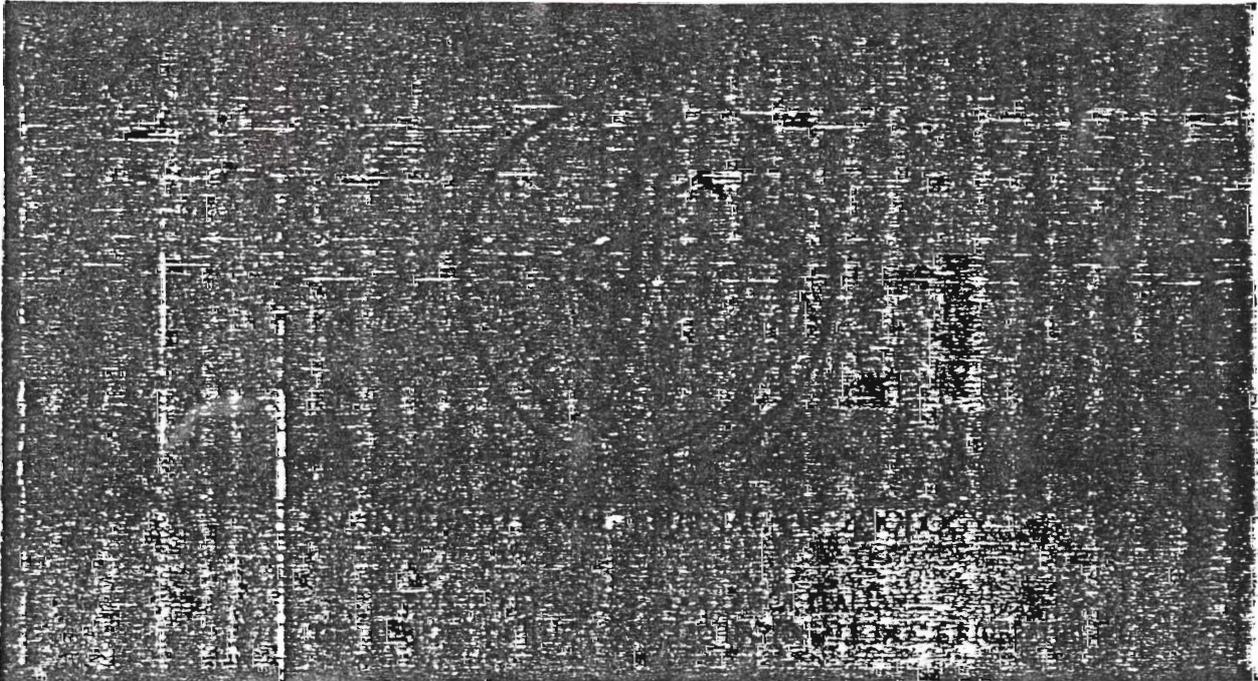
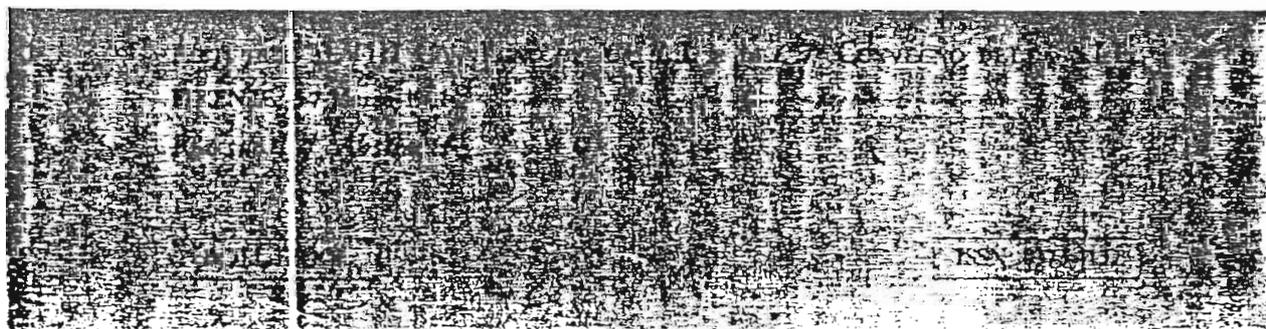


BOLLETTINO DI ZOOLOGIA



VOL. 48 - SUPPL. - 1981



M. SALVINI, G. SANTANGELO e F. NOBILI

Sintesi di RNA durante la coniugazione di Blepharisma

Istituto di Zoologia e Anatomia Comparata - Università di Pisa

Nell'ambito di una ricerca rivolta all'investigazione dei meccanismi molecolari alla base dei fenomeni coniugativi del protozoo ciliato Blepharisma, è stato deciso di seguire la sintesi dell'RNA nei due momenti chiave della coniugazione: a) nelle coppie omotipiche (due cellule dello stesso mating type), in seguito a stimolazione da parte del gamone complementare; b) all'induzione alla meiosi che si verifica solo nelle coppie eterotipiche (due cellule di mating type complementare) circa 1h dopo la formazione delle coppie stesse. Sono state approntate tecniche di estrazione e purificazione di RNA marcato con adenosina-³H, e successiva separazione di frazioni poli(A)- e poli(A)+, quest'ultimo presente in quantità compresa tra l'1-2% dell'RNA totale, in accordo con dati presenti in letteratura per altri organismi. Il rapporto RNA poli(A)-/poli(A)+ non sembra subire variazioni significative durante la coniugazione. Relativamente alle coppie omotipiche è stato rilevato un aumento di attività specifica sia nella frazione RNA poli(A)+ che poli(A)-. Inoltre sempre nelle coppie omotipiche, mediante frazionamento su gradiente di saccarosio, è stata osservata la comparsa di un picco di radioattività con coefficiente di sedimentazione compreso tra 16S e 5S sia per gli RNA poli(A)- che poli(A)+. Le dimensioni degli RNA sono state investigate con elettroforesi su gel di Agarosio-Urea. Mediante traduzione in vitro in un sistema cell-free, preparato da germe di grano, è stata possibile l'individuazione di RNA messaggeri sia nella frazione poli(A)- che poli(A)+.

L'analisi dei prodotti di traduzione è stata effettuata tramite fluorografia. La tappa finale di tale ricerca consisterà nell'individuazione del significato biologico degli RNA sintetizzati durante la coniugazione, mediante tecniche opportune tra le quali la microiniezione.

G. SANTANGELO e G. SOLDANI

Tecnica di micromanipolazione sul ciliato Blepharisma japonicum.

Istituto di Zoologia dell'Università di Pisa.

Negli ultimi anni sono state messe a punto tecniche di micromanipolazione su ciliati appartenenti al genere Paramecium (Koizumi 74, Fujishima et Al. 77). Il nostro intento è stato quello di trasferire questa tecnica sul ciliato Blepharisma japonicum; la messa a punto di tale tecnica ha presentato notevoli difficoltà dovute alla plasticità di queste cellule e alla loro motilità. Per lavorare efficacemente si è ridotta la velocità e la possibilità di movimento dei ciliati usando una soluzione fisiologica con albumina allo 0,5% e utilizzando gocce di volume ridotto (0,1 ml.). Per ovviare alla rapida evaporazione di tale goccia si è ricorsi all'uso di una camera umida su cui veniva applicato un vetrino a goccia rovesciata. Il set approntato permette inoltre di regolare la quantità di liquido della goccia.

Per penetrare la membrana estremamente plastica delle cellule, è stato necessario preparare microaghi con la punta a becco di clarino, aumentandone la penetrazione. Il microago veniva poi collegato a un tubicino indeformabile e ad una siringa con micromovimento; tutto il sistema veniva riempito di olio al silicone, il microago veniva montato su un micromanipolatore con movimento nelle tre direzioni. La mortalità, negli esperimenti di trapianto di citoplasma è stata del 10% per le cellule donatrici, più bassa per le accettrici. Con la tecnica sopra descritta intendiamo realizzare due tipi di esperimenti: 1) trapianti di citoplasma, di sue frazioni, di R.N.A. messaggero per identificare quei fattori citoplasmatici che in Blepharisma japonicum sono responsabili dell'induzione meiotica; 2) trapianti di macronuclei per chiarire alcune delle funzioni nucleari e delle interazioni nucleo-citoplasmatiche, così importanti nella biologia dei ciliati.