

Riassunto. — Vengono riportati alcuni risultati preliminari ottenuti nel corso di uno studio delle emoglobine di *Rana esculenta*, *Bufo bufo* e *Ambystoma tigrinum*. Le emoglobine sono state separate dalle proteine globulari non emoglobiniche mediante cromatografia su carbossimetilcellulosa. La cromatografia con gradiente continuo del pH del tampone su carbossimetilcellulosa non ha dimostrato eterogeneità della emoglobina di rospo. La composizione quantitativa in aminoacidi delle emoglobine studiate è stata determinata mediante cromatografia su colonne di amberlite secondo la tecnica di Spackman, Stein e Moore.

Summary. — Some preliminary results obtained in the course of a research on the structure of hemoglobins from *Rana esculenta*, *Bufo bufo* and *Ambystoma tigrinum* are reported. These hemoglobins have been separated from the other globular proteins by means of chromatography on columns of carboxymethylcellulose.

The chromatography on columns of carboxymethylcellulose performed with a compound gradient has not proved the heterogeneity of the hemoglobin from *Bufo bufo*.

The aminoacid composition of the three hemoglobins has been determined by chromatography on amberlite columns according to the technique developed by Spackman, Stein and Moore.

L'emoglobina è senza dubbio una delle proteine più studiate (^{1, 2, 3, 4, 5}). Un interesse così generale trova la sua spiegazione nel fatto che tale proteina è estremamente diffusa nel mondo animale come componente del sangue, è facilmente riconoscibile per la sua colorazione, ed è facilmente reperibile. Essa infatti è normalmente contenuta nei globuli rossi che possono essere facilmente separati dal resto del sangue e quindi sottoposti a lisi dopo essere stati lavati per allontanare le proteine plasmatiche. Con il termine « emoglobine » si definiscono attualmente dei pigmenti costituiti di un gruppo prostetico detto eme e più precisamente protoferroeme combinato ad una molecola proteica, la globina. Tali pigmenti hanno la caratteristica di fissare reversibilmente l'ossigeno molecolare senza che il ferro bivalente in essi contenuto subisca una normale ossidazione. Una simile definizione prende in considerazione solo caratteristiche strutturali e funzionali mentre prescinde com-

pletamente da qualsiasi precisazione di sede e di specie animale. Pertanto sono compresi in questo gruppo di pigmenti le emoglobine corpuscolari fisiologiche, adulte e fetali, dei vertebrati, le emoglobine patologiche, le emoglobine corpuscolari o plasmatiche di alcuni invertebrati, anche note con il nome di eritrocruorine, le emoglobine muscolari o mioglobine, le emoglobine vegetali o leg-emoglobine, e infine le emoglobine di alcuni protozoi del genere *parameci*.

Fin dai primi studi sulla emoglobina è sorta la discussione se questo pigmento fosse identico in tutte le specie o se vi fossero delle differenze di specie o perfino delle differenze individuali nell'ambito della stessa specie. Le ricerche congiunte sul comportamento elettroforetico e cromatografico, sulla solubilità, sulla struttura cristallina, sugli spettri di assorbimento, sul peso molecolare, sulla sequenza di aminoacidi, sulla cinetica di denaturazione, sulle reazioni di ossidazione e di riduzione, sulle curve di dissociazione dell'ossigeno e sui derivati della mettaemoglobina hanno permesso di risolvere il problema.

E' stato infatti dimostrato che ciascuna specie animale ha una sua particolare emoglobina, che in molte specie esistono due o più emoglobine normalmente presenti in rapporti ben definiti, che in alcune specie esistono delle differenze tra la emoglobina normalmente presente durante lo sviluppo embrionale e quella normalmente presente allo stato adulto, e che infine possono occasionalmente esistere nell'ambito della stessa specie individui portatori di emoglobine differenti dalle normali, legate, o non, a manifestazioni patologiche. Poichè è noto che il protoferroeme è identico in tutte le emoglobine le differenze riscontrate non possono che essere dovute a differenze strutturali nella globina.

Recentemente sono stati ottenuti notevoli progressi nella conoscenza della struttura primaria, secondaria e terziaria delle emoglobine, sia mediante l'uso di mezzi fisici, sia attraverso la analisi chimica della composizione in aminoacidi e delle sequenze di questi nei peptidi nei quali la catena proteica può essere scomposta (^{6, 7, 8, 9, 10, 11}).

Mentre da quest'ultimo punto di attacco le ricerche di BRAUNITZER e coll. hanno permesso di chiarire completamente la sequenza degli aminoacidi della emoglobina umana (^{8, 12, 13, 14, 15}) e la analisi della composizione in aminoacidi di molte emoglobine di diversi animali ha dimostrato le differenze esistenti fra le globine di questi, le ricerche cristallografiche della scuola di Perutz hanno chiarito la struttura della mioglobina di capodoglio e di foca e della emoglobina di cavallo (^{6, 16, 17, 18, 19, 20}). Queste ricerche hanno dimostrato che l'emoglobina di cavallo è composta di quattro sub-unità a struttura globulare del tutto simili tra loro e molto simili alla molecola (globulare) della mioglobina, pigmento respiratorio presente nei muscoli dei vertebrati. L'emoglobina possiede quindi una

struttura « quaternaria » (⁵), poichè le quattro sub-unità sono disposte ai vertici di un tetraedro. Sebbene ancora ne manchi la dimostrazione sperimentale è probabile che nelle emoglobine degli altri vertebrati superiori le sub-unità, a struttura terziaria globulare, abbiano la stessa disposizione spaziale. E' probabile che l'avvolgimento delle catene polipeptidiche, a causa del quale esse assumono una forma complessiva globulare, abbia un qualche significato biologico generale che però non è ancora noto (²¹). Questa struttura infatti sembra essere largamente diffusa in natura perchè lo studio delle molecole delle virus-proteine ha dimostrato che anche queste sono composte di un gran numero di sub-unità globulari di dimensioni assai vicine a quelle della molecola di mioglobina e disposte ad elica nel virus del mosaico del tabacco e simmetricamente secondo elementi di superficie di poliedri regolari nei virus sferici.

Ciascuna delle singole sub-unità di cui è costituita una molecola di emoglobina costituisce una singola catena polipeptidica, in cui, come hanno dimostrato le ricerche sulla struttura primaria, sono contenuti circa 150 aminoacidi. Lo studio delle sequenze degli aminoacidi delle catene, a partire dalla estremità N-terminale, eseguito soprattutto nella emoglobina umana, ha permesso di stabilire che in condizioni normali le sub-unità di ogni molecola sono identiche due a due. Nell'emoglobina umana è stata dimostrata, fino al momento attuale, la presenza di 4 catene polipeptidiche differenti che sono state denominate α , β , γ e δ . Queste catene differiscono l'una dall'altra per la presenza di diverse sequenze di aminoacidi nella parte N-terminale della catena. La combinazione di queste catene due a due caratterizza i tre tipi di emoglobina normalmente presenti nel sangue umano: l'emoglobina adulta A, l'emoglobina A_2 componente normalmente presente nell'adulto nella proporzione di circa il 2% della emoglobina A, e l'emoglobina fetale F, presente nella vita intrauterina. La emoglobina A è formata di due catene α e di due catene β per cui viene descritta con la formula: $Hb = \alpha_2 \beta_2$, la formula dell'emoglobina A_2 è $\alpha_2 \delta_2$ e infine la formula della emoglobina fetale è $\alpha_2 \gamma_2$.

E' ora universalmente accettata la concezione di INGRAM (²²) secondo la quale le catene peptidiche dell'emoglobina umana sono controllate da 4 geni differenti, denominati geni α , β , γ , δ , che si comportano come se fossero situati in cromosomi differenti e quindi come geni indipendenti ad eccezione dei geni β e δ che sembrano essere legati e quindi situati in loci prossimi di uno stesso cromosoma. Questi geni controllerebbero la struttura primaria delle corrispondenti catene polipeptidiche α , β , γ , δ e di conseguenza anche la loro struttura secondaria e terziaria.

Nell'uomo esistono anche delle emoglobine patologiche che possono essere determinate sia da un anormale accoppiamento delle catene poli-

peptidiche normali, come ad es. la emoglobina H presente in grande quantità nella talassemia, la cui formula è γ_4 , nella quale cioè non esistono due tipi differenti di catene polipeptidiche; sia da mutazioni geniche che determinano la formazione di catene polipeptidiche anormali, differenti da quelle normali per la trasposizione o il cambiamento anche di un singolo aminoacido.

Lo studio strutturale più approfondito delle sequenze di aminoacidi e della lunghezza delle catene polipeptidiche delle varie emoglobine, unito alle conoscenze che si hanno della loro struttura tridimensionale, ha dimostrato in maniera sufficientemente chiara che esiste una rassomiglianza, definita « familiare » da INGRAM, fra le varie caratteristiche strutturali delle 4 catene polipeptidiche presenti nelle emoglobine umane normali. Detto Autore ritiene che tali catene siano il prodotto dell'evoluzione da un comune precursore ancestrale, probabilmente la catena polipeptidica unica della mioglobina, da cui avrebbero preso origine, per successive mutazioni geniche, le catene α , β , γ e δ .

L'ipotesi di INGRAM tende a spiegare il fatto che le sequenze di aminoacidi delle catene β e δ sono assai simili tra loro, e quelle delle catene β e γ hanno fra loro maggiori punti di contatto di quanti singolarmente non ne abbiano con la catena α ; infatti è generalmente accettato il concetto che una similitudine di struttura implichi un distacco relativamente recente dei geni.

Da quanto è stato brevemente esposto si può dedurre l'attualità degli studi riguardanti l'emoglobina. La combinazione delle ricerche cristallografiche eseguite con i raggi X con la ricerca chimica sulle sequenze di aminoacidi permetterà ben presto di conoscere in ogni dettaglio la molecola dell'emoglobina. Una volta identificate le alterazioni mutazionali delle emoglobine abnormi, sia per la sequenza di aminoacidi che per le loro relazioni spaziali, sarà possibile non solo tentare di interpretare le alterazioni fisiologiche che ne derivano, ma anche studiare il problema fondamentale del controllo specifico della sintesi o della repressione della sintesi di differenti tipi di proteine, nel caso specifico di differenti tipi di emoglobine, al livello cellulare.

Infatti, assumendo che il DNA rappresenti il materiale genetico responsabile della formazione delle varie emoglobine, ne segue che l'esatta duplicazione del DNA conserva l'informazione genetica che contiene cifrata nella sua sequenza di basi appaiate. Questa sequenza di basi determina indirettamente l'esatta sequenza degli aminoacidi della proteina poichè il DNA agirebbe come matrice per la formazione del RNA che a sua volta, nell'interno delle particelle microsomiali, determina i legami dei singoli aminoacidi nel prodotto genico primario, consistente probabilmente in una catena polipeptidica che rappresenta, tutta o parte, una

molecola di una proteina o di un enzima. I prodotti genici primari potrebbero successivamente, attraverso un certo numero di reazioni intermedie, condurre alla formazione di prodotti genici secondari. Nel caso dell'emoglobina, la sua molecola composta di sub-unità dovrebbe essere considerata un prodotto genico secondario mentre le catene polipeptidiche α , β , γ e δ , cioè le singole sub-unità, rappresenterebbero un prodotto, se non primario, molto precoce dell'azione dei geni; ne consegue che la conoscenza della loro struttura può offrire una occasione per decifrare il codice genetico (²³⁻²⁴).

In conclusione le conoscenze fin qui acquisite mediante lo studio delle emoglobine aprono nuove possibilità di ricerca secondo due vie differenti ed ugualmente importanti; da una parte potranno permettere lo studio del meccanismo di azione del materiale genico nella determinazione della struttura delle proteine, dall'altra consentono di prevedere molto vicino il momento in cui sarà possibile compiere un notevole progresso nella comprensione di uno dei problemi più importanti della biologia: le relazioni esistenti fra la struttura delle molecole delle quali le cellule viventi sono costituite e la loro attività biologica.

Negli ultimi anni sono state studiate numerose emoglobine di specie animali differenti, tuttavia le ricerche più complete da un punto di vista fisico, chimico-fisico e biochimico sono state condotte, in pochi laboratori altamente specializzati in questo tipo di ricerca, quasi esclusivamente sulla emoglobina umana e sulle emoglobine di mammiferi superiori. Le emoglobine di molti altri animali sono state studiate in maniera estremamente incompleta (⁴).

Per quello che riguarda in particolare l'emoglobina degli anfibii, i dati della letteratura si riferiscono ad alcuni caratteri chimico-fisici tra i quali: costanti di sedimentazione e di diffusione, peso molecolare e punti isoelettrici. Nella salamandra maculosa, nella rana, nel rospo e nei rispettivi girini i pesi molecolari della emoglobina si aggirano intorno alla cifra di 68.000, corrispondenti a quelli di una molecola composta di 4 sub-unità; nel rospo e nella salamandra esistono però delle emoglobine a peso molecolare doppio, ed, in un singolo caso, triplo: sono quindi probabilmente possibili degli aggregati molecolari.

RIGGS (²⁵) ha dimostrato che esiste una differenza nelle curve di equilibrio dell'ossigeno fra l'emoglobina di rospo e l'emoglobina del suo girino, fatto che permette di dedurre che in questo gruppo di animali esistano delle differenze fra le emoglobine presenti nell'adulto e quelle presenti nello stadio larvale.

Uno studio sistematico è stato infine eseguito negli anfibii sulla mobilità elettroforetica su carta della emoglobina ed anche con questo metodo sono state dimostrate, come nel caso della rana *Clamitans*, diffe-

renze nella velocità di migrazione fra il pigmento dell'adulto e quello del girino (²⁶).

E' stato pertanto deciso di studiare il problema partendo dalle emoglobine degli anfibî poichè l'emoglobina di questi animali svolge nel corso della loro vita la sua funzione di pigmento respiratorio in due condizioni completamente diverse, passando essi, attraverso il processo della metamorfosi, da una respirazione acquatica branchiale ad una respirazione bucco-faringea, cutanea e polmonare.

Tra gli anfibî sono particolarmente interessanti da questo punto di vista gli appartenenti al genere *Ambystoma*; alcune varietà di questo, gli *Ambystoma tigrinum*, presentano il fenomeno della neotenia; in altre parole questi animali che, come tutti gli anfibî, iniziano la loro vita allo stadio larvale acquatico, rimangono fermi a questa organizzazione larvale pur diventando sessualmente maturi; solo in particolari condizioni ambientali, o sperimentalmente dopo la somministrazione di tiroide o l'aggiunta di tracce di iodio all'acqua in cui vivono, subiscono la metamorfosi passando allo stato adulto di salamandra.

PARTE SPERIMENTALE

MATERIALE BIOLOGICO. — Per le esperienze fino ad ora eseguite sono stati usati gli anfibî anuri *Rana esculenta* L. e *Bufo bufo* (L.) e gli anfibî urodeli *Ambystoma tigrinum* sottospecie *tigrinum* e sottospecie *diaboli* allo stato di salamandra.

PRELEVAMENTO DEL SANGUE. — I campioni di sangue sono stati prelevati in tutti gli animali per puntura cardiaca; le quantità di sangue che possono essere ottenute con questo metodo sono in media di 5 ml. per il rospo e 2 ml. per la rana e per l'*Ambystoma*; il salasso potrebbe essere ancora proseguito oltre queste quantità, ma la esperienza ha dimostrato che il sangue che si ottiene in queste condizioni è estremamente diluito e quindi poverissimo di corpuscoli.

Il rapporto plasma-eritrociti è estremamente variabile a seconda delle condizioni di nutrizione e di salute in generale degli animali usati, nei casi più favorevoli tale rapporto espresso come ematocrito si aggira sul 30% ma è frequente trovare, per tutti gli animali usati, ematocriti del 20% e anche del 15%.

EMOLISI. — Gli eritrociti venivano separati dal plasma per centrifugazione a $1500 \times g$ per 10 minuti, e quindi lavati 4 volte con soluzione

salina isotonica (NaCl 6,5‰). L'emolisi delle cellule lavate è stata eseguita con diversi metodi; congelamento e scongelamento, acqua distillata più toluene, acqua distillata più tetracloruro di carbonio.

Di questi metodi il più conveniente, perchè permette una emolisi pressochè completa ed una ottima separazione degli stromi dall'emolisato a velocità di centrifugazione relativamente basse, è quello eseguito con acqua distillata più tetracloruro di carbonio. Le emazie lavate venivano emolizzate aggiungendo due volumi di acqua distillata e 0,4 volumi di tetracloruro di carbonio; la miscela veniva agitata molto energicamente per circa 2 minuti e quindi centrifugata a $2500 \times g$ per 20 minuti. Non occorre filtrare su Celite il supernatante poichè esso era già quasi completamente privo di stromi: era sufficiente sottoporlo ad una centrifugazione a $100000 \times g$ per 30 minuti in centrifuga Spinco preparativa.

PREPARAZIONE DELLA CIANOMETAEMOGLOBINA. — Poichè è noto che, nella ossiemoglobina, è sempre contenuta una piccola quantità di metaemoglobina e, d'altra parte, è anche noto che durante i procedimenti cromatografici si formano piccole quantità di questo pigmento ferrico, tutte le esperienze sono state fino ad ora eseguite usando soluzioni di cianometamoglobina onde operare su materiale omogeneo. Nell'emolisato venivano aggiunte due gocce per ml. di una soluzione al 5% di ferricianu-

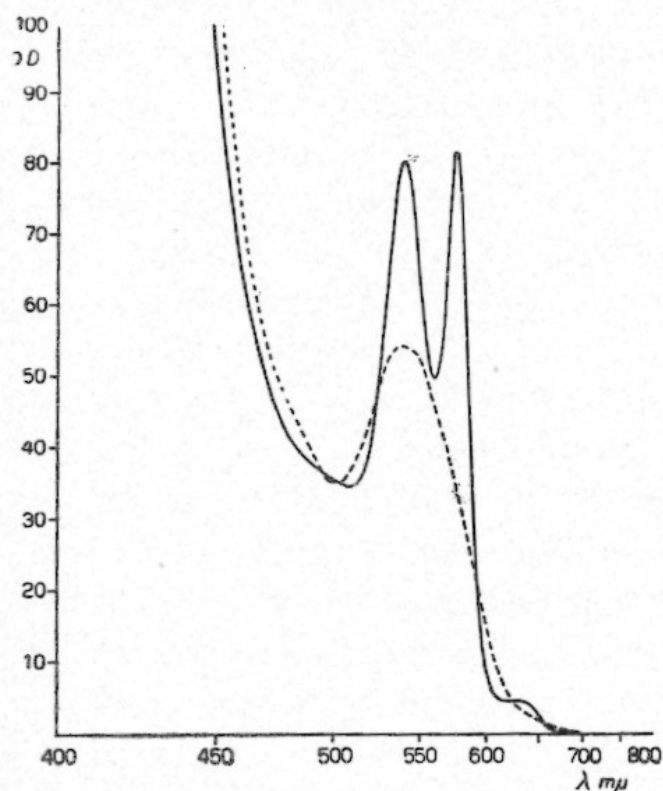


Fig. 1. - Spettro di assorbimento della Cianometa Hb (linea tratteggiata) e della Hb nativa (linea continua) di Rospo.

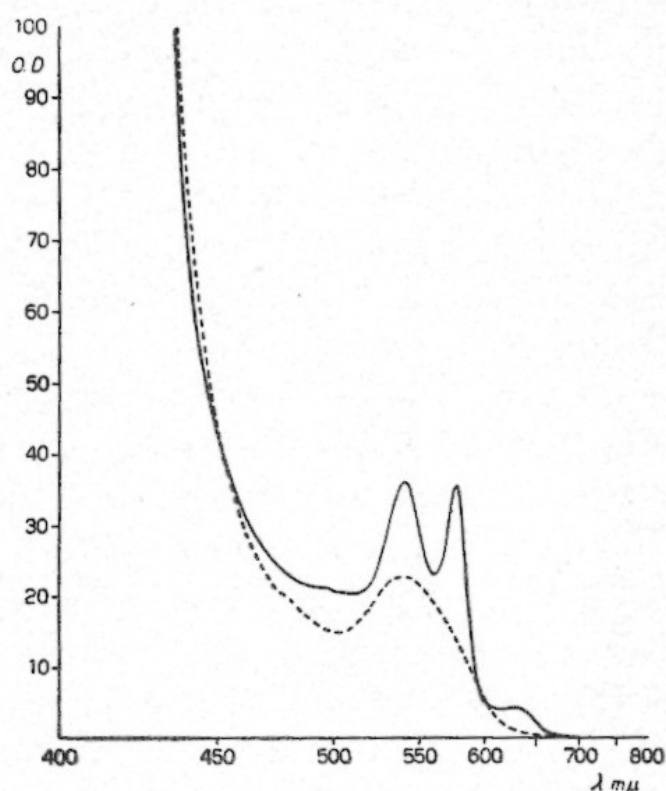


Fig. 2. - Spettro di assorbimento della Cianometa Hb (linea tratteggiata) e della Hb nativa (linea continua) di Rana.

ro di potassio, dopo 15' si aggiungevano due gocce per ml. di una soluzione al 2% di cianuro di potassio: immediatamente si sviluppa il colore rosso cupo caratteristico delle soluzioni di cianometaemoglobina. La soluzione di emoglobina nativa e quella di cianometaemoglobina, preparata come è stato descritto sopra, venivano controllate determinando allo spettrofotometro Beckman registratore gli spettri di assorbimento alle lunghezze d'onda comprese tra 700 e 450 m μ .

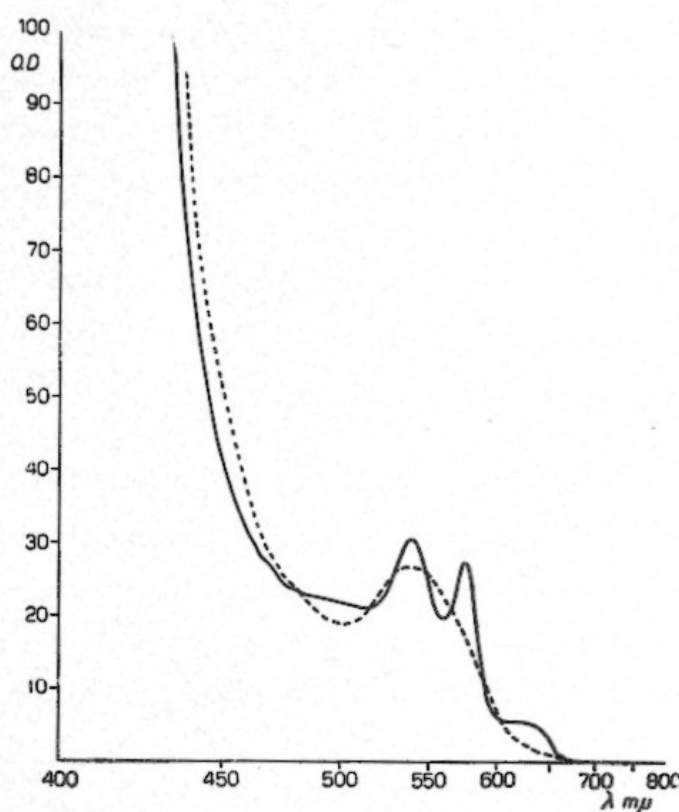


Fig. 3. - Spettro di assorbimento della Cianometa Hb (linea tratteggiata) e della Hb nativa (linea continua) di Ambystoma.

Come è evidente dalle curve riportate (fig. 1-2-3) le soluzioni di cianometaemoglobina presentano un massimo di assorbimento a 540 m μ . In attesa di poter determinare il peso molecolare delle emoglobine studiate, per il calcolo della concentrazione dell'emoglobina nelle soluzioni usate per le varie esperienze è stato seguito il seguente procedimento. Una soluzione di cianometaemoglobina, liberata dalle proteine corpuscolari non emoglobiniche mediante cromatografia su colonna di cellulosa con la tecnica che sarà descritta più avanti, veniva dializzata contro acqua per eliminare il tampone eluente. Un volume conosciuto della soluzione così ottenuta veniva portato a secco in strato sottile sotto lampada a raggi infrarossi e quindi portato a peso costante; si ricavava allora la quantità in peso dell'emoglobina contenuta nella soluzione. Della restante soluzione originale veniva fatta una opportuna diluizione onde pro-

cedere alla misura spettrofotometrica che veniva eseguita con uno spettrofotometro BECKMAN D. U. Le estinzioni sono risultate essere le seguenti: per la Rana $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 5438$; per il Rospo $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 5732$; e per l'Ambystoma $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 5900$.

CRISTALLIZZAZIONE. — Soluzioni contenenti circa il 12% di emoglobina nativa venivano dializzate in un piccolo cilindro di vetro chiuso ad una estremità con membrana Visking cellulose contro approssimativamente 3 volumi di tampone fosfati 1,4 M, pH 6,8, riscaldato a 37°. Il sistema veniva immediatamente portato in camera fredda e dopo 24 h. il dializzante veniva sostituito da tampone fosfati dello stesso pH, 2,1 M. Dopo ancora 24 ore quest'ultimo veniva finalmente sostituito con tampone fosfati 2,8 M. pH 6,8 e la dialisi veniva proseguita, sempre in camera fredda, per circa una settimana. Con questo metodo sono stati ottenuti dei microcristalli di emoglobina di rana e cristallini romboidali di emoglobina di rospo delle dimensioni di circa $20 \times 100 \mu$.

ISOLAMENTO E PURIFICAZIONE. — Per lo studio della struttura primaria delle emoglobine è necessario stabilire innanzi tutto se si è in presenza di una emoglobina omogenea o di una miscela eterogenea di varie frazioni, in questo secondo caso è indispensabile disporre di metodi di isolamento e purificazione delle frazioni che costituiscono la miscela. Per queste ragioni il primo problema da noi affrontato è stato quello della purificazione della proteina e della separazione delle varie frazioni di cui essa è eventualmente costituita mediante metodi di cromatografia su colonne di cellulosa e di amberlite.

Separazioni della emoglobina dalle altre proteine. — Sono state usate colonne di 50×1 cm. di carbossimetilcellulosa (CMC), preparata secondo PETERSON e SOBER (²⁷), fornita dalla Ditta Serva. Le colonne venivano equilibrate con tampone fosfati 0,01 M pH 6,8 contenente lo 0,1% di KCN. I campioni di cianometaemoglobina venivano dializzati per 12 ore a 4° contro il tampone suddetto e quindi il pH della soluzione, se necessario, veniva portato a pH 6,8. Le soluzioni così ottenute, contenenti circa 150 mg di proteina in un volume di 5 ml, venivano deposte sulla colonna e l'eluizione delle proteine non emoglobiniche veniva effettuata con lo stesso tampone fosfati pH 6,8 con una velocità di flusso di 6 ml per ora; l'effluente veniva raccolto in frazioni di 2,5 ml mediante un collettore di frazioni automatico a tempo. Di tutte le frazioni veniva controllato il volume ed eseguita una misura spettrofotometrica allo spettrofotometro Beckman D.U. alle lunghezze d'onda di 280 e 415 m μ . La lettura a 415 m μ è stata eseguita poichè alcune di queste proteine non

emoglobiniche contengono tuttavia l'eme di cui la caratteristica banda di Soret ha un massimo a 415 m μ . Dopo circa 30 frazioni quando, come appare dai grafici che vengono riportati nella fig. 4, le proteine non emoglobiniche erano state completamente eluite, il tampone pH 6,8 veniva sostituito con un tampone fosfati 0,1 M pH 7,8 allo scopo di ottenere l'eluizione della emoglobina; questa avveniva molto rapidamente dopo il cambio del tampone ed era possibile raccogliere tutta la frazione

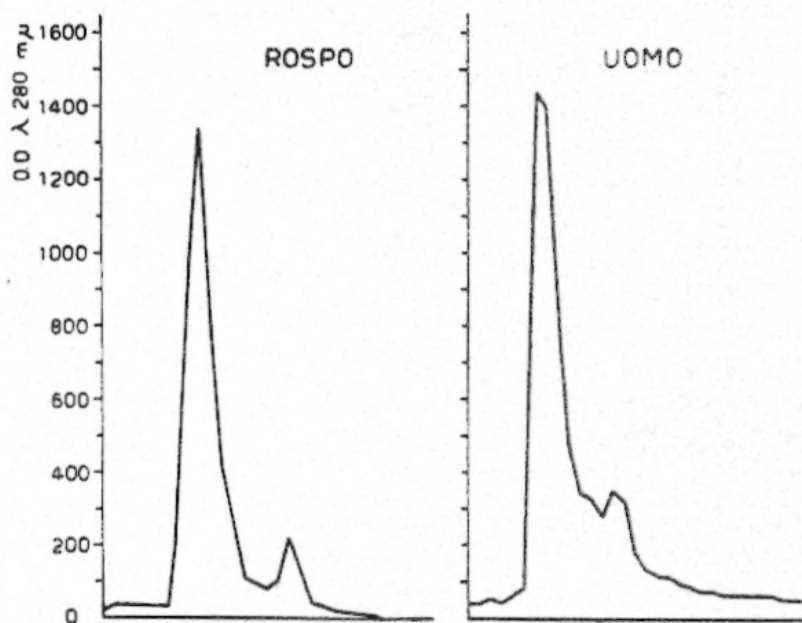


Fig. 4. - Curva di eluizione delle proteine non emoglobiniche.

colorata in circa 7-10 ml di effluente. Tutte le operazioni cromatografiche venivano eseguite in camera fredda alla temperatura di 4°C.

Cromatografia su Amberlite. — Colonne di 45 × 1 cm di Amberlite GC50 H⁺, 200 mesh, venivano equilibrate con tampone fosfati 0,05 M rispetto al Na, pH 6,9 contenente lo 0,64‰ di KCN.

Campioni di emoglobina contenenti circa 50-70 mg di proteina venivano dializzati per 12 h. a 4° contro il tampone suddetto, le soluzioni di emoglobina così ottenute venivano portate al volume di 5 ml, e, quando necessario a pH 6,9 prima di essere deposte sulla colonna cromatografica; avvenuto l'adsorbimento della proteina sulla colonna, si lavava con piccole quantità del tampone. L'eluizione delle proteine adsorbite sulla colonna è stata ottenuta con un gradiente continuo della molarità del tampone fosfati pH 6,9 da 0,05 M a 0,1 M rispetto al Na, ottenuto con un sistema a 2 camere (v. fig. 5) costituito da una riserva di tampo-

ne contenente il tampone fosfati pH 6,9 a più alta molarità, 0,4 M, comunicante con una camera di mescolamento, provvista di agitatore magnetico e comunicante a sua volta con la colonna, contenente un volume preordinato del tampone fosfati 0,05 M, pH 6,9. La camera di rimescolamento ed il tubo che la metteva in comunicazione con la colonna venivano riempiti con 50 ml di tampone. Si tratta, come è evidente dalla

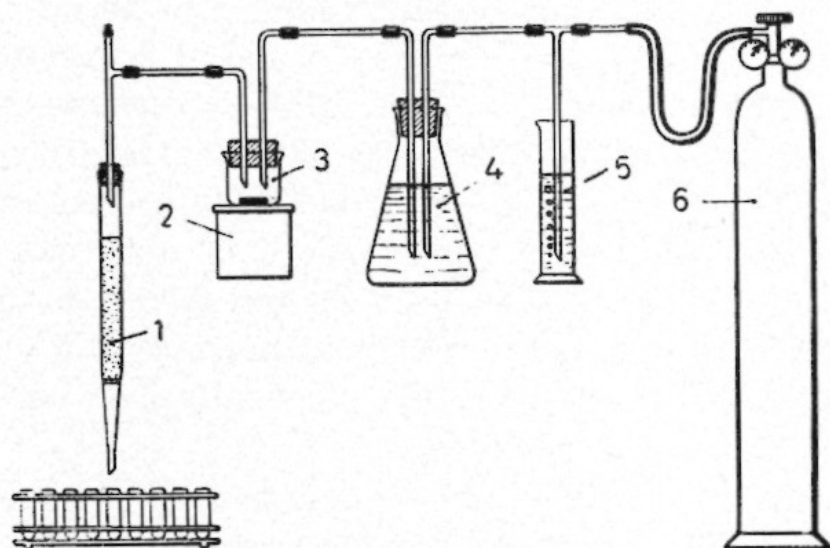


Fig. 5. - Sistema a due camere per ottenere un gradiente continuo di molarità (Na) o di pH.

figura, di un sistema chiuso nel quale il flusso è regolato dalla pressione idrostatica, assicurata dal dislivello tra l'altezza del liquido nella riserva di tampone e l'estremità inferiore della colonna cromatografica, e da una piccola pressione costante ottenuta con azoto e regolata da un manometro riduttore e dallo stabilizzatore ad acqua interposto fra il manometro e la riserva di tampone.

L'eluzione veniva effettuata con un flusso di 4-5 ml per ora, l'effluente veniva raccolto in frazioni di 2,5 ml mediante un collettore di frazioni automatico a tempo. Tutte le operazioni descritte venivano come di consueto effettuate in camera fredda a 4°C.

Veniva misurato il volume di ciascuna delle frazioni raccolte e di ciascuna veniva determinato l'assorbimento a 280 e 540 m μ con uno spettrofotometro Beckman D.U., veniva inoltre controllata la molarità rispetto al sodio dell'effluente al fotometro a fiamma mod. Jouan.

Un'esperienza eseguita con l'emoglobina umana ha dato risultati sovrapponibili a quanto riportato in letteratura. Con le soluzioni di emoglobina di anfibio si è ottenuta la separazione delle proteine non emoglobiniche, ma l'emoglobina è emersa in un solo picco senza alcun accenno al frazionamento.

Cromatografia su CMC. — Poichè con l'amberlite non sono stati ottenuti risultati soddisfacenti per quanto riguarda il frazionamento delle emoglobine eterogenee eventualmente presenti nel sangue di anfibi, sono state tentate delle separazioni con CMC.

Sono state usate colonne di 50×1 cm. equilibrate con tampone fosfati 0,01 M pH 6,8 contenente lo 0,1‰ di KCN. I campioni contenenti circa 150 mg di emoglobina venivano dializzati contro il tampone

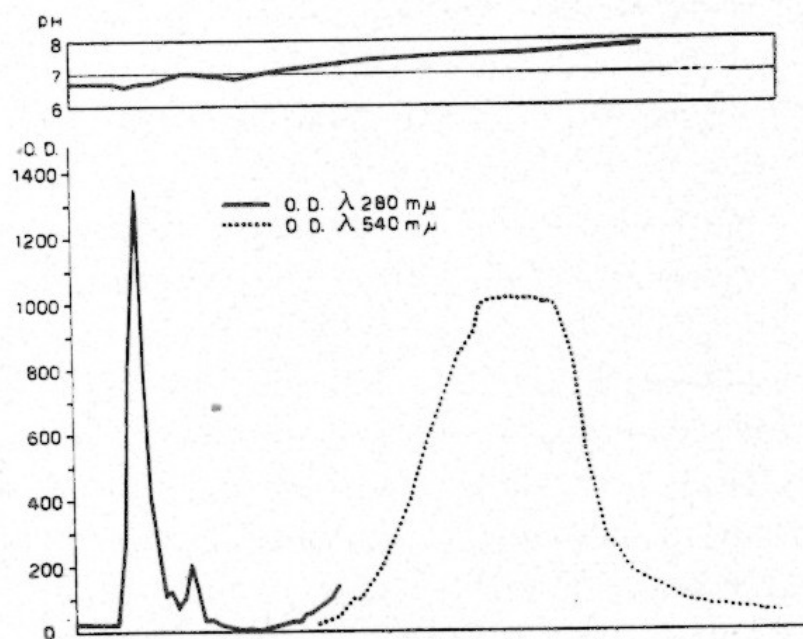


Fig. 6. - Eluizione con gradiente continuo di pH della Hb di Rospo.

fosfati pH 6,8 per 12 h a 4°C , il pH della soluzione veniva portato, se necessario a 6,8 ed il volume di essa veniva portato a 5 ml; tale soluzione veniva deposta sulla colonna con la solita tecnica.

L'eluizione veniva ottenuta con un gradiente continuo del pH della soluzione da un pH iniziale di 6,8 ad uno finale di 8,0. Tale gradiente veniva realizzato con il sistema a due camere precedentemente descritto; nella camera di mescolamento erano contenuti 50 ml di tampone fosfati 0,01 M pH 6,8 contenente lo 0,1‰ di KCN e nella riserva era contenuto un tampone fosfati 0,01 M pH 8 contenente lo 0,1‰ di KCN.

Con questo tipo di gradiente, trascurando la normale separazione delle proteine non emoglobiniche, l'emoglobina di rospo, emergeva in un solo picco e presentava un plateau piuttosto prolungato; (fig. 6) poichè tale andamento della curva di eluzione è stato interpretato come un accenno ad una separazione, abbiamo deciso di compiere un tentativo con un gradiente di tampone che salisse più lentamente dal pH iniziale al pH finale. Tale gradiente è stato realizzato con lo stesso sistema a due

camere e con la stessa disposizione dei tamponi, l'unica differenza dalla esperienza precedentemente descritta consisteva nel fatto che nella camera di mescolamento erano contenuti 100 ml, anzichè 50 ml del tampone fosfati pH 6,8. Anche con questo gradiente il picco dell'emoglobina di rospo, pur presentando un plateau piuttosto esteso, non si separava in picchi ben distinti.

Come per tutte le tecniche che abbiamo messo a punto è stata eseguita, anche in questo caso, un'esperienza con emoglobina umana, usando il gradiente più rapido di tampone, allo scopo di controllare la correttezza del procedimento da noi usato. I risultati ottenuti con questa proteina sono sovrapponibili a quelli riportati nella letteratura (²⁸).

Poichè, giunti a questo punto delle nostre esperienze, era divenuto disponibile un apparecchio tipo Autograd, costruito in Istituto (*) su nostra richiesta per avere la possibilità di programmare curve di gradienti di pH o di molarità aderenti alle necessità sperimentali che di volta in volta si presentano, è stata eseguita una esperienza di separazione di emoglobina di rospo usando tale apparecchiatura.

La curva di gradiente calcolata aveva come pH iniziale 6,8 e finale 8,4, saliva il più rapidamente possibile da pH 6,8 a pH 7,35 a questo punto iniziava una ascesa molto lenta fino al pH 7,65 e quindi di nuovo un'ascesa molto rapida fino al pH 8,4 finale.

Poichè le precedenti esperienze avevano dimostrato che il pH critico per l'eluizione delle emoglobine di rospo è compreso fra i valori di 7,4 e 7,6, con una curva così progettata si ottenevano due scopi: il primo di affrettare l'eluizione della emoglobina di rospo, che è molto labile, ed il secondo di variare molto lentamente il pH nell'intervallo critico con il fine di agevolare la separazione delle frazioni eventualmente presenti.

In pratica le 9 bottiglie dell'apparecchio sono state rifornite ciascuna con 120 ml di tampone fosfati 0,01 M contenente lo 0,1‰ di KCN dei seguenti pH a partire dalla bottiglia più vicina alla colonna: n. 1 pH 6,8, n. 2 pH 7,3, n. 3 pH 7,4, n. 4 pH 7,4, n. 5 pH 7,5, n. 6 pH 7,5, n. 7 pH 7,6, n. 8 pH 7,7, n. 9 pH 8,4. Come è noto ciascuna bottiglia, a partire dalla n. 9, comunica con la precedente, in ciascuna è contenuto un sistema di agitazione meccanico, la bottiglia n. 1 fornisce il tampone finale di pH variabile destinato alla eluizione della colonna.

E' stata usata una colonna di CMC di 50 × 1 cm. equilibrata con il tampone pH 6,8 sulla quale era stata adsorbita, con le modalità già ripe-

(*) SCACCIA G., TENTORI L., VIVALDI G., — Erogatore di soluzioni a concentrazione variabile per cromatografia — Rapporto di informazione interna, 30 luglio 1962.

tutamente descritte, la soluzione contenente circa 150 mg di emoglobina di rospo. La curva di eluzione ottenuta dimostra anche in questo caso la presenza di un picco unico con un plateau molto esteso.

COMPOSIZIONE IN AMINOACIDI DELLE EMOGLOBINE DI ANFIBI. — La composizione in aminoacidi delle emoglobine di rospo, di rana e di ambystoma è stata determinata con la tecnica cromatografica su resine polistireniche sulfonate secondo il metodo di SPACKMAN, STEIN e MOORE (²⁹).

Circa 20 mg di emoglobina purificata dalle proteine non emoglobiniche venivano idrolizzati sottoponendoli ad ebollizione a ricadere per 24 h con HCl 6 N; i liquidi acidi venivano portati a secco sotto vuoto, per tre volte, ripresi con acqua ed evaporati allo scopo di liberarli dall'acido cloridrico e quindi disciolti in 20 ml di tampone Na citrato 0,2 N pH 2,2; per ciascuna analisi cromatografica venivano usati 2 ml della soluzione così ottenuta.

Gli aminoacidi acidi e neutri venivano separati su colonne di Amberlite IR 120 di 150 × 0,9 cm, equilibrate con tampone Na citrato 0,2 M, pH 3,25, subito dopo l'adsorbimento dell'idrolizzato sulla colonna l'eluzione veniva iniziata ad una temperatura di 50° ad opera dello stesso tampone; un secondo tampone Na citrato 0,2 M pH 4,25 sostituiva automaticamente il primo dopo 7 ore 50' di esperimento corrispondenti a 235 ml di effluente, l'eluzione veniva continuata ancora fino alla 16^a ora dall'inizio, raggiungendo a questo punto il volume di effluente di 480 ml. Gli aminoacidi basici venivano cromatografati su colonne di 15 × 0,9 cm di Amberlite IR 120 equilibrate ed eluite con tampone Na citrato 0,35 M pH 5,28 ad una temperatura di 50°; l'eluzione veniva interrotta dopo 4 ore e 40' dall'inizio dell'esperimento. La velocità di flusso, per tutti e due i tipi di colonna era di 1 ml per 2'; il reagente alla ninidrina veniva automaticamente unito all'effluente nel volume di 0,5 ml ogni 2'; l'intensità del colore blu che si sviluppava dopo 15' di permanenza nella miscela in un bagno maria bollente veniva determinata per mezzo di un sistema di fotometria continua a 540 mμ, mentre con lo stesso sistema, ma ad una lunghezza d'onda di 440 mμ, veniva determinata la intensità di colore giallo sviluppato dalla reazione della ninidrina con la prolina. I risultati delle letture fotometriche venivano registrati in forma di curva da un apparecchio registratore automatico. L'integrazione delle curve così ottenute veniva in genere eseguita con il metodo altezza-tempo-larghezza, e occasionalmente, con il metodo della addizione degli assorbimenti quando si trattava di picchi troppo bassi o con andamento asimmetrico.

In tutti i campioni di emoglobina studiati sono stati trovati i seguenti aminoacidi: lisina, istidina, arginina, acido cisteico, metionina solfossido, acido aspartico, treonina, serina, acido glutammico, prolina, glicina, alanina, valina, metionina, alloisoleucina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina; si tratta di aminoacidi tutti normalmente presenti nelle proteine, mentre si è potuto escludere la presenza dei così detti aminoacidi contaminanti che rivelano la presenza d'impurità non proteiche nei preparati di proteine; l'acido cisteico e l'allosioleucina sono dovuti alla azione della idrolisi acida sulla cistina e sulla isoleucina rispettivamente, per tale ragione in alcuni casi non è stato possibile ottenere il picco della cistina, evidentemente trasformata tutta in acido cisteico nel corso dell'idrolisi.

Per quello che riguarda i solfossidi della metionina è noto che questi si formano dalla metionina durante l'adsorbimento del campione da analizzare sulla colonna di amberlite e durante il tempo in cui il campione resta adsorbito sulla colonna senza venire eluito mentre si svolge sull'altro tipo di colonna dell'apparecchio l'analisi degli aminoacidi basici.

TABELLA 1

Composizioni in aminoacidi delle globine di ambystoma, rana e bufo - (valori medi).

AMINOACIDI	μM per 100 mg di Globina		
	AMBYSTOMA	BUFO	RANA
Lisina	49,5	59,3	49,7
Istidina	50,9	56,2	67,2
Ammonio	91,0	101,5	88,8
Arginina	29,5	24,4	20,5
Acido cisteico	15,6	11,0	9,8
Metionina solfossidi	4,5	2,5	4,1
Acido aspartico	77,8	81,2	85,3
Treonina	38,7	33,2	25,1
Serina	49,8	51,3	39,9
Acido glutammico	67,6	54,9	60,9
Prolina	15,6	26,6	25,7
Glicina	41,3	34,3	52,5
Alanina	83,3	82,6	100,6
Cistina	4,7	10,2	—
Valina	49,3	40,6	39,6
Metionina	17,7	5,5	—
Alloisoleucina	0,2	0,8	—
Isoleucina	21,2	20,0	19,1
Leucina	83,0	83,7	91,6
Tirosina	16,5	21,9	24,6
Fenilalanina	41,3	50,0	44,5

Il triptofano, come è noto, viene distrutto dall'idrolisi acida; esistono pertanto dei metodi per la determinazione di questo aminoacido nella proteina non idrolizzata; queste determinazioni verranno eseguite in un tempo successivo.

La composizione percentuale in aminoacidi delle emoglobine di rospo, di rana e di ambystoma è riportato nella tabella 1.

DETERMINAZIONE DELL'AZOTO NEI CAMPIONI DI EMOGLOBINA. — La determinazione dell'azoto nelle emoglobine degli anfibi è stata eseguita con il micrometodo di Kjeldahl secondo la tecnica di KABAT, MEYER e TOMAS ⁽³⁰⁾.

Il contenuto percentuale in azoto delle tre emoglobine è risultato essere il seguente:

Rospo	16,37
Rana	15,39
Ambystoma	15,22

E' noto che, secondo BLOCK, quando un materiale proteico contiene più del 13,5% di azoto può essere considerato proteina pura ed essere idrolizzato, per l'analisi degli aminoacidi, senza ulteriore trattamento.

Alcune proprietà chimico-fisiche, la separazione e successiva caratterizzazione chimica delle sub-unità delle emoglobine studiate sono oggetto delle ricerche attualmente in corso.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Biologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) WYMAN J. - *Advanc. Protein Chem.*, 4: 407 (1948).
- (²) LEMBERG R. e LEGGE J. W. - *Hematin compounds and bile pigments*. Interscience Publishers (New York) (1949).
- (³) HUISMAN T. H. J., VAN DER HELM, VISSER H. K. A. e VLIET G. - *Symposium on abnormal hemoglobins* - Instambul - Blackwell - Oxford (1938).
- (⁴) GRATZER W. B. e ALLISON A. C. - *Biol. Rev.*, 34: 439 (1960).
- (⁵) MULLER C. J. - *A comparative study on the structure of the mammalian and avian haemoglobins*. Van Gorcum and Comp. N.V. (1961).
- (⁶) PERUTZ M. F., ROSSMANK M. G., CULLIS A. F., MUIRHEAD H., WILL G. e NORTH C. T. - *Nature*, 185: 416 (1960).
- (⁷) CULLIS A. F., MUIRHEAD H., PERUTZ M. F., ROSSMANN M. G. e NORTH A. C. T. - *Proc. roy. Soc. A* 263: 161 (1962).

- (8) BRAUNITZER G., RUDLOFF V., HILSE K., LIEBOLD B. e MULLER R. - Z. physiol. Chem., 320: 283 (1960).
 - (9) BRAUNITZER G., HILSCHMANN N., HILSE K., LIEBOLD B. e MULLER R. - Z. physiol. Chem., 322: 96 (1960).
 - (10) SCHROEDER W. A. - Progress in chemistry of organic natural products vol. 17: 371 (1959) Springer Verlag - Vienna.
 - (11) STRETTON A. O. W. e INGRAM V. M. - Fed. Proc., 19: 343 (1960).
 - (12) BRAUNITZER G., LIEBOLD B., MÜLLER R. e RUDLOFF V. - Z. physiol. Chem., 320: 170 (1960).
 - (13) BRAUNITZER G., HILSCHMANN N., RUDLOFF V., HILSE K., LIEBOLD B. e MÜLLER R. - Nature, 190: 480 (1961).
 - (14) BRAUNITZER G., HILSCHMANN N. e WITTMANN-LIEBOLD B. - Z. physiol. Chem., 323: 94 (1961).
 - (15) BRAUNITZER G., GEHRING-MÜLLER R., HILSCHMANN N., HILSE K., HOBON G., RUDLFF V. e WITTMANN-LIEBOLD B. - Z. physiol. Chem., 323: 283 (1961).
 - (16) KENDREW J. C., DICKERSON R. E., STRANDBERG B. E., HART R.G. e DAVIES D. R. - Nature, 183: 422 (1960).
 - (17) SCOULOUDI H. - Proc. roy. Soc. A 238: 181 (1960).
 - (18) EDMUNDSON A. B. e HIRS C. H. W. - Nature, 190: 663 (1961).
 - (19) KENDREW J. C., WATSON H. C., STRANDBERG B. E., DICKERSON R. E., PHILLIPS D. C. e SHORE V. C. - Nature, 190: 666 (1961).
 - (20) WATSON H. C. e KENDREW J. C. - Nature, 190: 670 (1961).
 - (21) KENDREW J. C. - Symposium n. 4 - Vth International Congress of Biochemistry - Moscow 1961 - Pergamon Press Lt.
 - (22) INGRAM V. M. - Symposium n. 4 - Vtd International Congress of Biochemistry -
 - (23) SORM F. - Plenary Lecture - Vth International Congress of Biochemistry - Moscow 1961 - Pergamon Press Lt.
 - (24) CHERNOFF A. I. - Am. J. hum. Genet., 13: 131 (1961).
 - (25) RIGGS A. e WELLES A. - Fed. Proc., 19: 78 (1960).
 - (26) DESSAUER H. C., FOX W. e RAMIREZ J. R. - Arch. Biochem., 71: 11 (1957)
 - (27) PETERSON E. A. e SOBER A. S. - J. am. chem. Soc., 78: 731 (1956).
 - (28) HUISMAN T. H. I., MARTIS E. A. e DOZY A. - J. Lab. clin. Med., 52: 312 (1958).
 - (29) SPACKMAN D. H., STEIN W. H. e MOORE S. - Anal. Chem., 30: 1190 (1958).
 - (30) KABAT E. A. e MEYER M. M. e TOMAS C. - Exp. Immunochem., 282 (1954).
-