ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

TOMMASO D'ANNA, SALVATORE METAFORA

Fosfati inorganici, esteri fosforici labili, ATP e glucosio-6-fosfato nell'ovario di *Ciona intestinalis*

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 38 (1965), n.2, p. 227–230.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_38_2_227_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)*

SIMAI & UMI

<http://www.bdim.eu/>

Embriologia chimica. — *Fosfati inorganici, esteri fosforici labili, ATP e glucosio-6-fosfato nell'ovario di Ciona intestinalis* (*). Nota di TOMMASO D'ANNA e SALVATORE METAFORA, presentata (**) dal Corrisp. P. PASQUINI.

INTRODUZIONE.

Poche ricerche sono state eseguite nel campo della embriologia chimica delle Ascidie. In particolare molto poco si conosce sui processi di produzione e di immagazzinamento dell'energia. La ricerca e il dosaggio di alcune molecole tipiche di vie metaboliche implicate nel ricambio energetico è di fondamentale importanza per mettere luce sul ruolo giocato da queste vie nell'ovogenesi e nello sviluppo embrionale.

In base a tali considerazioni ci è sembrato utile intraprendere uno studio sul contenuto in fosfato inorganico, ATP, fosfato labile e Glucosio-6-fosfato dell'ovario di *Ciona intestinalis*.

MATERIALE E METODO.

a) *Prelievo del materiale.*

Gli ovari prelevati dall'animale vivo furono accuratamente lavati a freddo con acqua di mare filtrata. Successivamente furono omogenizzati in tampone barbital 0,01 M, pH 8,6 contenente saccarosio 0,25 M. L'omogenizzazione fu eseguita a freddo con omogenizzatore vetro-teflon tipo Potter azionato a motore, per 2 minuti.

b) *Preparazione dell'estratto acido-solubile.*

L'omogenato fu centrifugato a 18.000 g. per 30 min. in centrifuga refrigerata International. Le proteine del sovrantante così ottenuto furono precipitate con TCA (concentrazione finale : 4 %). Dopo centrifugazione ed eliminazione del « pellet » proteico il sovrantante fu neutralizzato con KOH, centrifugato ancora per eliminare il perclorato di potassio formatosi ed infine essiccato a freddo e sotto vuoto. La sostanza secca, ripresa in acqua bidistillata, fu utilizzata come campione per il dosaggio del fosfato, dell'ATP, degli esteri fosforici labili e del Glucosio-6-fosfato. Tutte le operazioni preparative furono condotte a 4° C.

(*) Lavoro eseguito presso l'Istituto di Zoologia dell'Università di Palermo, sotto la direzione del prof. G. Reverberi. Il dott. S. Metafora è Ricercatore presso il Gruppo di Ricerca per l'Embriologia del C.N.R. per lo studio del differenziamento.

(**) Nella seduta del 13 febbraio 1965.

c) *Dosaggio dei fosfati inorganici e degli esteri fosforici labili totali.*

Alcune aliquote del campione furono diluite con TCA 5 % e, previo trattamento con carbone attivato DARCO G-60 per la rimozione dei pigmenti, adoperate per il dosaggio dei fosfati inorganici.

Altre aliquote furono idrolizzate con HCl 1N (conc. finale) a 100° C per 7 minuti in fiale chiuse sotto vuoto. L'idrolizzato essiccato fu sciolto in TCA 5 %, purificato con carbone attivato DARCO G-60 per rimuovere i pigmenti formati nel corso della idrolisi, e dosato per il contenuto in fosfato.

Il dosaggio del fosforo fu eseguito col micrometodo descritto da Glick [1]. A 300 μ l di campione furono aggiunti 300 μ l di reagente (molibdato di ammonio + solfato ferroso) e, lasciato sviluppare il colore per 10 min., l'assorbimento fu letto a 720 m μ in uno spettrofotometro Beckman DU mediante l'uso di microcuvette. Il contenuto in esteri fosforici labili fu calcolato per differenza fra il contenuto di fosforo dei campioni idrolizzati e quello dei non idrolizzati.

d) *Dosaggio dell'ATP e del Glucosio-6-fosfato.*

L'ATP fu dosato mediante metodo enzimatico, e il quantitativo calcolato sulla base del coefficiente di estinzione molare del TPNH a 340 m μ . La miscela di reazione, in 3 ml di volume finale, consisteva di: Glucosio 20 μ M, TPN 0,6 μ M, MgCl₂ 60 μ M, Tris-HCl buffer 0,04 M a pH 7,5; la temperatura era quella ambiente. Gli enzimi adoperati: Esochinasi 2,7 unit $\grave{a}$ K.M. e Glucosio-6-fosfato deidrogenasi 20 unit $\grave{a}$ [2].

Il glucosio-6-fosfato fu dosato con lo stesso metodo enzimatico usato per il dosaggio dell'ATP previa esclusione dalla miscela di reazione dell'esochinasi e del glucosio. Il contenuto proteico nei campioni analizzati è stato determinato col metodo di Lowry et al. [3] usando come standard albumina di siero.

Reagenti. - TPN sale sodico, Tris, esochinasi cristallina e siero-albumina furono ottenuti dalla Sigma Chemical Co.; MgCl₂ e Folin-Ciocalteu furono forniti dalla Merck Darmstadt; la Glucosio-6-fosfato deidrogenasi fu fornita dalla Boehringer Mannheim Germania.

RISULTATI.

I dati relativi ai dosaggi eseguiti sono raccolti nella tabella riassuntiva ed espressi in μ g/mg di proteine del sovratanante a 18000 g.

Il contenuto in Glucosio-6-fosfato non è compreso tra gli esteri fosforici labili totali; questi comprendono l'ATP, L'UDP, gli aldosi-1-fosfato, fruttosio-1-fosfato, fruttosio-1,6-difosfato e pirofosfato [4]. Il valore ottenuto per differenza tra gli esteri fosforici labili totali e il contenuto di ATP rappresenta il quantitativo di esteri fosforici labili qualitativamente non determinati: Fosf. lab.-ATP = 0,62 μ g/mg Prot.

TABELLA RIASSUNTIVA.

Contenuto in fosfato inorganico, Esteri fosforici labili, ATP e Glucosio-6-fosfato in ovario di Ciona intestinalis.

Esper. n°	Fosf. inorg.	Est. fosf. labili totali	ATP	G-6-P
1	4,92	—	—	—
2	5,18	—	—	—
3	4,12	1,03	—	—
4	4,40	1,15	—	—
5	4,57	—	—	—
6	5,27	0,99	—	—
7	5,05	1,43	—	—
8	3,88	1,00	0,55	0,46
9	4,5	1,1	0,41	0,63
10	3,6	0,85	0,34	0,62
11	3,54	0,98	0,45	0,6
Media	4,45	1,06	0,44	0,58
σ	$\pm 0,24$	$\pm 0,02$	$\pm 0,014$	$\pm 0,013$

Sulla base dei dati così ottenuti si deve ammettere l'esistenza nell'ovario di *Ciona* di un *pool* di fosfati inorganici che probabilmente viene gradatamente utilizzato dagli ovociti in sviluppo. La presenza dell'ATP e di altri esteri fosforici labili oltre che del Glucosio-6-fosfato ci porta a supporre la presenza nell'ovario delle normali vie metaboliche connesse con la produzione e l'immagazzinamento dell'energia.

Attualmente abbiamo in corso una ricerca sul « pattern » di distribuzione di questi metaboliti nel corso dello sviluppo embrionale di *Ciona intestinalis*.

CONCLUSIONI.

Nella presente ricerca è stato eseguito il dosaggio del fosfato inorganico e di alcuni composti organici fosforati nell'ovario di *Ciona intestinalis*.

I risultati ottenuti sono espressi sulla base del quantitativo di proteine del sovrinatante a 18000 g. È stato riscontrato un *pool* di fosfato inorganico

pari a 4,45 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Prot., un contenuto di ATP pari a 0,44 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Prot., un quantitativo di esteri fosforici labili (qualitativamente non determinati) di 0,62 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Prot. e infine un contenuto di Glucosio-6-fosfato di 0,58 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Prot.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] D. GLICK, *Quantitative chemical techniques of histo- and cytochemistry*, vol. II, p. 93 Wiley & Sons, Inc., New York (1963).
- [2] T. V. LANDAU e R. A. PEABODY, « *Exptl. Cell Res.* », 29, 54 (1963).
- [3] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR e R. J. RANDALL, « *J. Biol. Chem.* », 193 265 (1951).
- [4] L. F. LELOIR e C. E. CARDINI, *Methods in Enzymology*, S.P. Colowick e N. O. Kaplan, Eds., vol. III, p. 840, Acad. Press, New York (1957).