
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GIULIO LANZAVECCHIA, VITTORIO PARISI, ABELE SAITA

Osservazioni comparative sulle proteine del tuorlo di alcuni Anfi

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 38 (1965), n.5, p. 732–736.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_38_5_732_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/>

Biologia. — *Osservazioni comparative sulle proteine del tuorlo di alcuni Anfibi.* Nota (*) di GIULIO LANZAVECCHIA, VITTORIO PARISI e ABELE SAITA, presentata (**) dal Corrisp. S. RANZI.

Il globuli vitellini delle uova degli Anfibi sono essenzialmente costituiti da due proteine, la lipovitellina e la fosvitina, organizzate in complessi molecolari a struttura ben definita (Wallace, 1963 *b*). Le osservazioni che fino ad oggi sono state compiute per mezzo del microscopio elettronico, hanno mostrato che in tutte le specie di Anfibi osservate (*Rana esculenta*, *Rana pipiens*, *Rana nigromaculata*, *Bufo viridis*, *Bufo bufo*, *Hyla arborea*, *Xenopus laevis*, *Discoglossus pictus*, *Diemictylus viridescens*, *Triturus cristatus*, *Triturus pyrrhogaster*, *Triturus alpestris*) (Ward, 1962; Karasaki, 1963; Wartemberg, 1964, Lanzavecchia, 1965) questi complessi proteici cristallizzano sempre nel medesimo sistema esagonale semplice, e che in ogni caso la distanza tra le molecole di fosvitina, che nelle immagini elettroniche sono costituite dai punti densi agli elettroni, è sempre costantemente compresa tra 60 e 80 Å (figg. 1, 2, 3 e 4). Mancano purtroppo studi comparativi di carattere chimico e fisico sulle proteine dei globuli vitellini degli Anfibi: le sole due specie studiate a fondo per questi caratteri sono la *Rana esculenta* (Fujii, 1960), e la *Rana pipiens* (Wallace, 1963 *a*), ed i dati ottenuti sono molto simili tra di loro. Allo scopo di mettere in luce eventuali differenze tra le proteine del tuorlo di diverse specie di Anfibi, abbiamo ritenuto utile ricorrere all'analisi immunologica, sia per la sensibilità di tale metodo, sia per la possibilità di tradurre in valori quantitativi i dati ottenuti, con la conseguenza di poterli utilizzare per uno studio di carattere sistematico.

MATERIALI E METODI.

Le specie studiate in questa ricerca sono: *Triturus cristatus carnifex* Laur., *Triturus alpestris* Laur., *Xenopus laevis* D., *Bufo bufo* Laur., *Bufo viridis* Laur., *Rana esculenta* L., *Rana temporaria* L. Tutte queste specie sono state raccolte in natura (Lombardia), tranne lo *Xenopus*, specie per la quale sono stati usati esemplari di allevamento.

Per la preparazione degli antigeni (globuli vitellini), si è seguito il metodo di Ringle e Gross (1962): i globuli vitellini sono stati conservati a -20°C , ed al momento dell'uso sono stati sospesi in NaCl 10% e centrifugati a 9000 g. La concentrazione proteica è stata determinata secondo Lowry e coll. (1951).

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Zoologia dell'Università di Milano, dal Gruppo di Ricerca per l'Embriologia del C.N.R.

(**) Nella seduta dell'8 maggio 1965.

Gli antisieri sono stati preparati contro *Rana esculenta* (sei iniezioni ogni due giorni), *Bufo bufo* e *Xenopus laevis* (cinque iniezioni) e *Triturus cristatus carnifex* (quattro iniezioni), iniettando una sospensione di globuli vitellini in NaCl 0,9% per via endovenosa in conigli (due per ogni antisiero). Il salasso è stato eseguito una settimana dopo l'ultima iniezione. Soprattutto allo scopo di controllare la purezza dei preparati ed il loro stato di conservazione, si è ricorso alla immunodiffusione in micropiastre (distanze dei pozzetti 3 mm, diametro degli stessi 3 mm), di agar 1% in NaCl 10%. Le micropiastre sono state tenute per sei ore a + 37°C, oppure per un notte a + 4°C. I confronti immunologici sono stati eseguiti con la tecnica del dosaggio del precipitato di Heidelberger, in parte modificata.

Sono state usate le proporzioni di antigene e di anticorpo indicate nella Tabella I; nei confronti tutti gli antigeni sono stati portati alla stessa concentrazione proteica.

TABELLA I.
Schema di controllo immunologico.

Provetta N°	1	2	3	4
Antigene	0,05	0,10	0,20	0,30
Anticorpo (quantità in ml.)	0,35	0,30	0,20	0,10

La miscela dei due reagenti è stata tenuta per 1 h a temperatura ambiente (+20°C) e per una notte a +4°C. Il precipitato, ripetutamente lavato in NaCl 10%, è stato risospeso in NaCl 10% - NaOH 0,1 M.

Il calcolo dei gradi di affinità è stato eseguito secondo l'esempio della Tabella II.

TABELLA II.
Esempio di calcolo dei gradi di affinità.

Provetta N°	1	2	3	4	Sommatoria
<i>Triturus</i>	660	590	200	35	1485
<i>Xenopus</i>	235	110	10	20	365

(antisiero anti-*Triturus cristatus carnifex*)

$$\text{Gradi di affinità} = \frac{365}{1485} \cdot 100 = 24,6$$

OSSERVAZIONI.

I risultati delle prove di immunodiffusione e delle titolazioni in provetta, sono riassunti nelle Tabelle III e IV.

TABELLA III.

Confronti immunologici- Tests immunodiffusionali.

Antigeni \ Antisieri	<i>Rana</i>	<i>Bufo</i>	<i>Xenopus</i>	<i>Triturus</i>
<i>Rana temporaria</i>	+	—	—	—
<i>Rana esculenta</i>	+	—	—	—
<i>Xenopus laevis</i>	—	—	+	—
<i>Bufo bufo</i>	—	+	—	—
<i>Bufo viridis</i>	—	+	—	—
<i>Triturus cristatus</i>	—	—	—	+
<i>Triturus alpestris</i>	—	—	—	+

TABELLA IV.

Confronti immunologici - Gradi di Affinità.

Antigeni \ Antisieri	<i>Rana</i>	<i>Bufo</i>	<i>Xenopus</i>	<i>Triturus</i>
<i>Rana esculenta</i>	100,0	18,0	7,4	2,3
<i>Bufo bufo</i>	6,0	100,0	7,4	7,7
<i>Xenopus laevis</i>	3,4	11,7	100,0	24,6
<i>Triturus cristatus</i>	1,7	9,7	37,1	100,0

Appare evidente che le proteine del tuorlo sono molto differenti nelle diverse specie studiate, come è indicato dalla negatività dei tests immunodiffusionali, e dai valori generalmente bassi dei gradi di affinità.

All'interno dei generi, le proteine del tuorlo di *Triturus cristatus carnifex* e *Triturus alpestris* sono indistinguibili tra di loro, come del resto si verifica per *Bufo bufo* e *Bufo viridis*; in *Rana esculenta* esse sono probabilmente diffe-

renti rispetto a quelle di *Rana temporaria*, come è indicato dalla presenza dello « spur ». Si deve tuttavia far presente che dalle uova di *Rana temporaria* abbiamo estratto una minor quantità di globuli vitellini, per cui non ci è stato possibile avere soluzioni di proteine del tuorlo concentrate come quelle di *Rana esculenta*.

Interessante si presenta la posizione di *Xenopus*, intermedia tra quella degli Anuri e degli Urodeli. Ciò può essere ricondotto ad alcuni aspetti primitivi della morfologia dell'adulto, ed in generale alla posizione sistematica e filogenetica della famiglia dei Pipidi. Un tale fatto potrebbe spiegare il risultato apparentemente paradossale secondo cui i gradi di affinità tra *Xenopus*, *Rana* e *Bufo*, sono più bassi di quelli tra *Xenopus* e *Triturus*. La grande specializzazione di *Rana* e *Bufo* da un lato (dimostrata dai bassi valori di affinità trovati), e il fatto che lo *Xenopus* sembra aver conservato molti *Determinanti* « primitivi », può giustificare questi risultati.

Dati immunologici di interesse sistematico sugli Anfibi e sulle proteine del tuorlo sono scarsi e frammentari, e si riducono in pratica a quelli di Boyden e Noble (1933) sul siero degli adulti, e di Ranzi (1960) e Ranzi e coll. (1960) sul genere *Bufo* e gli ibridi delle due specie italiane di tale genere. Altri dati immunologici sulle lipovitelline (Flickinger, 1956; Landsteiner e Van der Scheer, 1940), hanno scarso interesse sistematico, essendo rivolti a problemi di embriologia e biochimica. Le osservazioni di Fujii (1960) su lipovitelline di diversi Vertebrati e quelle di Sybley (1960), su proteine delle uova di varie specie di uccelli, indicano tuttavia che le proteine del tuorlo, ed in generale quelle estraibili dalle uova, possono essere utilmente studiate in ricerche di carattere sistematico.

Le osservazioni di microscopia elettronica che rivelano una perfetta costanza di strutture nei globuli vitellini di tutti gli Anfibi, sembrano essere in contrasto con quelle immunologiche, le quali per contro mettono in luce notevoli differenze. I due metodi tuttavia lavorano a livelli notevolmente diversi: l'immunologia infatti dà indicazioni sulla presenza e sulla natura di particolari gruppi, i determinanti, che sono parti delle molecole, mentre la microscopia elettronica permette di studiare solo le strutture macromolecolari.

Le osservazioni che sono state presentate in questa nota inducono a pensare che nei diversi Anfibi le proteine del vitello siano sostanzialmente identiche dal punto di vista delle loro dimensioni e delle loro proprietà fisico-chimiche, per cui cristallizzano sempre in sistemi identici, mentre differiscono solo per i loro determinanti. Si tratterebbe in definitiva di un fenomeno analogo a quello studiato nelle emocianine dei Cefalopodi, in cui la disposizione spaziale delle subunità è identica in tutte le specie, mentre i determinanti immunologici differiscono nelle varie entità tassonomiche. D'altronde la possibilità di cristallizzare in sistemi esagonali semplici sembra essere una proprietà comune a molte proteine animali, e recentemente Roth e Porter (1964) in oociti di *Aedes aegypti* hanno messo in evidenza dei globuli vitellini che sono quasi indistinguibili, dal punto di vista della morfologia ultrastrutturale, da quelli degli Anfibi.

BIBLIOGRAFIA.

- A. BOYDEN and G. K. NOBLE, « Am. Museum Novitates », 606, 1 (1933).
 R. A. FLICKINGER, « Adv. Immunology », 2, 309 (1962).
 T. FUJII, « Acta Embryol. Morphol. Exptl. », 3, 260 (1960).
 S. KARASAKI, « J. Cell. Biol. », 18, 33 (1963).
 K. LANDSTEINER and J. VAN DER SCHEER, citato da R. C. WARNER, in H. NEURATH and K. BAYLEY, *The Proteins. Chemistry, Biological Activity and Methods*, Academic Press Inc., New York, 1954. Vol. 2, p. 435.
 G. LANZAVECCHIA, « J. Ultrastructure Research », 12, 147 (1965).
 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FAIR and R. J. RANDALL, « J. Biol. Chem. », 193, 265 (1951).
 S. RANZI, « Ist. Lombardo (Rend. Sc.) », 94, 247 (1960).
 S. RANZI, P. CITTERIO e C. SAMUELLI, « Acta Embryol. Morphol. Exptl. », 3, 65 (1960).
 D. A. RINGLE and P. R. GROSS, « Biol. Bull. », 122, 281 (1962).
 T. F. ROTH and K. R. PORTER, « J. Cell. Biol. », 20, 313 (1964).
 C. G. SYBLEY, « Ibis », 102, 215 (1960).
 R. A. WALLACE, « Biochim. Biophys. Acta », 74, 495 (1963 a).
 R. A. WALLACE, « Biochim. Biophys. Acta », 74, 505 (1963 b).
 R. T. WARD, « J. Cell. Biol. », 14, 309 (1962).
 H. WARTENBERG, « Z. Zellforsch. », 63, 1004 (1964).

SUMMARY. — *Comparative Observations on the Yolk Proteins in some Amphibia.* — The yolk globules of all Amphibia show at the electron microscope an identical crystalline structure. Therefore the serological properties of yolk proteins of several amphibians, both Anura and Urodela, have been analyzed. The immunological distances between some different genera (i.e., *Triturus*, *Bufo* and *Rana*) appear to be very great, while *Xenopus* has an intermediate position between other Anura and Urodela. This peculiar condition is probably related to the phylogenetic position of Pipidae. On the other hand, at the examination of different species of the same genus, we have not observed any serological differences between yolk proteins of both *Bufo* species (*B. bufo* and *B. viridis*) and *Triturus* species (*T. cristatus* and *T. alpestris*), while *Rana esculenta* e *Rana temporaria* have probably some different immunological determinants.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

Fotografie al microscopio elettronico di globuli vitellini di *Rana esculenta* (fig. 1), *Rana temporaria* (fig. 2), *Triturus alpestris* (fig. 3) e *Xenopus laevis* (fig. 4). In ogni caso è visibile il medesimo sistema cristallino, con uguali distanze tra le linee del reticolo. (× 110.000).

I preparati sono stati inclusi in Vestopal, dopo fissazione in acido osmico, e sezionati con l'Ultrotome LKB. Dopo colorazione con citrato di Pb, le sezioni sono state fotografate con il microscopio elettronico Hitachi HS-7.

