

PURIFICAZIONE DELLA FENOLOSSIDASI NELL'ASCIDIA COLONIALE *BOTRYLLUS SCHLOSSERI* E PRODUZIONE DI ANTICORPI SPECIFICI

A. Frizzo, L. Guidolin, L. Ballarin e A. Sabbadin.

Dipartimento di Biologia, Via G. Colombo 3, 35121 Padova

La fenolossidasi (PO) è un enzima contenente rame con attività monossigenasica che catalizza la conversione dei polifenoli in chinoni, i quali possono a loro volta polimerizzare in melanina.

La PO è largamente distribuita sia tra i procarioti che gli eucarioti ed è coinvolta in diversi processi fisiologici, come ad esempio la sclerotizzazione dei tegumenti, la sintesi di pigmenti, la produzione di sostanze cementanti e l'indurimento delle capsule delle uova.

Negli invertebrati rappresenta l'ultimo componente di una cascata di reazioni chiamata "pro-PO activating system" che svolge un ruolo fondamentale nei meccanismi di riconoscimento, di citotossicità e di incapsulamento.

Nell'ascidia coloniale *Botryllus schlosseri* è localizzata all'interno delle cellule a morula (Ballarin et al., Zool. Sci. 12 :757-764, 1995). Quando due colonie incompatibili giungono a contatto, la PO viene rilasciata lungo i margini di contatto e partecipa alla formazione di masse necrotiche che caratterizzano la reazione di rigetto (Sabbadin et al., Boll. zool., 59 :167-173, 1992).

Nel presente lavoro la PO è stata caratterizzata elettroforeticamente e spettrofotometricamente e purificata attraverso gel filtrazione, cromatografia a scambio ionico e HPLC. Il peso molecolare apparente, determinato mediante SDS-PAGE, è di circa 160 kDa; è una proteina relativamente termolabile, con un'attività massima a 38°C ed un pH ottimale a circa 7.0. Questo enzima viene inibito irreversibilmente da agenti chelanti i metalli, quali EDTA e dietilditiocarbammato e inibito reversibilmente da Na-benzoato. La k_m , determinata utilizzando l'idrazione 3-metil-2-benzotiazolinone (MBTH) (Winder and Harris, J. Biochem. 198 :317-326, 1991), è stata calcolata intorno a 0,5 mM a 20°C.

Sono stati ottenuti anticorpi policlonali specifici, elettroeluendo la banda corrispondente all'enzima, separata mediante SDS-PAGE e utilizzando come materiale di partenza il lisato totale di botrillo. L'enzima elettroeluito è stato, poi, ulteriormente purificato mediante HPLC e la PO, così ottenuta, è stata utilizzata per l'immunizzazione di conigli.

Con gli anticorpi policlonali è stato possibile localizzare, mediante tecniche di immunocitochimica al microscopio ottico ed elettronico, la PO all'interno dei vacuoli delle cellule a morula.