

70. G. TOSCHI e A. MARIANI - **Elettroforesi su carta di proteine muscolari. II.**

**Riassunto.** — Gli AA. hanno sviluppato il metodo descritto in precedenza, mettendo a punto una tecnica che consente la determinazione quantitativa dei diversi componenti proteici negli estratti di tessuto muscolare. Sono descritti inoltre alcuni miglioramenti che rendono più agevole l'esecuzione e più netti i risultati. Sono riportati anche alcuni dati qualitativi e quantitativi come esempio della idoneità del metodo a rilevare variazioni della composizione proteica del muscolo.

**Résumé.** — Les auteurs, en développant la méthode précédemment décrite, ont mis au point une technique qui permet la détermination quantitative des différents composants protéiques dans les extraits de tissu musculaire. Ils rapportent aussi des perfectionnements qui améliorent l'exécution du travail, ainsi que quelques données qualitatives et quantitatives, en exemple de l'idoneité de la méthode à révéler des variations de la composition protéique du muscle.

**Summary.** — The authors have developed the method previously described, and have established a technique which allows quantitative determination of the various protein components present in muscle tissue extracts. Some improvements in the method are described, which make for easier working and clearer results. Some qualitative and quantitative data are also reported, as an example of the suitability of the method for recording variations in the protein composition of muscle.

**Zusammenfassung.** — Die Autoren haben das vorher beschriebene Verfahren entwickelt, und haben dabei eine Technik bearbeitet, welche die quantitative Bestimmung der verschiedenen Proteinkomponenten in Extrakten von Muskelgewebe gestattet. Weiter werden einigen Verbesserungen beschrieben, die die Durchführung des Verfahrens erleichtern und die Erzielung genaurerer Ergebnisse gestatten. Ausserdem werden einige qualitative und quantitative Daten als Beispiel dafür gebracht, dass das Verfahren sich zur Feststellung von Veränderungen der Proteinzusammensetzung des Muskel eignet.

---

In una nota precedente <sup>(1)</sup> è stato da noi descritto un metodo per il frazionamento di estratti proteici di tessuto muscolare mediante elettroforesi su carta. Con tale tecnica era possibile una valutazione qualitativa della composizione degli estratti, ma non una determinazione quantitativa dei diversi componenti. Nella presente nota si descrive un metodo che consente tale determinazione e rende così possibile di seguire le variazioni quantitative di composizione degli estratti muscolari. Questo si è ottenuto applicando il nuovo metodo di colorazione e di lettura proposto da W. GRASSMANN e K. HANNIG per le proteine sieriche <sup>(2)</sup>. Abbiamo inoltre adottato, per gli estratti a bassa forza ionica, il metodo di elettroforesi in camera umida proposto dagli stessi AA.; abbiamo infine apportato una serie di modifiche rivelatesi utili nel corso del lavoro. Riteniamo quindi opportuno ricapitolare brevemente la metodica già esposta, integrandola con le modifiche adottate. Per un esame più approfondito dei criteri sperimentali rinviamo ai fondamentali lavori di M. DUBUISSON <sup>(3)</sup> e di J. JACOB <sup>(4)</sup> per quanto riguarda l'elettroforesi di proteine muscolari; a quelli di H. G. KUNKEL e A. TISELIUS <sup>(5)</sup> e di GRASSMAN e HANNIG <sup>(2)</sup> per quanto concerne la tecnica di elettroforesi su carta. La confrontabilità dei proteinogrammi di estratti muscolari ottenuti mediante elettroforesi su carta con quelli ottenuti in fase libera è già stata oggetto della nostra precedente ricerca.

*Preparazione degli estratti.* — Tutte le operazioni si eseguono a 1°-3° C.. Si agita la polpa muscolare di coniglio, affettata al microtomo congelatore, con la soluzione tampone. Per gli estratti a bassa f.i. si impiega un tampone di fosfati ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  di f.i.  $\mu = 0,10$  e pH 7,7) aggiunto nella misura di ml 1 per g di muscolo. L'estrazione dura 2 ore.

Per gli estratti ad alta f.i. si impiega un tampone fosfati di f.i.  $\mu = 0,35$  e pH 7,4 ( $\text{Na}_2\text{PO}_4$  0,048M;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,006M; NaCl 0,20M) aggiunto nella misura di ml 2 per g di muscolo; durata: da 10' a 24 ore, secondo lo scopo dell'esperimento. E' preferibile centrifugare gli estratti a velocità elevata (10-15.000 giri/min. per 15') onde rimuovere il più possibile di materiale particolato; questo infatti viene trattenuto dalla carta nel punto di deposizione e forma una banda che si sovrappone al proteinogramma. La dialisi degli estratti, necessaria per l'elettroforesi in fase libera, è inutile per l'elettroforesi su carta; ne consegue il grande vantaggio di

---

<sup>(1)</sup> MARIANI A. e TOSCHI G. - Rendic. Ist. Sup. San. 16, 148, 1953.

<sup>(2)</sup> Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiolog. Chem., 290, 1, 1952.

<sup>(3)</sup> Biol. Review, 25, 46, 1950.

<sup>(4)</sup> Biochem. J., 41, 83, 1946.

<sup>(5)</sup> J. Gen. Physiol., 35, 89, 1951.

potere eliminare il periodo di circa 40 ore (necessario alla dialisi) che intercorre tra la preparazione dell'estratto e l'elettroforesi in fase libera.

*Colorazione e lettura delle striscie.* — Le striscie, seccate a 110° C., si colorano per 20' con una soluzione satura di Amidoschwarz 10B (Bayer) in metanolo contenente il 10% di acido acetico. Per il lavaggio si usa una soluzione acquosa di metanolo al 50% e di acido acetico al 10%. La lettura si effettua per trasparenza in adatto apparecchio a cellula fotoelettrica, avendo diafanizzato le striscie con una miscela di olio di vaselina e bromonaftalina (2:1). Sul tracciato così ottenuto si valuta con un planimetro l'area dei diversi componenti (\*).

#### A) Estratti a bassa forza ionica.

L'elettroforesi si esegue col sistema di camera umida di GRASSMANN e HANNIG, alla temperatura di 1°-3° C.. Si usano striscie di carta Whatman n. 1, di cm. 4 × 30 (lo spazio utile di corsa è di cm. 16). L'estratto si depone sulla striscia già imbevuta di tampone, in un tratto asciugato preventivamente con listerelle di carta bibula, mediante un tiralinee. Una buona separazione dei componenti si ottiene operando con un tampone di fosfati di f.i.  $\mu = 0,10$  e pH 6,4 ovvero 7,7. Abbiamo fatto un gran numero di osservazioni per determinare le condizioni più adatte alla separazione dei diversi componenti; si è visto che, variando opportunamente il pH, la tensione e la durata, si possono mettere in evidenza le caratteristiche del tracciato che più interessano. Per esempio, se interessa una valutazione delle rispettive percentuali dei tre gruppi di componenti individuati da JACOB negli estratti muscolari di coniglio: I ( $l, m, n$ ) II ( $k_1, k_2$ ) e III ( $h, i$ ), è opportuna una elettroforesi a pH 6,4, con 5 V/cm. per 12-13 ore ovvero con 8 V/cm. per 8-9 ore, deponendo l'estratto a 15 mm. dall'estremità catodica dello spazio utile. Per una buona separazione fra i singoli componenti dei gruppi I e II è opportuna una elettroforesi a pH 6,4, con 7 V/cm. per 15 ore, deponendo l'estratto nel punto di mezzo dello spazio utile. Elettroforesi più rapide e separazioni più spinte si ottengono impiegando tamponi di f.i.  $\mu = 0,05$ , che consentono tensioni più elevate.

Un esempio dei risultati che si ottengono è dato nelle fig. 1, 2, 3. Nella individuazione dei diversi componenti ci siamo serviti della terminologia già istituita da JACOB; abbiamo indicato con  $\delta$  la sottile banda

---

(\*) Si è usata l'apparecchiatura per elettroforesi e lettura della Ditta « Label », Roma.

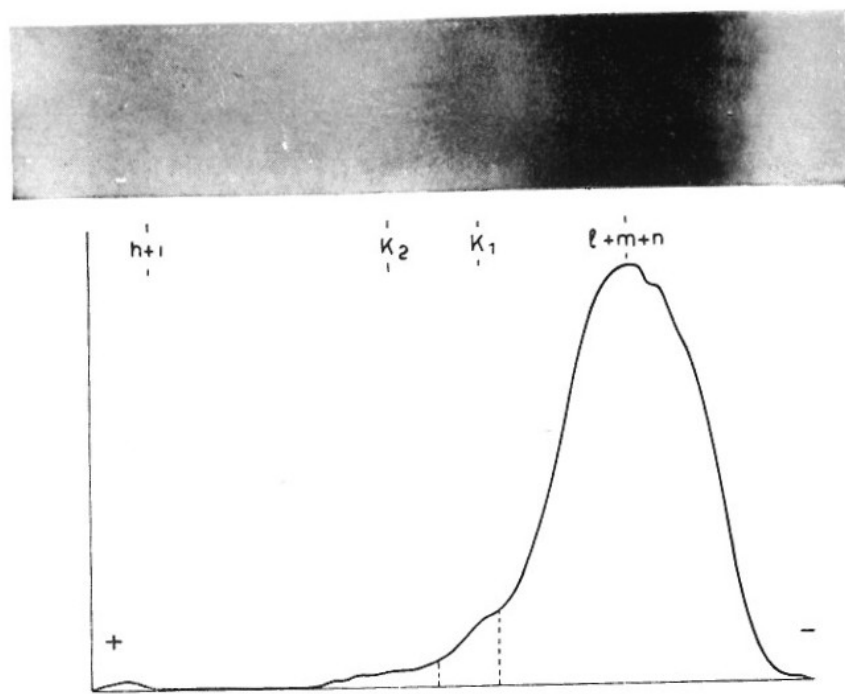


Fig. 1, a). - Muscolo bianco di Coniglio, estratto di f. i. 0,10. Elettroforesi a pH 6,4, con 5 V/cm. per 13 ore (estratto deposto a 15 mm. dall'estremità catodica).

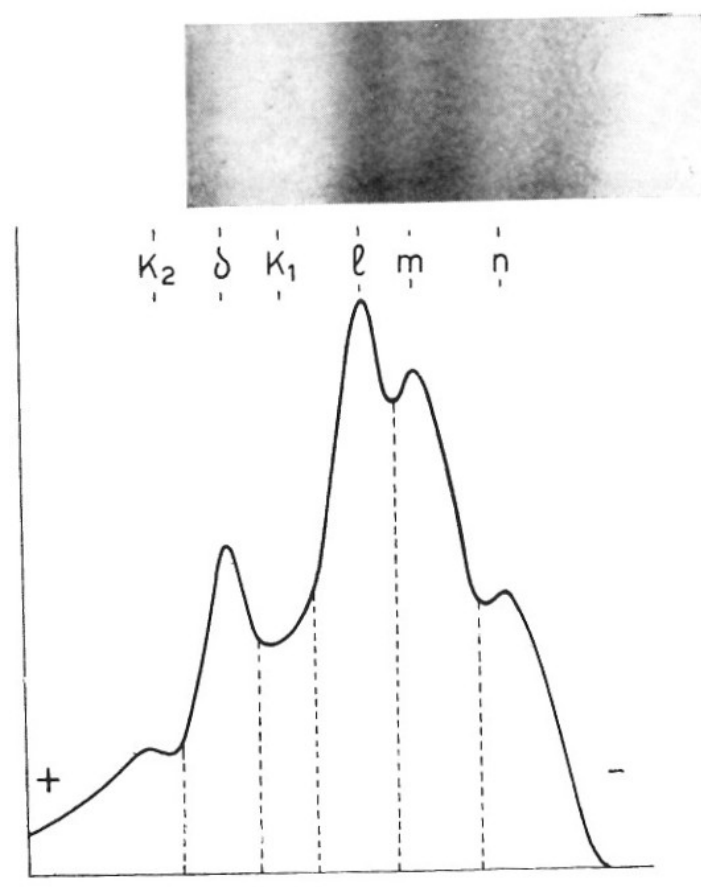


Fig. 1, b). - Idem. Elettroforesi con 7 V/cm. per 15 ore (estratto deposto nel punto di mezzo della striscia).

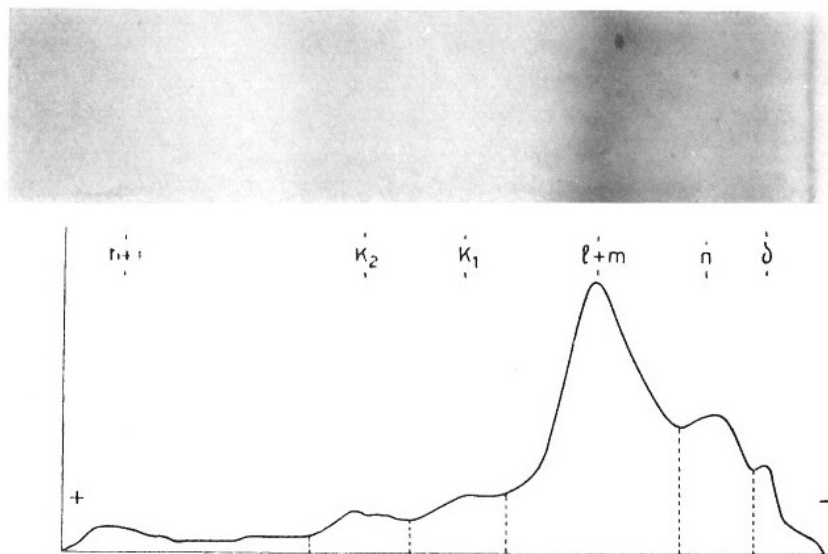


Fig. 2, a). - Muscolo rosso di Coniglio, estratto di f. i. 0,10. Elettroforesi a pH 6,4, con 6 V/cm. per 12 ore (estratto deposto a 15 mm. dalla estremità catodica).

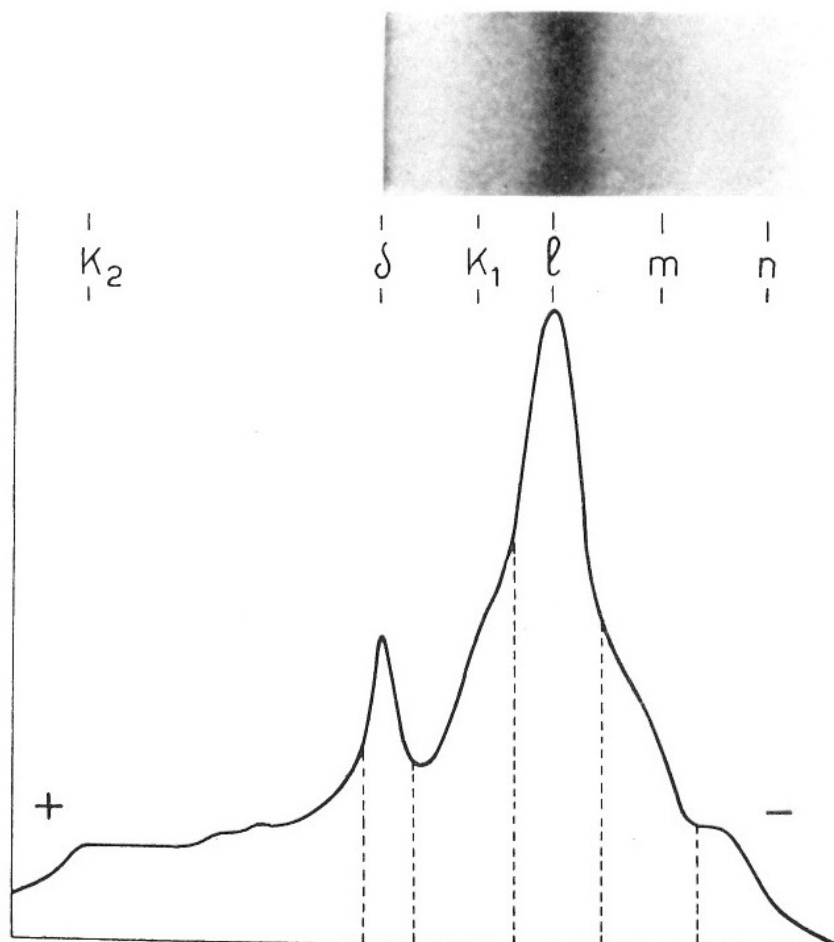


Fig. 2, b). - Idem. Elettroforesi con 7 V/cm. per 15 ore (estratto deposto nel punto di mezzo della striscia).

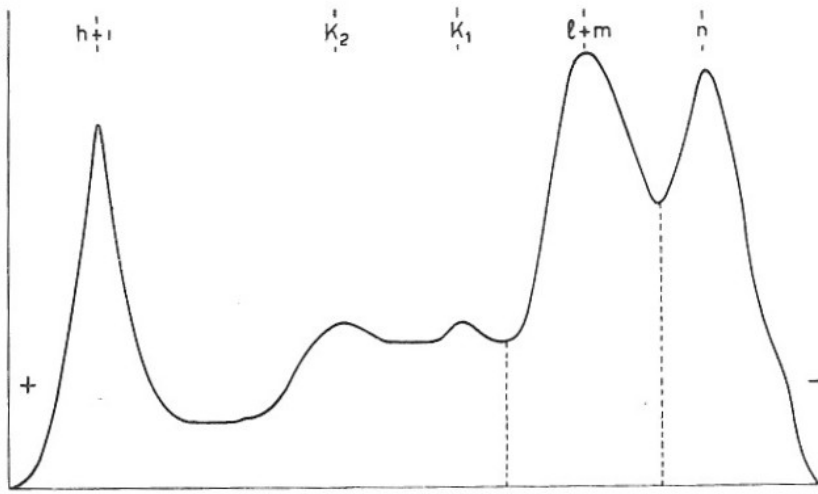


Fig. 3, a). - Miocardio di Coniglio, estratto di f. i. 0,10. Elettroforesi a pH 6,4, con 6 V/cm. per 13 ore (estratto deposto a 15 mm. dalla estremità catodica).

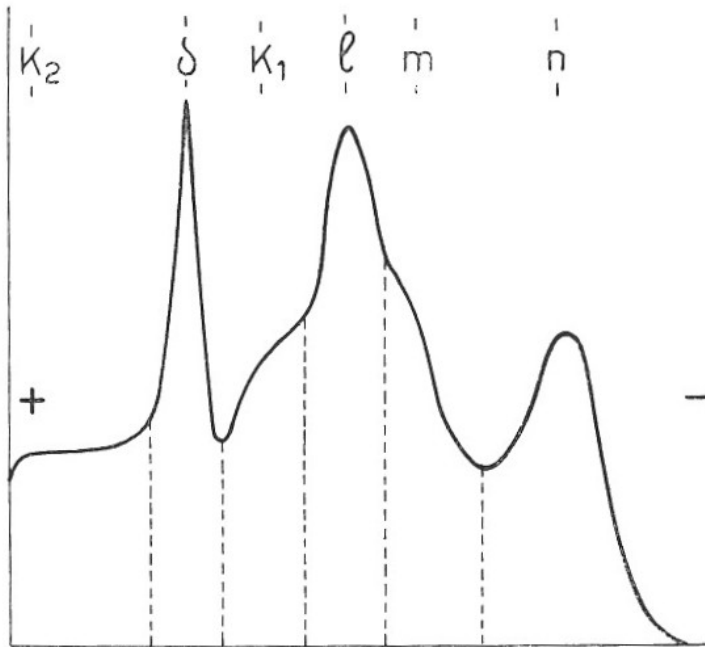
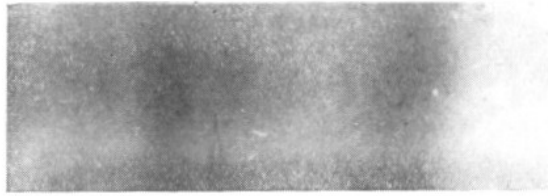


Fig. 3, b). - Idem. Elettroforesi con 7 V/cm. per 15 ore (estratto deposto nel punto di mezzo della striscia).

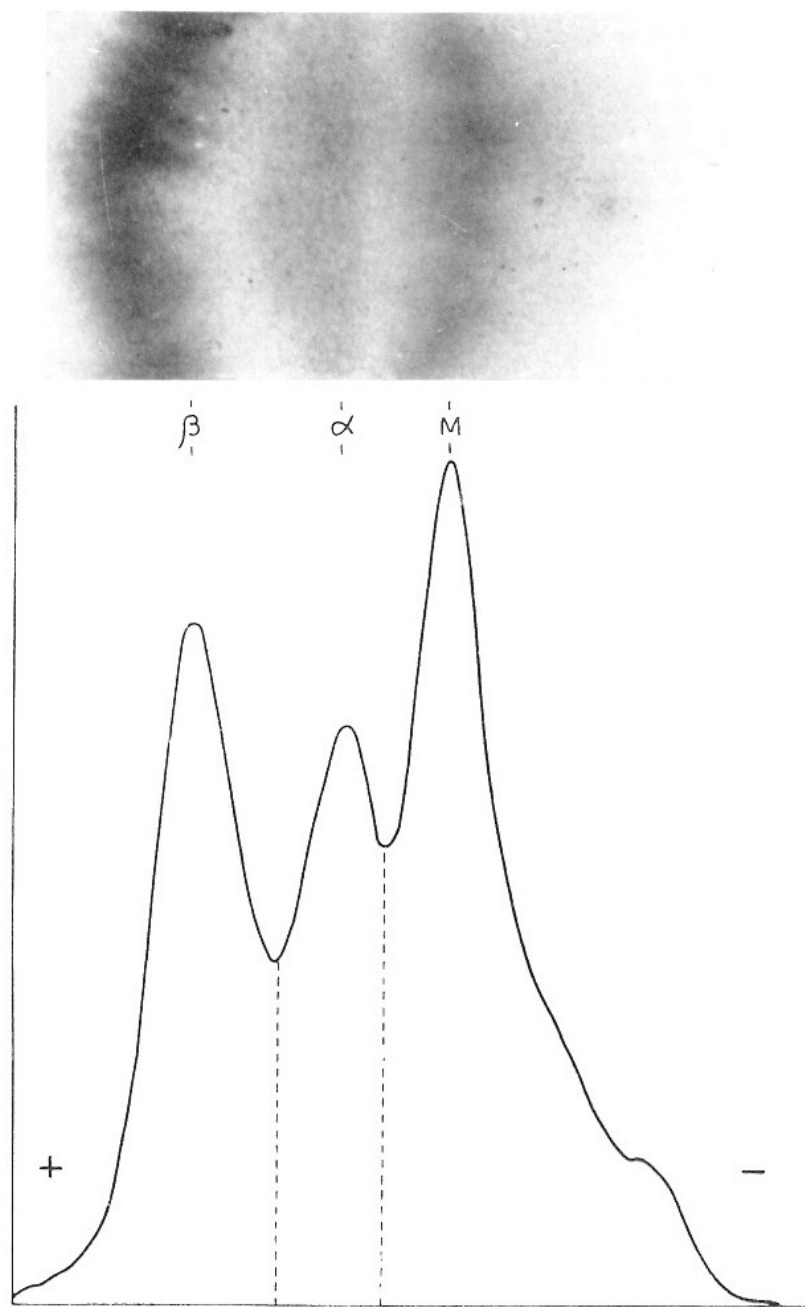


Fig. 4. - Muscolo bianco di Coniglio, estratto di f. i. 0,35 (durata: 20'; con ml 2 per g). Elettroforesi in tampone al Veronal-HCl di f. i. 0,25 e pH 8,6, con 8 V/cm. per 16 ore.

che si forma nel punto di deposizione, per adsorbimento di una minima quantità di proteine sulla carta. Si riscontrano in questi tracciati quelle differenze di composizione proteica tra muscoli dotati di diverse proprietà morfologiche e funzionali che sono già state messe in evidenza mediante l'elettroforesi in fase libera (6).

B) *Estratti a forza ionica elevata.*

L'elettroforesi si esegue alla temperatura di 1°-3°, con l'apparato di KUNKEL e TISELIUS, impiegando striscie di carta Munktell n. 20 di cm. 4 × 15. Si usa il tampone di fosfati di f.i.  $\mu = 0,35$  e ph 7,4 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,032M;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,004M;  $\text{NaCl}$  0,25M) o, anche meglio, un tampone al Veronal di f.i.  $\mu = 0,25$  e pH 8,6 ( $\text{NaCl}$  0,20M; Veronal sodico 0,04355M;  $\text{HCl}$  0,00645M). Abbiamo adottato con vantaggio due ponti di agar (agar al 3% nella soluzione tampone) i quali collegano le vaschette in cui pescano i capi delle striscie con due vaschette contenenti una soluzione di  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,2M, in cui pescano gli elettrodi. Si evitano così quanto più è possibile le variazioni di composizione del tampone nel corso dell'elettroforesi; variazioni notevoli quando questa è di lunga durata e l'intensità della corrente è elevata, in conseguenza della elevata forza ionica. Inoltre si evita così l'inconveniente dello sviluppo di una notevole quantità di cloro all'anodo. Quanto al pretrattamento della striscia con albumina, di cui alla nota precedente, si può ometterlo, dato che nella massima parte dei casi non interessa determinare in questi estratti la quantità di mioalbumina presente. Si può così determinare senza inconvenienti il contenuto di proteine fibrillari (miosina, actomiosina ed eventualmente actina depolimerizzata) e di miogeni: infatti la quantità di proteina che ogni banda contiene è più che sufficiente a saturare la carta nel brevissimo tratto percorso senza che vi sia una avvertibile riduzione delle bande. Una soddisfacente separazione delle miosine  $\alpha$  e  $\beta$  e del gruppo dei miogeni si ottiene con 16-18 ore di elettroforesi con 8 V/cm..

Un esempio dei risultati ottenibili è dato in fig. 4).

*Determinazione quantitativa.* — Riguardo alla idoneità del metodo per la determinazione quantitativa percentuale dei diversi componenti, riferiamo a titolo di esempio i risultati di alcune prove quantitative. Nella tabella I, a) sono riportati i valori percentuali dei tre gruppi di componenti di un estratto a bassa f.i. (muscolo rosso di Coniglio): dello stesso estratto si è eseguita l'elettroforesi in parallelo su 8 striscie diverse, su ogni striscia si è eseguita la determinazione quantitativa per-

---

(6) CREPAX P. - Biochim. Biophys. Acta, 9, 385, 1952.

centuale e si sono poi calcolati i valori medi e la relativa deviazione standard (*s*). Nella tabella I, *b*) sono riportati i dati di analoga prova, eseguita con un estratto di f.i.  $\mu = 0,35$  (muscolo bianco di Coniglio) in parallelo su 4 striscie diverse.

I valori così determinati si accordano in modo soddisfacente coi dati della letteratura (ottenuti mediante elettroforesi in fase libera). Vi è però da osservare che il valore percentuale della mioalbumina è inferiore a quello determinato in fase libera. Giova ricordare qui che lo stesso fatto si osserva per la sieralbumina, nella elettroforesi su carta delle proteine sieriche. Molto probabilmente questo è dovuto al fatto che il componente a migrazione più rapida (sieralbumina o mioalbumina) satura certi gruppi attivi della carta, fissandosi su questa in minima quantità su tutto il percorso, come ha mostrato A. MARIANI (<sup>7</sup>). Viene così sottratta una determinata quantità di albumina, che rimane come « fondo » nel proteinogramma. Tale quantità è costante per un dato tipo di carta e per un dato tratto percorso. La riduzione è pertanto costante se sono costanti le condizioni di elettroforesi. Questo è infatti verificato dalla larghissima esperienza di elettroforesi su carta di proteine sieriche fatta in numerosi Laboratori, e nel nostro caso anche dalla costanza dei risultati di prove multiple parallele di elettroforesi dello stesso estratto.

TABELLA I.

a) Estratto di muscolo rosso di Coniglio, di f.i. $\mu = 0,10$ Elettroforesi in parallelo su 8 striscie, con 7 V/cm. per 12 ore, con tampone di f.i. $\mu = 0,10$ e pH 6,4.					
	<i>h + i</i>	<i>k<sub>1</sub> + k<sub>2</sub></i>	<i>l + m + n</i>		
Percentuale media ( $\pm s$ (*)) =	7,74 ( $\pm 1,86$ )	15,14 ( $\pm 0,04$ )	77,12 ( $\pm 2,98$ )		
b) Estratto di muscolo bianco di Coniglio, di f.i. $\mu = 0,35$ (estrazione di 20' con 2ml per g.) Elettroforesi in parallelo su 4 striscie, con tampone di f.i. $\mu = 0,25$ e pH 8,6, con 8 V/cm. per 16 ore.					
	$\beta$	$\alpha$	M		
Percentuale media ( $\pm s$ ) =	30,42 ( $\pm 1,50$ )	17,34 ( $\pm 2,62$ )	52,24 ( $\pm 3,54$ )		
(*)	$s = \sqrt{\frac{S y^2}{n - 1}}$ (Emmens, C. W., <i>Principles of Biological Assay</i> , Chapman & Hall, London, 1948, p. 12).				

(<sup>7</sup>) Rendic. Ist. Sup. San. 15, 337, 1952.

### CONCLUSIONI

Il metodo da noi descritto si presta allo studio della composizione proteica della fibra muscolare, con quei limiti e quei vantaggi che l'elettroforesi su carta ha già dimostrato, in confronto all'elettroforesi in fase libera, per lo studio delle proteine sieriche. E' opportuno sottolineare, fra gli altri, il vantaggio rappresentato dall'impiego di minime quantità di tessuto muscolare (bastano anche 100 mg) e dalla possibilità di eseguire contemporaneamente in parallelo l'elettroforesi di molti estratti diversi. Esso rende agevole in particolare sia lo studio sistematico dei muscoli di piccoli animali (p.e. Insetti) sia l'osservazione comparativa tra fibre muscolari normali e fibre in condizioni patologiche diverse.

Era in effetti nostro proposito mettere a punto un metodo che ci servisse in questo tipo di ricerche.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di biologia

---