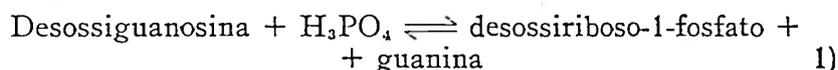


Istituto di Chimica Biologica dell'Università di Siena (Italia)  
(Direttore: Prof. C. Ricci)

## Determinazione della scissione fosforolitica della desossiguanosina in omogenati di fegato di ratto \*

di  
E. Marinello, P. Martelli e I. Domini \*\*

La desossiguanosina viene scissa fosforoliticamente nel fegato di ratto dalla nucleoside-fosforilasi, secondo la reazione:



La reazione può essere seguita con il metodo di KALCKAR (1947), trasformando, mediante aggiunta di guanasi e di xantino-ossidasi, la guanina in acido urico, la cui formazione viene determinata spettrofotometricamente a 293 m $\mu$ . La tecnica di Kalckar è preferibilmente applicata a preparazioni purificate di nucleoside-fosforilasi.

In questo lavoro presentiamo un metodo assai semplice per la determinazione della scissione fosforolitica della desossiguanosina, anche in omogenati di tessuto. Esso è sostanzialmente basato sulle reazioni per i desossipentosi alla difenilamina (DISCHE, 1930), secondo le indicazioni di SEIBERT (1940) e alla cisteina (DISCHE, 1944), secondo le indicazioni di STUMPF (1947).

Abbiamo tenuto presenti le seguenti considerazioni:

---

\* Comunicación 6-10 a las V Jornadas Bioquímicas Latinas, Barcelona, mayo 1959.

\*\* Lavoro eseguito con il contributo del C.N.R.

1) Il desossipentoso contenuto nella desossiguanosina si trasforma, in un omogenato di fegato di ratto, in desossiriboso-1-fosfato, attraverso la reazione 1).

2) Il desossiriboso-1-fosfato può trasformarsi nel fegato di ratto, per azione mutasica, dimostrata da MANSON e LAMPEN (1951), in desossiriboso-5-fosfato.

3) Il desossiriboso-1-fosfato ed il desossiriboso-5-fosfato possono subire una azione fosfataseica, con produzione di desossiriboso.

Da tali considerazioni risulta che la desossiguanosina dà luogo, in un omogenato di fegato di ratto, alla formazione di composti i quali danno tutti le reazioni per i desossipentosi: le reazioni di Dische come tali non possono essere perciò applicate alla determinazione della scissione fosforolitica della desossiguanosina.

Abbiamo però osservato che il desossipentoso della desossiguanosina, a differenza del desossiriboso libero, dà le reazioni di Dische anche dopo trattamento con NaOH 0,5 N per 5' a 100°C: esso viene perciò da noi indicato con il termine di desossipentoso alcali-stabile.

Non abbiamo esaminato le proprietà del desossiriboso-1-fosfato: è noto però dai dati di MANSON e LAMPEN (1951) che questo estere è completamente idrolizzato in 20' a temperatura ambiente, a pH 4,6, (condizioni in cui, in base a nostre osservazioni, è stabile il legame guanina-desossiriboso). Abbiamo pure osservato che il desossiriboso-5-fosfato, da noi ottenuto per idrolisi dell'acido desossiadenilico, secondo le indicazioni di RACKER (1952), viene distrutto dalla NaOH 0,5 N in 5' a 100°C.

TABELLA 1

*Scissione fosforolitica della desossiguanosina in omogenati di fegato di ratto*

Composizione delle prove: omogenato di fegato di ratto pari a 80 mg di tessuto fresco; desossiguanosina  $3,3 \cdot 10^{-3}$  M; tampone di fosfati secondo Soerensen (pH 7,8)  $1,1 \cdot 10^{-2}$  M; volume finale 3 ml.; 38°C. Ambiente aria.

Tempi di incubazione	$\mu$ M di desossiguanosina demolite nell'intera prova.
20'	2,5
40'	4,5
60'	7,—

Per la determinazione della scissione fosforolitica della desossiguanosina si può allora procedere nel modo seguente: omo-

genati di fegato di ratto vengono posti ad incubare con desossiguanosina nelle condizioni indicate nella tabella I.

Le miscele di incubazione poste a 38°C, vengono prelevate al tempo 0 e ai tempi prestabiliti, portate a pH 4,3 con Na acetato al 10 % ed acido tricloroacetico al 5 %, filtrate, lasciate per 20' a temperatura ambiente, indi neutralizzate e scaldate per 5' a 100°C con NaOH 0,5 N (conc. finale). Sugli estratti così trattati si eseguono infine le reazioni per i desossipentosi.

I risultati vengono riportati nella tabella I.

Con la procedura da noi adottata il desossiriboso-1-fosfato viene trasformato, a pH 4,3, in desossiriboso; desossiriboso e desossiriboso-5-fosfato vengono distrutti dalla successiva idrolisi alcalina.

Le reazioni di Dische eseguite a questo punto metteranno in evidenza solo il desossiriboso alcali-stabile della desossiguanosina. La differenza tra il desossiriboso alcali-stabile presente nelle miscele di incubazione all'inizio ed ai vari tempi, rappresenta la quantità di desossiguanosina scissa fosforoliticamente.

Il metodo, oltre che applicabile ad omogenati, risulterà valido, a maggior ragione, in presenza di estratti purificati o contenenti solo nucleoside-fosforilasi.

### Riassunto

Gli AA descrivono un nuovo metodo per la determinazione della scissione fosforolitica della desossiguanosina in omogenati di fegato di ratto. Il metodo è essenzialmente basato sulle reazioni di Dische per i desossipentosi e sul fatto che il desossiriboso della desossiguanosina resiste al trattamento con NaOH 0,5 N per 5' a 100°C.

### Summary

#### Determination of the deoxyguanosine phosphorolytic cleavage in rat liver homogenates

The AA describe a new method for the determination of phosphorolysis of deoxyguanosine in rat liver homogenate. The method is essentially based on Dische's reactions for deoxyribose and on the fact that the sugar moiety of deoxyguanosine is unaffected by treatment with 0,5 N NaOH for 5' at 100°C.

### Bibliografia

- (1) DISCHE, Z. : *Mikrochemie*, **8**, 4, 1930.
- (2) DISCHE, Z. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **55**, 217, 1944.
- (3) KALCKAR, H. M. : *J. Biol. Chem.* **167**, 429, 1947.
- (4) MANSON, L. A., e LAMPEN, J. O. : *J. Biol. Chem.*, **191**, 95, 1951.
- (5) RACKER, E. : *J. Biol. Chem.*, **196**, 347, 1952.
- (6) SELBERT, F. B. : *J. Biol. Chem.*, **133**, 593, 1940.
- (7) STUMPF, P. K. : *J. Biol. Chem.*, **169**, 367, 1947.

