
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

UMBERTO BIANCHI

**Zimogrammi di esterasi ottenuti su poliacrilamide ed
in gradiente di pH da omogenati di *Anopheles
atroparvus***

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 48 (1970), n.5, p. 539-542.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1970_8_48_5_539_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. — *Zimogrammi di esterasi ottenuti su poliacrilamide ed in gradiente di pH da omogenati di Anopheles atroparvus* (*). Nota di UMBERTO BIANCHI, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Esterase zymograms from single homogenates of *A. atroparvus* larva, obtained by isoelectric focusing in polyacrylamide gels, have shown a higher amount of enzyme fractions (16–18) compared to the usual number of bands (6–7) which can be observed after electrophoresis on polyacrylamide vertical gel slabs at a continuous pH value. The significance of the finding and its applicability to problems of formal genetics of enzymes, have been discussed. The conclusion is that, the electrofocusing technique does not seem to facilitate the finding of gene-enzyme systems. It has been suggested that this technique could be successfully applied to well defined analytical problems, for example the analysis of electrophoretic patterns produced by heterozygous variant forms of multimeric enzymes.

In questo laboratorio sono in corso *esperimenti tendenti a reperire sistemi «gene-enzima»*, da usarsi come utili marcatori biochimici, in diverse specie di zanzare anofeliche.

In quest'ambito di ricerca è già stato possibile segnalare la presenza di numerose forme alleliche specificanti diverse strutture molecolari primarie di proteine omologhe dotate di attività catalitica fosfatase ed esterasica in *Anopheles atroparvus*, *Anopheles labranchiae* ed *Anopheles stephensi*, Bianchi (1968 a, 1968 b).

Le varianti molecolari enzimatiche che costituiscono il «fenotipo» preso in considerazione, vengono poste in evidenza e studiate per mezzo di elettroforesi su supporti ad alto potere di separazione (geli d'amido e poliacrilamidici).

La presente Nota, che va inserita nel quadro generale di ricerca suddetto, ha lo scopo di illustrare i risultati di una serie di esperimenti, tendenti a migliorare il potere di separazione e di risoluzione dei nostri sistemi elettroforetici. Il principio tecnico al quale ci si è uniformati è quello del *frazionamento isoelettrico*, mediante elettroforesi a disco, del sistema enzimatico in esame. Tale innovazione tecnica può essere realizzata grazie all'uso di una miscela eterogenea di acidi poliaminopolicarbossilici alifatici sintetici, aventi diverso punto isoelettrico (Ampholine, LKB), che possono formare in una colonna di poliacrilamide un gradiente stabile di pH.

MATERIALE E TECNICHE.

Si sono utilizzati omogenati di singoli individui *A. atroparvus* al IV stadio larvale.

Circa 3 ml di una miscela così costituita: 4 ml di TMED (tetrametiletillendiammina) al 3,33 %; 8 ml di «Cyanogum 41» (BDH) al 66,6 %; 8 ml

(*) Ricerca eseguita con il contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche, nell'Istituto di Genetica dell'Università di Cagliari.

(**) Nella seduta del 9 maggio 1970.

di acqua distillata; 1 ml di «Ampholine» (pH 3-10); 4 ml di riboflavina allo 0,004 %, venivano prelevati e ad essi erano aggiunti 8-15 μ l di estratto proteico, ottenuto omogenando una singola larva in circa 2 gocce della sopraindicata miscela e raccogliendo l'omogenato con un capillare di vetro che, dopo essere stato chiuso alla fiamma ad una estremità, veniva posto in microcentrifuga e sottoposto ad un campo gravitazionale di $3000 \times g$ per 3'. La suddetta quantità di miscela veniva quindi stratificata in un tubicino di vetro (120 \times 6 mm). Queste operazioni venivano ripetute per altre nove volte. I dieci tubicini così preparati venivano quindi esposti a forte illuminazione. Il processo di fotopolimerizzazione si completava in circa 30'.

I tubicini venivano quindi inseriti verticalmente in un apparato per elettroforesi a disco la cui vaschetta superiore conteneva una «soluzione catodica» di etanolamina al 2,0 %. Una «soluzione anodica», costituita da 25 ml di acido fosforico saturo, sciolti in 1750 ml di acqua, veniva invece versata nella vaschetta inferiore, Dale e Latner (1968). Il frazionamento isoelettrico veniva eseguito ponendo l'apparecchio in camera fredda ad una temperatura di circa 3°C. Alimentando con una tensione costante di 110 V, si notava un assorbimento iniziale di circa 10 mA. Dopo alcune ore la corrente assorbita diminuiva fino a stabilizzarsi intorno a valori di 1-2 mA. Si continuava ad alimentare per altre 10-12 ore circa.

PREINCUBAZIONE ED INCUBAZIONE ENZIMATICA.

I gels erano posti per 2 ore in soluzione fredda di acido borico 0,15 M. Questo trattamento aveva lo scopo di annullare il gradiente di pH all'interno del gel stesso e di portare l'intero sistema ad un pH di 6,5 circa. Dopo lavaggio in acqua distillata i gels venivano incubati in 50 ml di soluzione tampone fosfata 0,15 M, pH 6,5, contenente 50 mg di sodio α -naftilacetato e 40 mg di Fast Red TRN salt. La visualizzazione delle zone ad attività esterasica veniva ottenuta nel tempo di 2-3 ore.

Gli zimogrammi di controllo (elettroforesi su piastra verticale di poliacrilamide a pH costante) venivano ottenuti seguendo particolarità tecniche recentemente descritte, Bianchi (in corso di stampa).

RISULTATI ED OSSERVAZIONI.

Gli zimogrammi delle esterasi ottenuti per frazionamento isoelettrico in gradiente di pH , risultano costituiti da numerose bande, fig. 1 B. Più precisamente sono osservabili da 15 a 18 zone in possesso della suddetta attività catalitica. Alcune di queste sono rappresentate da bande molto ben separate e sufficientemente colorate. Altre bande tendono invece a sovrapporsi, dando così origine a zone intensamente colorate. La fig. 1 A, illustra zimogrammi di esterasi ottenuti mediante elettroforesi a pH 8,65, su piastra verticale di

poliacrilamide. Si nota subito la molto più elevata capacità di separazione posseduta dai gels contenenti «Ampholine», poiché il numero di frazioni esterasiche osservabili nei supporti a pH continuo non è superiore a 6-7.

Spiegare questi reperti semplicemente sulla base di considerazioni teoriche, può anche non essere strettamente corretto. Tuttavia l'evidenza del reperto è così chiara da richiedere almeno un tentativo di interpretazione. Si potrebbe

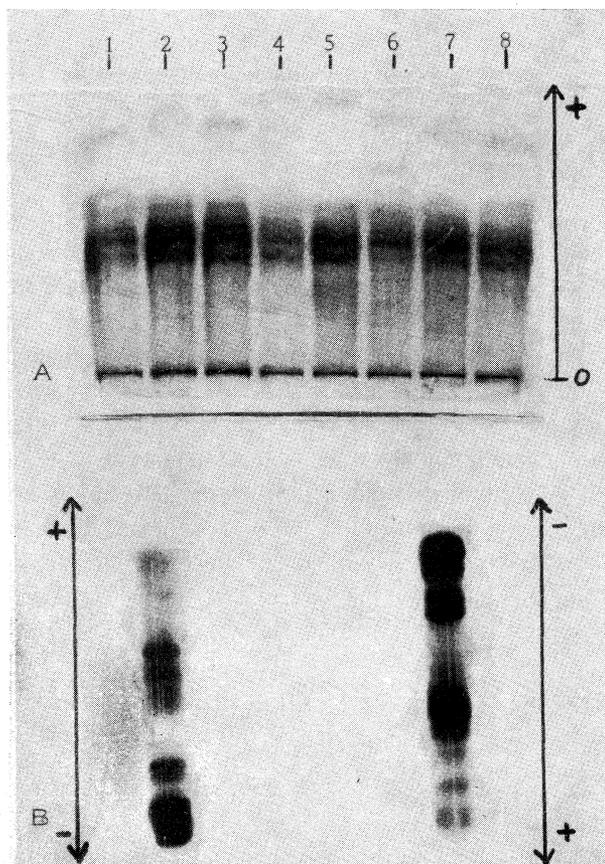


Fig. 1. — Zimogrammi di esterasi ottenuti a pH 8,65 su piastra verticale di poliacrilamide (1 A), si possono osservare (dal n. 1 al n. 8) diversi fenotipi del sistema gene-enzima *Est6*. La fig. 1 B illustra invece due zimogrammi ottenuti per frazionamento isoelettrico in gradiente di pH , mediante elettroforesi a disco.

per esempio ammettere che nel sistema catalitico studiato sono presenti effettivamente numerose e diverse forme molecolari enzimatiche. Conseguentemente, in assenza di «Ampholine», queste diverse forme molecolari tenderebbero a separarsi solo parzialmente. Non tutte le bande osservabili dopo separazione elettroforetica a pH continuo rappresenterebbero perciò singole entità catalitiche, ma piuttosto, almeno alcune di esse, risulterebbero dalla sovrapposizione di differenti frazioni molecolari.

Vi sono però alcune considerazioni che si oppongono ad una simile interpretazione. Innanzitutto non può essere escluso che alcune delle numerose bande osservabili nello zimogramma ottenuto in gradiente di pH , risultino da fenomeni di interazione molecolare, che possono aver luogo nel gel stesso, tra diverse subunità costituenti diversi multimeri dotati di attività catalitica. È ben noto che individui eterozigoti per forme enzimatiche isoalleliche aventi struttura molecolare quaternaria dimerica, possono fornire all'analisi elettroforetica tre bande e che eterozigoti per enzimi aventi struttura tetrameric, possono fornirne cinque, Shaw (1965). Se quindi subunità omologhe, appartenenti però a multimeri diversi (diverse bande), interagissero *in vitro*, assisteremmo alla formazione di un numero anche molto elevato di bande soprannumerarie, cioè di enzimi ibridi i quali non sarebbero però espressione fenotipica dell'attività di singoli o di più geni strutturali. Non può neppure essere escluso che alcune delle bande poste in evidenza in gradiente di pH possono rappresentare complessi risultanti dall'interazione delle molecole enzimatiche con alcune delle molecole di acidi poliamminopolicarbossilici costituenti l'elettrolita.

Si può inoltre sottolineare che non si è mai riusciti a riconoscere chiaramente, negli zimogrammi ottenuti in gradiente di pH , la presenza del sistema gene-enzima *Esterasi 6*. Tale sistema è stato posto in evidenza e studiato recentemente in *A. atroparvus* per mezzo di elettroforesi in pH continuo (8,65), eseguite su piastre verticali di poliacrilamide. Si può quindi affermare che il migliorato potere di separazione ottenibile mediante frazionamento isoelettrico, non sembra semplificare l'individuazione e lo studio di sistemi gene-enzima.

È invece possibile che esperimenti di frazionamento isoelettrico possano risultare utili se applicati con scopo analitico a problemi particolari. Ad esempio in casi in cui individui eterozigoti per due forme alleliche strutturali, presenti in un *locus* specificante la sintesi di un enzima supposto dimero, non forniscano gli attesi patterns elettroforetici a tre bande, ma pongano invece in evidenza zone ad attività catalitica verosimilmente risultanti dalla sovrapposizione di più bande. In questo caso una di queste zone potrebbe essere isolata da un gel a pH continuo e riesaminata mediante elettroforesi a disco in gradiente di pH .

BIBLIOGRAFIA.

- BIANCHI U., « Nature », 217, 382 (1968 a).
BIANCHI U., « Lincei, Rend. Sc. Fis. Mat. e Nat. », 45, 60 (1968 b).
BIANCHI U., « Canad. J. Genet. Cytol. » (in corso di stampa).
DALE G. e LATNER A. L., « The Lancet », 848 (1968).
SHAW C. R., « Science », 149, 936 (1965).