

11. A. MARIANI e G. TOSCHI. — Elettroforesi su carta di proteine muscolari (*).

Riassunto. — Basandosi sulle tecniche già sviluppate dal DUBUISSON per l'elettroforesi in fase libera delle proteine muscolari, gli AA. hanno messo a punto la tecnica per l'elettroforesi su carta delle stesse proteine. L'attrezzatura impiegata è quella descritta da KUNKEL e TISELIUS. L'adozione di diversi accorgimenti ha permesso di ottenere una soddisfacente separazione dei componenti proteici, la quale si accorda coi risultati ottenuti mediante l'elettroforesi in fase libera. Si è osservata per la miosina α (actomiosina) una differenza nel comportamento su carta rispetto a quello in fase libera.

Résumé. — En se basant sur les techniques déjà développées par Dubuisson pour l'électrophorèse en phase libre des protéines musculaires, les auteurs ont mis au point la technique de l'électrophorèse sur papier des mêmes protéines. Ils ont utilisé l'équipement décrit par Kunkel et Tiselius. Ils ont eu recours à divers stratagèmes pour obtenir une séparation satisfaisante des composés protéiniques, laquelle s'accorde avec les résultats obtenus par électrophorèse en phase libre. On a observé une différence dans le comportement sur papier de la myosine α (actomyosine) par rapport à celui qu'elle tient en phase libre.

Summary. — Basing their work on the techniques already developed by Dubuisson in free electrophoresis of muscle proteins, the authors have devised a technique of paper electrophoresis for the same proteins. They used the equipment described by Kunkel and Tiselius. The employment of a variety of different tactics has enabled a satisfactory separation of the proteic components to be obtained; this was found to agree with the results obtained through free electrophoresis. A difference in the behaviour of Myosin α (actomyosin) on paper and in free phase was observed.

Zusammenfassung. — Unter Zugrundelegung der von Dubuisson für die Elektrophorese der Muskelproteine in freier Phase bereits entwickelten Techniken haben die Verfasser die Technik der Elektrophorese der gleichen Proteine auf dem Papier herausgearbeitet. Dabei haben sie die von Kunkel und Tiselius beschriebene Apparatur angewendet. Es wurden verschiedene Verfahren angewandt zur Erzielung einer genügend scharfen Trennung der Proteinkomponenten, die mit den durch Elektro-

(*) Nota presentata all'Accademia Nazionale dei Lincei dal Socio D. MAROTTA nella seduta del 10 gennaio 1953.

phorese in freier Phase erzielten Ergebnissen übereinstimmt. Dabei ist beobachtet worden, dass das α -Myosin (Actomyosin) sich auf dem Papier anders verhält als in freier Phase.

Lo studio elettroforetico delle proteine muscolari in rapporto con le diverse condizioni fisiologiche del muscolo è stato oggetto negli ultimi anni di numerose ricerche, cui ha dato un largo contributo il CREPAX, dell'Istituto di Fisiologia dell'Università di Bologna. Il DUBUISSON, nelle sue rassegne sull'argomento, ha fornito una estesa raccolta di dati sperimentali (1, 2).

Basandoci sulle tecniche già sviluppate per l'elettroforesi in fase libera di proteine muscolari, abbiamo voluto mettere a punto per le stesse proteine la tecnica di elettroforesi su carta. Abbiamo impiegato la semplice e comoda attrezzatura descritta da KUNKEL e TISELIUS (3), già sperimentata con successo per le proteine seriche. Fin dalle prime prove abbiamo constatato varie difficoltà, dipendenti principalmente da: 1) necessità di operare con soluzioni tamponate di forza ionica superiore a quella delle soluzioni normalmente impiegate nella elettroforesi su carta; ne conseguono bassi voltaggi e conseguenti lunghe elettroforesi da eseguire tutte in camera fredda; 2) forti correnti di elettroosmosi che trascinavano verso il polo negativo molte proteine a bassa mobilità; 3) forte perdita di proteine per fissazione sulla carta.

Per ovviare al massimo a questi inconvenienti abbiamo adottato i seguenti accorgimenti: 1) impiego di strisce lunghe e strette (cm. 4 per 30) per aumentare la resistenza del mezzo e poter lavorare con voltaggi fino a 8-10 V/cm.; 2) pretrattamento della carta con soluzione di sieroalbumina secondo la tecnica già proposta da uno di noi (4); 3) la soluzione proteica in esame si depone in un tratto della striscia precedentemente saturato di sieroalbumina, in modo che sia il movimento verso il polo positivo che quello verso il polo negativo avvenga su carta già saturata.

In tal modo è stato possibile:

a) rilevare la presenza di piccole quantità di mioalbumina, la quale per la sua alta mobilità percorre un lungo tratto della striscia;

b) separare i componenti che, per effetto dell'elettroosmosi, vengono a spostarsi verso il polo negativo, senza una eccessiva perdita per fissazione sulla carta.

(1) DUBUISSON M.: Exposés annuels de Biochimie Médicale, IX série, 1948, Masson, Paris.

(2) DUBUISSON M.: Biol. Review, 25, 46, 1950.

(3) KUNKEL H. G., TISELIUS A.: J. Gen. Physiol., 35, 89, 1951.

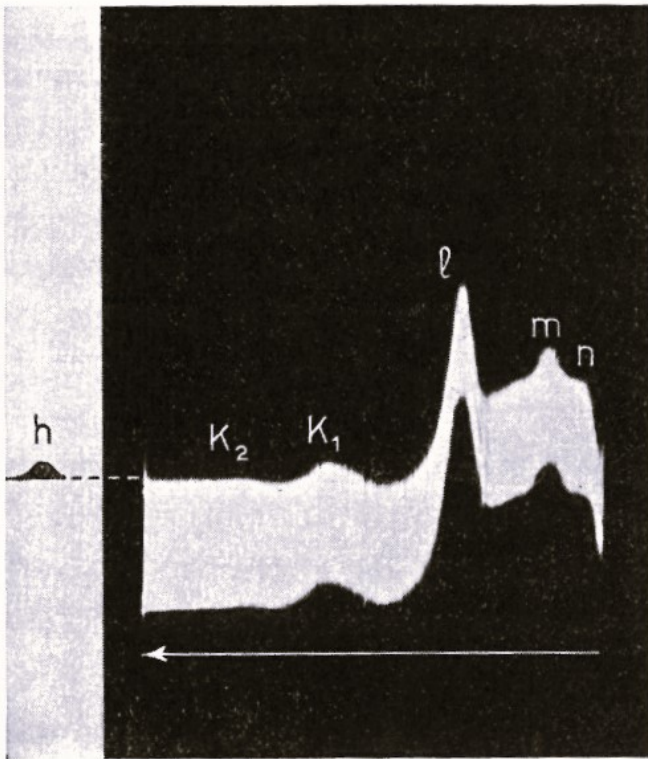
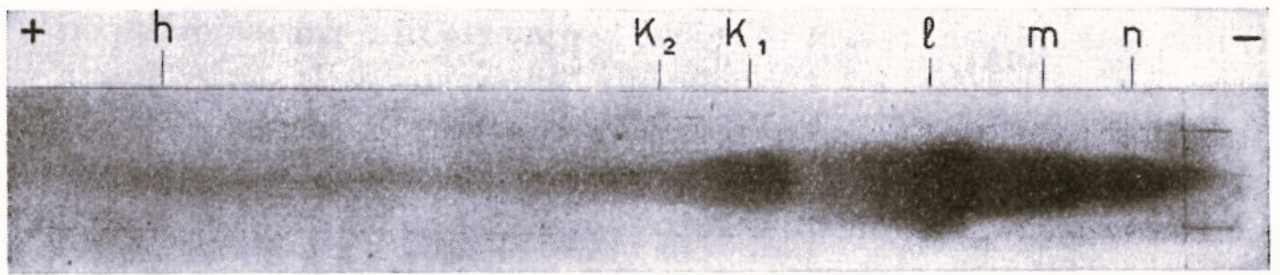
(4) MARIANI A.: Rendic. Ist. Sup. San. 15, 337, 1952.

Gli estratti di proteine muscolari, preparati secondo le modalità indicate da DUBUISSON ⁽²⁾ e da CREPAX ⁽⁵⁾, sono stati deposti sulla carta in quantità di 3-10 mm³. L'elettroforesi si è svolta in camera fredda a 0-2 °C, per una durata di circa 20 ore. Di ogni estratto si è eseguita contemporaneamente una normale elettroforesi in fase libera, servendoci di un apparecchio *Tiselius* 38 della Perkin Elmer con cella di cm³ 2, seguendo l'andamento della separazione soltanto nel braccio ascendente.

RISULTATI:

1) Estratti a bassa forza ionica.

(Estrazione: 1 g di polpa muscolare si estrae con cc. 1,5 di Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ di f.i. 0,10 e pH 7,7. Dialisi: per 48 ore con Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ di f. i. 0,10 e pH 6,8).



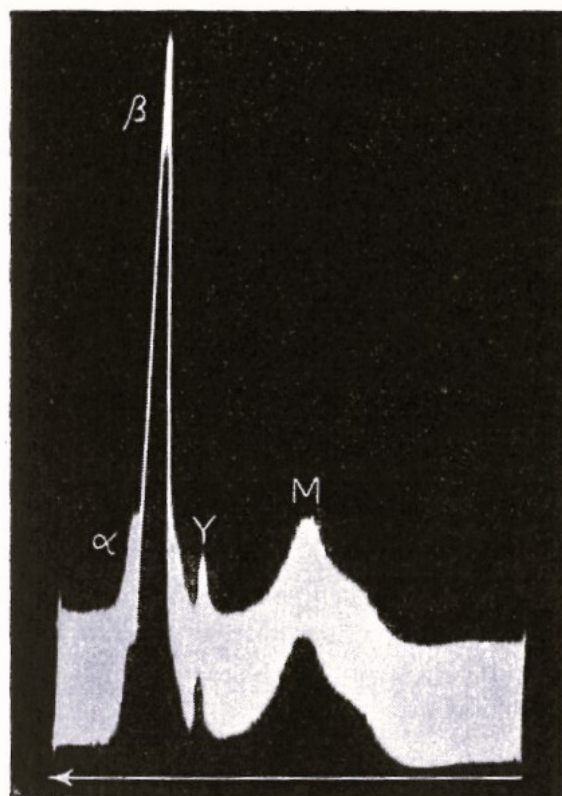
Estratto a bassa forza ionica (0,10).
FIG. 1: elettroforesi su carta.
FIG. 1a: elettroforesi in fase libera
per 15.900'' a 6,48 V/cm.

(5) CREPAX P.: Biochim. Biophys. Acta, 7, 87, 1951.

Le macchie che si identificano sulla carta corrispondono per numero, posizione e intensità ai « picchi » identificabili nel proteinogramma in fase libera.

2) Estratti a forza ionica elevata.

A) (Estrazione: 1 g di polpa muscolare si estrae con cc. 2 di soluzione di Weber-Edsall: KCl 0,6 M; Na₂CO₃ 0,01 M; NaHCO₃ 0,04 M. La f.i. è 0,67; il pH 8,6. Durata dell'estrazione: 10'. Prima di centrifugare si aggiungono 3 volumi di soluzione di W.-E. Dialisi: per 48 ore in: Na₂HPO₄ 0,032 M; NaH₂PO₄ 0,004 M; NaCl 0,25 M. La f. i. è 0,35 e il pH 7,1).



Estratto a forza ionica elevata (0,67) di breve durata (10').

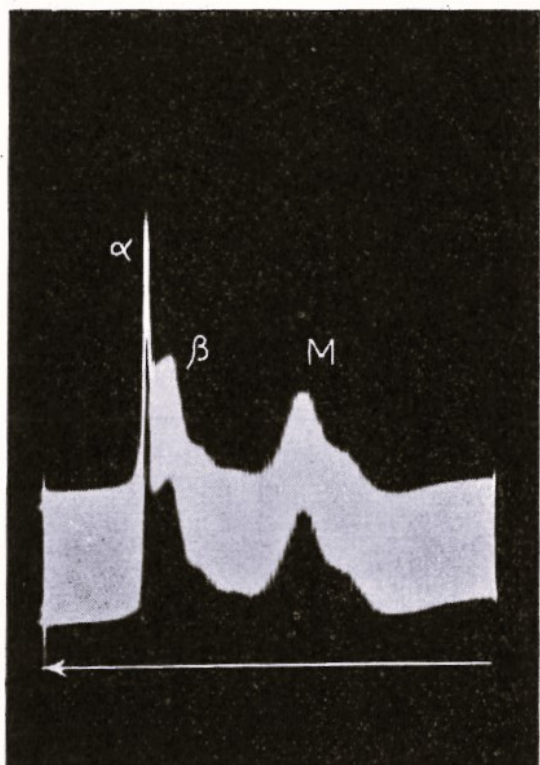
FIG. 2: elettroforesi su carta.

FIG. 2a: elettroforesi in fase libera per 33.000'' a 4,42 V/cm.

Si osserva che sulla carta la macchia della miosina α è da noi indicata *dietro* quella della miosina β , mentre nel proteinogramma in fase libera la miosina α si trova davanti, in posizione regolare. Ci siamo resi

conto di questo fatto eseguendo le prove successive con estrazioni di durata maggiore, in cui è possibile seguire l'aumento di miosina α (actomiosina) e la parallela diminuzione di miosina β (miosina).

B) (Estrazione: come sopra. Durata: 4 ore. Prima della centrifugazione si aggiungono 5 volumi di soluzione di W.-E. Dialisi: come sopra).



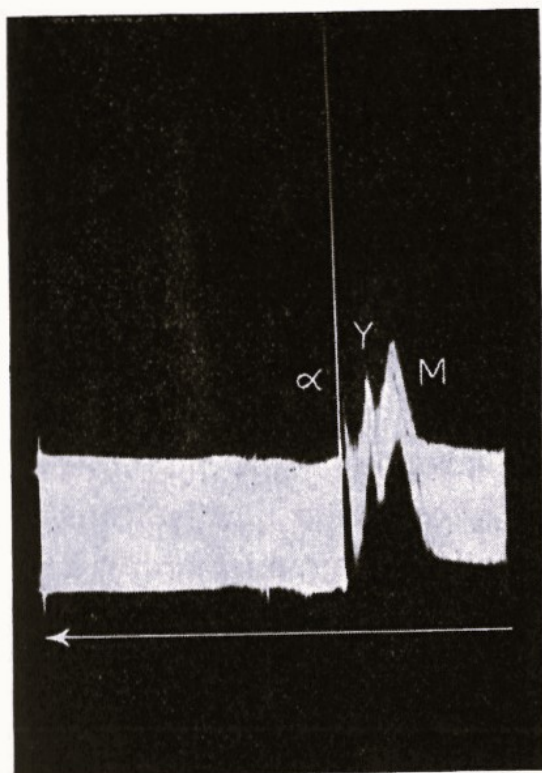
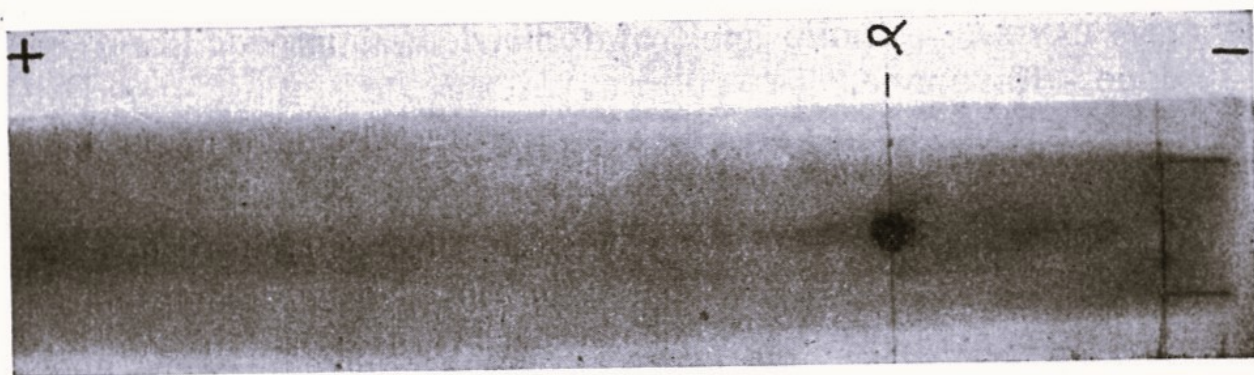
Estratto a forza ionica elevata (0,67) di durata 4 ore.

FIG. 3: elettroforesi su carta.

FIG. 3a: elettroforesi in fase libera per 25.200' a 4,42 V/cm.

La macchia della miosina α è cresciuta d'intensità mentre si è ridotta quella della miosina β ; tali variazioni corrispondono a quelle dei rispettivi « picchi » nel proteinogramma in fase libera.

C) (Estrazione: come sopra. Durata: 24 ore. Prima della centrifugazione si aggiungono 7 volumi di soluzione di W.-E. Dialisi: come sopra).



Estratto a forza ionica elevata (0,67) di durata 24 ore.

FIG. 4: elettroforesi su carta.

FIG. 4a: elettroforesi in fase libera per 11.100'' a 4,42 V/cm.

Sia dal proteinogramma su carta che da quello in fase libera risulta chiaramente come la miosina β sia praticamente assente, essendosi trasformata in miosina α ; la quantità di quest'ultima è assai alta, tenendo conto anche della forte diluizione dell'estratto.

In tutte le prove eseguite è stato notato il fatto che la miosina α (actomiosina) non si è mossa affatto dal punto in cui è stata deposta. Questo comportamento può avere una spiegazione nel fatto che una soluzione di actomiosina è in realtà un gel liquido in cui i filamenti di actomiosina si intrecciano a formare una rete continua ⁽⁶⁾. E' pertanto molto probabile che tale proteina non riesca a spostarsi, sotto l'azione del campo elettrico, attraverso la fitta trama delle fibre della carta.

Roma — Istituto Superiore di Sanità — Laboratorio di Biologia.

⁽⁶⁾ SZENT-GYORGYI A.: «Chemistry of Muscular Contraction», pag. 34, Academic Press, New York, 1951.