
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

MARIO BELLANDO

I precursori non fosforilati degli acidi nucleinici nei cotiledoni di *Phaseolus vulgaris* allo stato quiescente

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 34 (1963), n.5, p.
560–562.*

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1963_8_34_5_560_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/>

Botanica. — *I precursori non fosforilati degli acidi nucleinici nei cotiledoni di Phaseolus vulgaris allo stato quiescente.* Nota di MARIO BELLANDO (*), presentata (**), dal Socio C. CAPPELLETTI.

Nel passaggio dei semi dallo stato quiescente a quello della germinazione i mutamenti biochimici sono notoriamente molteplici. Scopo di una serie di nostri lavori in corso è di indagare quali variazioni qualitative e quantitative avvengano a carico delle nucleoproteine e dei loro componenti. In questa Prima Nota vengono studiati i precursori non fosforilati degli AN nei cotiledoni di *Phaseolus vulgaris* in riposo, con un contenuto di H₂O dell'ordine del 10%.

MATERIALE E METODO.

a) *Estrazione del materiale.* — I cotiledoni quiescenti (in quantità di 40 gr circa) privati del tegumento, sono macinati finemente in un mulino a dischi e la polvere risultante viene passata ad un fine setaccio, eliminando la piccola quantità di materiale grossolano. La polvere fine risultante viene sospesa in circa 150 ml di acqua fredda, lasciata rigonfiare per una notte a 4°C e quindi omogeneizzata. La separazione delle sostanze a basso peso molecolare dalle proteine, polisaccaridi di vario tipo, ecc. avviene per semplice dialisi contro H₂O: la sospensione, racchiusa in un ditale di cellophane viene dializzata a lungo contro un volume circa eguale di H₂O distillata a 4°C, smuovendo saltuariamente il contenuto del ditale ed il liquido dializzante. Tre-quattro cambi di quest'ultimo, intervallati di 36 ore, sono sufficienti ad estrarre una notevole aliquota del materiale interessante la ricerca (teoricamente dai 7/8 ai 15/16). Le soluzioni giallognole risultanti sono riunite, trattate con alcool od acetone fino ad un contenuto finale del 35% in volume, e lasciate in frigorifero per 1 h circa: precipita lentamente una sostanza bianca, fioccosa, miscela di sali di calcio e magnesio di derivati del fitolo fortemente fosforilati.

Il precipitato viene eliminato per centrifugazione, lavato con acetone al 30% v/v, unendo il liquido di lavaggio al liquido da analizzare. Quest'ultimo viene tirato a secco a t. a. a pressione ridotta e quindi, per aumentarne la conservabilità, essiccato sotto vuoto in presenza di P₂O₅.

b) *Separazione cromatografica dei componenti.* — 3,4 gr di estratto secco sono disciolti in 25 ml di H₂O, portati a pH 11 con ammoniaca concentrata. Il liquido alcalino viene immesso in una colonna cromatografica (cm² 2,5), riempita fino ad una altezza di 30 cm con resina Dowex 2 X, forma formiato⁽¹⁾,

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto Botanico di Torino (Dir. A. Ceruti) con il contributo del C.N.R.

(**) Nella seduta dell'11 maggio 1963.

ed i componenti vengono eluiti secondo lo schema proposto da Cohn (« J. Am. Chem. Soc. », 72, 1421 e sgg.) leggermente modificato allo scopo di rendere più completa la separazione dei componenti.

Le soluzioni eluenti usate sono:

Formiato ammonico,	pH 10,5	$\mu = 0,01$	(componente non nucleosidico, non determ., Citidina)
»	»	» 10,1	$\mu = 0,01$ (Adenosina)
»	»	» 9,2	$\mu = 0,01$ —
»	»	» 8,25	$\mu = 0,02$ (Uridina)
»	»	» 7,5	$\mu = 0,02$ (Guanina, Adenina, Guanosina)
»	»	» 7,25	$\mu = 0,02$ —
»	»	» 7,25	$\mu = 0,1$ (Tryptofano, R—CH(NH ₂)COOH).

RICONOSCIMENTO DEI COMPONENTI ELUITI.

Le frazioni eluite sono state evaporate a 37°C sotto vuoto e purificate dal formiato ammonico per sublimazione alla stessa temperatura. Il riconoscimento di ciascuna frazione è stato effettuato in base alla sequenza di eluzione [1] ed alle curve di estinzione degli eluati stessi, tra 210 e 310 m μ [2, 3]. Per la conferma di ciascun componente si è utilizzato il metodo cromatografico, operando, per ogni sostanza, con almeno tre sistemi eluenti diversi. Contemporaneamente vennero cromatografati campioni puri di nucleosidi e nucleobasi, scelti tra quelli di più probabile identificazione con la sostanza cimentata, isolatamente ed in miscela con essa [4, 5, 6, 7].

Le macchie cromatografiche, localizzate con luce di Wood (ottenuta da una semplice lampada germicida da 4 W, con filtro Hanau) sono state eluite a diversi pH e sugli eluati si sono determinati gli spettri di estinzione in U. V. [2, 3]. In tutti i casi la sostanza si è rivelata omogenea e di proprietà identiche a quelle del componente puro con cui era stata identificata.

Il pentoso legato alle basi è stato riconosciuto, per i derivati purinici, mediante cauta idrolisi e successiva identificazione cromatografica ⁽⁵⁾. Per l'Uridina e la Citidina si è ricorso alla elettroforesi su carta in mezzo borato, (pH 9,4 $\mu = 0,13$, 7 V/cm per 7 ore) in presenza di composti campione [8, 9].

Sulle sostanze presenti in maggiore quantità sono state determinate per via spettrofotometrica le costanti di dissociazione $K'_{a,1}$: i dati coincidono con le costanti riportate dalla letteratura entro i limiti degli errori sperimentali ($\pm 2\%$) [2].

L'ultimo picco di eluzione, considerato a causa della marcata reazione con cisteina ed H₂SO₄ come un probabile desossiriboside purinico impuro, si rivelò invece costituito da almeno 5 aminoacidi neutri. Tra questi, causa dell'elevata estinzione in UV e della reazione analoga a quella dei desossipentosi, è stato riconosciuto mediante analisi cromatografica e spettrofotometrica, il triptofano. Gli altri componenti, non interessanti la nostra ricerca sono stati trascurati.

RISULTATI.

Il diagramma di eluzione è riportato nella fig. 1. Le ordinate riportano le estinzioni a 260 m μ . Esse hanno valore di rapporto quantitativo per i tre componenti principali CyR, AR, UR). Le frazioni minori (GuR, A, Gu) sono, quali defluiscono dalla colonna, fortemente impure e contengono altresì prodotti fluorescenti. Le quantità riportate al riguardo hanno quindi valore poco più che semiquantitativo; sono comunque in corso, nel nostro Istituto,

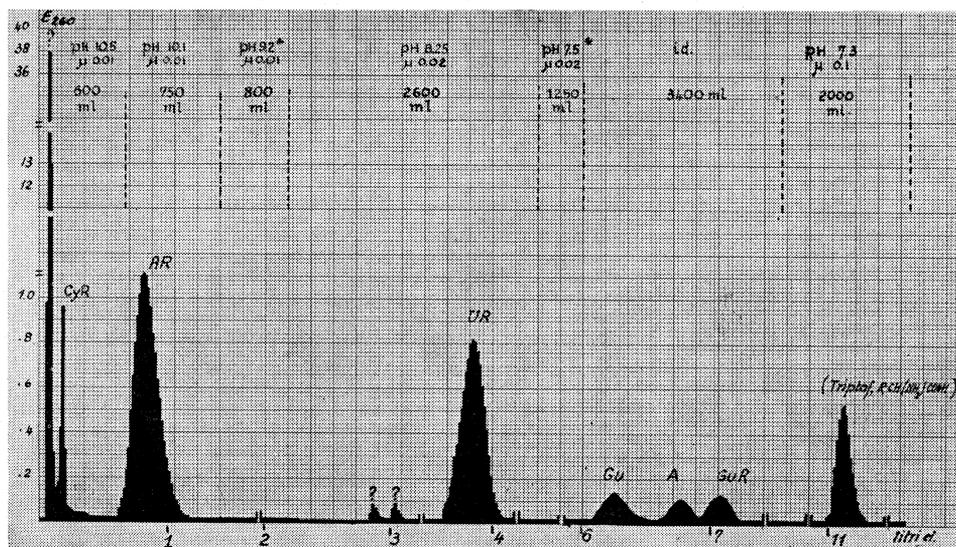


Fig. 1.

Diagramma di eluzione: Colonna cm² 3,5 × 30, Dowex 2 × formiato. Efflusso: 2 ml/min frazioni da 18 ml ciascuna. Le estinzioni sono riferite a 260 m μ . I due picchi minori compresi tra AR ed UR non sono stati esaminati per l'eventuale componente nucleico a causa della scarsissima quantità di sostanza presente. Le curve relative alla Guanina, Adenina ed al Guanirriboside sono arrotondate.

determinazioni quantitative assolute dei vari costituenti: è però ragionevole ammettere fin d'ora che le abbondanze relative dei componenti siano rispettate entro limiti alquanto ristretti. Ponendo uguale ad uno la quantità di Uridina presente, si ha:

$$UR : AR : CyR : GuR : Gu : A = 1 : 0,9 : 0,2 : 0,1 : 0,09 : 0,03 .$$

BIBLIOGRAFIA.

- [1] W. E. COHN, « J. Am. Chem. Soc. », 72, 1471 sgg. (1950).
- [2] E. CHARGAFF, J. N. DAVIDSON, *The nucleic acids*, N. York 1955.
- [3] H. M. HERSCHENSON, *U. V. and visible absorption spectra*, N. York 1956.
- [4] K. PAECH, M. W. TRACEY, *Mod. Meth. der Pfl. Analyse*, Berlin 1956.
- [5] G. DUPONT, A. KIRRMAN et al., *Chromatogr. en Ch. org. et biol.*, Paris 1960.
- [6] E. STAHL, *Dünnschichtchrom.*, Berlin 1962.
- [7] R. BLOCK, E. DURRUM et G. ZWEIG, *Paper chromat. and paper electrophoresis*, N. York 1955.
- [8] A. B. FOSTER, « Adv. in Carbohydr. Chem. », 12, 81-144 (1959).
- [9] M. LEDERER, *Paper electroph.*, Amsterdam 1955.