

73

83

ESTRATTO

RIVISTA DI BIOLOGIA

GIÀ REDATTA DA OSVALDO POLIMANTI

PUBBLICATA A CURA DELL'ISTITUTO DI BIOLOGIA GENERALE
DELL'UNIVERSITÀ DI PERUGIA

DIRETTA DA ALDO SPIRITO

ISTITUTO DI IDROBIOLOGIA E PESCOLTURA « G. B. GRASSI »
DELL'UNIVERSITÀ DI PERUGIA
DIRETTORE : PROF. GIAMPAOLO MORETTI
ISTITUTO DI CHIMICA BIOLOGICA DELL'UNIVERSITÀ DI PERUGIA
DIRETTORE : PROF. ALFREDO RUFFO

GIAMPAOLO MORETTI, MARIA BISTOCCHI e GIUSEPPE PORCELLATI

INDAGINI ELETTROFORETICHE SU PROTEINE MUSCOLARI
DI ALCUNE SPECIE DI PESCI VIVENTI NEL L. TRASIMENO

VOL. L - FASC. 3 - LUGLIO-SETTEMBRE 1958
NUOVA SERIE (VOL. X)

ISTITUTO DI IDROBIOLOGIA E PESCOLTURA « G. B. GRASSI »
DELL'UNIVERSITÀ DI PERUGIA
DIRETTORE : PROF. GIAMPAOLO MORETTI
ISTITUTO DI CHIMICA BIOLOGICA DELL'UNIVERSITÀ DI PERUGIA
DIRETTORE : PROF. ALFREDO RUFFO

GIAMPAOLO MORETTI, MARIA BISTOCCHI e GIUSEPPE PORCELLATI

INDAGINI ELETTROFORETICHE SU PROTEINE MUSCOLARI DI ALCUNE SPECIE DI PESCI VIVENTI NEL L. TRASIMENO

(in redazione il 10 agosto 1958)

Dall'esame dei tracciati elettroforetici in fase libera delle proteine estraibili con soluzioni di forza ionica $\approx 0,15$ dai muscoli scheletrici di rana (JACOB, 1945)¹, (DUBOUISSON et al., 1945)², di coniglio (JACOB, 1947)³, di carpa (HAMOIR, 1951)⁴, di uomo (HAAN, 1952)⁵ era rilevabile la diversità del quadro elettroforetico delle proteine muscolari estratte da diverse fonti animali. La comparazione dei dati non era però del tutto giustificabile, poichè le analisi erano state compiute in condizioni sperimentali parzialmente diverse, ed inoltre riguardavano specie animali assai distanziate nella scala zoologica.

Molto più indicativi appaiono i risultati ottenuti da CONNELL (1953)⁶ con diverse specie di pesci, che mostrano la diversità dei quadri elettroforetici in specie molto simili dal punto di vista fisiologico ed ecologico. I risultati ottenuti da CONNELL con elettroforesi in fase libera sono stati confermati da NIKKILA e LINKO (1955)⁷ con elettroforesi su carta. Questi ultimi Autori precisano che la separazione su carta porta ad una migliore risoluzione delle frazioni proteiche, e permette quindi una più precisa comparazione dei tracciati. Si pensava però che tali risultati avessero bisogno di ulteriori conferme (HAMOIR, 1955)⁸ soprattutto per quanto riguarda la riproducibilità.

Abbiamo quindi ritenuto opportuno estendere le ricerche ad altre specie di pesci, prendendo particolarmente in esame la riproducibilità dei risultati.

Il presente lavoro si inquadra in un ciclo di ricerche che si stanno compiendo nell'Istituto di Idrobiologia « G. B. Grassi » di Monte del Lago sul Trasimeno, riguardanti alcuni problemi di adattamento della ittiofauna ad un particolare ambiente lacustre.

Nel bacino sono infatti distinguibili forme selezionate di pesci con livree e statura particolari, quale ad esempio la ben nota laschetta del Trasimeno (*Rutilus rubilio*, Bp. *trasimenicus*), la cui individualità sistematica è ancora incerta, ed ancora altre specie, per le quali sembra utile conoscere le caratteristiche biochimiche. L'individuazione di particolari caratteri biochimici eventualmente atti a differenziare, congiuntamente agli incerti caratteri tassonomici disponibili, razze o varietà o sottospecie caratterizzate da un evidente confinamento geografico, potrebbe costituire un utile campo di indagine ecologica.

Per risolvere tale problema occorre indagare su quei caratteri biochimici che siano rappresentativi per una determinata specie, e che non varino in rapporto a momenti metabolici difficilmente controllabili, come può accadere per la funzione digestiva, la riproduzione, ecc. La composizione delle proteine muscolari, che è notoriamente stabile per ogni specie, ed inoltre, per quanto riguarda la frazione sarcoplasmatica (CONNELL, 1953)⁶, (NIKKILA e LINKO, 1955)⁷, caratteristica per ciascuna specie, è la più adatta ad essere studiata.

Pertanto questa ricerca, con la quale si esamina la composizione delle proteine muscolari delle principali specie di pesci viventi nel lago Trasimeno, rappresenta anche il tentativo di porre una base per ulteriori indagini sulla differenziazione delle varietà dalle specie.

MATERIALE E METODI

Ci si è serviti delle seguenti specie di pesci provenienti dal lago Trasimeno: carpa (*Cyprinus carpius*, L.), lasca (*Rutilus rubilio*, Bp. *trasimenicus*), tinca (*Tinca tinca*, L.), latterino (*Atherina mochon*, Cuv.).

Le analisi sono state compiute nel periodo estivo-autunnale. Gli esemplari sono stati sempre ottenuti vivi, senza far distinzione di sesso e di età. Forma ed aspetto non presentavano comunque anomalie.

Gli animali, uccisi per decapitazione, sono stati raffreddati lentamente a 0° C. Durante tutte le successive operazioni, compresa l'elettroforesi, la temperatura è stata mantenuta tra 0° e 4° C. Il muscolo bianco, pesato congelato, veniva suddiviso in fettine sottili ed estratto con puffer di fosfati di μ 0,05, pH 7,5 nel rapporto 1 : 1 (peso : volume),

per due ore, in agitazione continua. Si centrifugava quindi a 12.000 g per 20 min'. Il supernatante, limpido e roseo, veniva dializzato per 36 ore contro lo stesso puffer usato per l'estrazione, con frequente ricambio del liquido esterno. Dopo centrifugazione del dializzato si otteneva un precipitato di entità minima e talvolta inapprezzabile, che veniva allontanato. Per l'estrazione sono stati usati, in alcuni casi, puffer di forza ionica diversa (0,025-0,075-0,15) tutti di pH 7,5; la forza ionica del puffer di dialisi era sempre uguale a quella del puffer di estrazione.

La separazione elettroforetica è stata fatta con apparecchio Elvi, usando carta Whatman no. 1 e puffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ μ 0,05, pH 7,5. Tempo di migrazione: 17 ore. V/cm.: 7,8.

Le strisce sono state colorate con amidoswartz.

Il valore percentuale delle frazioni è stato rilevato planimetricamente. La mobilità è stata calcolata secondo la formula:

$$u = \frac{dl}{tv} \left(\frac{l'}{l} \right)^2, \text{ essendo } l' = Rq_a K.$$

Le proteine totali sono state dosate con spettrofotometro Hilger, secondo la formula di KALKAR (1947)⁹, misurando l'assorbimento a 280 e 260 m μ , sull'estratto dializzato opportunamente diluito.

RISULTATI

Estratti a forza ionica 0,05, pH 7,5.

Nella Fig. 1 sono riprodotti i diagrammi relativi ad estratti proteici muscolari ottenuti usando per l'estrazione, la dialisi e l'elettroforesi un puffer di μ 0,05, pH 7,5. Nei diagrammi di ciascuna specie i picchi sono stati numerati progressivamente dal più al meno mobile, tenendo conto sia dell'evidenza dei picchi sia della loro costante presenza nei diversi esperimenti.

Nei tracciati delle diverse specie si nota la presenza di un numero di frazioni principali variabile da 8 a 11, a loro volta suddivisibili in diverse sottofrazioni. Tali suddivisioni non sono state però prese in considerazione per il calcolo della composizione percentuale e della mobilità, sia per la difficoltà e conseguente imprecisione delle misurazioni, sia per la meno costante evidenza.

I valori della mobilità delle frazioni, indicate col numero d'ordine segnato nei grafici, sono riportati nella Tabella I e sono espressi come

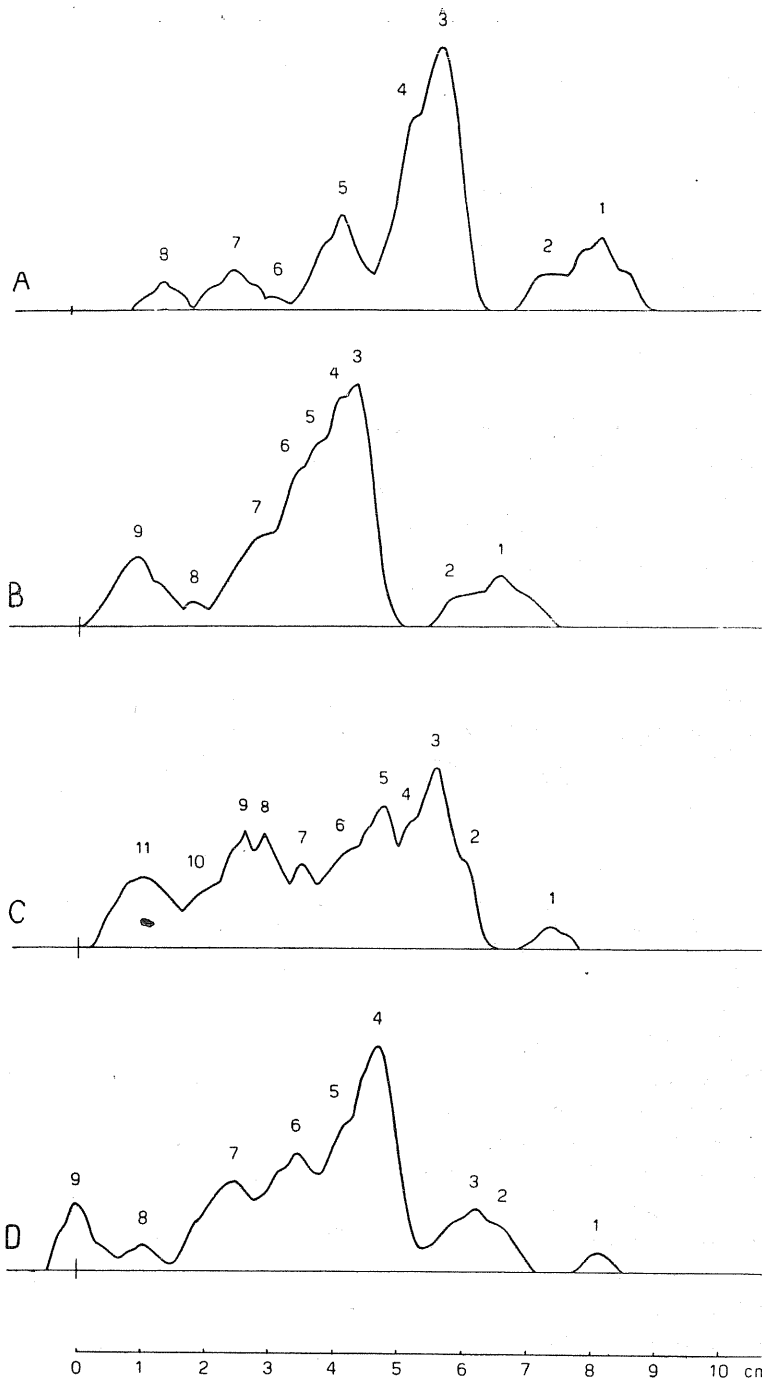


Fig. 1 — Diagrammi elettroforetici di proteine muscolari di pesci estratte, dializzate e separate con puffer di fosfati μ 0,05, pH 7,5. A) carpa; B) lasca; C) tinca; D) latterino.

TABELLA I

MOBILITÀ ELETTROFRETICA DELLE FRAZIONI PROTEICHE DI MUSCOLO BIANCO DI PESCE
ESTRATE E SEPARATE CON PUFFER DI FOSTATI μ 0,05, pH 7,5 (*)

| Specie | N. esp. | Mobilità (10^5 cm. ² volt ⁻¹ sec. ⁻¹) | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--|--|--|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | | | |
| <i>Cyprinus carpio</i> , L. | 8 | 15,2 | 14,1 | 10,3 | 9,8 | 7,5 | 5,8 | 4,7 | 2,6 | | | | | | |
| | | ($\pm 0,23$) | ($\pm 0,15$) | ($\pm 0,14$) | ($\pm 0,19$) | ($\pm 0,23$) | ($\pm 0,19$) | ($\pm 0,22$) | ($\pm 0,24$) | | | | | | |
| <i>Rutilus rubilio</i> , Bp. <i>ira-simenicus</i> . | 6 | 12,5 | 11,6 | 8,1 | 7,3 | 6,8 | 5,8 | 4,9 | 3,2 | 1,5 | | | | | |
| | | ($\pm 0,12$) | ($\pm 0,21$) | ($\pm 0,17$) | ($\pm 0,16$) | ($\pm 0,12$) | ($\pm 0,12$) | ($\pm 0,14$) | ($\pm 0,23$) | ($\pm 0,24$) | | | | | |
| <i>Tinca tinca</i> , L. | 6 | 14,9 | 11,6 | 10,5 | 9,9 | 8,7 | 8,1 | 6,6 | 5,5 | 4,8 | 4,0 | 1,6 | | | |
| | | ($\pm 0,19$) | ($\pm 0,15$) | ($\pm 0,22$) | ($\pm 0,19$) | ($\pm 0,15$) | ($\pm 0,18$) | ($\pm 0,23$) | ($\pm 0,22$) | ($\pm 0,10$) | ($\pm 0,21$) | ($\pm 0,33$) | | | |
| <i>Atherina mochon</i> , Cuv. | 6 | 15,2 | 12,5 | 11,6 | 8,9 | 7,9 | 6,4 | 4,7 | 1,9 | 0,3 | | | | | |
| | | ($\pm 0,19$) | ($\pm 0,15$) | ($\pm 0,10$) | ($\pm 0,23$) | ($\pm 0,19$) | ($\pm 0,15$) | ($\pm 0,24$) | ($\pm 0,22$) | ($\pm 0,21$) | | | | | |

(*) In parentesi vengono riportati i valori della deviazione standard.

TABELLA II

CONCENTRAZIONE PERCENTUALE DELLE FRAZIONI PROTEICHE DI MUSCOLO BIANCO DI PESCE
ESTRATTE E SEPARATE ELETTROFORETICAMENTE CON PUFFER DI FOSFATI μ 0,05, PH 7,5 (*)

| Specie | N. Proteine to- esp. tali. mg/g di peso fresco | Composizione percentuale delle varie frazioni elettroforetiche | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|--|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|--|--|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | | | |
| <i>Cyprinus carpio, L.</i> | 8 | 22,5 ($\pm 2,5$) | 13,1 ($\pm 1,55$) | 4,1 ($\pm 0,51$) | 35,9 ($\pm 1,20$) | 20,8 ($\pm 1,17$) | 15,1 ($\pm 0,51$) | 1,6 ($\pm 0,28$) | 6,1 ($\pm 0,99$) | 3,3 ($\pm 0,59$) | | | | | |
| <i>Rutilus rubilio, Bp.</i> <i>transimicus.</i> | 6 | 24,5 ($\pm 3,08$) | 8,4 ($\pm 1,32$) | 4,1 ($\pm 1,00$) | 24,6 ($\pm 1,87$) | 9,7 ($\pm 0,51$) | 15,7 ($\pm 1,51$) | 7,9 ($\pm 0,33$) | 14,0 ($\pm 0,68$) | 2,4 ($\pm 0,29$) | 13,2 ($\pm 0,49$) | | | | |
| <i>Tinca tinca, L.</i> | 6 | 25,1 ($\pm 2,70$) | 1,8 ($\pm 0,51$) | 3,2 ($\pm 0,52$) | 21,5 ($\pm 1,98$) | 7,1 ($\pm 0,79$) | 14,7 ($\pm 1,01$) | 10,2 ($\pm 1,69$) | 4,4 ($\pm 0,33$) | 10,1 ($\pm 0,37$) | 9,2 ($\pm 0,51$) | 4,9 ($\pm 0,34$) | 13,9 ($\pm 0,44$) | | |
| <i>Atherina mochon,</i> <i>Cuv.</i> | 6 | 23,5 ($\pm 2,79$) | 1,6 ($\pm 0,23$) | 3,8 ($\pm 0,40$) | 8,7 ($\pm 0,41$) | 30,4 ($\pm 1,51$) | 12,2 ($\pm 1,00$) | 18,2 ($\pm 1,22$) | 15,5 ($\pm 0,97$) | 2,4 ($\pm 0,51$) | 7,2 ($\pm 0,56$) | | | | |

(*) In parentesi vengono riportati i valori della deviazione standard.

valore medio relativo ; nella Tabella II, invece, è indicata la quantità totale delle proteine estratte e la composizione percentuale media delle frazioni.

Dall'esame dei dati della mobilità si vede come nelle diverse specie compaiano frazioni aventi mobilità pressochè uguale, come, ad esempio, la frazione 1 della carpa, tinca e latterino, o come la frazione 7 della carpa, lasca, latterino e 9 della tinca, mentre frazioni presenti in una specie non compaiono nelle altre, come la frazione 8 della carpa e 9 del latterino. Ciò verrà discusso in seguito.

Se si paragonano poi i dati della mobilità con quelli relativi alla composizione percentuale, si vede come frazioni di simile mobilità, presenti nella diverse specie, differiscano sensibilmente per il dato quantitativo, come ad esempio la frazione 4 della carpa (20,8 %) e 4 della tinca (7,1 %) e le frazioni 6 della carpa (1,6 %) e della lasca (7,9 %).

La quantità totale delle proteine estratte è la stessa per tutte le specie.

TABELLA III

QUANTITÀ TOTALE DELLE PROTEINE ESTRATTE DAL MUSCOLO BIANCO DI PESCE CON PUFFER DI FOSFATI DI FORZE JONICHE $\geq 0,15$. (Valori in mg/g di peso fresco. I dati rappresentano la media di vari esperimenti)

| Specie | Forza jonica | | | |
|------------------------|--------------|-------|-------|-------|
| | 0,025 | 0,050 | 0,075 | 0,150 |
| <i>Cyprinus carpio</i> | 19,5 | 22,5 | 26,4 | 30,5 |
| <i>Rutilus rubilio</i> | 20,3 | 24,5 | 25,9 | 27,9 |
| <i>Tinca tinca</i> | 20,9 | 25,1 | 26,9 | 30,1 |
| <i>Atherina mochon</i> | 19,1 | 23,5 | 27,3 | 29,6 |

Estratti a forza jonica 0,025-0,075-0,15.

Le estrazioni sono state compiute con puffer di fosfati di forza jonica progressivamente crescente da 0,025 a 0,15, pH 7,5. I tracciati elettroforetici non hanno mostrato variazioni rispetto a quelli precedentemente descritti, sia per quanto riguarda il numero e la mobilità

dei picchi, sia per la composizione percentuale delle frazioni, mentre la quantità delle proteine estratte varia apprezzabilmente con l'aumentare della forza jonica, come si osserva dai dati riferiti nella Tabella III.

DISCUSSIONE

Punto essenziale per l'inizio di ulteriori discussioni è la riproducibilità dei risultati. Da questo punto di vista i dati ottenuti ci sembrano più che soddisfacenti: le oscillazioni dei valori della mobilità e della composizione percentuale delle singole frazioni sono praticamente trascurabili, come è stato notato nel corso di vari esperimenti.

Dall'esame diretto dei diagrammi elettroforetici si nota, in tutte le specie esaminate, la presenza di tre raggruppamenti fondamentali dei quali il mediano è quantitativamente il più rilevante. Per la diversa mobilità e altezza dei picchi i tracciati delle singole specie appaiono però nettamente caratteristici. Tale diversità risulta poi maggiormente evidente dalla comparazione dei dati della mobilità e della composizione percentuale delle frazioni (Tabella I e II). Questi risultati ben si accordano con quanto trovato in altre specie di pesci da CONNELL (1953) ⁶ e da NIKKILA e LINKO (1955) ⁷.

Che l'aspetto dei tracciati elettroforetici ottenuti da estratti muscolari di diverse specie di pesci sia spiccatamente caratteristico appare ben chiaro: è però da discutere se ciò dipenda soltanto da variazioni di ordine quantitativo, ovvero se esistano anche differenze qualitative.

CONNELL, in base al rilievo che picchi migranti con una determinata velocità non sono presenti in tutte le specie esaminate, afferma che esiste una differenza qualitativa nella composizione proteica degli estratti.

In base ai risultati da noi ottenuti e con le tecniche da noi adottate, ci sembra che non si possa concludere decisamente in questo senso. Infatti, sebbene si possano fare gli stessi rilievi di CONNELL e di NIKKILA e LINKO per quanto riguarda la comparsa di alcune frazioni in qualche specie e non in altre, ci sembra arbitrario affermare soltanto per questa ragione che tali frazioni non esistano, anche se nei relativi tracciati non possano essere messe in evidenza. Infatti dette frazioni potrebbero essere presenti in concentrazioni troppo scarse, come appare possibile per frazioni migranti a massima e minima velocità, o mascherate da altre di entità molto cospicua, come è possibile per quelle migranti a velocità intermedia nel gruppo centrale.

Comunque, anche se per le ragioni su esposte, è difficile parlare di una differenza di ordine qualitativo nella composizione degli estratti proteici delle specie esaminate, ci sembra che le vistose differenze quantitative riscontrate siano sufficienti per giustificare l'affermazione che esiste una distribuzione proteica muscolare tale da fornire tracciati elettroforetici caratteristici per la specie. Pertanto questa tecnica appare anch'essa utilizzabile in ricerche di ecologia.

Infine è stato osservato che la quantità delle proteine estratte alle medesime condizioni nelle diverse specie è dello stesso ordine di grandezza. L'aumento della concentrazione delle proteine ottenuto aumentando la forza ionica del puffer di estrazione, è simile in tutte le speci esaminate e non determina variazioni apprezzabili dei quadri elettroforetici.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ JACOB J. — *Bull. Soc. Sci. Liège*, **4**, 231, 1945.
- ² DUBOUISSON M. e JACOB J. — *Ibidem*, **3**, 145, 1945.
- ³ JACOB J. — *Bioch. J.*, **41**, 83, 1947.
- ⁴ HAMOIR G. — *Symp. Biochem. Soc.*, **6**, 8, 1951.
- ⁵ HAAN A. M. — *Bioch. Bioph. Acta*, **7**, 61, 1952.
- ⁶ CONNELL J. J. — *Bioch. J.*, **55**, 378, 1953.
- ⁷ NIKKILA O. E. e LINKO R. R. — *Ibidem*, **60**, 242, 1955.
- ⁸ HAMOIR G. — *Adv. Prot. Chem.*, **10**, 227, 1955.
- ⁹ KALKAR H. — *J. Biol. Chem.*, **167**, 461, 1947.

GIAMPAOLO MORETTI, MARIA BISTOCCHI and GIUSEPPE PORCELLATI

ELECTROPHORETIC INVESTIGATIONS ON MUSCULAR PROTEINS
OF FISHES LIVING IN LAKE TRASIMENO

The protein composition of low ionic strength extracts of fish skeletal muscle has been examined by paper electrophoresis.

Cyprinus carpio, L.; *Rutilus rubilio*, Bp. *trasimenicus*; *Tinca tinca*, L.; *Atherina mochon*, Cuv., living in lake Trasimeno, have been investigated.

The electrophoretic patterns, obtained after extraction for 2 hours with phosphate buffer of μ 0,05, pH 7,5 from the different species, are shown in Fig. 1. The same buffer has been used for dialysis and electrophoresis.

The electrophoretic mobilities of the main protein fractions (see Table I), and their percentage composition as well as the total amounts of extracted proteins (see Table II), are referred.

The reproducibility of the patterns is very satisfying.

Each species shows a characteristic electrophoretic diagram. A different number of main components appears; certain components which are present in some species seem to be absent in others, while the components appearing in various species differ quantitatively.

The quantitative difference of the components is a very striking finding. On the contrary the existence of qualitative variations is discussed. It seems not possible to exclude that the components which do not appear in some species could be present in too small amount, or even could be masked by an other consistent component. In any case the quantitative difference is fairly enough to characterize the electrophoretic patterns of every species.

When the ionic strength used for the extraction has been varied from 0,025 to 0,150, the amount of extracted proteins increases (see Table III), while the electrophoretic patterns did not show any alteration in number and mobility of the components, or in percentage composition. The total amount of the protein extracted from the different species at the same conditions is very similar.

The possibility to utilise the electrophoretic methods for hydrobiological and ecologic problems is also examined.