
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

VIRGILIO BOTTE, GIOVANNI DELRIO

**Comportamento elettroforetico della fosfatasi
alcalina dell'intestino di Rana esculenta nei vari stadi
della metamorfosi**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 47 (1969), n.3-4, p.
218-220.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1969_8_47_3-4_218_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. — *Comportamento elettroforetico della fosfatasi alcalina dell'intestino di Rana esculenta nei vari stadi della metamorfosi* (*).
Nota (**) di VIRGILIO BOTTE e GIOVANNI DELRIO, presentata dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — The authors have studied the intestinal alkaline phosphatase from tadpoles and adults of *Rana esculenta*. The starch gel electrophoresis showed a change in isoenzyme pattern during metamorphosis.

Durante la metamorfosi gli Anfibi presentano profondi cambiamenti oltre che morfologici anche biochimici, tra cui i più noti sono quelli riguardanti i pigmenti retinici, l'emoglobina e le proteine seriche. Sia l'emoglobina che le proteine seriche presentano caratteristiche elettroforetiche peculiari dei vari stadi della metamorfosi (Chieffi, Siniscalco e Adinolfi, 1960; Bennet e Frieden 1962; Frieden 1967; Deuchar 1966).

Negli Anfibi anuri la fosfatasi alcalina intestinale mostra una notevole flessione di attività alla metamorfosi critica (Chieffi e Carfagna, 1959; Botte e Buonanno, 1962). Tale comportamento potrebbe essere legato ad una modificazione delle caratteristiche della proteina enzimatica nel corso della metamorfosi. Abbiamo, perciò, studiato la mobilità elettroforetica della fosfatasi estratta dall'intestino di girini di *Rana esculenta*, sacrificati a vari stadi della metamorfosi.

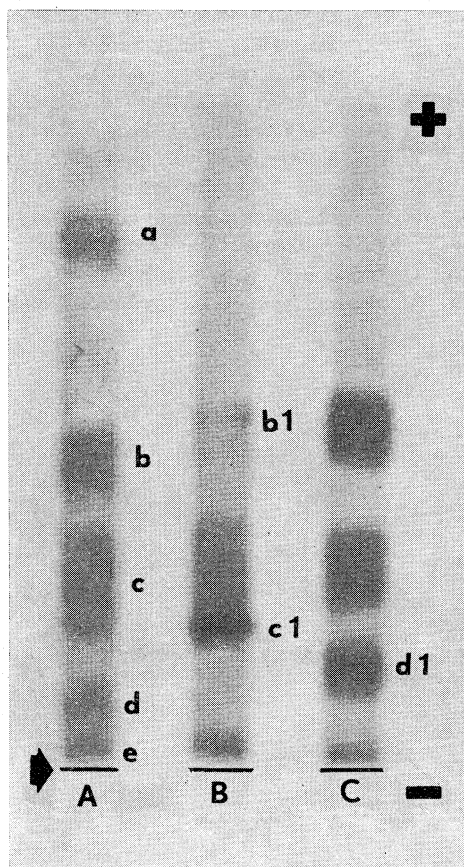
Gli intestini, prelevati a gruppi di 50 girini agli stadi 27-28, 30, 31, 32 e 33 delle tavole di seriazione del Witschi (Witschi, 1956) venivano lavati con soluzione fisiologica per gli anfibi ed omogenizzati in acqua distillata a freddo. La fosfatasi veniva estratta con alcool butilico normale seguendo la tecnica di Griffin e Cox (1966). L'estratto veniva cromatografato su una colonna di Sephadex G200 (cm 1,5 \varnothing \times cm 20 di altezza). L'enzima veniva eluito con buffer Tris-HCl, 0.05 M pH 7.4. L'attività enzimatica era valutata incubando 50 μ l di eluato in 2 ml di buffer Tris-HCl, 0.05 M pH 9.2 con MgSO₄ 0.001 M, contenente 1 mg di *p*-nitrofenolo fosfato. L'incubazione era condotta per 30' a 25°C e bloccata con 3 ml di NaOH 0.02 N. Il *p*-nitrofenolo formato veniva determinato a 400 m μ . Le frazioni contenenti l'attività enzimatica, eluita sempre in un picco unico, venivano riunite e concentrate contro Ficoll (Pharmacia) e quindi utilizzate per l'elettroforesi su amido.

(*) Lavoro eseguito presso la II Cattedra di Anatomia Comparata, Facoltà di Scienze (con un contributo del C.N.R.) e la Cattedra di Istologia ed Embriologia Generale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Napoli. Ringraziamo il Sig. Carlo Basile per la sua preziosa assistenza tecnica.

(**) Pervenuta all'Accademia il 27 settembre 1969.

Per l'elettroforesi si utilizzava il metodo di Smithies (1955) nel sistema discontinuo di Poulik (1957). L'amido idrolizzato (Connaught) era sospeso al 14% in buffer Tris-HCl, 0.05 M pH 8.6. Le camere degli elettrodi contenevano un buffer H_3BO_3 -NaOH, 0.3 M pH 8.2. Le separazioni migliori si ottenevano a 280 V e 2.2 mA dopo 10 ore di corsa a 12°C. La fosfatasi veniva sviluppata direttamente su gel secondo il metodo di Boyer (1961). Con lo stesso metodo veniva analizzata la fosfatasi alcalina estratta dall'intestino di alcuni esemplari adulti.

Fig. 1. - Comportamento elettroforetico su gel di amido della fosfatasi alcalina estratta dall'intestino dell'adulto (A) e di girini di *Rana esculenta* prima (B) e dopo la metamorfosi (C).



La fosfatasi alcalina dell'intestino dell'adulto si è risolta nel campo elettroforetico in cinque bande da noi indicate come *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, in ordine di decrescente mobilità verso l'anodo. Prima della metamorfosi (stadi 27-28) non si mettono in evidenza le bande *a*, *d*; la banda *b* presenta una maggiore mobilità (banda *b1*), mentre compare, nella parte di *c* più vicina al catodo, una frazione più attiva *c1*. Alla metamorfosi critica (stadio 31) è già riconoscibile una distribuzione di bande identica a quella che si precisa meglio negli stadi successivi (stadi 32 e 33). Sono, infatti, presenti le bande *b1* e *c* ed appare una banda caratteristica *d1* con mobilità intermedia tra *c* e *d*. Mancano le bande *a*, *c1* e *d* (fig. 1).

Questi risultati stanno a indicare che l'intestino di *Rana esculenta* presenta nel corso della metamorfosi oltre a modificazioni quantitative dell'attività fosfatase alcalina, anche notevoli modificazioni della composizione in isoenzimi. Tali variazioni si inquadrano nelle notevoli trasformazioni, anche morfologiche che interessano l'apparato digerente durante la metamorfosi.

BIBLIOGRAFIA.

- BENNETT T. P. e FRIEDEN E., «Comp. Biochem.», 4, 483 (1962).
BOTTE V. e BUONANNO C., «Boll. Zool.», 29, 471 (1962).
BOYER S., «Science», 134, 1002 (1961).
CHIEFFI G., SINISCALCO M. e ADINOLFIM., «Atti Accad. Naz. Lincei. Rend.», 28, 233 (1960).
CHIEFFI G. e CARFAGNA M., «Rend. Accad. Naz. Lincei, Cl. Sci. fis. mat. nat.», 26, 94 (1959).
DEUCHAR E. M., *Biochemical aspects of amphibian development*. Methuen & Co., London 1966.
FRIEDEN E., «Recent Progr. Hormone Research», 23, 139 (1967).
GRIFFIN M. J. e COX R. P., «Proc. Nat. Acad. Sci.», 56, 946 (1966).
POULIK M. D., «Nature», 180, 1477 (1957).
SMITHIES O., «Biochem. J.», 61, 629 (1955).
WITSCHI E., *Development of Vertebrates.*, Saunders, Philadelphia 1956.