

L'influenza dei polifosfati sull'attività tubercolinogena

MARIO GRANIERI, GIANFRANCO TIECCO, LUIGI BELLANI (*) e LEONIDA RAVAIOLI

Laboratori di Veterinaria

Riassunto. — Gli AA. coltivano due ceppi di micobatterio tubercolare (umano e bovino) in terreno di Sauton al quale sono stati aggiunti, in diverse concentrazioni, il sale di Graham ed il tetrafosfato esasodico.

La presenza di tali polifosfati, oltre a favorire la crescita dei micobatteri, esalta anche l'attività tubercolinogena dei due ceppi coltivati.

Summary. — Two strains of *Mycobacterium tuberculosis* (human and bovine types) were grown in Sauton medium with the addition of Graham salt or hexasodium tetrphosphate in different concentrations.

The presence of such polyphosphates does not only favour the growth of these mycobacteria but also enhances the production of tuberculin.

In un lavoro precedente (1) sono state riportate le esperienze relative all'attività dei polifosfati nei riguardi dei germi, ed in particolare dei micobatteri. Nello stesso lavoro è stata presa in considerazione la possibilità, da parte dei polifosfati, di influenzare lo sviluppo dei micobatteri in terreni colturali sintetici e di variarne il potere patogeno. Da esso risulta che i polifosfati, ad opportune concentrazioni, non influenzano negativamente la crescita del micobatterio e che, anzi, alcuni di essi, quali il sale di Graham ed il tetrafosfato esasodico, ne esaltano l'attività metabolica. La concentrazione dei polifosfati agisce in maniera diversa sui micobatteri umani rispetto a quelli bovini, mentre il potere patogeno dei due ceppi sembra pressochè ugualmente stimolato dai polifosfati.

In relazione a tutto ciò, il potere auxinico, nei riguardi dei micobatteri, di alcuni polifosfati quali il sale di Graham ed il tetrafosfato esasodico, aggiunti in opportune dosi al terreno di Sauton, giustifica ulteriori ricerche atte a stabilire se l'aggiunta dei sopracitati polifosfati possa venire utilizzata con vantaggio per la produzione delle tubercoline.

(*) Ministero della Sanità - Ospite dei Laboratori di Veterinaria dell'Istituto Superiore di Sanità.

MATERIALI E METODI

a) *Coltivazione dei ceppi tubercolari.*

Vengono usati i ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* H 106 e var. *bovis* IZP. Il terreno su cui viene eseguita la prova è quello sintetico di Sauton al quale i due polifosfati, sale di Graham e tetrafosfato esasodico, sono aggiunti nelle percentuali di 0,3 - 0,5 ed 1,0 riportando poi il pH al valore originale (pH 6,8).

La scelta di questi polifosfati e di queste dosi è giustificata dai risultati ottenuti in un precedente lavoro (1).

Sei matracci, contenenti ciascuno 100 cm³ di terreno di Sauton e addizionati con le percentuali sopradette dei due polifosfati, vengono seminati con cm³ 0,5 di una sospensione di micobatterio umano H 106 omogeneizzata in mortaio ed ottenuta da 3 ricche colture in Petragrani. Altri 6 matracci con uguali quantità di polifosfati vengono seminati con la stessa quantità di micobatterio bovino IZP. Due matracci senza polifosfati, seminati rispettivamente con cm³ 0,5 di micobatterio umano e con cm³ 0,5 di micobatterio bovino, vengono tenuti come controlli.

Nella tab. 1 sono riportate le percentuali dei due polifosfati aggiunte ai singoli matracci.

TABELLA 1

N. del matraccio	Micobatterio seminato	Polifosfati aggiunti al terreno di Sauton		Osservazioni
		nome	%	
1	Umano	—	—	Controllo
2	»	Tetrafosfato esasodico	0,3	
3	»	» »	0,5	
4	»	» »	1,0	
5	»	Sale di Graham	0,3	
6	»	» » »	0,5	
7	»	» » »	1,0	
8	Bovino	—	—	Controllo
9	»	Tetrafosfato esasodico	0,3	
10	»	» »	0,5	
11	»	» »	1,0	
12	»	Sale di Graham	0,3	
13	»	» » »	0,5	
14	»	» » »	1,0	

Tutti i matracci sono tenuti per 8 settimane a 37° C.

b) *Preparazione delle tuberculine.*

Dopo le 8 settimane di incubazione, i 14 matracci vengono sterilizzati a vapore fluente per 3 ore, raffreddati per una notte a temperatura ambiente e filtrati per garza. Al filtrato viene addizionata glicerina nella proporzione dell'1,2 % e, dopo agitazione, i liquidi vengono concentrati sotto vuoto in modo da ridurre il volume a circa 1/5 di quello iniziale.

Per mezzo del micro-Kjeldhal viene titolato l'azoto totale di ogni tuberculina e, con opportune diluizioni, riportato allo stesso valore in azoto del rispettivo controllo.

c) *Titolazione dell'attività tubercolinogena.*

Vengono vaccinate 28 cavie, del peso di circa g 400, mediante inoculazione sottocutanea, con cm^3 0,5 di una sospensione di BCG omogeneizzata in mortaio e contenente mg 0,24 di azoto totale/ cm^3 .

Dopo 30 giorni gli animali sono depilati sui fianchi ed inoculati per via intradermica con cm^3 0,2 delle varie tuberculine in prova, preventivamente diluite 1:10, e di un'ottava tuberculina prelevata dal commercio e prodotta con la stessa tecnica da noi adottata. Ogni cavia è sottoposta ad 8 inoculazioni, 4 in un fianco e 4 nell'altro, ruotando i punti di inoculazione in modo che ogni tuberculina sia saggiata in 8 punti diversi del derma della cavia. Su 14 cavie sono saggiate le 7 tuberculine ottenute con il ceppo umano e sulle altre 14 le 7 tuberculine ottenute con il ceppo bovino. La lettura viene fatta alla 24^a-48^a-72^a ora misurando gli aloni di reazione con un calibro e riportando i valori in millimetri. Delle tre letture si è scelta quella con i valori maggiori indipendentemente dall'ora in cui si sono manifestati e, sulle medie di tali valori, si è basata la valutazione statistica ottenuta per mezzo del «t» di STUDENT.

d) *Ricerca degli aminoacidi liberi presenti nelle tuberculine.*

In un precedente lavoro ⁽¹⁾ si era potuto constatare che l'azione dei polifosfati non aveva influenzato il tipo di metabolismo azotato dei ceppi di micobatteri in esame, determinando in 30 giorni la comparsa di ac. aspartico, ac. glutammico, leucina-isoleucina ed α -alanina. Abbiamo voluto controllare se, prolungando il periodo di crescita, si verificassero modificazioni tali da spiegare una eventuale variazione del potere tubercolinogeno dei due ceppi tubercolari in esame. La ricerca degli aminoacidi liberi viene effettuata a mezzo cromatografia su carta utilizzando il metodo discendente, carta Watmann, come fase liquida fenolo-acqua (80:20), e come rivelatore ninidrina al 0,2 % in butanolo. Gli aminoacidi vengono riconosciuti calcolando l'Rf delle macchie ottenute.

RISULTATI E CONCLUSIONI

I risultati che abbiamo ottenuto sono sintetizzati sia dalle tabelle 2 e 3, che dalle serie fotografiche dei matracci dopo le 8 settimane di incubazione. Da esse si può dedurre che:

1) tutte le dosi dei polifosfati aggiunte hanno influenzato positivamente lo sviluppo batterico (foto 1 e 2), confermando quanto precedentemente era stato affermato;

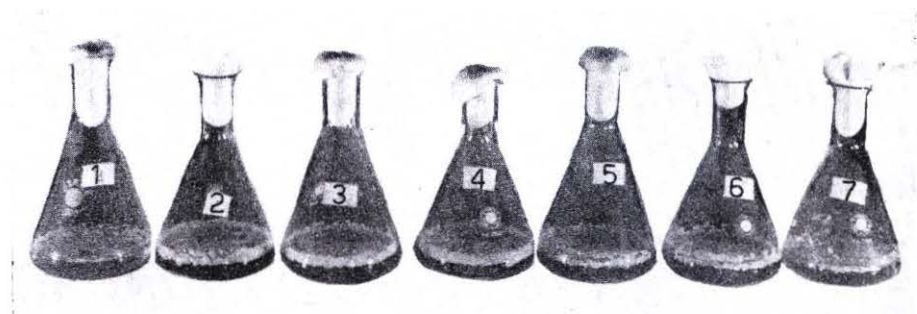


Fig. 1. — *Micobacterio umano*: Il matraccio numero 1 (controllo) non contiene polifosfati; negli altri matracci sono stati aggiunti polifosfati alle concentrazioni indicate nella tab. 1.

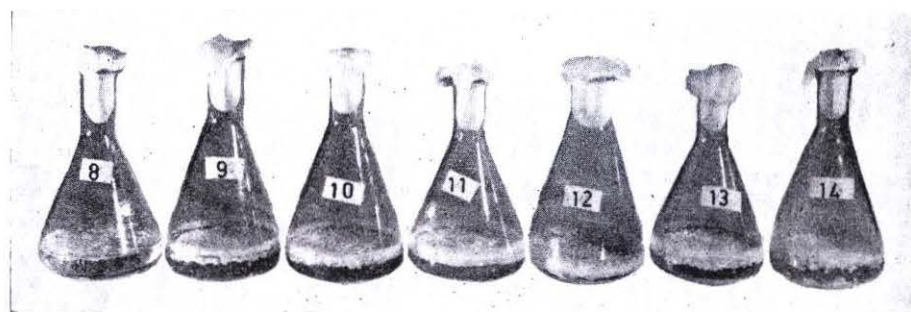


Fig. 2. — *Micobacterio bovino*: Il matraccio numero 8 (controllo) non contiene polifosfati; negli altri matracci sono stati aggiunti polifosfati alle concentrazioni indicate nella tab. 1.

2) la reazione tubercolinica su cavia ottenuta con una tubercolina commerciale, usata come controllo, è stata inferiore (millimetri 9,1) alla reazione avuta con le nostre tuberculine controllo cioè ottenute da colture prive di polifosfati (umana: millimetri 10,50; bovina: millimetri 10,00). Tale differenza però non è assolutamente significativa nei riguardi delle tre probabilità prese in esame (99-95-90 %);

Attività tubercolinogena nella cavia.

Mio batterio	T E R R E N I	NT %0,2 cm ³	Valore medio degli aloni in mm	Deviazione standard	s.e.s.	Probabilità		
						99 %/o	95 %/o	90 %/o
U M A N O	Terreno di Sauton	218	10,50	2,81				
	» » » + t. e. 0,3%/o	»	14,19	3,00	2,65	—	+	+
	» » » + t. e. 0,5%/o	»	13,75	2,50	2,49	—	+	+
	» » » + t. e. 1,0%/o	»	11,26	2,45	0,67	—	—	—
	» » » + s. G. 0,3%/o	»	13,17	2,03	2,12	—	+	+
	» » » + s. G. 0,5%/o	»	9,14	1,99	0,51	—	—	—
	» » » + s. G. 1,0%/o	»	10,03	1,87	0,45	—	—	—
B O V I N O	Terreno di Sauton	227	10,00	2,79				
	» » » + t. e. 0,3%/o	»	13,92	3,43	2,78	—	+	+
	» » » + t. e. 0,5%/o	»	13,66	2,85	2,73	—	+	+
	» » » + t. e. 1,0%/o	»	10,72	1,99	0,59	—	—	—
	» » » + s. G. 0,3%/o	»	13,27	2,93	2,40	—	+	+
	» » » + s. G. 0,5%/o	»	12,31	3,09	1,84	—	—	—
	» » » + s. G. 1,0%/o	»	10,07	1,95	0,62	—	—	—
	Tubercolina del commercio		9,10	1,97	1,10	—	—	—

Legenda: — t. e. = tetrafosfato esadico.

— s. G. = sale di Graham

Aminoacidi liberi delle tubercoline
(cromatografia su carta)

CERPI	TUBERCOLINE	Asparagina	Acido aspartico	Acido glutammico	Alfaalanina	Leucina-isoleucina
UMANO	derivate da terreno di Sauton	—	++	+	±	±
	» » » » » t. e. 0,3%	—	±	++	±	±
	» » » » » t. e. 0,5%	—	±	++	±	±
	» » » » » t. e. 1,0%	—	+	++	±	±
	» » » » » s. G. 0,3%	—	±	+	±	±
	» » » » » s. G. 0,5%	—	±	+	±	±
	» » » » » s. G. 1,0%	—	±	+	±	±
	» » » » » s. G. 1,0%	—	±	+	±	±
BOVINO	derivate da terreno di Sauton	—	++	+	±	±
	» » » » » t. e. 0,3%	—	±	++	+	±
	» » » » » t. e. 0,5%	—	+	++	+	±
	» » » » » t. e. 1,0%	—	+	++	+	±
	» » » » » s. G. 0,3%	—	±	++	+	±
	» » » » » s. G. 0,5%	—	±	++	+	±
	» » » » » s. G. 1,0%	—	±	++	+	±
	» » » » » s. G. 1,0%	—	±	++	+	±

Legenda: + ± — = intensità maggiore minore o nulla delle macchie.

t. e. = tetrafosfato esadico.

s. G. = sale di Graham.

3) anche la differenza ottenuta tra le due tubercoline controllo di origine umana (millimetri 10,50) e di origine bovina (millimetri 10,00) non è significativa;

4) i polifosfati inclusi nel terreno hanno influenzato positivamente oltre che lo sviluppo batterico, anche la quantità di tubercolina prodotta e la conseguente reazione biologica. A tale regola fanno eccezione i maggiori dosaggi (1 %) poichè ad un aumento di sviluppo batterico non corrisponde uguale aumento dell'attività tubercolinogena (tab. 2);

5) il ceppo umano ha avuto un aumento di attività tubercolinogena in presenza di entrambi i polifosfati aggiunti al terreno alla dose di 0,3 %. Tale aumentata reazione è statisticamente significativa con probabilità del 95 %. Comportamento analogo si è avuto con la aggiunta al terreno di 0,5 % di tetrafosfato esasodico (tab. 2);

6) il ceppo bovino ha presentato un comportamento pressochè sovrapponibile; fa eccezione la tubercolina allestita con l'aggiunta del 0,5 % di sale di Graham che ha fornito dati significativi solo al 90 % di probabilità (tab. 2);

7) il metabolismo azotato, anche dopo 8 settimane di crescita, non viene alterato qualitativamente dall'aggiunta di polifosfati. È possibile rilevare tuttavia lievi variazioni di ordine quantitativo (tab. 3).

Dai dati sopra riportati è pertanto possibile concludere che l'aggiunta di tetrafosfato esasodico (0,3 % e 0,5 %) e di sale di Graham (0,3 %) stimola l'attività tubercolinogena sia del micobatterio ceppo umano che del micobatterio ceppo bovino.

5 marzo 1964

BIBLIOGRAFIA

(1) TIECCO G. e BELLANI L. - Atti Soc. Ital. Sci. Vet. 16, 565 (1962).

L'emoglobina di anfi

II. — Caratterizzazione dell'emoglobina di axolotl messicano: proprietà chimico-fisiche e composizione in aminoacidi.

LEONARDO TENTORI, GEROLAMO VIVALDI, SALVATORE CARTA,
ANNA M. SALVATI (*), MARIELLA SORCINI (*) e STEFANIA VELANI (*)

Laboratori di Biologia

Riassunto. — L'emoglobina di axolotl messicano è stata purificata mediante cromatografia su carbossimetilcellulosa. Sono state studiate alcune caratteristiche chimico-fisiche della emoproteina per la quale è stato calcolato un peso molecolare di circa 68.000. Con metodi elettroforetici e cromatografici l'emoglobina di axolotl è stata risolta in due componenti omogenei. È stata determinata la composizione in aminoacidi ed il contenuto di gruppi SH reattivi.

Summary. — The hemoglobin from Mexican Axolotl has been purified through carboxymethylcellulose chromatography. Some physico-chemical properties of the hemoprotein have been studied; its molecular weight as calculated by means of the Scheraga and Mandelkern equation lies around 68,000. Starch gel electrophoresis, as well as carboxymethylcellulose chromatography resulted into the separation of two homogeneous heme-containing components. Aminoacid composition and contents of -SH reactive groups are reported.

Nel corso di una ricerca sistematica sulla struttura della emoglobina di anfi è stata studiata l'emoglobina di axolotl messicano; come è noto l'axolotl messicano è la forma neotenuca dell'*Ambystoma tigrinum*.

PARTE SPERIMENTALE

Emoglobina. — Sono stati usati individui adulti dei due sessi, della lunghezza di circa 25 cm della specie *Ambystoma tigrinum* nello stadio neotenuca. Il sangue è stato prelevato mediante puntura cardiaca e raccolto su

(*) Borsista dei Laboratori di Biologia.

soluzione ACD a 4°. Gli eritrociti sono stati separati dal plasma per centrifugazione a $1500 \times g$ per 10' e lavati quattro volte con soluzione salina isotonica 6,5‰. L'emolisi è stata ottenuta con aggiunta di 2 volumi di H₂O dist. e 0.4 volumi di tetracloruro di carbonio; la soluzione di emoglobina è stata separata dal coagulo gelatinoso mediante centrifugazione a $2500 \times g$ per 20' e dagli stromi con una ulteriore centrifugazione a $20.000 \times g$ per 30'.

Tutte le operazioni di centrifugazione sono state eseguite alla temperatura di 4°. L'emoglobina nativa così ottenuta è stata trasformata nel derivato cianometà (HiCN) aggiungendo 2 gocce di K₂Fe(CN)₆ al 5% e, dopo 15', due gocce di KCN al 10%.

Le soluzioni di Hb nativa e di HiCN sono state di volta in volta controllate allo spettrofotometro Beckman registratore e la loro concentrazione è stata determinata prelevando una aliquota di esse e determinandone il peso secco dopo permanenza in stufa a 110° per due ore; nella determinazione si teneva conto, quando necessario, del peso secco del tampone presente.

Separazione della emoglobina dalle proteine non emoglobiniche presenti nell'emolizzato. — È stata usata la cromatografia su colonne di carbossimetilcellulosa (CMC) di 1×20 cm equilibrate con tampone fosfati 0,01 M/pH 6,6 contenente lo 0,1‰ di KCN. I campioni opportunamente dializzati di emoglobina venivano adsorbiti sulla colonna; l'eluzione delle proteine non emoglobiniche era completa con 75 ml dello stesso tampone fosfati pH 6,6, l'eluzione della emoglobina veniva allora ottenuta con 50 ml di tampone fosfati 0,1 M pH 7,8. Tutte le operazioni sono state eseguite alla temperatura di 4°.

Determinazione dell'azoto. — Le determinazioni dell'azoto sono state eseguite con il micrometodo di Dumas (Coleman mod. 29 Nitrogen Analyzer). Sono state usate soluzioni di emoglobina con concentrazioni tra l'1 ed il 5%. Aliquote di 50-200 µl di queste soluzioni venivano deposte in navette di alluminio e portate a secco in stufa a 110° per due ore. Dopo la determinazione del peso secco eseguita detraendo, quando necessario, il peso dei sali contenuti nel tampone, le stesse navette venivano usate per la determinazione del contenuto in azoto.

Spettri di assorbimento. — Gli spettri di assorbimento sono stati determinati mediante lo spettrofotometro Beckman registratore mod. DK2 nel visibile fra 700 e 500 mµ su soluzioni di Hb nativa e su soluzioni di HiCN in tampone fosfati 0,01 M pH 6,6 contenente lo 0,1‰ di KCN.

Esperimenti di sedimentazione e viscosimetria ().* — Gli esperimenti di sedimentazione sono stati eseguiti in ultracentrifuga Spinco mod. E con soiu-

(*) Gli esperimenti di sedimentazione sono stati eseguiti nei Laboratori di Fisica dell'Istituto. Ringraziamo il prof. Mario Ageno per l'ospitalità e la d.ssa Clara Frontali, che ha effettuato le misure, per la cordiale collaborazione.

zioni di HiCN, alle concentrazioni di 0,15, 0,30 e 0,50 %, in tampone fosfati 0,1 M pH 7,2, le corse sono state eseguite a 59780 rpm, a 20°, nella cella standard di 12 mm; è stato usato un filtro rosso per eliminare l'esposizione irregolare dovuta al colore della emoglobina; le lastre fotografiche sono state lette con un microcomparatore.

Le misure di viscosimetria sono state eseguite su soluzioni di HiCN alle concentrazioni di 1, 1,5 e 3 % in tampone fosfati pH 7,2, 0,01 M, alla temperatura di 20° con un viscosimetro tipo Ostwald a capillare allungato con tempo di scorrimento di 280".

Denaturazione con alcali. — Sono state usate soluzioni di HiCN alla concentrazione dello 0,1 %. Il fenomeno della denaturazione alcalina è stato seguito con il metodo spettrofotometrico descritto in una precedente pubblicazione (1).

Elettroforesi. — Gli esperimenti di elettroforesi su gel di amido sono stati eseguiti con la tecnica di Smithies (2) con sistema di tamponi secondo HUISMAN (3) (tris EDTA borato 0,03 M pH 9 per il gel e borato 0,3 M, pH 9 per gli elettrodi) con un gradiente di voltaggio di 15 v/cm su 22 cm per 7 h alla temperatura di 5° ottenuta con una piastra di Perspex raffreddata a mezzo di circolazione di acqua (4). Sono state usate soluzioni di HiCN alla concentrazione del 2,5 %.

Cromatografia. — Gli esperimenti di cromatografia sono stati eseguiti in camera fredda a 4° con carbossimetilcellulosa (CMC) preparata secondo PETERSON e SOBER (*). Sono state usate colonne di 50 × 1 cm equilibrate con tamponi fosfati 0,01 M pH 6,6 contenente lo 0,1 ‰ di KCN. I campioni contenenti circa 150 mg di HiCN sono stati dializzati contro il suddetto tampone ed il pH finale è stato corretto a 6,6 quando necessario.

La soluzione dializzata è stata adsorbita sulla colonna senza applicazione di pressione esterna. L'eluzione è stata eseguita con un gradiente continuo del pH del tampone fosfato a molarità costante con un sistema aperto a 3 bottiglie: ciascuna bottiglia conteneva 100 ml di tampone fosfato 0,01 M contenente lo 0,1 ‰ di KCN; il tampone limitante aveva un pH 8,0 ed era contenuto nelle prime due bottiglie del sistema, la terza bottiglia conteneva il tampone iniziale a pH 6,6; il flusso costante di 10 ml per ora era ottenuto per mezzo di una micropompa dosatrice. Il procedere del frazionamento è stato seguito con un apparecchio Uvicord a registrazione continua della trasmissione alla lunghezza d'onda di 253 m μ ; sulle frazioni di 3 ml ciascuna venivano determinate la densità ottica a 415 m μ in uno spettrofotometro Beckman DU, ed il pH al pHmetro Radiometer PHM 23.

(*) Fornita dalla Ditta Serva - Entwicklungslabor - Heidelberg.

Analisi degli idrolizzati acidi. — A 0,5 — 1 ml di soluzione di HiCN, su una aliquota della quale era stato determinato il peso secco (mg 8-10 di proteina), veniva aggiunto un egual volume di HCl concentrato Mallinckrodt a punto di ebollizione costante. L'idrolisi è stata eseguita in fiale saldate sotto un vuoto di 10-15 mm Hg in stufa a 110° per 20 h, 50 h e 70 h; per ciascun tempo di idrolisi è stato allestito un doppio campione. Gli idrolizzati sono stati evaporati a secco sotto vuoto in presenza di KOH in gocce a temperatura ambiente ed il residuo secco disciolto in 1 ml di H₂O distillata. Una aliquota di questa soluzione è stata usata per la determinazione del peso secco e dell'azoto, il rimanente è stato opportunamente diluito in tampone citrato 0,2 N pH 2,20; aliquote di questa soluzione venivano usate per la determinazione del contenuto in aminoacidi. La composizione in aminoacidi degli idrolizzati è stata determinata col metodo di SPACKMAN, STEIN e MOORE (5) con un Aminoacid Analyzer Beckman Spinco Mod. 120.

Il contenuto di triptofano è stato determinato sulla proteina intera sia con il metodo spettrofotometrico diretto di GOODWIN e MORTON (6) che con il metodo della N-Bromosuccinimide di RAO e CAMA (7).

Determinazione dei gruppi SH-reattivi. — La determinazione dei gruppi SH reattivi è stata eseguita sulla emoglobina nativa col metodo di BOYER al p-idrossimercuri-benzoato (8) e col metodo di COLE, STEIN e MOORE (9), per reazione con la iodoacetamide e successiva determinazione della carbossimetilcisteina.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella fig. 1 sono riportati gli spettri di adsorbimento nel visibile tra 500 e 700 m μ dell'emoglobina nativa e del derivato HiCN in tampone fosfati 0,01 M pH 6,6.

Il quadro della sedimentazione della HiCN dimostra la presenza di un solo componente con fronte di sedimentazione apparentemente omogeneo e simmetrico e con una costante di sedimentazione $S_{20^{\circ}\text{w}} = 4,15$.

Dalle misure della viscosità eseguite è stato ricavato il valore della viscosità intrinseca $[\eta] = 0,025$.

Il peso molecolare della emoglobina è stato calcolato dai valori della costante di sedimentazione e della viscosità intrinseca applicando l'equazione di SCHERAGA e MANDELKERN (10). Assumendo per β il valore $2,16 \cdot 10^6$ e per \bar{V} , volume parziale specifico della proteina, il valore di 0,737 calcolato in base alla composizione in aminoacidi riportata in seguito il peso molecolare è risultato essere di circa 68000.

Nella fig. 2 è rappresentato una tipica curva della denaturazione alcalina seguita nei primi 10' dall'inizio della reazione. Sono state usate soluzioni di HiCN poichè recentemente HUEHNS (11) ha ottenuti buoni risultati

usando questo derivato in alcune sue ricerche su vari tipi di emoglobine e su ibridi da esse derivati. Il grafico non ha andamento esponenziale, pertanto se si facesse l'ipotesi che una emoglobina omogenea si denaturi con una

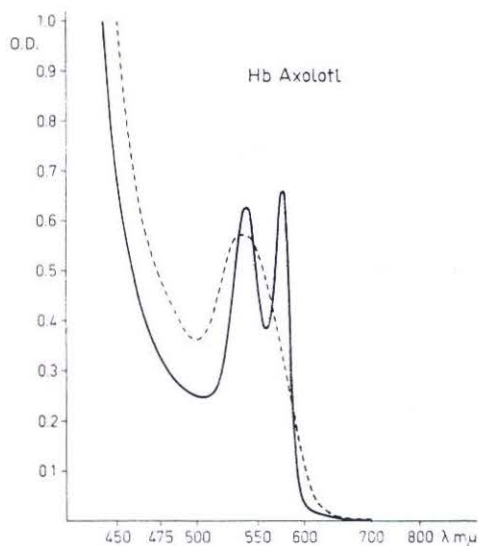


Fig. 1. — Spettri di assorbimento nel visibile.
 linea tratteggiata: HiCN
 linea continua: Hb nativa

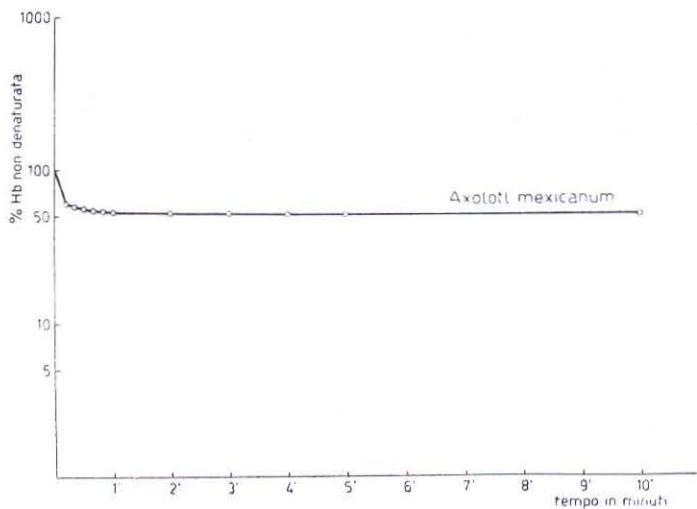


Fig. 2. — Curva della denaturazione della emoglobina di axolotl eseguita con NaOH 0,025 N.

cinetica di 1° ordine si potrebbe concludere che l'emoglobina di Axolotl è composta di due frazioni con alcali resistenza diversa.

I risultati degli esperimenti di elettroforesi su gel di amido sono riportati nella fig. 3. Sono rappresentate due emisezioni di una stessa piastrina colorate una con amido Schwartz e l'altra con benzidina: è evidente la pre-

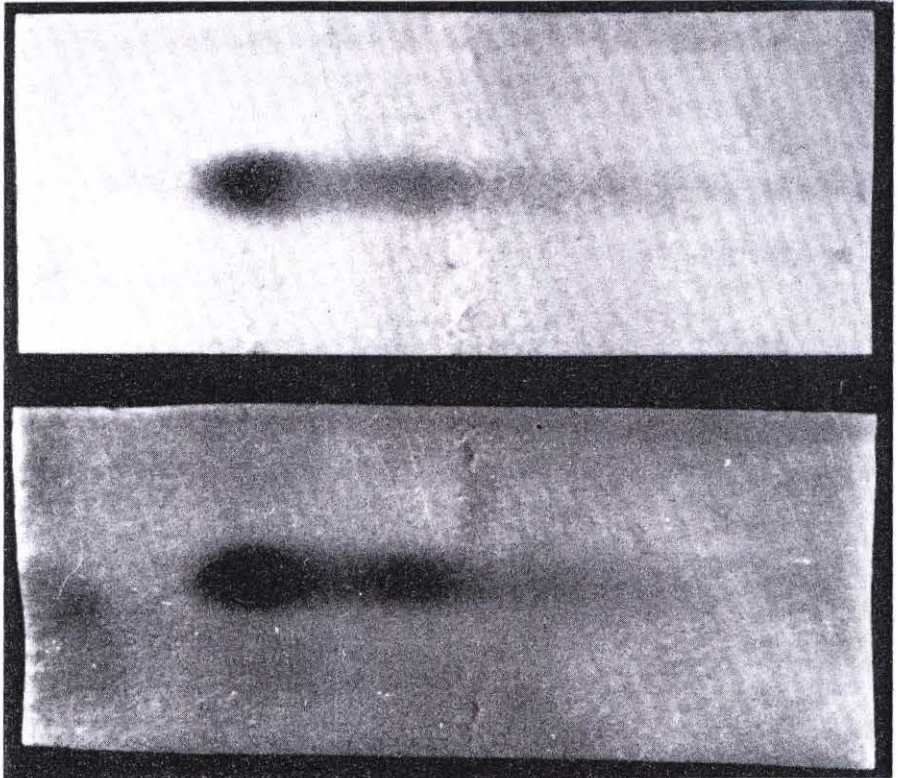


Fig. 3. — Elettroforesi su gel di amido di emoglobina di axolotl.
 Metà superiore: colorazione con benzidina
 Metà inferiore: colorazione con amidoschwartz.

senza di due componenti di natura emoglobinica a differente mobilità elettroforetica dei quali il più veloce ha una netta prevalenza quantitativa; gli esperimenti di cromatografia analitica su CMC hanno confermato questo risultato (fig. 4): a parte le proteine non emoglobiniche che emergono con le prime frazioni sono infatti presenti due componenti dei quali quello che emerge a un pH più basso ha una netta prevalenza quantitativa.

La composizione in aminoacidi della emoglobina totale di axolotl è riportata nella tabella 1. È stato eseguito il calcolo dei residui di ciascuno

TABELLA 1

Analisi degli amino-acidi degli idrolizzati di emoglobina di axolotti messicano.

	Grammi di amino-acidi per 100 grammi di proteina	Residui di amido-acidi per 100 grammi di proteina:grammi	N. % dell'azoto totale	Numero dei residui calcolati per P. M. 68000	Numero del residuo all'intero più vicino
Lisina	7,95	6,97	10,36	43,08	43
Istidina	8,24	7,28	15,16	41,97	42
N-NH ₂	1,01	—	6,93	(44,30)	(44)
Arginina	4,84	4,34	10,58	22,04	22
Asparagina	9,45	8,17	6,76	56,33	56
Treonina	4,40	3,73	3,13	29,33	29
Serina	4,47	3,70	3,14	35,20	35
Glutamina	8,08	7,09	5,23	43,59	44
Prolina	1,99	1,68	1,65	13,65	14
Glicina	2,64	2,01	3,35	27,81	28
Alanina	6,73	5,37	7,19	59,87	60
Cistina ½	2,40	2,04	1,90	15,87	16
Valina	6,20	5,25	5,05	41,97	42
Metionina	3,56	3,13	2,26	18,91	19
Isoleucina	3,55	3,06	2,58	21,44	21
Leucina	10,80	9,32	6,56	65,33	65
Tirosina	3,39	3,05	1,78	14,87	15
Fenilalanina	6,24	5,58	3,60	29,22	29
Triptofano	1,72	1,57	1,60	6,70	7
Totale	97,66	83,34	98,81	—	—
Eme	3,63	3,63	2,24	—	—
TOTALE	101,29	86,97	101,05	Residui sub-unità	146
				Peso molecolare calcolato	69.454

degli aminoacidi presenti assumendo un peso molecolare di 68000 ed è stato trovato che sono presenti 587 residui per molecola di emoglobina, pari a 147 residui per sub-unità, qualora si ammetta che ciascuna molecola sia composta di quattro catene polipeptidiche. Nel caso della treonina e della serina che vengono parzialmente distrutte durante l'idrolisi acida i risultati riportati nella tabella sono stati ottenuti estrapolando linearmente al tempo

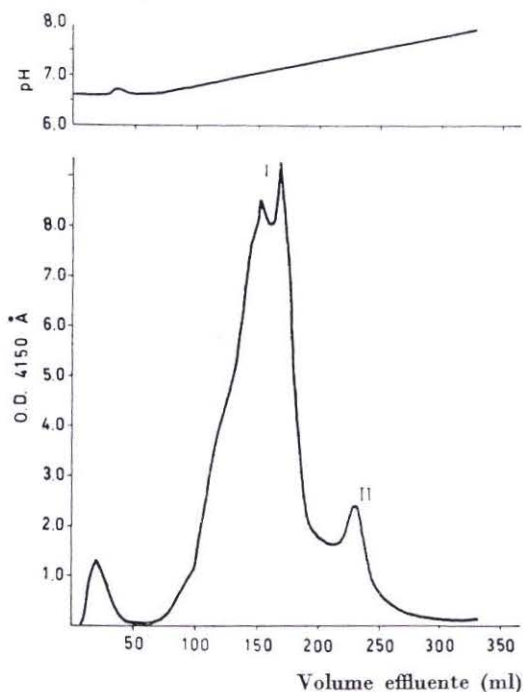


Fig. 4. — Cromatografia su colonna di CM - cellulosa.

0 le rese ottenute nei vari tempi di idrolisi; analogo procedimento è stato seguito per il calcolo dell'azoto amidico.

Nel calcolo dei recuperi della valina e della isoleucina non è stato tenuto conto del tempo di idrolisi di 20 h perchè, come è noto, la rottura dei legami peptidici di questi aminoacidi richiede un tempo di idrolisi più prolungato. I dati riguardanti il triptofano rappresentano la media dei risultati ottenuti con il metodo spettrofotometrico diretto e con il metodo della N-bromosuccinimide su quattro campioni. I valori per tutti gli altri aminoacidi sono stati dedotti dalla media dei risultati ottenuti nei vari tempi di idrolisi.

Il calcolo dei residui è stato effettuato partendo dalla media dei recuperi degli aminoacidi stabili: acido aspartico, acido glutammico, glicina,

alanina, leucina, fenilalanina, lisina ed arginina. Sono stati calcolati i rapporti molari tra questi aminoacidi, ed i loro recuperi sono stati corretti in base ai rapporti molari calcolati: da questi valori è stato derivato un equivalente minimo molare per ciascuno degli aminoacidi stabili e la media degli equivalenti minimi molari ottenuti è stata impiegata per calcolare i rapporti molari di tutti gli aminoacidi. Il recupero dell'azoto è stato calcolato partendo dai valori ottenuti nelle determinazioni eseguite con il micrometodo di DUMAS sulla soluzione di emoglobina prima dell'idrolisi e su aliquote dei vari campioni dopo l'idrolisi acida: come risulta dalla tabella il ricupero dell'azoto è del 101 % se si tiene conto nel calcolo anche dell'azoto contenuto in 7 residui di triptofano ed in 4 eme. Il recupero ponderale è stato tuttavia più basso essendo dell'86,97 %; questo fenomeno potrebbe essere spiegato con la capacità delle proteine di legare gli anioni del tampone salino durante l'eluzione dalle colonne cromatografiche; bassi recuperi ponderali nelle analisi degli aminoacidi sono stati riscontrati anche da EDMUNDSON e HIRS (12) da CRAMPTON, MOORE e STEIN (13) e da LEVY, GESCHWIND e LI (14) e da noi stessi in un altro esperimento sulla emoglobina di rana (15). Il numero dei residui, 587, non si discosta sensibilmente da quello della emoglobina umana, 574, ed è praticamente uguale a quello della emoglobina di rana esculenta, 584 (15). Tuttavia notevoli differenze con l'emoglobina umana esistono nel contenuto in amidi ed in aminoacidi basici, le amidi sono infatti 44 nell'emoglobina di axolotl e 28 nell'emoglobina umana, e gli aminoacidi basici sono rappresentati complessivamente da 107 residui nella emoglobina di axolotl e da 94 nella emoglobina umana; altre differenze di rilievo esistono per quanto riguarda la prolina, 14 residui, contro 28 residui nell'emoglobina umana, ed il contenuto in aminoacidi solforati metionina e cistina, 35 residui contro 12 residui complessivi nell'emoglobina umana. Il numero di gruppi SH « reattivi » trovato per l'emoglobina di axolotl è stato in media nei nostri esperimenti di circa 12 per molecola. È noto che il problema della determinazione dei gruppi SH reattivi in una proteina è piuttosto complesso, non esistendo un metodo sufficiente, da solo, a fornire informazioni conclusive; pertanto è opportuno usare, per una stessa proteina, metodi basati su differenti reazioni.

Nel presente esperimento con il metodo di BOYER al p-idrossimercurio benzoato sono stati titolati 12 gruppi SH reattivi e con il metodo di COLE, STEIN e MOORE sono stati determinati 12 residui di carbossimetileisteina per mole di emoglobina nativa.

Gli Autori ringraziano vivamente i Sigg. LUIGI MANGIONE, GIULIO PECCI e GIANCARLO SEVERINI per la preziosa ed intelligente assistenza tecnica.

16 marzo 1964.

BIBLIOGRAFIA

- (1) TENTORI L., VIVALDI G., CARTA S., SALVATI A. M., SORCINI M. e VELANI S.: *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 39, 2051 (1963).
- (2) SMITHIES O.: *Biochem., J.* 61, 629 (1955).
- (3) HUISMAN T. H. J.: *Clin. Chim. Acta*, 5, 709 (1960).
- (4) CARTA S. e SORCINI M.: *Giorn. Biochim.* (in corso di stampa).
- (5) SPACKMAN D. H., STEIN W. H., MOORE S.: *Anal. Chem.* 30, 1190 (1958).
- (6) GOODWIN T. W. e MORTON R. A.: *Biochem. J.* 40, 628 (1946).
- (7) RAO G. J. S. e CAMA H. R.: *Biochim. Biophys. Acta* 71, 139 (1963).
- (8) BOYER P. D.: *J. Am. chem. Soc.* 76, 4331 (1954).
- (9) COLE R. D., STEIN W. H. e MOORE S.: *J. Biol. Chem.* 233, 1359 (1958).
- (10) SCHERAGA H. A., MANDELKERN K. O.: *J. Am. Chem. Soc.* 75, 179 (1953).
- (11) HUEHNS E. R.: *J. Mol. Biol.* 4, 323 (1962).
- (12) EDMUNDSON A. B., HIRS C. H. W.: *J. Mol. Biol.* 5, 663 (1962).
- (13) CRAMPTON C. F., MOORE S. L. STEIN W. F.: *J. Biol. Chem.* 215, 787 (1955).
- (14) LEVY A. L., GESCHWIND I. I. e LI C. H.: *J. Biol. Chem.* 213, 187 (1955).
- (15) TENTORI L., VIVALDI G., CARTA S., SALVATI A. M., SORCINI M., VELANI S.: *Ann. Ist. Super. Sanità* 1, 181 (1965).

L'emoglobina di anfibii

III. — Caratterizzazione della emoglobina di *Rana esculenta*: proprietà chimico-fisiche e composizione in aminoacidi.

LEONARDO TENTORI, GEROLAMO VIVALDI, SALVATORE CARTA,
ANNA M. SALVATI (*), MARIELLA SORCINI (*) e STEFANIA VELANI (*)

Laboratori di Biologia

Riassunto. — L'emoglobina di *Rana esculenta* è stata purificata mediante cromatografia su carbossimetilcellulosa. Sono state studiate alcune caratteristiche chimico fisiche della emoproteina per la quale è stato calcolato un peso molecolare di circa 68.000, ed è stato determinato il contenuto di gruppi -SH reattivi.

Con metodi elettroforetici e cromatografici l'emoglobina di *Rana esculenta* è stata risolta rispettivamente in cinque ed in tre componenti omogenei.

La composizione in aminoacidi della emoglobina totale e dei tre componenti isolati cromatograficamente è stata determinata con il metodo di SPACKMAN, STEIN e MOORE.

Summary. — The hemoglobin from adult male *Rana esculenta* has been purified through carboxymethylcellulose chromatography. Some physico-chemical properties of the hemoprotein have been studied, its molecular weight, as calculated by means of the Scheraga and Mandelkern equation, lies around 68,000; contents of the -SH reactive groups have been determined. *Rana esculenta* hemoglobin has been resolved respectively into five and three heme-containing homogeneous components by starch gel electrophoresis and by carboxymethylcellulose chromatography.

Aminoacid composition of unfractionated hemoglobin and of the three chromatographically separated components was determined by the SPACKMAN, STEIN and MOORE technique.

I dati fino ad oggi pubblicati sulla emoglobina di anfibii riguardano alcune caratteristiche fisico-chimiche ed alcune differenze funzionali fra le emoglobine di individui allo stadio larvale e di individui adulti.

(*) Borsista dei Laboratori di Biologia.

La costante di sedimentazione delle emoglobine di *Salamandra maculosa*, di *Rana temporaria*, di *Bufo valliceps* e di *Bufo viridis* è stata determinata da SVEDBERG (1) e confermata per la *Rana catesbeiana* da RIGGS (2) e da TRADER e coll. (3) i quali hanno studiato anche la sedimentazione delle emoglobine di *Rana grylio*, di *Rana pipiens* e di *Xenopus laevis*. Queste ricerche hanno permesso di stabilire che le emoglobine studiate hanno un peso molecolare di circa 68000, e che presentano in genere, ad eccezione della rana temporaria, un secondo componente a peso molecolare doppio e, nel caso del *Bufo valliceps*, un terzo componente a peso molecolare quadruplo.

Altre caratteristiche studiate sono l'assorbimento a 291 m μ (4) e la mobilità elettroforetica su carta (5).

Dal punto di vista funzionale RIGGS (1) ha messo in evidenza che l'emoglobina di girino di *Rana catesbeiana* ha una curva di equilibrio con l'ossigeno differente da quella dell'emoglobina dell'individuo adulto: ambedue hanno un andamento sigmoide, ma solo per l'emoglobina di *Rana catesbeiana* adulta è possibile mettere in evidenza l'effetto Bohr. A queste differenze funzionali corrispondono alcune differenze nella mobilità elettroforetica e cromatografica, nella denaturabilità agli alcali, nella biosintesi, nel contenuto di gruppi SH-reattivi e nelle curve di sedimentazione all'ultracentrifuga (6, 7, 3).

Molto recentemente BAGLIONI e SPARKS (8) hanno pubblicato uno studio sulla differenziazione della emoglobina della *Rana catesbeiana* nel quale vengono riportati dati sulla eterogeneità della emoglobina, sul quadro peptidico dell'idrolizzato triptico e sulle catene peptidiche.

Nel presente lavoro vengono esposti i primi dati relativi alla caratterizzazione della emoglobina di *Rana esculenta* adulta.

PARTE SPERIMENTALE

Emoglobina. — Sono state usate rane di sesso maschile della specie *Rana esculenta* L. Il sangue è stato prelevato mediante puntura cardiaca e raccolto su soluzione ACD a 4°. Gli eritrociti sono stati separati dal plasma per centrifugazione a 1500 \times g per 10' e lavati 4 volte con soluzione salina isotonica 6,5 ‰. L'emolisi è stata ottenuta con aggiunta di 2 volumi di H₂O e 0,4 volumi di tetracloruro di carbonio; la soluzione di emoglobina è stata separata dal coagulo gelatinoso mediante centrifugazione a 2500 \times g per 20' e dagli stromi con una ulteriore centrifugazione a 20.000 \times g per 30'. Tutte le operazioni di centrifugazione sono state eseguite alla temperatura di 4°. L'emoglobina nativa così ottenuta è stata trasformata nel derivato cianometa (HiCN) aggiungendo 2 gocce di K₃ Fe (CN)₆ al 5 ‰ e, dopo 15', due gocce di KCN al 10 ‰. Le soluzioni di Hb nativa e di HiCN sono state di volta in volta controllate allo spettrofotometro BECKMAN registratore e

la loro concentrazione è stata determinata prelevando una aliquota di esse e determinandone il peso secco dopo permanenza in stufa a 110° per due ore; nella determinazione si teneva conto, quando necessario, del peso secco dei sali presenti nel tampone.

Separazione della emoglobina dalle proteine non emoglobiniche presenti nell'emolizzato. — È stata usata la cromatografia su colonne di carbossimetilcellulosa (CMC) di 1 × 20 cm equilibrate con tampone fosfati 0.01 M pH 6.6 contenente lo 0,1‰ di KCN quando si operava sulla HiCN. I campioni di emoglobina opportunamente dializzati venivano adsorbiti sulla colonna; l'eluzione delle proteine non emoglobiniche era completa con 75 ml dello stesso tampone fosfati pH 6,6, l'eluzione della emoglobina veniva allora ottenuta con 50 ml di tampone fosfati 0,1 M pH 7,8. Tutte le operazioni sono state eseguite alla temperatura di 4°.

Determinazione dell'azoto. — Le determinazioni dell'azoto sono state eseguite con il micrometodo di DUMAS (Coleman mod. 29 Nitrogen Analyzer). Sono state usate soluzioni di emoglobina con concentrazioni tra l'1 ed il 5%. Aliquote di 50-200 µl di queste soluzioni venivano deposte in navette di alluminio e portate a secco in stufa a 110° per due ore. Dopo la determinazione del peso secco eseguita detraendo, quando necessario, il peso dei sali contenuti nel tampone, le stesse navette venivano usate per la determinazione del contenuto in azoto.

Spettri di assorbimento. — Gli spettri di assorbimento sono stati determinati mediante lo spettrofotometro BECKMAN registratore mod. DK2 nel visibile fra 700 e 500 mµ e nell'U.V. fra 340 e 240 mµ su soluzioni di Hb nativa in acqua e su soluzioni di HiCN in tampone fosfati 0,01 M pH 6,6 contenente lo 0,1‰ di KCN.

Esperimenti di sedimentazione e viscosimetria ().* — Gli esperimenti di sedimentazione sono stati eseguiti in ultracentrifuga Spinco mod. E con soluzioni di HiCN, alle concentrazioni di 0,15, 0,30 e 0,50%, in tampone fosfati 0,1 M pH 7,2; le corse sono state eseguite a 59780 rpm, a 20°, nella cella standard di 12 mm; è stato usato un filtro rosso per eliminare l'esposizione irregolare dovuta al colore della emoglobina; le lastre fotografiche sono state lette con un microcomparatore.

Le misure di viscosimetria sono state eseguite su soluzioni di HiCN alle concentrazioni di 1, 1,5 e 3% in tampone fosfati pH 7,2, 0,01 M alla temperatura di 20° con un viscosimetro tipo Ostwald, a capillare allungato con tempo di scorrimento di 260''.

(*) Gli esperimenti di sedimentazione sono stati eseguiti nei Laboratori di Fisica dell'Istituto. Ringraziamo il prof. Mario Ageno per l'ospitalità e la d.ssa Clara Frontali, che ha effettuato le misure, per la cordiale collaborazione.

Denaturazione con alcali. — Sono state usate soluzioni di HiCN alla concentrazione dello 0,1 %. Il fenomeno della denaturazione alcalina è stato seguito con il metodo spettrofotometrico descritto in una precedente pubblicazione (9).

Elettroforesi. — Gli esperimenti di elettroforesi su gel di amido sono stati eseguiti con la tecnica di SMITHIES (10) con sistema di tamponi secondo HUISMAN (11) (tris EDTA borato 0,03 M pH 9 per il gel e borato 0,3 M, pH 9 per gli elettrodi) con un gradiente di voltaggio di 15 v/cm su 22 cm per 7 h alla temperatura di 5° ottenuta con una piastra di Perspex raffreddata a mezzo di circolazione di acqua (12). Sono state usate soluzioni di HiCN alla concentrazione del 2,5 %.

Cromatografia. — Gli esperimenti di cromatografia sono stati eseguiti in camera fredda a 4° con carbossimetilcellulosa (CMC) preparata secondo PETERSON e SOBER (*). Sono state usate colonne di 50 × 1 cm equilibrate con tampone fosfati 0,01 M pH 6,6 contenente lo 0,1 ‰ di KCN. I campioni contenenti circa 150 mg di HiCN sono stati dializzati contro il suddetto tampone ed il pH finale è stato corretto a 6,6 quando necessario.

La soluzione dializzata è stata adsorbita sulla colonna senza applicazione di pressione esterna. L'eluzione è stata eseguita con un gradiente continuo del pH del tampone fosfati a molarità costante con un sistema aperto a 3 bottiglie: ciascuna bottiglia conteneva 100 ml di tampone fosfati 0,01 M contenente lo 0,1 ‰ di KCN; il tampone limitante aveva pH 8,0 ed era contenuto nelle prime due bottiglie del sistema, la terza bottiglia conteneva il tampone iniziale a pH 6,6; il flusso costante di 10 ml per ora era ottenuto per mezzo di una micropompa dosatrice. Il procedere del frazionamento è stato seguito con un apparecchio Uvicord a registrazione continua della trasmissione alla lunghezza d'onda di 253 m μ ; sulle frazioni di 3 ml ciascuna venivano determinate la densità ottica a 415 m μ in uno spettrofotometro BECKMAN DU, ed il pH al pHmetro Radiometer PHM 23. Le frazioni corrispondenti a ciascuno dei componenti isolati cromatograficamente sono state riunite e concentrate mediante ultrafiltrazione prima di essere usate per gli ulteriori esperimenti.

Preparazione della globina. — La globina è stata preparata secondo il metodo di ANSON e MIRSKY modificato da ROSSI-FANELLI e coll. (13). A soluzioni di emoglobina al 3 % in acqua, a 4°, sono stati aggiunti 40 volumi di acetone e in due riprese a distanza di 1/2 ora, 8 cm³ di HCl N per litro di acetone. Il precipitato è stato raccolto per centrifugazione a -20° per 30' a 1800 × g e lavato 3 volte con la stessa miscela acetone -HCl. Il prodotto finale, essiccato, è stato conservato a -20°.

(*) Fornita dalla Ditta Serva - Entwicklungslabor - Heidelberg.

Analisi degli idrolizzati. — A 0,5 — 1 ml di soluzione di HiCN, su una aliquota della quale era stato determinato il peso secco (mg 8-10 di proteina) ed il contenuto di azoto, veniva aggiunto un egual volume di HCl Mallinckrodt, a punto di ebollizione costante. L'idrolisi è stata eseguita in fiale saldate sotto un vuoto di $10-15 \times 10^{-3}$ mm Hg in stufa a 110° per 20 h, 50 h e 70 h; per ciascun tempo di idrolisi è stato allestito un doppio campione. Gli idrolizzati sono stati evaporati a secco sotto vuoto in presenza di KOH in gocce, a temperatura ambiente ed il residuo secco disciolto in 1 ml di H_2O distillata. Una aliquota di questa soluzione è stata usata per la determinazione del peso secco e dell'azoto; il rimanente è stato opportunamente diluito in tampone citrato 0.2 N pH 2.20; aliquote di questa soluzione venivano usate per la determinazione del contenuto di aminoacidi. La composizione in aminoacidi degli idrolizzati è stata determinata col metodo di SPACKMAN, STEIN e MOORE ⁽¹⁴⁾ con un Aminoacid Analyzer Beckman Spinco Mod. 120.

Il contenuto di triptofano è stato determinato sulla proteina intera sia con il metodo spettrofotometrico diretto di GOODWIN e MORTON ⁽¹⁵⁾ che con il metodo della N-Bromosuccinimide di RAO e CAMA ⁽¹⁶⁾.

Determinazione dei gruppi SH-reattivi. — La determinazione dei gruppi SH-reattivi è stata eseguita sulle emoglobine native e sulla HiCN col metodo di BOYER al p-idrossimercuri-benzoato ⁽¹⁷⁾ e sulla emoglobina nativa con il metodo di COLE, STEIN e MOORE ⁽¹⁸⁾, per reazione con la iodoacetamide e successiva determinazione della carbossimetilcisteina.

Digestione enzimatica. — La HiCN è stata digerita completamente per azione di enzimi secondo il metodo descritto da HILL e SCHMIDT ⁽¹⁹⁾. Sono stati usati mercuri-papaina Worthington con attività specifica = 5, Leucin-aminopeptidasi preparata da rene di maiale secondo il metodo di HILL e coll. ⁽²⁰⁾ con $C_1 = 25$ e Prolidasi preparata da rene di maiale secondo il metodo di DAVIS e SMITH ⁽²¹⁾ con $C_1 = 2$. Il digerito finale è stato diviso in tre aliquote: la prima è stata usata per la determinazione del peso secco e del contenuto di azoto, la seconda per l'analisi degli aminoacidi presenti nell'idrolizzato enzimatico, la terza è stata sottoposta ad idrolisi con HCl 2 N (preparato da HCl distillato tre volte su vetro) in tubo chiuso sotto un vuoto di $10-15 \times 10^{-3}$ mmHg in stufa a 110° per 6 ore e quindi anche essa analizzata per la composizione in aminoacidi.

RISULTATI

Il quadro della sedimentazione della HiCN totale dimostra la presenza di un solo componente con fronte di sedimentazione apparentemente omogeneo e simmetrico. Le costanti di sedimentazione sono in funzione della concentrazione della proteina; sebbene il colore della emoglobina impedisca l'effettuazione di misure di sufficiente precisione al di sopra di una concen-

trazione di 5 mg per ml, mediante estrapolazione a diluizione infinita è stato possibile calcolare il valore di $S_{20^{\circ}\text{w}}^0 = 4,69$. Nella tabella I sono riportati i valori di $S_{20^{\circ}\text{w}}$ relativi alle diverse concentrazioni di emoglobina usate nell'esperimento. Le misure viscosimetriche hanno permesso di determinare la viscosità intrinseca $[\eta] = 0,025$.

TABELLA I

Relazione tra la concentrazione e la costante di sedimentazione della emoglobina totale di rana in soluzione tampone fosfati 0,1 M pH 7,2

Concentrazione o/o	$S_{20^{\circ}\text{w}}$
0,15	4,58
0,30	4,48
0,50	4,34

Il peso molecolare della emoglobina totale, calcolato dalla costante di sedimentazione $S_{20^{\circ}\text{w}}^0$ e dalla viscosità intrinseca secondo l'equazione di SCHERAGA e MANDELKERN⁽²²⁾ è risultato = 68000. Per β è stato assunto il valore di $2,16 \cdot 10^6$, mentre il volume parziale specifico della proteina $\bar{V} = 0,736$ è stato calcolato in base alla composizione in aminoacidi riportata nella tabella.

Il fenomeno della denaturazione alcalina è stato studiato adoperando come soluzione denaturante NaOH 0,025 N; tale concentrazione si è dimostrata la più conveniente per una migliore riproducibilità dei dati. Una tipica curva di denaturazione è rappresentata nella fig. 1. Il grafico non ha

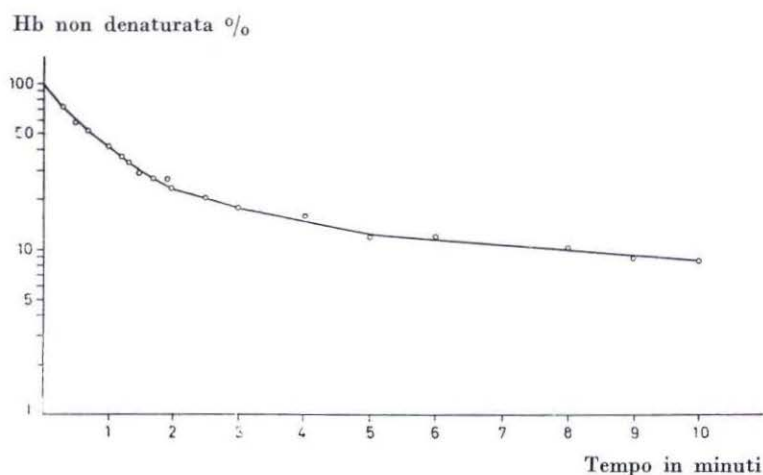


Fig. 1. — Curva di denaturazione della emoglobina di rana.

andamento esponenziale, pertanto se si facesse l'ipotesi che una emoglobina omogenea si denatura con una cinetica di primo ordine si potrebbe concludere che l'emoglobina esaminata presenta due frazioni con alcali resistenza diversa.

Con gli esperimenti di elettroforesi su gel di amido è stata ottenuta la separazione di cinque componenti di natura emoglobinica; tre di essi prevalgono quantitativamente mentre il componente più rapido ed il componente più lento sono presenti in piccola quantità (fig. 2).

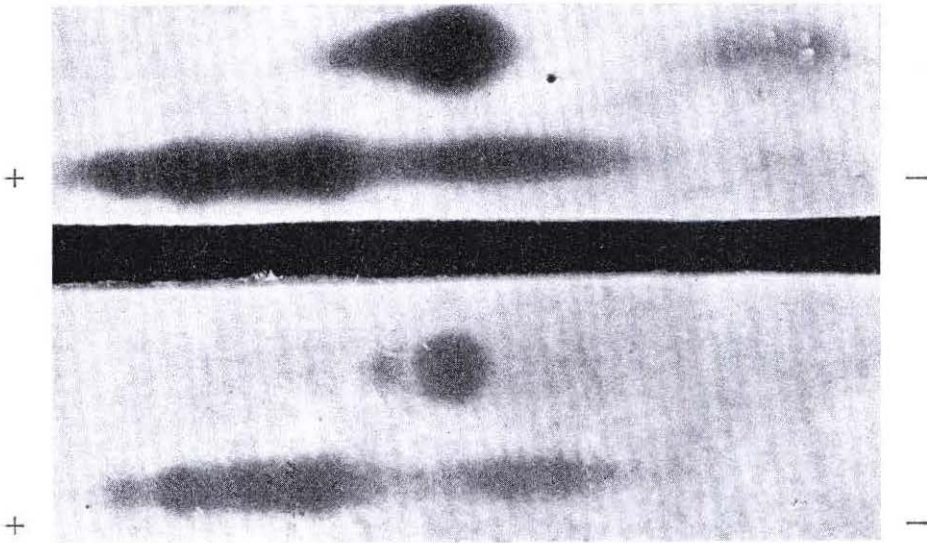


Fig. 2. — Elettroforesi su gel di amido di emoglobina di rana in confronto con la emoglobina umana. La emoglobina umana appare in alto in ciascuna delle due emisezioni della piastra di gel. L'emisezione superiore è stata sviluppata con benzidina, l'emisezione inferiore con amido schwartz.

Sebbene la maggior parte degli esperimenti, come quello rappresentato nella figura, siano stati eseguiti sul « pool » del sangue di un gruppo di rane, alcuni esperimenti sono stati condotti sulla emoglobina proveniente da singoli individui: il quadro elettroforetico su gel di amido non ha presentato variazioni; ciò dimostra che la presenza dei cinque componenti non è il risultato dell'unione, nello stesso campione, di emoglobine provenienti da varietà diverse di *Rana esculenta*, nè di differenze individuali dovute ad altre cause.

Nella fig. 3 è rappresentata una tipica curva di eluzione della H_1CN di rana ottenuta per cromatografia su colonna di CMC con gradiente continuo del pH del tampone fra 6,6 e 8. Le proteine non contenenti eme vengono eluite molto rapidamente dai primi 50 ml di tampone; la loro presenza viene

svelata dalla registrazione della trasmissione alla lunghezza di onda di 253 $m\mu$; per chiarezza nella figura sono rappresentati solo i valori delle misure effettuate a 415 $m\mu$. La HiCN viene risolta in tre componenti che emergono

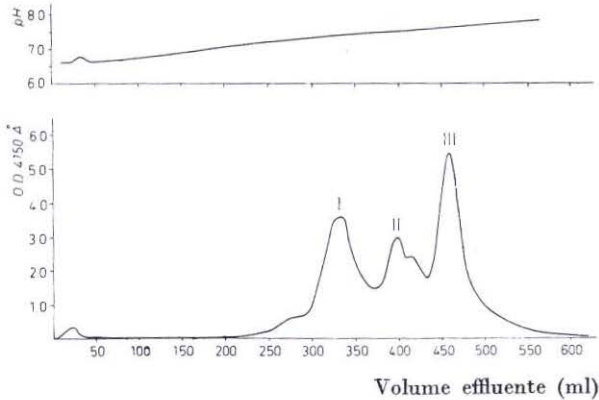


Fig. 3. — Curva di eluzione della HiCN di rana da cromatografia su colonna di CMC.

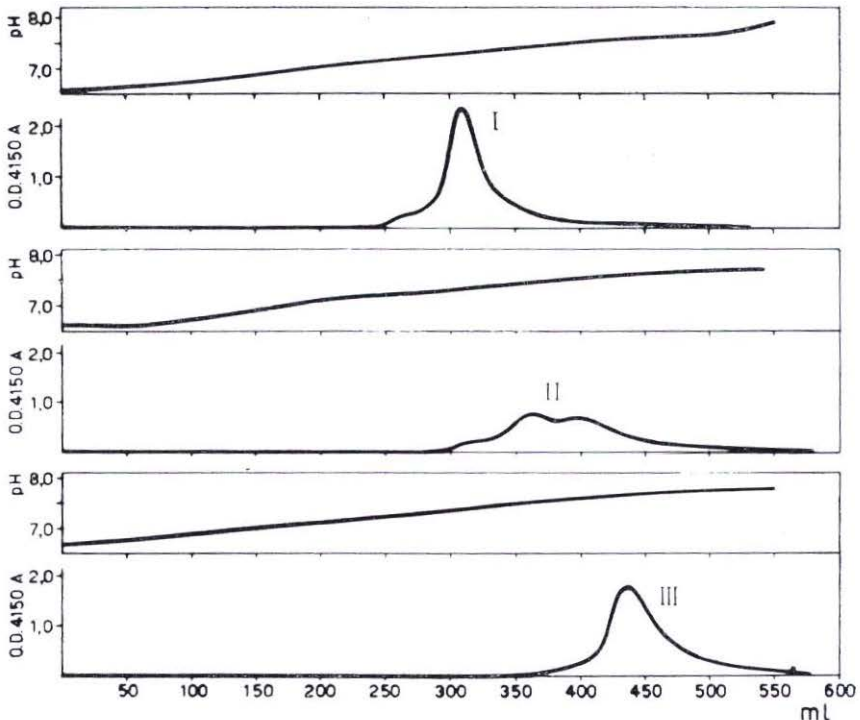


Fig. 4. — Ricromatografia delle emoglobine I, II, III separate nell'esperimento della fig. 3.

a pH 7,37, 7,50 e 7,61 rispettivamente, in rapporti quantitativamente equivalenti; il ricupero della emoglobina (determinato spettrofotometricamente) è di circa l'80-85 %.

La omogeneità cromatografica dei tre componenti separati è stata dimostrata con un esperimento di ricromatografia. Con opportuni tagli sono state raccolte separatamente le frazioni di effluente corrispondenti ai tre componenti; dopo dialisi e concentrazione per ultrafiltrazione ciascuno dei tre componenti è stato separatamente sottoposto a cromatografia sulla stessa colonna e nelle stesse condizioni usate nell'esperimento originale. I risultati ottenuti (fig. 4) dimostrano che ciascuno dei componenti si comporta come una specie molecolare omogenea.

Una aliquota della soluzione concentrata di ciascuno dei tre componenti è stata dializzata e sottoposta ad elettroforesi su gel di amido; l'esperimento (fig. 5) ha dimostrato che i tre componenti principali che vengono

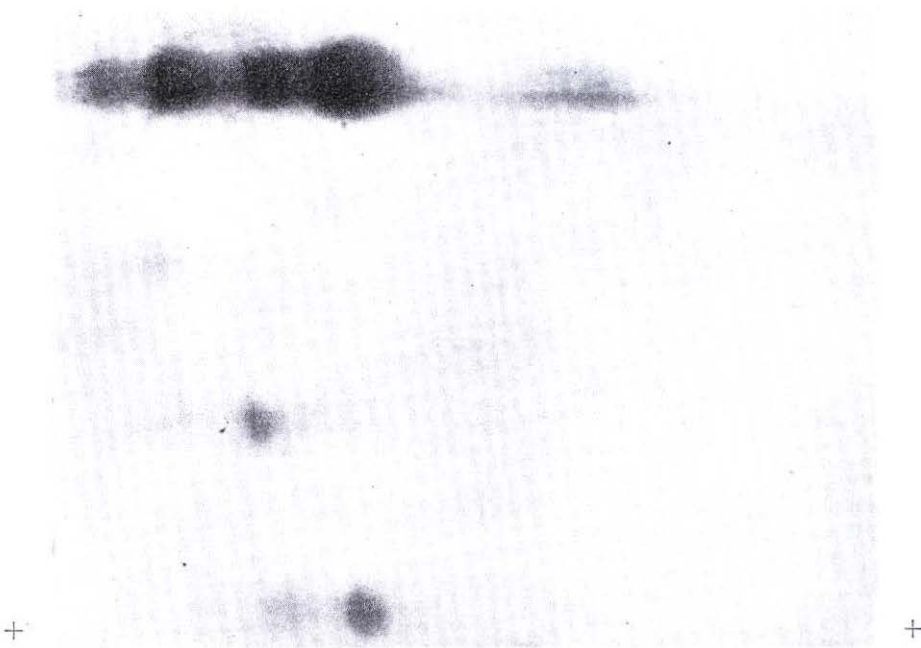


Fig. 5. — Elettroforesi su gel di amido delle emoglobine separate cromatograficamente. Dall'alto in basso: emoglobina totale, I componente, II componente e III componente. Sviluppo con benzidina.

separati mediante l'elettroforesi corrispondono ai tre componenti cromatografici; precisamente il primo componente cromatografico corrisponde alla frazione principale veloce, il secondo ed il terzo corrispondono alla seconda

ed alla terza rispettivamente, in ordine di mobilità, delle frazioni principali separate per elettroforesi; delle frazioni elettroforetiche minori, la più lenta è contenuta nel terzo componente cromatografico, mentre la più veloce non viene svelata nelle condizioni sperimentali impiegate.

L'emoglobina totale e le preparazioni del I, del II e del III componente sono state sottoposte a digestione acida e successivamente all'analisi quantitativa per il contenuto in aminoacidi, i risultati sono riassunti nelle tabelle 2, 3, 4 e 5 rispettivamente.

TABELLA 2

	EMOGLOBINA TOTALE DI RANA			
	Grammi di aminoacidi per 100 grammi di proteina	Residui di aminoacidi per 100 grammi di proteina (grammi)	Numero dei residui calcolati per P. M. = 68000	Numero dei residui all'intero più vicino
Lisina	8,21	7,20	40,75	41
Istidina	11,22	9,92	52,20	52
N-NH ₂	1,17		48,72	(49)
Arginina	4,12	3,69	17,04	17
Asparagina	10,65	9,21	58,48	58
Treonina	3,49	2,96	21,32	21
Serina	4,05	3,23	28,79	29
Glutamina	8,85	7,77	44,03	44
Prolina	3,39	2,86	21,48	21
Glicina	3,89	2,96	37,95	38
Alanina	9,02	7,20	74,02	74
Cistina ½	1,08	0,92	6,18	6
Valina	6,50	5,50	38,06	38
Metionina	0,73	0,64	3,59	4
Isoleucina	3,14	2,71	16,64	17
Leucina	12,36	10,66	68,74	69
Tirosina	4,92	4,43	19,93	20
Fenilalanina	7,06	6,31	30,48	30
Triptofano	1,25	1,14	4,88	5
Totale	105,10	89,31		
Eme	3,63	3,63		
TOTALE	108,73	92,94		

Nel caso della treonina e della serina, che vengono parzialmente distrutte durante l'idrolisi acida, i risultati riportati nella tabella sono stati ottenuti estrapolando linearmente al tempo 0 le rese ottenute nei vari tempi di idrolisi; un analogo procedimento è stato seguito per il calcolo dell'azoto amidico. I valori per l'asparagina e la glutamina riportati nella tabella riguardante

l'emoglobina totale sono stati calcolati in base ai risultati ottenuti dalla digestione enzimatica della proteina e sono in ottimo accordo con il dato dell'azoto amidico.

Infatti, come risulta dalla tabella 2 i valori trovati sono di 32 residui per mole per l'asparagina e 17 residui per la glutamina; la loro somma, 49

TABELLA 3

	EMOGLOBINA DI RANA, PRIMO COMPONENTE			
	Grammi di aminoacidi per 100 grammi di proteina	Residui di aminoacidi per 100 grammi di proteina (grammi)	Numero dei residui calcolati per P. M. = 68000	Numero dei residui all'intero più vicino
Lisina	7,45	6,53	39,39	39
Istidina	10,72	9,48	53,20	53
N-NH ₂	1,27		53,71	(54)
Arginina	3,86	3,46	17,06	17
Asparagina	9,30	8,04	53,81	54
Treonina	3,29	2,79	21,32	21
Serina	4,23	3,51	32,48	32
Glutamina	9,05	7,94	47,41	47
Prolina	2,80	2,36	18,68	19
Glicina	3,73	2,84	38,27	38
Alanina	8,60	6,86	74,42	74
Cistina ½	0,98	0,83	6,29	6
Valina	5,84	4,94	38,48	38
Metionina	0,53	0,47	2,74	3
Isoleucina	3,20	2,76	18,78	19
Leucina	11,73	10,12	68,83	69
Tirosina	4,60	4,14	19,49	19
Fenilalanina	6,99	6,25	31,78	32
Triptofano	1,57	1,43	5,99	6
Totale	99,74	84,75		
Eme	3,63	3,63		
TOTALE	103,37	88,38		586

residui, corrisponde esattamente al numero di residui di azoto amidico calcolato mediante estrapolazione al tempo 0 dei dati ottenuti nel corso delle analisi degli aminoacidi. Nel calcolo dei recuperi della valina e della isoleucina non è stato tenuto conto dei dati ottenuti con un tempo di idrolisi di 20 ore poichè, come è noto, la rottura dei legami peptidici di isoleucina e valina richiede un tempo di idrolisi più prolungato.

I dati riguardanti il triptofano rappresentano la media dei risultati ottenuti con il metodo spettrofotometrico diretto e con il metodo della N-

bromosuccinimide su quattro campioni di ciascuna preparazione; i due differenti metodi hanno fornito risultati molto omogenei.

Il calcolo dei residui è stato effettuato partendo dalla media dei recuperi degli aminoacidi stabili acido aspartico, acido glutamico, glicina, alanina, leucina, fenilalanina, lisina, arginina; sono stati calcolati i rapporti

TABELLA 4

	EMOGLOBINA DI RANA, SECONDO COMPONENTE			
	Grammi di aminoacidi per 100 grammi di proteina	Residui di aminoacidi per 100 grammi di proteina (grammi)	Numero dei residui calcolati per P. M. = 68000	Numero dei residui all'intero più vicino
Lisina	7,50	6,58	39,02	39
Istidina	10,45	9,24	51,22	51
N-NH ₂	1,15		51,12	(51)
Arginina	3,65	3,27	16,00	16
Asparagina	9,95	8,60	57,07	57
Treonina	3,24	2,75	21,56	22
Serina	3,72	3,08	28,00	28
Glutamina	8,06	7,07	41,76	42
Prolina	2,73	2,30	18,05	18
Glicina	3,65	2,78	37,17	37
Alanina	8,35	6,66	71,61	72
Cistina $\frac{1}{2}$	1,28	1,09	8,20	8
Valina	5,55	4,70	37,07	37
Metionina	0,81	0,71	4,20	4
Isoleucina	2,86	2,47	16,68	17
Leucina	11,68	10,08	68,00	68
Tirosina	4,83	4,35	20,10	20
Fenilalanina	6,70	5,99	30,24	30
Triptofano	1,31	1,19	4,88	5
Totale	97,47	82,91		
Eme	3,63	3,63		
TOTALE	101,10	86,54		571

molari fra questi aminoacidi ed i loro recuperi sono stati corretti in base ai rapporti molari, da questi valori è stato derivato un equivalente minimo molare per ciascuno degli aminoacidi stabili e la media degli equivalenti minimi molari così ottenuti è stata impiegata per calcolare i rapporti molari di tutti gli aminoacidi.

Il recupero dell'azoto è stato calcolato partendo dai valori ottenuti nelle determinazioni eseguite con il micrometodo di DUMAS sulla soluzione di emoglobina prima della idrolisi acida e su ciascun campione dopo l'idro-

lisi; in tutte le analisi eseguite è stato ottenuto un ricupero oscillante fra il 98 ed il 101 %. Il ricupero ponderale è stato tuttavia più basso; questo fenomeno potrebbe essere spiegato con la capacità delle proteine di legare gli anioni del tampone salino durante l'eluzione dalle colonne cromatografiche. Bassi recuperi in peso nelle analisi di aminoacidi sono stati ugualmente

TABELLA 5

	EMOGLOBINA DI RANA, TERZO COMPONENTE			
	Grammi di aminoacidi per 100 grammi di proteina	Residui di aminoacidi per 100 grammi di proteina (grammi)	Numero dei residui calcolati per P. M. = 68000	Numero dei residui all'intero più vicino
Lisina	7,95	6,97	39,98	40
Istidina	11,05	9,77	52,37	52
N-NH ₂	0,81		43,97	(44)
Arginina	4,03	3,61	16,99	17
Asparagina	10,59	9,16	58,46	58
Treonina	4,40	2,89	20,69	21
Serina	4,09	3,39	28,38	28
Glutamina	8,41	7,38	41,97	42
Prolina	2,95	2,49	18,69	19
Glicina	3,77	2,87	36,88	37
Alanina	8,81	7,03	72,65	73
Cistina 1/2	1,01	0,86	6,20	6
Valina	6,29	5,32	39,68	40
Metionina	0,83	0,73	4,10	4
Isoleucina	2,87	2,48	16,19	17
Leucina	12,49	10,78	69,86	70
Tirosina	5,03	4,53	20,39	20
Fenilalanina	6,94	6,20	30,08	30
Triptofano	1,35	1,23	5,10	5
Totale	102,67	87,69		
Eme	3,63	3,63		
TOTALE	106,30	91,32		579

ricontrati anche da EDMUNDSON e HIRS (²³), da CRAMPTON, MOORE e STEIN (²⁴) e da LEWY, GESCHWIND e LI (²⁵). Il confronto fra la composizione in aminoacidi della emoglobina totale e dei tre componenti cromatografici (tab. 2, 3, 4, 5) dimostra una buona corrispondenza dei dati: la media dei residui di ciascun aminoacido presente in ciascuno dei componenti è infatti in ogni caso molto vicina ai valori dei residui trovati nella emoglobina totale; anche fra i tre componenti non si osservano differenze sensibili nella composizione in aminoacidi, solo il primo si discosta in qualche modo

dagli altri due poichè presenta un più basso contenuto di acido aspartico, ed un maggiore contenuto di serina, di acido glutammico e di isoleucina; il secondo componente contiene una maggiore quantità di cistina: la scarsità di materiale non ha permesso di controllare il dato mediante la analisi dopo ossidazione con acido performico.

TABELLA 6

	GLOBINA DI RANA			
	Grammi di aminoacidi per 100 grammi di proteina	Residui di aminoacidi per 100 grammi di proteina (grammi)	Numero dei residui calcolati per P. M. = 68000	Numero dei residui all'intero più vicino
Lisina	8,17	7,16	40,90	41
Istidina	11,18	9,88	52,74	53
N-NH ₂	0,90		48,92	(49)
Arginina	4,04	3,62	16,97	17
Asparagina . . .	10,22	8,84	56,10	56
Treonina	3,65	3,10	21,23	21
Serina	4,32	3,58	28,96	29
Glutamina	8,87	7,78	44,05	44
Prolina	3,03	2,56	19,24	19
Glicina	3,73	2,84	36,38	36
Alanina	8,69	6,93	70,06	70
Cistina 1/2	1,06	0,90	6,42	6
Valina	5,88	4,93	37,64	38
Metionina	0,73	0,64	3,54	4
Isoleucina	2,98	2,57	17,19	17
Leucina	12,34	10,65	68,69	69
Tirosina	4,98	4,48	20,04	20
Fenilalanina . . .	6,83	6,10	29,82	30
Triptofano	1,21	1,10	4,51	5
Totale				
Eme				
TOTALE	102,81	87,66		575

La composizione in aminoacidi è stata anche determinata su campioni di globina preparati dalla emoglobina totale di rana e sottoposti a digestione acida; i risultati ottenuti sono riportati nella tabella 6; il paragone con i dati relativi alla emoglobina totale dimostra un buon accordo fra i risultati delle due differenti analisi. Le differenze più sensibili riguardano acido aspartico, prolina, glicina, alanina; tuttavia è da tener presente che la globina di rana si risolve in almeno quattro componenti sotto l'azione dell'urea⁽²⁶⁾, è quindi presumibile che la corrispondente emoglobina, come tutte le emo-

globine conosciute di vertebrati, sia composta di quattro sub-unità, probabilmente uguali a due due. In questo caso la sola differenza significativa nella composizione in aminoacidi fra la globina e l'emoglobina riguarderebbe la alanina, infatti per questo aminoacido risultano 74 residui per la emoglobina e 70 residui per la globina, corrispondenti alla differenza di 1 residuo per sub-unità; in tutti gli altri casi le differenze si risolvono in frazioni di residuo per sub-unità.

Differenze di questa entità nella composizione in aminoacidi delle emoglobine e delle corrispondenti globine sono riportate in letteratura ⁽²⁷⁾.

È noto che il problema della determinazione dei gruppi SH-reattivi in una proteina è piuttosto complesso non esistendo un metodo sufficiente da solo a fornire informazioni conclusive: è pertanto opportuno usare sulla stessa proteina metodi basati su differenti reazioni.

Nel presente esperimento con il metodo di BOYER al p-idrossimercuribenzoato sono stati titolati 3,6 gruppi SH reattivi per la emoglobina nativa e 3,7 gruppi SH reattivi per la cianometemoglobina; con il metodo di COLE STEIN e MOORE sono stati determinati 3.3 residui di carbossimetilcisteina per mole di emoglobina nativa.

DISCUSSIONE

L'emoglobina di *Rana esculenta* adulta è una emoproteina a contenuto di azoto, calcolato sulla base della composizione in aminoacidi, del 17,44 % e con un peso molecolare di circa 68000. Gli esperimenti di sedimentazione hanno messo in evidenza un unico componente a costante di sedimentazione $S_{20}^{0w} = 4,69$ in accordo con i dati riportati da SVEDBERG per la *Rana temporaria*; per quello che riguarda il peso molecolare di circa 68000 esiste accordo completo fra i vari dati riportati in letteratura per gli individui adulti di *Rana catesbeiana*, *Rana grilio*, *Rana pipiens* e *Rana temporaria*.

Il calcolo dei residui di aminoacidi presenti nella molecola di questa emoglobina ha messo in evidenza che il numero totale di questi è assai vicino a quello della emoglobina umana; del resto dai dati riportati in letteratura risulta che il numero totale di residui di aminoacidi presenti nelle emoglobine di differenti classi di vertebrati è sensibilmente costante; evidentemente il numero totale di residui è una caratteristica costante della molecola delle varie emoglobine, indipendentemente dal contenuto di ogni singolo aminoacido che, al contrario, presenta a volte notevoli variazioni da una classe all'altra. Il maggiore contenuto di azoto e così pure il maggiore peso molecolare della emoglobina di rana rispetto a quella umana sono dovute al maggiore contenuto di aminoacidi basici.

L'emoglobina di *Rana esculenta* adulta è costituita da almeno cinque componenti dimostrabili all'elettroforesi su gel di amido; l'esame visuale delle piastre colorate permette di distinguere, fra questi, tre componenti

maggiori e due componenti minori aventi uno la più alta ed il secondo la più bassa mobilità elettroforetica; CHIEFFI e coll. (30) hanno trovato nella emoglobina di *Rana esculenta* adulta solo due componenti; queste differenze possono essere dovute al fatto che non è stata usata la stessa tecnica negli esperimenti di elettroforesi.

Nella *Rana catesbeiana* adulta sono stati descritti recentemente (8) quattro componenti separati mediante elettroforesi su gel di amido e su blocco di amido; dai dati finora acquisiti risulterebbe che l'emoglobina del genere *Rana* presenta una maggiore eterogeneità rispetto a tutte le emoglobine di vertebrati fino ad ora descritte, ed anche rispetto alle emoglobine di altri anfibi sia anuri che urodéli; infatti nel Rospo sono presenti due frazioni elettroforetiche (28) e nell'*Ambystoma tigrinum* due frazioni nell'individuo allo stadio neotenicico e tre nell'individuo adulto (29).

Gli esperimenti cromatografici hanno messo in evidenza tre componenti corrispondenti ai tre componenti maggiori separati per elettroforesi; l'intervallo di pH che permette l'eluizione di questi componenti è piuttosto ristretto essendo compreso, nelle presenti condizioni sperimentali, fra pH 7,3 e pH 7,7; non è quindi stato possibile ottenere una netta separazione dei tre componenti poichè le code dei picchi risultano sovrapposte; è probabile che l'eluizione dei due componenti minori osservati negli esperimenti di elettroforesi venga appunto nascosta nelle regioni della curva di eluizione compresa fra i picchi principali; il componente minore più lento viene infatti messo in evidenza sottoponendo ad elettroforesi su gel di amido il terzo componente cromatografico; non è stato invece possibile localizzare il componente minore più veloce, la cui scomparsa potrebbe essere dovuta alla bassa concentrazione nella quale esso è contenuto nella emoglobina totale; tuttavia esso potrebbe essere eluito con le primissime frazioni del primo componente cromatografico che, data la loro bassa concentrazione, non sono state riunite alle altre, o potrebbe essere compreso nei vasti tagli che è stato necessario compiere nella zona di sovrapposizione delle code per evitare una eccessiva contaminazione fra un componente e l'altro. D'altra parte non è stato possibile tentare di migliorare la separazione dei componenti aumentando la temperatura alla quale gli esperimenti venivano effettuati, poichè la facile denaturabilità della proteina non permetteva di operare al di sopra dei 40°. L'omogeneità dei tre principali componenti è stata comunque dimostrata sia mediante la ricromatografia di essi nelle stesse condizioni sperimentali, sia dal fatto che ciascuno di essi è elettroforeticamente omogeneo e presenta una differente mobilità su gel di amido. Questo comportamento elettroforetico fa ritenere probabile che la separazione su CM-cellulosa dei componenti della emoglobina di *Rana esculenta* sia almeno in parte dovuta a differenze di carica; in effetti esistono differenze, sia pure lievi, nel contenuto in amidi e nelle composizioni in aminoacidi dei tre componenti.

Nella emoglobina di *Rana catesbeiana* adulta sono state messe in evidenza tre catene peptidiche ⁽⁸⁾; nell'emoglobina di *Rana esculenta* è stato invece possibile mettere in evidenza la presenza di almeno quattro catene polipeptidiche, le esperienze su questo argomento sono tuttora in corso allo scopo di chiarire con una analisi chimica più dettagliata i rapporti che queste catene assumono fra loro nella molecola delle varie emoglobine di *Rana esculenta*.

Gli Autori ringraziano vivamente i Sigg. LUIGI MANGIONE, GIULIO PECCI e GIANCARLO SEVERINI per la preziosa ed intelligente assistenza tecnica.

16 marzo 1964

BIBLIOGRAFIA

- (1) SVEDBERG T. e HEDENIUS A. - Biol. Bull. 66, 191 (1934).
- (2) RIGGS A., - J. Gen. Physiol. 35, 23 (1951).
- (3) TRADER C. D., WORTHAM J. S. e FRIEDEN E. - Science, 139, 918 (1963).
- (4) JOPE E. M. - Haemoglobin - Barcroft Memorial Volume - Butterworth - London 1949, p. 205.
- (5) DESSAUER H. C., FOX W., RAMIREZ J. R. - Arch. Biochem., 71, 11 (1957).
- (6) HERNER A. E. e FRIEDEN E. - Arch. Biochem. Biophys., 95, 25 (1961).
- (7) RIGGS A. - J. Gen. Physiol., 43, 737 (1960).
- (8) BAGLIONI C. e SPARKS C. E. - Develop. Biol. 8, 272 (1963).
- (9) TENTORI L., VIVALDI G., CARTA S., SALVATI A. M., SORCINI M. e VELANI S. - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 39, 2051 (1963).
- (10) SMITHIES O. - Biochem. J., 61, 629 (1955).
- (11) HUISMAN T., H., J. - Clin. Chim. Acta 5, 709, 1960.
- (12) CARTA S. e SORCINI M. - Giorn. Biochim. (in corso di stampa).
- (13) ROSSI FANELLI A., ANTONINI E., CAPUTO A. - Biochim. Biophys. Acta, 30, 608 (1958).
- (14) SPACKMAN D. H., STEIN W. H. e MOORE S. - Anal. Chem. 30, 1190 (1958).
- (15) GOODWIN T. W. e MORTON R. A. - Biochem. J., 40, 628 (1946).
- (16) RAO G., J., S. e CAMA H. R. - Biochim. Biophys. Acta, 71, 139 (1963).
- (17) BOYER P. D. - J. Am. Chem. Soc. 76, 4331 (1954).
- (18) COLE R. D., STEIN W. H. e MOORE S. - J. Biol. Chem., 233, 1359 (1958).
- (19) HILL R. L. e SCHMIDT W. R. - J. Biol. Chem., 237, 389 (1962).
- (20) HILL R. L., SPACKMAN D. H., BROWN D. M., SMITH E. L. in C. S. Vestling (Editor), Biochemical Preparations, Vol. 6 John Wiley and Sons, Inc. 1958, p. 35.
- (21) DAVIS N. C. e SMITH E. L. - J. Biol. Chem. 224, 261 (1957).
- (22) SCHERAGA H. A. e MANDERKEN K. O. - J. Am. Chem. Soc. 75, 179 (1953).
- (23) EDMUNDSON A. B. e HIRS C. H. W. - J. Mol. Biol. 5, 663 (1962).
- (24) CRAMPTON C. F., MOORE S. e STEIN W. H. - J. Biol. Chem. 215, 787 (1955).
- (25) LEVY A. L., GESCHWIND I. I. e LI C. H. - J. Biol. Chem. 213, 187 (1955).
- (26) Dati personali non pubblicati.
- (27) RIGGS A. - J. Biol. Chem. 238, 2983 (1963).
- (28) TENTORI L., VIVALDI G., CARTA S., SALVATI A. M., SORCINI M. e VELANI S. - Ann. Ist. Super. Sanità (in corso di stampa).
- (29) TENTORI L., VIVALDI G., CARTA S., SALVATI A. M., SORCINI M. e VELANI S. - Ann. Ist. Super. Sanità (in corso di stampa).
- (30) CHIEFFI G., SINISCALCO M. e ADINOLFI M. - Atti Accad. Naz. Lincei - Serie VIII, 28, 233 (1960).