

### Zusammenfassung

Der Zitronensäuregehalt wurde vom Gastrulastadium bis in larvale Stadien gemessen. Während des Schwanzknospenstadiums und kurz nachher erfolgt eine relativ rasche Zunahme, die möglicherweise in Zusammenhang mit der Entwicklung und Differenzierung von Mitochondrien steht.

### Influenza del $Mg^{++}$ sulla «eptoformazione non ossidativa» nel muscolo scheletrico

In ricerche precedenti<sup>1-3</sup> abbiamo osservato, in estratti enzimatici di muscolo scheletrico di ratto, il processo indicato da BONSIGNORE *et al.*<sup>4</sup> col termine di «eptoformazione non ossidativa», e cioè la formazione di eptoso-fosfato da esoso-fosfato (G-6-P e F-6-P) attraverso reazioni non appartenenti allo shunt ossidativo. Nelle nostre condizioni, tale eptoformazione veniva aumentata per aggiunta di fruttosio-1,6-difosfato (F-1,6-P).

Per spiegare i dati sperimentali abbiamo ammesso – come suggerito da BONSIGNORE *et al.*<sup>4</sup> – che la velocità del processo eptoformativo dal solo esoso-fosfato fosse «limitata» da tracce di trioso-fosfato presenti nell'estratto enzimatico. Nelle nostre condizioni, il F-1,6-P aggiunto avrebbe agito in quanto aumentava, per scissione aldolasica, la concentrazione del trioso-fosfato.

Nella Tabella seguente sono esposti i risultati di alcune esperienze<sup>5</sup> che suffragano, a nostro parere, questa ipotesi.

Dalla Tabella risulta:

1) Aumentando la concentrazione del F-6-P – nelle prove contenenti questo solo substrato – da 7,5 a 10,0  $\mu M$ , la eptoformazione non aumenta. Quindi nelle prove enzimatiche in presenza di «F-6-P + F-1,6-P», l'aumento della concentrazione del F-6-P dovuto alla idrolisi del legame fosforico in 1 dell'estere difosforico, non dovrebbe influire sulla eptoformazione, essendo già ottimale la concentrazione delle 7,5  $\mu M$  di F-6-P aggiunte.

2) Aggiungendo  $Mg^{++}$ , attivatore della idrolisi fosfatase in 1 a carico del F-1,6-P, si ha – nelle prove in presenza di ambedue i substrati – una diminuzione della eptoformazione. Questa diminuzione è spiegabile in quanto la attivazione dell'idrolisi fosfatase da parte degli  $Mg^{++}$  sottrarrebbe il F-1,6-P alla azione aldolasica. Ne deriverebbe una minore formazione di trioso-fosfato e conseguente minore eptoformazione.

3) L'aggiunta, oltre al  $Mg^{++}$ , di KF – inibitore della attivazione degli ioni  $Mg^{++}$  sull'attività fosfatase del nostro estratto – ripristina pressoché quantitativamente l'eptoformazione nelle prove in presenza di F-6-P + F-1,6-P.

Tutti questi fatti depongono a favore dell'ipotesi che il F-1,6-P nelle nostre condizioni agisca come donatore di

Attività eptoformativa di estratti enzimatici di muscolo scheletrico a partire da F-6-P e da F-1,6-P, in assenza e in presenza di  $MgCl_2$  (10  $\mu M$ ) e di  $MgCl_2$  (10  $\mu M$ ) + KF (200  $\mu M$ ).  
Volume finale delle prove: 2,5 ml

Substrati	Aggiunte	$\mu M$ eptoso formato/ mg N proteico	% F-1,6-P idroliz- zato*
7,5 $\mu M$ F-6-P . . . .	—	0,18	—
10 $\mu M$ F-6-P . . . .	—	0,17	—
7,5 $\mu M$ F-6-P . . . .	$MgCl_2$	0,18	—
7,5 $\mu M$ F-6-P + 1,8 $\mu M$ F-1,6-P } . . . .	—	0,41	53%
7,5 $\mu M$ F-6-P + 1,8 $\mu M$ F-1,6-P } . . . .	$MgCl_2$	0,27	62%
7,5 $\mu M$ F-6-P + 1,8 $\mu M$ F-1,6-P } . . . .	$MgCl_2$ + KF	0,36	48%
1,8 $\mu M$ F-1,6-P . . . .	—	0,12	50%
1,8 $\mu M$ F-1,6-P . . . .	$MgCl_2$	0,13	62%

\* L'idrolisi del F-1,6-P è stata constatata dosando i fosfati liberi nel mezzo, prima e dopo l'incubazione, con il metodo di BERENBLUM e CHAIN<sup>6</sup>. Tale idrolisi, maggiore in presenza di  $Mg^{++}$ , si svolgeva a livello del legame fosforico in 1. Infatti il F-6-P non veniva idrolizzato né in assenza né in presenza di  $Mg^{++}$ .  
È noto d'altra parte che gli ioni  $Mg^{++}$  attivano la F-1,6-P-asi del muscolo scheletrico<sup>7</sup>.

trioso-fosfato, necessario per la eptoformazione, e non come donatore di F-6-P.

V. MORET e S. SPERTI

Istituto di Chimica Biologica, Università di Padova, il  
3 ottobre 1958.

### Summary

$Mg^{++}$  influence on 'non-oxydative heptoformation' from hexose-phosphate has been studied in enzymatic preparations of rat skeletal muscle. The results give further evidence that F-1,6-P, added to F-6-P, increases the rate of heptoformation inasmuch as it gives, by aldolase action, triosephosphate.

<sup>6</sup> I. BERENBLUM e E. CHAIN, *Biochem. J.* 32, 295 (1938).

<sup>7</sup> K. LOHMANN, *Biochem. Z.* 262, 137 (1933).

### Analyses immunoélectrophorétiques des fractions protéiques du sérum humain séparées par électrophorèse en gel d'amidon

Le sérum humain, soumis à une électrophorèse en gel d'amidon se scinde en de nombreux composants (SMITHIES<sup>1</sup>). Ce pouvoir de résolution du milieu, plus élevé que celui du papier ou de la gélose résulte d'un phénomène complexe régissant dans un gel d'amidon, la position des fractions en fin d'électrophorèse.

Dans les modes habituels d'électrophorèse de zone (papier ou gélose) la mobilité en fin d'expérience est due à la résultante du courant électrique et de l'électro-osmose. En gel d'amidon la mobilité habituelle d'une protéine se trouve perturbée par le pouvoir du gel à ralentir les protéines composées de grosses molécules, à l'avantage de celles composées de molécules de plus petites dimensions.

<sup>1</sup> O. SMITHIES, *Biochem. J.* 61, 629 (1955).

<sup>1</sup> V. MORET e S. SPERTI, *Exper.* 14, 342 (1958).

<sup>2</sup> S. SPERTI e V. MORET, *Exper.* 14, 358 (1958).

<sup>3</sup> S. SPERTI e V. MORET, *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* (1958) in corso di stampa.

<sup>4</sup> A. BONSIGNORE, S. PONTREMOLI, G. FORNAINI e E. GRAZI, *G. Biochim.* 6, 241 (1957).

<sup>5</sup> Il metodo di preparazione dell'estratto, le condizioni sperimentali seguite nelle prove enzimatiche, ed i metodi di dosaggio sono esposti in una nota precedente<sup>1</sup>.