

88. Marco FRANK. — Un registratore elettronico di numeri di impulsi e sue applicazioni nel campo della radiocromatografia.

Riassunto. - Si descrive un'apparecchiatura automatica per il conteggio e la registrazione di impulsi elettrici, progettata e costruita in una piccola serie presso l'Istituto superiore di Sanità di Roma. L'apparecchiatura, pur essendo adatta a misure di carattere generale, si presta particolarmente alla determinazione delle zone radioattive di radiocromatografie.

Summary. — An automatic apparatus is described for the counting and recording of electrical pulses, which was designed and built in a small series in this Institute. Although suitable for general measurements of this type, the apparatus is particularly adapted for the determination of the active zones of radio-chromatograms.

Il problema del conteggio di impulsi elettrici, particolarmente di impulsi provenienti da rivelatori di radiazioni, e della registrazione dei conteggi su carta, oggi tanto di attualità, è stato oggetto di numerosi studi (^{1, 2, 3, 4}) presso l'Istituto Superiore di Sanità di Roma, per la importanza che tale problema riveste nei riguardi delle applicazioni sistematiche della radiocromatografia e, più in generale, dell'impiego dei radioisotopi.

Com'è noto, la tecnica della radiocromatografia su carta (^{5, 6}), così largamente impiegata nelle ricerche di biochimica (^{7, 8}), permette la separazione, la rivelazione ed il riconoscimento di sostanze presenti in una soluzione anche in quantità piccolissime (pochi milionesimi di grammo).

Una goccia della soluzione in esame viene posta sul bordo di un foglio di carta bibula: il bordo viene poi immerso in un solvente in modo che questo per capillarità si sposta verso il bordo opposto del foglio. Le varie sostanze presenti nella goccia, eluite dal solvente, si spostano anch'esse sul foglio nella direzione in cui è avanzato il solvente, ed il rapporto (R_f) tra il cammino della sostanza ed il cammino del fronte del solvente è caratteristico, per un dato solvente, delle varie sostanze. E' così possibile, conoscendo la posizione occupata sul foglio dalle sostanze eluite, individuare, almeno entro certi limiti, le sostanze stesse.

Se le varie sostanze sono « marcate », cioè esse sono dei composti

di isotopi radioattivi, la loro posizione sul foglio sarà rivelabile con contatori di Geiger.

Per una maggiore separazione tra le macchie è poi conveniente ricorrere alla tecnica delle radiocromatografie « bidimensionali »: il foglio sul quale si sono ottenute le macchie radioattive col passaggio di un primo solvente viene fatto nuovamente attraversare da un differente solvente in direzione normale a quella secondo la quale si era spostato il primo solvente. Le macchie risultano così più separate, essendo distribuite sull'intera superficie del foglio anzichè lungo una sola direttrice. La determinazione della posizione delle macchie sul foglio è ottenuta misurando e registrando la radioattività di ciascun elemento di superficie del foglio stesso, ed effettuando l'esplorazione o « scansione » di tutto il foglio per righe parallele.

Nella presente esposizione è riportato per sommi capi il principio di funzionamento di un registratore elettronico di numeri di impulsi, rimandando ad una preesistente pubblicazione ⁽²⁾ per ulteriori informazioni. Di tale registratore è nuovamente pubblicato il circuito in quanto vi sono state apportate alcune modifiche. Infine è descritta una serie di apparecchi destinati a funzionare principalmente in connessione con il registratore, completandone l'impiego particolarmente in vista delle applicazioni alle tecniche radiocromatografiche.

La linea completa di apparecchi comprende:

- 1) Il registratore elettronico di numeri di impulsi;
- 2) La macchina da scrivere con comando elettromagnetico dei tasti;
- 3) Il generatore di segnali stabilizzato con diapason;
- 4) La scala di demoltiplicazione per un numero prefissato di impulsi;
- 5) L'unità per l'autoprogrammazione delle misure;
- 6) Il dispositivo per l'esplorazione di radiocromatografie monodimensionali;
- 7) Il dispositivo per l'esplorazione di radiocromatografie bidimensionali.

1. IL REGISTRATORE ELETTRONICO

Il registratore è costituito da una scaletta decadica di quattro selettori Dekatron GS 10C, adatta a contare fino a 9999 impulsi, alla quale è connesso un sistema elettronico (read out) capace di effettuare la

« lettura » del numero di impulsi contato dalla scaletta e di stamparlo su carta mediante una macchina da scrivere elettrica i cui tasti dei numeri vengono battuti mediante pulsanti elettromagnetici.

In fig. 1 è riportato lo schema di principio del registratore. Questo presenta due entrate: ad una di esse (J1) pervengono gli impulsi che devono essere contati ed il cui numero deve essere registrato, all'altra (J2) arriva da un timer o da altro sistema un segnale che comanda l'inizio delle operazioni per la registrazione. Tali operazioni sono:

- a) Sospensione del conteggio;
- b) Registrazione dei numeri indicati dai Dekatron nell'ordine delle potenze decrescenti di dieci (cioè migliaia, centinaia, decine ed unità);
- c) Azzeramento dei Dekatron;
- d) Ripresa del conteggio.

Com'è noto, i selettori Dekatron comprendono un anodo, due guide e dieci catodi, ciascuno dei quali è connesso individualmente ad un piedino dello zoccolo. La scarica a bagliore avviene tra l'anodo ed un solo catodo. Il catodo acceso, corrispondente alla cifra indicata dal Dekatron, ha un potenziale positivo di circa 40 volt (con i valori delle resistenze catodiche usate nel circuito), mentre gli altri catodi sono a potenziale zero.

Il segnale che comanda l'inizio della registrazione produce lo scatto di una serie di univibratori connessi in modo che ognuno di questi scatta nell'istante in cui il precedente univibratore ritorna allo stato stabile. Si ha così una sequenza d'impulsi ciascuno dei quali è sovrapposto al potenziale dei catodi di un Dekatron. Data la polarizzazione dei diodi formanti la matrice, l'impulso di ciascun univibratore arriva ad accendere un solo thyatron per volta, che a sua volta aziona il pulsante elettromagnetico del tasto della macchina corrispondente alla cifra indicata dal Dekatron.

Al termine della sequenza degli impulsi degli univibratori i Dekatron vengono azzerati.

La durata delle operazioni descritte, per un registratore di numeri di quattro cifre, è di 0,6 sec, dall'inizio della sospensione alla ripresa del conteggio.

Alla fine della sospensione si accende un undicesimo thyatron destinato a funzioni ausiliarie quali il ritorno del carrello, la spaziatura, ecc... Se viene usata un'addizionaltrice elettrica anzichè una macchina da scrivere, l'undicesimo thyatron serve per azionare il tasto « stampa ».

In fig. 2 è riportato lo schema del registratore.

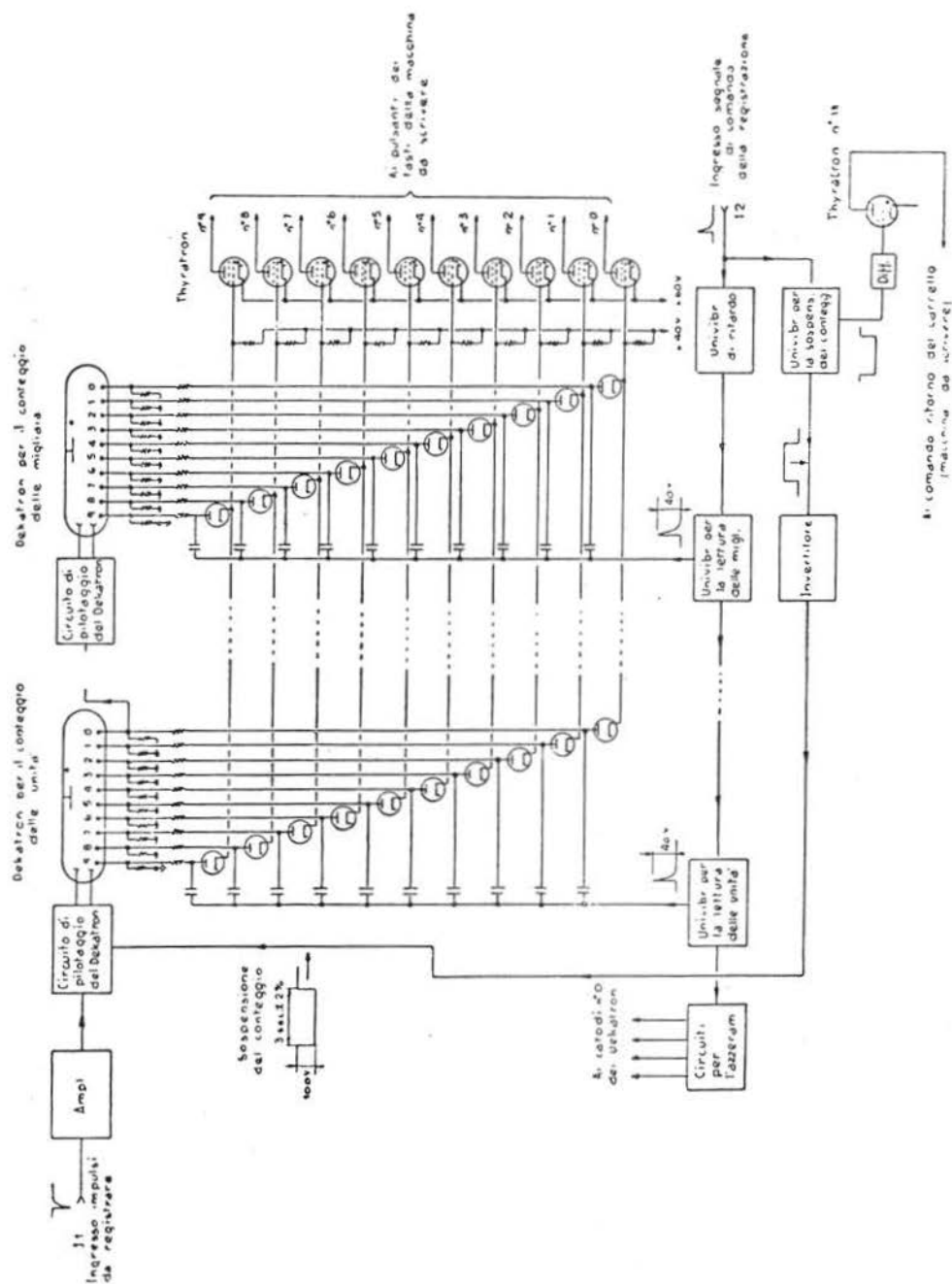


Fig. 1. - Schema di principio del registratore.

Le modifiche al modello precedentemente descritte ⁽²⁾ riguardano lo stadio d'ingresso, l'applicazione del segnale negativo per la sospensione del conteggio, l'azzeramento dei Dekatron e la sostituzione di alcuni diodi al germanio con diodi a vuoto ed infine l'applicazione di un piccolo ventilatore da 10 watt per il raffreddamento dei thyatron, aggiunto in quanto la potenza dissipata nei filamenti di questi, data la compattezza del montaggio, dava luogo ad un eccessivo riscaldamento.

Il vantaggio fondamentale presentato da questo tipo di registratore rispetto agli altri sistemi recentemente apparsi in commercio consiste nel fatto che il registratore descritto è completamente elettronico e privo di contatti striscianti, mentre la parte meccanica, necessaria per la stampa delle cifre, è costituita dalla macchina da scrivere per la quale ci si avvale di una profonda esperienza tecnica e di una costruzione industriale in gran serie.

La sicurezza di funzionamento, prevista in sede di progetto, è stata largamente confermata dall'esperienza. Sono già stati costruiti 18 registratori per le necessità interne dell'Istituto, ed il primo di questi, entrato in servizio nell'ottobre del 1956, ha totalizzato a tutt'oggi (dicembre 1960) quasi trentamila ore di funzionamento, richiedendo solo un minimo di manutenzione e di sostituzioni di tubi. Altrettanto buoni sono stati i risultati di funzionamento delle macchine da scrivere.

L'impiego della macchina da scrivere offre un altro notevole vantaggio: la possibilità di sfruttare i movimenti della macchina stessa per effettuare direttamente l'esplorazione delle radiocromatografie, come sarà illustrato più avanti, ai punti 6 e 7.

2. MACCHINA DA SCRIVERE CON COMANDO ELETTROMAGNETICO DEI TASTI

Sulla macchina da scrivere elettrica è fissata un'incastellatura portante i pulsanti elettromagnetici per i tasti dei numeri, per il tasto dello spazio e per quello del ritorno del carrello. Il montaggio dell'incastellatura sulla macchina non richiede alcuna modifica di quest'ultima.

I numeri relativi ai successivi conteggi possono essere registrati in colonna su un nastro di carta oppure l'uno di seguito all'altro sull'intera facciata di un foglio. La prima forma può essere preferibile nella maggior parte dei casi, mentre la seconda si presta particolarmente per le registrazioni di radiocromatografie bidimensionali in quanto la registrazione viene a costituire una vera e propria mappa della radiocromatografia.

Nello schema di fig. 3 sono mostrate le connessioni delle parti relative alla macchina da scrivere.

Per ottenere la registrazione sull'intero foglio il commutatore deve assumere la posizione riportata in figura. Dopo la registrazione di ogni gruppo di quattro cifre il thyatron n. 11 si accende facendo passare corrente nella bobina del pulsante corrispondente al tasto per il ritorno del carrello. Il circuito della bobina del pulsante però è interrotto dal microinterruttore azionato dal carrello.

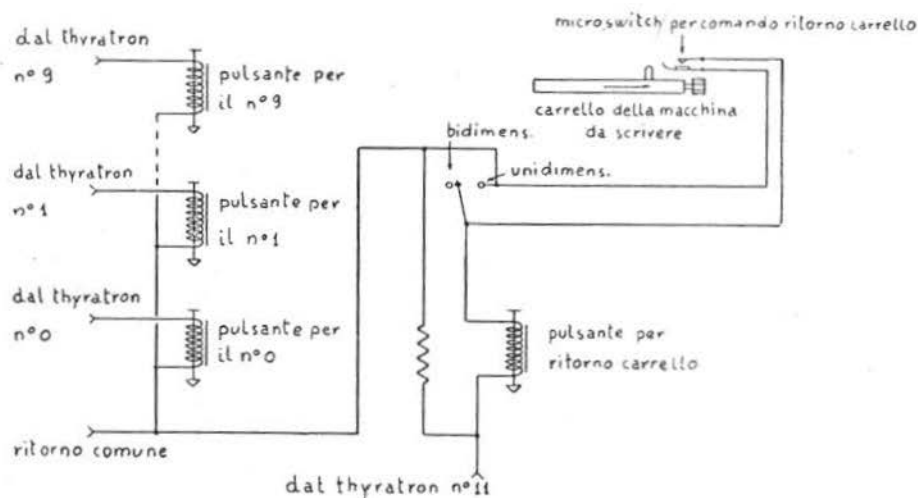


Fig. 3. - Schema dei comandi della macchina da scrivere.

Al termine di ciascuna riga il movimento del carrello produce la chiusura del microinterruttore e dopo la registrazione dell'ultima cifra di ogni riga, viene azionato il tasto per il ritorno del carrello.

Per la registrazione dei numeri in colonna il commutatore viene girato in senso orario ed in tale posizione ogni volta che si accende il thyatron n. 11, dopo la registrazione di un numero, viene azionato il tasto per il ritorno del carrello.

Nella registrazione di radiocromatografie, soprattutto bidimensionali, è conveniente utilizzare, in luogo del tasto dello zero, il tasto dell'avanzamento; si ottengono allora numeri radi, in quanto costituiti da una sola cifra, in corrispondenza del fondo, e addensati, in quanto composti da più cifre, in corrispondenza delle macchie radioattive, le quali sono così più facilmente visualizzabili (fig. 4).

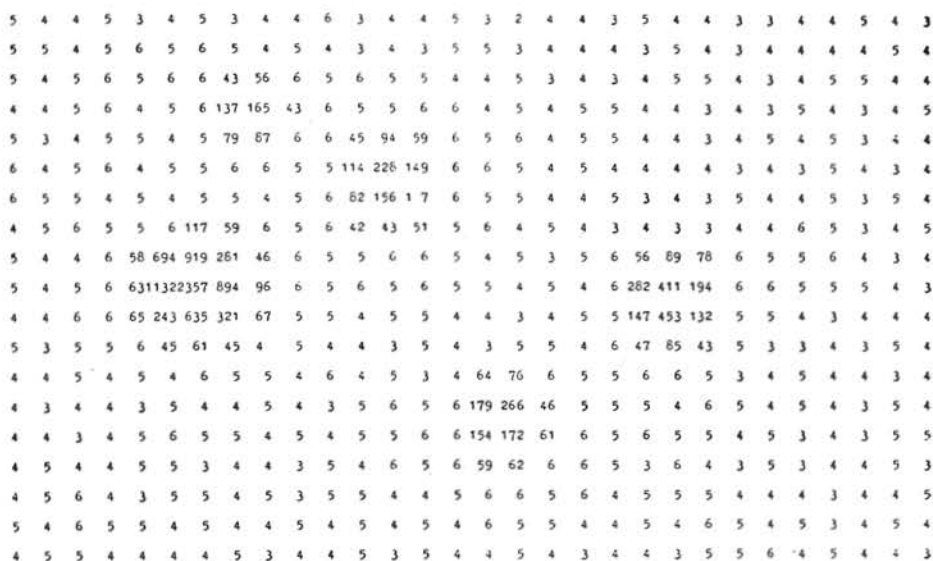


Fig. 4. - Fotografia della registrazione di una radiocromatografia.

3. GENERATORE DI SEGNALI A FREQUENZA STABILIZZATA CON DIAPASON

E' costituito (fig. 5) da un oscillatore la cui frequenza (600 c/s) è stabilizzata con una precisione migliore di una parte su 10^4 mediante un diapason termocompensato, seguito da uno stadio di demoltiplicazione per 6. Il circuito di questo stadio è derivato dal circuito studiato dalla Philips per scalette a numero prefissato di impulsi, con tubi E1T.

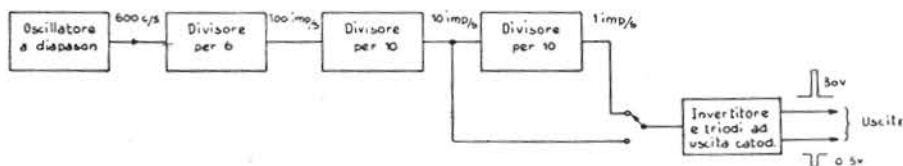


Fig. 5. - Schema a blocchi del generatore di segnali a frequenza stabilizzata con diapason.

Lo stadio di demoltiplicazione per 6 è seguito da due stadi di demoltiplicazione per 10. In tutti gli stadi sono usati tubi E1T. L'unità fornisce sia impulsi positivi di 30 volt, sia negativi di 0,5 volt. La frequenza degli impulsi di uscita è di 1 o 10 impulsi al secondo.

L'uscita è effettuata attraverso un cathode follower ed è previsto il collegamento contemporaneo di più utilizzatori.

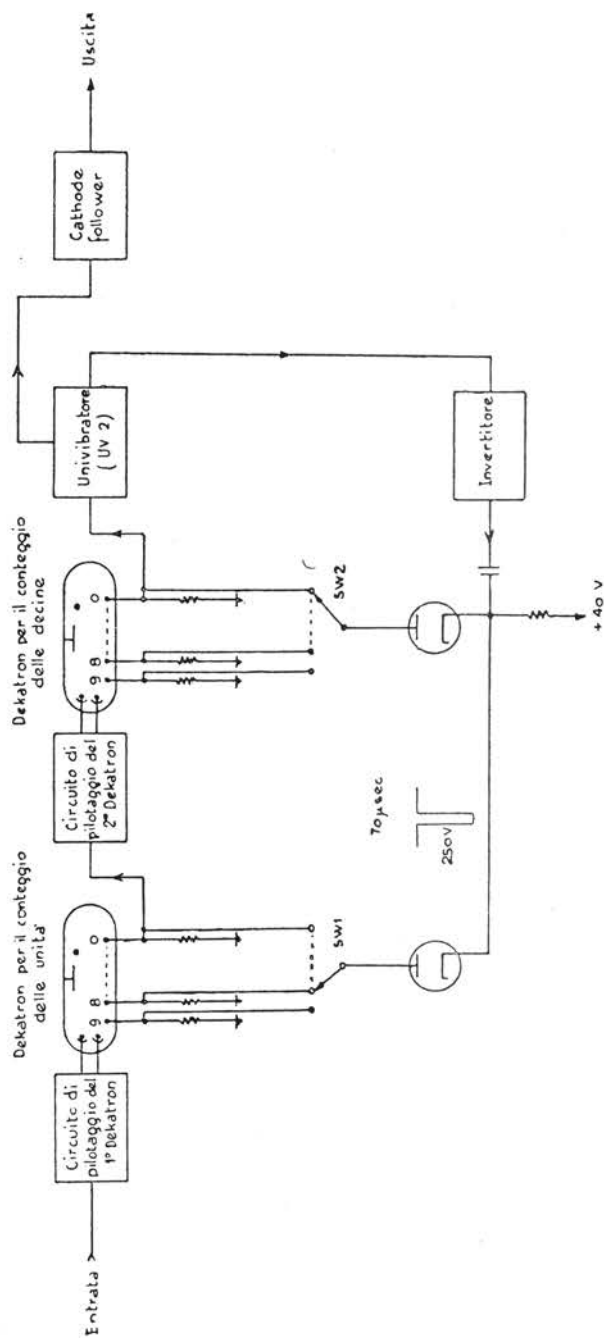


Fig. 6. — Schema di principio della scala di demoltiplicazione per un numero prefissato di impulsi.

4. SCALA DI DEMOLTIPLICAZIONE PER NUMERO PREFISSATO DI IMPULSI.

Questa unità (fig. 6) è stata fondamentalmente progettata per funzionare in connessione con il generatore di impulsi descritto nel precedente paragrafo, ed è destinata a fornire in uscita segnali ad intervalli di un numero intero prefissabile di secondi, destinati a comandare la registrazione.

In fig. 7 è riportato lo schema della scaletta.

Il principio di funzionamento di questa unità è il seguente: dopo che un certo numero di impulsi è pervenuto all'entrata della scaletta si accende il catodo n. 0 del secondo Dekatron (V7), e questo fa scattare l'univibratore V8. Quest'ultimo, attraverso l'invertitore V10 ed attraverso i diodi V9A e V9B applica un impulso negativo dell'ampiezza di circa 250 volt e della durata di circa 70 μ sec a quel catodo di ciascuno dei Dekatron che è stato prescelto con i commutatori SW1 e SW2.

Si supponga di richiedere un impulso in uscita ad esempio ogni 43 impulsi in entrata. Si dispongono allora i commutatori SW1 ed SW2 in modo che i contatti mobili si trovino in corrispondenza del catodo n. 3 del Dekatron delle decine e del catodo n. 7 del Dekatron delle unità, rispettivamente. Al ritorno a zero del Dekatron delle decine gli impulsi negativi applicati attraverso i diodi spostano la scarica a bagliore sul catodo n. 3 di quest'ultimo Dekatron e sul catodo n. 7 del Dekatron delle unità; i due Dekatron segneranno allora la cifra 37, ed occorreranno appunto 43 impulsi per ritornare a zero ed iniziare nuovamente il ciclo.

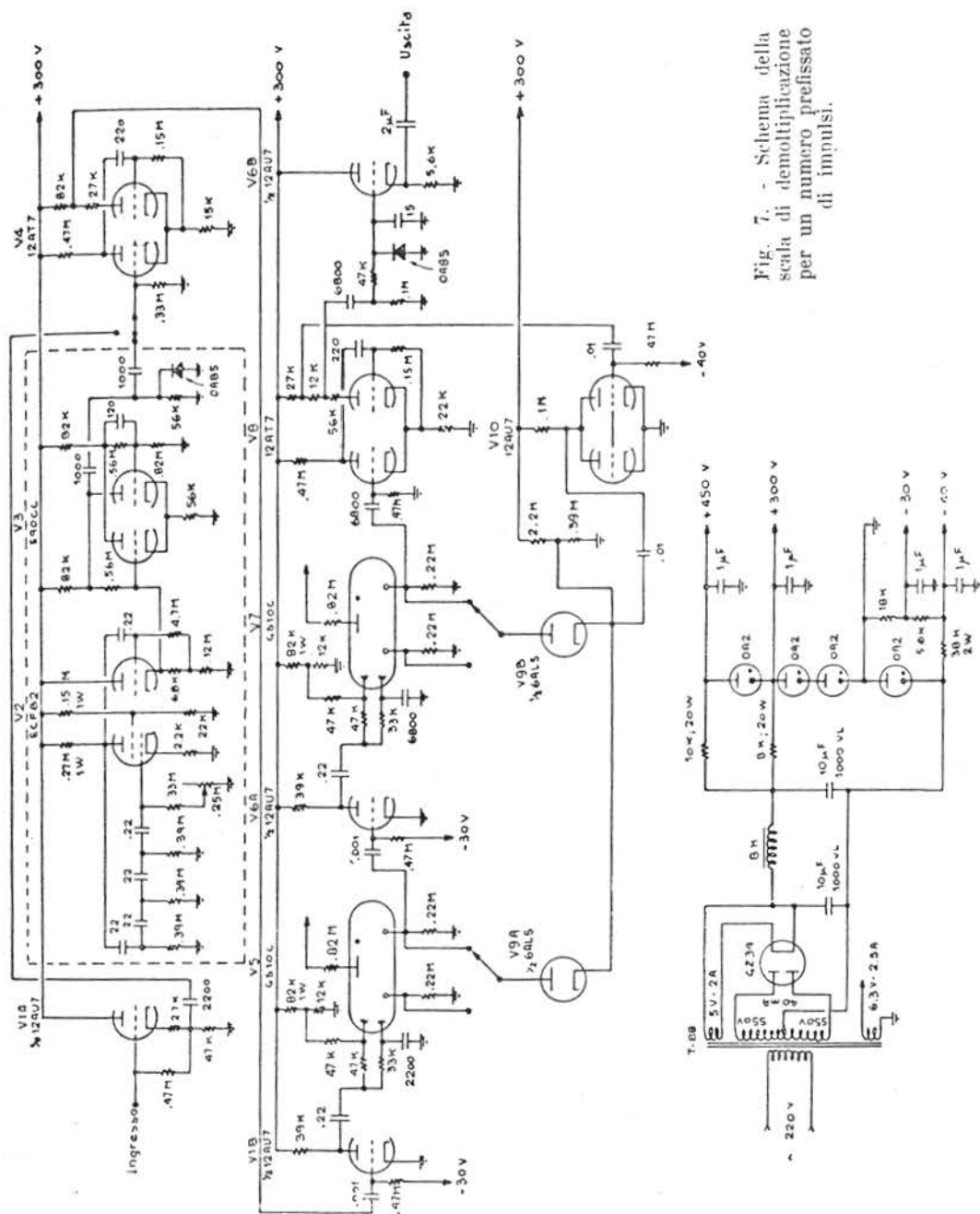
Come il registratore, anche questa scaletta può essere progettata per un qualsiasi numero di cifre.

Per applicazioni in cui è sufficiente una stabilità di frequenza dell'ordine di qualche unità per cento si può evitare l'impiego del generatore di impulsi a frequenza stabilizzata usando un oscillatore sinusoidale seguito da uno squadratore e da un differenziatore costruiti entro questa unità, in modo da produrre localmente impulsi ad intervalli di tempo di 1 sec: in tal caso la scaletta costituisce da sola un timer completo.

La frequenza massima degli impulsi che la scaletta può seguire nel conteggio è di oltre 3000 imp/sec, pertanto questo tipo di demoltiplicatore può trovare applicazioni diverse oltre a quella fondamentale descritta.

5. UNITÀ PER L'AUTOPROGRAMMAZIONE DELLE MISURE.

Questa unità è stata particolarmente studiata per la registrazione di radiocromatografie bidimensionali, ed ha il seguente scopo: durante la



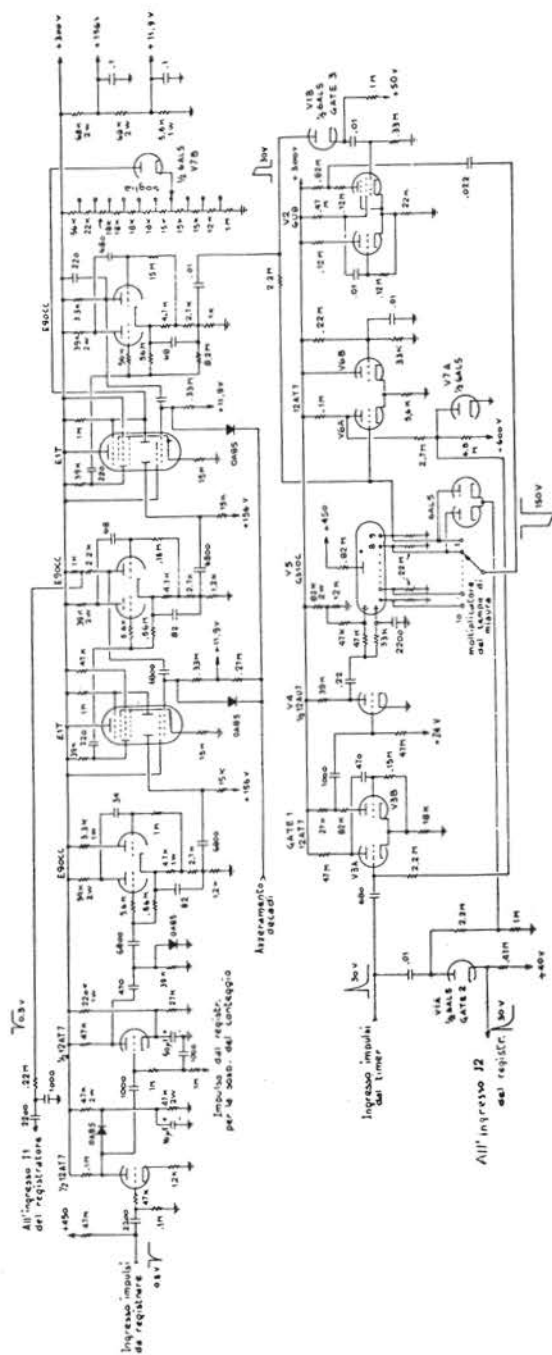


Fig. 8. - Schema dell'unità per l'autoprogrammazione delle misure.

scansione di una radiocromatografia vengono via via esplorati elementi appartenenti o meno a macchie radioattive. Per ridurre il tempo totale necessario alla scansione dell'intero foglio pur mantenendo sufficientemente grande la durata delle misure degli elementi di superficie effettivamente radioattivi, in modo da mantenere convenientemente ridotto l'errore statistico, occorre che la misura di ciascun elemento possa avvenire in un tempo relativamente breve se l'elemento non è radioattivo (e quindi non interessante), mentre la misura deve essere automaticamente prolungata se l'elemento appartiene ad una macchia radioattiva.

A tale scopo, durante l'intervallo di tempo che intercorre tra due segnali provenienti dal timer, viene contato il numero degli impulsi forniti dai Geiger: se durante questo intervallo il conteggio non è arrivato a superare un numero (« soglia ») prefissato in base al valore del « fondo » dei contatori, all'arrivo del successivo segnale del timer il conteggio viene registrato, le scalette azzerate, e si inizia l'esplorazione del successivo elemento della radiocromatografia. Se invece tale soglia è superata, il segnale proveniente dal timer non raggiunge più l'ingresso J2 del registratore, ed il conteggio relativo alla misura dello stesso elemento di superficie della radiocromatografia prosegue per un intervallo di tempo multiplo (secondo un fattore prestabilito) degli intervalli di tempo stabiliti dal timer.

In fig. 8 è mostrato lo schema dell'unità.

Gli impulsi provenienti dai tubi Geiger sono amplificati, demoltiplicati da uno stadio decadico con tubo E-T, ed inviati al registratore. Questa disposizione è conveniente in quanto nell'esplorazione delle radiomatografie si incontrano macchie con forte attività, e d'altronde non interessa la registrazione del singolo impulso, cioè delle unità: i numeri stampati dal registratore così connesso rappresentano quindi le decine di migliaia, le migliaia, le centinaia e le decine. L'impiego di un tubo EIT anziché di un Dekatron come primo stadio di demoltiplicazione è preferibile per il suo maggior potere risolutivo.

Dopo il primo stadio di demoltiplicazione si ha un secondo demoltiplicatore che divide per un numero prefissabile tra 1 e 10, anch'esso realizzato con un tubo EIT. Da questo secondo stadio si ha quindi un impulso in uscita ogni 10, 20, ...oppure 100 impulsi dei Geiger, a seconda del valore prefissato per la soglia.

All'inizio del conteggio il catodo n. 9 del Dekatron è acceso e si trova ad un potenziale positivo di oltre 40 volt. Il triodo V6A è un invertitore la cui resistenza catodica è costituita fondamentalmente dalla re-

sistenza d'ingresso 1/gm del triodo V6B. Il potenziale della griglia della sezione A dell'univibratore V3 è a circa -400 volt, pertanto i segnali del timer non possono arrivare a far avanzare la scarica a bagliore del Dekatron (gate 1 chiuso), ed il catodo n. 9 resta acceso. I diodi V1A e V1B in queste condizioni sono prossimi alla conduzione, ed i segnali (positivi) del timer raggiungono l'ingresso J2 del registratore attraverso V1A (gate 2 aperto).

Supponiamo che nell'intervallo di tempo intercorrente tra due segnali del timer il conteggio non superi la soglia prefissata: quando avviene l'azzeramento dei Dekatron nel registratore un impulso negativo di circa 50 volt proveniente dal registratore stesso provvede ad azzerare anche i tubi E1T dell'unità per l'autoprogrammazione e, a registrazione avvenuta, il conteggio riprende.

Supponiamo invece che, prima dell'arrivo del segnale dal timer, venga superata la soglia: in tal caso l'impulso proveniente dal secondo stadio di demoltiplicazione, attraverso il diodo V1B che, come si è detto, è prossimo alla conduzione (gate 3 aperto), raggiunge l'univibratore V2. Questo fornisce un ampio impulso negativo di circa 150 volt che sposta la scarica a bagliore del Dekatron dal catodo n. 9 ad un altro catodo pre-stabilito. Appena il catodo n. 9 si spegne ed il suo potenziale cade a zero, il gate 2 si chiude cosicchè i segnali provenienti dal timer non raggiungono più il registratore. Il gate 1 invece si apre e ciascun segnale proveniente dal timer fa avanzare da un catodo al successivo il bagliore del Dekatron.

Essendo spento il catodo n. 9 è chiuso anche il gate 3 e quindi, nell'eventualità di cui col proseguire del conteggio si sorpassi nuovamente la soglia, gli impulsi provenienti dal secondo stadio di demoltiplicazione non possono raggiungere l'univibratore V2.

Quando il succedersi dei segnali provenienti dal timer ha ricondotto ad accendersi il catodo n. 9, i segnali stessi nuovamente raggiungono il registratore ed i gate 2 e 3 si riaprono. Il gate 2 viene aperto dal momento in cui il bagliore arriva al catodo n. 8, in modo che il successivo impulso proveniente dal timer, trovando il gate già aperto, possa passare a provocare la registrazione e l'avanzamento dell'elemento esplorato. Altrimenti il segnale del timer aprirebbe il gate stesso ma non farebbe in tempo a passare e prima dell'arrivo del segnale successivo nuovamente interverrebbe l'univibratore V2 col risultato che il ciclo si ripeterebbe indefinitamente e la registrazione e la scansione non procederebbero.

6. DISPOSITIVO PER LA SCANSIONE DI RADIOCROMATOGRAFIE MONODIMENSIONALI.

La radiocromatografia su striscia viene tesa mediante nastro adesivo su un telaietto di alluminio. Questo (fig. 9) può scorrere longitudinalmente tra due contatori di Geiger, su pulegge che lo sostengono e lo guidano. Un estremo del telaietto è fissato mediante una pinzetta all'estremo del nastro di carta sul quale la macchina da scrivere (oppure un elettrocalcolatore) registra incolonnati i numeri relativi alle successive misure. All'altro estremo del telaietto è agganciato un filo di nylon collegato ad un peso di circa 300 grammi.

Ad ogni registrazione il nastro di carta avanza e consente al telaietto porta striscia di spostarsi a sua volta, cosicchè l'avanzamento del rullo della macchina provvede ad assicurare anche l'esplorazione della striscia.

I contatori sono affacciati da ambedue le parti della cromatografia in modo da intercettare le radiazioni emesse sotto l'angolo solido più ampio possibile, e per minimizzare gli effetti dovuti alle eventuali variazioni di distanza della radiocromatografia da uno dei contatori con variazioni inverse dall'altro.

E' importante che la striscia sia disposta verticalmente (anzichè orizzontalmente), altrimenti piccole particelle di carta radioattive, staccandosi dalla cromatografia e cadendo sulla finestra di mica del contatore che si trovasse sotto la striscia, ne altererebbe rapidamente il fondo. La striscia radiocromatografica ha una larghezza di 30 mm ed i contatori impiegati hanno una finestra di mica da 1,5 - 1,9 mg/cm². La finestra è limitata da una apertura di 30 x d mm, ove d è l'avanzamento della striscia ad ogni misura. Il valore di d dipendente dal tipo di macchina da scrivere o elettrocalcolatore usato, si aggira sui 3 mm.

I contatori sono alloggiati in schermi di piombo da 30 mm di spessore con camicia interna d'alluminio, ed avendo il medesimo pianerottolo sono connessi al registratore e ad un alimentatore per l'alta tensione attraverso una semplice scatola di giunzione.

Il dispositivo descritto è completato da un interruttore generale che spegne l'apparecchiatura quando il telaietto, arrivato al termine della sua traslazione, preme sulla leva dell'interruttore stesso.

Opportuni segni di riferimento e la possibilità di bloccare il telaietto rispetto all'incastellatura dei contatori durante il fissaggio della pinza al nastro di carta consentono di iniziare l'esplorazione della striscia partendo da una posizione ben definita ed assicurano la riproducibilità delle misure.

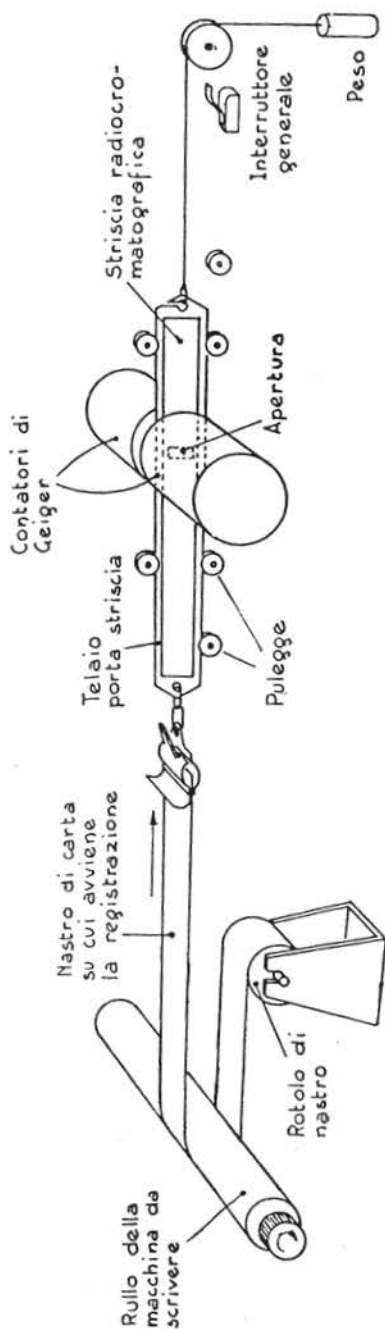


Fig. 9. - Dispositivo per l'esplorazione di radiocronatografie monodimensionali.

In fig. 10 è mostrato il dispositivo per l'esplorazione delle radiocromatografie su striscia. Nella stessa fotografia sono mostrate anche altre unità descritte nella presente trattazione.

7. DISPOSITIVO PER LA SCANSIONE DI RADIOCROMATOGRAFIE BIDIMENSIONALI.

Anche nel caso delle radiocromatografie bidimensionali si sono utilizzati i movimenti della macchina da scrivere per effettuare la scansione della radiocromatografia stessa. Un lembo di questa viene unito ad un foglio di carta per la macchina da scrivere mediante nastro adesivo. All'altro lembo viene fissata una barretta del peso di circa 250 gr., co-

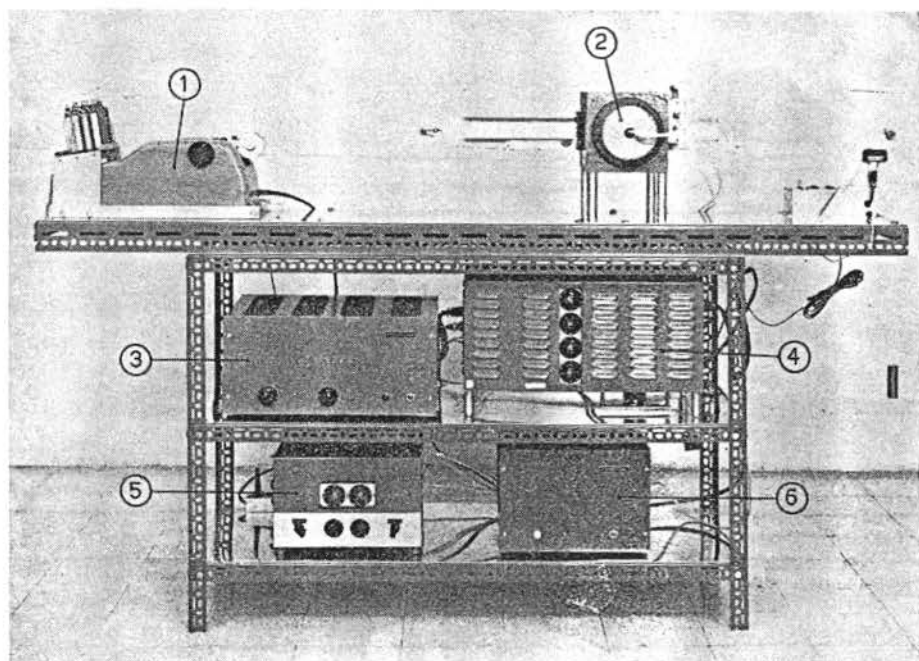


Fig. 10. - Fotografia del dispositivo per l'esplorazione di radiocromatografie monodimensionali:

- 1) Elettrocalcolatore o macchina da scrivere
- 2) Schemi di piombo contenenti i contatori Geiger

Nella fotografia sono inoltre visibili:

- 3) L'unità per l'autoprogrammazione delle misure
- 4) Il registratore di numeri di impulsi
- 5) La scaletta a numero prefissato di impulsi
- 6) L'alimentatore alta tensione per i Geiger

stituita da due metà incernierate ad un estremo e adatte a tenere saldamente il lembo stesso, una volta serrate insieme.

Il dispositivo per la scansione delle radiocromatografie è mostrato in fig. 11 e nella fotografia (fig. 12). Al carrello della macchina da scrivere è fissato un supporto incurvato di lamiera di acciaio inossidabile, avente la forma di una porzione di cilindro tagliato lungo due generatrici a 90° tra loro rispetto l'asse.

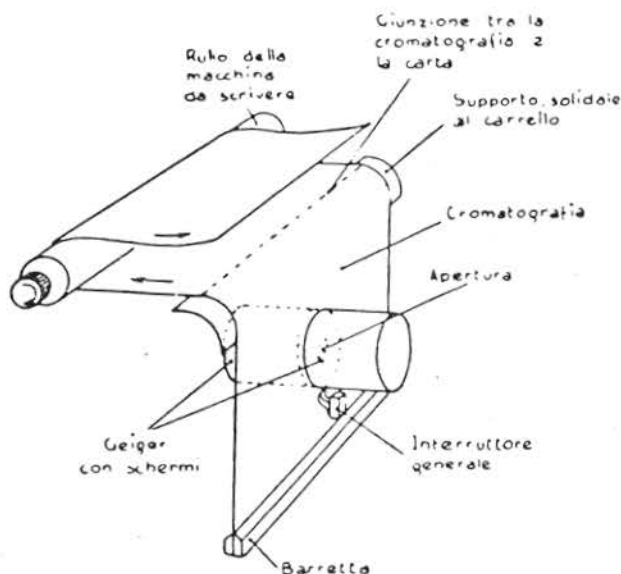


Fig. 11. - Dispositivo per la scansione delle radiocromatografie bidimensionali.

La carta viene inserita nella macchina da scrivere e ad ogni spostamento del carrello la radiocromatografia si sposta tra i due contatori di Geiger.

Alla fine della riga il carrello ritorna a capo ed il rullo ruota facendo avanzare la carta e facendo salire la radiocromatografia tra i Geiger.

Con la macchina da scrivere LEXICON 80 E della Olivetti, gli spostamenti lungo una riga corrispondenti a numeri di quattro cifre sono di circa 10,4 mm e la distanza tra le righe può essere prefissata a 10 mm. Le aperture che limitano le finestre di mica dei contatori di Geiger sono quindi di $10,4 \times 10$ mm. Questi contatori possono quindi essere di diametro notevolmente inferiore rispetto ai Geiger impiegati nel dispositivo

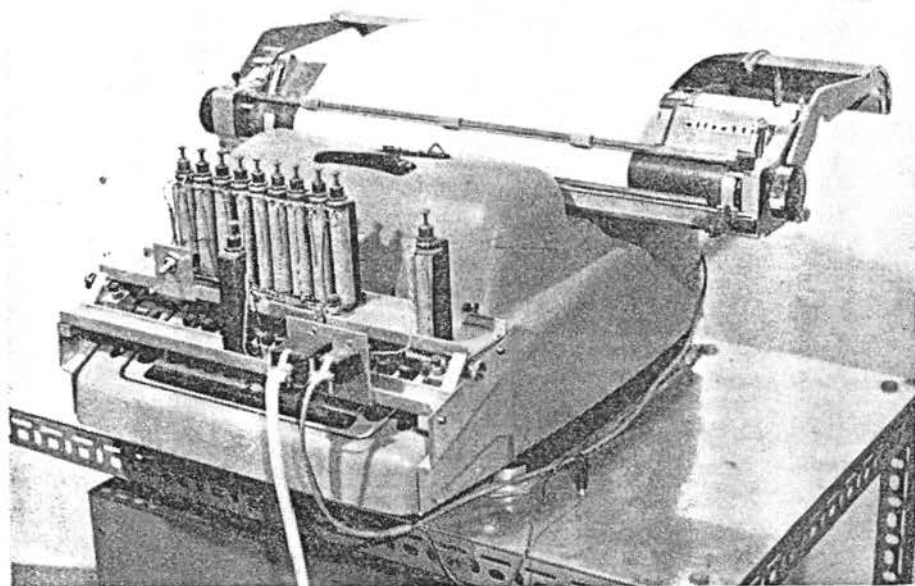


Fig. 12. - Fotografia della macchina da scrivere con i pulsanti elettromagnetici dei tasti ed il dispositivo per la scansione delle radiocromatografie bidimensionali

per l'esplorazione delle radiocromatografie monodimensionali, mantenendosi per lo spessore della mica un valore di circa $1,9 \text{ mg/cm}^2$. Poichè per l'alimentazione di questi contatori si richiede una tensione di 450 volt, i Geiger sono alimentati direttamente dall'unità per l'autoprogrammazione.

Al termine dell'intera scansione la barretta fissata al lembo inferiore della radiocromatografia arriva a premere la levetta di un microinterruttore spegnendo l'intera apparecchiatura.

Alcune misure effettuabili con l'apparecchiatura descritta.

Come si è accennato, gli apparecchi descritti possono essere interconnessi in modo da effettuare registrazioni di vari tipi di misure.

a) Conteggio a tempo prefissato e misure di frequenza.

In fig. 13 è rappresentata una disposizione per effettuare misure di frequenza di impulsi e conteggi a tempo prefissato.

Dato che il tempo durante il quale il conteggio nel registratore è

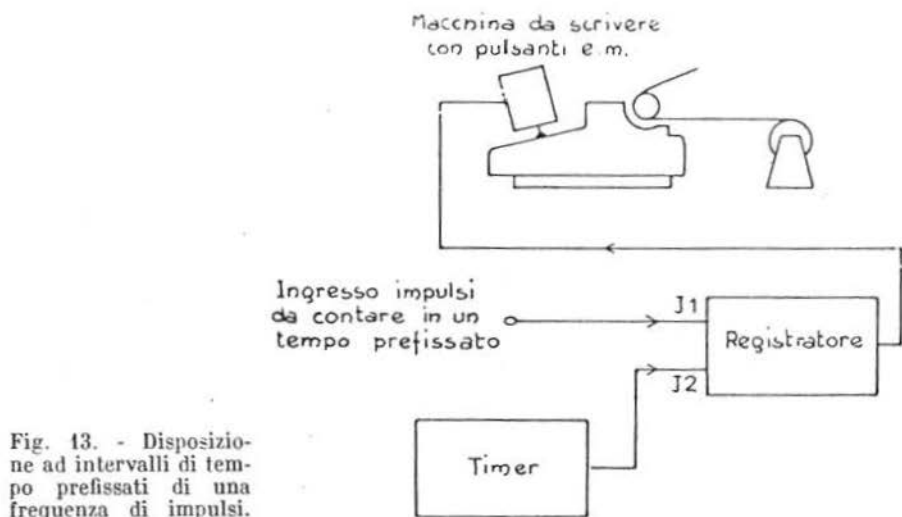


Fig. 13. - Disposizione ad intervalli di tempo prefissati di una frequenza di impulsi.

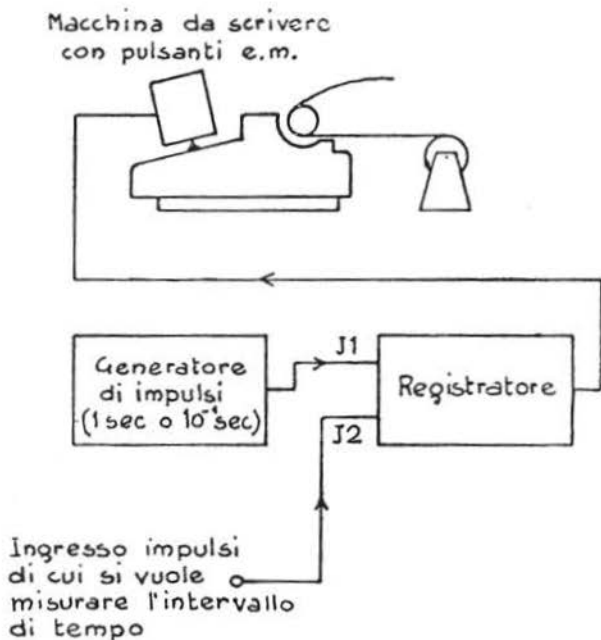


Fig. 14. - Disposizione per la registrazione della misura dell'intervallo di tempo intercorrente tra due eventi

sospeso, è di $0,6 \text{ sec} \pm 2\%$, e tenendo conto che gli intervalli di tempo a cui si susseguono gli impulsi del timer con stabilizzazione della frequenza a diapason sono misurati con una precisione migliore di una parte su 10^4 , l'errore sul tempo di sospensione diviene dello stesso ordine dell'errore sull'intervallo di tempo durante il quale si effettua la mi-

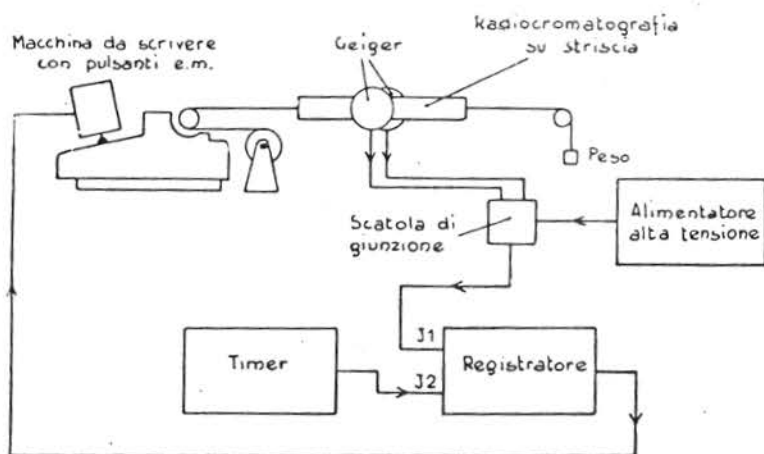


Fig. 15. - Disposizione per la registrazione di radiocromatografie monodimensionali: eventualmente può essere inserita anche l'unità per l'autoprogrammazione, come è mostrato in Fig. 10.

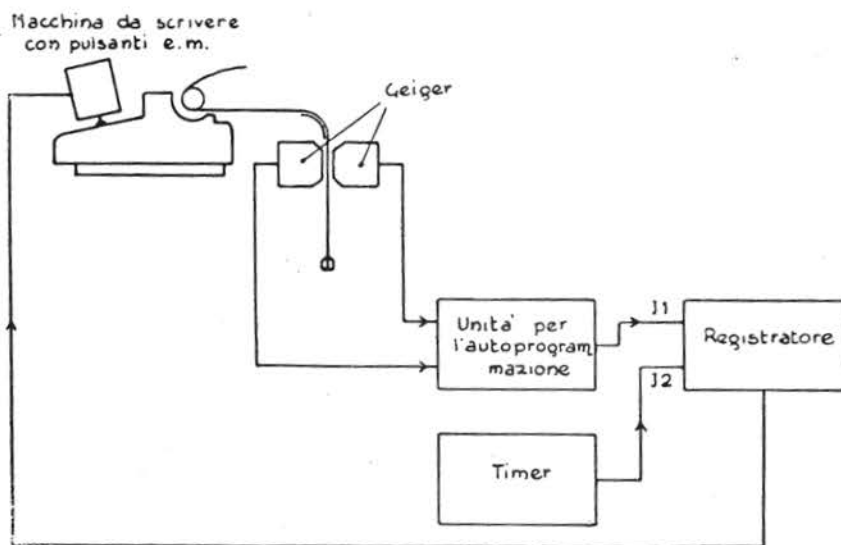


Fig. 16. - Disposizione per la registrazione di radiocromatografie bidimensionali.

sura quando questo ultimo intervallo è di 2 minuti; ma l'errore è già minore o uguale ad una parte su 10^3 per misure della durata di 12 sec.

b) *Misura dell'intervallo di tempo intercorrente tra due eventi.*

In fig. 14 è rappresentata la disposizione per registrare la misura dell'intervallo di tempo T intercorrente tra due eventi (con T sufficientemente grande rispetto a 3 sec.).

I tempi possono essere misurati in secondi o in decimi di secondo, dipendentemente dalla durata prevedibile per T, e tenendo conto del numero di cifre previsto nel registratore e delle precedenti considerazioni relative alla precisione delle misure.

Alle misure registrate occorre ovviamente aggiungere il tempo di sospensione del conteggio.

c) *Registrazione di radiocromatografie monodimensionali.*

La disposizione delle unità impiegate per la registrazione delle radiocromatografie monodimensionali è mostrato in fig. 15.

d) *Registrazione di radiocromatografie bidimensionali.*

In fig. 16 è mostrata la disposizione delle unità usate per la registrazione delle radiocromatografie bidimensionali.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Elettronica.

BIBLIOGRAFIA

- (1) CHAIN E. B., FRANK M., POCCHIARI F., ROSSI C., UGOLINI F. e UGOLINI G. - Selected Scientific Papers from the Ist. sup. Sanità, 1: 239 (1936).
- (2) FRANK M. - Selected Scientific Papers from the Ist. sup. Sanità, 1: 281 (1936).
- (3) FRANK M. - Rend. Ist. sup. Sanità, 21: 238 (1938).
- (4) UGOLINI G. - Selected Scientific Papers from the Ist. sup. Sanità, 1: 288 (1936).
- (5) FINK R. M., DENT C. E. e FINK K. - Nature, 160: 801 (1947).
- (6) TOMARELLI R. M. e FLOREY K. - Science, 107: 630 (1948).
- (7) BELOFF-CHAIN A., CATANZARO R., CHAIN E. B., MASI I., POCCHIARI F. e ROSSI C. - Rend. Acc. Lincei, 8: XIV, 489 (1933).
- (8) BELOFF-CHAIN A., CATANZARO R., CHAIN E. B., MASI I., POCCHIARI F. e ROSSI C. - Proc. roy. Soc. B 143: 481 (1933).

Riassunto. — Le particelle di uno stesso virus sono tutte uguali tra loro quanto a forma e dimensioni. Le forme osservate sono tutte poliedriche, talora regolari. La costanza e la specificità di tali forme non si possono giustificare, ricorrendo a modelli noti di solidi naturali dotati di forma propria, quali i cristalli e le molecole.

Sulla base delle osservazioni al microscopio elettronico, si propone un nuovo modello, che sembra capace di inquadrare in modo soddisfacente i risultati sperimentali. Secondo tale modello, la forma esterna della particella virale sarebbe essenzialmente dovuta al rivestimento esterno di molecole proteiche, costituente un monostrato chiuso di elementi tutti uguali tra loro.

Si fa vedere che ciò porta come conseguenza che solo alcune categorie di forme sono possibili (quali l'icosaedro regolare, il prisma esagonale retto, ecc.) e che i volumi risultano in ogni caso quantizzati. Ne segue la possibilità di una « cristallografia » sistematica dei monostrati chiusi che permette di prevedere e classificare tutte le forme possibili.

Summary. — The particles of the same virus are all identical both in shape and size. The observed shapes are always polyhedral, sometimes regular. The uniformity and specificity of such a shape cannot be justified by any known model valid for natural solids, having a well defined shape, like crystals and molecules.

On the basis of the observations with the electron microscope, we propose a new model, which seems to explain satisfactorily the experimental results. According to such a model, the external shape of the virus particle would be essentially due to the external coat made up of protein molecules, forming a closed monolayer of strictly identical elements.

It is shown that, under these hypotheses, only some categories of shapes are possible (e.g. the regular icosahedron, the orthogonal hexagonal prism, etc.) and that the volumes are, in any case, quantized. It follows that it is possible to develop a real systematic « crystallography » of the closed monolayers which allows to foresee and classify all the possible shapes.

1. - Sono trascorsi ormai cinque anni da quando CRICK e WATSON (^{1, 2}) pubblicarono le prime considerazioni sulla forma dei virus. Da allora molto nuovo materiale sperimentale si è andato accumulando e di parecchi virus è ormai nota la forma con sufficiente precisione. Sembra quindi che sia giunto il momento di tentare di riformulare il problema su basi meglio definite e in parte nuove. E' necessario avvertire che ciò che diremo nel seguito riguarda esclusivamente quei virus, generalmente di piccole dimensioni, che sono dotati di una forma specifica.

In base ai risultati allora noti, Crick e Watson credettero di poter affermare che le particelle virali sono sempre o bastoncini o sfere e che le particelle di uno stesso virus sono esattamente uguali tra loro. Questa seconda conclusione ha ricevuto da allora numerose conferme ed è provata, oltre che dall'osservazione diretta al microscopio elettronico, soprattutto dal fatto che le particelle di un virus tendono spesso ad aggregarsi in reticoli regolari di tipo cristallino (fig. 1). La prima conclusione, invece, è senza dubbio smentita dall'esperienza. Le « sfere » di Crick e Watson si sono (com'essi del resto già sospettavano) rivelate poliedri e (ciò che è importante) ciascuna faccia del poliedro è piastrellata, per così dire, mediante un numero relativamente elevato di molecole proteiche: ciò risulta chiaramente visibile nelle micrografie elettroniche a grande potere risolutivo (^{3, 4}).

Cadono quindi le considerazioni mediante le quali Crick e Watson tentarono di giustificare le forme da loro considerate. Dal punto di vista matematico, infatti, il problema non è più quello di suddividere in parti uguali una superficie chiusa assegnata e di dimostrare che, nel caso per esempio della sfera, questo è possibile in un numero limitato di modi. Si tratta invece ora di dimostrare che solo alcune forme poliedriche sono possibili per le particelle virali e il fondamento della dimostrazione non può essere esclusivamente di carattere geometrico, ma potrà ritrovarsi solo nelle caratteristiche fisiche strutturali dei virus.

2. - Incominciamo con il riassumere brevemente le principali tra queste caratteristiche.

La microscopia elettronica conferma sostanzialmente il modello strutturale proposto da Crick e Watson. Una particella virale appare costituita da un nucleo centrale, essenzialmente di acido nucleico e da un rivestimento esterno, involucro o membrana, formato da molecole proteiche. La colorazione con uranil acetato mette in evidenza la distribuzione dell'acido nucleico (⁵) (fig. 2) e con la tecnica del freeze drying è possibile vedere contemporaneamente i due organelli, nucleo e tegumento esterno, e si vede che il nucleo ripete più in piccolo la forma geo-

metrica esterna della particella ⁽⁵⁾ (fig. 3). Si osservano spesso dei gusci, svuotati del loro contenuto di acido nucleico, che pur conservano sostanzialmente la forma esterna della particella integra ⁽⁶⁾ (figg. 4, 5).

D'altra parte, come abbiamo già detto, le fotografie a grande potere risolutivo fanno anche vedere che il rivestimento proteico è costituito da sub-unità di forma tondeggiante, probabilmente molecole, strettamente impaccate e costituenti un monostrato (fig. 6). La forma esterna « in grande » è quella di un poliedro a facce piane, talora regolare (es. icosaedro). Ciascuna faccia è però ricoperta da numerose unità proteiche strettamente addensate, sicchè l'aspetto complessivo è spesso quello di una mora.

Ci sono due fatti che particolarmente sorprendono. Il primo è che se si eseguono le preparazioni con particolare cura, in modo da non deformare le particelle del virus, non si osservano forme rotondeggianti: sembra, effettivamente, che per i virus di piccole dimensioni queste siano dovute soltanto ad artefatti. In particolare, non si osserva la forma sferica che pur dovrebbe essere fortemente favorita dalla tensione superficiale.

Il secondo fatto è la straordinaria indistinguibilità, nei limiti delle nostre possibilità osservative, tra le particelle di uno stesso virus. Per quanto semplicissimi, si tratta pur sempre di organismi, ma non vi è traccia di quella variabilità biologica che pur si osserva sempre nelle dimensioni e nelle forme di tutti gli organismi, anche di quelli appena più complessi di questi.

Una teoria della forma dei virus dovrà essere in grado di spiegare non solo *l'esclusiva presenza di certe forme poliedriche*, ma anche questa *estrema costanza delle dimensioni assolute*.

3. - Viene fatto innanzi tutto di chiedersi se, tra le categorie di oggetti naturali che noi già conosciamo, non ve ne sia qualcuna nella quale possano rientrare, per analogia di struttura, questi oggetti biologici di forma poliedrica.

Noi conosciamo due tipi di enti dalla forma geometricamente definita: i cristalli e le molecole. Esaminiamo quindi se i virus non possano rientrare in una di queste categorie.

Un cristallo è effettivamente (come un virus) un solido poliedrico limitato da facce piane. Vi sono però tra virus e cristalli delle differenze di carattere fondamentale. Ciò che caratterizza un cristallo è, com'è ben noto, solo il valore degli angoli diedri. Due cristalli reali della stessa specie possono differire tra loro moltissimo per la forma, il volume, l'estensione delle facce. Gli angoli diedri debbono essere ordinatamente

uguali, ma le facce possono venire arbitrariamente traslate parallelamente a loro stesse. Possiamo esprimere ciò sinteticamente, dicendo che un cristallo è un sistema che ha molti gradi di libertà: può accrescersi o diminuirsi in direzione perpendicolare a ciascuna faccia, senza per questo cessare di essere un cristallo di quella specie particolare.

Una particella virale invece è un sistema in cui tutti i gradi di libertà sono bloccati. Non solo gli angoli diedri sono fissati, ma sono fissati anche la forma complessiva, il volume, la estensione delle facce. Tale particella non può essere (dal punto di vista geometrico) costituita che in un solo modo e non può accrescersi o diminuirsi, senza ledere la sua specifica individualità.

Se poi passiamo a considerare gli elementi di simmetria presenti o possibili in un caso o nell'altro, troviamo altre dissimiglianze di carattere fondamentale. Per esempio, un cristallo non può presentare all'osservazione macroscopica un asse di simmetria quinario (perchè il piano non può essere suddiviso in pentagoni regolari). Viceversa, nei virus, gli assi quinari sono frequenti: gli adenovirus ad esempio hanno la forma di un icosaedro regolare, forma non possibile nella ordinaria cristallografia (³, ⁵).

Queste considerazioni sono, a quanto sembra, sufficienti per concludere che le particelle virali non hanno struttura cristallina nel senso corrente del termine. Esse cioè non possono essere costituite da subunità tutte uguali e che si ottengono l'una dall'altra per semplice traslazione.

D'altra parte ciò che oggi si conosce sulla struttura dei virus permette di escludere che ciascuna particella consista di una sola molecola. Si tratta, come abbiamo detto, di un aggregato organizzato di (un relativamente piccolo numero di) molecole, cioè di un organismo molto semplice, ma pur tuttavia di un organismo.

Escluso dunque che le particelle dei virus possano classificarsi tra i cristalli oppure tra le molecole, è necessario concludere che esse costituiscono una categoria a sè di solidi naturali con forma poliedrica e che noi non abbiamo finora alcun modello, mediante il quale si possa giustificare la costanza e la specificità di tale forma.

4. - Abbiamo tuttavia a nostra disposizione un certo numero di indizi che ci possono aiutare a costruire un modello, capace di dar ragione almeno delle principali tra le caratteristiche osservate. Tali indizi derivano essenzialmente dalle ricerche eseguite con la microscopia elettronica.

Come abbiamo già osservato, l'acido nucleico del virus e il tegu-



Fig. 1

Fig. 1 — Virus enterico di scimmia coltivato in cellule renali di scimmia. (Fotografia elettronica eseguita da Archetti, Bocciarelli e Toschi, Istituto Superiore di Sanità). Si vedono, all'interno del nucleo di una cellula, parecchi aggruppamenti ordinati di particelle virali. L'alternarsi della opacità nel passare da una fila di particelle alla fila adiacente è dovuta all'obliquità della sezione rispetto ai piani reticolari.

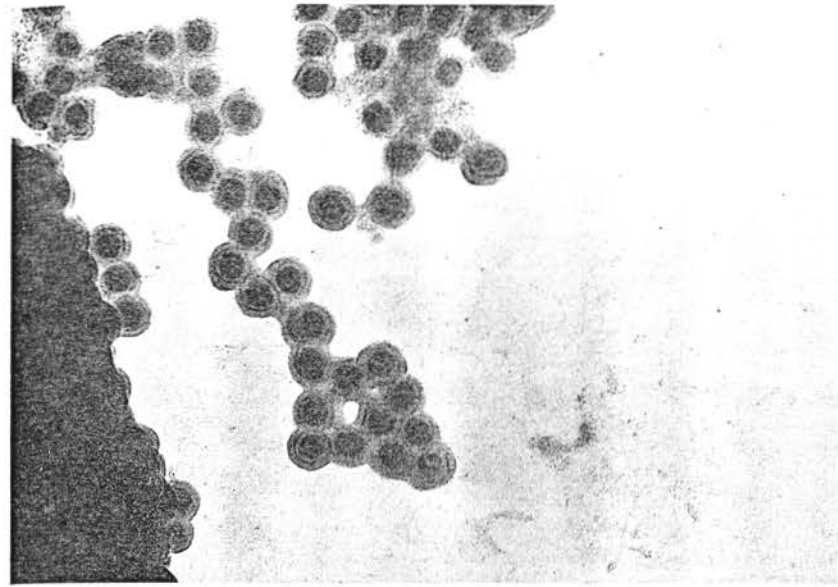


Fig. 2

Fig. 2 — Virus enterico di scimmia coltivato in cellule renali di scimmia. Colorazione con uranil acetato. (Fotografia elettronica eseguita da Archetti, Bocciarelli e Toschi, Istituto Superiore di Sanità). Sono chiaramente visibili il nucleo, più intensamente colorato, e il rivestimento proteico.

Fig. 3 — Virus enterico di scimmia coltivato in cellule renali di scimmia. Tecnica del freeze drying. (Fotografia elettronica eseguita da Archetti, Bocciarelli e Toschi, Istituto Superiore di Sanità). E' visibile il profilo esagonale dell'icosaedro ripetuto nel tegumento e nel nucleo.

Fig. 4 — Virus enterico di scimmia coltivato in cellule renali di scimmia. Colorazione negativa con acido fosfotungstico. (Fotografia elettronica eseguita da Archetti, Bocciarelli e Toschi, Istituto Superiore di Sanità). Sono visibili numerose particelle a profilo esagonale ed alcuni involucri, svuotati del loro contenuto, che mantengono la stessa forma.

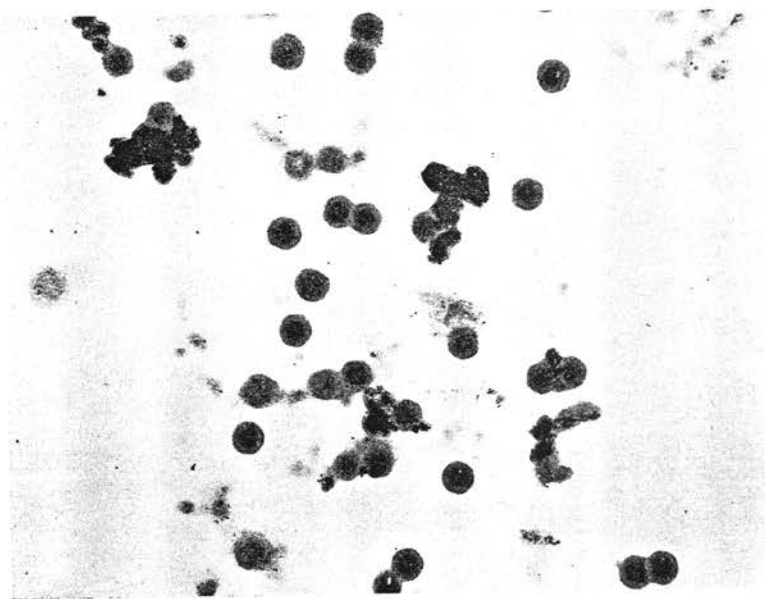


Fig. 3

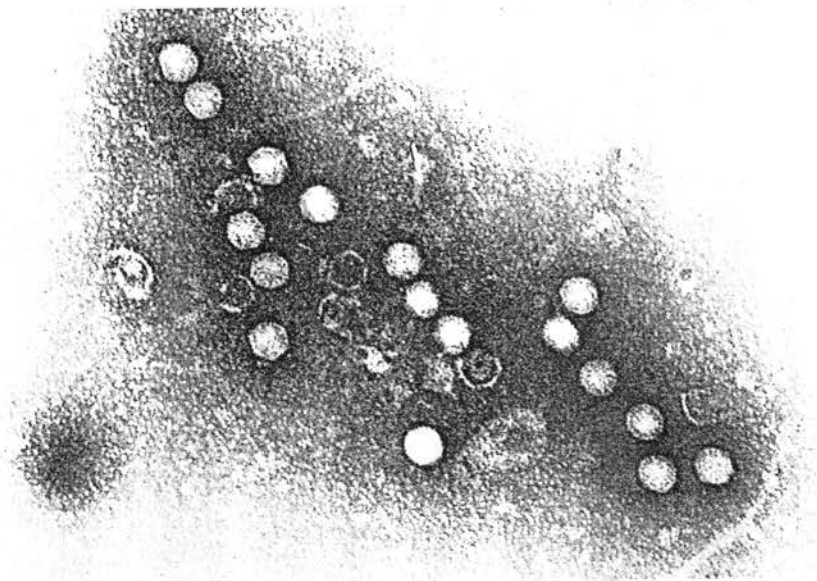


Fig. 4

Fig. 5 — Fago temperato α del B-megatherium. Colorazione negativa con acido fosfotungstico. (Fotografia elettronica eseguita da Aurisicchio, Chiozzotto A., Coppo, Donini, Frontali e Graziosi, Istituto Superiore di Sanità e Istituto di Microbiologia dell'Università di Roma). Anche qui sono visibili numerose particelle e alcuni involucri tutti a profilo esagonale.

Fig. 6 — Virus enterico di scimmia coltivato in cellule renali di scimmia. Colorazione negativa con acido fosfotungstico. (Fotografia elettronica eseguita da Archetti, Bocciarelli e Toschi, Istituto Superiore di Sanità). Si vedono le unità proteiche del rivestimento disposte con simmetria esagonale.

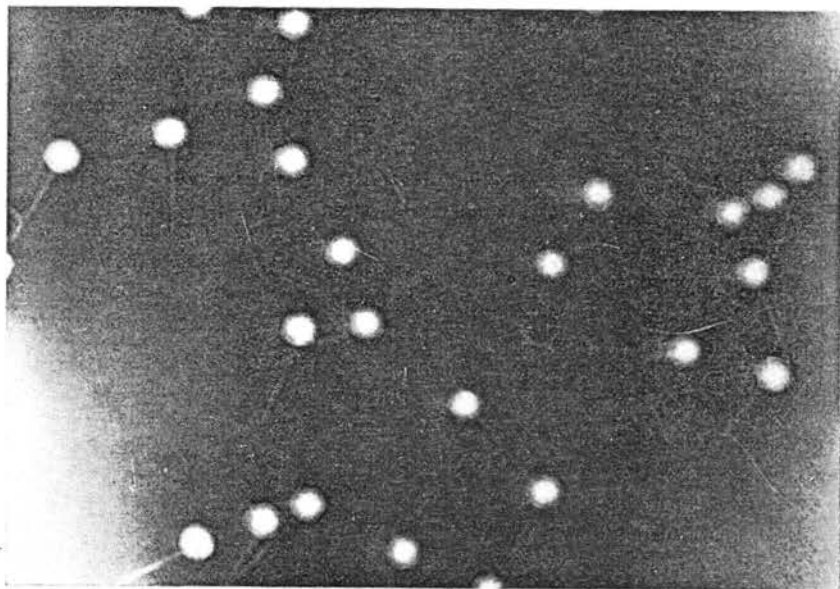


Fig. 5

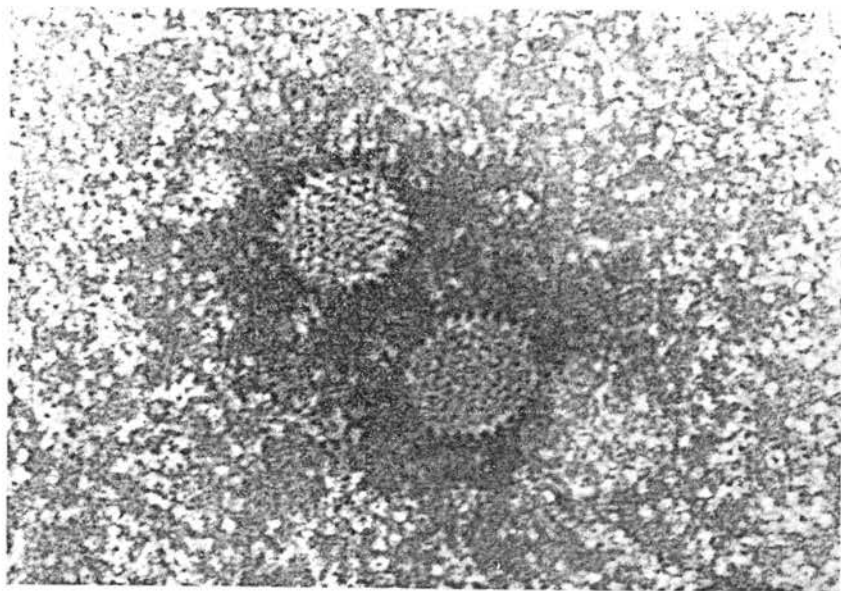


Fig. 6

Fig. 7 — Virus enterico di scimmia coltivato in cellule renali di scimmia. Colorazione con uranil acetato. (Fotografia elettronica eseguita da Archetti, Bocciarelli e Toschi, Istituto Superiore di Sanità). Da una particella virale, il cui involucro è rotto, fuoriesce il materiale nucleare.

Fig. 8 — Fago temperato α del B-megatherium, trattato con acqua ossigenata. Colorazione negativa con acido fosfotungstico. (Fotografia elettronica eseguita da Aurisicchio, Chiozzotto A., Coppo, Donini, Frontali e Graziosi, Istituto Superiore di Sanità e Istituto di Microbiologia dell'Università di Roma). Si vedono parecchi involucri totalmente o parzialmente svuotati del loro contenuto. Questo si vede talora in una masserella informe lungo la coda del fago.

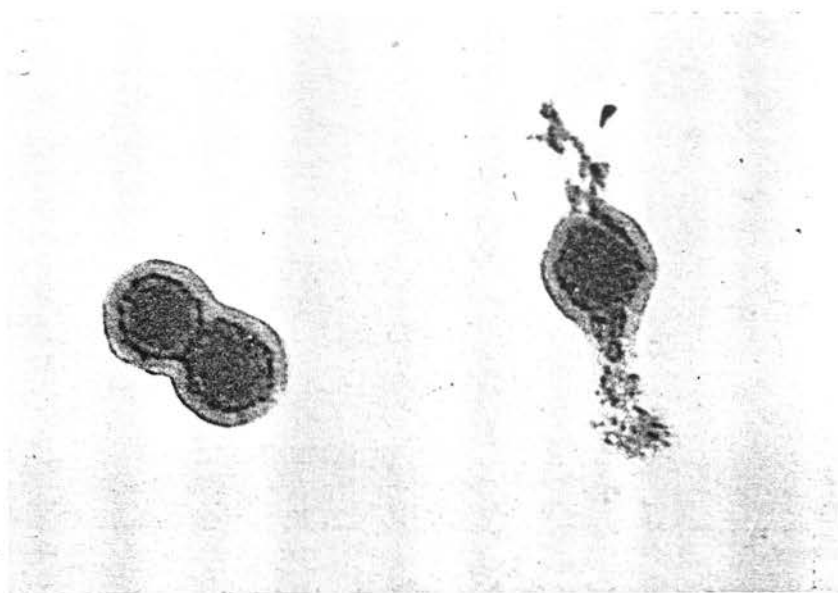


Fig. 7

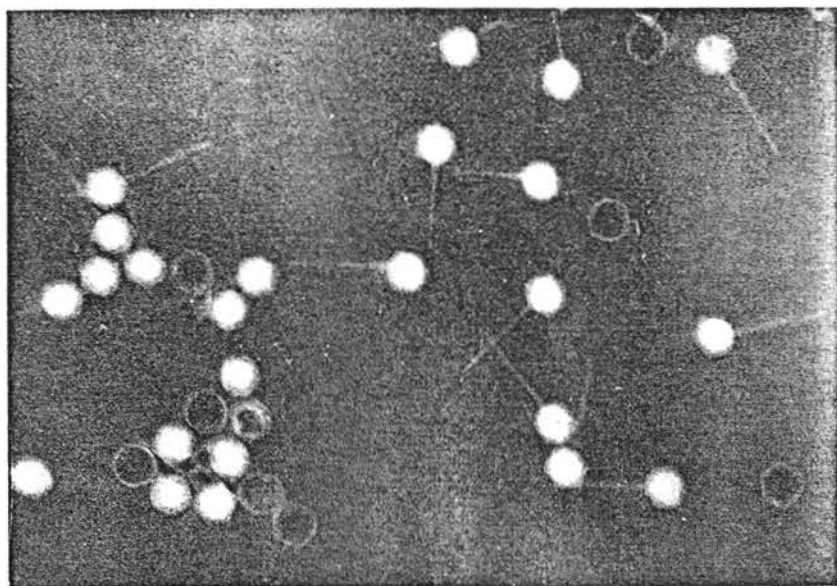


Fig. 8

Fig. 9 — Fago temperato α del B-megatherium. Colorazione negativa con acido fosfotungstico. (Fotografia elettronica eseguita da Aurisicchio, Chiozzotto A., Coppo, Donini, Frontali e Graziosi, Istituto Superiore di Sanità e Istituto di Microbiologia dell'Università di Roma). Si vedono alcuni involucri parzialmente svuotati del loro contenuto, oltre ai fagi integri e agli involucri totalmente svuotati.

Fig. 10 — Fago temperato α del B-megatherium. Colorazione negativa con acido fosfotungstico. (Fotografia eseguita da Aurisicchio, Chiozzotto A., Coppo, Donini, Frontali e Graziosi, Istituto Superiore di Sanità e Istituto di Microbiologia dell'Università di Roma). Quasi al centro del campo un involucro che mostra chiaramente le faccette triangolari dell'icosaedro. Si intravedono le unità proteiche del tegumento che sembrano essere sei lungo ogni spigolo.

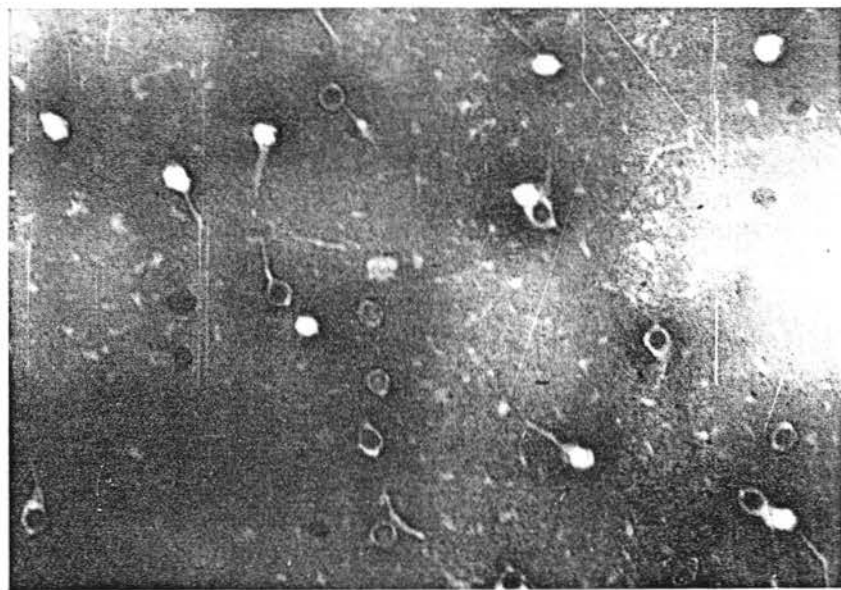


Fig. 9

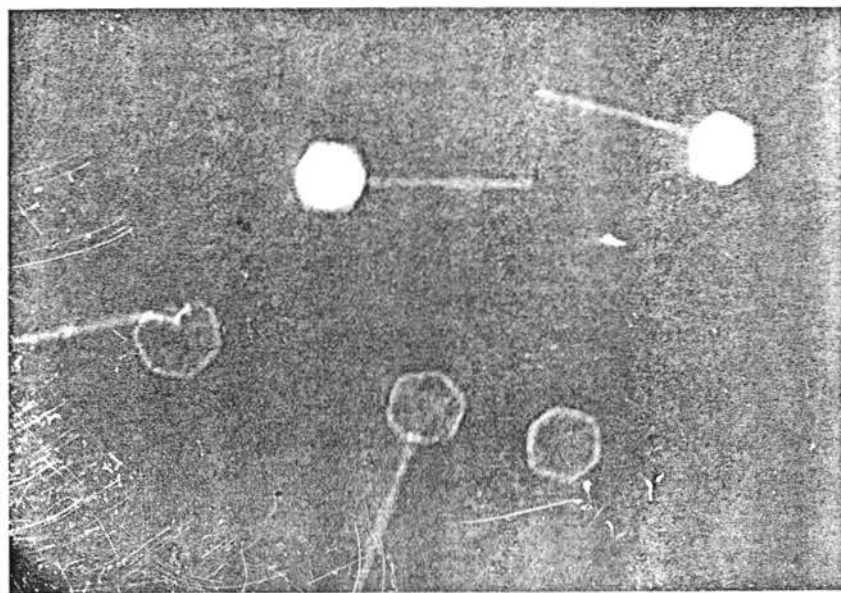


Fig. 10

uguali, ma le facce possono venire arbitrariamente traslate parallelamente a loro stesse. Possiamo esprimere ciò sinteticamente, dicendo che un cristallo è un sistema che ha molti gradi di libertà: può accrescersi o diminuirsi in direzione perpendicolare a ciascuna faccia, senza per questo cessare di essere un cristallo di quella specie particolare.

Una particella virale invece è un sistema in cui tutti i gradi di libertà sono bloccati. Non solo gli angoli diedri sono fissati, ma sono fissati anche la forma complessiva, il volume, la estensione delle facce. Tale particella non può essere (dal punto di vista geometrico) costituita che in un solo modo e non può accrescersi o diminuirsi, senza ledere la sua specifica individualità.

Se poi passiamo a considerare gli elementi di simmetria presenti o possibili in un caso o nell'altro, troviamo altre dissimiglianze di carattere fondamentale. Per esempio, un cristallo non può presentare all'osservazione macroscopica un asse di simmetria quinario (perchè il piano non può essere suddiviso in pentagoni regolari). Viceversa, nei virus, gli assi quinari sono frequenti: gli adenovirus ad esempio hanno la forma di un icosaedro regolare, forma non possibile nella ordinaria cristallografia (³, ⁵).

Queste considerazioni sono, a quanto sembra, sufficienti per concludere che le particelle virali non hanno struttura cristallina nel senso corrente del termine. Esse cioè non possono essere costituite da subunità tutte uguali e che si ottengono l'una dall'altra per semplice traslazione.

D'altra parte ciò che oggi si conosce sulla struttura dei virus permette di escludere che ciascuna particella consista di una sola molecola. Si tratta, come abbiamo detto, di un aggregato organizzato di (un relativamente piccolo numero di) molecole, cioè di un organismo molto semplice, ma pur tuttavia di un organismo.

Escluso dunque che le particelle dei virus possano classificarsi tra i cristalli oppure tra le molecole, è necessario concludere che esse costituiscono una categoria a sè di solidi naturali con forma poliedrica e che noi non abbiamo finora alcun modello, mediante il quale si possa giustificare la costanza e la specificità di tale forma.

4. - Abbiamo tuttavia a nostra disposizione un certo numero di indizi che ci possono aiutare a costruire un modello, capace di dar ragione almeno delle principali tra le caratteristiche osservate. Tali indizi derivano essenzialmente dalle ricerche eseguite con la microscopia elettronica.

Come abbiamo già osservato, l'acido nucleico del virus e il tegu-

mento proteico che lo ricopre appaiono all'osservazione della medesima forma. Senza dubbio, tutti i caratteri del virus, e quindi anche la sua forma e le sue dimensioni, hanno in definitiva la loro giustificazione nella struttura molecolare dell'acido nucleico specifico.

E' tuttavia lecito chiedersi se, dal punto di vista della rigidità meccanica, la permanenza della forma della particella virale sia dovuta al nucleo oppure al tegumento esterno. In altre parole: noi distinguiamo i due organelli e li vediamo della stessa forma, l'uno dentro l'altro. Le prime e più semplici ipotesi che si presentano alla mente sono allora le seguenti. O il nucleo è rigido ed ha una forma propria geometricamente definita e le sub-unità proteiche del tegumento si attaccano ad esso e lo rivestono come le piastrelle di maiolica di rivestimento di un muro. Oppure è il guscio proteico ad essere rigido e ad avere una sua forma geometricamente definita, mentre il nucleo costituisce una masserella cedevole che, quasi fosse un liquido molto vischioso, si adatta alla forma del recipiente proteico.

Naturalmente, molte altre ipotesi, meno semplici, sono pure possibili e la seconda di quelle ora enunciate non toglie affatto al nucleo la sua funzione orientatrice nella strutturazione della particella: la sintesi delle molecole proteiche specifiche che costituiscono il guscio si ritiene infatti indotta dall'acido nucleico.

Sembra che vi sia una qualche evidenza sperimentale in favore della seconda ipotesi. Le micrografie elettroniche mostrano ogni tanto una particella virale danneggiata nella quale il tegumento proteico è rotto in un punto. Da quel punto si vede allora uscire la materia nucleare ed essa ha l'aspetto di una masserella priva di forma propria, quasi fosse appunto un liquido fortemente vischioso (fig. 7). Aspetto analogo assume l'acido nucleico espulso artificialmente dai fagi (⁶) (fig. 8).

Mediante colorazione di contrasto con acido fosfotungstico è facile osservare dei tegumenti proteici completamente o parzialmente svuotati del loro contenuto (⁶) (figg. 9, 10): essi mantengono praticamente immutata la forma del virus intatto. Inoltre, l'ultracentrifugazione analitica mostra, con la tecnica dello schlieren, un picco definito attribuibile verosimilmente a queste particelle fantasma: esse sembrano quindi avere tutte la stessa massa, assai minore di quella delle particelle virali complete (⁶).

Viceversa, non sembra che si sia mai osservata una particella virale che abbia perduto almeno in parte il suo tegumento proteico e che abbia mantenuto almeno approssimativamente la sua forma originaria.

Riteniamo pertanto ragionevole ammettere, almeno come ipotesi di

lavoro, che dal punto di vista meccanico sia il guscio proteico ad assicurare alla particella virale la sua forma caratteristica.

5. - Rivolgiamo allora la nostra attenzione al tegumento proteico. Come abbiamo già detto, esso risulta costituito da sub-unità di forma rotondeggiante e apparentemente almeno tutte uguali tra loro, disposte in un solo strato e strettamente impaccate.

Nelle condizioni di massimo impaccamento, tutte le particelle proteiche, ad eccezione di quelle situate nei vertici del poliedro, toccano altre sei particelle. E' evidente che tra particelle contigue esistono dei legami e che questi legami (che permettono al guscio di permanere inalterato anche se svuotato del suo contenuto) debbono essere più robusti di quelli che legano ciascuna particella proteica all'acido nucleico.

E' certamente difficile comprendere, allo stato attuale, quale sia esattamente il meccanismo di formazione, attorno al precedente materiale nucleare, del tegumento proteico, con la sua forma e le sue dimensioni specifiche. Sembra ragionevole escludere che le molecole proteiche vengano sintetizzate in loco. Porta ad escluderlo se non altro il Phenotypic mixing (^{7, 10}), che dimostra come le proteine specifiche possano unirsi a materiale nucleare di una particella virale geneticamente diversa da quella che ha determinato la loro specificità.

Si può forse supporre che su tutta la superficie esterna del materiale nucleare vi siano numerosissimi punti ove una molecola proteica si può attaccare: in una prima fase, le proteine specifiche si attaccherebbero quindi all'acido nucleico raggomitolato, come su di una superficie appiccaticcia, realizzando un monostrato a massimo impaccamento. Solo in una seconda fase si stabilirebbero dei robusti legami tra sub-unità proteiche adiacenti. Si spiegherebbe così come mai il guscio risulti meccanicamente più rigido e stabile del contenuto. Questa ipotesi spiegherebbe anche le osservazioni di KELLENBERGER et al. (¹¹), secondo cui particelle virali già formate si dissolvono, se si provoca la lisi della cellula che le contiene immediatamente dopo la loro formazione, mentre permangono se la lisi è provocata dopo un tempo sufficiente. Quanto alla natura delle forze tra sub-unità proteiche e tra queste e il nucleo, poco possiamo dire. E' tuttavia certo che le forze tra sub-unità sono forze a raggio di azione molto breve, in confronto alle dimensioni di queste ultime. E' quindi lecito ammettere che le sub-unità proteiche, in quanto molecole singole, si comportino come sferette rigide che possono stabilire un legame tra loro solo quando vengono effettivamente a contatto. La massima energia di legame e quindi la massima rigidità del tegumento si avrà quando il numero dei legami tra particelle proteiche

è massimo, cioè quando la disposizione di tali particelle nel monostrato è quella di massimo impaccamento. Infine, il tegumento dovrà, in genere, realizzare un contenitore completamente chiuso.

Riassumendo quanto abbiamo detto, sembra che il tegumento proteico di una particella virale possa essere pensato come un monostrato di unità molecolari dotato delle seguenti proprietà:

- a) ciascuna unità si comporta come una particella rigida;
- b) le unità adiacenti sono direttamente a contatto tra loro e il loro ordinamento nel monostrato è quello di massimo impaccamento;
- c) il monostrato realizza un contenitore chiuso.

6. - *E' facile vedere che queste tre condizioni bastano da sole a imporre una restrizione molto severa alle forme possibili per una particella virale. Solo alcune categorie di forme, geometricamente ben definite, risultano realizzabili ed anche per queste i volumi risultano, per così dire, quantizzati.*

Si vede inoltre facilmente che è possibile sviluppare una vera e propria cristallografia sistematica dei monostrati chiusi, ottenendo una categoria di enti dalle proprietà geometriche simili a quelle finora osservate nei virus.

Naturalmente, non è possibile, per ora, affermare che proprio questo sia il meccanismo responsabile della forma dei virus. E' anzi necessario mettere in evidenza che non c'è per ora un materiale sperimentale sufficiente a sostegno di questa ipotesi. La presentiamo quindi soltanto come una base di discussione: solo una indagine sistematica sufficientemente estesa potrà mostrare se le forme che si incontrano in natura siano effettivamente quelle previste dalla cristallografia dei monostrati.

In ciò che segue, non svilupperemo una vera e propria sistematica, la cui esposizione rimandiamo ad altra sede, ma ci limiteremo a giustificare le affermazioni precedenti, portando alcuni semplici esempi.

Incominciamo con lo schematizzare drasticamente il nostro problema supponendo le particelle proteiche tutte uguali tra loro e di forma esattamente sferica. Si potrà poi eventualmente, in un secondo tempo, tentare di liberarsi da queste ipotesi restrittive, introducendo per esempio due o più specie di particelle di forma diversa. E' però da osservare che quanto più si complica la situazione, tanto più difficile risulta soddisfare le condizioni di contatto e di chiusura: al limite, queste non potranno essere soddisfatte altro che in casi estremamente singolari e allora nessuna sistematica è più possibile.

Immaginiamo di appoggiare delle sferette tutte uguali su di una generica superficie convessa. Il numero massimo di sferette con cui una sferetta data può venire a contatto è sei. Ciò può verificarsi solo su di una superficie piana, oppure su di una superficie cilindrica. Se la superficie è a doppia curvatura, per esempio sferica (di raggio maggiore di quello della sferetta) non è invece possibile disporre su di essa una sferetta che ne tocchi contemporaneamente altre sei. Ora, una superficie piana, o cilindrica, non soddisfa ovviamente alla condizione di chiusura. E' quindi necessario che almeno ogni tanto una sferetta sia circondata da un numero N di altre sferette, inferiore a sei: solo a queste condizioni si può realizzare un monostrato chiuso. Ma allora, il punto del monostrato ove $N < 6$ è un punto singolare: esso è il vertice di un poliedro.

Ciò spiega, intanto, come non si conoscano virus di piccole dimensioni di forma sferica (o più in generale di forma rotondeggiante) mentre ci si aspetterebbe, a priori, che questa forma, fortemente favorita dalla tensione superficiale, sia la più frequente.

Vi sono tre tipi fondamentali di vertici, nei monostrati: quelli con $N = 5$, o $N = 4$ e un terzo tipo derivato dal caso $N = 3$. Infatti, nel caso $N = 3$ la sferetta che dovrebbe trovarsi nel vertice viene a mancare. Le altre tre, a due a due in contatto tra loro, la isolerebbero completamente dal nucleo. Essa quindi non potrebbe stabilire un legame con quest'ultimo.

Consideriamo a titolo di esempio il caso $N = 5$ e supponiamo che le cinque sferette a contatto con quella centrale siano disposte sui vertici di un pentagono regolare. Ciò che allora si ottiene è un vertice di icosaedro regolare e l'icosaedro può essere completato fino alla chiusura, ponendo lungo ogni spigolo un numero n qualsiasi di sferette ($n = 2, 3, \dots$). Calcoliamo il numero totale di sferette nel monostrato completo. Si hanno 12 sferette nei 12 vertici dell'icosaedro. Su ognuno dei 30 spigoli vi sono poi $(n - 2)$ sferette che non cadono nei vertici e su ciascuna delle 20 facce triangolari vi sono $\frac{1}{2} (n - 2) (n - 3)$ sferette che non cadono nè nei vertici nè sugli spigoli. In totale, per formare il monostrato icosaedrico del tipo qui considerato sono dunque necessarie:

$$\frac{1}{2} (n - 2) (n - 3) \cdot 20 + (n - 2) \cdot 30 + 12 = 10 (n - 1)^2 + 2 \quad (1)$$

sferette.

Si potrebbe vedere facilmente che l'icosaedro regolare è, tra le forme possibili, quella che più si avvicina alla forma sferica. Essa è dun-

que la più favorita dalla tensione superficiale e ciò spiega come, nonostante la sua complessità, essa sia così frequente.

Un'altra forma possibile, appartenente a una categoria di monostrati diversa dalla precedente, è quella del prisma esagonale retto. Anche essa corrisponde a $N = 5$, ma le cinque palline a contatto con quella che individua il vertice non formano un pentagono regolare. Le due basi del prisma sono esagoni equiangoli, ma non necessariamente equilateri. Consideriamo il caso in cui lungo ciascuno spigolo delle basi si ha una fila di sferette a contatto tra loro. Valutiamo anche qui il numero totale di sferette necessario a realizzare il monostrato.

Siano n_1, n_2, n_3 i numeri di sferette lungo i tre spigoli disuguali di una base. Il perimetro di queste comprende allora:

$$2(n_1 + n_2 + n_3) - 6 \quad (2)$$

sferette e su ciascun esagono di base se ne hanno in totale:

$$n_1 n_2 + n_2 n_3 + n_3 n_1 - n_1 - n_2 - n_3 + 1 \quad (3)$$

Sulla superficie laterale del prisma, le sferette sono disposte lungo piani paralleli alle basi. Vi sono però due specie di piani, quelli che hanno una sferetta su ciascuno spigolo laterale, come le basi, e quelli intermedi che non hanno sferette su tali spigoli. Se n_4 è il numero di sferette (non a contatto tra loro) lungo ciascuno spigolo laterale, il numero delle sferette che ricoprono il mantello del prisma e non appartengono alle basi è pari a $(2n_4 - 1)$ volte il numero delle sferette lungo il perimetro di una base. Quindi, in totale il numero delle sferette che costituiscono il monostrato è dato dalla espressione:

$$2(n_1 n_2 + n_2 n_3 + n_3 n_1 - n_1 - n_2 - n_3 + 1) + 2(n_1 + n_2 + n_3 - 3)(2n_4 - 1) \quad (4)$$

Se l'esagono di base è regolare ($n_1 = n_2 = n_3 = n$) la formula si riduce a:

$$2(3n^2 - 3n + 1) + 6(n - 1)(2n_4 - 1) \quad (5)$$

Si osservi che le sferette disposte sulla superficie laterale del prisma esagonale qui considerato appaiono disposte a spirale. Ciò corrisponde a quanto è stato osservato in taluni virus vegetali aventi appunto la forma di bastoncelli a sezione esagonale ^(12, 13).

Un'altra forma compatibile con le condizioni da noi considerate è il prisma pentagonale regolare retto, terminato da due piramidi pentagonali. La bipiramide esagonale non è invece una forma possibile. Da questo punto di vista, sarebbe interessante esaminare meglio la forma

dei fagi pari della serie T, ai quali sulla base di evidenze incomplete viene generalmente attribuita la forma di un prisma esagonale terminante in due piramidi esagonali ⁽¹⁴⁾.

7. - Una delle conseguenze più importanti delle considerazioni precedenti riguarda le dimensioni che un monostrato di determinata forma può assumere. Come abbiamo già accennato, il volume racchiuso dal monostrato risulta sempre quantizzato.

Consideriamo, a titolo di esempio, il caso di un virus di forma icosaedrica. Siccome le dimensioni delle proteine specifiche del virus sono fissate, è effettivamente possibile tutta una serie di icosaedri di dimensioni via via crescenti, che differiscono tra loro per il numero n di unità proteiche lungo uno spigolo dell'icosaedro. Il volume a disposizione dell'acido nucleico varia, lungo questa serie, press'a poco come $(n - 2)^3$. Al crescere di n si hanno dunque per ciò che riguarda il tegumento proteico, volumi possibili per il nucleo che stanno tra loro come i numeri:

$$1, 8, 27, 64, 125, \dots$$

Non solo il volume risulta quantizzato, ma le differenze tra ciascun volume e il successivo sono molto notevoli.

Ciò spiega come mai le particelle di un determinato virus risultino tutte rigorosamente uguali tra loro. Infatti, non bisogna dimenticare che la massa dell'acido nucleico non è neppure essa una variabile continua. Il nucleo della particella virale sarà in generale costituito da una sola molecola o, al più, da un assai piccolo numero di molecole. Indicando con V_n il volume a disposizione entro il guscio avente n particelle proteiche per lato, con u il volume di una molecola di acido nucleico e con r il numero delle molecole di quest'ultimo per particelle di virus, dovrà aversi:

$$V_n \simeq r u \quad (6)$$

Anche ammettendo che questa relazione non possa essere interpretata in modo troppo rigoroso, tuttavia, siccome n ed r sono certamente numeri molto piccoli e V_n varia, come si è detto, molto fortemente quando n aumenta di una unità, si avrà in generale al più una sola coppia di valori $\bar{n}$ ed $\bar{r}$ per cui essa è sufficientemente soddisfatta. Si capisce quindi come tutte le particelle di uno stesso virus risultino identiche e non vi sia traccia di quelle variabilità di dimensioni che si osserva negli organismi più complessi.

Del resto, è da osservare che non è affatto escluso che la (6) possa essere soddisfatta altrettanto bene da due coppie diverse di valori di n e r . Noi allora osserveremmo particelle virali di due differenti dimensioni mescolate assieme. Probabilmente saremmo in un primo tempo indotti a ritenere che si tratti di due virus differenti. Solo un accurato controllo della identità dei caratteri biologici delle due forme potrebbe portarci a concludere che si tratta di un unico virus.

Si presenta ora un'ultima questione di carattere fondamentale. Se le idee qui svolte hanno una qualche attinenza con la realtà; perchè i virus non sono tutti della stessa forma? Perchè non hanno tutti ad esempio la forma icosaedrica che, come si è detto, è certamente molto favorita dalla tensione superficiale?

Non è certamente possibile rispondere ora esaurientemente a questa domanda. Probabilmente, vi sono parecchie cause che influenzano la scelta della forma. Innanzi tutto, la (6) potrebbe non avere nessuna soluzione per la forma icosaedrica ed averne una, invece, ad esempio per la forma prismatica esagonale. In secondo luogo, è pensabile che vi siano delle limitazioni relativamente all'orientazione spaziale dei legami che si possono stabilire tra particelle proteiche specifiche contigue. Ciò avrebbe evidentemente una diretta influenza sulla scelta della forma.

Anche se queste limitazioni dovessero non esistere, sembra tuttavia improbabile che uno stesso virus possa assumere due forme distinte: una di esse infatti sarà sempre più favorita dalla tensione superficiale che non l'altra.

In conclusione, il modello qui proposto risulta basato in modo essenziale sulla ipotesi che sia il tegumento proteico a condizionare, dal punto di vista geometrico e meccanico, le forme a priori possibili per le particelle di un virus, mentre il volume nucleare, l'orientazione dei legami possibili tra particelle proteiche contigue e la tensione superficiale determinerebbero la scelta della forma specifica.

Desidero infine ringraziare vivamente il prof. Franco Graziosi per le lunghe, interessanti discussioni su questo argomento e per i numerosi consigli e suggerimenti, nonchè per avermi consentito il libero accesso alle sue micrografie elettroniche. Altrettanto vivamente ringrazio per quest'ultimo motivo il prof. Archetti, la prof. Bocciarelli Steve e il dr. Toschi.

BIBLIOGRAFIA

- (1) CRICK F. H. C. e WATSON J. D. - *Nature*, 177: 473 (1956).
 - (2) CRICK F. H. C. e WATSON J. D. - « The nature of viruses » Ciba Foundation Symposium, J. and A. Churchill, London (1957).
 - (3) HORNE R. W., BRENNER S., WATERSON A. P. e WILBY P. - *J. mol. Biol.*, 1: 84 (1959).
 - (4) ARCHETTI I., STEVE BOCCIARELLI D. e TOSCHI G. - Questo fascicolo e *Virology*, in corso di stampa.
 - (5) ARCHETTI I., STEVE BOCCIARELLI D. e TOSCHI G. - European Regional Conference on Electron Microscopy, Delft 1960, Atti - in corso di stampa.
 - (6) AURISICCHIO S., CHIOZZOTTO A., COPPO A., DONINI P., FRONTALI C. e GRAZIOSI F. - *Nuovo Cimento, Suppl.*, in corso di stampa.
 - (7) DELBRUCK M. e BAILEY W. T. - *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 11: 33 (1946).
 - (8) NOVICK A. e SZILARD L. - *Science*, 113: 34 (1951).
 - (9) STREISINGER G. - *Virology*, 2: 388 (1956).
 - (10) BRENNER S. - *Virology*, 3: 560 (1957).
 - (11) KELLENBERGER E., SÉCHAUD J. e RYTER A. - *Virology* 8: 478 (1959).
 - (12) WILLIAMS R. C. - *Bioch. bioph. Acta*, 8: 227 (1952).
 - (13) MATTEWS R. E. F., HORNE R. W. e GREEN E. M. - *Nature*, 178: 135 (1956).
 - (14) ANDERSON T. F., RAPPAPORT C. e MUSCATINE N. A. - *Le Bactériophage Premier Colloque International*, Royaumont, pag. 5 (1952).
-

90. I. ARCHETTI, D. STEVE-BOCCIARELLI e G. TOSCHI. — Studio al microscopio elettronico dello sviluppo e della struttura di un virus enterico della scimmia.

Riassunto. — Colture primarie di cellule epiteliali di rene di scimmia sono state infettate con dosi massive di virus SV39, quindi prelevate a tempi diversi (dopo 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 48 ore dall'infezione), incluse in resine acriliche e osservate in sezioni al microscopio elettronico. Sono state così seguite le alterazioni morfologiche delle cellule e le fasi progressive dello sviluppo del virus.

Il virus ha origine intranucleare, comincia a mostrarsi alla sedicesima ora e si forma da caratteristici addensamenti che vengono a costituirsi nella matrice nucleare. Verso la ventesima ora si cominciano a vedere nei nuclei degli aggregati di particelle virali a gruppi che spesso sono disposti ordinatamente, quasi a formare strutture cristalline. Circa alla trentaduesima ora l'azione citopatica del virus ha raggiunto il suo massimo e le cellule ormai sono disfatte: il virus è sparso irregolarmente nel nucleo, nel citoplasma e nel liquido ambiente.

La struttura delle particelle virali è stata studiata sia sulle sezioni delle cellule infettate osservate a forti ingrandimenti, sia sul virus isolato e purificato, preparato con tecniche diverse.

Il virus maturo, completo, si presenta in forma poliedrica, provvisto di un nucleo centrale pure poliedrico, avente densità maggiore del mantello esterno. Il diametro esterno è da 700 a 800 Å, quello del nucleo da 450 a 500 Å.

La superficie del virus, che è quella di un icosaedro, è costituita di elementi tondeggianti (subunità) disposti con simmetria esagonale, aventi diametro apparente da 50 a 60 Å e distanti 80 Å da centro a centro. La disposizione delle subunità sulla superficie dell'icosaedro sembra differire da quella già trovata da altri AA. per un adenovirus umano.

Le subunità, che presumibilmente sono molecole proteiche e che si valuta abbiano peso molecolare dell'ordine di 100.000, si presentano spesso come dispiegate sia sulla superficie del virus, sia sparse in gran numero sul fondo del preparato.

Summary. — Monkey kidney cells grown « in vitro » were infected with a large amount of SV39 virus, then prepared for electronmicroscopic observation at 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 48 hours after infection. It was then possible to follow the development of the virus and the sequence of changes in the infected cells.

The virus has an intranuclear origin, appears after 16 hours, and is formed from dense reticular aggregates which are seen in the nuclear matrix from about the 12th hour. After 20 hours a great number of virus particles may be seen in orderly arrays (« crystals ») or in irregular clusters; after 32 hours it is possible to see viruses going through the disrupted nuclear membrane into the cytoplasm, and from there outside the cell membrane.

The fine structure of the virus particle itself has been examined both in sections under large magnification and in purified free virus preparations. The complete virus has polyhedral shape and a central core denser than the outer coat. The external diameter is from 700 to 800 Å and the central core from 450 to 500 Å. The surface of the particle is an icosahedron built from globular elements (subunits) disposed with six-fold symmetry, 30-60 Å in diameter and 80 Å from center to center. The distribution of the subunits on the icosahedron surface seems unlike that found by other authors in an human adenovirus.

Gli studi fatti negli ultimi anni con il microscopio elettronico hanno rivelato di quanta utilità possa essere questo strumento nell'indagine morfologica dello sviluppo dei virus e nella ricerca delle fini strutture degli elementi virali.

L'isolamento dalle feci di una scimmia (*Macaca mulatta*), morta con paralisi del treno posteriore, di un virus enterico appartenente al gruppo 1 stabilito da HULL e MINNES⁽¹⁾, ha offerto la possibilità di studiare da vicino questo agente che è un tipo nuovo, chiamato SV39 (*). Il piano di ricerche comprende anche una parte biologica, di cui si daranno in questo lavoro solo pochi accenni, mentre invece verranno illustrati con maggiore dettaglio e maggiore ampiezza i risultati ottenuti con il microscopio elettronico.

Come era già stato fatto notare da HULL e MINNES⁽¹⁾, l'effetto citopatico dei virus di questo gruppo sulle cellule sensibili coltivate *in vitro* è molto simile a quello degli adenovirus dell'uomo. L'importanza di questi virus, scoperti abbastanza di recente, nello studio dei problemi fondamentali riguardanti la funzione virale è già stata messa in evidenza da BURNET⁽²⁾.

Osservazioni fondamentali con il microscopio elettronico sullo svi-

(*) La determinazione del ceppo è stata fatta dal Dr. R. Hull della Lilly Co., Indianapolis, Indiana (U.S.A.): ci è grato ringraziarlo anche da queste pagine.

luppo *in vitro* di vari tipi di adenovirus umani e sulla loro struttura sono già state riportate nella letteratura: ricordiamo quelle di MORGAN et al. (3, 4), di LAGERMALM et al. (5), di VALENTINE (6), di TYRREL et al. (7), di HORNE et al. (8). Avvantaggiandoci delle esperienze fatte da questi Autori, abbiamo studiato il ciclo di sviluppo di SV39 nelle sezioni ultrasottili di cellule epiteliali di rene di scimmia, coltivate *in vitro* ed infettate con questo virus e abbiamo inoltre approfondito l'esame della morfologia grossolana e più minuta delle particelle virali isolate e purificate con metodi diversi.

L'interesse principale della nostra ricerca era quello di seguire le fasi dello sviluppo del virus, particolarmente durante il periodo iniziale dell'infezione, così da poter cogliere, se possibile, il primo apparire del virus nell'interno della matrice nucleare e ottenere delle informazioni nuove sul costituirsi delle particelle virali in quello speciale momento che corrisponde alla riunione dell'acido nucleico con le proteine neoformate.

Lo studio delle particelle virali isolate e purificate aveva invece lo scopo essenziale di rivelare l'effettiva morfologia delle singole unità dell'agente e di metterne in evidenza la struttura elementare. La descrizione dei risultati ottenuti costituisce l'argomento di questo lavoro.

MATERIALI E METODI

VIRUS. — Per infettare le cellule, con le quali sono state preparate le inclusioni per l'esame al microscopio elettronico, venne usata una sospensione particolarmente concentrata di virus, mentre per infettare le cellule dalle quali è stato ottenuto il materiale da purificare venne normalmente impiegato un virus « seed » proveniente dal terzo passaggio del ceppo originale in cellule di rene di scimmia e conservato come stock a -23° C.

COLTURE DI TESSUTO. — Sono state adoperate esclusivamente cellule epiteliali di rene di scimmia rhesus (*Macaca mulatta*), ricavate per tripsinizzazione secondo la tecnica ormai abituale in quasi tutti i laboratori di virologia e derivata dal metodo originale di YOUNGNER (9). Le cellule così disperse vennero cresciute e mantenute nei terreni alla lattalbumina consigliati da MELNICK (10), in bottiglie di Roux o in fiaschette di Kolle.

MICROSCOPIA ELETTRONICA. — La fissazione delle cellule da esaminare in sezione e tutti i passaggi sino all'inclusione in prepolimero, ven-

nero effettuati nelle fiaschette di Kolle, per evitare che le cellule venissero in qualche modo deteriorate dalle numerose centrifugazioni altrimenti necessarie. Praticamente si procedeva in questo modo: eliminato il liquido di coltura, si prefissavano le cellule in una soluzione di OsO_4 al 0,25% in tampone di PALADE ⁽¹¹⁾, lasciando agire il fissativo per 1/4 d'ora; seguiva poi la fissazione in OsO_4 all'1%, sempre in tampone di PALADE, per 1 ora. La disidratazione veniva fatta attraverso una scala di diluizioni di alcool etilico, partendo dall'alcool a 70% sino a quello assoluto. Per l'inclusione si passava dall'alcool assoluto all'acetone assoluto, quindi a una soluzione di resine acriliche (butilmetacrilato con 5% di metilmetacrilato) ed acetone al 50% e poi in resine senza catalizzatore, che venivano lasciate a contatto con le cellule per 12 ore, mentre i tempi dei passaggi precedenti variavano dai 10 ai 30 minuti. Dopo questo lungo contatto con le resine senza catalizzatore, si versavano nella fiaschetta le resine con catalizzatore e dopo circa 1 ora si otteneva il distacco delle cellule dalla parete di vetro mediante una spatolina di platino. Le cellule così raccolte venivano centrifugate a bassa velocità ed il sedimento così ottenuto veniva introdotto insieme con il prepolimero nella appropriata capsula di gelatina; la polimerizzazione si otteneva in stufa a 48° C. Le sezioni venivano appoggiate sulle normali reticelle porta oggetto e ricoperte di un leggero film di carbonio. Allo scopo di ottenere un miglior contrasto e una migliore risoluzione della morfologia del virus, si sono anche colorate le sezioni con acido fosfotungstico all'1% e acetato di uranile al 0,5% in parti uguali, secondo WOHLFART-BOTTERMANN ⁽¹²⁾. La colorazione è stata fatta sulle sezioni già montate sulla reticella porta oggetti, ponendola nella soluzione di cui sopra a faccia in giù, come consigliato da GIBBONS e BRADFELD ⁽¹³⁾ e WATSON ⁽¹⁴⁾.

I virus purificati, trattati con acido osmico o con acetato di uranile o preparati col metodo del freeze-drying ⁽¹⁵⁾, oppure colorati negativamente con il fosfotungstato (PTA), secondo BRENNER e HORNE ⁽¹⁶⁾, venivano posti su pellicola di formvar ricoperta da un leggero strato di carbonio oppure su film di solo carbonio. Allo scopo di ottenere film di solo carbonio assai resistenti, abbiamo anche usato pellicole di formvar bucherellate, secondo il metodo di SJÖSTRAND ⁽¹⁷⁾, modificato in modo da ottenere una distribuzione più continua ed uniforme di zone utili.

PREPARAZIONE E PURIFICAZIONE DEL VIRUS. — Per l'osservazione al microscopio elettronico si sono usate anche preparazioni purificate di virus, ottenute con diversi procedimenti.

Il materiale della coltura veniva inizialmente centrifugato a $6000 \times g$

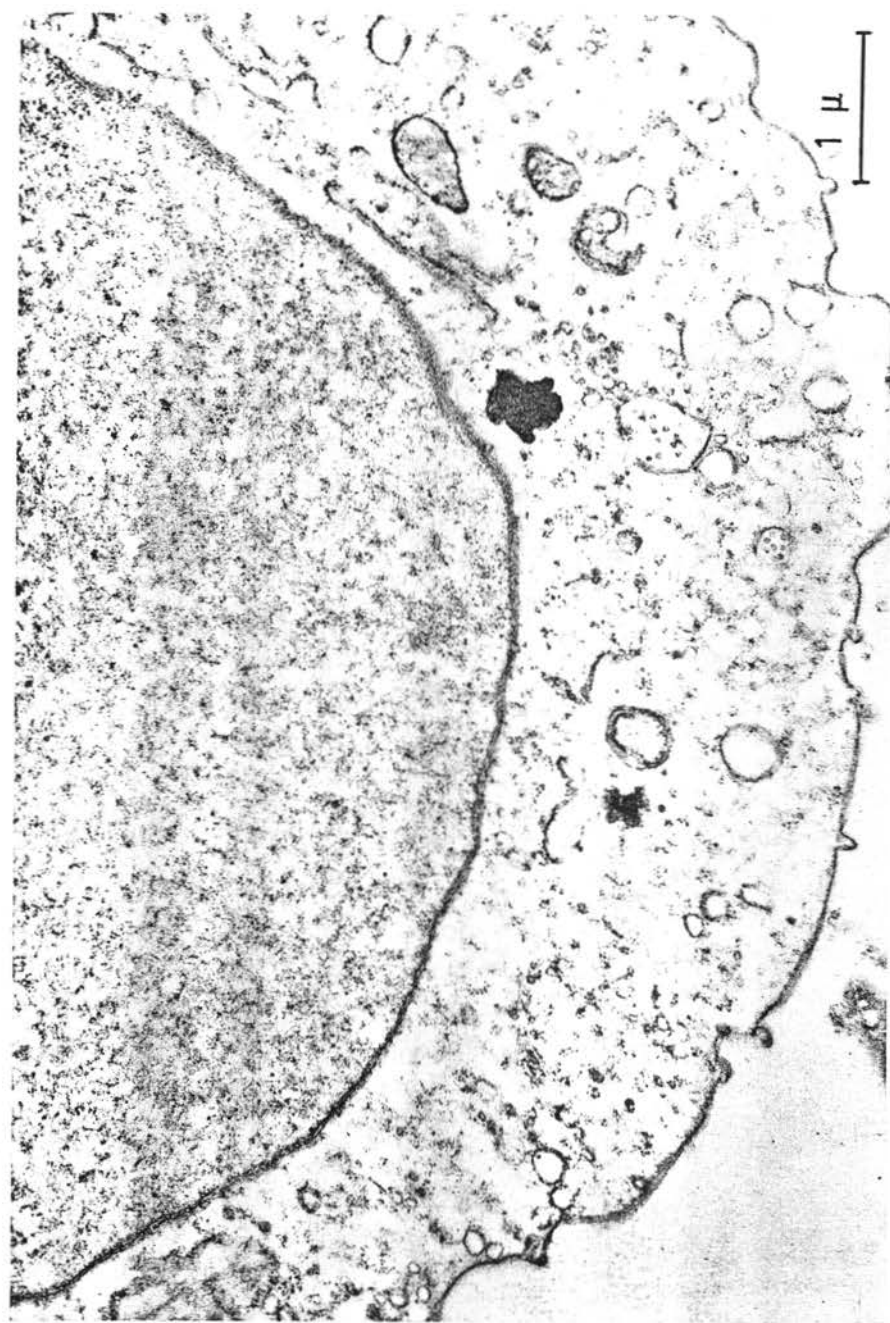


Fig. 1 - Nucleo normale di cellula non infettata: si scorge bene la doppia membrana nucleare. Nel citoplasma ci sono alcuni mitocondri e due masse lipidiche.

Fig. 2 - Nucleo dopo 12 ore dall'infezione della cellula con SV₃₉. Non si vedono elementi virali; la trama nucleare non è più così omogenea come nel nucleo normale.

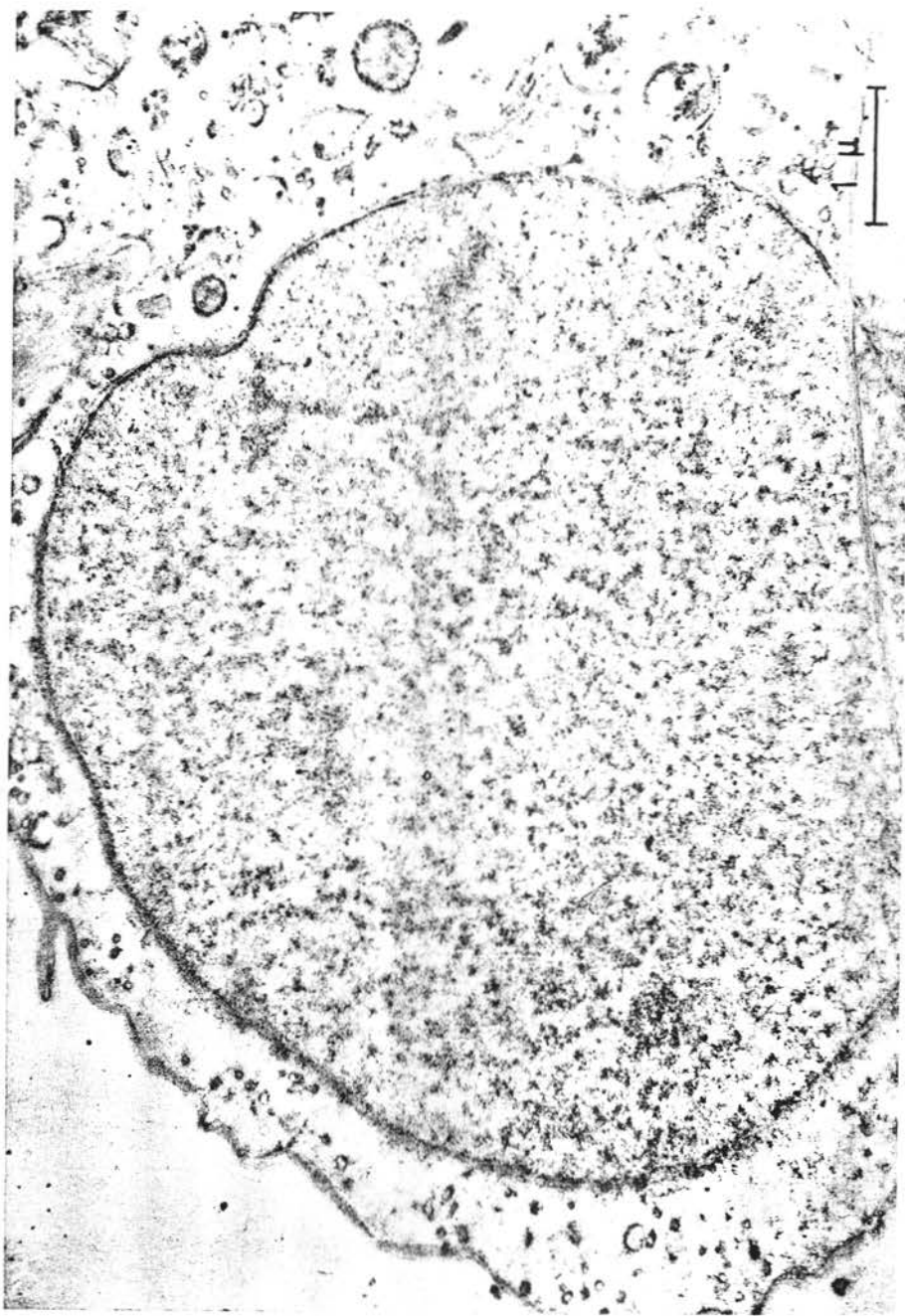


Fig. 2

Fig. 3 - Porzione di nucleo dopo 16 ore dall'infezione. Si vedono alcune particelle virali, alcuni corpi globoidi e degli aggregati di matrice virale.



Fig. 3

Fig. 4 - Come Fig. 3. Si scorgono le zone vacuolari poste alla periferia del nucleo.

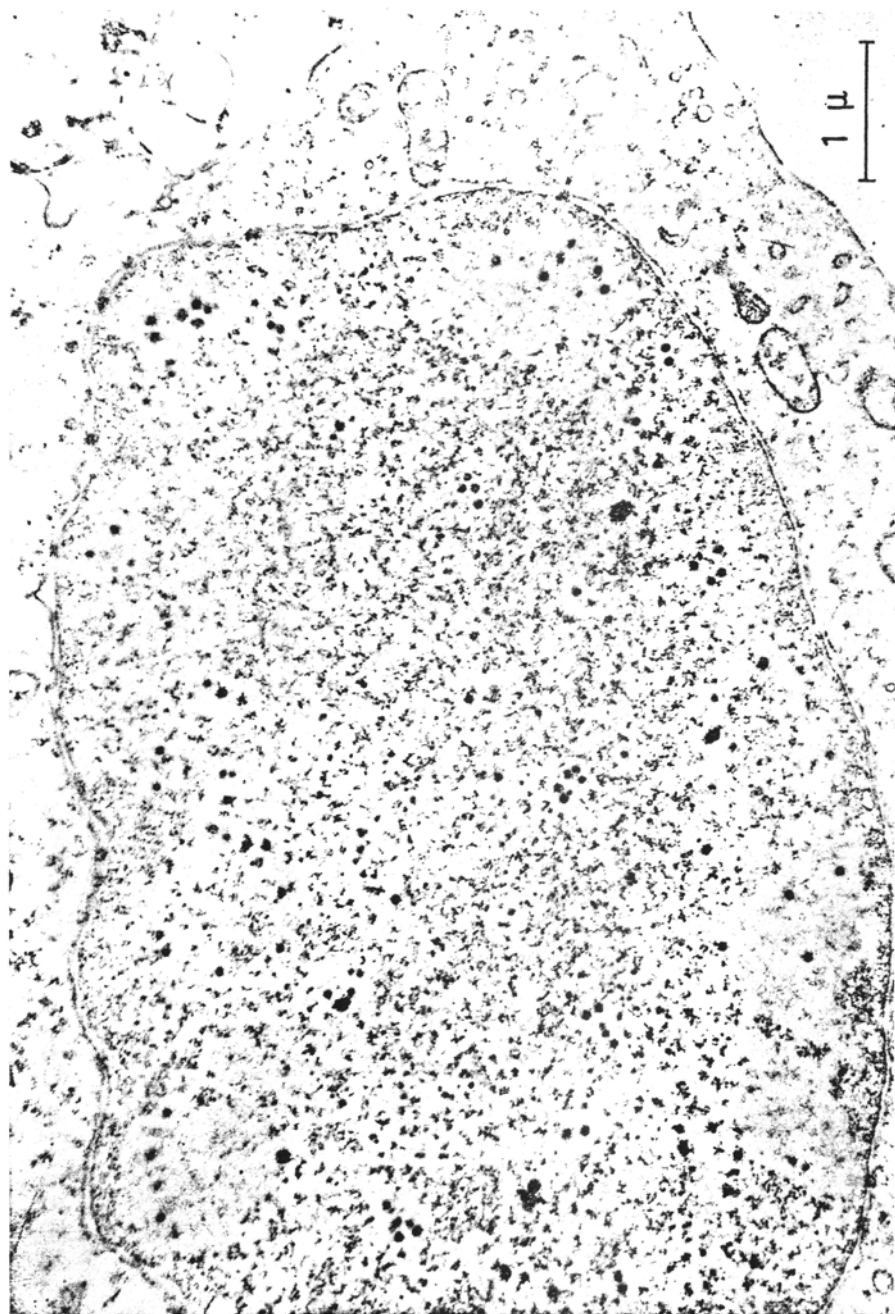


Fig. 4

Fig. 5 - Come Fig. 3. Si distinguono molto bene, accanto alle particelle pressochè omogenee, quelle con una zona centrale più densa agli elettroni.

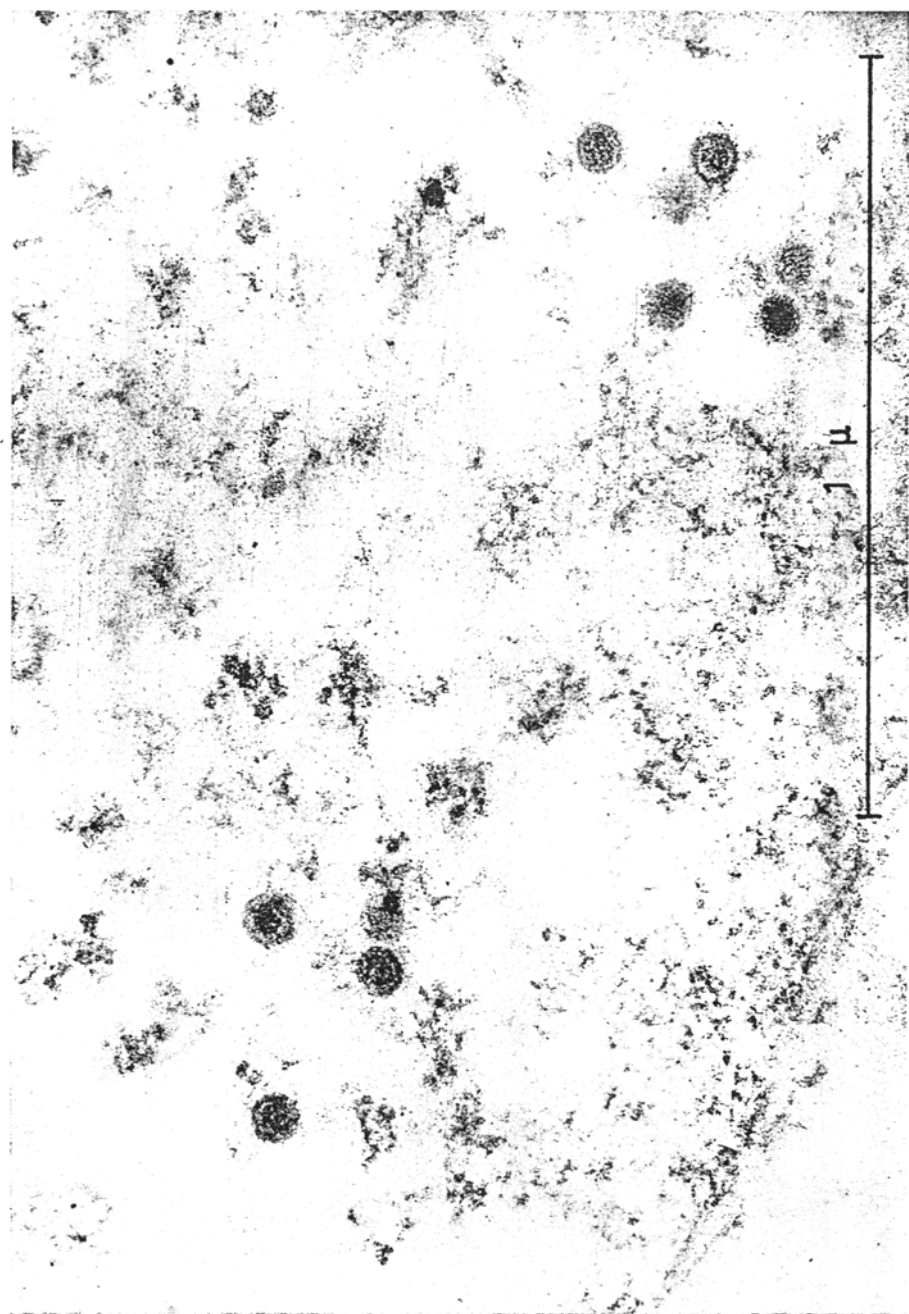


Fig. 5

Fig. 6 - Come Fig. 5. Sono evidenti gli ammassi, specie i due sopra il gruppo delle particelle e che si potrebbero ritenere i precursori immediati dei virus.

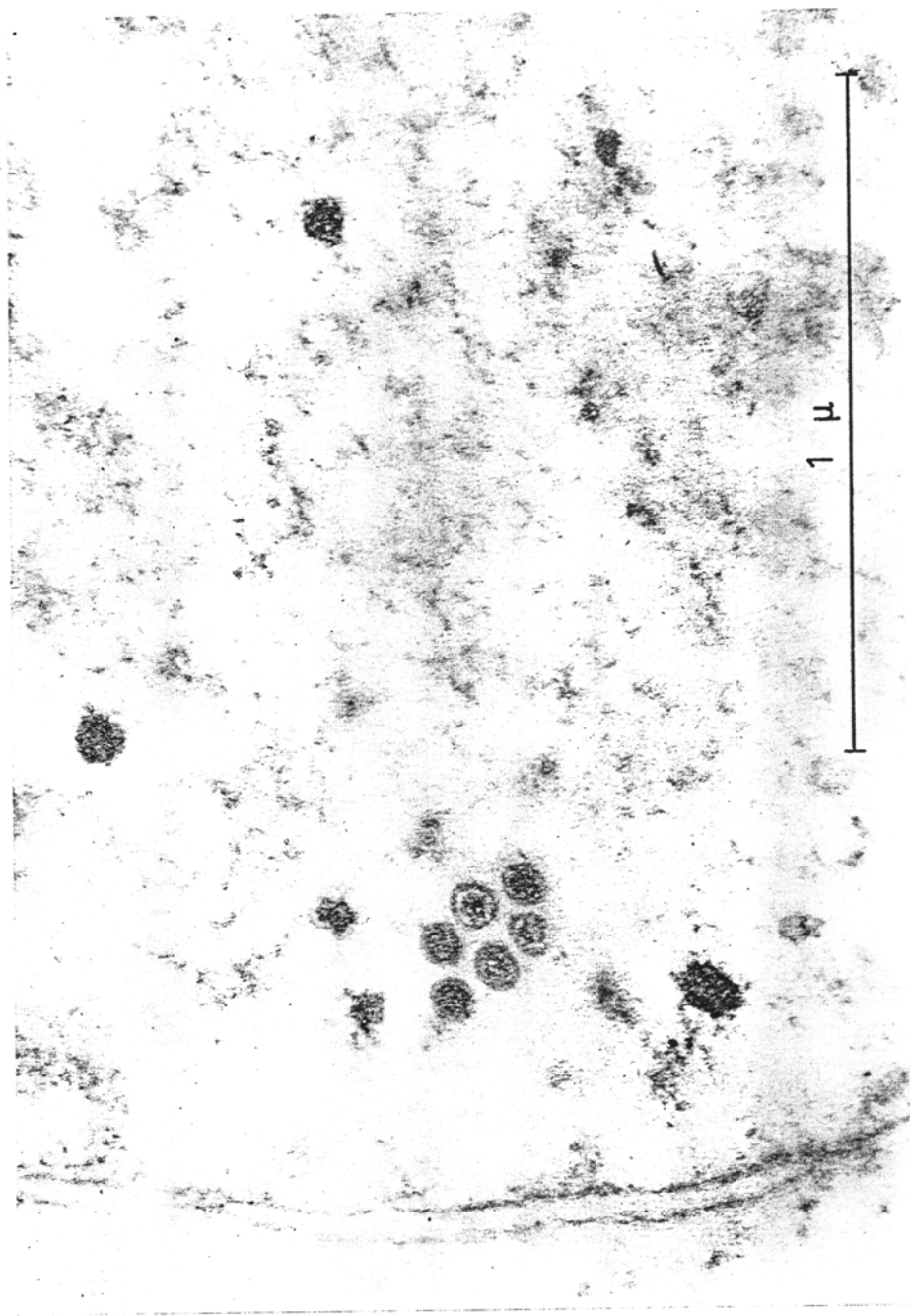


Fig. 6

Fig. 7 - Porzione di nucleo infetto dopo 20 ore dall'infezione della cellula. Le particelle virali sono più numerose; si scorgono alcuni corpi globoidi; grandi e piccoli aggregati di matrice.

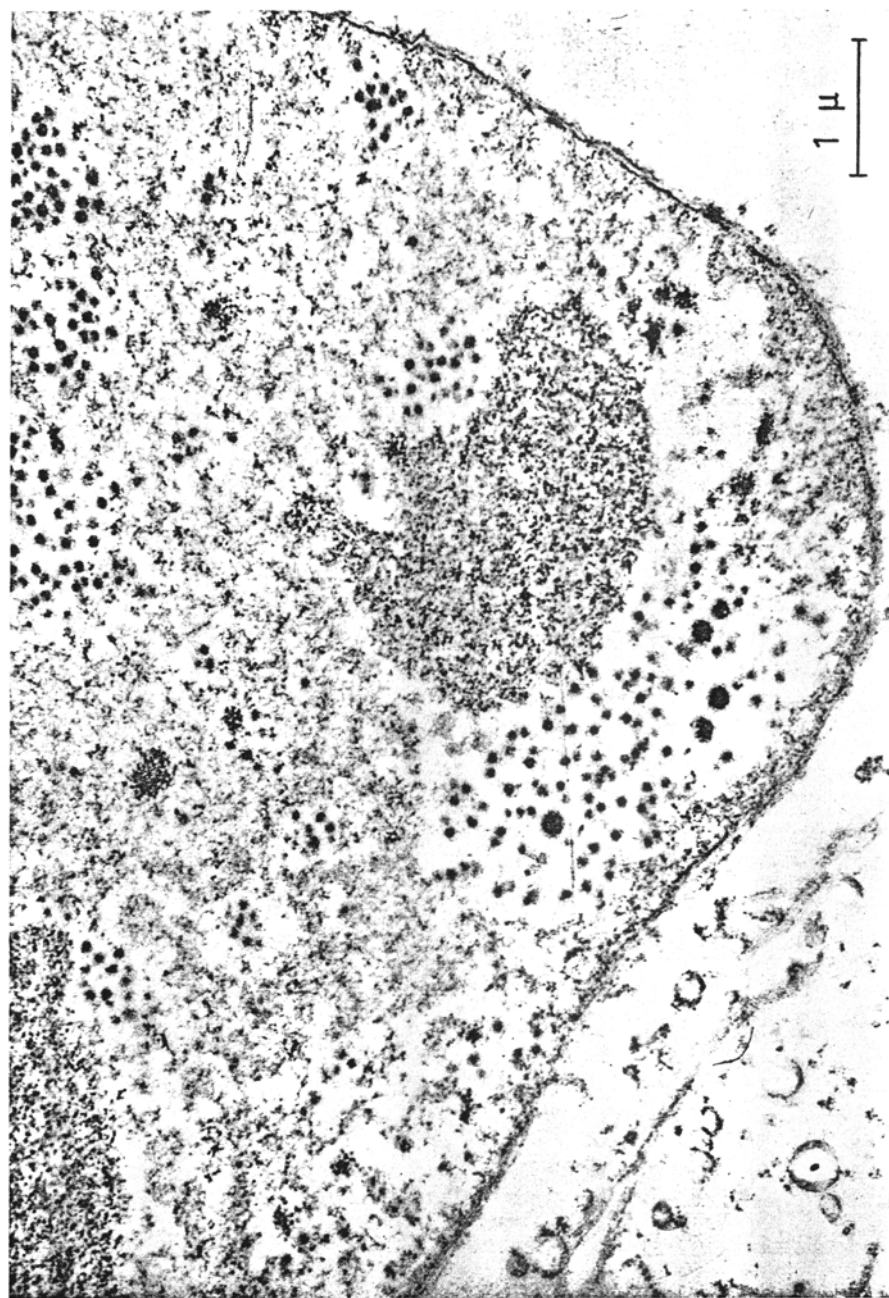


Fig. 7

Fig. 8 - Come Fig. 7. A volte sembra di intravedere negli aggregati una disposizione regolare.



Fig. 8

Fig. 9 - Come Fig. 7. Le particelle virali presentano una disposizione regolare, cristallo-simile. I corpi globoidi, ora notevolmente grandi, sono chiaramente visibili.



Fig. 9

La fig. 2 corrisponde al nucleo di una cellula infettata da 12 ore. Non si vedono ancora particelle virali, intendendo con questo termine la particella virale completa; però si osserva che il nucleo non appare più così omogeneo come prima. Cominciano a formarsi qua e là degli aggregati, piccoli, sparsi, più densi del resto della trama nucleare. A volte sembra quasi di scorgere una parvenza di struttura regolare che tende a ripetersi. Questi aggregati si distinguono dai nucleoli in quanto sono più numerosi, più irregolari per la forma e, in generale, meno densi. Il periodo di 12 ore corrisponde alla fase di latenza: infatti osservazioni da noi compiute e che verranno riferite in altra sede, hanno mostrato che questo periodo dello sviluppo intracellulare del virus, studiato in prove condotte per ottenere la curva di crescita del virus stesso, ha una durata di circa 12 ore. Sia l'indagine biologica, sia quella morfologica non mettono in evidenza sino a questo momento una moltiplicazione del virus.

Le figure 3, 4, 5 e 6 appartengono a sezioni di cellule dopo 16 ore dall'infezione. Gli aggregati, che si sono cominciati a scorgere verso la dodicesima ora, si fanno più numerosi e anche più marcati. La cromatina è marginata, la matrice nucleare non ha più un aspetto regolare: appare meno densa, più dispersa e con frequenti zone (in queste cellule sono situate soprattutto alla periferia del nucleo) in cui la trama nucleare sembra quasi scomparsa ed è sostituita da un materiale finemente disperso, difficilmente identificabile. E' per lo più in corrispondenza di queste zone « vacuolari » che appaiono le prime particelle virali ben delineate e apparentemente complete. Sin d'ora si può chiaramente vedere che le particelle virali non appaiono identiche: ritorneremo su questo argomento nella discussione, però possiamo già dire che, accanto a particelle apparentemente omogenee, dense agli elettroni, ve ne sono altre che appaiono o parzialmente svuotate, trasparenti, limitate da una membrana periferica, o più spesso con una massa centrale che presenta la stessa densità della particella omogenea. Queste differenze si notano particolarmente bene nelle figure 5 e 6.

Accanto alle particelle che sono sparse nella matrice nucleare e che solo raramente sono ordinate con regolarità su due o tre file parallele, si vedono dei corpi globoidi (*), ben distinti, per lo più densi, omogenei o a volte con inclusioni granulari non ben differenziate: questi corpi sono

(*) Mentre questa nota era in corso di stampa, è uscito un lavoro di V. MONACI et al. (Ann. Sclavo, 2, 631, 1960) sullo sviluppo dell'adenovirus tipo 8 in cellule KB. In esso si parla di formazioni ovalari che si riscontrano nei nuclei in preda ad avanzati fenomeni regressivi. Probabilmente si tratta di formazioni analoghe ai corpi globoidi da noi descritti ed osservati anche da MORGAN et al. (*).

sempre più grandi delle particelle virali e in questi primi stadi cellulari sono in genere di una grandezza due o tre volte quella delle particelle stesse.

Le figure 7, 8, 9, 10 e 11 sono di cellule studiate dopo 20 ore dall'infezione. Gli aggregati sono divenuti più densi: ormai le particelle virali sono numerose, sparse nella matrice nucleare, oppure raggruppate, così come se derivassero da un unico centro di origine; le particelle mostrano ormai più o meno evidente in alcune cellule una disposizione regolare, cristallo-simile, tanto più chiara quanto più numerose sono le particelle. I corpi globoidi sono quasi sempre presenti, a volte anche abbastanza numerosi (10-13 per sezione): di solito hanno una grandezza maggiore di quella riscontrata nelle cellule osservate dopo 16 ore; sono ben evidenti, a volte nettamente delimitati, talvolta con margine più sfumato. Abitualmente queste formazioni sembrano omogenee, ma qualche volta lasciano intravedere una qualche granulazione irregolare: i corpi globoidi si trovano quasi sempre in prossimità dei raggruppamenti di virus.

La matrice nucleare sembra farsi più trasparente, meno densa, e pare addirittura che manchi in prossimità dei gruppi di virus, i quali appaiono immersi in una zona più chiara e spesso circondati da un alone molto più trasparente del resto della matrice nucleare. A volte (v. fig. 9) si riscontrano nel nucleo, specialmente verso la periferia, dei grossi vacuoli, però non delimitati da alcuna membrana, nei quali si possono trovare particelle virali o corpi globoidi.

Dopo 24 ore (figure 12, 13, 14 e 15) il quadro generale delle sezioni non cambia molto, se non che il numero delle particelle virali è maggiore. I virus sono per lo più a gruppi, talora disposti regolarmente a formare cristalli, talaltra irregolarmente. Quando sono disposti in serie ordinate mostrano spesso un profilo esagonale e un orientamento definito. Dopo avere visto molte sezioni, noi abbiamo l'impressione che la disposizione delle particelle sia legata alle particolari condizioni in cui si trova la matrice nucleare e che abitualmente i virus si presentino sotto forma di cristalli ovvero di raggruppamenti irregolari con una certa costanza secondo la cellula considerata: in altri termini, si osserva l'uno o l'altro aspetto, quasi che fosse la trama della matrice a permettere che le particelle virali si dispongano nell'una o nell'altra forma, in dipendenza di una speciale condizione della matrice stessa. I corpi globoidi sono sempre presenti, ben netti e circoscritti, a volte tutti riuniti come nella figura 14. Sono ancora ben visibili gli aggregati densi, meno numerosi però che nelle ore precedenti.

Le ultime osservazioni da noi fatte sulle sezioni si riferiscono a cel-

lule incluse dopo 32 ore dall'infezione (figure 16, 17 e 18), quando ormai tutte le cellule erano staccate dal vetro della fiaschetta e si presentavano evidentemente alterate anche al microscopio ordinario.

A questo stadio non è sempre facile distinguere i limiti che separano il nucleo dal citoplasma, specialmente per le notevoli alterazioni subite dal nucleo in conseguenza dello sviluppo del virus: nelle figure 16 e 17 si può notare come i virus abbiano ormai occupato una buona parte del nucleo e siano tutti disposti irregolarmente; la membrana nucleare appare notevolmente alterata (fig. 16) o interrotta (fig. 17) e si possono scorgere particelle virali nel citoplasma. Praticamente siamo giunti agli ultimi stadi della lesione citopatica e le cellule possono essere in buona parte distrutte, così che si riscontrano gli elementi virali non solo nel citoplasma, ma anche al di fuori della membrana cellulare, come si vede chiaramente nella fig. 18, dove le particelle sono apparentemente ancora adsorbite alla superficie esterna della cellula.

RISULTATI CON IL MATERIALE PURIFICATO. — Le figure 19, 20 e 21 si riferiscono ancora a sezioni che noi abbiamo fatto allo scopo di osservare con maggiore dettaglio la struttura morfologica delle particelle virali all'interno delle cellule: le sezioni sono state colorate con acido fosfotungstico e acetato di uranile, colorante quest'ultimo capace di mettere in evidenza gli acidi nucleici.

Quello che appare molto chiaramente da queste tre fotografie è la non omogeneità delle particelle virali, resa evidente dalla colorazione: le particelle, sia quelle appartenenti alla sezione fatta alla sedicesima ora (fig. 19), sia quelle della ventottesima ora (figg. 20 e 21), appaiono costituite da un nucleo centrale, colorato con l'acetato di uranile, circondato da una corona molto più trasparente. Il nucleo centrale, a sua volta, non appare omogeneo e lascia intravedere una substruttura. Lo aspetto diverso di alcune particelle che appaiono molto più trasparenti può essere dovuto: 1) alla loro posizione nello spessore della sezione: il taglio ha cioè interessato la particella in una zona più superficiale, per cui il nucleo centrale risulta meno opaco; 2) al fatto che, essendo stata eseguita la colorazione dopo l'inclusione ed il taglio ed avendo essa interessato solo una superficie della sezione, i virus che si affacciano all'altra faccia della sezione potevano non essere raggiunti dal colorante. Per altre particelle ancora il diverso aspetto corrisponde con ogni probabilità effettivamente ad una diversa morfologia: può trattarsi di virus incompleti o perchè immaturi o perchè svuotati, almeno in parte, del loro contenuto; sono quelle particelle virali che appaiono come « ghosts » e che sono state osservate anche nei fagi.

Nelle figure 19 e 20 si possono scorgere alcuni corpi globoidi: essi appaiono uniformi e non rivelano traccia sicura di una struttura interna.

Nella figura 22, che rappresenta alcune particelle virali osservate dopo freeze-drying, appare chiaramente la forma esagonale del profilo del virus che già si è osservata nelle particelle viste nelle sezioni (v. figg. 12 e 13). Questo metodo è fra tutti quello presumibilmente meno lesivo e che permette di vedere gli oggetti quali essi sono, non alterati in alcuna maniera dal fissativo o da altro procedimento di tecnica. La particella appare esagonale e costituita da un nucleo centrale più opaco agli elettroni e da una zona periferica più trasparente: questo aspetto del virus convalida le osservazioni precedenti.

Le figure 23 e 24 sono state ricavate dal virus purificato e fissato con OsO_4 e poi colorato con acetato di uranile. Le particelle risultano costituite da un nucleo centrale, corrispondente certamente a quello riscontrato nelle sezioni, con la differenza che qui si nota con evidenza la forma esagonale della massa centrale. Vi è poi una zona periferica più trasparente, la cui superficie esterna appare granulare. Il mantello omogeneo ai raggi elettronici, e che in questa preparazione circonda la particella con notevole regolarità, è materiale estraneo al virus, che aderisce alle particelle malgrado l'avanzata purificazione. Risulta a volte molto evidente la forma esagonale delle particelle virali.

Le figure 25, 26, 27, 28, 29, 30 e 31 sono tutte riproduzioni di preparati colorati negativamente con PTA. Questo metodo, veramente molto semplice nella sua applicazione, permette di raggiungere un notevole contrasto, così da ottenere delle buone riproduzioni fotografiche; e d'altra parte mette chiaramente in evidenza la presenza di una substruttura nella particella, quando tale substruttura esiste, come è il caso di SV39. Quanto appare evidente anche dall'esame di questi preparati è che non tutte le particelle sono identiche: in gran parte sono « complete » e dimostrano uno strato superficiale costituito da tante subunità distribuite regolarmente (v. figg. 28 e 29), mentre altre appaiono svuotate, simili alle ombre che si osservano nei fagi rotti con shock osmotico (v. figg. 25 e 26). Vi sono poi altre particelle le quali sembrano in disfacimento, e allora si può notare (v. fig. 27) come le subunità più esterne siano quasi unite a formare una specie di membrana spezzata, mentre la porzione interna può essere più o meno alterata. Alcune delle particelle mostrano un profilo esagonale, evidente nelle ombre della fig. 26. Accanto alle particelle più o meno integre, più o meno complete, si nota sovente (v. figg. 26 e 27) sul fondo del preparato la presenza di un gran numero di granuli regolari, disposti separati o a gruppi: questi granuli sono in parte simili alle subunità costituenti il mantello della particella virale.

Le subunità, che nei preparati allestiti con il metodo del freeze-drying si rivelano di densità inferiore alla zona centrale delle particelle (v. fig. 22) e che quindi è giustificato ritenere corrispondano a grosse molecole proteiche (anche per analogia con la composizione di altri virus), appaiono per lo più compatte, rotondeggianti (figg. 28 e 29a), regolarmente distribuite a formare quasi uno strato di protezione per la porzione nucleica. A volte, invece (figg. 29b e 30), sia le subunità costituenti le particelle, sia quelle che si vedono sul fondo del preparato, sembrano svuotate all'interno e costituite da un anellino che spesso è chiuso, mentre non di rado si presenta a forma di ferro di cavallo. Non siamo ancora in grado di stabilire se questo quadro corrisponda ad un aspetto normale o se sia invece il prodotto di un'alterazione dovuta alla tecnica e che ha determinato un certo dispiegamento della macromolecola proteica corrispondente alla subunità.

La grandezza delle particelle virali calcolata sia su preparati in sezione, sia in quelli purificati, risulta fra i 700-800 Å, mentre le subunità, quando si presentano compatte, sono del diametro apparente compreso fra i 50 e i 60 Å, e quando si presentano a forma di anellino hanno un diametro esterno di circa 90 Å ed uno interno che va da 20 a 30 Å.

In alcune preparazioni (v. figg. 31 e 32) si sono osservate, più o meno numerose, delle strutture molto simili a quelle già descritte da HORNE e WATERSON ⁽²¹⁾ nel loro studio sui mixovirus: sono delle bande allungate che mostrano una periodicità regolare lungo il loro asse, ad intervalli di 50-70 Å. Queste bande sono di lunghezza molto variabile (arrivano oltre 0,1 μ): la loro sezione trasversale ha un diametro che va da 170 a 200 Å; esse presentano un canale interno avente un diametro che va da 60 a 80 Å.

VALUTAZIONE DEI RISULTATI E DISCUSSIONE

Come già nella esposizione dei risultati, distingueremo la nostra discussione in due parti, quella che riguarda lo sviluppo intranucleare del virus e quella che si riferisce alla struttura della particella virale.

In base alle nostre osservazioni e a tutte quelle che sono state fatte da altri ricercatori nel campo degli adenovirus umani (quei virus, cioè, al cui comportamento e alle cui caratteristiche molto si avvicina il virus SV39), risulta evidente che SV39 ha unicamente uno sviluppo intranucleare: le particelle si cominciano sicuramente a vedere verso la sedicesima ora, quando anche la determinazione biologica rivela che è terminata la fase di latenza dello sviluppo del virus (dati non pubblicati).

Dallo studio accurato dei risultati ottenuti con il microscopio elettronico appare evidente che il nucleo della cellula, il quale si mantiene di aspetto quasi normale sin verso la dodicesima ora, comincia ad alterarsi e porta progressivamente alla formazione di quella che i virologi hanno ormai indicato come matrice del virus. Questa matrice, che risulta ben evidente nelle sezioni fatte in fasi progressive nel tempo dello sviluppo del virus, ha in genere nei nuclei infettati con SV39 l'aspetto di grossi ammassi, che non raggiungono mai, però, le dimensioni di quelli osservati da altri Autori negli adenovirus umani. L'impressione che l'osservatore attento ricava dall'esame di un gran numero di sezioni è che questa matrice sia veramente quella da cui originano le particelle virali (figg. 6, 10 e 19): in alcune delle sezioni appare quasi la transizione dall'ammasso informe del materiale, costituente la matrice, alla particella virale morfologicamente ben definita.

Le particelle sembrano, come in preparati osservati da altri Autori con gli adenovirus umani, appartenere a due grandi categorie fra loro abbastanza bene separate, pur potendosi trovare delle forme intermedie: 1) la maggior parte sono particelle omogenee, più o meno dense; vi sono poi 2) particelle che appaiono completamente trasparenti, sprovviste di una struttura interna e limitate semplicemente ad una membrana periferica, o aventi un corpo centrale, di densità molto simile a quella delle particelle del primo gruppo.

Se questo aspetto morfologico sia l'espressione di una fase diversa di maturazione del virus e si possa quindi interpretare come corrispondente ad una particella virale ancora incompleta oppure ad un virus maturo (intendendo con questo termine il virus provvisto di tutte le sue proprietà biologiche oltre che strutturali), non ci è dato di affermarlo. Solo ricerche di ordine quantitativo potranno chiarire questo problema; ma è evidente, anche da un esame superficiale, che vi è una grandissima disparità fra il numero delle particelle presenti e il titolo infettante: è probabile, come è stato accertato per altri virus umani, che il numero di particelle virali corrispondenti ad una unità infettante sia notevolmente superiore all'unità. Sorge, però, sempre il problema se sia una sola la particella che è capace di infettare e richieda « l'accompagnamento » di un altro numero — per ora non determinato — di particelle che in qualche maniera favoriscano la penetrazione della particella infettante, o se solo una parte delle particelle visibili sia veramente completa, matura, mentre la grande maggioranza sarebbe ancora parzialmente incompleta. Tutte domande di indubbio significato biologico, a cui ci proponiamo, se sarà possibile, di rispondere con dati di natura sperimentale.

Il profilo del virus purificato è spesso esagonale e ciò si riscontra anche, sebbene con più difficoltà, nelle particelle osservate nelle sezioni; raramente si osserva un profilo pentagonale. Questo fatto, insieme con le caratteristiche di struttura che verranno fra poco discusse, fa ritenere che la particella virale abbia la forma di un icosaedro. E' così che un altro dei virus piccoli si viene ad aggiungere alla serie già abbastanza numerosa di quelli che presentano una identica forma (il virus di *Tipula paludosa*; l'adenovirus tipo 5, alcuni batteriofagi, ecc.).

Dall'esame comparato dei preparati in sezione e di quelli del materiale purificato e studiato con il freeze-drying e con la colorazione di acetato di uranile, sembra molto evidente che SV39 è costituito da un nucleo centrale più denso ai raggi elettronici e che viene intensamente colorato dall'acetato di uranile, mentre vi è un mantello avvolgente più trasparente e non colorato. Per analogia con quanto è noto dalla biochimica e dalla morfologia dei virus, animali e batterici, e in considerazione del fatto che gli acidi nucleici hanno densità superiore alle proteine, si può ritenere che il nucleo centrale corrisponda all'acido nucleico (nel caso di SV39 si tratta probabilmente di DNA) e questa supposizione viene confermata dalla colorazione con l'acetato di uranile, che dovrebbe interessare fortemente gli acidi nucleici. La porzione periferica sarebbe costituita dal mantello proteico, che ormai si ritiene abbia principalmente la funzione di proteggere il nucleo centrale di acido nucleico, depositario in molti dei virus studiati delle proprietà genetiche fondamentali, informatrici e determinanti i caratteri della nuova progenie.

Nei virus purificati e colorati negativamente con PTA risulta evidente che la porzione esterna della particella virale è costituita da subunità che sembrano tutte eguali e disposte con una certa regolarità alla superficie della particella stessa. Il diametro del virus risulta in questi preparati assai costante ed è di 700-800 Å, variando solo in funzione di eventuali alterazioni della particella, dovute forse al trattamento subito durante la purificazione: questo diametro corrisponde del resto a quello che si può ottenere misurando le particelle nelle sezioni e dopo freeze-drying. Come già rilevato poco più sopra, con questi ultimi due metodi si mette bene in evidenza un nucleo interno, che nelle particelle non colorate, osservate con il solo freeze-drying (fig. 22), senza previa fissazione in OsO_4 , appare più denso della zona superficiale: si sa d'altra parte che l'acido nucleico è più denso (densità 1,6-1,7) delle proteine (densità circa 1,35). Il diametro del nucleo interno risulta nei preparati con il freeze-drying di 400-500 Å, mentre lo spessore del mantello superficiale va da 150 a 175 Å. Le subunità da cui è costituito quest'ultimo e che appaiono così evidenti nei preparati con PTA, pre-

sentano un diametro che va da 50 a 60 Å: se lo strato superficiale fosse costituito dalle sole proteine, queste dovrebbero essere disposte almeno in doppio strato. Il fatto però che, quando il virus è alterato nella sua morfologia, perchè lo strato periferico della particella tende a frammentarsi, non si abbia alcuna evidenza che esista un doppio strato di proteine, ma al contrario si osservi di frequente una chiara disposizione lineare, fa ritenere che le proteine globulari, che possono essere dimostrate nel mantello superficiale, siano effettivamente disposte a formare un monostrato.

Nei virus immersi nel PTA non si scorge mai il nucleo al di sotto delle subunità: questo si può facilmente spiegare con la forte differenza di opacità agli elettroni fra lo strato di PTA che è penetrato fra le subunità e quello del materiale da cui è costituito il virus.

L'adesione del PTA ai lati del virus produce spesso un effetto di rilievo: in quelle particelle virali la cui immagine è sufficientemente buona e completa si nota con evidenza come le subunità siano disposte sulla superficie della particella con simmetria esagonale, a distanza di circa 80 Å da centro a centro. La presenza inoltre di un profilo esagonale in molte particelle del virus (v. anche figg. 23 e 26), come è già stato rilevato più sopra, fa ritenere che la loro forma sia quella dell'icosaedro, forma che appare assai chiaramente in conseguenza dell'effetto di rilievo, determinato appunto dall'inglobamento delle particelle in PTA (figure 27 e 29).

Le subunità visibili sulla superficie della particella sono dunque disposte con simmetria esagonale. La disposizione però può avvenire in diversi modi e, in accordo con le immagini osservate nelle nostre numerose preparazioni, si possono fare tre ipotesi: 1) la prima, che le subunità siano disposte lungo gli spigoli del poliedro e sui vertici di esso e, con l'ordine che ne segue, sulle facce, così che nel nostro caso, in base alla numerazione fatta sulle particelle meglio visibili, vi potrebbero essere: a) 6 subunità per lato (compresi i due vertici adiacenti) con un totale di 232 subunità, oppure b) 7 subunità per lato con un totale di 362 subunità; 2) la seconda ipotesi è che nessuna delle subunità si trovi sugli spigoli o sui vertici, ma solo adiacenti ad essi, per cui, secondo le immagini da noi avute, si avrebbero 5 subunità lungo ogni lato, quindi 15 per faccia ed in totale 300; 3) una terza ipotesi avanzata da Ageno è che la disposizione sia quella corrispondente, nella classificazione da lui proposta per le forme chiuse possibili dei piccoli virus⁽²²⁾ ⁽²³⁾, alle caratteristiche $p=5$, $q=1$, $n=2$, con numero totale di particelle eguale a $310(n-1)^2 + 2 = 312$.

La prima di queste ipotesi nella sua espressione contenuta in a) offrirebbe una disposizione in accordo con l'idea sviluppata da CRICK e

WATSON (²⁴), secondo cui i piccoli virus sono costituiti da subunità fra loro in relazione secondo gli elementi di una simmetria cubica; inoltre questa disposizione sarebbe analoga a quella stabilita con molta evidenza da HORNE e al. (⁶) per un adenovirus umano che ha, esso pure, la forma icosaedrica ed un diametro di circa 700 Å. Nel caso di SV39 vi sono due elementi a favore di questa prima ipotesi: precisamente il numero totale delle subunità che si possono con certezza contare sulla superficie visibile del virus ed il numero di 6 subunità, evidenti sugli spigoli del profilo esagonale della particella. Invece contro questa possibilità sta il fatto che mai nelle nostre immagini si riesce ad osservare una subunità circondata da 5 altre (e corrispondente quindi ad un vertice) alla distanza di 4 subunità da un altro vertice bene identificabile.

L'alternativa b) della prima ipotesi, la quale viene suggerita dall'osservazione che si può fare in alcune immagini, in cui sembra che una subunità circondata da 5 altre si trovi alla distanza di 5 subunità (e non di 4 come nel caso precedente) da una nella stessa posizione, ha contro di sé: la conta totale delle subunità e quella delle subunità che appaiono sugli spigoli. Infatti il numero delle subunità visibili nei nostri preparati è di molto inferiore a quello che risulterebbe se l'ipotesi fosse esatta; ed inoltre bisognerebbe ammettere che una parte della particella virale sia nascosta dal PTA, la qual cosa sembra molto improbabile, data la nitidezza con cui le particelle spiccano sul fondo.

La seconda ipotesi soddisfa la osservata disposizione delle subunità in corrispondenza di quelli che si suppone siano gli spigoli ed i vertici dell'icosaedro, ma presuppone una alterazione della forma dell'icosaedro in corrispondenza dei vertici, affinché le subunità possano disporsi ordinatamente. Il numero delle subunità che si contano sulla superficie visibile è in questo caso un po' inferiore a quello che si dovrebbe effettivamente riscontrare in base a questa seconda ipotesi.

La terza ipotesi ha in favore l'osservazione diretta della disposizione delle subunità sul virus; tuttavia la conta delle subunità sulla superficie visibile della particella non raggiunge, di nuovo, il numero richiesto dall'ipotesi.

Sarebbero necessarie molte altre fotografie, nella speranza di riuscire ad ottenere una particella così ben disposta, da potere con certezza rivelare il numero e la disposizione delle subunità: finora non ci è stato possibile, malgrado le moltissime particelle osservate, per cui ci sembra giustificato il concludere attualmente che SV39 ha la forma di un icosaedro, della grandezza di 700-800 Å ed è costituito da un nucleo centrale corrispondente con probabilità all'acido nucleico e da un mantello avvolgente, formato principalmente da proteine. Queste proteine presentano

una evidente disposizione regolare, distribuita su tutta la superficie dell'icosaedro: i dati che per ora noi abbiamo non ci consentono di decidere quale sia la modalità di disposizione delle subunità.

Dalle nostre osservazioni queste subunità appaiono prevalentemente come macromolecole rotondeggianti e compatte (simili per dimensioni e forma a molecole proteiche globulari di peso molecolare dell'ordine di 100.000); in alcuni casi il loro aspetto suggerisce quello di molecole dispiegate e si può supporre che sia un effetto della tecnica di preparazione.

Quanto alle bande allungate con struttura periodica (figg. 31 e 32) osservate in alcune preparazioni, sono possibili diverse interpretazioni. Si può supporre che si tratti di strutture filamentose costituite dall'acido nucleico, analogamente a quanto suggerito da HORNE e WATERSON ⁽²¹⁾ per strutture simili osservate nei mixovirus, le quali, per aspetto e per dimensioni, corrispondono a quelle osservate nei nostri preparati. Una natura filamentosa non risulta tuttavia dalle nostre osservazioni e la composizione in acido nucleico potrebbe essere dimostrata solo mediante trattamento con enzimi specifici. D'altra parte si può fare l'ipotesi che queste strutture possano essersi formate per un processo di riassociazione in forma periodica delle subunità disperse, che sono numerosissime in queste preparazioni, analogamente a quanto è stato osservato per il virus del mosaico del tabacco ⁽²⁵⁾. Le dimensioni dei singoli elementi della struttura periodica e delle subunità sarebbero in accordo con questa ipotesi, che, per essere convalidata, richiede ulteriori osservazioni sulle caratteristiche chimiche e chimico-fisiche delle presenti strutture. Infine non si può escludere del tutto la possibilità che si tratti di materiale estraneo al virus.

Desideriamo esprimere la nostra gratitudine ai tecnici: A. Chiozzotto, F. Piccirilli, N. Tomassini e F. Valente, per l'appassionata ed attenta opera di collaborazione.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Fisica e Laboratori di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (1) HULL R. N. e MINNES J. R. - *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 67: 413 (1957).
- (2) BURNET F. M. - *The viruses*, III, pag. 1 (1959).
- (3) MORGAN C., HOWE C., ROSE H. M. e MOORE G. H. - *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2: 351 (1956).
- (4) MORGAN C., GORDMAN G. C., BREITENFELD P. M. e ROSE H. M. - *J. exp. Med.*, 112: 373 (1960).

- (5) LAGERMALM G., KJELLEN L., THORSSON K. G. e SVEDMYR A. - Arch. Virusf., 7: 221 (1937).
- (6) VALENTINE R. C. - IV int. Congress f. Electronenmikr., Berlin, 1958, Springer Verlag 1960, Bd. II, pag. 537.
- (7) TYRRELL D. A. J., BUCKLAND F. E., LANCASTER M. C. e VALENTINE R. C. - Brit. J. exp. Path., 41: 610 (1960).
- (8) HORNE R. W., BRENNER S., WATERSON A. P. e WILBY P. - J. Mol. Biol., 1: 84 (1959).
- (9) YOUNGNER J. S. - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 83: 202 (1954).
- (10) MELNICK J. L. - Ann. N. Y. Acad. Sci., 61: 734 (1953).
- (11) PALADE G. E. - J. exp. Med., 93: 283 (1932).
- (12) WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E. - Naturwissensch., 44: 287 (1957).
- (13) GIBBONS I. R. e BRADFIELD J. R. - Proc. Stockholm Conference, pag. 121 (1956).
- (14) WATSON M. L. - J. biophys. biochem. Cytol., 4: 473, 727 (1958).
- (15) BELL L. G. E. - In Physical Techniques in Biological Research, 3: 4 (1956) (Oster e Pollister).
- (16) BRENNER S. e HORNE R. W. - Bioch. biophys. Acta, 34: 103 (1959).
- (17) SJÖSTRAND F. S. - Proc. Stockholm Conference, 120 (1956).
- (18) GESSLER A. E., BENDER C. E. e PARKINSON M. C. - Trans. N. Y. Acad. Sci., 48: 701 (1953).
- (19) HANZON V. e TOSCHI G. - Exp. Cell Research, 21: 332 (1960).
- (20) KLEMPERER H. G. e PEREIRA H. G. - Virology, 9: 536 (1959).
- (21) HORNE R. W. e WATERSON A. P. - J. Mol. Biol., 2: 73 (1960).
- (22) AGENO M. - Nuovo Cimento (in corso di stampa).
- (23) AGENO M. - (Comunicazione personale).
- (24) CRICK F. H. C. e WATSON J. D. - Nature, 177: 473 (1956).
- (25) FRAENKEL CONRAT H. e WILLIAMS R. C. - Proc. nat. Acad. Sci. U.S., 41: 690 (1953).
-