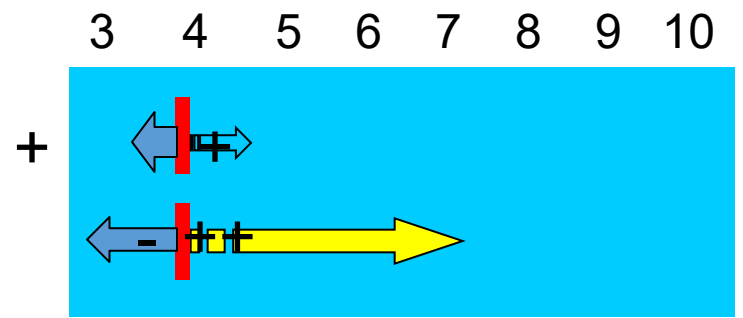




Le proteine con $pI < 4$
(-)

Le proteine con $pI > 4$
(+)

Range di pH 3-10



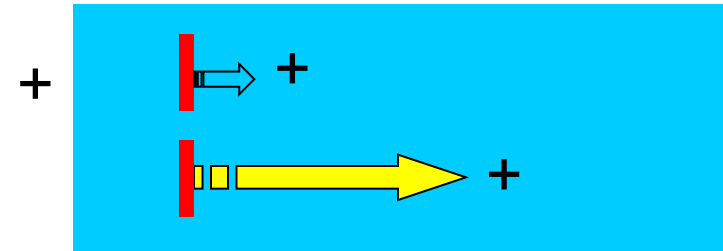
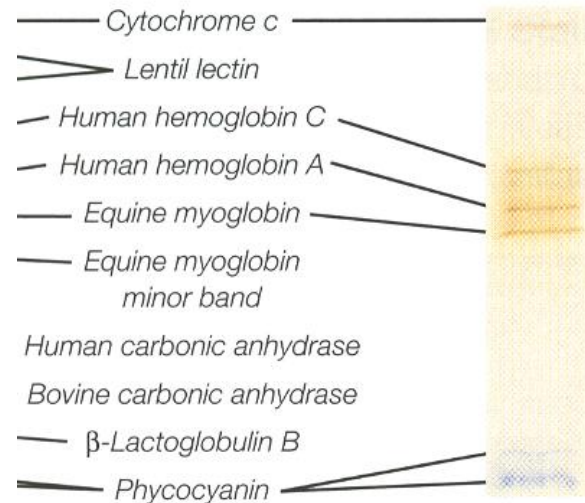
Focalizzazione
isoelettrica



Fine corsa?

~~Tracciante?~~

a) Proteine a pI noto e colorate da utilizzare come riferimento



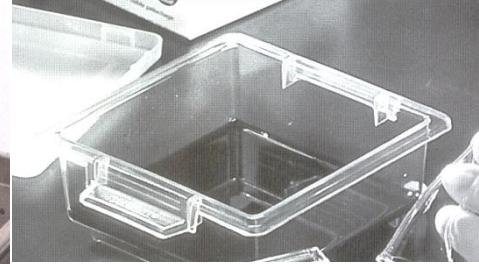
b) Se lavoriamo applicando una differenza di potenziale costante, quando le diverse proteine focalizzano l'intensità di corrente diminuisce sino a raggiungere un valore minimo costante (plateau)

Per evidenziare le proteine alla fine dell'IEF

- Fissaggio



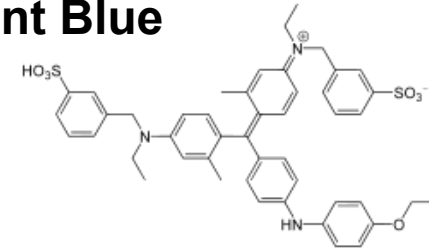
- Colorazione



10% acido tricloracetico (TCA)

serve a lavare via gli anfolti
prima della colorazione

Coomassie Brilliant Blue

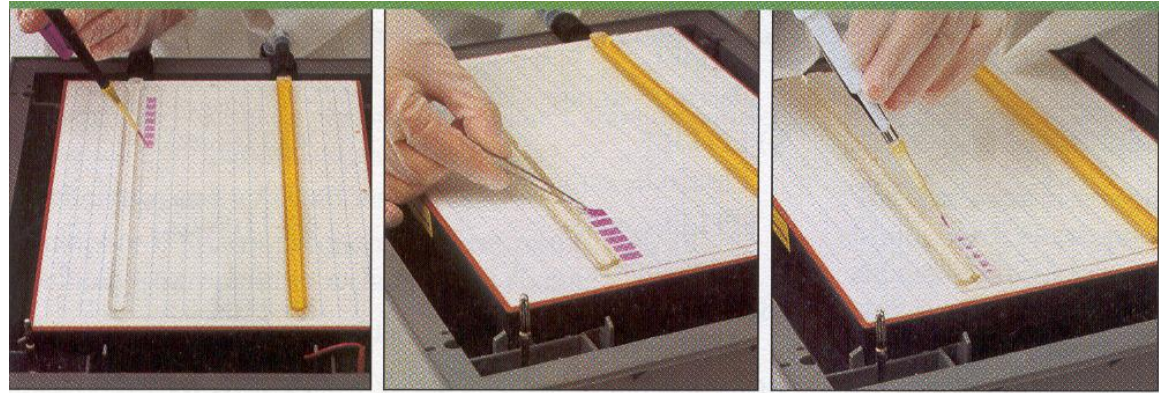


o altri coloranti specifici per le proteine



- Decolorazione

E' importante che i campioni vengano caricati tutti lungo la stessa linea?



No, in questa tecnica la focalizzazione delle diverse proteine avviene in base al loro pI:
ogni proteina si arresta nel punto del gel che corrisponde al proprio pI

Non è importante il punto di applicazione: il risultato finale non varia!

Per aumentare la risoluzione nell'IEF si applicano differenze di potenziale molto elevate

- **diminuiscono i tempi di analisi (2-3 ore)**
- **aumenta la produzione di calore**

la maggior parte della potenza viene dissipata sotto forma di calore

Svantaggi della produzione di calore:

Aumento velocità di diffusione dei campioni → diminuzione di risoluzione

Comparsa correnti convettive → rimescolamento dei campioni separati

Aumento della temperatura → denaturazione proteine

Quando si applicano campi elettrici molto intensi è necessario dissipare il calore sviluppato: utilizzo di sistemi refrigerati

- si usano gel di spessore ridotto
- si utilizzano sistemi di raffreddamento
x circolazione di acqua a 4°C



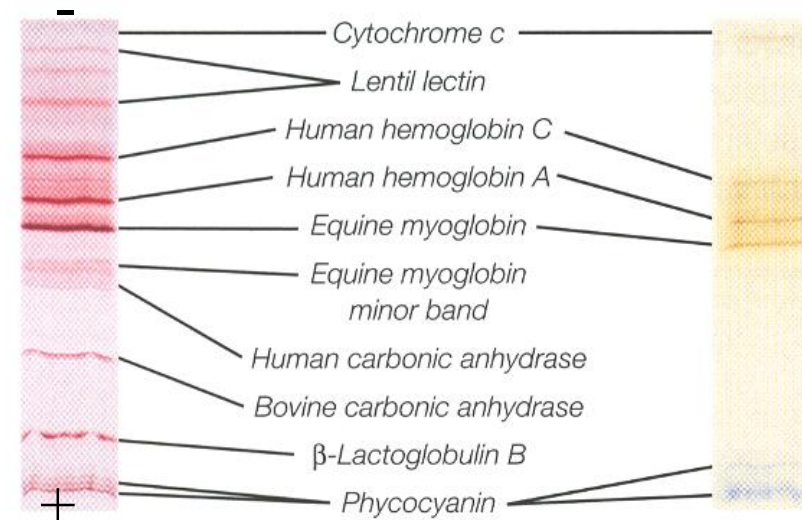
Bagnetto refrigerante cella elettroforetica alimentatore

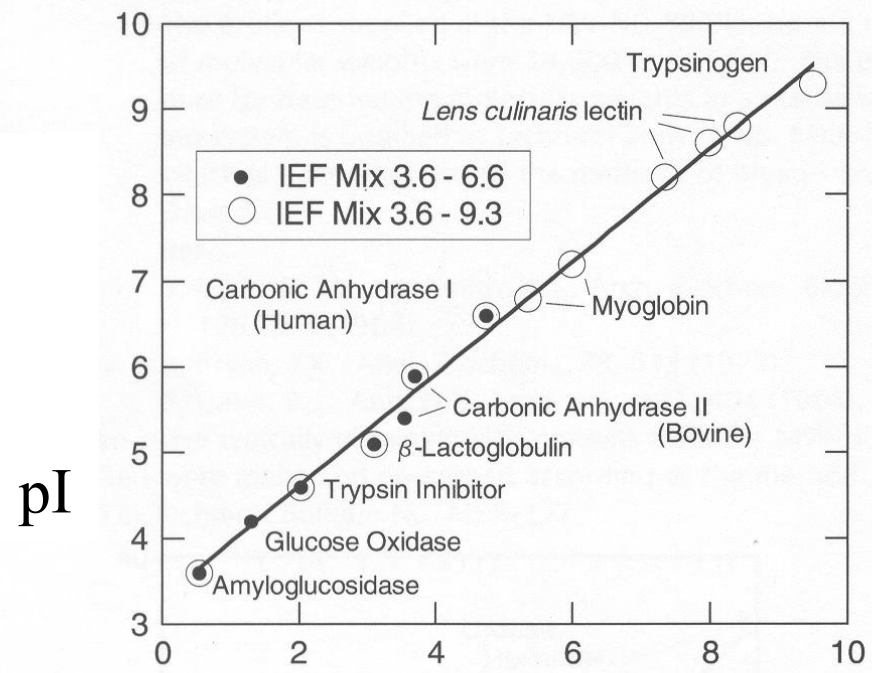
Applicazioni dell'IEF:

- Analisi di miscele proteiche complesse
- Valutazione purezza di una proteina
- Determinazione pI
- Studio microeterogeneità di una proteina
(fosforilazioni, glicosilazioni acide, sostituzioni aminoac., etc)

Constituent Proteins of IEF Standards

Protein	Color	pI
Cytochrome c	Red	9.6
Lentil lectin (3 bands)		7.8, 8.0, 8.2
Human hemoglobin C	Red	7.50
Human hemoglobin A	Red	7.10
Equine myoglobin (2 bands)	Brown	7.00
Human carbonic anhydrase		6.50
Bovine carbonic anhydrase		6.00
β -Lactoglobulin B		5.10
Phycocyanin (3 bands)	Blue	4.45, 4.65, 4.75





NOTE: (+) (-)

3.0

10

gradiente di pH mediante anfoliti

L'IEF consente di separare le proteine con:

- Alta risoluzione: differenze di pI sino a 0.01 unità di pH
- Tempi rapidi: 2-3 ore
- Ampia possibilità di scelta dei range di pH: miscele di anfoliti con pH ristretti o ampi

IEF

3



10

Tecniche elettroforetiche **su gel di poliacrilamide:**

- 1) In condizioni native (PAGE nativa)
- 2) **In condizioni denaturanti in presenza del detergente ionico SDS (SDS-PAGE)
separa le proteine unicamente in base al PM**
- 3) **In gradiente di pH (Isoelettrofocalizzazione: IEF)
separa le proteine unicamente in base al pI**
- 4) **Elettroforesi in condizioni denaturanti (AUT-PAGE)**
- 5) **Elettroforesi Bidimensionale (2D-PAGE)= IEF e SDS
separa le proteine in base al pI e al PM**

L'elettroforesi in condizioni denaturanti

Elettroforesi in Urea (AUT-PAGE)

AUT-PAGE: Acido acetico, Urea , Triton

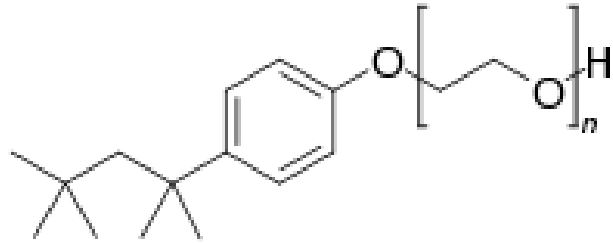
Acido acetico al 5%,
Urea 8M,
Triton X-100 al 2% (detergente non ionico)

Questa tecnica permette di separare le
proteine sia in funzione della carica netta
che in funzione della loro idrofobicità

Triton-X100. forma degli aggregati micellari con le regioni idrofobiche



La formazione di questi complessi determina una riduzione della mobilità elettroforetica delle proteine proporzionale alla loro idrofobicità



Questa tecnica permette di distinguere variazioni anche di 1 aminoacido, purchè la sostituzione interessi una porzione idrofobica della proteina e modifichi l'interazione proteina-detergente.

Preparazione del gel

Gel di poliacrilamide al 12%
Urea 8 M
Acido acetico al 5%
Triton X-100
Temed
Riboflavina

Polimerizzazione: 1 h sotto i raggi UV

Condizioni di corsa: 10 mA

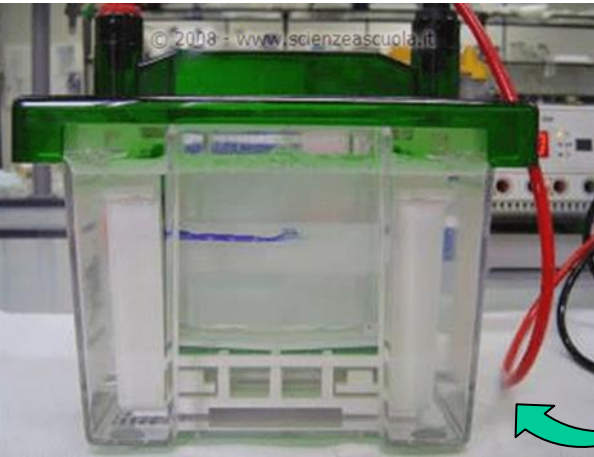
Tampone della cella elettroforetica:

Acido acetico al 5%

Preparazione dei campioni

Sample
Urea 8 M
Acido acetico al 10%
 β -mercaptoetanolo al 10%

Polarità invertita:



Tampone della cella elettroforetica:

Acido acetico al 5%

Proteine a pH acido saranno al di sotto del loro pI e quindi cariche positivamente

Anodo

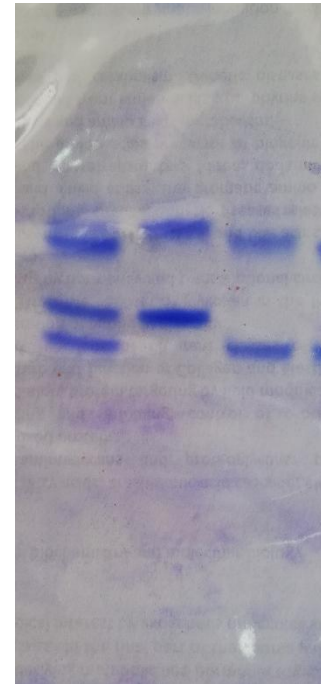
+

Proteine
(+)

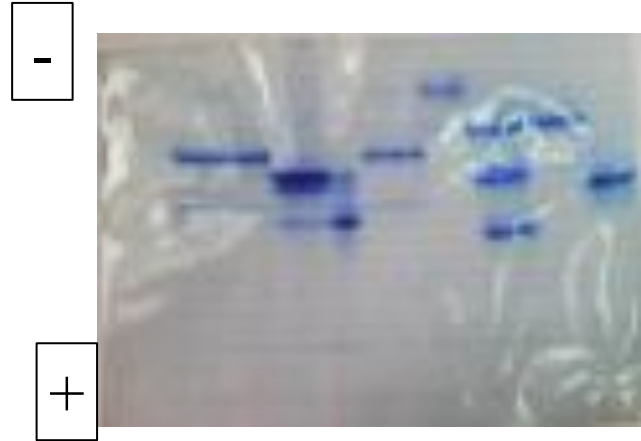
Catodo

-

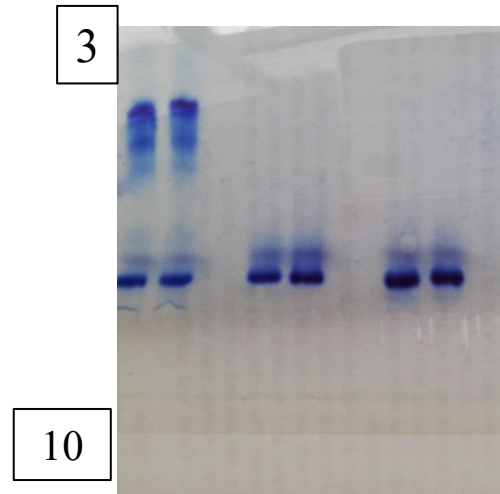
1 2 3



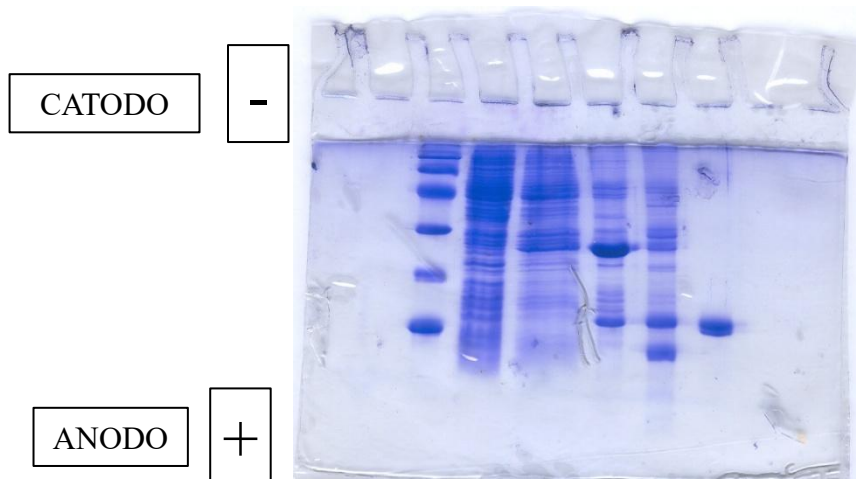
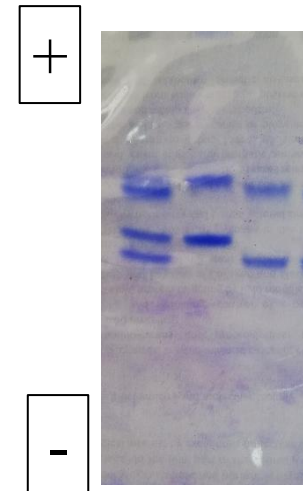
NATIVE-PAGE



IEF



AUT-PAGE



SDS

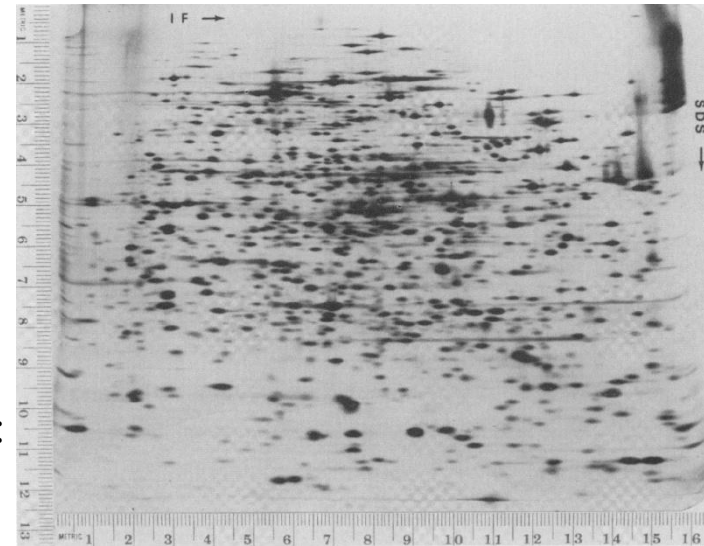
L'elettroforesi bidimensionale (2D-PAGE)
risulta dall'accoppiamento
di una separazione in base alla **carica (IEF)** e
di una separazione in base alla **massa (SDS-PAGE)**



Prima dimensione : IEF
Range pH 4-7



Seconda dimensione :
SDS-PAGE
T% = 10-20





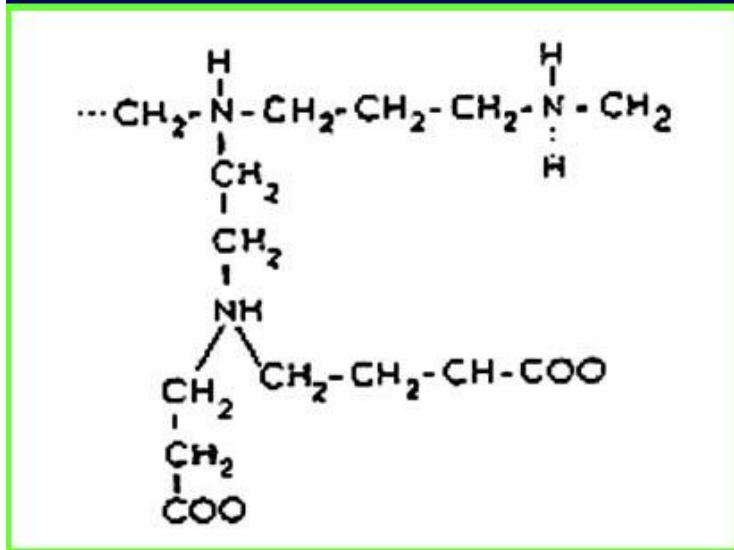
Prima dimensione : IEF
Es: Range pH 4-7



Seconda dimensione : SDS-PAGE
Es: T% = 10-20

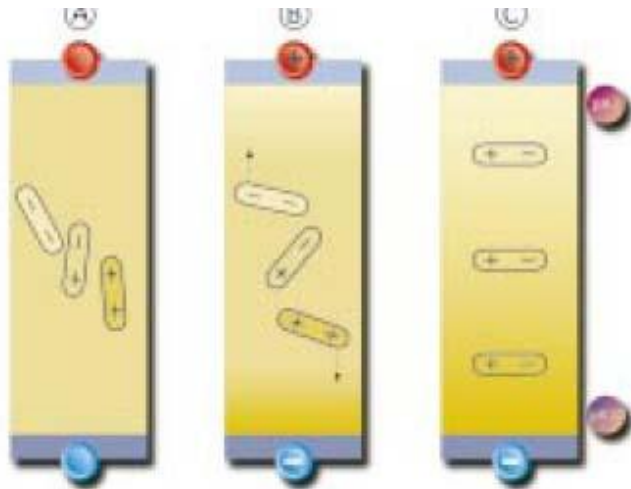
- Grande capacità di separazione e risoluzione di miscele proteiche
- (2.000-3.000 proteine) ad elevato ordine di grandezza
- • Risoluzione estremamente alta
- • I gel 2 –DE sono collettori di frazioni proteiche molto efficienti
- • Proteine sono protette all'interno della matrice del gel
- Possibilità di confronto tra i dati
- Riproducibilità e affidabilità dei dati
- Capacità di rilevazione di modificazioni post-traduzionali delle proteine
 - glicosilazione
 - fosforilazione
 - tagli proteolitici
- Possibilità di costruire o di usufruire di mappe di riferimento disponibili in rete

Anfoline in fase liquida



Molecole anfotere a basso peso molecolare

Valori di pI leggermente spazati con cui possiamo creare un gradiente di pH



Sottoposte ad un campo elettrico migrano a seconda della loro carica fino al pI

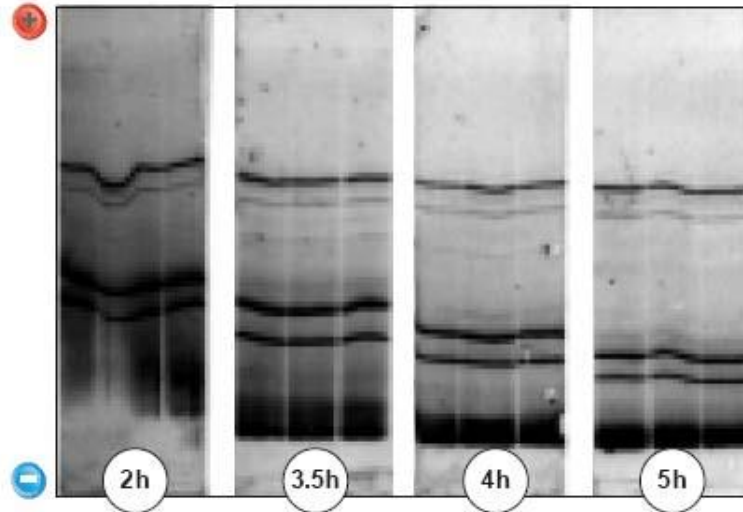
Per la loro elevata capacità tamponante in ogni punto del gel il valore di pH sarà bene preciso

Limitazioni delle anfoline

Effetto del “drift catodico”

Non buona riproducibilità tra esperimenti
nello stesso laboratorio e tra laboratori
differenti per la diversità dei lotti di
anfoline

Non focalizzazione delle
proteine basiche

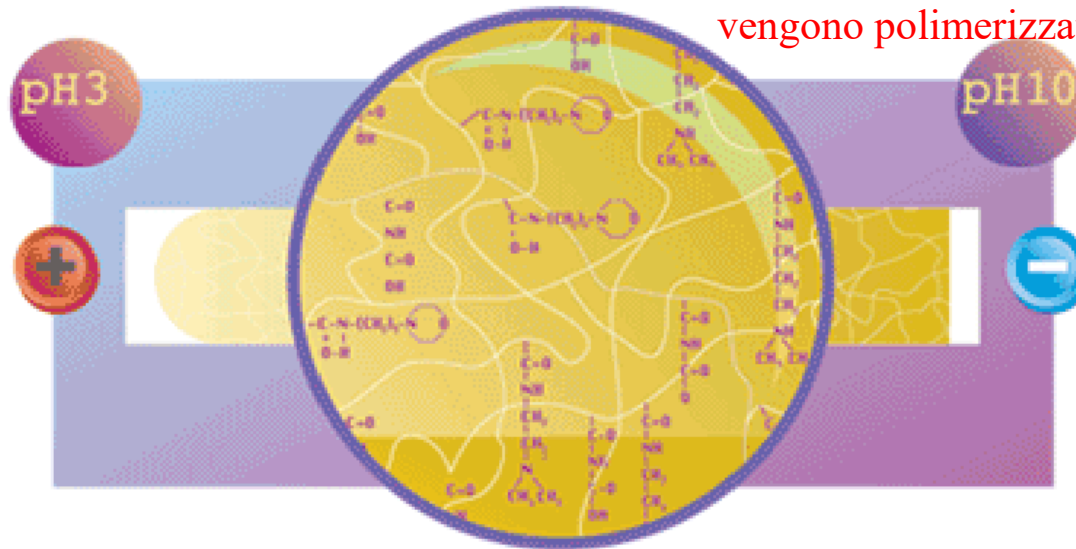


IPG = Immobilized PH Gradient strip

Nel 1993 è stato sviluppato un metodo nel quale la focalizzazione viene svolta su gradienti IMMOBILIZZATI

Il gradiente è formato legando covalentemente un gradiente di molecole cariche (immobiline) nel gel

Le IMMOBILINE sono derivati della acrilammide, contenenti catene laterali con capacità tamponanti, che vengono polimerizzate nel gel insieme alla acrilammide.



Il pH in ogni punto del gel è determinato dalla miscela di immobiline che si trovano in quel punto.

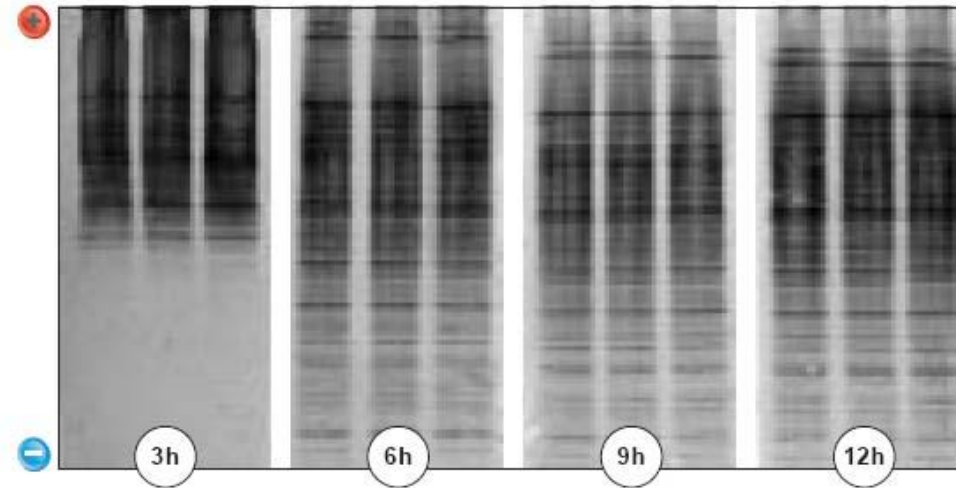
Vantaggi delle immobiline

Gradiente di pH stabile perché è immobilizzato

Buona separazione anche a pH basici estremi

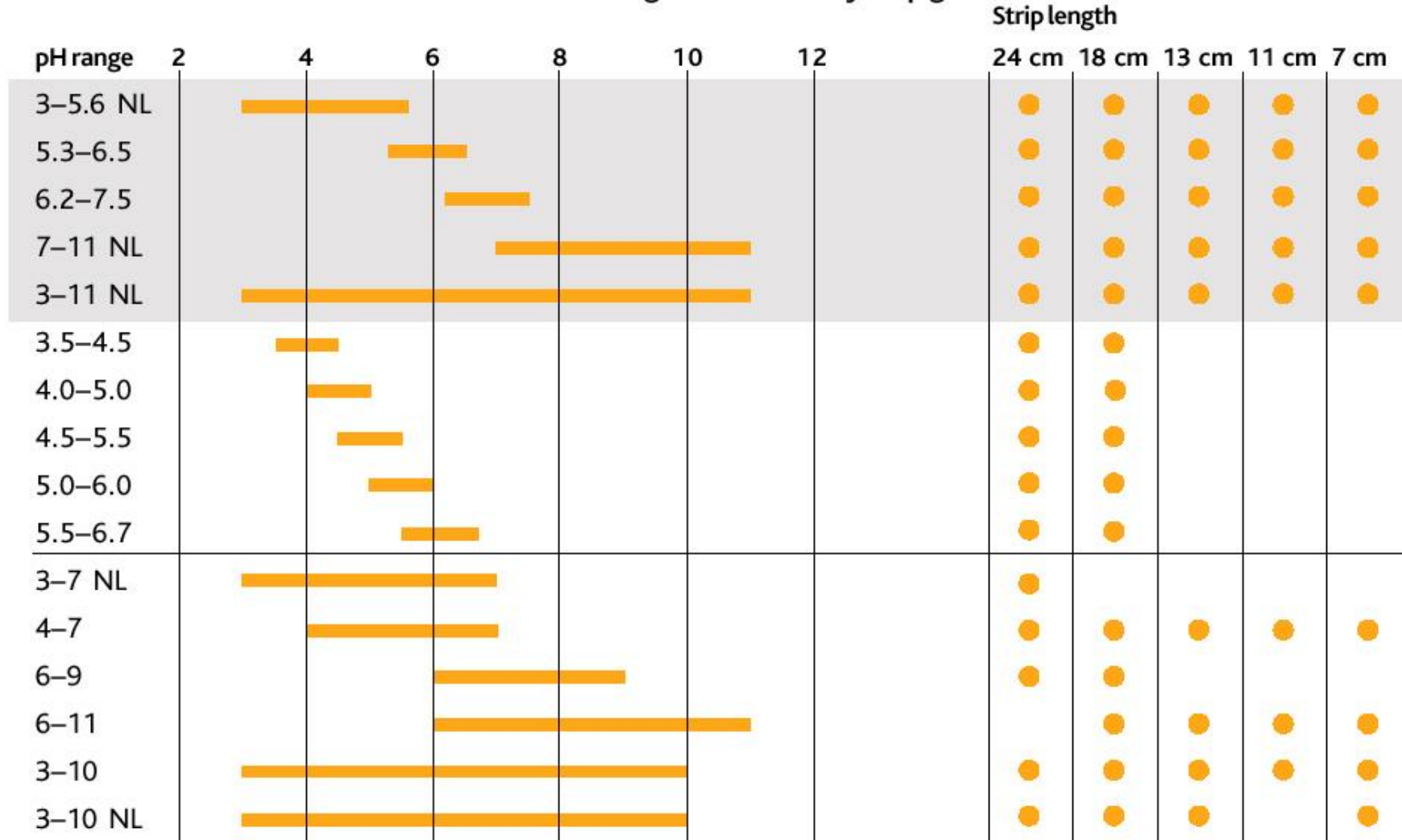
Possibilità di caricare grandi quantitativi di materiale anche fino a 12 mg

Riproducibilità delle mappe e confronto dei dati fra diversi laboratori



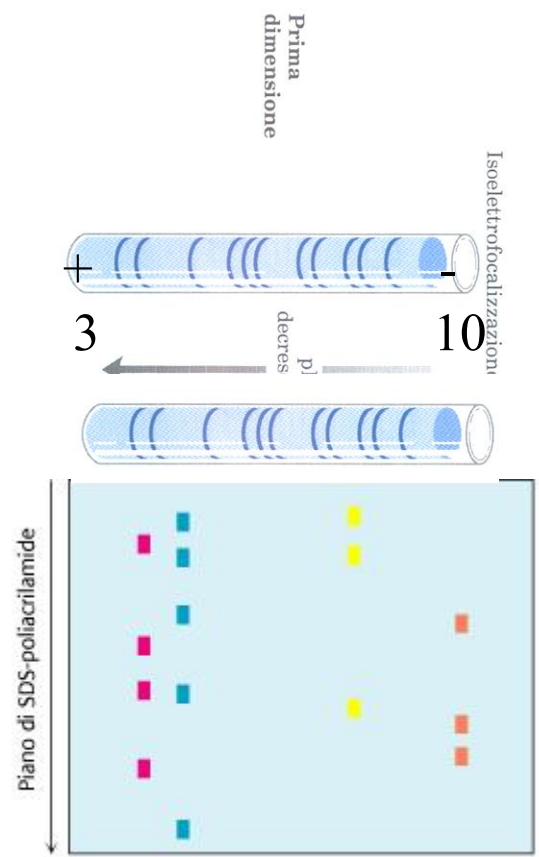
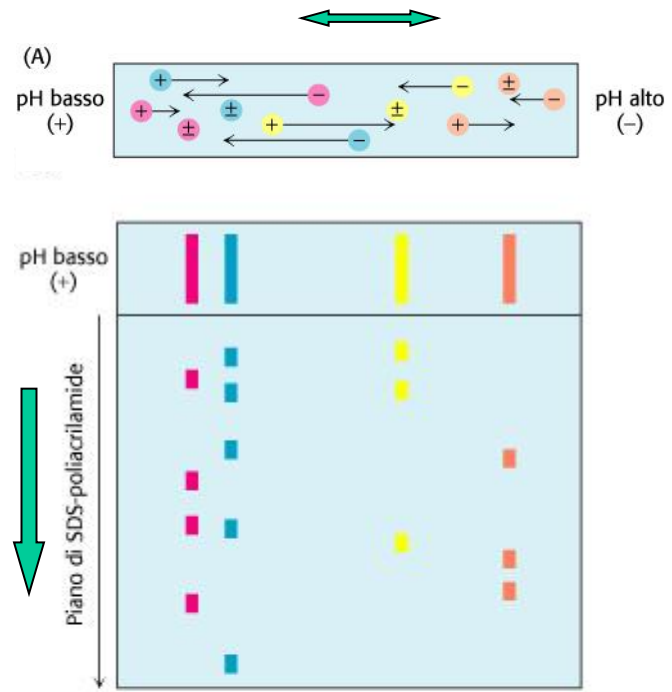
IPG strip disponibili

Guidelines for choosing Immobiline DryStrip gels

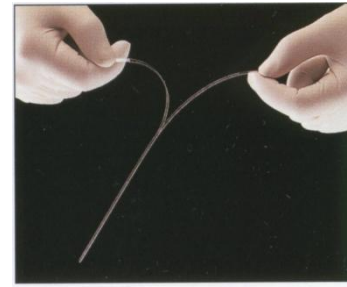
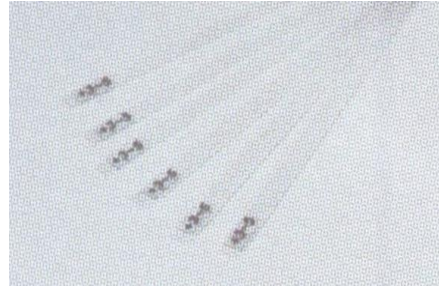
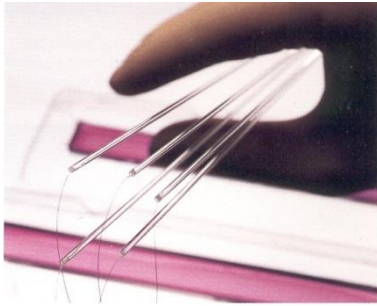


1) IEF

2) SDS-PAGE

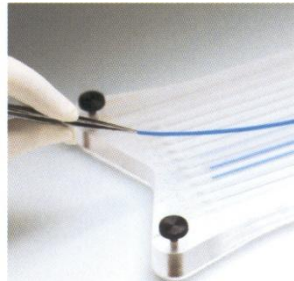


IPG-strip Gradiente di pH immobilizzato (IPG) su strisce di gel di poliacrilamide disidratate



Reidratazione della strip con il campione

- **Reidratazione passiva (Overnight)**
- **Reidratazione attiva**



Programma di focalizzazione

Reidratazione passiva	
Reidratazione attiva	50V
300V	3h
300- 3500 V	1h
3500V	3h
3500- 9500 V	1h
9500V	fino a voltaggio desiderato

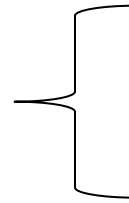


Denaturazione del campione

-Solubilizzazione del campione

-Denaturazione delle proteine

-Prevenzione dell'aggregazione proteica



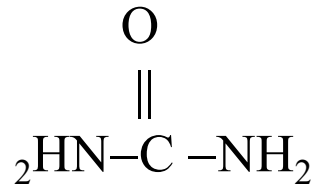
Urea

Tioli

Detergenti

Inibitori delle proteasi

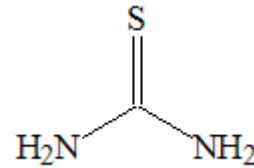
Agenti caotropici: ioni o piccole molecole organiche che rompono le interazioni idrofobiche e i legami idrogeno presenti all'interno delle proteine



urea

Urea 8 M

tiourea



Miscela 8 M urea e 2M tiourea

INIBITORI DI PROTEASI:

alcuni enzimi proteolitici riescono a rimanere attivi, anche se le condizioni di preparazione sono denaturanti

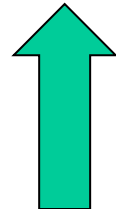
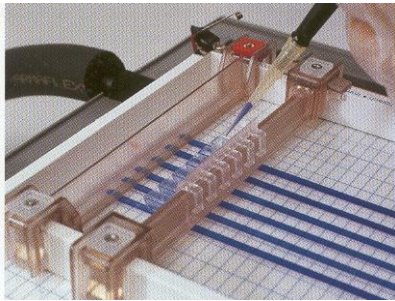
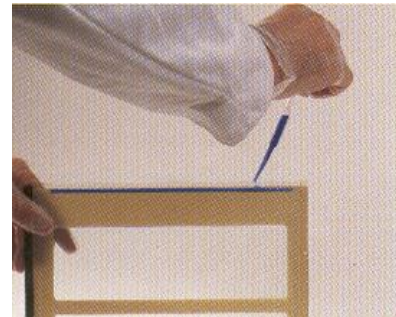
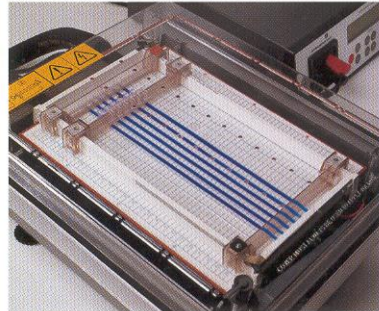
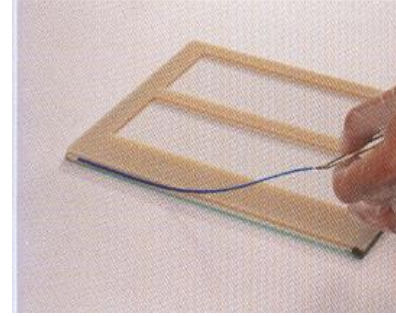
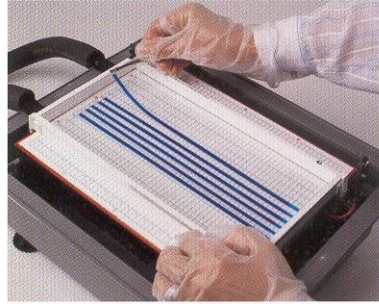
Per evitare una degradazione proteica durante le fasi che precedono la corsa elettroforetica, si usano:

Table 2. Protease inhibitors and their targets

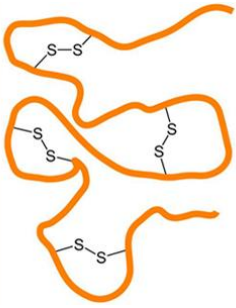
Protease inhibitor	Target	Recommended working concentration
APMSF	Plasma serine proteases	10–20 μM
Aprotinin	Serine proteases	0.01–0.3 μM
Bestatin	Aminopeptidases	40 $\mu\text{g/mL}$
Dichloroisocoumarin	Serine proteases	1–43 $\mu\text{g/mL}$
Disodium EDTA	Metalloproteases	100 μM
E-64	Thiol proteases	1.4–2.8 μM
Leupeptin	Serine and thiol proteases	1 μM
Pepstatin	Acidic proteases	1 μM
PMSF	Serine proteases	100–1000 μM
Phosphoramidon	Thermolysin Collagenase Metalloendoproteases	7–569 μM
TLCK.HCl	Trypsin Thiol proteases	37–50 $\mu\text{g/mL}$
TPCK	Chymotrypsin Thiol proteases	70–100 $\mu\text{g/mL}$

Può essere utilizzato anche Tris Base fino a 40 mM, che rende alcalino l'ambiente e neutralizza una serie di proteasi attive in ambiente acido.

I dimensione (IEF) II dimensione (SDS-PAGE)

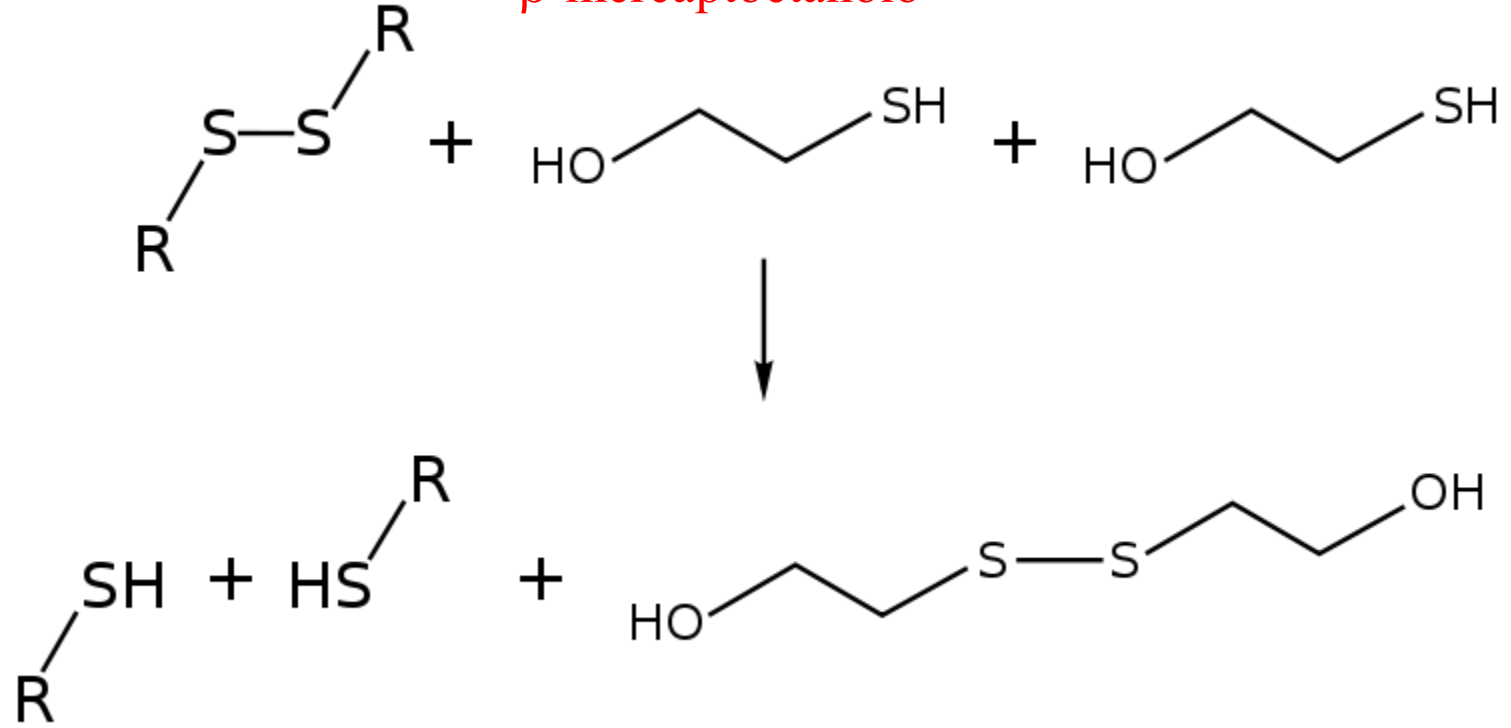


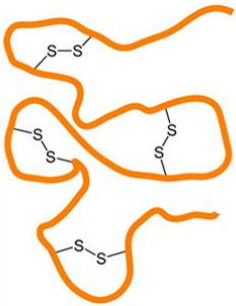
Equilibratura delle strip in SDS + agente riducente



Riduzione con β -mercaptoetanol

HO-CH₂-CH₂-SH
 β -mercaptoetanol

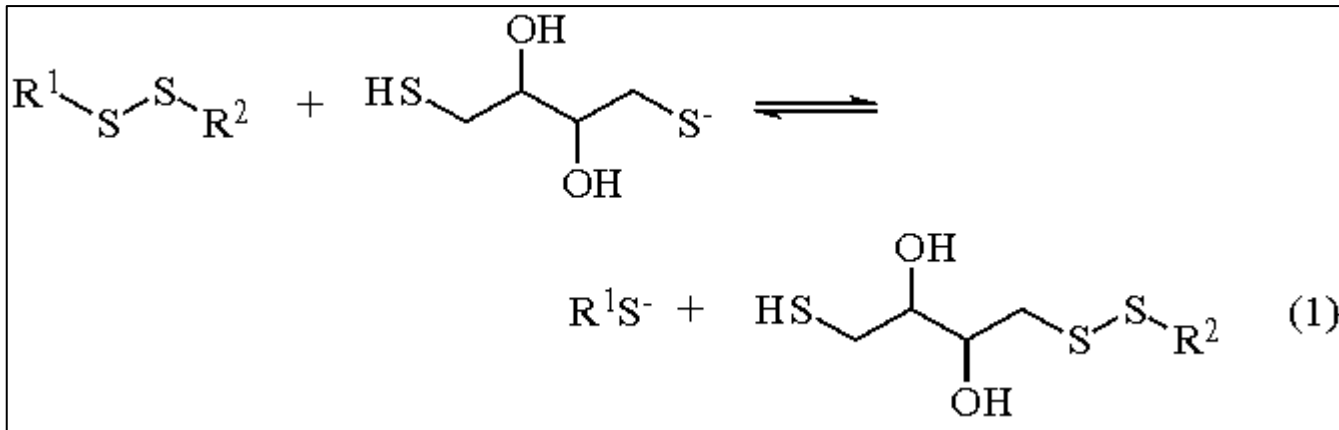
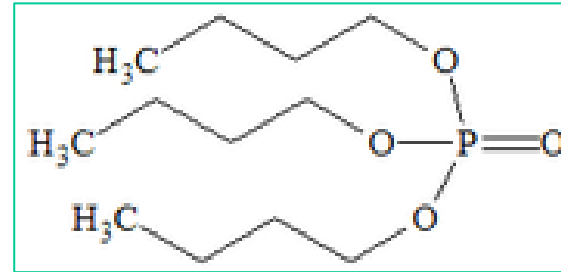
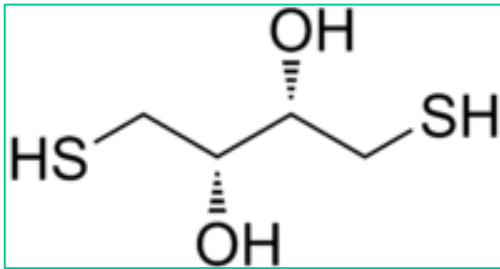




RIDUZIONE con DTT

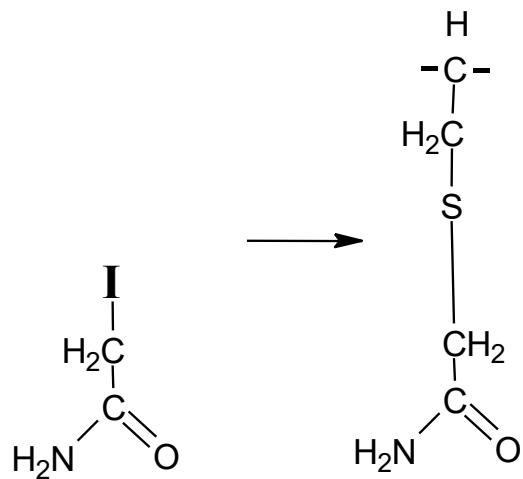
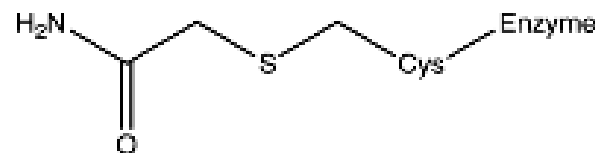
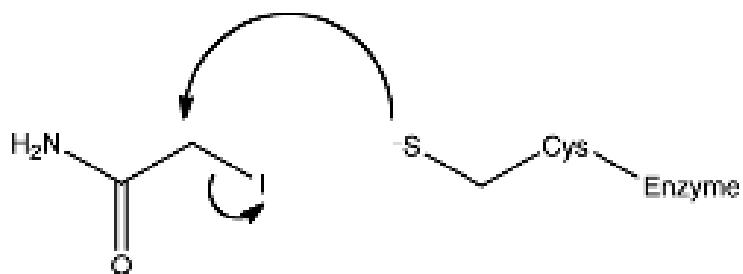
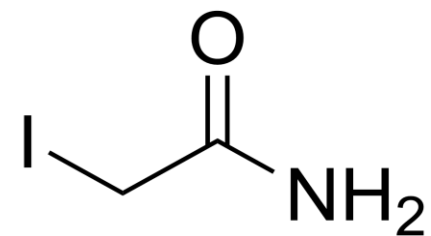
Ditiotreitolo (DTT)

Tributilfosfina (TBP).

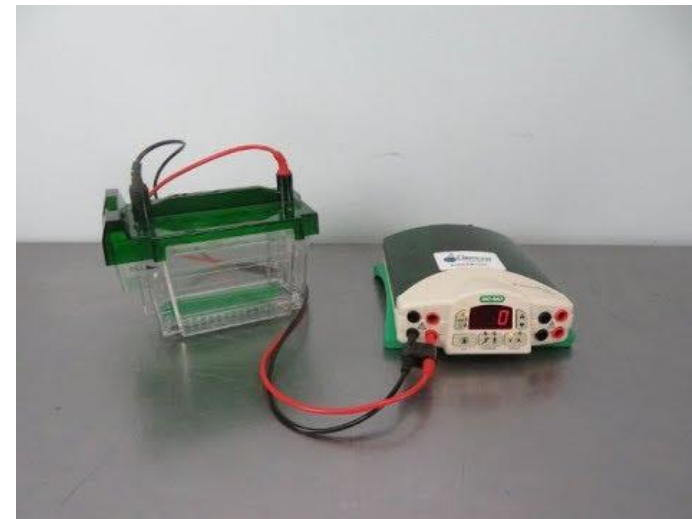
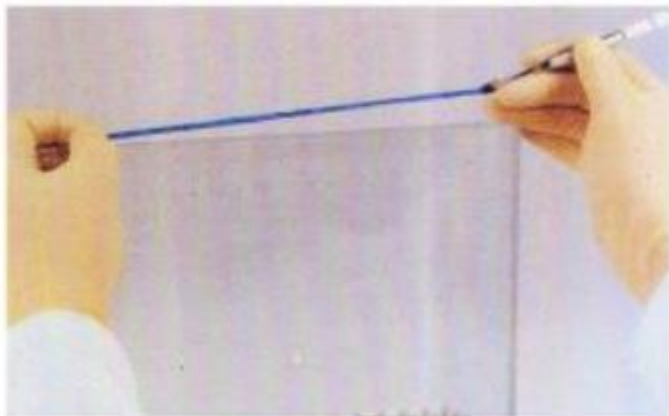
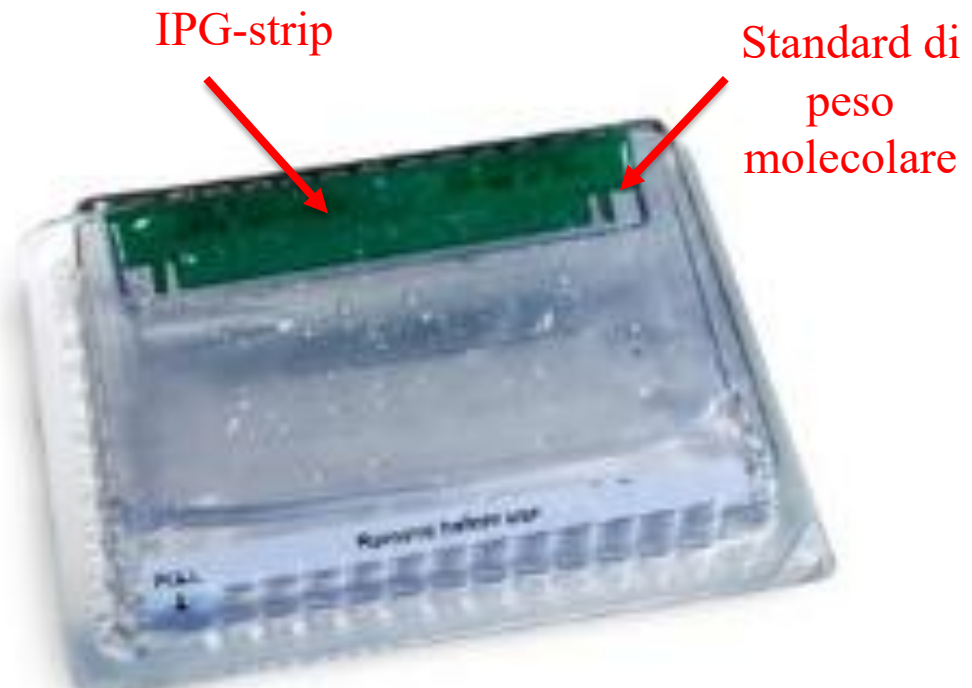


ALCHILAZIONE

Iodoacetamide (IAM)

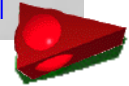
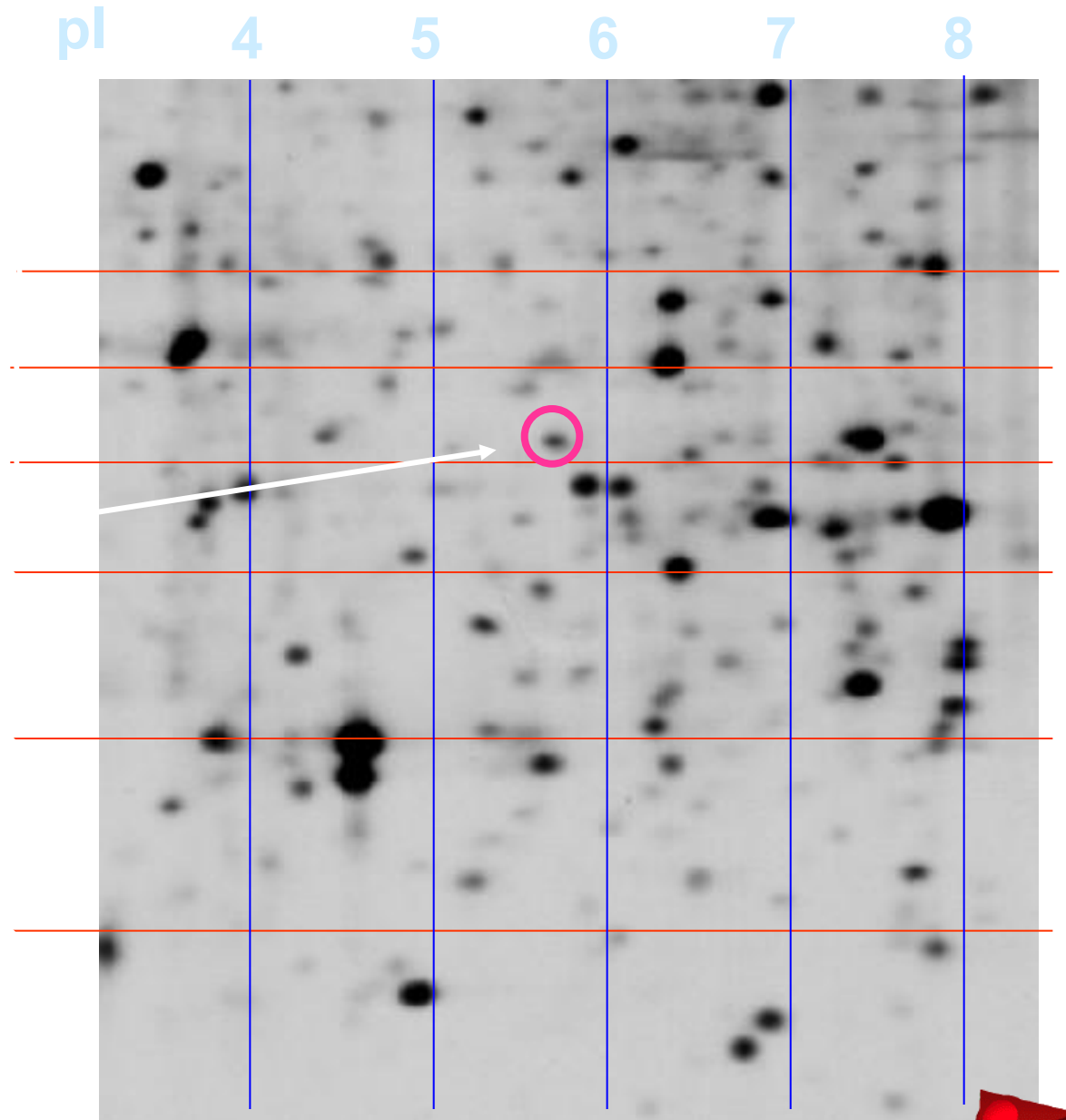


SDS-PAGE

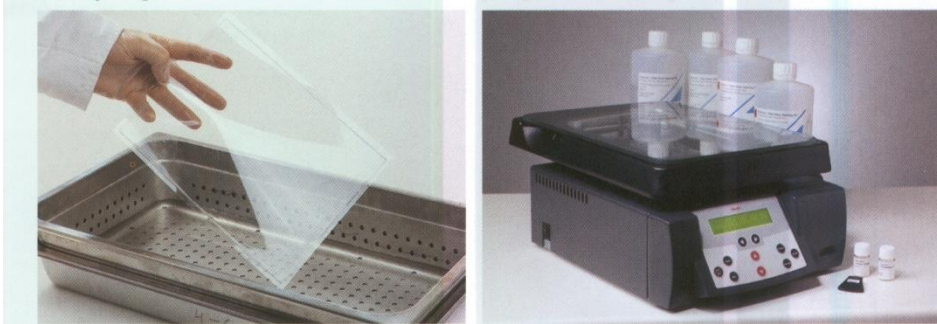


SDS – 2D PAGE

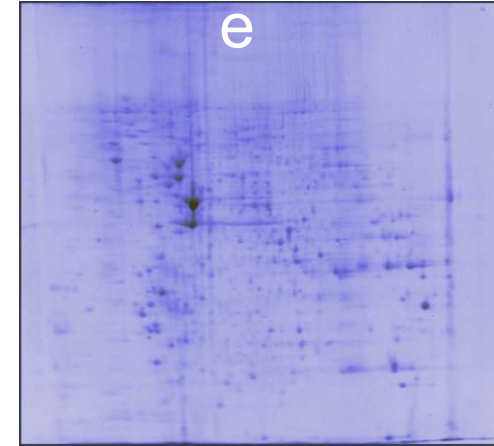
Ogni proteina (*spot*)
è caratterizzata
da **Mr** - **pI**



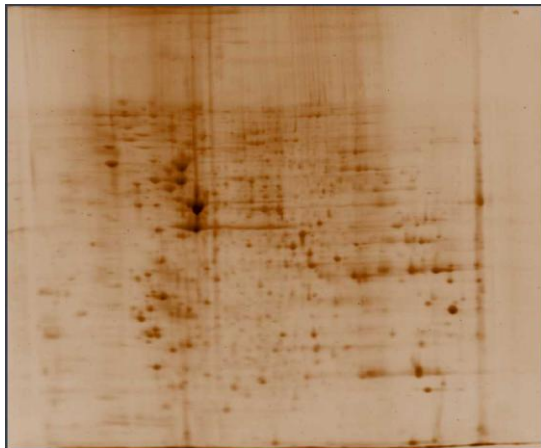
Rivelazione delle proteine



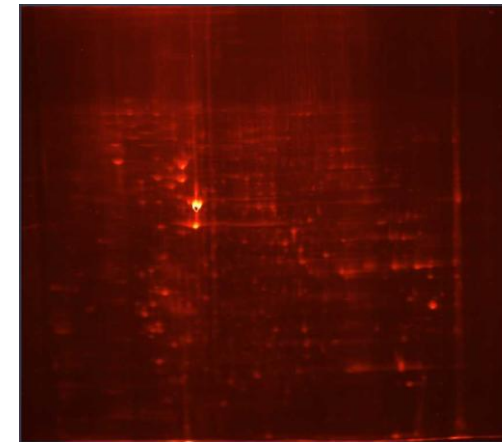
Colorazione e Decolorazione



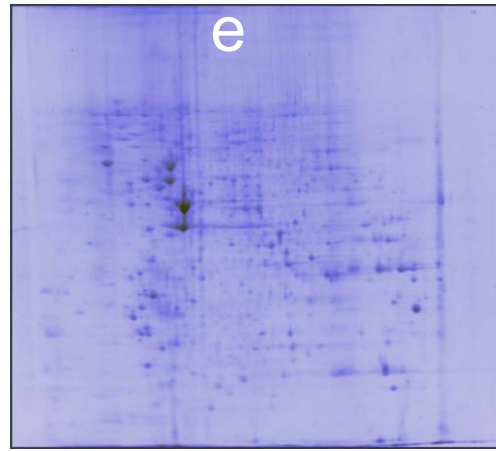
Coomassie Brilliant Blue



Colorazione ad argento (Silver Staining)



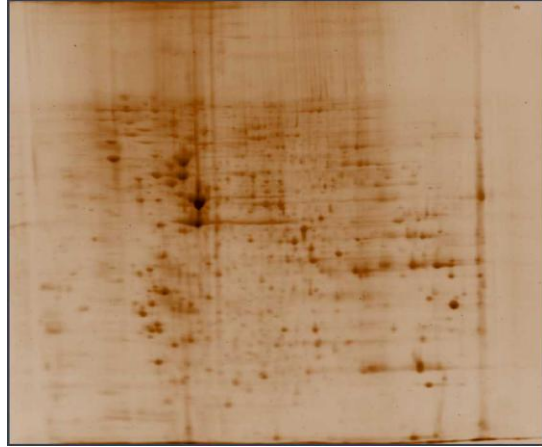
Coloranti fluorescenti



Coomassie Brilliant Blue

Lega gli aminoacidi aromatici, l'istidina e l'arginina

1-5 μ g of protein



Colorazione con i Sali d'argento (Silver Staining)

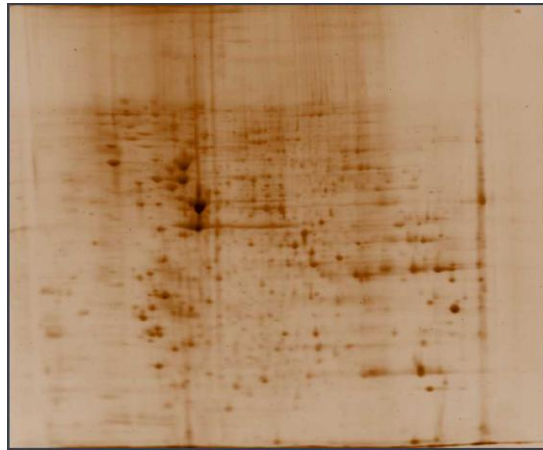
(nitrato d'argento)

Lega i gruppi sulfidrilici e carbonilici delle catene laterali degli aminoacidi

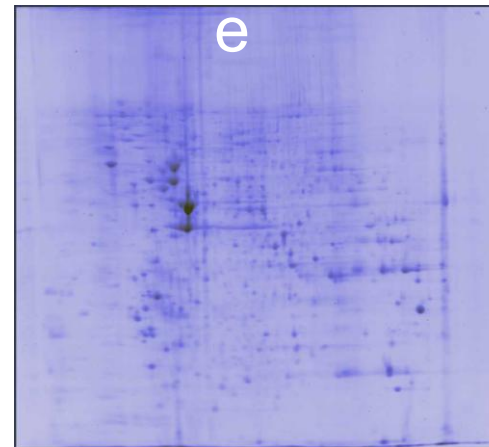
0.1–0.5 μg of protein

50 volte più sensibile di quella con il Coomassie

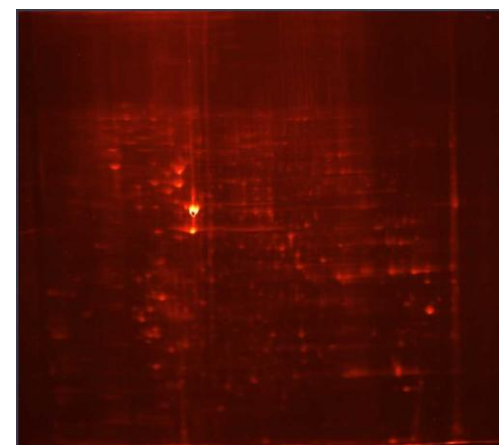
Utilizzata per evidenziare quantità molto piccole di proteine



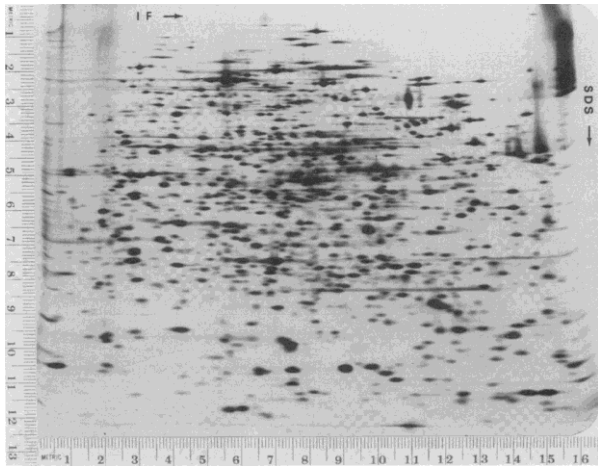
Colorazione ad argento (Silver Staining)



Coomassie Brilliant Blue

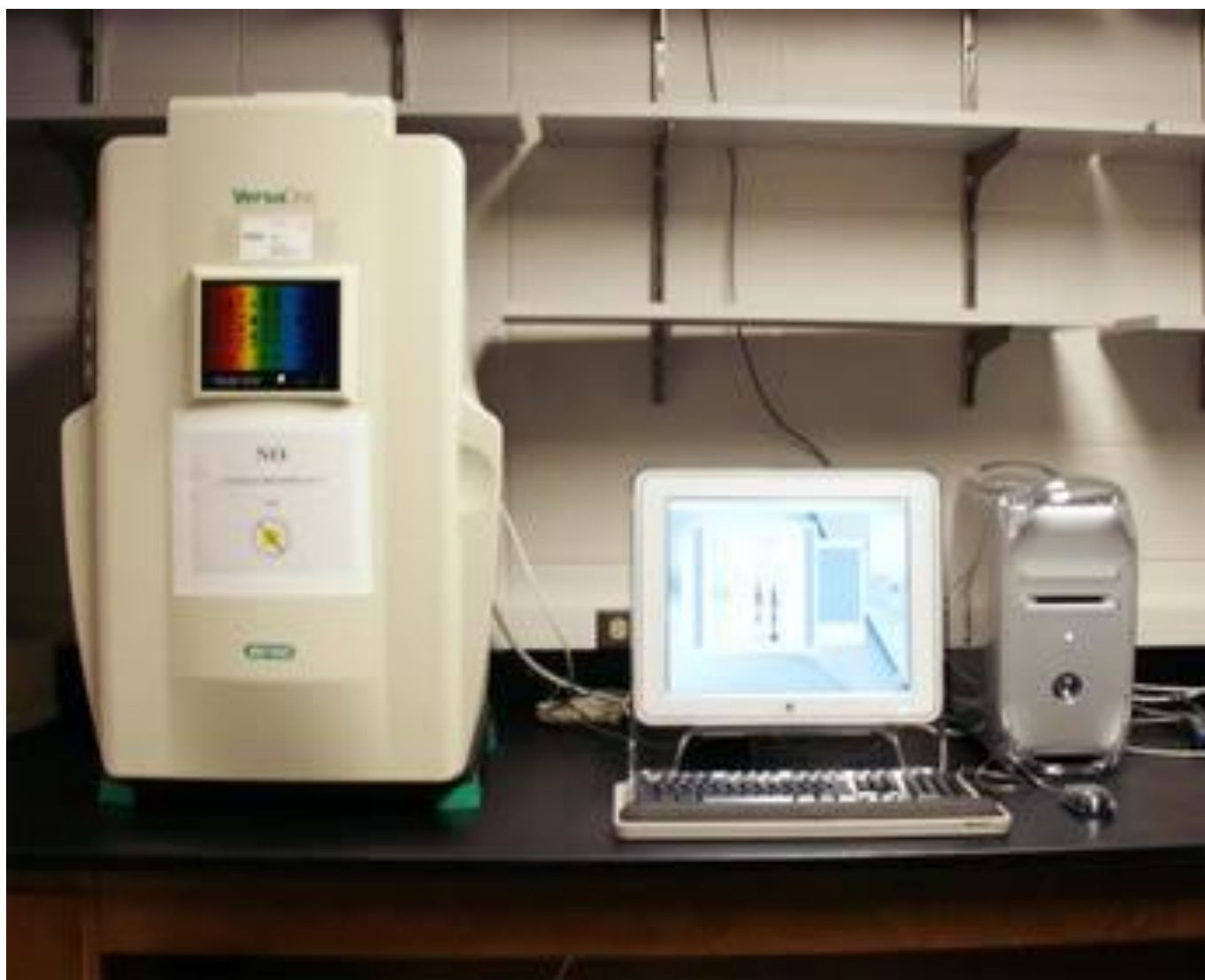


Coloranti fluorescenti



Difficoltà nel gestire le numerose informazioni ottenute mediante 2D

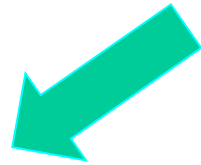
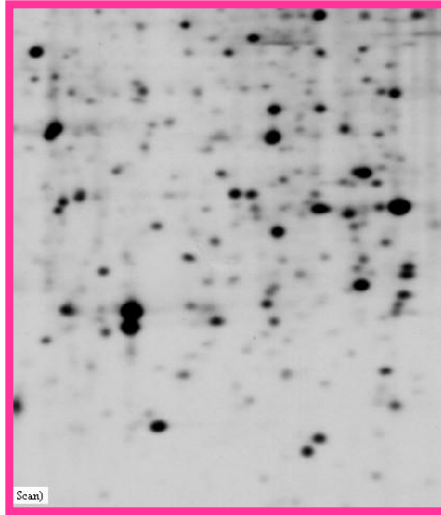
per **analisi qualitative/quantitative** è necessario un sistema di acquisizione dell'immagine (PC, scanner) ed un software per l'analisi delle immagini





Confronto tra due o più gel per quantificare differenze nell'espressione delle proteine non espresse, poco espresse, altamente espresse

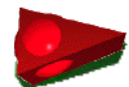
Differenze tra campione normale e patologico, tra campione trattato con un dato farmaco e non trattato



Identificazione

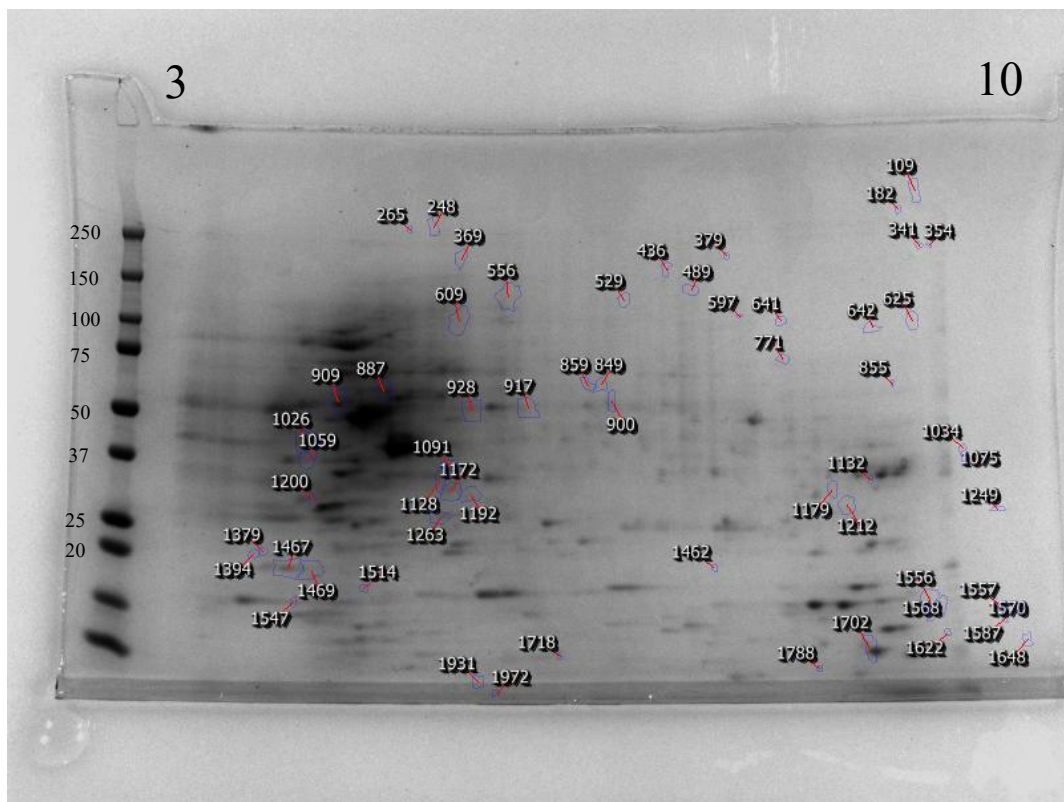


Comparazione

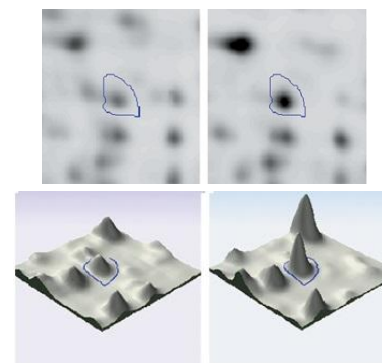




SameSpots™ v5 | 2D Gel Image Analysis Software



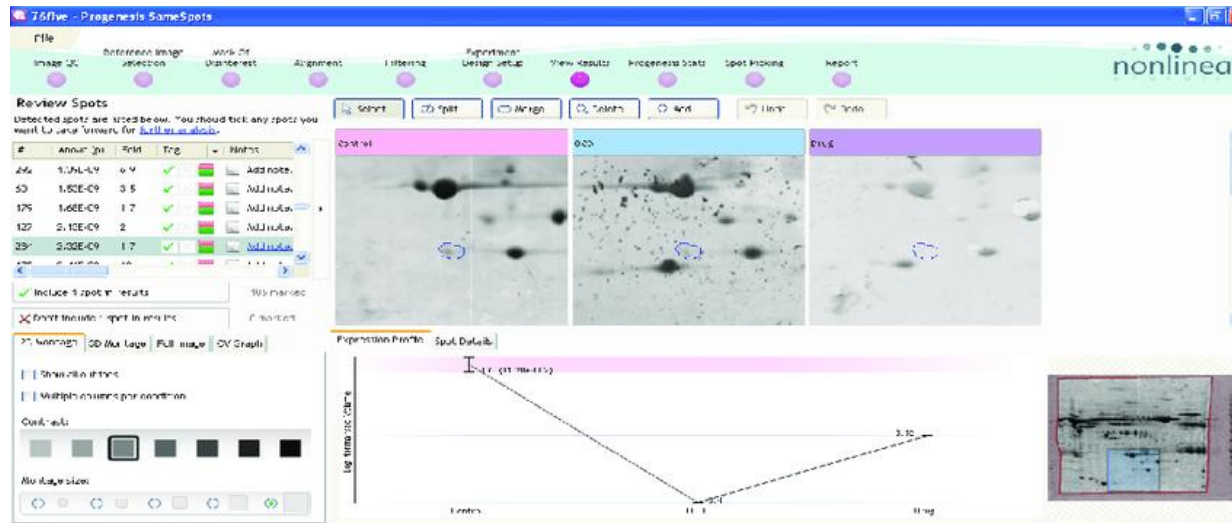
Controllo Trattato



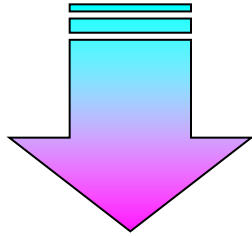
In totale il software identifica
52/1200 proteine variate
($p < 0.05$, fold change > 1.2):

- 27 proteine con livelli aumentati
- 25 proteine con livelli ridotti

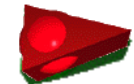
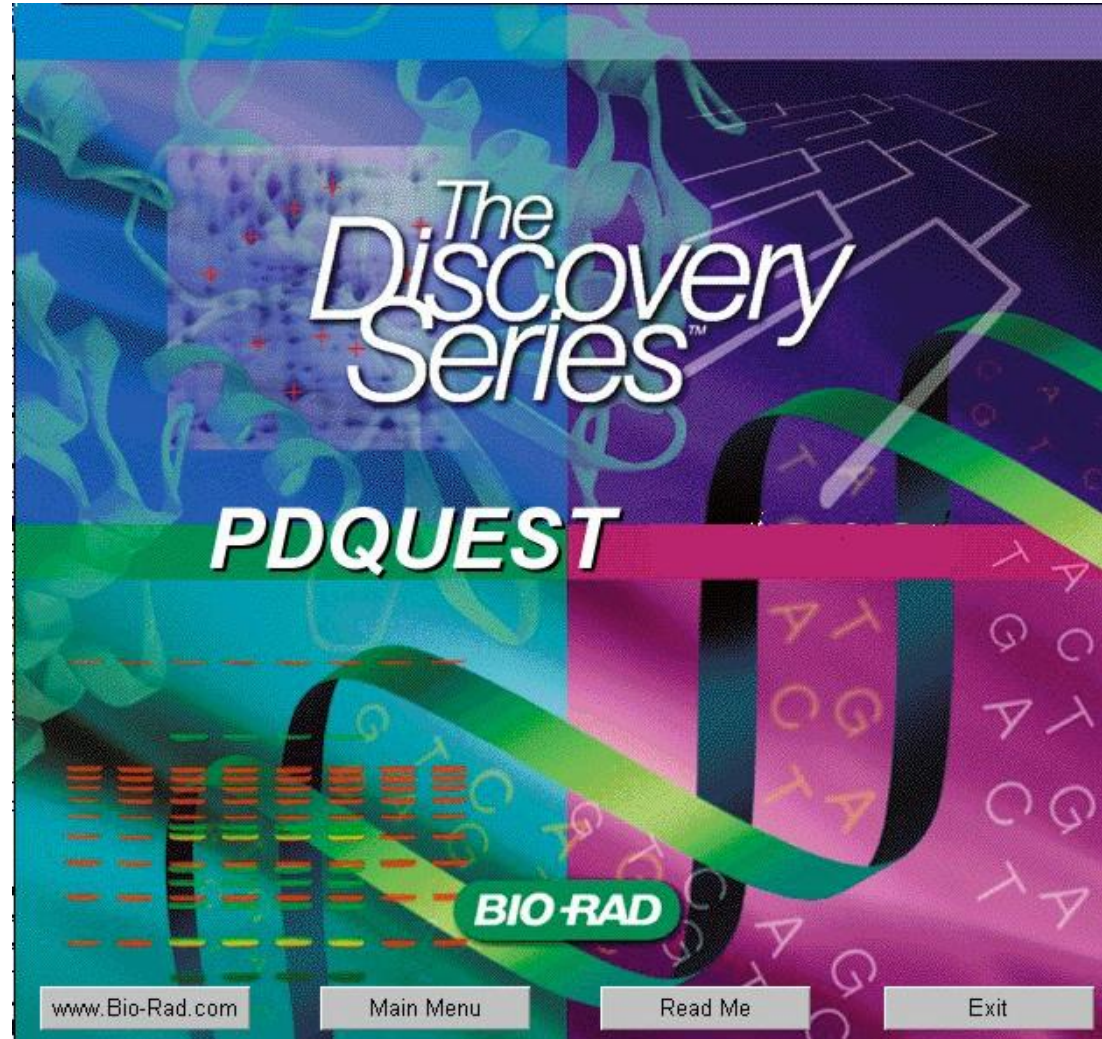
Analisi Proteomica dei target molecolari



Il confronto e l'analisi dei 2D Gels vengono effettuati mediante l'uso di opportuni **Hardware** e **Software**



Bioinformatica



Vantaggi

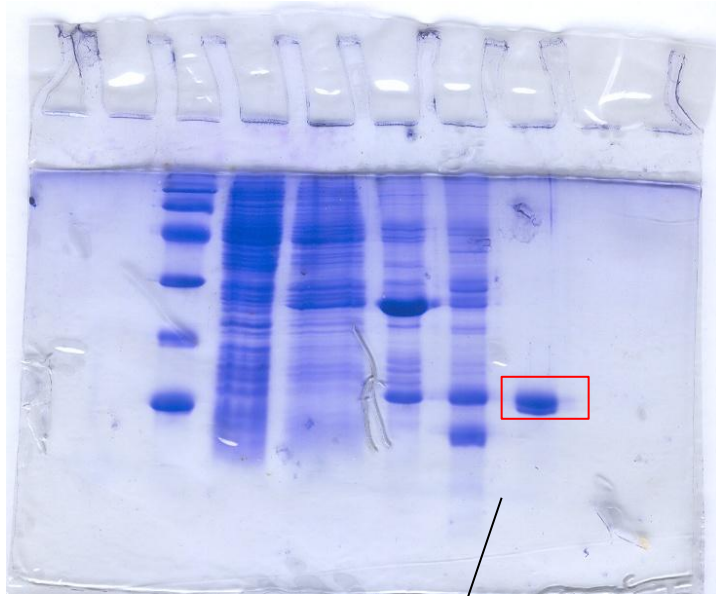
- Grande capacità di separazione e risoluzione di miscele proteiche (2.000–3.000 proteine)
- Riproducibilità e affidabilità dei risultati
- Possibilità di confronto dei dati tra laboratori differenti
- Capacità di rilevazione di modificazioni post-traduzionali delle proteine
 - fosforilazione
 - glicosilazione,
- Possibilità costruire e/o usufruire di mappe di riferimento disponibili in rete

Svantaggi

- metodica lunga
- molto dispendiosa in termini di: tempo e costo
- bassa capacità di risoluzione delle proteine idrofobiche con limitata solubilità (rimangono adsorbite sulla strip)
- difficile separazione delle proteine molto acide o basiche
- scarsa risoluzione di proteine con PM > 150 kDa
- bassa risoluzione per le proteine poco rappresentate nel campione proteico

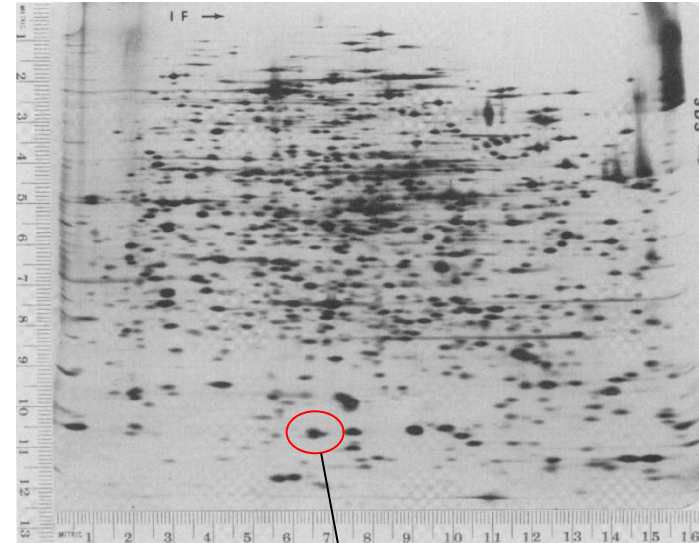
Taglio degli spot o bande dal gel

SDS

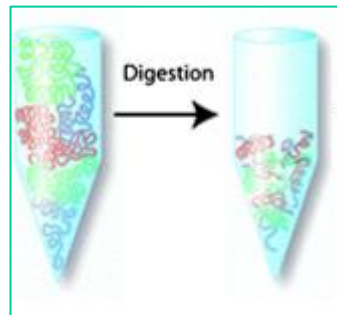


EPPENDORF

2DE

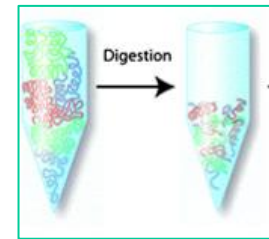
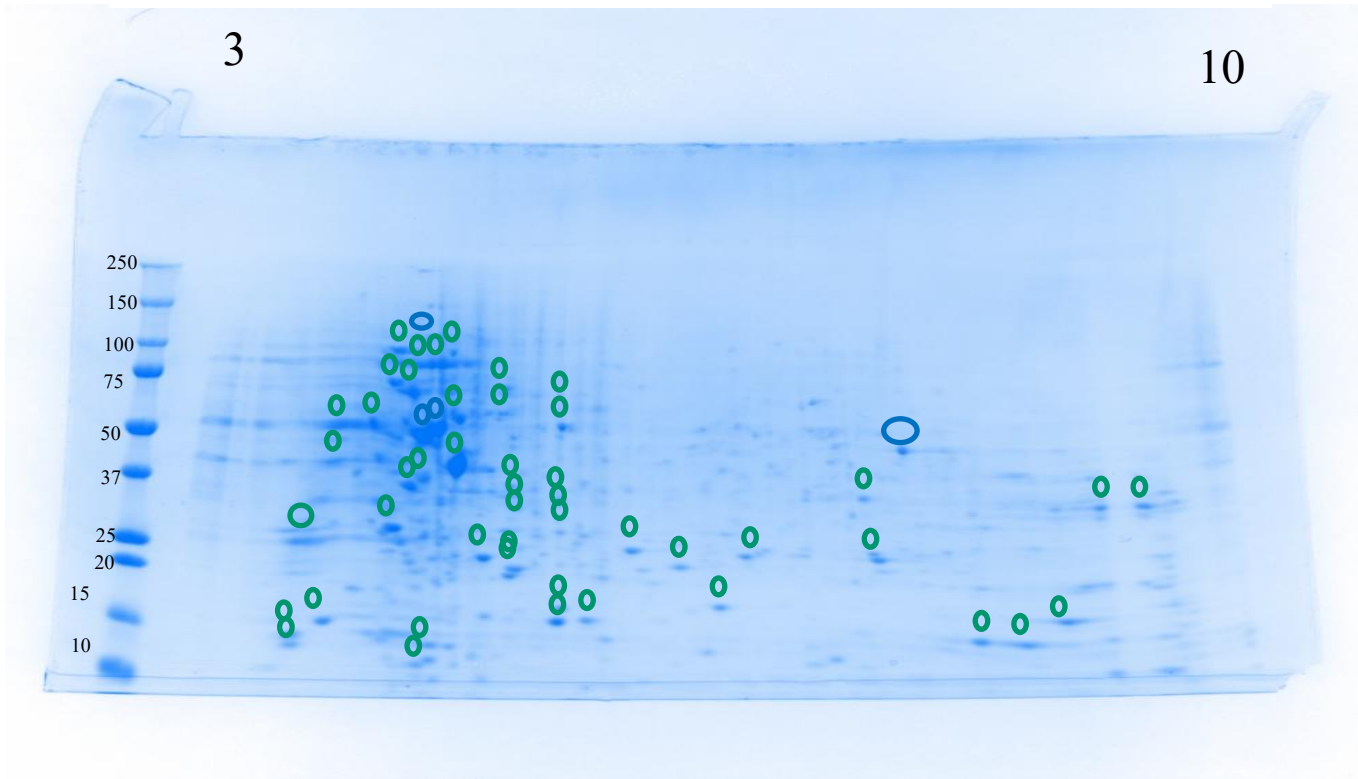


EPPENDORF



Taglio degli spot dal gel
Digestione triptica

Lisato cellulare

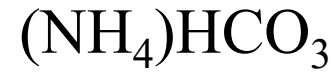


DIGESTIONE TRIPTICA IN GEL

- Usare alcool per pulire bisturi, spatole e vetrini su cui tagliare gli spots
- Tagliare gli spots dal gel mediante l'utilizzo di bisturi puliti e tagliarli a pezzi piccoli.

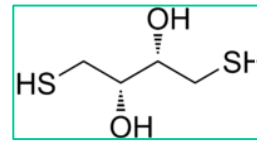
- **Tampone Ammonio Bicarbonato 100 mM pH 8,0:**

- Ammonio Bicarbonato/ACN 1:1



- Aggiungere DTT 10 mM in Ammonio Bicarbonato 100 mM.

- Incubare per 30 minuti a 65°C.
- Rimuovere la soluzione di DTT
- Aggiungere ACN e incubare 10 minuti
- Rimuovere l'ACN

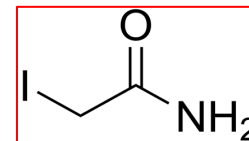


DTT

- Aggiungere Iodoacetamide (IAM) 55 mM in Ammonio Bicarbonato 100 mM.

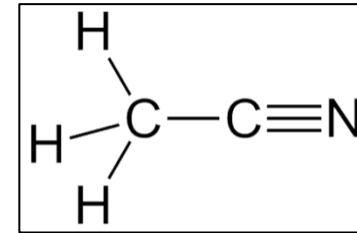
- Incubare per 30 minuti a 30°C.
- Rimuovere la soluzione di IAM
- Aggiungere ACN e incubare 10 minuti.
- Rimuovere l'ACN

IAM



La banda è pronta per la tripsinizzazione

ACN



Per disidratare il gel

DIGESTIONE TRIPTICA

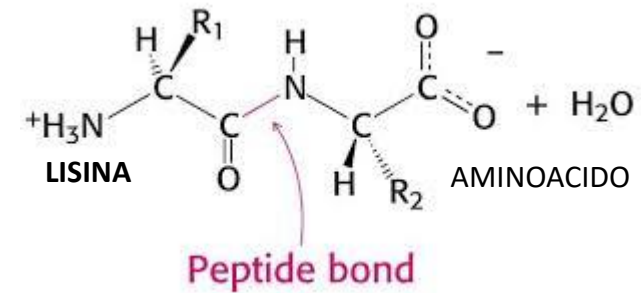
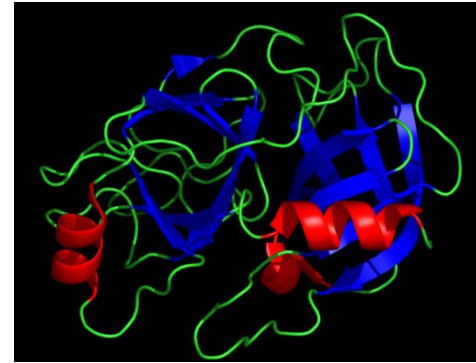
- **Tripsina:** 1 vial contiene 1 ug di enzima liofilizzato.

Digestion buffer: Ammonio Bicarbonato/ACN (10:1)
Ammonio Bicarbonato 40 mM

- Incubare a 37° C overnight

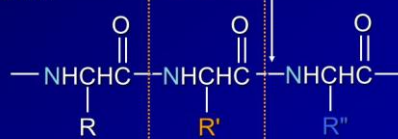
Extraction buffer: Ammonio Bicarbonato/ACN
(1:2)

TRIPSINA



Tripsina

La tripsina scinde selettivamente il legame peptidico
che impegna il gruppo carbossilico della **lisina** o
dell'**arginina**.



lisina o arginina

<https://www.youtube.com/watch?v=mkMPx49QZtw>

<https://www.youtube.com/watch?v=3wFh0z7so8w>

https://www.youtube.com/watch?v=8p-zBJfJZ_0

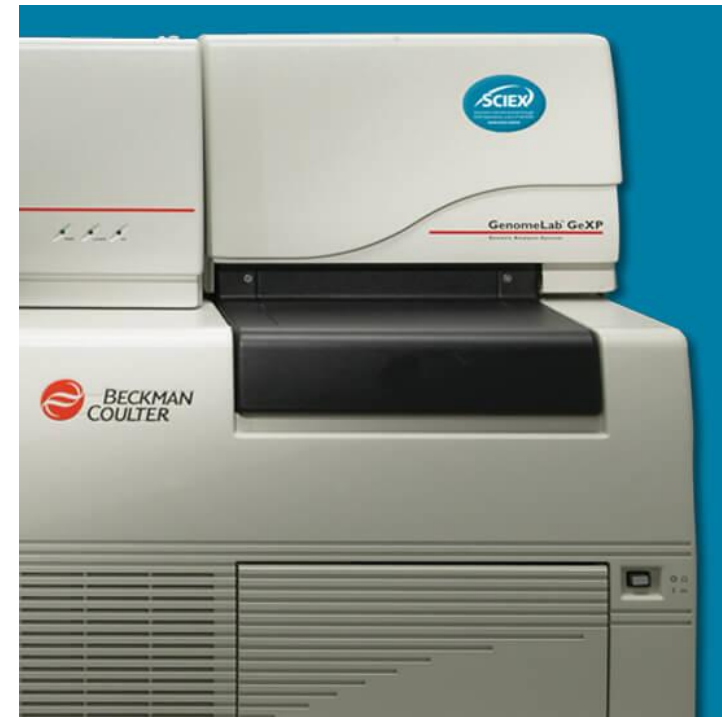
Elettroforesi capillare:

L'elettroforesi capillare fu introdotta per la prima volta da Hjertén nel 1967, ma è diventata una vera e propria tecnica analitica solo all'inizio degli anni '80

- L'elettroforesi capillare (CE) è una tecnica analitica che fonde il principio dell'elettroforesi con i concetti strumentali e di automazione propri dell'HPLC.

L'elettroforesi capillare usa, come alternativa alla piastra di gel o ad altri supporti, un capillare del diametro dell'ordine di decine di micron,

-piccolo diametro limita la quantità di calore generato anche quando vengono applicati centinaia di Volt per centimetro.



Elettroforesi capillare:

- separazione di macromolecole biologiche come le proteine,
- separazione di aminoacidi,
- farmaci chirali,
- vitamine,
- pesticidi,
- ioni inorganici,
- coloranti,
- surfattanti,
- zuccheri,
- oligonucleotidi
- virus.

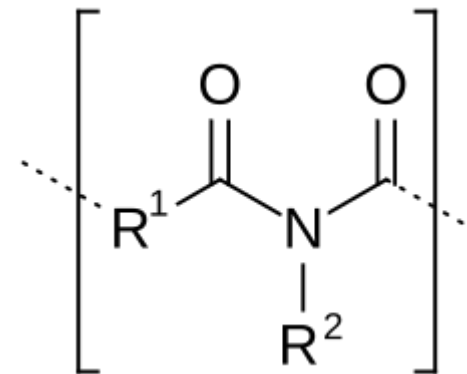
Caratteristiche

- rapidità d'analisi;
- alta efficienza;
- minime quantità di campioni e di solventi;
- rivelazione UV on-line;
- si opera in mezzi acquosi o con mezzi non-acquosi;
- può essere accoppiata con vari sistemi di rivelazione (UV, fluorescenza, massa);

Capillare:

- Chimicamente ed elettricamente inerte
- Trasparente alle lunghezze d'onda UV e visibile
- Flessibile e robusto.

Silice fusa nella sua parte interna e esternamente è di **polimide**, (polimero di monomeri immidi).
stabilità termica, buona resistenza chimica



La parete interna del capillare è costituita dai gruppi silanologici della silice (SiOH).

1- Condizionamento

Il capillare viene riempito con NaOH 1 M o una base o un acido forti (ionizzare i silanoli)

per cui la parete interna del capillare sarà carica negativamente.

2- Il capillare viene riempito con un elettrolita o tampone che permetta il passaggio della corrente.

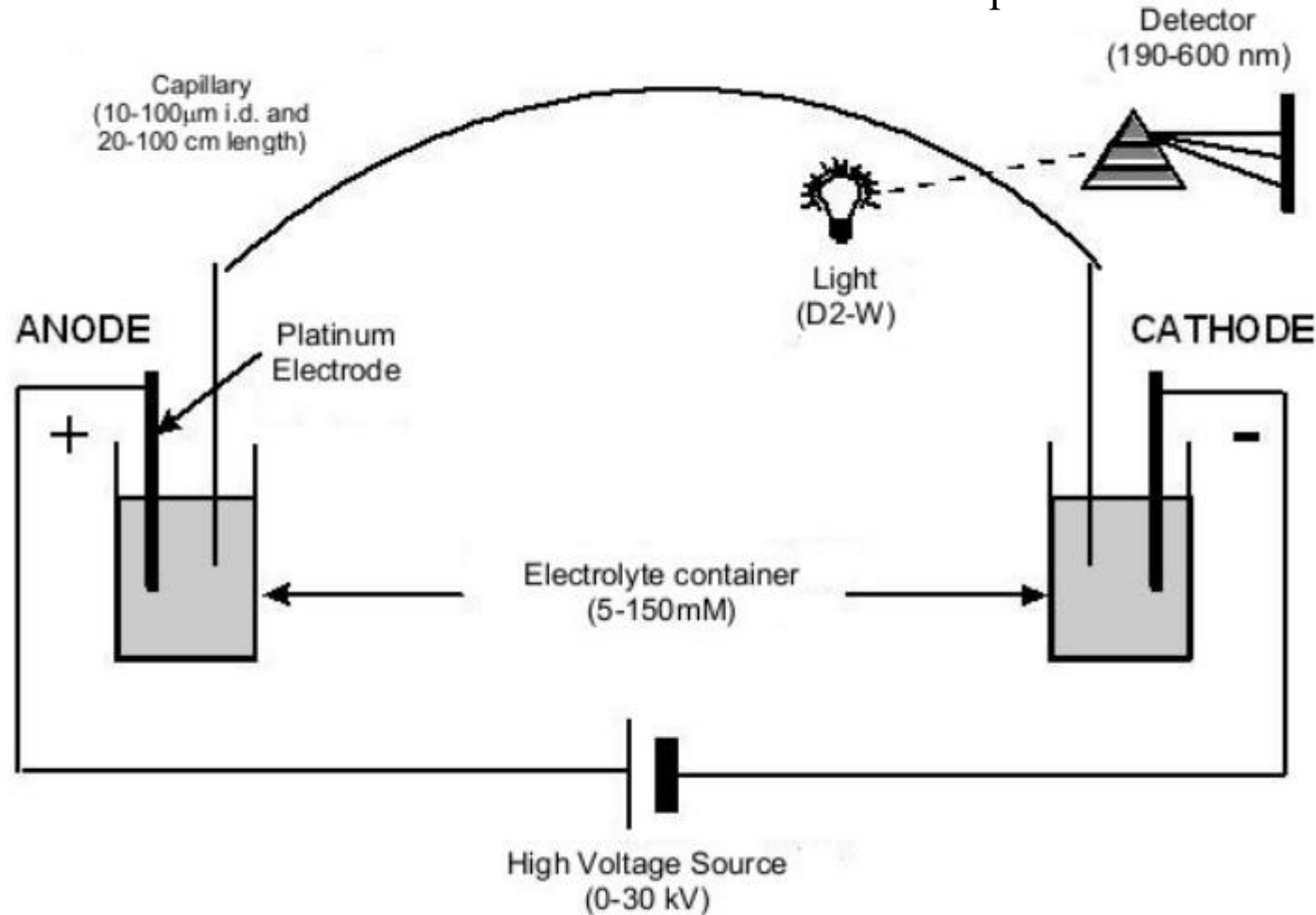
Caratteristiche del tampone:

- un buon potere tampone ai valori di pH a cui si desidera operare;
- bassa assorbanza di fondo alla lunghezza d'onda scelta per la rivelazione;
- bassa mobilità per minimizzare la generazione di corrente.

Nel CE non esiste una vera e propria cella di rivelazione

Termostatazione del capillare.

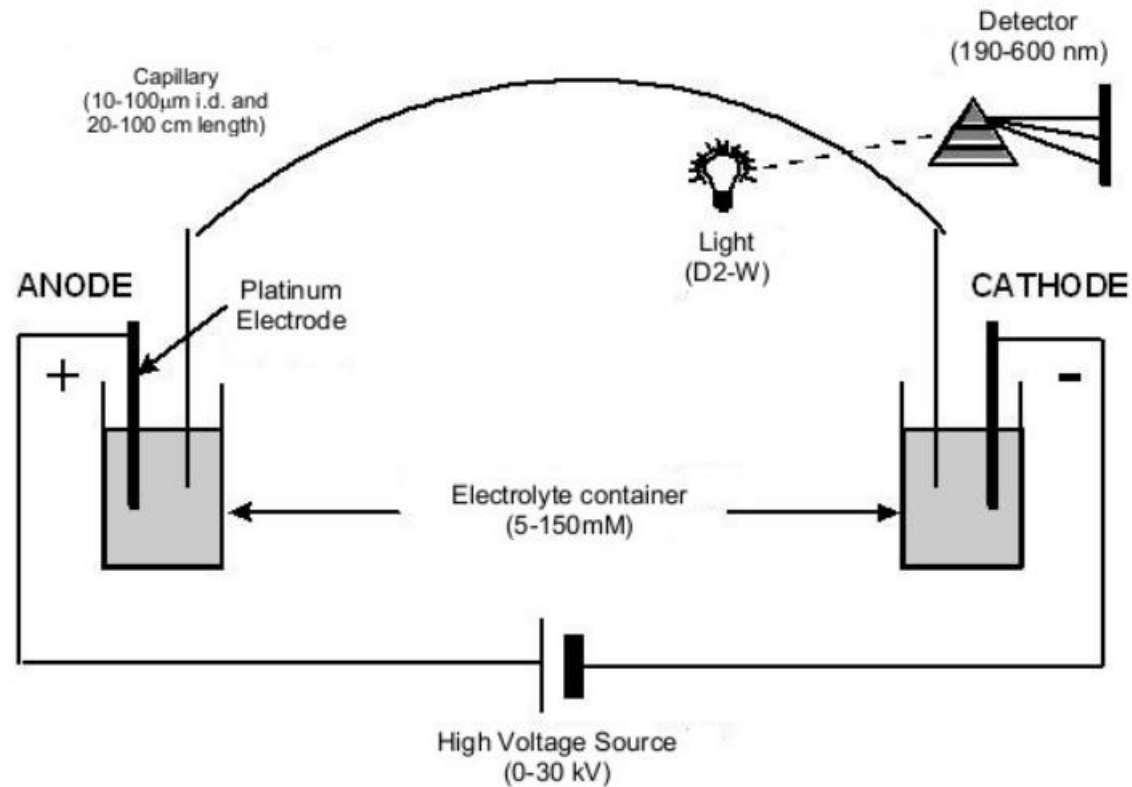
- la cella è sul capillare
- una piccola porzione della sua lunghezza che viene resa trasparente alla luce eliminando la poliammide.



Le estremità del capillare sono immerse nell'elettrolita o nel tampone

3- L'iniezione del campione. Un volume di campione molto piccolo, dell'ordine dei nl, viene iniettato ad una estremità del capillare

In genere il campione viene iniettato all'anodo, mentre la rivelazione avviene al catodo.



Corsa elettroforetica

Voltaggio (10 a 30 kV).

L'analita da analizzare o gli analiti da separare in caso di una miscela, migreranno con una velocità che dipende dalla loro **massa** e dalla loro **carica** e da un parametro molto importante che è il flusso **elettroendosmotico**.



movimento del tampone verso il catodo

generato dalla migrazione dei cationi

solvatati nel doppio strato elettrico alle pareti del capillare di silice.

