
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

NEVIO FIUSSELLO

Possibili errori di valutazione sul dosamento dei desossi-derivati mediante le reazioni con cisteina ed acido solforico

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 44 (1968), n.1, p. 116–119.
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1968_8_44_1_116_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/>

Fisiologia vegetale. — *Possibili errori di valutazione sul dosamento dei desossi-derivati mediante le reazioni con cisteina ed acido solforico.*
Nota di NEVIO FIUSSELLO (*), presentata (**) dal Socio C. CAPPELLETTI.

SUMMARY. — Using H_2SO_4 -cysteine reaction for determination of 2-deoxyribose, deoxyribosides, deoxynucleotides and DNA it is possible to get misleading results when the sample is not free from sugars, proteins, tryptophane and its derivatives.

The causes of error are discussed for the methods suggested by Z. Dische [2], Buchanan [3], N. Fiussello [5].

Il DNA ed i desossi-nucleotidi possono essere rivelati normalmente in tre modi:

- 1° dosaggio del fosfato con metodi colorimetrici.
- 2° dosaggio delle basi puriniche e pirimidiniche con spettrometria in U.V.
- 3° dosaggio del 2-desossi-ribosio con metodi colorimetrici.

Per i desossi-nucleosidi sono ovviamente utilizzabili solo i metodi 2° e 3°.

La spettrofotometria in U.V. sarebbe forse la più idonea perché non distruttiva nei confronti della sostanza da rivelare e dosare, ma ha un limite imposto dal fatto che non può distinguere tra ribosidi e desossi-ribosidi ed inoltre le sostanze naturali che estinguono in U.V. sono molte e non sempre ne è agevole l'allontanamento totale dalla sostanza da esaminare specie quando è ricavata da estratti biologici.

Per avere dei dati più sicuri sui desossi-nucleosidi, desossi-nucleotidi e DNA è perciò necessario ricorrere al dosaggio del 2-desossi-ribosio.

Tra i metodi colorimetrici proposti il più usato sino ad ora è quello descritto da Z. Dische con cisteina ed acido solforico [1] [2] sia *in vitro* sia in cromatografia su carta secondo Buchanan [3].

Si ottiene una colorazione rosa con un massimo di assorbimento sui 490 m μ .

Purtroppo anche altri composti di origine biologica possono dare tale colorazione in condizioni opportune. Il triptofano, la triptamina, l'acido β -indol-acetico e in genere i derivati indolici, in presenza di esosi danno una colorazione rosa [4].

In particolare se lo zucchero è il fruttosio o il sorbosio, abbastanza diffusi nei vegetali, la reazione avviene già a temperatura ambiente mentre per gli altri esosi è necessario il riscaldamento.

Nella rivelazione di macchie ottenute con cromatografia su carta la possibilità di errore esiste anche in assenza di zuccheri perché l'acido solforico idrolizza la carta liberando glucosio.

(*) Istituto Botanico dell'Università di Torino (dir. prof. A. Ceruti).

(**) Nella seduta del 9 dicembre 1967.

È importante osservare che 1 γ di triptofano, in presenza di fruttosio, dà una estinzione di circa 0,070 che nella reazione di Dische corrisponde a circa 10 γ di 2-desossi-ribosio. Quindi è necessario essere sicuri di aver allontanato i derivati indolici (auxine) e le proteine contenenti triptofano.

Probabilmente molti dati sui desossi-derivati contenuti in liquidi organici o in estratti dovranno essere riveduti.

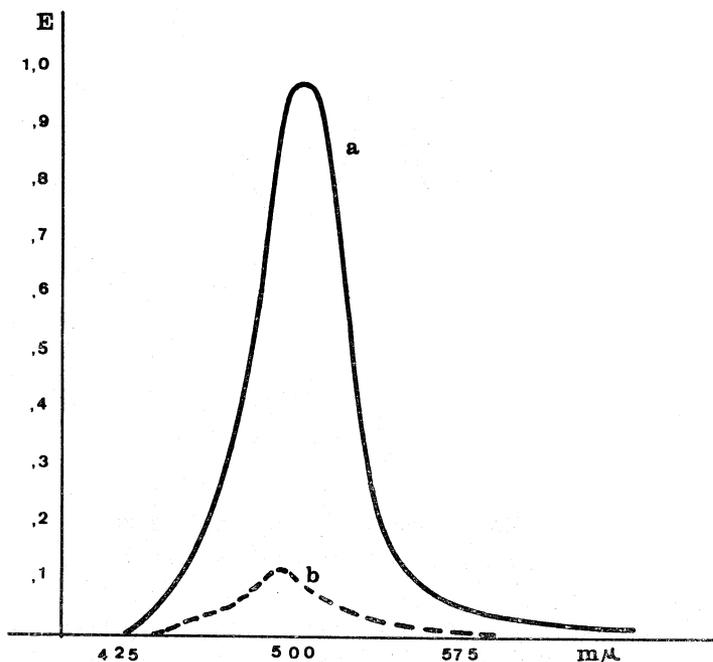


Fig. 1. — Spettro del 2-desossi-ribosio dopo 2 ore.

a = nuovo metodo proposto; *b* = senza Fruttosio (Dische).

Per i desossiribonucleoprotidi, dato che la parte proteica pare non debba contenere triptofano, non dovrebbe esservi possibilità di errori purché, naturalmente, siano state allontanate tutte le altre proteine ed i derivati indolici.

Recentemente ho proposto un nuovo metodo colorimetrico per il dosamento del 2-desossi-ribosio, dei desossi-nucleosidi, desossi-nucleotidi e DNA[5].

I reagenti sono:

| | |
|---|--------|
| Fruttosio 1% | ml 0,1 |
| cisteina cloridrato 1,5% | ml 0,2 |
| sostanza da dosare | ml 1,0 |
| H ₂ SO ₄ /H ₂ O = 70/30 V.V. | ml 3,0 |

A temperatura ambiente si ottiene una colorazione rosa come per la reazione di Dische, ma il massimo di assorbimento è a 506 $m\mu$ e la sensibilità è circa 10 volte maggiore.

La legge di Lambert-Beer è rispettata da 1 γ /ml a 15 γ /ml di 2-desossi-ribosio.

Anche per questa reazione sono possibili interferenze con il triptofano ed i derivati indolici, è quindi necessario allontanare scrupolosamente tali sostanze.

Per quanto riguarda la presenza di zuccheri invece non vi sono pericoli di interferenze. Tra i più comuni monosaccaridi saggiati solo il 2-desossi-glucosio ed il 2-desossi-galattosio potrebbero causare interferenze (fig. 2).

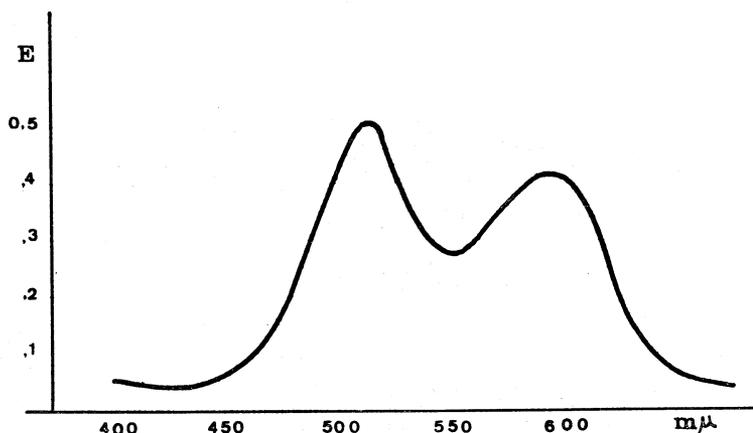


Fig. 2. - Spettro del 2-desossi-galattosio.

Questi zuccheri però danno una colorazione viola-azzurra ed uno spettro notevolmente diverso e facendo una lettura a $\lambda = 595$ la loro presenza può essere rivelata.

Il ribosio non dà alcuna interferenza e quindi è praticamente possibile dosare 2-desossi-derivati anche in presenza di ribonucleosidi, ribonucleotidi e RNA.

Il fruttosio, anche in quantità 30 volte maggiori del 2-desossi-ribosio non produce variazioni superiori all'1%.

TABELLA I.

| Zucchero saggiato | concentrazione 300 γ /ml $\lambda = 506$ | conc. 300 γ /ml + 10 γ /ml di 2 desossi-ribosio |
|--|--|--|
| Fruttosio | incolore | non interferisce |
| Sorbosio | incolore | non interferisce |
| Galattosio | incolore | non interferisce |
| Glucosio | incolore | non interferisce |
| Ribosio | incolore | non interferisce |
| Arabinosio | incolore | non interferisce |
| Xilosio | incolore | non interferisce |
| Ramnosio (6-desossi-mannosio) | incolore | non interferisce |
| Fucosio (6-desossi-galattosio) | incolore | non interferisce |
| 2-desossi-galattosio | colore violetto intenso | interferisce |
| 2-desossi-glucosio | colore violetto intenso | interferisce |

CONCLUSIONI.

1) Usando la reazione di Z. Dische per il riconoscimento ed il dosaggio dei desossi-pentosi si può incorrere in forti errori quantitativi se sono presenti fruttosio, sorbosio e in genere cheto-esosi.

2) La presenza di triptofano (libero o legato in catena peptidica), triptamina, acido β -indol-acetico e in genere di derivati indolici può dare errori qualitativi e quantitativi: in cromatografia su carta sempre, *in vitro* solo in presenza di zuccheri.

3) Con la reazione di N. Fiussello si ha un aumento della sensibilità di circa dieci volte, però è necessario l'allontanamento dei derivati indolici che potrebbero interferire.

Gli zuccheri non interferiscono.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] Z. DISCHE, « J. Biol. Chem. », 181-379 (1949).
- [2] Z. DISCHE, « The nucleic acids », 1, N. Y. (1955).
- [3] J. G. BUCHANAN, « Nature », 168, 1091 (1951).
- [4] M. BELLANDO e N. FIUSSELLO, *Su un nuovo metodo colorimetrico per il dosamento del triptofano*, « Atti Acc. Sc. di Torino », 101 (1966-1967).
- [5] N. FIUSSELLO, *Nuovo metodo colorimetrico per il dosamento del desossi-ribosio, dei desossi-nucleosidi, desossi-nucleotidi e DNA*, « Atti Acc. Sc. di Torino », 101 (1966-1967).