
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GIANNI A. AMIRANTE, SILVIO FERRARIO

**Studi sulle caratteristiche immunologiche del
teleosteo Tinca tinca L. II. Separazione e
purificazione dell'eteroagglutinina a mobilità
albuminica**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 60 (1976), n.4, p. 505–509.*
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1976_8_60_4_505_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/>

Zoologia. — *Studi sulle caratteristiche immunologiche del teleosteo Tinca tinca L. II. Separazione e purificazione dell'eteroagglutinina a mobilità albuminica* (*). Nota di GIANNI A. AMIRANTE e SILVIO FERRARIO, presentata (**) dal Socio S. RANZI.

SUMMARY. — This study was designed to isolate and purify the heteroagglutinin of *Tinca tinca* L. serum with albuminic mobility. Its biophysical and immunochemical parameters were correlated with characteristics of immunoglobulins of the higher Vertebrates.

Come risulta da nostre precedenti ricerche [1] sulle caratteristiche delle eteroagglutinine nella *Tinca tinca* L., avevamo dimostrato che nel siero di tali animali si riscontrava la presenza di tre proteine con potere agglutinante. Di queste, due mostravano mobilità elettroforetica di tipo γ - e β_2 -globulinica (elettroagglutinina 1 e 2) mentre la terza presentava una mobilità albuminica (eteroagglutinina 3). Da tali proprietà sierologiche e immunochimiche (1-2) abbiamo ritenuto di poter ascrivere alla classe delle immunoglobuline le prime due eteroagglutinine, e più precisamente alla classe delle IgG e IgM, mentre per la terza abbiamo ipotizzato per lo meno la somiglianza con quelle sostanze ad alto potere agglutinante presenti nei liquidi circolanti di moltissimi Invertebrati.

Ci è parso interessante pertanto approfondire le nostre conoscenze sulle caratteristiche biofisiche e biochimiche di tali sostanze, ed in particolar modo concentrare la nostra attenzione sulla frazione con mobilità elettroforetica albuminica, che ci sembrava essere quella con caratteristiche filogenetiche più interessanti.

Lo scopo di questa ricerca è di tentare di evidenziare l'esistenza di caratteristiche comuni alle immunoglobuline degli altri Vertebrati, e di isolare e purificare la terza proteina.

Prelievo del sangue. Il sangue fu prelevato da 60 adulti di *Tinca tinca* L., sia maschi che femmine e sierato come da metodica indicata in una precedente ricerca [1].

Immuno-elettroforesi. Sono state eseguite prove immuno-elettroforetiche del siero di tinca in toto e delle frazioni purificate, contro siero anti-siero totale di tinca e anti-eteroagglutinine indotti in conigli, come indicato altrove [1].

Trattamento del siero di tinca con carboidrati. Una parte del siero di tinca in precedenza complementato [2], fu cimentata con diversi tipi di carboidrati e quindi messa a reagire con globuli rossi di ratto.

A uguali quantità di siero di tinca (diluito 1 : 10) vennero aggiunti identici volumi dei seguenti zuccheri in soluzione 1%: destrano 10.000, glutammina, mannosio, arabinosio, glucosammina. Tali miscele furono poste in termostato a 37 °C per 1 ora, quindi di ciascuna si approntò una serie di diluizioni scalari da 1 : 20 a 1 : 2560.

(*) Ricerche eseguite nel Laboratorio di Zoologia (direttore prof. Vincenzo G. Leone) dell'Università Statale di Milano.

(**) Nella seduta del 10 aprile 1976.

Successivamente ad ogni provetta si aggiunse un egual volume di una sospensione di globuli rossi di ratto all'1% e dopo 1 ora in termostato (37 °C) e una notte in camera fredda (4 °C), venne titolata la concentrazione di eteroagglutinine, determinando la massima diluizione alla quale, per ogni serie, si riscontrava ancora l'agglutinazione (vedi Tabella I).

Separazione e purificazione della agglutinina con caratteristiche albuminiche. Il siero di tinca scomplementato è stato trattato con egual volume di una sospensione di globuli rossi di ratto formolati secondo la tecnica di Kwapinsky [3], a 37 °C per 1 ora. La sospensione è stata centrifugata a 3.000 rpm per 10' e il precipitato è stato lavato ripetutamente con soluzione tampone fosfato pH 7,2 per eliminare le frazioni proteiche che non avessero reagito. Successivamente il precipitato è stato trattato con soluzione tampone glicina-HCl pH 2,4 (a 37 °C per 1 ora) che, in precedenti esperienze, si era dimostrata atta a scindere il legame tra le componenti antigeniche della parete globulare e l'eteroagglutinina. A questo pH le altre componenti (IgG e IgM) si sono dimostrate più resistenti al trattamento e non si sono separate

TABELLA I.

Inibizione della reazione di agglutinazione del siero di tinca trattato coi vari zuccheri.

Viene espresso il valore della massima diluizione a cui si ha ancora agglutinazione positiva contro globuli rossi di ratto.

	Titolo del siero
Siero di controllo	1/1280
Siero destrano 10.000	1/640
Siero glutammina	1/160
Siero mannosio	1/1280
Siero arabinosio	1/640
Siero glucosammina	1/160

Dopo centrifugazione a 3.000 rpm per 10' il sovranatante è stato concentrato mediante ultradialisi contro tampone fosfato 0,01 M pH 7,2 fino al ripristino del volume iniziale del siero. Il concentrato, sottoposto a prove di immunoelettroforesi contro siero anti-tinca e siero anti-eteroagglutinine, si è dimostrato costituito da un'unica proteina, e, saggiato contro una sospensione all'1% di globuli rossi freschi di ratto, ha dato agglutinazione.

Ultracentrifugazione. L'eteroagglutinina così separata e purificata, portata a concentrazione di circa 7 mg/ml e dializzata contro PBS 0,01 M è stata sottoposta ad analisi all'ultracentrifuga analitica modello E, corredata con sistema ottico Schlieren. Le analisi sono state compiute in cella standard (12 mm 4° sector) alla velocità di 59.780 r.p.m. e a 20 °C. Le foto sono state scattate a intervalli regolari di 4 minuti, iniziando dopo circa 3 minuti dal raggiungimento della massima velocità.

Come è noto le resine Sephadex sono costituite da polimeri di destrano a differente peso molecolare. Inizialmente le abbiamo usate per separare le eteroagglutinine ma poichè nelle frazioni ottenute in seguito a tali separazioni non ci era stato mai possibile identificare nessuna frazione che contenesse

una o più eteroagglutinine, supponemmo che le resine trattenessero specificamente dette proteine. Tale supposizione è plausibile per il fatto che alcuni carboidrati entrano nella costituzione della parete cellulare dei globuli rossi e ne determinano le proprietà antigeniche, come ad esempio il fucosio, la glucosamina, la galattosamina il galattosio che caratterizzano i determinanti antigenici dei gruppi sanguigni umani del sistema A, B, O.

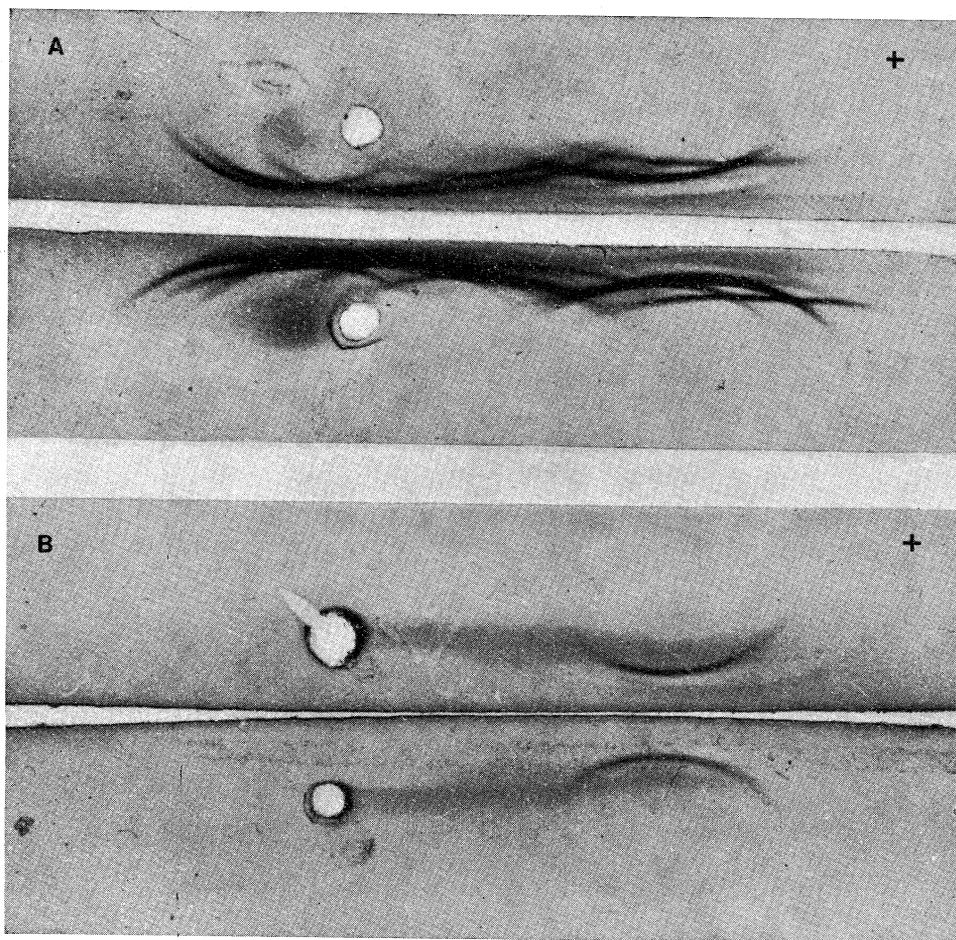


Fig. 1. - A) Immunoelettroforesi di siero di tinca normale contro antisiero di tinca. B) Immunoelettroforesi della eteroagglutinina 3^a con mobilità albuminica isolata e purificata (colorazione Blue Coomassie).

Partendo da tali premesse abbiamo trattato il siero di tinca scomplementato, con alcuni zuccheri. Dopo tale trattamento le eteroagglutinine, come risulta dalla Tabella I, hanno dimostrato una specifica reattività, dimostrata da una riduzione sensibile, seppur differente tra zucchero e zucchero, del loro potere agglutinante contro i globuli rossi di ratto. Mentre infatti il siero non trattato presenta attività agglutinante fino a una diluizione di 1/1280,

la riduzione della reazione di agglutinazione dopo trattamento con zuccheri è stata come si può notare per alcuni altamente significativa (1/160) per altri debole (1/640) o del tutto nulla. Ad esempio uno zucchero che non ha dimostrato nessuna efficacia è stato il mannosio.

Possiamo pertanto ragionevolmente dedurre che questa componente non entra nella costituzione dei determinanti antigenici specifici che riguardano tali eteroagglutinine. Da questi dati si può quindi presumere che almeno una parte delle eteroagglutinine di tinca possiede siti anticorpali specifici contro alcuni carboidrati che molto verosimilmente fanno parte dei costituenti della membrana dei globuli rossi di parecchi Vertebrati.

Va però precisato, sulla base dei dati precedentemente ottenuti [1], che questi carboidrati non fanno parte nè degli antigeni di gruppo A, B, O umano nè dell'antigene di Forssman. Infatti tali eteroagglutinine reagiscono indistintamente coi globuli rossi umani, a prescindere dal gruppo e pressochè con la medesima intensità; a ulteriore precisazione si ricorda che tali eteroagglutinine reagiscono con emazie di alcune specie Forssman positive e negative, mentre non reagiscono con emazie di altre specie Forssman positive e negative.

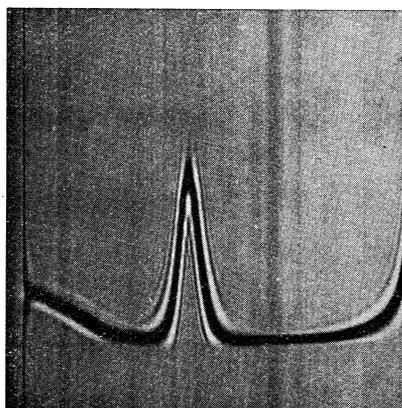


Fig. 2. - Picco dell'eteroagglutinina 3^a isolata e purificata analizzata all'ultracentrifuga analitica (foto scattata dopo circa 7 minuti dal raggiungimento della massima velocità).

L'isolamento della frazione 3^o, albuminica, è stato effettuato sfruttando sia le proprietà agglutinanti contro globuli rossi di ratto di tale frazione, sia usufruendo della nota tecnica basata sulla labilità del legame antigene-anticorpo a pH non fisiologici, molto acidi o molto basici. Sfruttando queste caratteristiche e giocando su bassi valori di pH, siamo riusciti a differenziare le diverse frazioni eteroagglutiniche; in particolare abbiamo riscontrato che agendo sul complesso emazie-eteroagglutinine a pH 2,4 si riusciva a liberare il legame coinvolgente l'eteroagglutinina 3^a (fig. 1), mentre le altre due componenti, che probabilmente sono caratterizzate da un legame più forte non venivano liberate. Va precisato, che allo scopo di evitare l'emolisi dei glo-

buli rossi a pH lontano dalle condizioni fisiologiche, sono stati usati globuli rossi fissati in formalina. È stata in questo modo ottenuta l'eteroagglutinina 3^a, la quale una volta riportata nelle condizioni di concentrazione di partenza ha dimostrato di non aver subito danni, nelle prove di agglutinazione positive eseguite contro globuli rossi di ratto e nelle prove immunoelettroforetiche, dimostranti le identiche caratteristiche immunochimiche riscontrate nel siero fresco.

Tale proteina infine, studiata all'ultracentrifuga analitica, si è dimostrata pura (presentando un unico picco molto netto) (fig. 2) e costituita da un'unica frazione con coefficiente di sedimentazione di 8,45 S.

Ringraziamento. Gli Autori vogliono ringraziare la dott. F. Laria De Bernardi che ha prestato la sua preziosa collaborazione per le analisi all'ultracentrifuga.

LAVORI CITATI

- [1] G. A. AMIRANTE, A. M. CACCAMO e S. FERRARIO (1972) - *Studi sulle caratteristiche immunologiche del teleosteo Tinca tinca L. I. Le eteroagglutinine naturali del siero*, « Rend. Accad. Naz. Lincei », 52, 783-789.
- [2] G. A. AMIRANTE (1970) - *Studi sulle caratteristiche del complemento di un teleosteo (Tinca tinca L.)*, « Boll. Zool. », 37, 469.
- [3] J. B. KWAPINSKI (1965) - *Methods of serological research.*, J. Wiley and Sons Ed. N.Y.