
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

SALVATORE MINAFRA

Studio elettroforetico di fosfatasi alcalina di uova ed embrioni di *Phallusia mamillata*

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 42 (1967), n.1, p. 81-84.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_1_81_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. — *Studio elettroforetico di fosfatasi alcalina di uova ed embrioni di Phallusia mamillata* (*). Nota di SALVATORE MINAFRA, presentata (**) dal Corrisp. P. PASQUINI.

SUMMARY. — Homogenates of *Phallusia mamillata* eggs and embryos were analyzed by electrophoresis on starch gels. Three distinct bands with alkaline phosphatase activity were identified histochemically, using glycerophosphate, phenylphosphate, p-nitrophenylphosphate and substituted naphthol phosphates as substrates. A first band was present on all stages, except the early tail bud; a second band occurred from gastrula stage to hatching, and a third from late tail bud stage to hatching.

INTRODUZIONE.

Precedenti analisi quantitative su uova ed embrioni di ascidie hanno mostrato delle variazioni dell'attività enzimatica di fosfatasi alcalina nel corso dello sviluppo (1,2). Tali variazioni hanno un andamento simile, ma non identico, quando l'attività enzimatica è determinata su diversi substrati, quali glicerofosfato, p-nitrofenilfosfato e fenilfosfato.

Nella ipotesi che queste differenze siano dovute alla presenza di fosfatasi multiple, si è provato a separare tali fosfatasi mediante elettroforesi su gel d'amido.

MATERIALE E METODI.

Preparazione degli omogenati. È stata usata l'ascidia *Phallusia mamillata* (Cuvier) raccolta nel golfo di Napoli nei periodi luglio-settembre 1964 e Settembre-Ottobre 1965 (1).

Gli animali adulti e gli embrioni durante lo sviluppo sono stati fatti soggiornare in acqua di mare mantenuta termostaticamente a 18° C.

Uova e spermi sono stati ottenuti mediante puntura dei rispettivi dotti. Le uova erano fecondate in vitro per aggiunta di una sospensione diluita di spermi. Dopo 20-60 minuti le uova fecondate venivano lavate e trasferite in acqua di mare. A stadi determinati, gli embrioni venivano concentrati mediante centrifugazione a mano e conservati in freezer alla temperatura di -25° C. Una parte degli embrioni veniva lasciata completare lo sviluppo per controllarne la normalità; di solito il 90-95% delle uova si sviluppava normalmente fino alla schiusa.

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Istologia ed Embriologia di Palermo, e Gruppo di Ricerche per l'Embriologia del C.N.R., sotto la direzione del prof. A. Minganti.

(**) Nella seduta del 14 gennaio 1967.

(1) Desidero ringraziare vivamente il dott. Pietro Dorhn per la generosa ospitalità presso la Stazione Zoologica di Napoli, e tutto il personale che ha contribuito alla raccolta del materiale.

Sono stati usati i seguenti stadi: uova vergini; uova a 30 minuti dalla fecondazione; uova allo stadio di 32 blastomeri (3 ore dopo la fecondazione); gastrula (5 ore); neurula (7 ore); bottone caudale precoce (10 ore); bottone caudale tardivo (12 ore); larve natanti (18 ore).

Al momento dell'uso uova ed embrioni venivano scongelati e omogenizzati a freddo in un omogenizzatore di Potter-Elvehjem, con due volte il loro volume di acqua distillata. L'omogenato così ottenuto veniva sottoposto a sonicazione a freddo in un apparecchio «Acoustica» DR50AH 50 W, frequenza 40 Kc/sec, per 20 minuti e quindi centrifugato a $40.000 \times g$ a $4^{\circ}C$ per 10 minuti.

Elettroforesi su gel d'amido. Circa 10 μ l di sopranatante venivano assorbiti su inserti di carta Whatman N. 1, posti in una fessura del blocco di gel d'amido. È stato usato il metodo di elettroforesi orizzontale, con un sistema discontinuo di tamponi, secondo il metodo di Poulik [3] parzialmente modificato.

Il gel veniva preparato con amido dei Connaught Labs. di Toronto, nella concentrazione consigliata, in tampone di Tris 0,076 M-acido maleico 0,005 M pH 8,6 nel gel; per la vasca tampone di acido borico 0,225 M-NaOH 37,5 mM pH 7,9.

Il gel era sottoposto ad elettroforesi per 7 ore a $4^{\circ}C$, applicando una corrente continua di circa 20V/cm, 7 mA per gel della misura di $8 \times 12 \times 0,6$ cm. Dopo elettroforesi il gel veniva tagliato orizzontalmente a metà, e le due parti venivano poste nel mezzo di incubazione.

Colorazione istochimica. Per la rivelazione delle bande con attività enzimatica sono stati usati due diversi metodi istochimici:

a) metodo di accoppiamento simultaneo di naftoli con sostanze diazotate: al tampone Tris-maleato 0,05 M pH 8,6 veniva aggiunto 1 mg/ml di α -naftilfosfato (Michrome) e 1 mg/ml di 5-cloro-*o*-toluidina. I gels venivano incubati a $37^{\circ}C$ per 20 minuti.

Sono stati provati anche alcuni esteri di naftoli sostituiti: fosfato di Naftolo AS-MX e di Naftolo AS-TR, con lo stesso risultato, ma con colorazione meno intensa.

b) Metodo di Gomori, nella modificazione di Allen [4], con DL-glicerofosfato di sodio (Sigma Grade III) come substrato. Il mezzo di incubazione conteneva i seguenti reagenti nelle concentrazioni finali indicate: 0,05 M DL-glicerofosfato, 15 mM cloruro di calcio; 33 mM Tris, pH 9,5. Dopo incubazione a $37^{\circ}C$ per 15', i gels venivano lavati e passati per 30', a temperatura ambiente, in una soluzione contenente i seguenti reagenti alla concentrazione indicata: 0,08 M tampone Tris-maleato pH 7; 3 mM nitrato di piombo. Successivamente, i gels erano lavati per un'ora con ripetuti cambi di acqua distillata e passati in una soluzione di solfuro di ammonio al 5% per 2 minuti, seguita da un abbondante lavaggio finale.

c) È stato usato anche il p-nitrofenilfosfato (Sigma) nella concentrazione 6,3 mM, sciolto in tampone Tris-maleato pH 8,6. Il p-nitrofenolo liberato nella reazione rimaneva a lungo ben localizzato, senza effetti di diffusione.

RISULTATI E DISCUSSIONE.

Gli zimogrammi della fosfatasi alcalina hanno presentato delle variazioni in relazione agli stadi di sviluppo (fig. 1).

Con omogenati dell'uovo vergine è apparsa una banda (banda 3), la quale è stata pure presente negli stadi successivi fino a quello di neurula. Tale banda era assente per lo stadio di bottone caudale precoce. Essa è riapparsa dallo stadio di bottone caudale tardivo fino alla schiusa. Dallo stadio di gastrula fino alla schiusa, era presente una seconda banda (banda 1) più mobile verso l'anodo e meno intensa della prima. Dallo stadio di bottone caudale tardivo, fino alla schiusa era presente un'altra banda (banda 2) intensa come la banda 3, e posta tra la banda 1 e la banda 3.

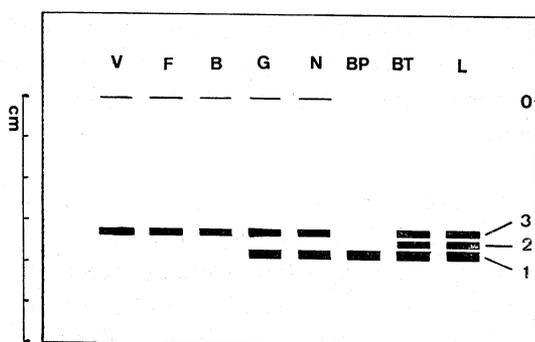


Fig. 1. — Schema dei zimogrammi di omogenati di *Phallusia mamillata* a vari stadi di sviluppo.

O, origine. 1, 2, 3: bande di attività enzimatica. V, uova vergini; F, 30 minuti dopo la fecondazione; B, blastula; G, gastrula; N, neurula; BP, bottone caudale precoce; BT, bottone caudale tardivo; L, larva natante.

Abbiamo quindi ottenuto una sola banda di attività enzimatica nelle uova vergini fino a blastula (banda 3), e bottone caudale precoce (banda 1); due bande a gastrula e a neurula (bande 1, 3); e tre bande a bottone caudale tardivo e larva natante (bande 1, 2 e 3).

Gli zimogrammi relativi ad ogni stadio embrionale non hanno mostrato alcuna differenza dipendente dal substrato adoperato per la rivelazione della attività enzimatica.

Inoltre in tutti gli stadi di sviluppo fino a neurula, una debole attività enzimatica era presente anche nel posto di inserzione del campione, sulla faccia rivolta verso l'anodo. La presenza di questa attività è stata confermata anche con metodo quantitativo su eluito del gel.

La presenza di fosfatasi alcaline multiple riscontrato durante lo sviluppo embrionale non è esclusiva di *Phallusia*. Nel gasteropode polmonato di acqua dolce *Limnea palustris*, Norris e Morrill [5] hanno messo in evidenza la comparsa di tre bande di attività enzimatica in due periodi successivi di svi-

luppo. Nel riccio di mare, Pfohl e Monroy [6] e Pfohl [7] hanno messo in evidenza due bande di attività nei primi stadi di sviluppo: una prima presente dall'uovo vergine fino a blastula mesenchimale, e una seconda a partire da questo stadio. Questi dati sono stati messi in relazione sia con quelli quantitativi di Mazia et al. [8], e Gustafson e Hasselberg [9], i quali hanno rilevato che l'attività della fosfatasi alcalina presenta un incremento dallo stadio di gastrula fino a pluteo; sia con quelli istochimici di Hsiao e Fujii [10] che hanno messo in evidenza due diverse localizzazioni di attività enzimatica che compaiono alla gastrulazione: una nell'archenteron e una nel mesenchima primario, e successivamente, fino a pluteo, nell'intestino e nelle cellule scheletogene. Questi ultimi dati hanno confermato quelli di Evola-Maltese [11] che in precedenza aveva ottenuto identici risultati.

Per quanto riguarda gli embrioni di ascidie, oltre ai dati quantitativi su accennati (1, 2) ricerche istochimiche di Leonardi (non pubblicate) hanno mostrato in embrioni di *Ciona intestinalis* attività di fosfatasi alcalina nei derivati ectodermici ed endodermici, e non in quelli mesodermici (mesenchima, muscolatura), se viene usato come substrato un fosfato di naftolo; mentre Minganti [12], usando come substrato β -glicerofosfato, ha messo in evidenza, sia in *Ciona* che in *Phallusia*, una localizzazione di attività nell'entoderma e poi nell'intestino, a partire da fine neurulazione. I dati elettroforetici mettono in evidenza la comparsa di nuove bande di fosfatasi in stadi di sviluppo embrionale dove hanno luogo importanti movimenti morfogenetici (gastrula e neurula) e in stadi in cui si compiono processi di differenziamento e organogenesi (periodo bottone caudale tardivo - larva natante).

Quindi questi dati, oltre a confermare la presenza di fosfatasi multiple, indicano una relazione tra la loro presenza e determinati processi.

A quali dei processi metabolici che si svolgono nei diversi territori dell'embrione siano connesse le varie fosfatasi e a quali fattori genetici sia dovuta la loro sintesi successiva, sono problemi di importanza fondamentale, che aspettano ancora una soluzione.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] F. AUTUORI, V. AUTUORI PEZZOLI e G. D'ANCONA LUNETTA, «Acta Embryol. Morphol. Exper.», 6, 344 (1963).
- [2] G. D'ANCONA LUNETTA e S. MINAFRA, «Acta Embryol. Morphol. Exper.», 8, 189 (1965).
- [3] M. D. POULIK, «Nature», 180, 1477 (1957).
- [4] J. M. ALLEN e G. HYNICK, «J. Histochem. Cytochem.», 11, 169 (1963).
- [5] E. NORRIS e J. B. MORRILL, «Acta Embryol. Morphol. Exper.», 7, 29 (1964).
- [6] R. J. PFOHL e A. MONROY, «Biol. Bull.», 123, N. 2, 473 (1962).
- [7] R. J. PFOHL, «Exptl. Cell Res.», 39, 496 (1965).
- [8] D. MAZIA, G. BLUMENTHAL e E. BENSON, «Biol. Bull.», 95, 250 (1948).
- [9] T. GUSTAFSON e I. HASSELBERG, «Exptl. Cell Res.», 1, 371 (1950).
- [10] S. C. HSIAO e W. K. FUJII, «Exptl. Cell Res.», 32, 217 (1963).
- [11] C. EVOLA MALTESE, «Acta Embryol. Morphol. Exper.», 1, 99 (1957).
- [12] A. MINGANTI, «Pubbl. Staz. Zool. Napoli», 25, 9 (1954).