
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

VITTORIO PARISI, GIUSEPPINA AMBROSOLI MOGNONI

**Primi dati sulla precipitazione della emocianina di
Gasteropodi ed Anfineuri da parte dell'estratto di
Turritella communis L. (Gasteropoda,
Prosobranchia)**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 40 (1966), n.4, p. 686-691.*

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_40_4_686_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. — *Primi dati sulla precipitazione della emocianina di Gasteropodi ed Anfineuri da parte dell'estratto di Turritella communis L. (Gasteropoda, Prosobranchia)* (*). Nota di VITTORIO PARISI e GIUSEPPINA AMBROSOLI MOGNONI, presentata (**) dal Corrisp. S. RANZI.

SUMMARY. — A substance, probably a protein, is extracted from *Turritella communis* L. This substance is able to precipitate Gasteropoda and Amphineura hemocyanins. The characteristics of this reaction are studied.

Durante ricerche, tuttora in corso, sulle proprietà immunologiche delle emocianine dell'adulto e dell'embrione di alcune specie di Molluschi [2] ci siamo accorti che l'estratto di *Turritella communis* L. (specie che contiene emocianina nell'emolinfa) ha la particolare capacità di precipitare l'emocianina di altri Molluschi.

Data la notevole specificità della reazione, come verrà più oltre mostrato, e d'altra parte non essendo noto, a quanto ci risulta, tale fatto, si è pensato utile approfondire l'argomento.

MATERIALI E METODI.

1° L'emocianina dei diversi animali è stata preparata con tre diverse tecniche: per le piccole specie ci si è accontentati di utilizzare il liquido ottenuto per rottura del tegumento e centrifugato a circa $2000 \times g$; per le specie di medie e grandi dimensioni si è utilizzata o l'emolinfa, privata delle cellule per centrifugazione, o l'emocianina purificata per dialisi ed ultracentrifugazione [1]. L'emolinfa di *Murex trunculus*, che è stata usata per molti esperimenti, è stata dializzata contro acqua bidistillata per 12 ore a $+ 20^\circ C$ e liofilizzata in presenza di saccarosio. 2° Un antisiero antiemocianina, purificato per dialisi ed ultracentrifugazione, di *Natica josephinia* è stato preparato nel coniglio mediante iniezioni endovenose. 3° L'estratto di *Turritella* è stato preparato come segue: dopo cernita degli animali vivi, tenuti in acqua di mare filtrata per 2-3 giorni, si procede alla rottura del nicchio (è necessario controllare nicchio per nicchio l'eventuale presenza di anomuri). L'animale viene tagliuzzato in acqua distillata fredda e quindi si procede ad una centrifugazione onde eliminare il particolato; si dializza il supernatante limpido contro acqua distillata a freddo per 16 ore e si ricentrifuga. Il preparato grezzo così ottenuto è stato liofilizzato ed utilizzato, risospeso in NaCl 1%, in tutti gli esperimenti in provetta. 4° Le micropiastre per gli esperimenti di immunodiffusione sono state fatte con agar 1% in NaCl 1%; la distanza tra i pozzetti (aventi 3 mm di diametro) era di 3 mm. Le micropiastre sono state tenute a $+ 20^\circ C$ per circa 24 ore. 5° La determinazione della concentrazione proteica è stata fatta con la reazione del biuretto. 6° Le analisi all'ultracentrifuga analitica sono state fatte con la Spinco Mod. E. Le costanti di sedimentazione sono state calcolate estrapolando a concentrazione zero, con il metodo dei minimi quadrati, i coefficienti di sedimentazione determinati a varie concentrazioni.

(*) Ricerche del Gruppo di Embriologia per il citodifferenziamento presso l'Istituto di Zoologia dell'Università di Milano. Il materiale marino venne raccolto alla Stazione Zoologica di Napoli.

(**) Nella seduta del 16 aprile 1966.

Se si pone in micropiastre di agar in pozzetti antistanti emocianina di una specie di prosobranco o di polmonato e l'estratto di turrیتella, si ottiene dopo circa 24 ore a + 20°C un arco di precipitato del tutto simile a quello ottenibile tra emocianina ed il corrispondente antisiero. Tale arco si dissolve dopo soggiorno della micropiastra in liquido di lavaggio (NaCl 1%). L'arco ottenuto con l'estratto di turrیتella si fonde completamente con l'arco formato dalla emocianina ed il corrispondente antisiero.

TABELLA I.

Azione inibente dell'eccesso di una delle due sostanze reagenti.

Emolinfa	Estratto di turrیتella	Precipitato
0,55	0,05	— —
0,50	0,10	+ —
0,40	0,20	+ +
0,30	0,30	+ +
0,20	0,40	+ +
0,10	0,50	+ +
0,05	0,55	— —

I numeri rappresentano ml di liquido.

++ precipitato; +- opalescenza; -- reazione negativa Emolinfa di *Murex trunculus* (2,6 mg proteina per ml); estratto di turrیتella (1 mg proteina per ml). Lettura dopo 1 h a + 20°C.

La reazione di precipitazione avviene anche in provetta ed in breve tempo; si forma un flocculato (ben evidente se le due sostanze che reagiscono sono in rapporti ottimali) ovvero un forte intorbidamento e successiva precipitazione dei reagenti. Esiste una azione inibente delle alte concentrazioni di emocianina come è possibile vedere nella Tabella I e nella fig. 1. Evidentemente non è la concentrazione in sè che ha importanza ma il rapporto di concentrazione tra le due sostanze che reagiscono. Anche nella zona di eccesso di turrیتella non si ha reazione o essa è debole come risulta dal seguente esperimento: in due provette si è posto 0,05 ml di emolinfa di *Murex* (2,2 mg proteina per ml), ad esse è stato aggiunto rispettivamente 0,05 e 0,55 ml di estratto di turrیتella (2,8 mg proteina per ml): il primo tubo presenta un evidente precipitato che è invece assente nel secondo.

Il precipitato ottenuto nella zona di equivalenza si ridiscioglie se lavato ripetutamente con NaCl 1%.

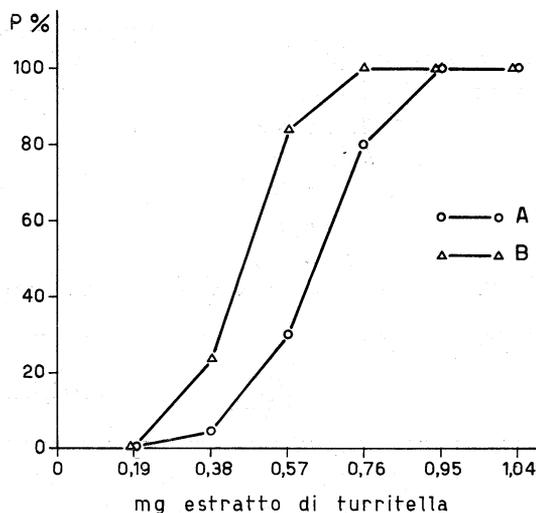


Fig. 1. - Inibizione della reazione nella zona di eccesso di emocianina.

Si noti come il precipitato è in quantità minore, nella zona di eccesso, ove la emocianina è più concentrata. Emolinfia di *Murex*, A = 2,8 mg per ml; B = 1,6 mg per ml. Precipitato, risospeso, letto a 346 m μ , espresso come percento del precipitato massimo. In ogni provetta è stato posto 0,4 ml di Hc e 0,4 ml di estratto di turrیتella alle varie concentrazioni.

Se si esamina all'ultracentrifuga l'estratto di turrیتella si osservano due componenti uno con costante di sedimentazione pari a 6,8 S ed un altro, non ben misurabile, con s_{20} non superante il valore di 3 S. Se si esamina il supernatante della miscela: emolinfia di *Murex* ed estratto di turrیتella nella zona di equivalenza, si osserva la sparizione del componente più veloce.

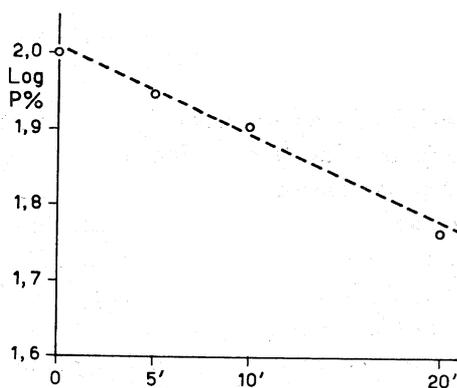


Fig. 2. - Denaturazione termica del principio attivo dell'estratto di turrیتella.

In ascisse il tempo, in ordinate il logaritmo del precipitato, espresso come percentuale del precipitato al tempo 0. Emolinfia di *Murex* (2,8 mg \times ml). *Turrیتella* (estratto) (0,8 mg \times ml). Il precipitato, risospeso, è stato letto a 346 m μ . L'esperimento è stato fatto a + 65°C.

TABELLA II.

Relazione tra quantità di precipitato e pH della soluzione.

pH	Precipitato (*)
5,1	30,5
7,2	100,0
9,1	15,4
10,7	0,0

Emolinfa di *Murex trunculus* (2,8 mg proteina per ml); estratto di turrítella (2,4 mg proteina per ml).
 (*) Come per cento del precipitato a pH 7,2.

Il principio attivo dell'estratto di turrítella è termolabile come indicato dalla fig. 2 relativa alla sua inattivazione termica. Esso ha inoltre un optimum di pH (Tabella II); un pH superiore a 10 inibisce del tutto la reazione, peraltro in modo reversibile in quanto, se si abbassa il pH mediante dialisi, si ottiene precipitato.

TABELLA III.

Rapporto tra emocianina e principio attivo dell'estratto di turrítella.

METODO	Rapporto Hc/Tr
Ultracentrifuga	3,20
Inibizione	2,78
Precipitato.	2,35

Hc = emolinfa di *Murex trunculus*; Tr = estratto di turrítella; i valori indicano la quantità di emocianina precipitata da 1 mg di principio attivo (cfr. testo).

Si è cercato di valutare quante molecole del principio attivo sono necessarie per precipitare una molecola di emocianina; purtroppo non è stato possibile impiegare il metodo più semplice e cioè la valutazione del precipitato, dato che fin'ora non si è trovata una soluzione che consenta di lavare il precipitato senza che esso si disciolga. Ci si è avvalsi sia dei dati dell'ultracentrifuga che

TABELLA IV.

Confronto tra i dati immunologici e quelli relativi all'estratto di turritella

SPECIE	Pigmento respiratorio	anti-Natica	Estratto di turritella
<i>Chiton olivaceus</i>	Hc	— —	+ +
<i>Haliotis lamellosa</i>	Hc	+ —	+ +
<i>Patella coerulea</i>	— (*)	— —	— —
<i>Monodonta turbinata</i>	Hc	— —	+ +
<i>Viviparus ater</i>	Hc	+ +	+ +
<i>Serpulorbis arenarius</i>	Hc	+ +	+ +
<i>Cerithium vulgatum</i>	Hc	+ +	+ +
<i>Aporrhais pes pellicani</i>	Hc	— —	+ +
<i>Natica josephinia</i>	Hc	+ +	+ +
<i>Cassidaria echinophora</i>	Hc	+ +	+ +
<i>Murex trunculus</i>	Hc	+ +	+ +
<i>Nassa costulata</i>	Hc	+ +	+ +
<i>Haminaea navicula</i>	—	— —	— —
<i>Lobiger serradifalci</i>	—	— —	— —
<i>Aplysia depilans</i>	—	n.f.	— —
<i>Planorbarius corneus</i>	Hb	— —	— —
<i>Eobania vermiculata</i>	Hc	n.f.	+ +
<i>Loligo vulgaris</i>	Hc	— —	— —
<i>Octopus vulgaris</i>	Hc	— —	— —
<i>Eriphia spinifrons</i>	Hc	— —	— —

Reazioni in micropiastre a +20°C. Tranne *Planorbarius* e *Viviparus*, dulcacquicoli, *Eobania*, terrestre, gli altri sono marini.

Hc emocianina nell'emolinfa; Hb emoglobina nell'emolinfa; — nella prima colonna non c'è né emocianina né emoglobina; n.f. non fatto.

(*) Anche al microscopio elettronico *Patella* sembra essere priva di emocianina (Lanzavecchia, inedito).

di quelli ricavabili dalle curve di inibizione della precipitazione (fig. 1) partendo dal presupposto che la diluizione precedente ad una diminuzione del precipitato sia quella corrispondente al rapporto più basso tra le due sostanze che reagiscono. Nella Tabella III sono riassunti i dati, insieme a quelli, poco attendibili per quanto detto, ottenuti con il dosaggio del precipitato. In base a tali dati per precipitare 2,78 mg di emocianina è necessario 1 mg del principio attivo (assumendo in base ai dati dell'ultracentrifuga, che esso è circa il 38 % della concentrazione proteica totale dell'estratto di turritella usato). Al coefficiente di sedimentazione 6,8 del principio attivo corrisponde un peso molecolare di 150×10^3 (ammettendo la molecola del principio attivo di forma sferica). Poiché l'emocianina di *Murex* ha un peso molecolare di 9×10^6 si conclude che sono necessarie 22 molecole del principio attivo per precipitare una di emocianina.

Come si è prima accennato vi è una notevole specificità nell'azione dell'estratto di turritella: nella Tabella IV vi sono riassunti i dati raccolti confrontati con quelli immunologici.

Un dato interessante è che mentre viene precipitata l'emocianina di anfineuro non viene precipitata quella di cefalopodo; una spiegazione possibile di ciò è che sono coinvolti gruppi molto antichi della molecola che sono andati persi, nel corso dell'evoluzione, nella emocianina dei Cefalopodi; tale dato va d'accordo con le attuali idee che si hanno sulla filogenesi dei Molluschi e con recenti studi biochimici su essi (3).

Un altro dato interessante è che viene precipitata anche una particolare emocianina che in ricerche in corso abbiamo visto presente nelle uova di *Viviparus*.

In conclusione nell'estratto di *Turritella communis* L. è presente un principio precipitante in modo specifico l'emocianina di gasteropodo ed anfineuro; questo principio non è dializzabile, è precipitabile con solfato di ammonio, è termolabile, ha un peso molecolare intorno a 150×10^3 ; la reazione di precipitazione avviene entro un determinato intervallo di concentrazioni relative delle sostanze che reagiscono ed è inibita dall'eccesso di una di esse; infine la reazione avviene entro un intervallo di pH essendo inibita, reversibilmente, da pH alti.

Diversi di questi dati inducono a ritenere che tale principio sia una proteina che noi proponiamo chiamare *turritellina*. Tale sostanza può essere accostata sia alle eteroagglutinine, lecitine ecc. sia alle aptoglobine.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] A. GHIRETTI-MAGALDI, G. NARDI, F. GHIRETTI e R. ZITO, *Ricerche sulle emocianine. I) Purificazione. Preparazione delle apoemocianine. Ricostituzione*, « Boll. Soc. it. biol. sper. », 38, 1839-1844 (1962).
- [2] V. PARISI, *Analisi immunologica delle emocianine di alcuni Cefalopodi*, « Rend. Acad. Naz. Lincei (Sc. Fis.) », 38, 269-273 (1962).
- [3] S. RANZI, M. PROTTI NECCHI e P. CITTERIO, *Impiego dei diagrammi di « salting-out » per lo studio della sistematica zoologica*, « Rend. Acad. Naz. Lincei (Sc. Fis.) », 38, 791-803 (1965).