

P939

POLSKA AKADEMIA NAUK

KOMITET BIOCHEMICZNY

POSTĘPY
BIOCHEMII


KWARTALNIK

TOM II

1956

ZESZYT 2

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE
WARSZAWA


<http://rcin.org.pl>

P O L S K A A K A D E M I A N A U K
K O M I T E T B I O C H E M I C Z N Y

POSTĘPY BIOCHEMII

Kwartalnik

TOM II

1956

ZESZYT 2

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Józef Heller.
Zastępca redaktora nacz. — Jerzy Meduski.

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1956

Nakład 1235 + 107 egz.	Oddano do składania 11.3.56
Ark. wyd. 7,3. Ark. druk. 5,5	Podpisano do druku 24.5.56
Papier druk. sat. kl. V, 70 g, 70 × 100	Druk ukończono w maju 1956.
Cena zł 15.—	Zam. 143c/56. B-7-24444.

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

WITOLD DRABIKOWSKI, BOGNA WIŚNIEWSKA

Izolowanie nukleoproteidów i kwasów nukleinowych z tkanek i mikroorganizmów

Nukleoproteidy (NP) są jednym z podstawowych składników uorganizowanych elementów żywej materii. Charakteryzują się one wysokim ciężarem cząsteczkowym i niezmiernie skomplikowaną budową. Poznanie tej ostatniej utrudnia fakt, że związki te są składnikami tak niezwykle złożonego środowiska jakim jest protoplazma. Fakt ten stawia szczególne zadania przed badaczami zajmującymi się izolowaniem NP i KN z różnego materiału biologicznego: z jednej strony muszą oni dążyć do uzyskania jak najwyższego stopnia czystości preparatu, z drugiej — stosowane postępowanie nie powinno naruszać subtelnej struktury tych związków.

Metody izolowania, stosowane przez pierwsze dziesiątki lat badań nad NP i KN dalekie były od wymagań jakie im dzisiaj stawiamy. Przez długi czas bowiem przypisywano tym związkom znacznie prostszą budowę niż okazało się to w rzeczywistości. Toteż używana dawniej przez wielu autorów ekstrakcja roztworami kwasów i zasad, często w podwyższonej temperaturze, dawała preparaty różniące się w znacznym stopniu budową i własnościami od rodzimych związków występujących w żywym ustroju. Gdy w wyniku prac wielu badaczy oczywistą się stała złożoność struktury KN zwrócono baczniejszą uwagę na zmiany, jakim ulegają te związki w czasie ich izolowania.

Już w latach czterdziestych rozpoczęto żywą dyskusję nad sposobami wyosabniania NP i KN z materiału biologicznego w postaci możliwie jak najmniej odbiegającej od tej, jaka występuje w żywej komórce. Ostatnio w związku ze stwierdzeniem niejednorodności zarówno kwasów nukleinowych jak i komponenty białkowej NP problem zastosowania subtelniejszych metod w czasie izolowania stał się szczególnie istotny. Zagadnienie to jednak do dziś pozostaje jeszcze częściowo otwarte i różnorodność stosowanych metod oraz rozbieżność uzyskiwanych wyników świadczy, że dalekie są one od doskonałości.

Izolowanie nukleoproteidów

Stosowane metody otrzymywania NP uwarunkowane są ich rozpuszczalnością wyróżniającą je od większości innych składników komórkowych. W zasadzie jednak mają tu zastosowanie metody, używane ogólnie do izolowania i frakcjonowania białek.

Od czasu pierwszych prac nad nukleoproteidami tj. od lat siedemdziesięciu stosowano do ich wyodrębniania ekstrakcję materiału biologicznego roztworami zasad, kwasów, buforami, roztworami soli lub wodą (przegląd dawnych metod izolowania — Gulland (49) — Feulgen (40) — Hammarsten (50,52)). Preparaty nukleoproteidów otrzymywane powyższymi drastycznymi sposobami, były dalekie od stanu, w jakim znajdują się w komórce. W trakcie izolowania stosowano często podwyższoną temperaturę, nie zwracano uwagi na działanie enzymów. Stosowany przeważnie odczyn alkaliczny powodował głębokie zmiany w strukturze. Nie potrafiono również otrzymać dobrego rozdziału obu nukleoproteidów. Dziś te dawne metody wyszły zupełnie z użycia i jedynie ekstrakcja wodą lub roztworami soli kuchennej stała się podstawą do opracowania nowoczesnych metod izolowania i rozdziału NP.

Praktyczne zastosowanie roztworu chlorku sodu do preparatyki NP zawdzięczamy Mirsky'emu i Pollister'owi (87,89). Wykorzystali oni różnice w rozpuszczalności dezoksyrybonukleoproteidów (DNP) w zależności od stężenia chlorku sodu. DNP rozpuszczają się w wodzie oraz w roztworach 1 molarnych soli i bardziej stężonych (praktycznie nie używa się jednak większych stężeń niż 2 molarne, gdyż w roztworach stężonych białko ulega wysoleniu). Rozpuszczalność DNP osiąga minimum o dość ostrej granicy przy stężeniu 0,14M NaCl. Dokładnie zbadała tę zależność Frick (41). W tablicy I-ej przytaczamy wyniki jej doświadczeń.

Rybonukleoproteidy (RNP) nie wykazują zmian rozpuszczalności zależnie od stężenia NaCl.

W oryginalnej metodzie Mirsky'ego — Pollister'a (89) dokładnie zmieloną świeżą tkankę, ekstrahowano 2 do 3 razy 0,14M NaCl. Po odwirowaniu pozostałości tkankowych wytrącono rybonukleoproteid (RNP) z połączonych wyciągów alkoholem w postaci białego puszystego osadu. Na pozostałą tkankę działano przez dłuższy czas 1M NaCl. Z powstałego bardzo lepkiego roztworu wytrącono DNP w postaci długich białych włókien dających się z łatwością oddzielić bagietką od roztworu. Wszystkie czynności prowadzono w temp. 0—4°C. Jak widać metoda ta pozwala nie tylko na izolowanie, ale również i na rozdział obu NP, co prawda dokładny tylko w przypadku grasicy ewentualnie śledziona i spermy (117).

Metoda Mirsky'ego i Pollister'a jest dziś, obok wprowadzonej przez Huiskamp'a (53) w 1901 r. ekstrakcji NP wodą, jedną z najpowszechniejszych metod obecnie stosowanych, które pomimo wprowadzenia całego szeregu drobnych modyfikacji pozostają w zasadzie niezmienione.

Tablica 1

Rozpuszczalność DNP w 0,00 — 1,00M NaCl w t. 3,8 — 4,2°C
w buforze fosforanowym (wg Frick (41))

M NaCl	Azot rozpuszczonego DNP w mg/ml	M NaCl	Azot rozpuszczonego DNP w mg/ml
0,000	0,3500	0,194	0,0024
0,018	0,0276	0,292	0,0052
0,036	0,0092	0,398	0,0732
0,055	0,0080	0,422	0,1050
0,073	0,0062	0,480	0,3370
0,082	0,0060	0,524	0,4000
0,091	0,0058	0,544	0,4060
0,100	0,0048	0,590	0,5170
0,109	0,0056	0,682	0,5580
0,118	0,0048	0,770	0,6170
0,141	0,0036	0,872	0,7030
		0,970	0,7860

Zdolność rozpuszczania się nukleoproteidów dezoksyrybozowych w silnych roztworach soli jest dość wszechstronna. Pewne anomalie wykazują jednak DNP spermy niektórych zwierząt, nie rozpuszczają się bowiem ani w roztworze NaCl ani w wodzie.

Mirsky i Pollister (88) stwierdzili, że DNP jąder spermy pstrąga, śledzia, myszy i żaby dają się ekstrahować 1M NaCl, zaś DNP jąder spermy jeżowca i ślimaka rozpuszczają się dopiero w 2M NaCl. Główki spermy byka i knura nie rozpuszczają się nawet w silnych roztworach NaCl (88 i 30) i dają się izolować dopiero po hydrolizie alkalicznej (30). Do podobnych wniosków doszli Thomas i Mayer (108), którym nie udało się wyciągnąć DNP ze spermy knura i barana nie tylko działaniem słabych kwasów i alkalii, ale nawet detergentami. Bernstein i Mazia otrzymali DNP ze spermy *Strongylocentrotus* na drodze ekstrakcji wodnej (8). Podobne rezultaty uzyskali Emanuel i Chaikoff (37) przy wodnej ekstrakcji mleczu łososia, a Watanabe (112) przy ekstrakcji mleczu śledzia. Suzuki i współpr. (62) nie potwierdzili jednak tych wyników i otrzymali DNP z mleczu łososia dopiero po ekstrakcji 2M NaCl.

W roztworach chloru sodu o dużej sile jonowej kompleksy DNP są stosunkowo silnie zdysocjowane i ich własności fizykochemiczne związane są z obecnością wolnych kwasów i białek. W związku z tym wy-suwanu, szczególnie ostatnio, szereg zarzutów w stosunku do ekstrakcji molarnym roztworem chlorku sodu (Butler (14) i Stern (106)). Trudno jest stwierdzić, czy otrzymane w ten sposób DNP są rodzimymi związkami. Być może działanie silnego roztworu soli wywołuje nieodwracalne zmiany, a wytrącony DNP jest artefaktem. Powyższe zarzuty wpłynęły na to, że szereg badaczy stosuje obecnie wyłącznie ekstrakcję DNP oziębioną wodą po uprzednim usunięciu rybonukleoproteidu 0,14M NaCl. Metodę H u i s k a m p a ekstrakcji DNP wodą (53) opracował w 1924 r. H a m m a r s t e n (51) stosując wielogodzinną ekstrakcję zmielonej tkanki w temperaturze 0,°C. Potem ekstrakcji wodą używali między innymi C a r t e r i H a l l (15), a ostatnio S t e r n (106), G a j d u s e k (45), P e t e r m a n n i L a m b (94), S h o ö t e r i w s p ó ł p r. (99). Prócz roztworów chlorku sodu i wody w pewnych wypadkach, szczególnie przy pracach nad NP drobnoustrojów (B i e ł o z i e r s k i (5)), stosuje się nadal do ekstrakcji słabe roztwory węglanu sodu (64, 97, 5), 0,2% NaOH (97, 5), roztwory buforowe jak np.: boranowe (21), fosforanowe (111), cytrynianowe (18, 57). Stosowanie takich roztworów, głównie alkalicznych jest nieraz konieczne, gdyż NP bakteryjne i wirusowe przeważnie nie ulegają ekstrakcji wodą lub obojętnymi roztworami soli. Często nieodzowne jest uprzednie stosowanie takich zabiegów jak: odlipidowanie rozpuszczalnikami tłuszczowymi (21), rozbitcie komórek ultradźwiękami (ostatnio zresztą krytykowane) (21, 86, 16), rozcieranie z piaskiem kwarcowym lub pyrexowym (46, 21, 18, 17), działanie glikolem etylenowym itp. (21). Wszystko to ma na celu zniszczenie bądź usunięcie nierozpuszczalnej otoczki komórkowej.

Dawne metody wytrącania nukleoproteidów kwasami w punkcie izoelektrycznym zostały w stosunku do DNP prawie zupełnie zaniechane. W wypadku RNP strącenie w punkcie izoelektrycznym jest dalej stosowane, np. celem oddzielenia od innych związków obecnych w ekstrakcie 0,14M NaCl (63). Szeroko stosowanym dziś sposobem wytrącania NP jest użycie alkoholu etylowego. Zwykle w tym celu dodaje się do roztworu NP jedną do dwóch obj. 96% alkoholu etylowego. Niekiedy stosuje się metanol (93). Trzeba zaznaczyć, że zarówno przedłużone działanie alkoholu, jak i kwaśne środowisko mogą wprowadzić pewne zmiany w strukturze NP. Wielu autorów (22, 12, 15) stosuje nadal wprowadzone przez H a m m a r s t e n a (51) strącanie NP za pomocą CaCl₂, choć w tym wypadku otrzymuje się osad trudny do oddzielenia (51). Niekiedy w przypadku NP bakteryjnych stosuje się wysolenie siarczanem amonu (93). Korzystając z różnic w rozpuszczalności DNP w różnych stężeniach

NaCl wytrąca się je z 1M roztworu soli przez rozcieńczenie tego ostatniego wodą do stężenia 0,14M. Większość jednak DNP bakteryjnego nie daje się w ten sposób wytrącić (57). Ostatnio metoda ta została skrytykowana przez Sterna, który uważa, że wytrącający się nukleoproteid jest artefaktem (106). Jones w r. 1953 użył siarczanu miedzi do wytrącania NP z *Mycobacterium phlei* (57), przy czym napotkał jednak trudności z oddializowaniem siarczanu miedzi i otrzymał końcowy produkt bardzo zanieczyszczony. Jako najbardziej dogodny sposób poleca Jones wytrącanie NP bakteryjnych kationowym detergentem — Cetavlonem. Utworzony kompleks jest nierozpuszczalny w rozcieńczonym roztworze soli (0,3M), rozpuszczalny natomiast w 1M NaCl.

W ramach prac oceniających krytycznie przytoczone wyżej metody otrzymywania nukleoproteidów zwrócono uwagę na działanie enzymów w trakcie wyosabniania. Otrzymane w obecności czynnych nukleaz i proteaz nukleoproteidy i kwasy nukleinowe są w różnym stopniu zdepolimeryzowane. Wprowadzono szereg usprawnień zmierzających do zahamowania działania enzymatycznego. Efekt ten uzyskuje się częściowo przez zachowanie w trakcie pracy niskiej temperatury. Ponieważ dezoksyrybonukleaza jest aktywowana przez jony Mg, zatem celem ich związania zastosowano dodawanie arsenianów (106), fluorku sodu (96, 101, 67, 68), cytrynianu sodu (94, 80), ostatnio czterooctanu — etyleno-dwuaminy (118). Z danych Webb'a (113) wynika jednak, że jony powyższe hamują tylko dezoksyrybonukleazę trzustkową, mającą optimum działania przy pH około 7,0, zaś dezoksyrybonukleazy wewnątrzkomórkowe, których obecność wykryli wcześniej Maver i Greco (85), nie są hamowane przez powyższe środki. Te ostatnie mają optimum działania przy pH 5,0 i są prawie nieczynne przy niewielkim podwyższeniu pH.

Hamujący wpływ cytrynianu ograniczałyby się więc do podwyższenia pH soku komórkowego do wartości, w której aktywność depolimeryzująca jest bardzo mała. Z drugiej strony Shack (98) doniósł, że dezoksyrybonukleaza surowicza zachowuje się podobnie do trzustkowej. Tak więc dodatek powyższych inhibitorów może mieć znaczenie przy izolowaniu NP z tkanek silnie ukrwionych.

W praktyce stosuje się najczęściej roztwór cytrynianu sodu. Petermann i Lamb (94) badali dokładnie zależność między lepkością otrzymanych nukleoproteidów a stężeniem cytrynianu sodu i uznali dodatek 0,01M cytrynianu do roztworu 1M NaCl za optymalny.

Większą trudność sprawia zahamowanie działania rybonukleazy. Allen (1) omawiając ten problem stwierdza, że właściwie brak jest

metody, pozwalającej na zupełną jej inaktywację. Zostaje ona w pewnym stopniu unieczynniona przy użyciu soli guanidyny, lub detergentów. Metody te zostaną omówione poniżej.

We wszystkich omówionych przypadkach poddawano ekstrakcji całą tkankę. W toku badań nad lokalizacją kwasów nukleinowych w poszczególnych elementach morfotycznych komórki, Euler i Hahn (38, 39) otrzymali cytoplazmatyczne nukleoproteidy z mitochondrii wątroby. Większość prac poświęcona była jednak badaniom nukleoproteidów ekstrahowanych z izolowanych jąder komórkowych (3,35). Tak np. Barnum i współprac. (3) ekstrahowali materiał cytoplazmatyczny 0,85% roztworem NaCl. Następnie celem usunięcia zanieczyszczeń pozostałych na powierzchni jąder płukano je wielokrotnie kwasem cytrynowym i otrzymywane w ten sposób jądra komórkowe poddawano pod odlipidowanie alkoholem i eterem dalszej ekstrakcji wg. ogólnie przyjętej techniki izolowania NP. Uprzednie usunięcie materiału cytoplazmatycznego wydaje się być jednak niedostateczne, bowiem Webb (112) wysuwa zarzut, że RNP cytoplazmatyczny może być adsorbowany na jądrach w czasie preparowania. Euler i Hahn (39) znaleźli, że DNP izolowanych jąder może być bardziej rozłożony niż ekstrahowany wprost z tkanki. Wydaje się, że rozkład ten należy przypisać katepsynie, bowiem Maver i Greco (85) dowiedli, że może ona rozkładać połączenia białka z KDN, a Butler i współprac. (14) wykazali, że istotnie działanie katepsyny ma miejsce, gdyż preparaty otrzymane z dodatkiem inhibitorów grup —SH np.: jodooctanu etylu były mniej rozłożone. Brown i Laskowski (11) stwierdzili, że zawarte w jądrach dezoksyrybonukleazy mogą depolimeryzować KDN w słabo kwaśnym środowisku, używanym zazwyczaj do izolowania jąder. Z drugiej strony stwierdzono, że wewnątrzkomórkowe dezoksyrybonukleazy są charakterystyczne dla mitochondrii i mogą się jedynie adsorbować na jądrach w czasie izolowania (113). Tak czy inaczej istnieje niebezpieczeństwo rozkładu DNP preparowanych z izolowanych jąder.

Z powyższego krótkiego przeglądu widać, że i obecnie stosowane metody izolowania nukleoproteidów nie są w pełni zadawalające. NP są kompleksami niezupełnie zdefiniowanymi i trudno rozróżnić w nich komponenty związane i składniki zaadsorbowane. Mirsky i Ris (90) np. stwierdzili, że niektóre białka luźniej związane z KDN mogą być gubione w trakcie preparowania. Lucy i Butler (81) przez kolejne wyciąganie chloroformowego żelu DNP 0,6M NaCl w różnych okresach czasu otrzymali szereg frakcji nukleoproteidów o malejącym stosunku białka do kwasu.

Izolowanie kwasów nukleinowych

Używane dawniej metody otrzymywania KN, podobnie jak dawne metody izolacji NP, były dość drastyczne. Szeroko rozpowszechnione było użycie zasad do hydrolizy NP, prowadzonej przeważnie w podwyższonej temperaturze. Białko usuwano następnie przy pomocy różnych środków jak np. koloidalnego wodorotlenku żelaza (75, 78), kwasu pikrynowego (73, 77), alkoholu (24, 55) lub przez wytrącanie w punkcie izoelektrycznym. Wszystkie te metody przedstawiają obecnie bardzo małą wartość (49).

DNP, jak wspomniano, są w silnych roztworach soli kuchennej w znacznym stopniu zdysocjowane. Fakt ten ma bardzo ważne znaczenie przy oddzielaniu komponenty białkowej i na nim opierają się wszystkie nowoczesne metody odbiałczania. Jedną z nich, wprowadzoną jeszcze w 1903 r. przez B a n g'a (2), opracowaną później przez H a m m a r s t e n a (51) i stosowaną do dziś (12, 96, 107), jest wysalanie białka nasyceniem roztworem chlorku sodu. H a m m a r s t e n (51) rozpuszczał wytrąconą sól wapniową DNP w 1M NaCl, po czym nasycał roztwór NaCl, przechowywał kilka dni w temp. 0°C, po czym odsączał wytrącone białka. S i g n e r (101) w podobny sposób nasycał chlorkiem sodu roztwór soli sodowej NP, przy czym okres wysalania przedłużył jednocześnie do dwu tygodni. Białko oddzielał również przez odsączenie. Ostatnio E m a n u e l i C h a j k o f f w 1953 r. (37) wprowadzili modyfikacje do metody H a m m a r s t e n a. Nasycali oni przez pół godziny wodny wyciąg NP chlorkiem sodu z dodatkiem arsenianu. Wysolone białko oddzielali z roztworu KN sącząc preparat z dodatkiem dużej ilości Hyflo Super Cel, dzięki czemu czas sączenia uległ znacznemu skróceniu.

Drugą, bardzo delikatną metodą i obecnie najbardziej rozpowszechnioną jest wprowadzone przez S e v a g'a (97) usuwanie białka działaniem mieszaniny chloroformu z alkoholem oktylowym. Białko tworzy z chloroformem nierozpuszczalny żel chloroformowo-białkowy, który z łatwością można oddzielać od KN przez odwirowywanie. Chloroform służy tu jako adsorbent ciekły tworząc z białkiem luźne cząsteczkowe połączenia (97). Kwas nukleinowy pozostaje w roztworze i daje się zdekantować z nad warstwy żelu. Alkoholu oktylowego używa się jako środka zmniejszającego pienienie. W praktyce mieszaninę wszystkich składników wytrząsa się a następnie wiruje. Otrzymuje się dwie fazy: górną, będącą roztworem NP częściowo odbiałczanego, dolną, zawierającą chloroform. Na granicy obu faz zbiera się żel białka. Do całkowitego odbiałczenia trzeba wytrząsanie powtórzyć kilkanaście razy. Ważnym jest, by odczyn odbiałczanego roztworu był obojętny. W razie bowiem zakwaszenia KN może się częściowo adsorbować na żelu chloroformowo-biał-

kowym. Metoda chloroformowa jest jednocześnie bardzo czułą metodą na wykrycie obecności białka, nawet w tych wypadkach, kiedy inne reakcje jak np. biuretowa wypadają całkowicie ujemnie. Jeśli po odwirowaniu na granicy faz brak jest już nawet śladu błonki żelu, roztwór można uważać za całkowicie odbiałczony. Niekiedy wskazane jest jednak zateżenie roztworu w próżni do mniejszej objętości i dalsze wytrąsanie z chloroformem tak długo, póki żel chloroformowo-białkowy nie przestanie się wytwarzać. Białko kurze daje się wykryć tą metodą jeszcze w stężeniu $1/25000$ — $1/40000$ (97). W oryginalnej technice *Sevag'a* roztwór NP uprzednio hydrolizuje się łagodnie roztworem węglaanu sodu w temp. 55°C . Technika taka pozwala również i na odbiałczanie RNP.

Metoda *Sevag'a* jest dziś używana głównie w opracowanej później przez *Gulland'a* modyfikacji (49). *Gulland* korzystając już z faktu, że DNP tkankowe są w roztworach soli zdysocjonowane, poddawał je odbiałczaniu chloroformem bez uprzedniej hydrolizy alkalicznej.

Trzeba zaznaczyć, że dysocjacja nukleohistonu grasicy wzrasta począwszy od stężenia $0,5$ NaCl. Dlatego w modyfikacji *Gulland'a* należy użyć wyższych stężeń soli, zmniejsza to bowiem ilość kwasu nukleinowego związanego z wytrąconym białkiem przy działaniu chloroformem (*Crampton* 29).

Otrzymany metodą *Sevag'a* KN wytrąca się z roztworu zwykłymi metodami opisanymi poniżej. Składnik białkowy można odzyskać przez odsączenie żelu od resztek wodnego roztworu KN, białko zaś uwalnia się dodatkiem alkoholu. Otrzymany produkt po zakwaszeniu kwasem octowym do pH $5,0$ — $6,0$ i odwirowaniu rozpuszcza się ponownie przez doprowadzenie do pH $7,0$. Uzyskane w ten sposób przez *Sevag'a* białka zawierały $0,73\%$ — P, $15,72\%$ — N, $0,6\%$ azotu purynowego i zachowały wszystkie właściwości immunochemiczne (97). W rozdzielaniu białka od KN metodą *Sevag'a* może przeszkadzać obecność lipidów, które tworzą jednolitą emulsję nie dającą się odwirowywać. Trzeba nadmienić, że NP spermy nie zawsze dają się odbiałczyć chloroformem bezpośrednio z roztworem soli. Tak np. *Zamenhof* i współprac. (119) trawili plemniki ludzkie trypsyną i dopiero wtedy poddawali je odbiałczaniu chloroformem. *Wyatt* (116) usuwał protaminę z komórek spermy śledzia papainą. Metoda *Sevag'a* służy do odbiałczania nie tylko KDN otrzymywanych z tkanek zwierzęcych, ale również i kwasów nukleinowych pochodzących z materiału roślinnego (70).

Trzecią z metod wprowadzoną od niedawnego czasu przez *Marko* i *Butlera* (84) oraz *Kay* (61) jest użycie do odbiałczania kwasów nukleinowych detergentów. Są to związki posiadające długi łańcuch węglowy apolarny i grupę polarną na końcu cząsteczki. Wyróżniamy

detergenty anionowe, z których głównie używa się siarczanów wyższych alkoholi, oraz kationowe — głównie czwartorzędowe sole amoniowe, w których jeden z alkylów posiada długi łańcuch. Detergenty tworzą silne kompleksy z białkami wskutek działania grup polarnych, powodując dysocjację nukleoproteidów i wytrącanie białka. Dzięki swym właściwościom denaturującym detergenty posiadają zdolność unieczyniania wirusów, enzymów oraz hamowania metabolizmu bakterii (44).

Zdolność detergentów zmniejszania napięcia powierzchniowego oraz wywoływania denaturacji białek znano już dawniej, jak również wykonano szereg prac, w których badano zależność powyższych zjawisk od stężenia detergentów, pH, temperatury, obecności elektrolitów itp. (13, 82, 33).

W oryginalnej metodzie Kay (61) używała 5% roztworu duponolu w 45% etanolu. (Duponol jest to mieszanina siarczanów wyższych alkoholi od C₈ do C₁₈ z przewagą siarczanu dodecyłu). Zmieloną tkankę ekstrahowano 0,9% NaCl z 0,01M cytrynianem sodu celem usunięcia RNP. Pozostałą tkankę umieszczano w 0,9% NaCl i dodawano roztworu duponolu do stężenia 0,4%. Po trzygodzinnym wytrząsaniu do lepkiego wyciągu dodawano NaCl do stężenia jednomolarnego i wytrącone białko odwirowywano. Wszystkie czynności prowadzono w temp. 0°C.

Przy odbiałczaniu RNP konieczne jest przed odbiałczeniem spowodowanie dysocjacji kompleksu. RNP trzustki wyekstrahowany 0,14M NaCl i strącony w punkcie izoelektrycznym daje się po zdysocjonowaniu półnasyconym roztworem chlorku sodu, (Kerr i Seraidarian (63), Nishioka (69)) odbiałczyć metodą Sevaga. Kay (60) użyła detergentów zamiast soli do dysocjacji RNP wytrąconego uprzednio w punkcie izoelektrycznym.

Szerokie zastosowanie znalazły detergenty do otrzymywania KN z wirusów i bakterii. Sreenivasaya i Pirie (104) już w 1938 roku badali wpływ siarczanu dodecyłu i stwierdzili, że wywiera on działanie dysocjujące na wirusy mozaiki tytoniowej. Autorzy ci zwrócili uwagę na konieczność doboru właściwego buforu. Bufory fosforanowe, boranowe i ftalanowe nie nadają się do tego celu, ponieważ tworzą krystaliczny kompleks z siarczanem laurynowym, tak że autorzy w swojej pracy używali buforu weronalowego o pH 8,0. Zawiesinę wirusa poddawano działaniu półprocentowego roztworu detergentu w temp. pokojowej przez 24 godz., a następnie białko usuwano półnasyconym roztworem siarczanu amonu, którego nadmiar oddializowywano. Do odbiałczania niektórych wirusów stosuje się działanie detergentów w podwyższonej temperaturze (34). Należy przy tym zaznaczyć, że dla każdego gatunku wirusa należy ustalić odpowiednie warunki.

Mayer i Spizizen (86) używali ostatnio duponolu do otrzy-

mywania KDN z bakteriofagów *Escherichia coli*. Koncentrat faga rozpuszczano w 1% duponolu przy pH 7,0 i podgrzewano 15 min. do 60°C, poczem białko usuwano półnasyconym octanem sodu. KRN prawdopodobnie ulegał całkowitej depolimeryzacji i nie dawał się wytrącić alkoholem z roztworu. W podobny sposób otrzymywano KDN z kolonii *Escherichia coli* i z innych drobnoustrojów. Autorzy nadmieniają jednak, że większość bakterii wymaga uprzedniego rozbicia ultradźwiękami. Prócz siarczianu dodecyłu zastosowano do odbiałczania drobnoustrojów Cetavlon (bromek cetylo-trój-metyloamoniowy), wprowadzony w 1953 r.

Tablica 2

Porównanie preparatów KDN bakteriofagów i grasicy otrzymanych działaniem detergentów i mocznika (wg Mayers i Spizizena (86))

KDN otrzymany z	Metoda otrzym.	Il. zasad azot. KDN μ M/100 μ g*)	P KDN μ M/100 μ g	N KDN μ M/100 μ g	N-nie nukl. μ M/100 μ g	Lepkość wzgl.
Bakteriof. T _{2r}	deterg.	0,151	0,148	0,561	0,019	5,34
„ T _{6r} +	„	0,075	0,078	0,696	0,410	—
„ T _{6r} +	„	0,106	0,135	0,726	0,231	—
„ T _{6r} +	mocznik	0,186	0,193	0,729	0,022	1,07
Grasica	deterg.	0,242	0,258	—	—	5,60
Woda		—	—	—	—	1,00

* — zawartość składników obliczono w mikromolach na 100 mikrogramów subst.

przez J o n e s'a, który użył go do otrzymywania KDN z *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium phlei* i *Sarcina lutea* (56, 57). Komórki bakteryjne po 24 godzinach ekstrakcji 0,001M arsenianem sodu wytrącano dwuprocentowym roztworem Cetavlonu. Utworzony kompleks rozpuszczano w 1M NaCl i wytrącano przez rozcieńczenie roztworu 2 obj. wody. Resztki białka i Cetavlonu usuwano metodą S e v a g'a. W ten sposób otrzymywano mieszaninę KDN i KRN.

Omówione powyżej trzy metody odbiałczania zostały dokładnie zbadane w ubiegłym roku przez F r i c k (42, 43), która badała DNP grasicy. Autorka stwierdziła, że przy odbiałczaniu DNP chloroformem w sposób podany przez G u l l a n d'a uzyskuje się bardzo niską wydajność — 5—10% (41). Otrzymany KDN zawiera jeszcze niewielkie ilości bardzo silnie związanego białka, którego obecność można wykryć dopiero po długotrwałej hydrolizie. Dużo większą wydajność uzyskuje się przy stosowaniu oryginalnej metody S e v a g'a, po hydrolizie węglanem sodu. Te fakty doprowadziły F r i c k do wniosku, że wiązanie między KDN a białkiem

jest silniejsze niż się to przyjmuje obecnie. Z badań Frick (42) nad metodą Hammarstena (51) wynika, że najbardziej wydajną jest oryginalna metoda tj. wysolenie chlorkiem sodu roztworu DNP, po wyekstrahowaniu z tkanki wodą i wytrąceniu chlorkiem wapnia. W tym wypadku dużo zależy jednak od aktywności enzymatycznej wyjściowego materiału. Wysolenie chlorkiem sodu ekstraktu otrzymanego działaniem 1M NaCl na tkankę okazało się mniej wydajne. Największą jednak wydajność (dochodzącą do dziewięćdziesięciu kilku % teoretycznej) uzyskała Frick przy odbiałczaniu DNP siarczanem dodecyłu.

Zastosowanie powyższych metod odbiałczania do NP bakteryjnych z *Mycobacterium* i *Aerobacter aerogenes* sprawdził ostatnio Jones (58) Przez wysolenie NaCl lub $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nie można było usunąć białka. Siarczan dodecyłowy wytrącał białko częściowo, a jedynie chloroform odbiałczał całkowicie. Te fakty są sprzeczne z danymi Bernsteina (7) i Frick (42), którzy stwierdzili, że właśnie chloroform nie usuwa całkowicie białka i konieczne jest po użyciu jego późniejsze działanie detergentów. Jones wprowadził równocześnie nowy sposób odbiałczania polegający na działaniu roztworem wodzianu chloralu (58). Resztki białka pozostające przy tym usuwane były następnie jedno lub dwukrotnym wytrząsaniem z chloroformem. Wodzian chloralu nie powoduje wyrażnej depolimeryzacji kwasu nukleinowego i nie tworzy trwałych kompleksów z tym związkami. Metody tej nie daje się zastosować do tkanek zwierzęcych.

Prócz tego należy wspomnieć o stwierdzeniu przez Pirie (95) odbiałczającego działania azotanu strontu na nukleoproteidy wirusowe. Pirie próbował również działać na NP chlorkiem strontu oraz azotanami baru lub wapnia, efekt odbiałczający był jednak w tych wypadkach znikomy. Lauffer i Dow prowadzili badania nad odbiałczającym działaniem wysokich ciśnień (71).

Do izolowania KN stosuje się również roztwory mocznika i chlorowodorku guanidyny (105, 48, 113). Mocznik ma szczególne zastosowanie do izolowania KN bakteryjnych (100). Cohen w roku 1947 (25) działał mocznikiem na zawiesinę bakteriofaga T_2r i T_4r w 0,85% NaCl a otrzymany w wyniku tego lepki roztwór odbiałczał chloroformem. Jones spostrzegł (57), że jeśli podziać na zawiesinę bakterii *Mycobacterium tuberculosis* nasyconym roztworem mocznika w temp. 37° to ekstrakt mocznikowy zawiera stosunkowo niewiele KN. Jeśli jednak odwirowane komórki ekstrahować w dalszym ciągu wodą, to znaczne ilości KN przechodzą do roztworu. Autor nie uzyskiwał jednak takiego efektu w przypadku *Mycobacterium phlei* i *Sarcina lutea*. Te ostatnie wymagały użycia bardziej drastycznych metod (57).

Mayers i Spizizen (86) porównywali KN bakteriofagów otrzy-

mane działaniem mocznika i detergentów. W pierwszym przypadku otrzymane preparaty wykazują stosunkowo niskie wartości lepkości a wydajność wynosi zaledwie 30%. Czas izolowania kwasu trwa przy tym ponad 12 godzin. Preparaty uzyskane działaniem siarczanu dodecylu są wprawdzie bardziej zanieczyszczone, jednakże wykazują wyższą lepkość i wyzyskuje się przy tym większą wydajność a czas trwania preparowania trwa zaledwie 3 — 4 godz. (Porównawcze dane podano w tablicy II).

Leuthard i Exer (72) stosowali 50% mocznik do ekstrakcji KRN z mitochondrii wątroby. Pozostałe resztki białka wydzielano następnie chloroformem.

Volkin i Carter (111) wprowadzili użycie 2M chlorowodoru guanidyny do otrzymania KRN. Pod jego wpływem większość białek ulega rozpuszczeniu, podczas gdy kwas nukleinowy tworzy galaretowaty żel. Resztę nieoddzielonego białka zarówno po działaniu mocznika jak i guanidyny usuwa się z roztworu chloroformem. Metoda ta ma tę zaletę, że można działać roztworem guanidyny i mocznika bezpośrednio na tkankę, hamując z miejsca działanie rybonukleazy.

Neurath i Greenstein (91) spostrzegli, że przy działaniu soli guanidyny na białka istotny wpływ na powstawanie kompleksu ma również anion. Najaktywniejszymi okazały się sole kwasów chlorowcowodorowych guanidyny, podczas gdy siarczany, węglany i octany raczej hamowały denaturację (91).

Jeszcze do dziś niekiedy stosuje się działanie alkali i wysokiej temperatury do izolowania KN z bakterii. Cohen (26, 27, 28) otrzymywał KRN z wirusów działając 5% NaOH na zimno przez 2 godz. lub ogrzewając zawiesinę wirusa w 0,1M NaCl do 100° przez 1 min. w pH 5,6 a następnie odwirowywał skoagulowane białka. Ciężar cząsteczkowy otrzymanego kwasu wynosił w pierwszym wypadku około 15 tys., w drugim 150 tys. Podobne wyniki z ługiem sodowym otrzymał Loring (79).

Smith i Weytt (102) podają, że 1M NaOH w temp. 37° nie powoduje zasadniczych zmian w składzie puryn i pirymidyn KDN.

Autorzy otrzymywali KN z *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* i bakteriofaga T₂ i T₅. Po hydrolizie alkalicznej strącali białko w pH 4 alkoholem, a resztki usuwali chloroformem.

Do odbiałczania KN drobnoustrojów jak i tkankowych używano również dezoksycholenu sodu (18).

Enzymy proteolityczne znalazły stosunkowo małe zastosowanie do odbiałczania KN. Boivine (9) używał do tego celu pepsyny działającą nią w pH 2,0, a Maver i Greco (85) katepsyny w pH 3,8 i 5,8. Otrzymane produkty wykazywały jednak znaczny stopień depolimeryzacji.

Dawne metody bezpośredniego izolowania kwasu nukleinowego z materiału biologicznego wyszły już prawie z użycia. Pewne znaczenie posiada jeszcze metoda Clarka i Schryvera (24) opracowana przez Javilliera i Allaira (54). Tkanę odlipidowaną ogrzewa się z 10% NaCl. Powoduje to rozpad wiązania białko-kwas nukleinowy i ten ostatni przechodzi ilościowo do roztworu. Oczywiście otrzymany w ten sposób kwas jest zdepolimeryzowany. Tego rodzaju odbiałczanie stosowała w ostatnich latach szkoła Khouvine do otrzymania KN z atypowego nabłonka szczura (67, 65) i z drożdży (66), oraz Bendich (6) do badań niejednorodności KDN. Należy wspomnieć, że wiele NP wirusowych okazało się jednak odpornych nawet na gorący roztwór chlorku sodu.

Kwasy nukleinowe, względnie ich sole wytrącane są z roztworu przez dodanie alkoholu etylowego. Rzadziej stosuje się zakwaszanie roztworu do pH około 1,0 przy pomocy kwasu solnego, co powoduje szybką depolimeryzację kwasu nukleinowego. Do wytrącania stosowano dawniej także sole Cu (4) i La (31, 32, 20, 110), a ostatnio Jones badał użycie do tego celu soli Mn i Pb (36).

Po wytrąceniu KN odwadnia się alkoholem i eterem, zaś w przypadku preparatów otrzymanych detergentami, acetonem i następnie suszy pod zmniejszonym ciśnieniem. Niektórzy autorzy zalecają łagodne suszenie na powietrzu, co ma zapobiegać depolimeryzacji. Ostatnio coraz częściej stosuje się liofilizację roztworu KN szczególnie (bakteryjnych (19, 85, 114, 109).

Aby usunąć resztki zanieczyszczeń stosuje się wielokrotne rozpuszczanie i wytrącanie KN bądź przez kolejne alkalizowanie i zakwaszanie środowiska (74, 92), (co powoduje jednak w pewnym stopniu depolimeryzację), bądź przez rozpuszczanie kwasu w molarnym NaCl i ponowne wytrącanie alkoholem. W ten sposób można się pozbyć częściowo zanieczyszczeń związkami mineralnymi, a w przypadku bakterii, również i polisacharydów (3). Wszystkie niskocząsteczkowe związki oraz sole mineralne można usunąć poprzez dializę (19, 109, 114, 103). Glikoproteidy stanowiące zanieczyszczenie KN bakteryjnych Boivin oddzielał przez wielokrotne wytrącanie NP w pH 3,5 i rozpuszczanie w węglanie sodu (9). KN, otrzymany działaniem Cetavlonu na *Sarcina lutea* wytrącał Jones z 20% roztworu alkoholu 0,5 do 1M chlorkiem wapnia. Znaczna część polisacharydów pozostawała przy tym usunięta, tak, że zawartość fosforu wzrastała z 7,9 do 8,4%. Kwasów nukleinowych z *Mycobacterium tuberculosis* i *Mycobacterium phlei* nie udało się jednak w ten sposób oczyścić.

Subtelna metodyka badań składu KN wymaga do analizy jak najczystszych preparatów. Wprawdzie metoda Mirsky'ego i Pollister'a pozwala na rozdzielenie obu kwasów, to jednak KDN pozbawio-

ne zanieczyszczeń kwasem rybonukleinowym otrzymuje się, jak już wspomniano, w przypadku tylko niewielu tkanek np. grasicy (117). W większości tkanek pewne zanieczyszczenia KRN stale pozostają mimo wielokrotnego działania 0,14M chlorkiem sodu. Z metod pozwalających na rozdzielanie obu kwasów okazały się przydatne takie jak: elektroforeza, frakcjonowanie przy użyciu soli wapnia (jednak niezbyt dokładne) (22), oraz oczyszczenie KDN przez działanie rybonukleazy i oczyszczenie KRN przez działanie dezoksyrybonukleazy (117). Przy trawieniu nukleazami KN ulegają jednak wtórnemu zanieczyszczeniu białkiem. KRN można usunąć również przez dializę w środowisku alkalicznym o pH 13,5 w temp. 30°. Jednakże KDN ulega wówczas również częściowej depolimeryzacji (23). Z a m e n h o f i C h a r g a f f opisali delikatną metodę usuwania śladów KRN z KDN. Z obu kwasów nukleinowych rozpuszczonych w 0,14M NaCl tylko KRN adsorbuje się ilościowo na węglu aktywnym (117). Do metody tej wprowadził J o n e s przy rozdzielaniu KN bakteryjnych, modyfikację pozwalającą na odzyskanie zaadsorbowanego KRN przez eluowanie węgla roztworem fenolu (36). Jednocześnie opracował on nowy sposób rozdzielania NP korzystając z różnic rozpuszczalności kompleksów Cetavlonowych w różnych stężeniach NaCl. DNP wytrąca się z 0,5M roztworu NaCl w temp. 0° 20% Cetavlonem, a RNP można następnie wytrącić z przesączu przez rozcieńczenie tego ostatniego do stężenia 0,3M NaCl.

Ostatnio coraz częściej ukazują się prace dotyczące frakcjonowania KN różniących się między sobą nie tylko składnikiem cukrowym, lecz również składem puryn i pirymidyn, oraz różnym ciężarem cząsteczkowym. KRN o różnym ciężarze cząsteczkowym otrzymywał M a l l e t t e i L a m a n a frakcjonując preparaty alkoholem (83). B r o w n i W a t s o n (10) przy badaniach niejednorodności KDN uzyskali rozdzielanie na poszczególne frakcje. Autorzy działali różnymi stężeniami NaCl na kolumny zawierające wysycony histonem żel krzemionkowy. Stwierdzili jednocześnie, że związany na kolumnach KRN daje się eluować 0,4M NaCl. Metoda ta może więc służyć do oddzielania KRN od KDN, gdyż przy tym stężeniu NaCl ten ostatni jeszcze nie zostaje wyeluowany.

Reasumując dotychczasowe doświadczenia nad izolowaniem NP i KN z tkanek zwierząt i wyższych roślin należy stwierdzić, że obecnie najpowszechniej stosowaną jest ekstrakcja roztworami NaCl lub wodą w temp. 0°. Działanie enzymów w trakcie preparowania zostaje hamowane przez dodatek inhibitorów. KN uzyskuje się przez odbiałczanie nukleoproteidów przy pomocy chloroformu lub detergentów, coraz powszechniej wchodzących w życie. Te ostatnie odznaczają się tym, że przy stosunkowo krótkim czasie działania i łatwej do stosowania technice, pozwalają na uzyskanie wysoko spolimeryzowanych preparatów

o zachowanej strukturze, dużym stopniu czystości i przy jednocześnie znakomitej wydajności. Celem otrzymania KN z bakterii lub wirusów, rzadziej z tkanek zwierzęcych wykorzystuje się jeszcze nadal dysocjujące własności mocznika i guanidyny w połączeniu z odbiałczaniem chlo-roformem. Coraz mniej stosuje się natomiast hydrolizę alkaliczną lub podwyższoną temperaturę. Często w pracy nad izolowaniem KN mikro-organizmów musimy uciekać się do uprzedniego zniszczenia błony ko-mórkowej, by umożliwić przedostanie się roztworu ekstrahującego w głąb komórki.

Jak wynika z powyższego przeglądu technika otrzymania nukleopro-teidów i kwasów nukleinowych posunęła się w ostatnich latach wybitnie naprzód. Preparaty otrzymywane dziś są napewno bliższe stanowi w jakim znajdują się w komórce, niż preparaty otrzymywane dawniej. Mimo to nie mamy nadal pewności, czy w trakcie otrzymywania nie za-chodzą jakieś zasadnicze zmiany. Ostatnie lata, zapoczątkowujące ba-dania nad niejednorodnością zarówno kwasów nukleinowych jak i kom-ponenty białkowej nukleoproteidów zmuszają nas do szukania jeszcze innych metod, pozwalających na skalę preparatywną frakcjonować nu-kleoproteidy i kwasy nukleinowe.

LITERATURA

1. Allen F. W., *Ann. Rev. Biochem.*, **23**, 99 (1954).
2. Bang J., *Hofmeisters Beiträge Chem. Physiol. Pathol.*, **4**, 331 (1903).
3. Barnum C. P., Nask C. W., Jennings E., Nygard O. i Vermund H., *Arch. Biochem.*, **25**, 376 (1950).
4. Baumann E. J., *Prod. Ann. Soc. Biol. Chem.*, **33**, XIV (1918).
5. Biełozierski A. N., *Cold Spring Harbor Symp.*, **12**, 1 (1947).
6. Bendich A., Russel P. J. i Brown G. B., *J. Biol. Chem.*, **203**, 305 (1953).
7. Bernstein M. H., *Science*, **117**, 228 (1953).
8. Bernstein M. H., i Mazia D., *Bioch. Bioph. Acta*, **11**, 59 (1953).
9. Boivine A., *Cold Spring Harbor Symp.*, **12**, 7 (1947).
10. Brown G. L. i Watson M., *Nature*, **172**, 339 (1953).
11. Brown K. D., Jacobs G. i Laskowski M., *J. Biol. Chem.* **194**, 445 (1952).
12. Brues A. M., Tracy R. M. i Cohn W. E., *J. Biol. Chem.*, **155**, 619 (1944).
13. Bull H. B. i Neurath H., *J. Biol. Chem.*, **118**, 163 (1937).
14. Butler J. A. W., Davison P. F., James W. W. F. i Shortet K. V., *Bioch. Bioph. Acta*, **13**, 224 (1954).
15. Carter R. O. i Hall J. L., *J. Amer. Chem. Soc.* **62**, 1194 (1940).
16. Chambers L. A. i Flosdorf E. W., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **34**, 631 (1936).
17. Chargaff E., *Fed. Proc.*, **5**, 129 (1946).
18. Chargaff E., *Cold Spring Harbor Symp.*, **12**, 28 (1947).
19. Chargaff E., Crampton Ch. F. i Lipshitz R., *Nature*, **172**, 4372 (1953).
20. Chargaff E., Vischer E. i Doniger R., *J. Biol. Chem.*, **177**, 405 (1949).
21. Chargaff E. i Seidel H. F., *J. Biol. Chem.*, **177**, 417 (1949).
22. Chargaff E. i Zamenhof S., *J. Biol. Chem.*, **173**, 327 (1948).

23. Chargaff E. i Zamenhof S., *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 38, 25 (1950).
24. Clarke G. i Schryver S. B., *Biochem. J.*, **11**, 319 (1917).
25. Cohen S. S., *Cold Spring Harbor Symp.*, **12**, 35 (1947).
26. Cohen S. S. i Stanley W. N., *J. Biol. Chem.*, **142**, 863 (1942).
27. Cohen S. S. i Stanley W. N., *J. Biol. Chem.*, **144**, 389 (1942).
28. Cohen S. S. i Stanley W. N., *J. Biol. Chem.*, **144**, 591 (1942).
29. Crampton F. Ch., Lipshitz R. i Chargaff E., *J. Biol. Chem.*, **206**, 499 (1954).
30. Dallam R. D. i Thomas L. E., *Nature*, **170**, 377 (1952).
31. Davidson J. N., *Cold Spring Harbor Symp.*, **12**, 50 (1947).
32. Davidson J. N. i Waymouth C., *Biochem. J.*, **38**, 375 (1944).
33. Desseux V. i Fabry C., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **28**, 78 (1946).
34. Dorner K. W. i Knight C. A., *J. Biol. Chem.*, **205**, 959 (1953).
35. Dounce A. L., *J. Biol. Chem.*, **147**, 685 (1943).
36. Dutta S. K., Jones A. S. i Stacey M., *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 613 (1953).
37. Emanuel C. F. i Chaikoff I. L., *J. Biol. Chem.*, **203**, 167 (1953).
38. Euler H. i Hahn L., *Arkiv Kemi Min. Geol.*, (A), **22**, 17 (A), 23, 5 (1946).
39. Euler H. i Heller L., *Arkiv Kemi Min. Geol.*, (A) **26**, 10—16 (1726) (1948) (cyt. wg Chem. Abstr. 43, 8990 (1950)).
40. Feulgen R., *Z. Physiol. Chemie.*, **90**, 261 (1914).
41. Frick G., *Bioch. Bioph. Acta*, **3**, 103 (1949).
42. Frick G., *Bioch. Bioph. Acta*, **13**, 41 (1954).
43. Frick G., *Bioch. Bioph. Acta*, **13**, 374 (1954).
44. Putnam F. W. i Neurath H., *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 692 (1944).
45. Gajdusek D. C., *Bioch. Bioph. Acta*, **5**, 397 (1950).
46. Gandelman B., Zamenhof S. i Chargaff E., *Bioch. Bioph. Acta*, **9**, 399 (1952).
47. Grinnan E. L. i Mosher W. A., *J. Biol. Chem.*, **191**, 719 (1951).
48. Gulland J. M., Jordan D. O. i Threlfall C. J., *J. Chem. Soc.*, 1129 (1947).
49. Gulland J. M., Barker J. M. i Jordan D. O., *Annual Rev. Biochem.*, **14**, 175 (1945).
50. Hammarsten O., *J. Biol. Chem.*, **43**, 243 (1920).
51. Hammarsten E., *Biochem. Z.*, **144**, 383 (1924).
52. Hammarsten E. i Jorpes E., *Z. Physiol. Chem.*, **118**, 224 (1922).
53. Huiskamp W. Z., *Z. Physiol. Chem.*, **32**, 145 (1901).
54. Javillier M. i Allaire H., *Bull. Soc. Chim., Biol.*, **13**, 678 (1931).
55. Jonson T. B. i Harkins H. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **51**, 1779 (1929).
56. Jones A. S., *Chem and Ind.*, 1067 (1951).
57. Jones A. S., *Bioch. Bioph. Acta*, **10**, 607 (1953).
58. Jones A. S., *Bioch. Bioph. Acta*, **14**, 559 (1954).
59. Jorpes E., *Biochem. J.*, **28**, 2103 (1934).
60. Kay E. R. M. i Dounce A. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4041 (1953).
61. Kay E. R., Simmons N. S. i Dounce A. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1724 (1952).
62. Kenski Suzuki, Itary Watanabe, *J. Chem. Soc. Japan*, **73**, 778, (1952) (cyt. wg Chem. Abstr. 47, 4384, (1953)).
63. Kerr S. E. i Seraidarian K., *J. Biol. Chem.*, **180**, 1203 (1949).
64. Khouvine Y. i Robichon-Szulmajster N., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 1508 (1951).

65. Khouvine Y. i Robichon-Szulmajster H., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **34**, 1050 (1952).
66. Khouvine Y. i Wysmann L., *Comp. rend.*, **239**, 834 (1954).
67. Khouvine Y. i Hirsch M., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **34**, 305 (1952).
68. Koenig V. L., Larkins L. i Perrings J. D., *Arch. Biochem. Biophys.*, **39**, 355 (1952).
69. Kusuya Nishioka i Katsuko Ibuka, *Japan J. Exptl. Med.*, **22**, 163 (1952) (cyt. wg *Chem. Abstr.* **47**, 5463 (1953)).
70. Laland S. i Overend W. G., *Acta Chem. Scand.*, **4**, 885 (1950).
71. Lauffer M. A. i Dow R. B., *J. Biol. Chem.*, **140**, 509 (1941).
72. Leuthardt F. i Exer B., *Helv. Chim. Acta*, **36**, 500 (1953).
73. Levene P. A., *Z. Physiol. Chem.*, **45**, 370 (1905).
74. Levene P. A., *Biochem. Z.*, **17**, 120 (1909).
75. Levene P. A., *J. Biol. Chem.*, **53**, 441 (1922).
76. Levene P. A. i Jorpes E., *J. Biol. Chem.*, **86**, 389 (1930).
77. Levene P. A. i La Forge F. B., *Ber. deutsch. chem. Ges.*, **43**, 3164 (1910).
78. Levene P. A. i Bass L. W., *Nucleic Acids (New York)*, (1931).
79. Loring H. S., *J. Biol. Chem.*, **130**, 251 (1939).
80. Luck J. M., Kupke D. W., Rhein A. i Hurd, *J. Biol. Chem.*, **205**, 235 (1953).
81. Lucy A. J. i Butler J. A. W., *Nature*, **174**, 32 (1954).
82. Lundgren H. P., Elam D. W. i O'Connell R. A., *J. Biol. Chem.*, **149** 183 (1943).
83. Mallette M. F. i Lamana C., *Arch. Bioch. Bioph.*, **47**, 174, (1953).
84. Marko A. M. i Butler G. C., *J. Biol. Chem.*, **190**, 165 (1951).
85. Maver M. E. i Greco A. E., *J. Biol. Chem.*, **181**, 853 (1949).
86. Mayers V. L. i Spizizen J., *J. Biol. Chem.*, **210**, 877 (1954).
87. Mirsky A. E. i Pollister A. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. Wash.*, **28**, 344 (1942).
88. Mirsky A. E. i Pollister A. W., *J. Gen. Physiol.*, **30**, 101 (1946).
89. Mirsky A. E. i Pollister A. W., *J. Gen. Physiol.*, **30**, 117 (1946).
90. Mirsky A. E. i Ris H., *J. Gen. Physiol.*, **34**, 451 (1951).
91. Neurath W. i Greenstein J. P., *Chem. Rev.*, **34**, 157 (1944).
92. Osborne T. B., i Harris J. F., *Z. Physiol Chem.*, **36**, 85 (1902).
93. Parson C. H. J., *Arch. Bioch. Bioph.*, **47**, 72 (1953).
94. Petterman M. L. i Lamb C. M., *J. Biol. Chem.*, **176**, 685 (1948).
95. Pirie N. W., *Biochem. J.*, **56**, 83 (1954).
96. Schwander H. i Signer R., *Helv. Chim. Acta*, **33**, 1521 (1950).
97. Sevag M. G., Lackman D. B. i Smolens J., *J. Biol. Chem.*, **124**, 425 (1938).
98. Shack J. i Thomssen J. N., *J. Nat. Cancer.*, **13** (1952).
99. Shoöter K. V., Davison P. F. i Butler J. A. V., *Bioch. Bioph. Acta*, **13**, 192 (1954).
100. Siegel A. i Singer J., *Bioch. Bioph. Acta*, **10**, 311 (1953).
101. Signer R. i Schwander H., *Helv. Chim. Acta*, **32**, 853 (1949).
102. Smith J. D. i Wyatt G. R., *Biochem. J.* **49**, 144 (1951).
103. Smith J. D. i Markham R., *Biochem. J.*, **46**, 509 (1950).
104. Sreenivasaya M. i Pirie N. W., *Biochem.*, **32**, 1707 (1938).
105. Stanley W. M. i Lauffer M. A., *Science*, **89**, 345 (1939).

106. Stern K. G., Goldstein G., Wagner G. i. Schyver J., Fed. Proc., **6**, 296 (1928).
107. Taylor B., Greenstein J. P. i Hollaender A., Arch. Bioch., **16**, 19 (1948).
108. Thomas L. E. i Mayer D. T., Science, **110**, 393 (1949).
109. Uzman L. L. i Dezeer C., Arch. Biochem. Biophys. (1953).
110. Vischer E., Zamenhof S. i Chargaff E., J. Biol. Chem., **177**, 429 (1949).
111. Volkin E. i Carter C. E., J. Am. Chem. Soc., **73**, 1516 (1951).
112. Watanabe I. i Suzuki K., J. Chem. Soc. Japan, **72**, 578 (1951) (cyt. wg Chem. Abstr. 46, 3666 (1952)).
113. Webb M., Nature, **169**, 417 (1952).
114. Woodhouse D. L., Biochem. J., **56**, 349 (1954).
115. Wyatt G. R., Biochem. J., **48**, 581 (1951).
116. Wyatt G. R., Biochem. J., **48**, 584 (1951).
117. Zamenhoff S. i Chargaff E., Nature, **168**, 604 (1951).
118. Zamenhoff S., Gribeff G. i Ulanle M., Bioch. Bioph. Acta, **13**, 459 (1954).
119. Zamenhoff S., Shettles R. B. i Chargaff E., Nature, **165**, 756 (1950).

WITOLD DRABIKOWSKI

Budowa białek wchodzących w skład nukleoproteidów

W pierwszym klasycznym okresie rozwój badań nad białkami nukleoproteidów wyprzedzał badania nad kwasami nukleinowymi. Prace wykonywane wówczas polegały głównie na opracowaniu metod wydzielania białek oraz na oznaczaniu ich składu aminokwasowego. W ostatnich latach zajmowano się może nieco mniej zagadnieniem komponenty białkowej, niż samymi kwasami nukleinowymi, mimo to jednak obok wykrycia heterogenności kwasów nukleinowych coraz bardziej zarysowuje się pogląd o niejednorodności związanych z nimi białek. Wydaje się, że dziś nie można już mówić o jednym białku jako o składniku nukleoproteidu, ale o całej grupie białek, wykazujących co najwyżej cechy wspólne, ale różniące się składem i częściowo własnościami fizykochemicznymi.

Pierwszym badaczem, który w r. 1874 wyizolował ze spermy łosia substancję białkową połączoną z kwasami nukleinowymi i nadał tej grupie białek nazwę protamin był Miescher (32). Kossel badając w dziesięć lat później jądra erytrocytów ptasich znalazł tam również zasadowe białka, bardziej złożone niż protaminy Mieschera, którym nadał nazwę histonów (27).

Szkoła Kossela prowadziła w następnych latach długotrwałe pionierskie prace nad zbadaniem składu i własności protamin i histonów. Mimo że otrzymane dane analityczne w świetle badań współczesnych często nie wytrzymują krytyki wskutek stosowania wówczas nie dość dokładnych metod, to jednak wkład Kossela w tej dziedzinie jest bez wątpienia ogromny. Jego monografia wydana w r. 1928 (28) do dziś jeszcze oddaje usługi, tym bardziej, że nikt do tej pory nie pokusił się o opracowanie podobnej, unowocześnionej monografii.

Protaminy są charakterystycznymi białkami nukleoproteidów spermy ryb. Do lat ostatnich uważano, że nie występują one u wyższych kręgowców. Ostatnio w r. 1953 Fischer i Kreuzer (17) stwierdzili, że komponenta białkowa spermy koguta tzw. gallina jest też typową

protaminą, wbrew twierdzeniu D a l y'e i g o i wsp. (9), że gallina jest białkiem o własnościach i składzie pośrednim między protaminami a histonami. D u i j n (13) w r. 1954 doniósł, że przynajmniej część KDN w plemnikach ludzkich jest związana z protaminą. U roślin brak jest protamin. Najdokładniej zbadane są dwie protaminy: klupeina ze śledzia i salmina z łososia. Otrzymuje się je klasycznymi metodami przez ekstrakcję odlipidowanych główek spermy kwasami mineralnymi. Z roztworu kwaśnego strąca się etanolem siarczan protaminy najpierw w postaci oleju, który następnie krzepnie. Można również izolować protaminy przez wysolenie lub w postaci pikrynianów. Po zawieszeniu pikrynianu w metanolu i przepuszczeniu gazowego chlorowodoru otrzymuje się chlorowodorki estru metylowego protamin.

Protaminy są białkami o bardzo nieskomplikowanej budowie. Ich ciężar cząsteczkowy wynosi około kilku tysięcy (37, 15, 46). Posiadają charakter silnie zasadowy, a ich punkt izoelektryczny leży w granicach pH 11 — 12. Zawartość argininy wynosi do 90%^{*)}. Prócz argininy stwierdzono występowanie zaledwie kilku innych aminokwasów. Salmina

zawiera izoleucynę, walinę glikokol, alaninę, prolinę i serynę (33, 46, 21, 2, 7). Klupeina różni się tym od salminy, że zawiera zamiast glikokolu treoninę (2, 15). Ilości innych aminokwasów poza argininą są niewielkie. Dla przykładu podajemy wyniki prac C o r f i e l d a i R o b s o n a z r. 1953 nad składem aminokwasowym salminy (tablica 1).

Końcowymi grupami aminokwasowymi klupeiny jest prolina, niekiedy seryna (15, 36, 48).

Drugim typem białek wchodzących w skład nukleoproteidów są histony. Są one charaktery-

stycznym składnikiem dezoksyrybonukleoproteidów tkanek somatycznych zwierząt i wyższych roślin. Występują również niekiedy w komórkach rozrodczych zwierząt np. w spermie jeźowców (1). Są to białka o budowie o wiele bardziej złożonej niż protaminy. Posiadają również charakter zasadowy. Ich punkt izoelektryczny leży w pH około 10 — 11,

Tablica 1

Skład aminokwasowy salminy (wg C o r f i e l d a i R o b s o n a (7)).

	% zaw. N aminokwasu w stosunku do N białkowego	ilość równoważników
arginina	89,8	50
izoleucyna	0,44	1
alanina	0,45	1
walina	1,40	3
glicyna	1,80	4
seryna	3,12	7
prolina	2,70	6

^{*)} Wszystkie dane w niniejszej pracy dotyczące % zawartości aminokwasów podane są w obliczeniu na azot.

a ciężar cząsteczkowy wynosi do 20000 (3). Jak to wynika z ostatnich prac Butler'a i wsp. przynajmniej niektóre z nich mogą tworzyć dime-ry, lub większe agregaty (5).

Do izolowania histonów służą dziś dwie drogi. Jedną jest oddzie-łanie histonu od kwasu nukleinowego po uprzedniej ekstrakcji nukleo-proteidu roztworami soli lub wodą bezpośrednio z homogenatu tkanki. Poprzez łagodną hydrolizę kwasami mineralnymi uzyskuje się wytrące-nie KDN, a histon pozostaje w roztworze. Wydziela się go następnie przez doprowadzenie roztworu do punktu izoelektrycznego bądź przez dodatek alkoholu, bądź acetonu lub przez wysolenie. Drugą metodą jest ekstrakcja nukleoproteidu, lub bezpośrednio histonu z izolowanych uprzednio jąder komórkowych. Posiada to jednak tę niedogodność, że nawet już słabe kwasy, używane często do izolowania jąder mogą czę-ściowo rozpuszczać histony. Butler (4, 6) próbował wprowadzić nową technikę izolowania histonów. Dezoksyrybonukleoproteidy są w roztwo-rach soli o dużej sile jonowej zdysocjowane i dodatek alkoholu o koń-cowym stężeniu 30% do takiego roztworu powoduje wytrącenie histo-nów z pozostawieniem kwasu nuklei-nowego w roztworze. Metoda okazała się jednak niedogodna ze względu na proteolityczne działanie katepsyn w obojętnym środowisku (6). Niezależnie od Butler'a technikę powyższą wprowadzili Gregoire i Limozin (19) stosując jednak o wiele dłuższy czas dysocjowania nukleoproteidu.

W składzie aminokwasowym histo-nów przeważają aminokwasy zasado-we. Zawartość argininy wynosi do 30% (3), a lizyny do kilkunastu % (19, 20). Ogólnie należy stwierdzić, że histony zawierają prawie wszystkie aminokwa-sy (tablica 2).

Jedynie kwestią sporną pozostaje sprawa występowania w nich trypto-fanu, metioniny i cystyny. Jedni auto-rzy nie znajdują ich wcale, inni wykry-wają zawsze niewielkie ale zdefinio-wane ilości, choć nieraz przypisują za-nieczyszczeniom.

Stedman i Stedman (44) uwa-żali brak tryptofanu za kryterium czy-

Tablica 2

Skład aminokwasowy frakcji P histo-nu grasicy (Gregoire i Limozin (19), (wartości podano w % azo-tu aminokwasowego w stosunku do azotu białkowego).

glicyna	5,8
alanina	6,0
walina	4,35
leucyna	10,7
prolina	2,1
fenyloalanina	1,3
cysteina-cystyna	0,25
arginina	26,0
histrydina	2,6
lizyna	13,2
kw. asparaginowy	4,1
kw. glutaminowy	4,9
azot amidowy	6,4
seryna	3,4
treonina	3,2
tyrozyna	2,1
tryptofan	0,25 maks.
metionina	0,45
Razem	97,10

stości histonów Harper i Morris (22) w histonie erytrocytów ptasich nie wykrywali tryptofanu, potwierdzając dane Daly'ego (9), znaleźli go natomiast w histonie wątroby. Engbring i Laskowski (14) stwierdzali obecność tryptofanu w histonie erytrocytów ptasich, a Davison i Lavrie (11) w histonie grasicy. Khouvine (23) nie znajdowała tryptofanu w histonach atypowego nabłonka szczura. Daly (9) nie znalazł metioniny, podczas gdy Harper i Morris (22) wykrywali stale małe jej ilości.

Również Brunisch (3) i Daly i Mirsky (10) znajdowali w histonach grasicy metioninę. Hamer (20) nie stwierdził obecności cystyny w histonie grasicy, a Gregoire i Limozin (19) wykrywali w nim zawsze pewne ilości zarówno aminokwasów zawierających siarkę, jak i tryptofanu (choć obecność tego ostatniego skłonni byli przypisać zanieczyszczeniom).

Jak widać z powyższych danych zagadnienie składu aminokwasowego omawianych białek nie zostało jeszcze rozstrzygnięte. Omawiając ten problem Davison (12) stwierdza, że histony jako klasa charakteryzują się właściwie obecnością wszystkich aminokwasów z wyjątkiem być może cystyny.

Stosowane dawniej metody izolowania komponenty białkowej nukleoproteidów pozwalały w efekcie otrzymać całe białko obecne w kompleksie. Otrzymywane dane analityczne były właściwie danymi średnimi. W ostatnich latach podjęto badania nad następującymi zagadnieniami: czy histony i protaminy są jednorodne, czy też w obrębie nawet jednej i tej samej komórki występuje obok siebie szereg białek o wspólnym charakterze histonów czy protamin ale różniących się własnościami i składem aminokwasowym. Czy histony i protaminy są jedyną komponentą białkową jąder komórkowych i dezoksyrybonukleoproteidów, a jeżeli nie to jakie ewentualnie jeszcze typy białek mogą w nich występować?

Materiałem do badań były zarówno dezoksyrybonukleoproteidy otrzymane z całych tkanek, jak i izolowane jądra komórkowe. Davison i wsp. (12) uważają, że żeby rozwiązać to zagadnienie należy rozpatrywać wszystkie białka zawarte w jądrach, ponieważ nie ma nigdy pewności, czy niektóre z białek związane z KDN nie ulegają wypłukiwaniu w trakcie izolowania nukleoproteidów.

Już kilka lat temu wykazano, że wyniki analiz podawane przez różnych autorów dla histonów tej samej tkanki wykazują większe różnice, niż pozwalałyby na to sam błąd metody oznaczania. Daly (9) a również i Harper (22) uważają, że odchylenia mogą pochodzić od rzeczywistych różnic w naturze histonów, od zanieczyszczeń lub ewentualnego rozpadu histonów w trakcie ekstrakcji, lub też tkwić w nieznaczących

różnicach metody, rezultatem czego jest ekstrakcja różnych frakcji z całej rodziny histonów podobnych do siebie. K h o u v i n e (23) uważa, że dwa histony nie mogą być porównywalne, jeżeli ani one ani nukleoproteidy, z których pochodziły nie były otrzymywane tą samą metodą.

Za niejednorodnością histonów i protamin przemawia coraz więcej danych. Już wcześniej S t e d m a n i S t e d m a n (42, 43) rozdzielali etanolem protaminy i histony na dwie frakcje różniące się składem aminokwasowym. F e l i x wykazał (38, 39) na drodze ultrawierowania i elektroforezy, że klupeina składa się z wielu frakcji różniących się ciężarem cząsteczkowym i składem aminokwasowym. Tak np. aminokwasy występujące w niewielkim stężeniu jak izoleucyna i treonina znajdowały się nie w każdej frakcji (39). Salmina okazała się również niejednorodną (16).

Do frakcjonowania protamin zastosowano również rozdział przeciwpądowy (39a), wymiennicze jonowe i rozdział na ziemi okrzemkowej (51) i stwierdzono występowanie dwu składników głównych, z których każdy składa się z wielu pojedynczych frakcji. W a l d s c h m i d t - L e i t z (47, 48) wydzielił z klupeiny komponentę białkową nie zawierającą w końcowej grupie proliny. To białko rozdzielił na frakcje, z których jedna nie zawierała w ogóle izoleucyny a bardzo niewiele treoniny, podczas gdy druga była bogata w izoleucynę.

Szereg autorów stwierdziło homogenność histonów drogą ultrawierowania (3) i rozdziału elektroforetycznego, lub uważało, że znajdowane często frakcje są artefaktem powstałym na skutek bądź to częściowej denaturacji, bądź częściowej preteolizy. Inni donoszą o kompleksowości histonów nie wywołanej powyższymi zjawiskami. B u t l e r i w s p. (6) badając w r. 1954 w ultrawirówce i elektroforezie histon grasicy, stwierdzili występowanie dwóch składników. G r e g o i r e i L i m o z i n (19) rozdzielali histon grasicy na dwie frakcje. Histony te otrzymali po wydzieleniu KDN etanolem ze zdysocjowanego nukleoproteidu. Jedna z frakcji tzw. P, wypadała z roztworu po usunięciu alkoholu, druga, tzw. S, pozostawała w roztworze. Stosunek wzajemny obu frakcji był zmienny. Frakcja P wynosiła średnio 50 — 75% całości i była elektroforetycznie jednorodna. Frakcja S wykazała w elektroforezie trzy składniki. Skład aminokwasowy obu frakcji różnił się znacznie. Tak np. frakcja P zawierała 26% argininy i 13% lizyny (tablica 2), podczas gdy frakcja S miała tylko 15% argininy i 21% lizyny.

Podawane w literaturze rozbieżności w składzie aminokwasowym histonów, nawet tej samej tkanki G r e g o i r e i L i m o z i n tłumaczą, właśnie tym, że zależnie od procedury otrzymuje się obie frakcje histonów w zmiennych proporcjach. Potwierdzały to fakt, że histony z atypowego nabłonka szczura, otrzymane z DNP wytrącanego przez roz-

cieńczenie wodą różnią się składem od histonów pochodzących od DNP, wytrąconych chlorkiem wapnia (25) (tablica III).

W roku 1955 D a l y i M i r s k y (10) ogłosili wyniki badań nad rozdziałem histonów grasicy. Autorzy stwierdzili, że amoniak w pH 10,6 wytrąca tylko część białka, a mianowicie histon bogaty w argininę.

Tablica 3

Skład aminokwasowy histonów atypowego nabłonka szczura w zależności od sposobu otrzymywania nukleoproteidów (K h o u v i n e i wsp. (25) (wartości podane w % N aminokwasowego w stosunku do 100 g N białkowego)

	woda	CaCl ₂
arginina	25,7	15,1
lizyna	10,9	15,0
histydyna	3,7	6,4
kw. glutaminowy	6,1	3,7
kw. asparaginowy	3,7	6,7
fenyloalanina	1,5	1,3
tyrozyna	1,6	3,5
glicyna	6,2	6,3
seryna	4,3	0,8
treonina	3,3	1,5
alanina	5,5	9,1
prolina	3,7	2,0
walina	4,1	7,6
leucyna-izoleucyna	10,3	12,6
metionina	0,3	—
cysteina-cystyna	0,3	0,1
azot amidowy	5,5	11,5
Razem	96,7	103,2

W kolumnie I „woda“ podano skład histonów otrzymanych z nukleohistonów wytrąconych przez rozcieńczoną wodę, a w kolumnie II skład histonów, otrzymanych z nukleohistonów, wytrąconych chlorkiem wapnia.

zowało się niską zawartością argininy (6,7%) oraz zupełnym brakiem cystyny i metioniny i co ciekawe histydyny. Pozostałe białka również różniły się składem aminokwasowym. W obu brak było cystyny, metioni-

W roztworze pozostaje histon bogaty w lizynę. Z drugiej strony 0,5 M NaCl z dodatkiem 0,05 M kwasu cytrynowego ekstrahuje z jąder wyłącznie frakcję histonu bogatego w lizynę. Oba histony różnią się wyraźnie składem. Histon bogaty w argininę zawiera jej 28% oraz 13% lizyny. Histon nie wytrącający się w pH = 10,6 zawiera 38% lizyny i tylko 7% argininy, mniej metioniny od poprzedniego, cystyny i histydyny nie zawiera zupełnie. Ostatni histon, tj. bogaty w lizynę oddysocjowuje łatwiej od kwasu dezoksyrybonukleinowego. O istnieniu histonów bogatych w lizynę doniesiono również z innych pracowni. D a v i s o n i wsp. (12a) uzyskali przez frakcjonowanie acetonem i amoniakiem histon elektroforetycznie jednorodny, o dużej zawartości lizyny. C r a m p t o n i współ. (7a) rozdzielali histony na kolumnie z wymienniczy jonowych i wykazali istnienie kilku różnych histonów. Trzy z nich oczyszczono, sprawdzono elektroforetycznie jednorodność i oznaczono skład aminokwasowy. Jedno z tych białek (A) było niezwykle bogate w lizynę (38%) i alaninę (18%), charaktery-

na zaś występowała jedynie w niewielkich ilościach. Białko B zawierało 17% lizyny i 19,5% argininy, a białko C 24,8% lizyny i 12,3% argininy.

Od czasu kiedy w r. 1942 Meyer i Gulich (31) jako pierwsi wyizolowali z jąder komórkowych grasicy frakcję białka niezasadowego, mamy coraz więcej danych o naturze tych białek. Stedman i Stedman (41) w r. 1943 znaleźli w jądrach rozmaitych tkanek różnych rodzajów zwierząt, zmienne ilości białka niezasadowego, nazwanego przez nich chromozominą. Z suchych odlipidowanych jąder ekstrahowano kwasami histony lub protaminy. Z pozostałości po usunięciu kwasu nukleinowego uzyskano białko niezasadowe, zawierające tryptofan i stosunkowo dużo kwasu glutaminowego.

Mirsky i Pollister (35) po usunięciu rybonukleoproteidów 0,14 M chlorkiem sodu, wyciągali 1 M chlorkiem sodu z homogenatów tkankowych kompleks nazwany przez nich chromozyną. W skład chromozyny wchodziły: kwas dezoksyrybonukleinowy, histon i białko niehistonowe. To ostatnie nazwane przez autorów „pozostającym” (residual) otrzymano po wyciągnięciu histonów kwasem solnym z chromozyny, lub z mieszaniny białek wydzielonych z tego kompleksu chloroformem. Było to białko nierozpuszczalne w kwasach, podobne, choć nie identyczne z chromozominą Stedmana i Stedmana. Autorzy otrzymali chromozynę z materiału przeróżnego pochodzenia: z wielu tkanek zwierzęcych, ze spermy ryb, zarodków pszenicy, a nawet z pneumokoków, nie udało im się jednak uzyskać jej ze spermy ssaków. W następnej pracy (34) Mirsky i Ris badali białka zawarte w izolowanych chromozomach wielu tkanek. Po usunięciu z nich kwasem siarkowym histonów obraz mikroskopowy nie ulegał zmianie. Natomiast po usunięciu KDN lub białka „pozostającego” struktura chromozomów uległa zniszczeniu. Białko „pozostające” otrzymywano również z pozostałości po wyekstrahowaniu z chromozomów KDN i histonów za pomocą 1 M NaCl. Autorzy stwierdzają, że białko „pozostające” jest w jądrach związane z kwasem nukleinowym, bowiem po usunięciu histonów 1 M NaCl w pH 2,9, KDN nie przechodzi do roztworu ani w pH 4 ani w pH 7, mimo, że w tym zakresie pH jest rozpuszczalny.

Niezasadowymi białkami zajmowali się również Zbarski i wsp. Autorzy po opracowaniu metody wyodrębnienia jąder komórkowych (52, 53) rozdzielali białka jąder na trzy frakcje (54, 55). Jądra ekstrahowano najpierw 1 M NaCl, a z pozostałości słabym roztworem ługu wyciągano kwaśne białko wytrącające się po doprowadzeniu pH do 5 — 5,3. Białko to zawierało około 2,5% tryptofanu i było analogiczne do chromozomy Stedmana i Stedmana, ale w przeciwieństwie do tej ostatniej łatwo rozpuszczało się w zasadach. Procentowa zawartość jego

zależała od typu tkanki. Tak np. w wątrobie człowieka wynosiła aż 40—50% wszystkich białek. Trzecie białko pozostające po ekstrakcji zasadami nie rozpuszczało się w żadnym z badanych rozpuszczalników. Pod działaniem zasad ulegało tylko pęcznieniu. Białko to, nazwane przez autorów „pozostającym” różniło się składem aminokwasowym tak od histonów jak i od białek kwaśnych. Nie zawierało np. zupełnie tryptofanu. Autorzy sądzą, że w jądrach istnieje kompleks wszystkich tych trzech typów białek z kwasami nukleinowymi.

Engbring i Laskowski (14) trawili jądra erytrocytów ptasich dezoksyrybonukleazą, a po trawieniu wyekstrahowali oni prócz frakcji histonowej, która okazała się niejednorodną, inne białko rozpuszczalne w ługu. Te wyniki potwierdzałyby sugestie Stedmana i Stedmana i Mirski'ego, że w jądrach komórkowych białka niehistonowe są również połączone z KDN. Na poparcie tej tezy można podać, że Bernstein i Mazia (1), badając komponentę białkową nukleoproteidów dezoksyrybozowych spermy jeźowca znaleźli tam w oczyszczonym już nukleoproteidzie 25% białka niehistonowego.

Thomas i Meyer (45) badali białka plemników knura i barana. Dezoksyrybonukleoproteid nie ulega z tego materiału wyciąganiu roztworami chlorku sodu lub wodą, co potwierdza dane Mirsky'ego i Pollister'a (37). Ekstrakcja 1 M NaOH usuwa z plemników wieprza dwie frakcje białkowe, strącające się w pH 6 i 4,5. Prócz tego w pozostałości znajduje się jeszcze jedno białko oraz większość kwasu nukleinowego. Autorzy stwierdzają, że plemniki zawierają a) protaminy lub histony b) białka ekstrahujące się alkaliami i wytrącające się w środowisku kwaśnym, (frakcja ta odpowiadałaby białkom Meyer'a i Gulicha, oraz białkom wyciąganym przez autorów ługiem), c) nierozpuszczalną pozostałość zawierającą kwas nukleinowy i białko odpowiadające białkom Mirsky'ego, Pollister'a i Stedmanów.

Ta sama pracownia badając jądra wątroby oraz „chromozomy” izolowane metodą Mirsky'ego i Risa (34) znalazła po wyciągnięciu nukleohistonów 1 M NaCl frakcję białkową ekstrahującą się zasadami, analogiczną do frakcji otrzymywanej z plemników (50).

Dalam i Thomas (8) donieśli o izolowaniu z główek plemników ssaków za pomocą 0,14 M NaCl w pH 9 lipoproteidu, w skład którego wchodzi białko niezasadowe. Później Wang i wsp. (49) otrzymali również lipoproteidy z jąder wątroby i innych tkanek oraz z erytrocytów ptasich. Lipoproteid z wątroby był wyciągany 1 N NaOH z jąder komórkowych po usunięciu 1 M chlorkiem sodu nukleohistonu. Był on nierozpuszczalny w pH około 6. Lipidy, w skład których wchodziły również fosfolipidy i cholesterol, można było usunąć gorącym alkoholem, ale nie eterem. Autorzy uważają, że lipoproteid ten jest zasadniczo tą

samą substancją, co chromozomina Stedman i Stedman (41) i białka „pozostające” Mirsky'ego i Risa (34).

Khouvine badała szczegółowo białka dezoksyrybonukleoproteidów atypowego nabłonka szczura, otrzymanych metodą Mirsky'ego i Pollistera (35) przez ekstrakcję roztworem NaCl (23, 25). Histony wykazywały elektroforetycznie obecność dwu składników. Po oddzieleniu histonów, które stanowiły do 80% wszystkich białek pozostawał kompleks dezoksyrybonukleoproteidowy, w którym szukano chromozominy Stedmanów. Autorzy otrzymali dwie frakcje białek niehistonowych, zawierających tryptofan. Jedno z nich, być może odpowiednik chromozominy, stanowiło 8% całego białka. Nie analizowano obu frakcji białkowych z osobna, ale całość białek otrzymanych po usunięciu histonów — czyli tzw. białka „żelu Sevaga” tj. białka wytrącone z roztworu przez wstrząsanie z chloroformem. W przeciwieństwie do histonów zawierają tryptofan i zachowują ten sam skład niezależnie od procedury izolowania nukleoproteidu (tabl. 4).

Autorzy sądzą, że istnieje cała grupa białek niehistonowych i dlatego zależnie od procedury, otrzymuje się białko bardziej podobne do chromozominy, lub do białka „pozostającego”.

Dezoksyrybonukleoproteidy z grascicy według ostatnich badań Butler'a (6) i Khouvine (19) nie zawierają praktycznie biorąc białek nie ekstrahujących się kwasami mineralnymi.

Mimo niewątpliwych osiągnięć nie wiemy do dziś nic pewnego o naturze tych niezasadowych białek, jak również nie mamy pewności, czy są one związane w jądrze komórkowym z kwasem dezoksyrybonukleinowym.

Przechodząc do omówienia komponenty białkowej cytoplazmatycznych rybonukleoproteidów trzeba

Tablica 4

Skład aminokwasowy białek niezasadowych z atypowego nabłonka szczura (Khouvine i wsp. (25))
(Zawartości podane w % azotu aminokwasowego w stosunku do azotu białkowego)

Aminokwas	A	B
Arginina	22,2	22,8
Lizyna	10,0	10,1
Histydyna	3,6	3,1
Kw. glutaminowy	5,2	5,4
Kw. asparaginowy	8,7	8,8
Fenylalanina	6,4	6,5
Tyrozyna	1,8	2,0
Glikokol	9,2	8,6
Seryna	2,5	2,0
Treonina	6,2	6,7
Alanina	4,3	4,3
Prolina	1,8	0,9
Walina	7,7	6,9
Leucyna-izoleucyna	6,3	5,8
Metionina	--	--
Cystyna-cysteina	0,7	0,5
Tryptofan	0,5	0,3
Azotamidowy	0,9	0,9
	98,0	95,6

A — skład aminokwasowy białek otrzymanych z dezoksyrybonukleoproteidów strąconych przez rozcieńczenie wodą.

B — skład aminokwasowy białek otrzymanych z dezoksyrybonukleoproteidów strąconych CaCl₂.

zaznaczyć, że była ona dotąd niewiele badana i nasze wiadomości o jej naturze są bardzo skąpe. Jeszcze w r. 1945 Grenstein (18) pisał, że poza białkami nukleoproteidów wirusowych badano tylko białka nukleoproteidów wątroby. O białkach rybonukleoproteidów roślinnych do dziś zresztą prawie nic nie wiemy.

Jedynie Biełozierskij (1a) wykazał, że w komórkach roślinnych i bakteryjnych w skład nukleoproteidów wchodzi białka o punkcie izoelektrycznym leżącym po stronie kwaśnej.

Z prac lat ostatnich nad białkami RNP omówimy z powodu ograniczonych ram referatu tylko badania Khouvine i wsp. nad białkami rybonukleoproteidów drożdży i atypowego nabłonka szczura (24, 40). Białka te są również niejednorodne. Nie są one histonami, nie dają się ekstrahować kwasem solnym i należą do globulin, choć wykazują w stosunku do nich pewne różnice. Z drożdży przez wyciąganie NaHCO_3 i frakcjonowanie strącanie uzyskano trzy rybonukleoproteidy, różniące się punktem izoelektrycznym (26). Po usunięciu z nich kwasów nukleinowych otrzymano trzy białka, zawierające wszystkie zasadnicze aminokwasy. Stosunki ilościowe poszczególnych aminokwasów były jednak w tych białkach różne. Wskutek tego jedno z nich jest kwaśne, drugie obojętne, a trzecie słabo zasadowe. Podajemy przykładowo różnicę o zawartości kilku aminokwasów w powyższych białkach:

	12,3	5,9	19,3
arginina	8,1	6,4	11,0
lizyna	9,7	8,8	8,5
histydyna	Białko A	Białko B	Białko C

Autorzy sądzą, że wyizolowali spośród wielu prawdopodobnie obecnych w komórce powyższe trzy rybonukleoproteidy.

Nukleoproteidy rybozowe otrzymane z ekstraktów 0,14 M NaCl z atypowego nabłonka szczura również dawały się frakcjonować (24, 25). Białka tych nukleoproteidów rozdzielono na trzy frakcje, zależnie od rozpuszczalności w HCl i NaOH. Nie są one histonami, a punkt izoelektryczny jednego z nich leży np. w pH 5,2. Wszystkie różnią się między sobą zawartością aminokwasów (tabl. V).

Powyższy krótki zarys badań nad komponentą białkową nukleoproteidów wskazuje na to, że mimo długoletnich prac, stosunkowo słabo znamy rzeczywisty obraz nukleoproteidów w komórce.

W latach ostatnich Chargaffi i wsp., Brown i Watson, Lucy i Butler udowodnili, przy użyciu różnych metod badawczych, heterogenność kwasów nukleinowych. Wyniki tych badań zostaną szczegółowo omówione w referacie o budowie nukleoproteidów. Tu wspomnimy

tylko o niedawno ogłoszonych próbach frakcjonowania całych dezoksyrybonukleoproteidów, a nie tylko ich składników. Lucy i Butler (29) donieśli o uzyskaniu szeregu frakcji nukleoproteidów z nukleohistonu zdenaturowanego chloroformem. W kolejnych wyciągach 0,6 M chlorkiem sodu z takiego żelu chloroformowego zmienia się nie tylko stosunek zasad azotowych w kwasach nukleinowych, ale również stosunek białka do kwasu nukleinowego. Nukleoproteidy otrzymane z pierwszych wyciągów charakteryzują się niższą procentową zawartością kwasu nukleinowego. Ostatnio w r. 1955 ci sami badacze donieśli (30), że w kolejnych wyciągach 0,6 M NaCl w skład DNP wchodzi coraz to inne białka. Badano stosunek zasadowych aminokwasów argininy i lizyny i stwierdzono, że ulega on znacznej zmianie. W białkach otrzymanych z kolejnych frakcji następował spadek zawartości lizyny, a wzrost argininy. Pokrywa się to z wynikami pracy Daley'ego i Mirsky'ego (10) nad frakcjonowaniem histonów.

Wszystkie omówione przykłady zdają się świadczyć coraz bardziej o tym, że cząsteczki nukleoproteidów są niezmiernie złożone i stanowią prawdziwy kompleks nie tylko wielu kwasów nukleinowych, ale wielu białek o podobnym, ale nie identycznym charakterze.

Tablica 5

Skład aminokwasowy komponenty białkowej RNP z tkanki rakowej nabłonka szczura (Khouvine i wsp. (25))
(Wartości podane w % azotu aminokwasowego w stosunku do azotu białkowego)

Aminokwas	Białko A	Białko B
Arginina	11,0	11,3
Lizyna	17,1	9,6
Histydyna	7,5	10,6
Kw. glutaminowy	8,1	4,4
Kw. asparaginowy	7,2	7,3
Fenylalanina	2,4	3,5
Tyrozyna	2,0	1,3
Glikokol	3,6	6,2
Seryna	3,3	3,9
Tronina	2,5	4,6
Alanina	6,7	6,0
Prolina	4,7	0,2
Walina	5,0	5,8
Leucyna-izoleucyna	9,6	12,1
Metionina	0,7	0,6
Cystyna-cysteina	0,5	0,3
Tryptofan	0,6	0,5
Azot amidowy	2,4	6,2
	94,7	94,4

LITERATURA

1. M. H. Bernstein, D. Mazia, *Bioch. Bioph. Acta* **10**, 600 (1953).
- 1a. A. H. Biełozłerskij, *Więstnik moskowsk. uniwersit.*, **2**, 125 (1949), cyt. wg (55).
2. R. J. Block, D. Bolling, H. Gershon i H. A. Sober, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **70**, 494 (1949).
3. R. Brunish, D. Fairley i J. M. Luck, *Nature*, **168**, 82 (1951).

4. J. A. V. Butler, P. F. Davison i D. W. F. James, *Biochem. J.*, **54**, XXI (1953).
5. J. A. V. Butler, P. Davison i K. V. Shooter, *Biochem. J.*, **57**, XXIV (1953).
6. J. A. V. Butler, P. F. Davison, D. W. F. James, K. V. Shooter, *Bioch. Bioph. Acta*, **13**, 224 (1954).
7. M. C. Corfield i A. Robson, *Biochem. J.*, **55**, 517 (1953).
- 7a. Ch. F. Crampton, S. Moore i W. H. Stein, *J. Biol. Chem.*, **215**, 787 (1955).
8. R. D. Dallam, i L. S. Thomas, *Nature*, **170**, 377 (1952).
9. M. M. Daly, A. E. Mirsky i H. Ris, *J. Gen. Physiol.*, **34**, 439 (1951).
10. M. M. Daly i A. E. Mirsky, *J. Gen. Physiol.*, **38**, 405 (1955).
11. P. F. Davison, i R. W. Lawrie, *Biochem. J.*, **43**, XXIV (1948).
12. P. F. Davison, B. E. Conway i J. A. V. Butler, *Progr. Bioch. Bioph. Chem.*, **4**, 148 (1954).
- 12a. P. F. Davison i J. A. V. Butler, *Bioch. Bioph. Acta*, **15**, 439 (1954). cyt. wg *Adv. of Enzymol.*, **16**, 445 (1955).
13. C. V. Duijn, *J. Roy. Micr. Soc.*, **74**, 69 (1954).
14. V. K. Engbring i M. Laskowski, *Bioch. Bioph. Acta*, **11**, 344 (1953).
15. K. Felix, H. Fischer, A. Krekels i H. M. Rauen, *Hoppe Seyler's Z.*, **286**, 67 (1950).
16. K. Felix, H. Fischer, J. Hartlieb, A. Krekels, H. M. Rauen i W. Stamm, *II Congr. Inter. Bioch.*, Paris, 199, (1952).
17. H. Fischer i L. Kreuzer, *Hoppe Seyler's Z.*, **293**, 176 (1953).
18. J. P. Greenstein, *Adv. Prot. Chem.*, **1**, 209 (1944).
19. J. Gregoire i M. Limozin, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **36**, 15 (1954).
20. D. Hamer, *Nature* **167**, 40 (1951).
21. D. Hamer i D. L. Woodhouse, *Nature* **163**, 689 (1949).
22. H. A. Harper i M. D. Morris, *Arch. Biochem.*, **42**, 61 (1953).
23. Y. Khouvine, J. Gregoire i J. P. Zalta, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **35**, 244 (1953).
24. Y. Khouvine i M. L. Hirsch, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **34**, 305 (1952).
25. Y. Khouvine, F. Baron, J. Gregoire, M. L. Hirsch, B. Lubochinsky, M. Montreuil i J. P. Zalta, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **36**, 31 (1954).
26. Y. Khouvine i H. Robichon-Szulmajster, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 1508 (1951).
27. A. Kossel, *Zeit. Physiol. Chem.*, **8**, 511 (1884).
28. A. Kossel, *The Protamines and Histones 1928* London Longmans.
29. J. A. Lucy i J. A. V. Butler, *Nature* **174**, 32 (1954).
30. J. A. Lucy i J. A. V. Butler, *Bioch. Bioph. Acta*, **16**, 431 (1955).
31. D. T. Mayer i A. Gulick, *J. Biol. Chem.*, **146**, 433 (1942).
32. F. Miescher, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, **7**, 376 (1874).
33. G. L. Mills, *Biochem. J.*, **50**, 707 (1952).
34. A. E. Mirsky i H. Ris, *J. Gen. Physiol.*, **34**, 1 (1947).
35. A. E. Mirsky i A. W. Pollister, *J. Gen. Physiol.*, **30**, 117 (1946).
36. R. Monier i M. Jutisz, *Bioch. Bioph. Acta*, **14**, 551 (1954).
37. A. W. Pollister i A. E. Mirsky, *J. Gen. Physiol.*, **30**, 101 (1946).
38. H. M. Rauen, W. Stamm i K. Felix, *Hoppe Seyler's Z.*, **291**, 275 (1952).
39. H. M. Rauen, *II Cong. Intern. Bioch.*, 190, (1952).
- 39a. H. M. Rauen, W. Stamm i K. Felix, *Hoppe Seyler's Z.*, **292**, 101 (1953).
40. H. Robichon-Szulmajster i Y. Khouvine, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **35**, 945 (1953).

41. E. Stedman i E. Stedman, *Nature*, **152**, 267 (1943).
42. E. Stedman i E. Stedman, *Phil. Trans. Roy. Soc., B*, **235**, 565 (1951).
43. E. Stedman i E. Stedman, *Nature*, **166**, 780 (1950).
44. E. Stedman i E. Stedman, *Gold Spring Harbor Symp.*, **12**, 224 (1947).
45. L. E. Thomas i D. T. Mayer, *Science*, **110**, 393 (1949).
46. G. R. Tristram, *Nature* **160**, 637 (1947).
47. E. Waldschmidt-Leitz i R. Voh, *Hoppe Seyler's Z.*, **298**, 257 (1954).
48. Waldschmidt-Leitz, K. Kühne i F. Zimert, *Experientia*, **7**, 183 (1951).
49. T. Y. Wang, D. T. Mayer i L. E. Thomas, *Expt. Cell Res.*, **4**, 102 (1953).
50. T. Y. Wang, W. R. Kirkham, R. D. Daliham, D. T. Mayer, L. E. Thomas, *Nature*, **165**, 974 (1950).
51. R. K. Zahn i W. Stamm, *Naturwissen.*, **41**, 95 (1954).
52. J. B. Zbarskij i K. A. Pieriewoszcznikowa, *Dokł. Akad. Nauk.* **60**, 77 (1948).
53. J. B. Zbarskij i K. A. Pieriewoszcznikowa, *Biochimia*, **16**, 112 (1951).
54. J. B. Zbarskij i S. S. Diebow, *Dokł. Akad. Nauk.*, **62**, 795 (1948).
55. J. B. Zbarskij i S. S. Diebow, *Biochimia*, **16**, 390 (1951).

ALEKSANDRA PRZEŁĘCKA

Cytochemiczne metody oznaczania kwasów nukleinowych

Możliwości oznaczania nie tylko jakościowego ale i ilościowego rozmaitych związków występujących w komórce zależą przede wszystkim od metod, jakimi w danej chwili badacz rozporządza. Podobnie też, jak w innych dziedzinach wiedzy, równoległe z wprowadzaniem nowych sposobów badania pojawiają się szeregi nowych prac poświęconych uzasadnieniu teoretycznemu i analizie krytycznej metodyki tych dociekań.

W pracy swej cytolog — czy ściślej cytochemik musi się liczyć ze szczególnie trudnymi, zupełnie specyficznymi warunkami badań. W wypadku kwasów nukleinowych ma się do czynienia z ilościami rzędu 10^{-5} μ g gdy chodzi o KDN jąder, a nieraz jeszcze mniejszymi, gdy chodzi o KRN występujący w jąderku, czy ziarnistościach cytoplazmy — stąd wymagana jest bardzo wysoka czułość przeprowadzanej reakcji. Odczynnik stosowany powinien być specyficzny, o ściśle znanym przebiegu działania. Warunek ten jest tym ważniejszy, że w badaniach cytochemicznych nie można doprowadzić do wyizolowania substancji badanej, lecz stwierdza się jej występowanie in situ, często w połączeniu, a zawsze w obecności innych, nieraz bardzo skomplikowanych związków. Przy badaniach wizualnych — w mikroskopie świetlnym — otrzymywane produkty reakcji muszą być barwne, nie mogą też one mieć zdolności łatwego dyfundowania poprzez tkanekę, ponieważ wtedy nie można byłoby właściwie niczego powiedzieć o zlokalizowaniu danej substancji. Dochodzi jeszcze — w olbrzymiej większości wypadków — konieczność badań na materiale utrwalonym — a więc właściwy wybór danego utwalczacza i techniki przygotowywania preparatu cytologicznego.

Poza tym jeszcze jeden bardzo istotny warunek — przebieg reakcji musi być łagodny, nie można stosować zbyt silnych środków, które zniszczyłyby, względnie nawet tylko naruszyły badaną strukturę. Stąd szereg metod stosowanych w biochemii całkowicie odpada — jak np. test na KRN z orcyną, ponieważ wymagane w nim traktowanie HCl stężonym w temperaturze 100°C niszczy całkowicie komórkę.

Wśród metod, którymi posługujemy się przy badaniach nad KN nie wszystkie spełniają wyżej wymienione warunki. Zwłaszcza sprawa specyficzności przebiegu reakcji jest często niejasna. Szereg wprowadzonych na drodze czysto empirycznej barwień, charakterystycznych dla jąder komórkowych i ziarnistości cytoplazmatycznych dopiero w ostatnich latach znajduje częściowe uzasadnienie teoretyczne. Tak wygląda sprawa stosowanych od przeszło pół wieku reakcji opartych na bazofilności wymienionych struktur. Obok jednak tych testów, mało specyficznych — stosowanych już dziś tylko dla ogólnego zorientowania się w materiale — rozporządzamy testami bardziej specyficznymi, o szerokiej podbudowie teoretycznej i opartymi na nowych zdobyczach metodyki biochemicznej.

Ogólnie można wśród metod oznaczania cytochemicznego kwasów nukleinowych wyróżnić dwa działy: 1. badania w mikroskopie świetlnym i 2. badania spektrofotometryczne. Badania w mikroskopie świetlnym opierają się na charakterystycznych reakcjach barwnych często stosowanych w połączeniu ze specyficzną hydrolizą KRN czy KDN bądź enzymatyczną, bądź działaniem kwasów nieorganicznych. Wyniki uzyskane tą drogą mają charakter jakościowy. Badania histofotometryczne dostarczają już danych ilościowych. Przeprowadza się je w świetle widzialnym badając krzywą ekstynkcji po odpowiednich reakcjach barwnych, — lub w ultrafiolecie, gdzie wykorzystuje się właściwość pochłaniania przez KN światła o długości fal 2600 Å.

Przy wykrywaniu KN w komórce oznacza się je zawsze poprzez reakcje charakterystyczne dla poszczególnych ich komponentów. Można więc wszystkie stosowane tu metody podzielić na trzy grupy — zależnie od tego czy wykrywają one KN poprzez kwas fosforowy, rybozę lub dezoksyrybozę czy zasady purynowe i pirymidynowe. Do grupy I należą metody polegające na stosowaniu barwników zasadowych. Jest rzeczą znaną, że barwniki te — choćby znacznie różniące się między sobą budową chemiczną — ale, których jedyną cechą wspólną jest posiadanie rodnika zasadowego — wykazują duże powinowactwo do nukleoproteidów komórki. Do najpopularniejszych spośród barwników tych należą zieleń metylowa, błękit metylenowy, tionina, błękit toluidynowy (41), Azur B (18), pyronina (35) i galloctjanina (13, 40). Stosowanie rozтворów ich w buforze o pH 5—6 zmniejsza błąd spowodowany chwytnością ich przez inne, nawet nie bazofilne substancje. Można według terminu P a n i j e l'a nazwać reakcje te sygnalizacyjnymi. Nie zawsze są one ściśle specyficzne, ale pozwalają na pewne zorientowanie się w materiale a poparte dodatkowymi badaniami, jak trawienie enzymatyczne, czy hydroliza kwasami nieorganicznymi oddają duże usługi. Stosowany

dzis powszechnie test Brachet'a wyrósł z takiej właśnie reakcji sygnalizacyjnej.

Brachet wprowadził do cytochemii metodę wybiórczego trawienia enzymatycznego KRN. Stwierdził on, że po zastosowaniu inkubacji preparatu w wyciągu zawierającym rybonukleazę — przy barwieniu mieszaniną zieleni metylowej i pyroniny — występujące w komórce granulacje pyroninofilne tracą zdolność barwienia się. Z doświadczeń tych wyciągnął wniosek, że wspomniane ziarnistości są siedliskiem KRN (4).

Słuszność wyników uzyskanych tą metodą zależy przede wszystkim od czystości użytego preparatu enzymatycznego. Danielli zapatruje się na nią bardzo sceptycznie, twierdząc, że praktycznie biorąc nigdy nie da się ustalić stopnia czystości — nawet w preparatach enzymu krystalicznego.

Poza tym według jego teorii ziarnistości zasadochłonne występujące w cytoplaźmie otoczone są monomolekularną błonką proteinową, co znów utrudnia dostęp enzymu do substratu. Danielli wysuwa paradoks, że kto wie, czy nie czystość enzymu a właśnie zanieczyszczenia enzymami proteolitycznymi powodują dobre wyniki otrzymywane przy trawieniu rybonukleazą (11). Tego rodzaju przypuszczeniom zaprzecza Panijel stwierdzając eksperymentalnie, że działanie roztworów pepsyny, trypsyny i chemotrypsyny w stężeniach równych stężeniom ewentualnych zanieczyszczeń rybonukleazy nie atakuje ziarnistości pyroninofilnych (32).

Według wskazówek Brachet'a RN-aza występuje w ślinie ssaków. Karnkowska-Górska stosowała trawienie śliną ludzką przy badaniach nad KN gruczołów przednych jedwabnika (21). W pracach naszych próbowaliśmy trawienia śliną otrzymaną z przetoki psa przygotowanego operacyjnie do badań nad odruchami warunkowymi metodą Pawłowa. Ma to tę zaletę, że ślina pobrana w ten sposób jest całkowicie jałowa i wolna od zanieczyszczeń występujących w jamie gębowej. Enzymy proteolityczne inaktywowano przez działanie wysokiej temperatury (90°C — 15 min.). Wyniki uzyskane były zadowalające. Poza tym stosowano też trawienie wyciągiem RN-azy otrzymanym z trzustki szczura.

Trawienie rybonukleazą zastosowało szereg autorów jako test do sprawdzenia innych barwników zasadowych. Stosowana od kilkudziesięciu lat mieszanina Unny-Pappenheima (zielen metylowa + pyronina) dzięki połączeniu z testem Brachet'a pozwala identyfikować KRN. W ostatnich latach została ona także dokładnie przebadana od strony jej przydatności do wykazywania DNA oraz do badań ilościowych. Kurnick i szereg innych autorów stwierdziło na podstawie badań cytochemicznych i mikrofotometrycznych — na obszernym materiale

cytologicznym — oraz na podstawie reakcji przeprowadzanych *in vitro*, że specyficzność barwienia zielenią metylową i pyroniną zależy od stopnia polimeryzacji substratu, przy czym zieleń metylowa łączy się w określonym stosunku stechiometrycznym z kwasem wysoko spolimeryzowanym, a więc z KDN (1, 24, 25, 27).

Tezę tę zaatakował Taft (43). Kurnick zbija jednak jego dowody, wykazując, że warunki przeprowadzonych przez niego doświadczeń nie powodowały nieodwracalnej depolimeryzacji KDN, stąd też nie zmieniło się jego powinowactwo do zieleni metylowej (26).

Według Vercauteren — o tym powinowactwie zieleni metylowej do KDN decyduje przede wszystkim budowa przestrzenna cząsteczek biorących udział w reakcji. Odległość między ładunkami ujemnymi grup fosforanowych makromolekuły KDN równa się dokładnie odległości między ładunkami dodatnimi występującymi na cząsteczce barwnika — co umożliwia tworzenie się trwałych połączeń (45).

Opracowanie techniki tej metody barwienia podał Chayen (8), stosowanie jej też w jego modyfikacji w pracach naszych dawało najlepsze wyniki. Stosowana jest ona nie tylko przy badaniach na skrawkach — ale także przy technice rozmazów oraz frakcjonowanego ultrawiwowania homogenizatów tkankowych (22). Posługują się nią autorzy przy badaniach jakościowych, a także ilościowych — histospektrofotometrycznych.

Obok stosowanego w teście Brachet'a trawienia rybonukleazą szereg autorów wprowadziło ekstrakowanie KRN alkaliami (42) lub kwasem trójchlorooctowym, nadchlorowym, czy innymi jeszcze kwasami nieorganicznymi (16, 17, 39). Powodują one poprzez rozbitcie połączenia glikozydowego rozpad KRN na małe, łatwo dyfundujące z tkanki cząstki. Słuszność tych metod jest często poważnie kwestionowana. Atkinson stwierdził, że ekstrahują one z tkanki obok KRN także mukopolisacharydy, może to więc spowodować fałszywą interpretację wyników(2).

Pearse zestawiał wyniki uzyskane przez różnych autorów z ekstrakcją kwasem nadchlorowym. Z zestawienia tego widać wyraźnie, że pewne usługi metoda ta może oddać, jednak nie jest tak specyficzna, jak trawienie enzymatyczne (33).

Wzorując się na teście Brachet'a wprowadzono do identyfikowania KDN w komórkach trawienie DN-azą. Metoda ta jest jednak mniej rozpowszechniona — po pierwsze ze względu na większe trudności w otrzymaniu czystego preparatu enzymatycznego — a po drugie po prostu ze względu na mniejszą potrzebę opracowania takiego testu. Do selektywnego oznaczania KDN mamy wprowadzoną przed dokładnie

30 laty reakcję cytochemiczną Feulgena i Rossenbecka. Należy ona do grupy II reakcji — wykrywających KN poprzez cukier.

Reakcja Feulgena polega na odszczepianiu puryn drogą łagodnej hydrolizy 1n HCl, następnie przejściu znacznej ilości dezoksyrybozy z formy furanozowej w aldehydową i na reagowaniu uwolnionych w ten sposób grup aldehydowych z odczynnikiem Schiffa. W wyniku otrzymuje się wybiórcze zabarwienie chromatyny jądra. Szczególnie ważnym etapem jest tu przeprowadzenie hydrolizy. Lison podaje uzupełnioną własnymi badaniami tablicę Bauera wskazującą optymalne czasy hydrolizy po różnych utrwalaczach (3, 29).

Zastosowanie właściwego czasu hydrolizy zapewnia uwolnienie grup aldehydowych — bez strat spowodowanych ekstrakcją KDN, która zachodzi przy zbyt długim hydrolizowaniu. Według Sibatani i Fukuda straty te są o wiele większe dla tkanek nieutrwalonych — homogenizatów, niż dla tkanek utrwalonych, w których przy zbyt długiej hydrolizie nie przekraczają one 10% (36). Haskim poleca przeprowadzanie hydrolizy kwasem fosforowym (30—85% — 1 godz. temp. 28°). Według niego dzięki mniejszej zawartości wody w płynie hydrolizującym zmniejsza się ujemne efekty dyfuzji (20).

Oczywiście niezmiernie ważne jest właściwe przygotowanie samego odczynnika (30).

Słuszność lokalizowania KDN metodą Feulgen'a — Rossenbecka zaatakowali poważnie przed kilkoma laty E. i E. Stedman. Opierając się na badaniach przeprowadzonych na preparatach KN stwierdzili oni, że powstający w czasie reakcji produkt — połączenie zhydrolizowanego KDN z odczynnikiem Shiffa jest całkowicie rozpuszczalny w wodzie — wobec tego otrzymane zabarwienie chromozomów spowodowane jest jedynie zjawiskiem zaadsorbowania barwnika przez białko — a nie istotnym występowaniem na nich KDN (38). Jednak nie można tak bez zastrzeżeń przenosić wyników uzyskanych in vitro na teren reakcji odbywających się w komórce. KDN komórki występuje w powiązaniu z białkami, jest całkowicie nierozpuszczalny i właściwości tej — jak wykazał Brachet — nie zmienia po krótkotrwałej hydrolizie (5).

Podobnie przedstawia się sprawa związku między intensywnością zabarwienia uzyskanego w reakcji a stosunkiem ilości białek do KDN. Stwierdzono, że in vitro intensywność ta zmienia się zależnie od ilości obecnych w próbce histonów — na reakcjach przeprowadzanych in situ żadnego takiego wpływu nie zaobserwowano (37).

Zarzuty, że reakcja przebiega na skutek obecności innych — nie powstałych po hydrolizie KDN grup aldehydowych — łatwo odeprzeć stosując barwienie kontrolne na materiale nieshydrolizowanym, oraz

hydrolizowanym — ale poddanym uprzednio działaniu specyficznych czynników blokujących grupy COH.

Rewelacyjne wyniki podali w 1953 roku Chayen i Norris. Zakwestionowali oni całkowicie przydatność cytochemiczną reakcji Feulgen'a dla badanego przez nich materiału bogatego w bazofilne ziarnistości cytoplazmatyczne — merystemów korzonków *Vicia Faba*. Zdaniem ich już parominutowa hydroliza 1n HCl wystarczą, żeby strukturę tych granulacji zniszczyć i spowodować przesunięcie uwolnionych KN do jąder komórkowych. Według nich wykrywany w jądrze KDN jest właśnie cytoplazmatycznego pochodzenia (9).

Narazie praca ta nie wywołała w literaturze dyskusji i zgodnie z dotychczasowymi danymi reakcja Feulgen'a uznawana jest nadal przez ogół badaczy za właściwą i wysoce specyficzną przy wykrywaniu KDN.

De Lamater i współpracownicy opracowali na komórkach wegetatywnych glonów *Chlamydomonas* metodę specyficznego jednoczesnego barwienia jąder i błon komórkowych. KDN jąder wykrywają oni przy pomocy wytworzonego w czasie przebiegu reakcji — *in situ* — zmodyfikowanego odczynnika Schiffa — w którym na miejscu fuksyny występuje Azur A (28).

Danielli sugeruje możliwość wykorzystania reakcji aldehydowej z odczynnikiem Schiffa także dla wykrywania KRN. W przeprowadzonych przez niego badaniach wstępnych uzyskał on po odpowiednim zastosowaniu hydrolizy, blokowaniu grup aldehydowych i następnie utlenianiu grup glikolowych pentozy charakterystyczne dla aldehydów zabarwienie w miejscach, w których, jak mówi, w komórce zwykle występuje KRN (12).

Do równoczesnego selektywnego wykrywania KDN i KRN Turchini wprowadził reakcję z fluoronami (9-fenylo-2,3,7, trójhydroksy 6 fluoron, 9-metylo 2,3,8 trójhydroksy 6 fluoron). W środowisku kwaśnym zachodzi poprzez grupy hydroksylowe odczynnika kondensacja jego z cukrami. Następnie po umieszczeniu preparatu w środowisku alkalicznym otrzymuje się nierozpuszczalny produkt reakcji o wyraźnym kontrastowym zabarwieniu zależnie od rodzaju cukru (dla fenylo-fluoronu: KDN — niebieski, KRN — różowy, dla metylo-fluoronu KDN — fioletowy, KRN — różowo-pomarańczowy) (44).

Gomori atakując słuszność tej metody mówi, że nie wyszła ona poza pracownię w Montpellier, w której została wprowadzona, tymczasem już dziś coraz częściej spotyka się ją w literaturze stosowaną obok innych, powszechnie uznanych reakcji. Panijel, Lison podkreślają konieczność dokładniejszego jej opracowania, zarówno od strony cytologicznej, jak i biochemicznej (19, 29, 32).

Metodę tę zastosowaliśmy w naszych pracach. Posługiwaliśmy się

odczynnikami zsyntetyzowanymi przez Zakład Technologii Środków Lekarskich Akademii Medycznej w Łodzi*.

Badając rozmieszczenie KN w gruczołach przednich jedwabnika otrzymaliśmy wyniki zgodne z tymi, jakie dawały inne metody barwienia. Trzeba jednak dodać, że reakcja ta nie zawsze i nie na każdym materiale zachodziła. Prawdopodobnie było to skutkiem błędów techniki, lub niedostatecznego stopnia oczyszczenia odczynnika co przy dalszej pracy da się usunąć.

III grupa reakcji cytochemicznych dla KN opiera się na wykrywaniu ich poprzez zasady purynowe i pirymidynowe.

Danielli opracował metodę wykrywania KN opartą na sprzęganiu puryn i pirymidyn z wodorotlenkiem dwuazoniowym. Otrzymuje się produkt reakcji o kolorze jasno-żółtym. Pogłębienie tego zabarwienia można uzyskać przez odpowiednie dołączenie np. fenolu do pozostałej wolnej grupy aktywnej odczynnika — w wyniku czego otrzymuje się silnie zabarwiony barwnik azowy. Przy czym — ponieważ szereg związków obecnych w komórce — jak tyrozyna, histydyna, tryptofan — daje tę samą reakcję — eliminuje się je przez działanie odpowiednich czynników blokujących (dinitrofluorobenzen blokuje wszystkie fenole i histydyne, kwas nadmówkowy — tryptofan, chlorek benzoilu — niszczy histydyne, tryptofan i tyrozyne (12)).

Mimo że Danielli daje szerokie wyjaśnienie teoretyczne tej metody została ona bardzo krytycznie przyjęta przez innych badaczy, nie spotyka się też zupełnie w literaturze prac, w których by się nią posługiwano (19).

Szkoła badaczy szwedzkich — z Casperssonem na czele — wprowadziła do cytochemii metodę badania widma absorbcyjnego KN w ultrafiolecie. Opierając się na właściwości absorbowania przez puryny i pirymidyny promieni U.V. o określonej długości fali — w pobliżu 2600 Å i zakładając, że w preparacie cytologicznym — praktycznie biorąc — wszystkie dające się utwalić zasady purynowe i pirymidynowe występują tylko jako powiązane składniki kwasów nukleinowych — Caspersson badał na kliszy fotograficznej lub za pomocą komórki fotoelektrycznej stopień pochłaniania promieni U.V. przez różne struktury komórki. Metoda ta — uzupełniana pracami innych uczonych — pozwala na badania ilościowe. Błąd, jak podaje Caspersson, dla obiektów o niezbędnych dla dokładności pomiarów wymiarach nie mniejszych niż 3-krotna długość fali użytego światła nie przekracza 5%. Ponieważ metoda ta nie pozwala na rozróżnienie KDN i KRN stosuje

*) Kol. dr A. Kotelko i mgr Tkaczyńskiemu za wykonanie tej syntezy serdecznie dziękujemy.

się ją zawsze w połączeniu z innymi, jak reakcja Feulgen'a, czy trawienie enzymatyczne (7, 34).

Metoda ta stosowana jest nie tylko do badań na materiale utrwalonym — ale także przyżyciowo. W związku z tym dyskutowana jest w literaturze sprawa wpływu samego promieniowania tej części widma na strukturę komórki. Wysuwa się zarzuty, że pochłanianie U.V. w żywej komórce nie zachodzi odrazu, a pojawia się dopiero stopniowo w miarę uszkodzania komórki i zachodzących w niej już częściowo zmian nekrotycznych (6).

Ostatnie prace Koeniga (54 r.) nad nukleoproteidami żywych komórek nerwowych hodowanych *in vitro* przeczyłyby tym zarzutom. Stwierdził on, że utrwalenie materiału wpływa jedynie w bardzo niewielkim stopniu na zmniejszenie absorpcji — zasadniczy kształt krzywej pozostaje ten sam (23).

Badania nad wpływem U.V. na spektra absorbcyjne roztworów kwasów nukleinowych, nukleotydów i zasad purynowych i pirymidynowych wykazały, że dopiero dłużej trwające — parogodzinne promieniowanie U.V. wywołuje w roztworach tych dające się mierzyć zmiany w spektrach (10).

Wprowadzenie do cytochemii badań spektrofotometrycznych — zarówno w ultrafiolecie, jak i w świetle widzialnym — rozwinęło możliwości badań ilościowych.

Cytologia — po długim okresie przewagi badań morfologicznych — wkroczyła w fazę dynamicznego rozwoju cytofizjologii, biologii komórkowej.

Tak istotne dla tej biologii zagadnienia, jak sprawy związane z metabolizmem niektórych związków, zlokalizowanie ich, powiązanie z określonymi strukturalnie i funkcjonalnie organellami komórki — rozstrzygane są właśnie w oparciu między innymi o badania cytochemiczne.

Teoria Caspersson'a o kierowniczym udziale heterochromatyny jądrowej w syntezie białek — czy koncepcja Brachet'a o roli kwasów nukleinowych cytoplazmy rozwinęły się na podstawie rozległych badań cytochemicznych tych autorów.

Metody cytochemiczne, które wyrastają z nowych osiągnięć metodyki biochemicznej — wracają często do biochemii jako cenna niekiedy pomoc w rozwiązywaniu zagadnień.

Takim przykładem ząębiana się metod tych dwóch dziedzin wiedzy jest badanie komórek przy pomocy frakcjonowanego wirowania albo prace Hyden'a, czy Edströma.

Edström opracował metodę ilościowego badania KRN w pojedynczych włóknach nerwowych. Posługując się mikromanipulatorem wyekstrahowany z poszczególnych komórek KRN poddawał mikroelektro-

forezie na odpowiednio przygotowanym jedwabiu miedziowym lub paskach celofanu i otrzymany w ten sposób preparat badał w ultrafiolecie. Pozwoliło mu to na ustalenie składu ilościowego puryn i pirymidyn poszczególnych nukleotydów (14, 15).

Duże usługi w cytochemii KN odda też jeszcze z pewnością metoda historadiogramów — z zastosowaniem izotopów pierwiastków promieniotwórczych — a także analizy w mikroskopie fluorescencyjnym — np. uzyskana przez Meisla — po zastosowaniu niektórych fluorochromów — wyraźna kontrastowa fluorescencja KDN i KRN (31).

Niestykanie nęcące są perspektywy badań cytochemicznych w mikroskopie elektronowym. Danielli podaje pierwsze próby tego rodzaju badań, narazie tylko w odniesieniu do białek, mamy jednak prawo przypuszczać, że mogą one się też rozwinąć w cytochemii KN. Ogólnie metoda ta polega na przyłączaniu do związku badanego dużych grup organicznych zawierających metale ciężkie — przez co zwiększa się jego zdolność rozpraszania elektronów — dzięki czemu związek ten może być uwidoczniiony na elektronogramie (12).

Serdecznie dziękuję pani doc. S. Niemierko za krytyczne przejrzanie rękopisu.

LITERATURA

1. Alfert Max, *Biol. Bull.*, **5**, 103 (1952).
2. Atkinson William B. *Science* **116**, 305 (1952).
3. Bauer, *Zeitschr. f. Zellforsch.*, **15** (1932).
4. Brachet J., *C. R. Soc. Biol.*, **133**, 88 (1940).
5. Brachet J., *Experientia*, **2**, 142 (1946).
6. Brumberg E. M., Larionow L. *Nature*, **158**, 663 (1946).
7. Caspersson M. D. T., *Cell Growth and Cell Function. A Cytochemical Study.* (1950).
8. Chayen J., *Exp. Cell. Res.*, **3**, 4 (1952).
9. Chayen J. and K. P. Norris, *Nature* **171**, 472 (1953).
10. Christensen E., Giese A. C., *Arch. Biochem. Bioph.*, **51**, 208 (1954).
11. Danielli J. F., *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **1**, 101 (1947).
12. Danielli J. F., *Cytochemistry. A Critical Approach.* (1953).
13. Diefenbach H., Sandritter W., *Acta Histochem.* **1**, 55 (1954).
14. Edström J. E., *Nature*, **172**, 809 (1953).
15. Edström J. E., *Biochem. Bioph. Acta*, **12**, 361 (1953).
16. Erickson R. O., Sax K. B., Ogur M., *Science*, **110**, 472 (1949).
17. Fischer E. R. *Stain Technol.*, **28**, 9 (1953).
18. Flax H. M., Himes M. H., *Physiological Zool.*, **25**, 297 (1952).
19. Gomori G., *Microscopic Histochemistry, Principles and Practice.* (1953).
20. Haskin S. A., *Stain Technol.*, **28**, 27 (1953).
21. Karnkowska-Górska Z. (1955). w druku.
22. Kay E., *Stain Technol.*, **28**, 41 (1953).
23. Koenig H., *J. Histochem Cytochem.*, **2**, 334 (1954).

24. Kurnick N. B., *Exp. Cell Res.*, **1**, 151 (1950).
25. Kurnick N. B., *J. Gen. Physiol.*, **33**, 243 (1950).
26. Kurnick N. B., *Exp. Cell Res.*, **3**, 649 (1952).
27. Kurnick N. B., Mirsky A. E., *J. Gen. Physiol.*, **33**, 265 (1950).
28. de Lamater E. D., Schaechter M., Hunter M. E., *J. Histochem. Cytochem.*, **3**, 16 (1955).
29. Lison L., *Histochemie et Cytochemie Animales. Principes et Méthodes* (1953).
30. Longley J. B., *Stain Technol.*, **27**, 161 (1952), *Ber. Wiss. Biol. A.* **85**, (1953).
31. Meisel M. N., *Izw. A. N. SSSR, Ser. fiz.*, **15**, 788 (1951).
32. Panijel J., *Les Problemes de l'Histochemie et la Biologie Cellulaire*. 1951.
33. Pearse E. A., *Histochemistry, Theoretical and Applied* (1954).
34. Pollister A. H., Ris H., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **12**, 147 (1947).
35. Romanini A., *Boll. Soc. Ital. Biol. Speriment.*, **29**, 2 (1953).
36. Sibatani A., Fakuda M., *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 935 (1953).
37. Sibatani A., Hiroto Naora, *Biochim. Biophys. Acta*, **12**, 515 (1953).
38. Stedman E., Stedman E., *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1**, 232 (1947).
39. di Stefano H. S., *Science*, **115**, 316 (1952).
40. Stenram U., *Exp. Cell Res.*, **4**, 2 (1953).
41. Stenram U., *Acta Anat.*, **20**, 36 (1954).
42. Sulkin N. M., *Proc. Soc. Exp. Biol. Q. Med.*, **78**, 32 (1951), *Ber. wiss. Biol.* **77**, (1952).
43. Taft E. B., *Exp. Cell Res.*, **2**, 3 (1951).
44. Turchini J., *Exp. Cell Res. Suppl.* **1**, 105 (1949).
45. Vercauteren R., *Enzymologia*, **14**, 3 (1950).

Prace o charakterze referatowym

1. Blicharski J., *P. T. L.*, **6**, 924 (1951).
2. Dempsey E. W., Wisłocki G. B., *Physiol. Rev.*, **26**, 1 (1946).
3. Gersh I., *Physiol. Rev.*, **21**, 242 (1941).
4. Lumb E., *Quart. Rev. Biol.*, **25**, 278 (1950).
5. Moog Fl., *Surv. Biol. Progr.*, **2**, 197 (1952).

LEOKADIA KŁYSZEJKO

Kwasy nukleinowe bakterii

Zakład Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego

Zainteresowanie kwasami nukleinowymi bakterii sięga początków badań nad nukleoproteidami. Już w kilkanaście lat po genialnych odkryciach Mieschera i Hoppe-Seylera rozpoczęto poszukiwania kwasów nukleinowych w komórkach bakteryjnych, lecz do niedawna bezsprzecznym wynikiem tych usiłowań było jedynie stwierdzenie udziału nukleoproteidów w budowie bakterii oraz trudności preparatywnych (Ruppel (98), Levene (79, 70), Brown i Johnson (30, 31, 66 — 68), Coghill (41), Mencil i Heidelberg (88), Sevag i in. (104, 106), Seibert i współpr. (102, 103), itd).

Dopiero w ostatnim dziesięcioleciu szybki rozwój ogólnych badań nad kwasami nukleinowymi znacznie pogłębił i poszerzył zagadnienie tych związków w bakteriach. Skoncentrowało się ono w kilku wybitnych ośrodkach, z których należy wymienić szkołę Biełozierskiego, Boivin'a, A very'ego, Chargaffa i Zamenhoffa, Hotchkissa, Smitha, Wyatta. W Polsce badania nad kwasami nukleinowymi bakterii prowadzone są pod kierunkiem Mikulaszka i Shugara.

Twórczemu wysiłkowi wszystkich tych badaczy zawdzięcza się szereg metod preparatywnych, określenie ilości i struktury pewnych bakteryjnych kwasów nukleinowych oraz ich udziału w niektórych procesach życiowych bakterii.

Preparatyka kwasów nukleinowych z bakterii

Wyjątkowe trudności, jakie nasuwa preparatyka kwasów nukleinowych z bakterii, prawdopodobnie znajdują uzasadnienie w specyficznych właściwościach bakteryjnej błony komórkowej oraz mocniejszym powiązaniu wewnątrzkomórkowych kompleksów. Niezbędnym przeto zabiegiem, poprzedzającym właściwe izolowanie nukleoproteidów z bak-

terii jest przede wszystkim naruszenie ciągłości bakteryjnej błony komórkowej za pomocą czynników natury fizycznej, bądź chemicznej.

Do czynników fizycznych zalicza się mechaniczne rozcieranie bakterii z proszkiem szklanym lub wytrząsaniu ich na perełkach szklanych, oraz rozrywanie komórek bakteryjnych przy pomocy ultradźwięków. Ten ostatni zabieg, wprowadzony do bakteriologii przez F l o s d o r f f a i współpr. (52) nie znajduje obecnie szerszego zastosowania z uwagi na możliwość depolimeryzacji kwasów DN (L a l a n d i in. (77)).

Z metod chemicznych stosowanych do dziś, należy wymienić rozpuszczanie pewnych składników kompleksu białkowo-cukrowo-tłuszczowego bakteryjnej błony komórkowej, a także częściowo komórki, w alkaliach, chloroformie, roztworach mocznika, czy soli kwasów żółciowych.

Preparatyka kwasów nukleinowych z bakterii, jak z każdego innego materiału biologicznego, zawiera kilka etapów, a mianowicie: a) wyciąganie nukleoproteidów i ich wytrącenie, b) oczyszczenie i odbiałczenie nukleoproteidów, c) wydzielenie z odbiałzonego roztworu kwasów nukleinowych oraz d) ich rozdzielenie. Na wszystkich tych etapach zaznacza się różnorodność i swoistość bakteryjnych nukleoproteidów.

Izolowanie nukleoproteidów ze względu na szeroki wachlarz struktury komórki bakteryjnej, przeprowadza się różnorodnymi metodami ekstrakcji. Dawne drastyczne wyciąganie alkaliami ustąpiło dziś miejsca bardziej łagodnym metodom, a mianowicie ekstrakcjom roztworami buforowymi (C h a r g a f f i współpr. (37, 38), S i e g e l i in. (109), bądź wodą (S n e l l m a n i W i d s t r o m (113), B l i x i współpr. (18)), a najczęściej roztworami NaCl i innych soli.

W toku różnych metod ekstrakcji ujawniło się szereg szczególnych cech bakteryjnego nukleoproteidu. I tak wybitny mikrobiolog radziecki B i e ł o z i e r s k i j (8 — 17) wyciągając nukleoproteidy z różnych bakterii rozcieńczonymi roztworami alkalicznymi z następnym rozfrakcjonowaniem, miał możność zaobserwować już w 1941 r. (11) przynajmniej dwa typy wiązań pomiędzy kwasem DN i białkiem: labilne, typu soli, oraz bardziej trwałe. Stabilny dezoksyrybonukleoproteid nie ulegał rozpadowi na komponenty składowe pod wpływem nasyconego kwasu pikrynowego. Zgodnie z obserwacjami B i e ł o z i e r s k i e g o kwas DN, mocno związany z białkiem występuje przede wszystkim, jeżeli nie wyłącznie, w młodych aktywnych komórkach bakteryjnych i zanika w miarę starzenia się hodowli.

Dane B i e ł o z i e r s k i e g o zyskały w latach późniejszych potwierdzenie w pracach innych badaczy, między innymi C h a r g a f f a i S a i d e l a (34, 38). Autorzy ci zauważyli, że nukleoproteid, wyciągnięty roztworami buforowymi z pałeczki gruźliczej nie ulegał dysocjacji

w obecności takiego elektrolitu, jak sól lantanu, co przemawiało za mocniejszym wiązaniem białka z kwasem nukleinowym.

Wyjątkowo luźne połączenie łańcuchów wielopeptydowych z wielonukleotydomi stwierdzono w nukleoproteidzie ze *Streptococcus pneumoniae* (typ VI), otrzymanym w toku ekstrakcji roztworami NaCl wobec NaF (Koenig i współpr. (76)).

Kilka nieoczekiwanych własności bakteryjnych nukleoproteidów ujawniło ekstrahowanie roztworami NaCl. Metoda Mirsky'ego i Pollistera (89), wykorzystująca różną rozpuszczalność nukleoproteidów w różnych stężeniach chlorku sodu, a mianowicie rozpuszczalność rybonukleoproteidu w 0,14 M NaCl przy braku rozpuszczalności dezoksyrybonukleoproteidu w tym roztworze, znalazła zastosowanie tylko do pewnych bakterii. W ten sposób Mirsky'emu i Pollisterowi (90) udało się wyizolować ze *Streptococcus pneumoniae* (typ III) t.zw. „chromozynę”, przypominającą swoim składem „chromozynę” grasicy. Podobnie dezoksyrybonukleoproteidy z *Bacillus Schatz*, *Serratia marcescens* (Zamenhof, Brawerman i Chargaff (130)), z *Chlostridium perfringens* (Clinton i Parsons (40)) i inne były nierozpuszczalne w 0,14 M NaCl. Należy nadmienić, że dla izolowania dezoksyrybonukleoproteidów z *Serratia marcescens* Chargaff (39), Zamenhof i współpr. (130) zaproponowali 3,5 M roztwór NaCl, gdyż dopiero w takim stężeniu dawało się zahamować aktywność dezoksyrybonukleazy tych bakterii.

Swoistością całego szeregu gatunków bakteryjnych okazała się rozpuszczalność dezoksyrybonukleoproteidów w 0,14 M NaCl. Cecha ta została stwierdzona przez Chargaffa i Saidela (38) dla *Mycobacterium tuberculosis*, przez Overenda i współpr. (96) dla *Hemophilus pertussis*, przez Gandelmana, Zamenhofa i Chargaffa (54) dla *E. coli* itd. Fakty te spowodowały między innymi, że przy wyciąganiu nukleoproteidów korzysta się często z roztworów innych soli, okazujących dodatkowe własności, np. roztworów cytrynianu, arsenianu czy fluorku sodu, hamujących działanie dezoksyrybonukleazy (Gandelman i in. (54), Zamenhof i współpr. (130), Jones (70)) oraz cholanu czy dezoksychołanu sodu, obdarzonych jednocześnie własnościami detergentów (Henry i Stacey (60 — 62), Overendi in. (96), Schneider (101), Avery i McCarty (6, 83 — 87), Zamenhof i współpr. (129) itd.)

Należy nadmienić, że ekstrakcje wodą i roztworami pewnych soli np. cytrynianu czy arsenianu sodu, pociągają za sobą pewne trudności w wytrąceniu nukleoproteidów bakteryjnych. Pomyślnie wyniki zapewnia kationowy detergent, t.zw. „cetawlon” (bromek cetylo-trójmetylo-amoniowy) zaproponowany ostatnio przez Jonesa (69, 70). W wypadku

stosowania „cetawlonu” ulegają pewnej modyfikacji zwykle metody oczyszczania nukleoproteidów tj. wykorzystują one fakt, że kompleks nukleoproteidowo-cetawlonowy jest nierozpuszczalny w roztworach NaCl o stężeniu niższym od 0,3 M.

Odbiałczenie nukleoproteidów bakteryjnych nasuwa wiele trudności na skutek znacznie silniejszego powiązania obu składowych komponentów niż w nukleoproteidach innego pochodzenia. Mało efektywne bądź niesłychanie żmudne okazują się w zastosowaniu do bakterii powszechnie używane w tym celu zabiegi, jak dysocjacja nukleoproteidów za pomocą silnych roztworów soli (NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), eluowanie białka na chloroformowo-wodnej powierzchni, czy strącenie białek przy pomocy anionowych detergentów, najczęściej siarczanów wyższych alkoholi. W wyniku niedawnego krytycznego przeglądu metod *Jones i Marsch* (71) proponują dla nukleoproteidów bakteryjnych wstępne odbiałczenie anionowymi detergentami np. siarczanem dodecyłu sodu, względnie przy pomocy wodzianu chloralu, szczególnie efektywnego w wypadku bakterii, oraz usunięcie śladów białka metodą *Sevaga*'a (105).

Poważnym zagadnieniem w preparatyce kwasów nukleinowych bakterii jest ich rozdzielenie. Wobec tego, że nie zawsze daje się to przeprowadzić przy pomocy techniki *Mirsky'ego i Pollister'a* (89, 90), wielu badaczy uciekało się do innych metod. Rozdzielenie w komórce elektroforetycznej, pomyślnie przy oczyszczaniu kwasu DN obdarzonego aktywnością transformacyjną (*Zamenhof i in.* (132)), nie znajduje szerszego zastosowania ze względu na żmudną technikę.

Zupełnie dobre wyniki zapewniają dwie metody wprowadzone do bakteriologii przez *Jonesa i współpr.* (49, 69, 70), a mianowicie rozdzielenie przy pomocy „cetawlonu”, wykorzystujące różną rozpuszczalność w roztworze NaCl kompleksów tego związku z kwasami RN i DN oraz rozfrakcjonowanie na węglu aktywnym. Roztwór zawierający oba kwasy nukleinowe zmieszany dokładnie z węglem aktywnym ulega rozdzieleniu tj. kwas DN pozostaje w roztworze, a kwas RN adsorbuje się na węglu aktywnym i daje się eluować roztworem fenolu.

Zawartość kwasów nukleinowych w bakteriach i ich lokalizacja

Zawartość kwasów nukleinowych w bakteriach znacznie przewyższa ilość tych substancji w innych komórkach roślinnych czy zwierzęcych. Określa się ją w toku klasycznego analitycznego rozdzielenia kwasów RN i DN metodą *Schmidta i Thannhauser'a* (99), bądź *Schneider'a* (100), czy *Ogura i Rosen'a* (95) po usunię-

ciu związków lipidowych i kwasorozpuszczalnych. Pomyślną w zastosowaniu do mikroorganizmów okazuje się również technika Schneidera w modyfikacji Webba i Levy'ego (119) (1955), polegającej na ilościowym oznaczaniu dezoksyrybozy przy użyciu p-nitrofenylohydrazyny.

Wielu dawnych autorów, między nimi Biełozierskij (8 — 17), oznaczało ilość kwasów nukleinowych i nukleoproteidów na podstawie zawartości całkowitego fosforu i azotu w suchej masie bakterii, co nie było pozbawione pewnych błędów.

Tablica 1

Zawartość kwasów nukleinowych, nukleoproteidów i białek w bakteriach w zależności od wieku hodowli (% suchej masy)

Szczep	Kwasy nukleinowe	Białka	Nukleoproteidy
<i>Spirillum volutans</i> hodowla 2 dniowa	28,8	36,4	65,2
„ 4 „	21,3	48,6	69,9
„ 6 „	10,6	63,6	74,2
<i>E. coli</i> hodowla 5 godz.	22,43	57,0	79,43
„ 20 „	14,13	72,4	86,53
„ 48 „	9,66	70,4	80,06
<i>B. paradysenteriae</i> hodowla 5 godz.	28,18	61,0	89,18
„ 20 „	19,97	74,0	93,97
„ 48 „	14,77	70,9	85,67

wg Biełozierskiego (14)

Przedstawione na tablicach 1 i 2 dane Biełozierskiego (14) wyliczone z wartości fosforu i azotu w suchej masie bakterii, oraz dane innych autorów, oparte głównie na technice Schneidera (100), wyrażają wyjątkowe bogactwo komórek bakteryjnych w kwasy nukleinowe. W zależności od gatunku i warunków fizjologicznych ilość kwasów nukleinowych w bakteriach stanowi od 10 — 25%, a wg Biełozierskiego do 30% ich suchej masy, z czego na kwas DN przypada od 2 — 5%, a na kwas RN od 5 — 20%, a nawet do 25%. Od ogólnego schematu odbiegają ilości kwasów nukleinowych w riketsjach (Smith i Stocker (111)), tj. zawartość kwasu DN ok. 10%, a kwasu RN od 2 — 5% suchej masy, co w przypadku organizmów stojących na pograniczu wirusów i bakterii nie budzi wielkiego zdziwienia.

Zawartość kwasów nukleinowych zmienia się w zależności od wie-

ku bakteryjnej hodowli. Ilość kwasów nukleinowych, najwyższa w młodych szybko mnożących się bakteriach (20 — 25% suchej masy) spada w miarę starzenia się (5 — 15%) (Boivin (19, 29), Vendrely i in. (115 — 118)). Fakt ten dowodzi, że akumulacja znacznych ilości kwasów nukleinowych jest jednym z czynników warunkujących zdumie-

Tablica 2

Zawartość kwasów nukleinowych w różnych bateriach (% suchej masy)

Szczep	KN ogółem	KDN	KRN	Autor
Staphylococcus	11,57	2,82	8,75	Vendrely (115)
Eberth. typhosa	12,84	3,72	9,12	
E. coli (różne szczepy)	13,90	4,17	9,73	
	13,12	4,40	8,72	
	14,67	4,24	10,43	
	15,76	4,29	11,47	
Pałeczka jelitowa S ₁ hodowla 5 godz.	21,4	8,1	15,3	Vendrely i Tulasne (120)
„ 20 „	13,1	4,48	8,7	
Proteus P ₁₈	11,59	3,28	8,31	
Rickettsia burnetti		9,8	2,95	
„ „		9,5	5,5	Stocker (111)

wające zdolności życiowe bakterii, jak wyjątkową intensywność przemian, czy zawrotną szybkość rozmnażania, będących wyrazem wzmożonej syntezy białkowej.

Niewątpliwego udziału kwasów nukleinowych w procesach syntezy białka dowodzą na materiale bakteryjnym frapujące, bardzo niedawne badania Gale i Folkesa (55), (56, 58). Inkubowanie wobec mieszaniny radioaktywnych aminokwasów i źródła energii (np. ATF) „podkomórkowych” preparatów gronkowcowych uzyskanych przy pomocy ultradźwięków, a pozbawionych w różnym stopniu obu kwasów nukleinowych, wykazuje wyraźną zależność aktywności enzymatycznej, a tym samym syntezy białka od zawartości kwasów DN i RN.

W hipotetycznym mechanizmie syntezy białka cząsteczka kwasu DN byłaby rusztowaniem dla tworzenia się łańcuchów rybonukleotydowych, a dopiero na tych ostatnich realizowałyby się najsztudniejsze modelowanie nowej drobin białkowej.

Atrakcyjne są eksperymenty Gale i Folkesa (56) stwierdzające, że inkorporacja niektórych napiętnowanych aminokwasów w białko komórek gronkowcowych, może być aktywowana przez dodanie nie tylko kwasu RN w całości, ale jeszcze efektywniej przez jego fragmenty,

jak dwu- lub trójnukleotydy, np. dwunukleotyd adenilo-cytydylowy. Białkotwórcza, gatunkowo specyficzna, funkcja kwasu RN wydaje się być związana z określoną sekwencją poszczególnych nukleotydów w całym łańcuchu. Postulowana przez D o u n c e'a (46) rola kwasu nukleinowego, jako „modelu natury” zdaje się zyskiwać w. wyżej wspomnianych badaniach pewne uzasadnienie doświadczalne.

Rozmieszczenie kwasów nukleinowych w komórce bakteryjnej w świetle wieloletnich badań cytochemicznych, popartych obserwacjami w mikroskopie elektronowym i fazowo-kontrastowym, wydaje się przypominać lokalizację nukleoproteidów w innych komórkach, a mianowicie kwas RN w cytoplazmie, a kwas DN w swoistym jądrze bakteryjnym, tzw. „nukleoidzie”, stanowiącym pewien etap ewolucji aparatu jądrowego wyższych organizmów.

Wymiary swoistych jąder bakteryjnych zmieniają się w zależności od rozmiarów bakterii i wahają się w granicach ułamków mikrona, np. $0,6 \mu$ średnicy w komórkach. *E. coli*. Z tym wymiarem trudno pogodzić wielkość cząsteczek kwasu DN z *E. coli*, jaką udało się ustalić w 1954 r. Rowenowi i Normanowi (97), a mianowicie masę drobinową ok. $7 \cdot 10^6$, długość od $0,8$ — $1,0 \mu$ i średnicę cząsteczki ok. 20 \AA . Autorzy przypuszczają, zgodnie z badaczami kwasów DN w komórkach organizmów wyższych, że cząsteczka kwasu DN, obdarzona niezwykle giętkością, ulega odwracalnemu skręceniu i rozwinięciu w ciągu życia komórki, natomiast wydłuża się nieodwracalnie w toku zabiegów preparatywnych.

Wielkość cząsteczek kwasu DN wydaje się zmieniać nie tylko wraz z odmiennym gatunkiem, ale i szczepem bakteryjnym. Wskazują na to wyniki badań wizkozymetrycznych Ko en i g a (75 — 1955) nad roztworami soli sodowych kwasów DN, izolowanych w identycznych warunkach z różnych typów *Streptococcus pneumoniae*. Wielkość cząsteczki kwasu DN z typu III, określona wartościami: $1,2 \cdot 10^6$ (masa drobinowa), $0,399 \mu$ (długość) i 18 \AA (średnica cząsteczki), odbiega znacznie od odpowiednich danych odnośnie drobinowy kwasu DN ekstrahowanego z typu VI *Streptococcus pneumoniae* (masa cząsteczkowa — $2,1 \cdot 10^6$, długość — $0,499 \mu$ oraz średnica ok. $22,6 \text{ \AA}$).

Ilości kwasów DN przypadające na jedną komórkę bakteryjną również wahają się w szerokich granicach, np. $2 \cdot 10^{-15} \text{ g}$ dla *Hemophilus influenzae* (Z a m e n h o f i w s p ó ł p r. (129)), 10^{-14} g dla *E. coli* (B o i v i n i n. (29)), ale są znacznie niższe od przeciętnych zawartości kwasów DN w komórkach tkankowców (ok. $6 \cdot 10^{-12} \text{ g}$) (V e n d r e l y i V e n d r e l y (121)).

Inaczej przedstawia się sprawa z cytoplazmatycznym kwasem RN, którego ilość w bakteriach znacznie przewyższa odpowiednie wartości

w komórkach organizmów wyższych i ponosi główną odpowiedzialność za wahania w ogólnej zawartości bakteryjnych kwasów nukleinowych. Fakt ten staje się zrozumiałym w przypadku organizmów wykazujących ze wszystkich żywych komórek najwyższą zdolność mnożenia i w konsekwencji najwyższą zdolność syntezy białka. Należy przypomnieć, że obfitość kwasu RN w cytoplazmie bakterii nadając jej wybitną zasadochłonność, przez wiele lat uniemożliwiała wykazanie zwykłymi metodami barwienia również zasadochłonnego jądra (Bliższe szczegóły w artykule K ł y s z e j k o (73)).

Tablica 3

Fracje fosforowe szczepów *Corynebacterium diptheriae* bogatych i ubogich w ziarnistości metachromatynowe (% suchej masy)

Szczepy	P. całk.	Ortofosforany	Polifosforany		KRN	KDN
			kwaso-rozp.	kwaso-nierozp.		
Bogate w ziarnistości metachromatynowe	2,29	0,38	0,15	0,47	0,46	0,16
Ubogie w ziarnistości metachromatynowe	2,10	0,20	0,10	0,17	0,89	0,39

wg Ebela (50)

Rozmieszczenie kwasów RN w cytoplazmie bakteryjnej nie zostało jeszcze wyjaśnione. Dane dotyczące ewentualnej obecności w bakteriach mitochondrii, a zwłaszcza mikrosomów nie są jednoznaczne. Nieco więcej jest wyświetlony udział kwasu RN w strukturze ziarnistości metachromatynowych. Pogląd Biełozierskij'ego (11), że podstawowym składnikiem wolutyny jest wolny kwas RN ($N : P = 9,2 : 10,0$), nazwany przez niego „wolutynowym”, ulega poprawce w świetle badań z ostatnich lat. Prace Ebela (50), a także Wilkinsona i Duguida (112) nad bakteriami ubogimi i bogatymi w wolutynę, wykazały, że tworzywo ziarnistości metachromatynowych stanowią przede wszystkim polifosforany (metafosforany) (tablica 3). Znaczenie tych związków w procesach fosforylacji, prawdopodobnie na skutek regeneracji ADF, podkreślają ostatnie prace Winderera i Denneny (126, 127) nad *Mycobacterium smegmatis*.

Odwrotne stosunki w zawartości kwasów RN i DN, w porównaniu z bakteriami typowymi, obserwuje się w postaciach L drobnoustrojów. Analiza chemiczna pałeczek normalnych odmienia i jego postaci L,

przeprowadzona przez Vendrely'ego i Tulasne'a (119, 120), wykazuje, że stosunek KRN i KDN = 2,5 w pałeczkach typowych, spada do 0,14 w postaciach L. (tablica 4). Ta wysoka zawartość lipidów, również charakterystycznych dla jąder komórkowych, wydaje się sugerować udział materiału jądrowego bakterii w budowie postaci L. Jednakże dopiero szczegółowa analiza składu puryn i pirymidyn obu kwasów DN mogłaby tę kwestię rozstrzygnąć. Niestety dotychczas brak odnośnych danych o literaturze (Bliższe dane dotyczące postaci L drobnoustrojów w artykułach Horoszewicza (63) i Kłyszewko (74)).

Tablica 4

Chemiczna analiza pałeczek normalnych odmienia i ich postaci L (% suchej masy)

	N całk.	P całk.	Lipidy całk.	Białka całk.	Kw. nu- kleino- wy całk.	KRN	KDN	$\frac{KRN}{KDN}$
Proteus P ₁₈ pałeczki	14,77	2,45	6,0	73,0	11,59	8,31	3,28	2,50
postacie L	10,27	2,88	24,3	58,9	1,65	0,20	1,45	0,14

wg Vendrely'ego i Tulasne'a (120)

Przy omawianiu lokalizacji kwasów nukleinowych bakterii nie sposób pominąć istoty barwienia wg Grama, gdyż w ciągu wielu lat właśnie w kwasach nukleinowych dopatrywano się przyczyny Gram-dodatniej barwliwości mikroorganizmów. Fakt ten w dużej mierze został spowodowany powszechnym uznaniem roli kwasów nukleinowych w procesach biologicznych, a także popularnością hipotezy Henry'ego i Stacey'ego (60 — 62), że rybonukleinian magnezu, znajdujący się w korowej warstwie komórki bakteryjnej w połączeniu z zasadowymi białkami o wysokim odsetku argininy i grup SH, warunkuje Gram-pozytywność bakterii.

Literatura tego zagadnienia jest olbrzymia, a ponieważ została ostatnio uwzględniona w wyczerpującej monografii Shugara (107) ograniczę się tylko do paru uwag.

Wyniki badań do dziś są sprzeczne, ale pojawiają się coraz więcej faktów podważających teorię o wyłącznym udziale kwasów nukleinowych bakterii w barwieniu wg Grama. Zarysowuje się tendencja upatrywania odmiennego charakteru barwienia się bakterii w ich odmiennej strukturze fizyko-chemicznej. Obserwacje Camiena i współprac. (32), Stokesa i Gunnesa (14), Freeland'a i Gale'a (53) nad aminokwa-

sowym składem całości białek szeregu bakterii, podkreśliły znacznie niższą zawartość arginy w Gram-dodatnich (ok. 450 mikromoli/g suchej masy) niż w Gram-ujemnych komórkach (ok. 900 mikromoli/g suchej masy). Odwrotne stosunki wykazały wyniki badań Webba (123) odnośnie jonów Mg, a mianowicie: ok. 250 mikromoli/g suchej masy w Gram-dodatnich organizmach wobec 60 mikromoli/g w Gram-ujemnych.

Prowadzone od kilku lat prace Mitchella i Moyle'a (91 — 93) nad mechanizmem barwienia wg Grama znalazły ostatnio wyraz we wnikliwej analizie chemicznej frakcji fosforowych Gram-pozytyw-

Tablica 5

Fracje fosforowe Gram-dodatnich i Gram-ujemnych mikroorganizmów
 PL — fosfor lipidowy, PN — fosfor kwasorozpuszczalny nieorganiczny, PO — fosfor kwasorozpuszczalny organiczny, PRN — fosfor kwasu RN, PDN — fosfor kwasu DN,
 P_x — fosfor nieznanego estru fosforowego

Mikroorganizm	Mikromol P g suchej masy komórek							reakcja Gram
	PL	PN	PO	PRN	PDN	P _x	Pcałk.	
<i>Acetobacter pasteurianum</i>	48	15	17	472	53	—9	636	—
<i>Alcaligenes faecalis</i>	87	27	37	389	97	13	649	—
<i>Bacillus brevis</i>	45	31	29	410	73	—10	578	—
<i>Escherichia coli</i>	63	26	42	345	180	8	664	—
<i>Proteus vulgaris</i>	73	48	22	365	94	3	625	—
Drożdże piekarskie	9,4	47	45	169	22	60	352	+
<i>Bacillus subtilis</i>	16	70	3238	291	71	471	1157	+
<i>Clostridium sporogenes</i>	42	71	56	426	75	103	773	+
<i>Corynebacterium xerosis</i>	36	92	129	270	65	385	977	+
<i>Mycobacterium phlei</i>	37	49	106	326	89	126	733	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	38	166	110	197	73	250	834	+
<i>Streptococcus faecalis</i>	26	146	266	459	168	232	1297	+

wg Mitchella i Moyle'a (93)

nych i Gram-negatywnych bakterii, wyrosłych w tym samym środowisku i badanych w tej samej fazie wzrostu. Wyniki analiz, załączone w tablicy 5, podkreślają pewne różnice i analogie między dwiema odmiennie barwiącymi się grupami bakterii.

Średnie wartości na fosfor nukleinowy (KRN + KDN), wahające się ok. 470 mikromoli/g suchej masy we wszystkich badanych organizmach, potwierdzają poprzednie obserwacje Mitchella i Moyle'a (92) oraz kilku innych autorów (Boivin (20), Vendrely (115)), że bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne, nie różnią się znacznie pod względem zawartości kwasów nukleinowych. Wybitna przewaga kwasu RN, stwierdzona przez Stacey'a (113a) w Gram-dodatnich organiz-

mach, znajduje pewne wytłumaczenie w wykrytym przez Mitchell'a i Moyle'a (92) bliżej nieznanym organicznym estrze fosforowym (P_x), prawdopodobnie związku wieloglicerofosforowym, który warunkuje nadwyżkę fosforu we frakcji kwasu RN uzyskanej metodą Schmidta i Thannhausera (99). Frakcja P_x , spośród wszystkich frakcji fosforowych, reprezentuje największą rozpiętość między bakteriami Gram-ujemnymi i Gram-pozytywnymi, na korzyść tych ostatnich (kilkaset mikromoli/g suchej masy wobec kilkunastu mikromoli/g w przypadku organizmów Gram-ujemnych).

Bakterie Gram-dodatnie cechuje ponadto pewna nadwyżka fosforu kwasorozpuszczalnego oraz zawartość fosforu lipidowego (1,65%) o połowę niższą, niż w organizmach Gram-ujemnych (ok. 3,3% P_{lip}). Mitchell i Moyle (93) nie wykluczają możliwości, że ten deficyt fosforu lipidowego pozostaje w jakimś bliżej nieokreślonym związku z wybitną nadwyżką frakcji P_x , i na podstawie całości swoich badań sugerują, że kompleks lipidowo-wieloglicerofosforowo-białkowy jest jedną z przyczyn Gram-pozytywności bakterii. Należy nadmienić, że wspomniane wyniki doświadczeń Mitchell'a i Moyle'a obok danych innych autorów odnośnie niższej zawartości jednoelektrododatniej argininy kompensowanej przez większą ilość dwuelektrododatnich jonów Mg w Gram-pozytywnych bakteriach podsuwają myśl o roli ewentualnej wymiany jonowej w procesie barwienia wg Grama.

Rola kwasu DN w procesach transformacji szczepów bakteryjnych

Wydarzeniem w bakteriologii, które wywarło bezsprzeczny wpływ na ogólny rozwój badań nad kwasami nukleinowymi, były odkrycia Avery'ego (6) i Mc Carthy'ego (83 — 87) oraz Boivina (20 — 28), związane z transformacją szczepów bakteryjnych. Przygotował je Griffith (59), który w 1928 r. był świadkiem, jak *in vivo* w organizmie myszy bakterie żywe (odmiana *Streptococcus pneumoniae* typu awirulentnego) były pobudzone do mutacji przez bakterie zabite (odmiana S typu zjadliwego) i zdobyły całkowicie charakter antygenowy i biochemiczny tych martwych bakterii. Oryginalne obserwacje Griffith'a znalazły potwierdzenie w pracach Neufelda i Levinthala (94), Bauerhenna (7), Dawsona (43) i in. W latach późniejszych to samo zjawisko zostało odtworzone *in vitro* przez hodowlę jednego typu bakteryjnego w przesączu z hodowli szczepu innego, lub w obecności zabitych bakterii tego innego typu (Dawson i Sia (44), Allo way (4) itd).

Istota transformacji długo pozostawała nieznana. Dopiero w 1944 r.

Avery'emu (6) udało się wyekstrahować roztworem dezoksycholenu sodu w soli fizjologicznej ze *Streptococcus pneumoniae* (typ II) czynnik wywołujący transformację. Zawartość azotu i fosforu w stosunku równym 1,67, odporność na enzymy proteolityczne i rybonukleazę, a natychmiastowa inaktywacja pod wpływem drobnych stężeń dezoksyrybonukleazy oraz ruchomość elektroforetyczna identyczna z szybkością poruszania się kwasu DN, dowodziły, że czynnikiem ponoszącym odpowiedzialność za biologiczną aktywność był swoisty wysokopolimeryzowany kwas dezoksyrybonukleinowy.

Prace Avery'ego stały się bodźcem dla całej serii usiłowań mających na celu wyizolowanie najbardziej rodzimego kwasu DN z bakterii. Od 1944 r. w literaturze mnóstwo jest prac nad procesami transformacyjnymi u różnych bakterii oraz ulepszeń preparatywnych metod ekstrakcji i oczyszczania bakteryjnego kwasu DN. Zdolność transformacyjną stwierdzono poza *Streptococcus pneumoniae* (Avery (6), Hotchkiss (64, 65)) w szczepach *Escherichia coli* (Boivin (20—28), Dinzani (45)), w szczepach *Proteus* (Dinzani (45)), *Shigella paradysenteriae* (Veil i Binder (125)), *Bacillus anthracis* (Manniger i współpr. (82)), w szczepach *Neisseria meningitidis* (Alexander i Redman (3)), *Hemophilus influenzae* (Alexander i Leidy (3), Zamenhof i współpr. (129)) itd.

We wszystkich tych gatunkach bakterii pod wpływem kwasu DN wyizolowanego z jednego szczepu następowała pożądana zmiana procesów przemiany materii w szczepie ulegającym transformacji. Przypuszczalny mechanizm transformacji sprowadzałby się do oddziaływania aktywnego kwasu DN na nukleinowe ośrodki syntezy w obcej komórce bakteryjnej, w kierunku odtwarzania drobin kwasu DN, identycznych z czynnikiem transformującym. Wtórna modyfikacja aparatu enzymatycznego w obcej komórce bakteryjnej znajdowała wyraz bądź w nowej substancji otoczkowej w przypadku *Streptococcus pneumoniae* (6), bądź zmodyfikowanej przemianie cukrowców w *Escherichia coli* (21—28, 45) lub *Proteus* (45), czy wreszcie w odporności na antybiotyki indukowanej w szczepach *Hemophilus influenzae* (1, 129), *Neisseria meningitidis* (3), bądź *Streptococcus pneumoniae* (64, 65). Należy nadmienić, że badania Dinzani (45) sugerują możliwość transformacji nie tylko w obrębie jednego gatunku, ale również w szczepach należących do różnych gatunków biologicznie pokrewnych (np. *E. coli*, *Proteus*, *Salmonella*).

Dążenie badaczy do uzyskania wysokopolimeryzowanego biologicznie aktywnego kwasu DN, w dużej mierze zostało spełnione w latach 1951—53 w pracach Zamenhofa, Alexandra i Leidy (1), (129) nad *Hemophilus influenzae*. Komórki przemyte rozcieńczonym roztworem NaCl z cytrynianem sodu, poddawano lizie w roztworze dezoksy-

cholanu sodu. Z osadu wytrąconego etanolem usuwano rybonukleoproteid i polirybofosforany, zaś dezoksyrybonukleoproteid odbiałczano przy pomocy detergentu „Duponolu C” *) w roztworze chlorku sodu i cytrynianu. Oczyszczenie kwasu DN uzupełniano oddzieleniem śladów kwasu RN na węglu aktywnym. Uzyskany produkt zawierał 99,3% kwasu DN, ślady kwasu RN, polirybofosforanów i białka. Był to najczystszy preparat kwasu DN uzyskany dotychczas z bakterii.

Jak małe ilości kwasu DN niezbędne są do transformacji odporności na streptomycynę w jednej komórce *Hemophilus influenzae* wskazują liczby: $3 \cdot 10^{-14}$ — 10^{-13} g. Niewątpliwie fakt ten jest związany z brakiem znacznych ilości dezoksyrybonukleazy w *H. influenzae* oraz z techniką preparatywną, gdyż odpowiednie wartości dla *Streptococcus pneumoniae* są rzędu 10^{-9} — 10^{-8} g kwasu DN (6).

Rewelacyjne są wyniki ostatnich badań Ephrussi-Taylor i Latarjeta (51) i nad bezpośrednią inaktywacją pneumococowego czynnika transformującego w roztworze wodnym promieniami Röntgena (0,7 — 0,9 A). Krzywe inaktywacji dały zupełnie nieoczekiwaną wartość na masę cząsteczkową biologicznie czynnego kwasu DN: nieco mniejszą lub równą $7,3 \cdot 10^5$.

Zasługują na uwagę badania Zamenhofa i współpr. (129, 131) nad wpływem różnych czynników natury fizycznej bądź chemicznej na czysty preparat kwasu DN z *H. influenzae*, obdarzony zdolnością transformacyjną. Jego biologiczna czynność była probierzem nienaruszonej funkcji, natomiast lepkość świadczyła o nietkniętej strukturze chemicznej. W wyniku tych eksperymentów stwierdzono, że lepkość i aktywność biologiczna są praktycznie niezmienione przez ogrzewanie w ciągu jednej godziny w temp. 76 — 81°C. W temperaturach wyższych cząsteczka kwasu DN traci kompletnie aktywność, a lepkość tylko w minimalnym stopniu. Rozerwanie kilku labilnych wiązań takich, jak np. wiązania wodorowe, powodując tylko małą zmianę asymetrii cząsteczek, przekreśla być może całkowicie jej działanie biologiczne.

Doniosłości nietkniętej struktury kwasu DN dla jego funkcji dowodzi również wpływ jonów wodorowych i wodorotlenowych. Autorzy stwierdzili, że po 4-godzinnym trzymaniu kwasu DN w pH 3,16 uwalnia się do roztworu 0,16% całości adeniny i 0,13% całkowitej zawartości guaniny. Zakładając, że przeciętna cząsteczka kwasu DN posiada masę wielkości ok. $5,5 \cdot 10^6$ można obliczyć, że w ciągu 4 godzin w pH 3,16 traci ona zaledwie 9 cząsteczek adeniny i 4 cząsteczki guaniny. Usunięcie tych kilku zasad purynowych wystarcza do kompletnej inaktywacji kwasu DN.

* Siarczany alkilów z wysokim odsetkiem siarczanu dodecyłu sodu.

Nieodwracalny, destrukcyjny wpływ na biologiczną funkcję kwasu DN okazują siły jonowe, a także proces odwodnienia. Stosunkowo najmniejsze straty powoduje odwodnienie 75⁰/₀ alkoholem, suszenie na powietrzu i przechowywanie nad CaCl₂.

Najsilniejsze inaktywujące działanie wywiera dezoksyrybonukleaza, która w stężeniach tak niskich jak $8,5 \cdot 10^{-11}$ g/ml w ciągu 138 minut niszczy kompletnie zdolność transformacyjną kwasu DN z *Hemophilus influenzae*.

Niezwykle ciekawym jest fakt stwierdzony przez *Hotchkiss*a (65), że działanie czynnika transformującego, indukującego mutację, np. odporność na penicylinę w szczepach *Streptococcus pneumoniae*, jest hamowane całkowicie w obecności kwasu DN pochodzącego z komórek organizmów wyższych, bądź z innego gatunku bakterii.

Badania nad wpływem różnych czynników fizyko-chemicznych na aktywność biologiczną wydają się podkreślać jego naturę chemiczną. Zupełna odporność kwasu DN na czynniki denaturujące białko i enzymy proteolityczne stanowi jeszcze jeden dowód, że białko nie tworzy funkcjonalnej części aktywnej cząsteczki. Stabilność jej wobec związków sterylizujących, jak np. fenol (0,65 M), formaldehyd (0,33 M) wydaje się w pewnym stopniu przemawiać za tym, że mimo daleko idących analogii w mechanizmie działania wirusów i czynnika transformującego (*Casper*son (33)), ani wirusy ani postacie L drobnoustrojów nie warunkują transformacji szczepów bakteryjnych.

Struktura kwasów nukleinowych bakterii

Konsekwencją dość rewolucyjnej roli kwasów DN w procesie kierowanych mutacji były odkrycia w jego strukturze chemicznej. Prace *Avery*'ego i jego następców zachwiały poglądem o wyłącznym istnieniu jednego typu kwasu DN. Swoistość cech transportowana przez kwasy DN musiała mieć swoje źródło w strukturze tych kwasów swoistej dla danego szczepu. Różnice w proporcji, czy sekwencji nukleotydów tworzących łańcuch kwasu nukleinowego, mogły być przyczyną specyficznych efektów.

Osiągnięcia *Avery*'ego stały się bodźcem do badań nad strukturą kwasów DN z różnych źródeł między innymi z bakterii. Prace z ostatnich lat *Vischera*, *Zamenhofa* i *Chargaffa* (22, 39) oraz *Wyatta*, *Markhama* i *Smitha* (110, 128) nad składnikami azotowymi wykazały daleko idące różnice w składzie, a tym samym przypuszczalnie i w nukleotydowej sekwencji kwasów DN należących do różnych gatunków bakterii. Różnorodna zawartość poszczególnych zasad azotowych przemawiała za niezwykle bogatą strukturą nukleinową

komórki bakteryjnej. Wnikliwe badania wzajemnych molowych stosunków puryn i pirymidyn w kwasach DN różnego pochodzenia upoważniły Chargaffa i współpr. (35, 36, 39) do ujęcia wszystkich kwasów DN w dwa główne typy: typ „AT” z przeważającą zawartością adeniny i tyminy, oraz typ „GC” cechujący się znaczną ilością guaniny i cytozyny. O ile wszystkie preparaty kwasów DN zwierzęcego i roślinnego pochodzenia szeregowyły się przeważnie w grupie „AT” i wykazywały stosunek puryn do pirymidyn bardzo bliski jedności, o tyle poznane wówczas kwasy DN z *Mycobacterium tuberculosis* (122), *Bacillus Schatz*, *Serratia*

Tablica 6

Zasady azotowe kwasów DN (typu „GC”) bakterii

Szczep	Mol. zasady na 1 mol P				Ad. Gu.	Tym. Cyt.	Ad. Tym.	Gu. Cyt.	Pur. Pi- rym	Autor
	Adenina	Guanina	Cytozyna	Tymina						
<i>Myc. tuberculosis</i> (typus humanus)	0,180	0,285	0,333	0,200	0,63	0,60	0,90	0,85	0,87	Smith i Wyatt (109)
<i>Myc. tuberculosis</i> (typus bovinus)	0,178	0,293	0,338	0,190	0,61	0,56	0,94	0,87	0,89	Smith i Wyatt (109)
<i>Myc. tuberculosis</i> (typus avium)	0,120	0,280	0,255	0,103	0,43	0,40	1,16	1,29	1,12	Vischer i współpr. (122)
<i>Myc. phlei</i>	0,143	0,280	0,255	0,123	0,57	0,45	1,16	1,91	0,98	Laland i współpr. (78)
<i>Serratia marcescens</i>	0,180	0,237	0,278	0,175	0,76	0,63	1,03	0,85	0,92	Zamenhof i współpr. (130)
<i>Bacillus Schatz</i>	0,179	0,253	0,281	0,162	0,68	0,58	1,07	0,90	0,96	Zamenhof i współpr. (130)

marcescens (39) zdawały się wyraźnie należeć do typu „GC” i odznaczały się poważnymi różnicami w stosunkach puryn do pirymidyn oraz całą gamą wzajemnych proporcji poszczególnych zasad azotowych. Zarysowała się biochemiczna różnica pomiędzy światem zwierząt i roślin, a światem bakterii. Pogłębiał ją jeszcze fakt stwierdzony między innymi przez Vischera, Zamenhofa i Chargaffa (122), Lalandę i współpr. (78) oraz Wyatta, Markhama i Smitha (110, 128), a mianowicie brak metylocytozyny w prątkach gruźliczych i innych bakteriach w przeciwieństwie do całego szeregu kwasów DN pochodzenia zwierzęcego i roślinnego.

Badania nad kwasami DN innych gatunków bakterii wykazały zadziwiającą różnorodność składu pod względem zasad azotowych i wykryły obok typu „GC” (tablica 6) przedstawicieli typu „AT” w *Hemophilus in-*

fleunzae (Z a m e n h o f i w s p ó ł p r. (130)), czy *Streptococcus pneumoniae* (D a l y, A l l f r e y i M i r s k y (42)) oraz dowiodły występowania kwasu DN o składzie pośrednim między dwoma głównymi typami, np. w *Escherichia coli* (G a n d e l m a n i i n. (54)). Kwas DN tego organizmu odznacza się niemal równoważną zawartością 4-azotowych składników (tablica 7).

Tablica 7

Zasady azotowe kwasów DN bakterii (typ „AT” i pośredni)

szczep	Mol zasady na 1 mol P				Typ	Ad. Gu.	Tym. Cyt.	Gu. Cyt.	Ad. Tym.	Pur. Pirym.	Autor
	Ade-nina	Gua-nina	Cyto-zyna	Ty-mina							
<i>H. influenzae</i>	0,296	0,169	0,182	0,280	„AT“	1,75	1,54	1,06	0,93	1,01	Zamenhof i współpr. (130)
<i>Str. pneumoniae</i>	0,300	0,210	0,180	0,300	„AT“	1,43	1,67	1,00	1,17	1,01	Daly, Allfrey i Mirsky (42)
<i>R. burnetti</i>	0,295	0,233	0,270	0,260	„AT“	1,33	1,18	1,13	1,01	0,98	Smith i Stocker (111)
<i>R. provazeki</i>	0,360	0,170	0,150	0,320	„AT“	2,12	2,13	1,13	1,13	1,11	Wyatt i Cohen (128)
<i>E. coli</i> K-12	0,247	0,236	0,239	0,227	Typ pośr.	1,05	0,95	1,09	0,99	1,04	Gandelman i współpr. (54)

Przypuszczalnie dalszy wnikliwy wgląd w strukturę kwasów DN różnego pochodzenia wykaże przypadkowość udziału kwasu DN o typie „AT” w budowie wyższych organizmów, tym niemniej jest ciekawe, że właśnie bakteryjne kwasy DN reprezentują nie tylko typy „AT” i „GC”, ale również postacie przejściowe.

Godne uwagi są prace G a n d e l m a n'a, Z a m e n h o f a i C h a r g a f f a (54) stwierdzające, że trzy różne szczepy *E. coli*, wyrosłe zasadniczo w identycznych warunkach, a różniące się pochodzeniem i biochemicznymi właściwościami, dostarczają preparaty kwasów DN o niemal identycznym składzie puryn i pirymidyn. Stałość składu kwasów DN w obrębie jednego gatunku zostaje zachowana nawet w szczepie *E. coli* niezdolnym do syntezy tyminy, a wyhodowanym wobec 50-krotnego nadmiaru tyminy w porównaniu z ilością niezbędną dla optymalnego wzrostu (tablica 8). Niezależność składu kwasów DN od środowiska odżywczego podkreślają badania S m i t h a i W y a t t a (110) nad *E. coli* (mutant B/r).

Poważne różnice w składzie kwasów DN różnych gatunków tego samego rodzaju bakterii dają się dodatkowo zaobserwować na przykładzie *Rickettsia burnetti*. Dowodzi tego analiza chromatograficzna puryn i piry-

midyn w kwasach DN z *Rickettsia burnetti* (Smith i Stocker (111), oraz *Rickettsia provazeki* (Wyatt i Cohen (128a) wyrosłych na zarodku jaja kurzego.

Pomimo głębokich różnic w zawartości poszczególnych zasad azotowych (tablica 8), kwasy DN obu gatunków *Rickettsia* powtarzają zasadniczy obraz struktury wszystkich kwasów DN dzięki molowym stosun-

Tablica 8

Zawartość puryn i pirymidyn w kwasach DN trzech szczepów *E. coli*

Szczep	Mol zasady/100 moli				Pur. Pirym.
	Adenina	Guanina	Cytozyna	Tymina	
<i>E. coli</i> K-12	0,247	0,236	0,239	0,227	1,04
<i>E. coli</i> U	0,240	0,234	0,239	0,224	1,02
<i>R. coli</i> T	0,227	0,215	0,229	0,221	0,98

wg Gandelmana, Zamenhofs i Chargaffa (54)

kom (adeniny): (tyminy) i guaniny): (cytozyny) bliskim jedności. Proporcje (adenina + tymina): (guanina + cytozyna), wynoszące 1,25 dla kwasu DN z *Rickettsia burnetti* i 2,58 dla *Rickettsia provazeki*, podkreślają odrębność gatunkową.

Ostatnią rewelacją w strukturze kwasów nukleinowych bakterii jest wykryta przez Dunna i Smitha (47, 48) w kwasach DN z *B. coli* 15 T⁻ i kilku innych organizmów nowa zasada purynowa: 6-metylo-

Tablica 9

Zawartość puryn i pirymidyn w kwasie DN z *B. coli* 15 T (różne warunki wzrostu)

Warunki wzrostu	Mol zasady/100 moli				
	Adenina	Guanina	Cytozyna	Tymina	6-metyloaminopuryna
Tymina (25 g/ml)	23,6	27,5	26,2	22,4	0,4
Tymina (1,5 g/ml) + 5-aminouracyl (10 ⁻³ M)	22,3	27,6	26,2	19,1	4,2

aminopuryna. Zawartość jej w kwasie DN z *B. coli* 15 T⁻ zmienia się w zależności od ilości tyminy w środowisku odżywczym i w przypadku bakterii wyrosłych wobec nadmiaru tyminy wynosi ok. 0,4% całości

zasad. W kwasach DN bakterii z pożywek o niskim stężeniu tyminy ilość ta zwiększa się do 4,2⁰/o przy równoczesnym spadku zawartości tyminy i adeniny (tablica 9). Nowa zasada purynowa występuje w ilości równoważnej 2⁰/o adeniny w kwasach DN z *B. coli*, *B. coli* K-12, *Aerobacter aerogenes*, podczas gdy odpowiednia wartość dla *Myc. tuberculosis* wynosi zaledwie 0,4⁰/o.

O ile dane dotyczące struktury kwasów DN bakterii są jeszcze bardzo skąpe, o tyle znajomość bakteryjnego kwasu RN jest prawie żadna. Pewne światło na skład kwasów RN bakterii rzucają badania Clinton i Parsons (40) nad *Clostridium perfringens*, Khouvine i wspóln. (72) nad *Mycobacterium phlei* oraz Shugara i Jarmolińskiej (108) nad bakteriami termofilnymi.

Analiza chromatograficzna puryn i pirymidyn w kwasie RN z *Myc. phlei* wykazała proporcje zasad azotowych na ogół zbliżone do odpowiednich wartości dla kwasów RN wyższych organizmów, tj. wyraźną przewagę puryn (2,33 : 1) oraz znacznie wyższą zawartość guaniny i cytozyny niż adeniny i uracylu. Stosunek puryn do pirymidyn w kwasie RN z *Cl. perfringens* był tylko nieznacznie wyższy od jedności (1,25), a w kwasach RN *B. subtilis* i pewnej bakterii termofilnej niemal równy jedności (tablica 10).

Tablica 10

Zasady azotowe kwasów RN, *Myc. phlei* i *Cl. perfringens*

Szczep	Pur Pirym.	Gu. Ad.	Cyt. Ur.	Autor
<i>Myc. phlei</i>	2,33	1,45	2,83	Khouvine i wspóln. (72)
<i>Cl. perfringens</i>	1,29	1,16	1,69	Clinton i Parsons (40)

Pewną dodatkową rolę kwasu RN w bakteriach sugerują badania Marshaka (81) nad zawartością puryn i pirymidyn w całości obu kwasów nukleinowych trzech szczepów *E. coli*, z których jeden szczep (szczep B/r) okazał się więcej odpornym zarówno na promienie Röntgena, jak i nadfiołkowe. Własność ta znalazła odbicie w odmiennym składzie jego kwasów nukleinowych. Odporny szczep B/r różnił się od szczepu macierzystego zawartością adeniny wyższą o 7⁰/o, guaniny o 41⁰/o, a cytozyny o 23⁰/o. Ilość uracylu, w zestawieniu ze szczepem wyjściowym, była niższa o 15⁰/o przy zawartości tyminy identycznej w obu szczepach (tablica 11). Wyraźna nadwyżka wszystkich zasad azotowych (w przybliżeniu 56⁰/o) w szczepie B/r, przy braku różnic w ilości tyminy,

prawdopodobnie znajduje uzasadnienie w zwiększonej zawartości kwasów RN.

Wydaje się, że cytoplazmatyczne kwasy RN odgrywają rolę pewnej ochronnej zasłony wokół części bakteryjnej komórki wrażliwej na działanie promieni tj. materiału jądrowego. Można się domyślać, że w życiowym cyklu bakteryjnej komórki mają miejsce okresy wzmożonej i niskiej wrażliwości na działanie czynników zewnętrznych i że znajdują one wytłumaczenie w odpowiednio niskiej i wysokiej zawartości kwasów RN.

Tablica 11

Zawartość puryn i pirymidyn w 3 szczepach *E. coli* (frakcja kwasonierozpuszczalna)
(Mikromole/mg suchej masy)

Szczep	Adenina	Guanina	Cytozyna	Uracyl	Tymina
B	0,118	0,150	0,119	0,068	0,026
B/r	0,127	0,212	0,147	0,058	0,026
K ₁₂	0,097	0,158	0,117	0,044	0,023

wg Marshaka (81)

Wielostronności wielkocząsteczkowej struktury bakterii dowodzą obserwacje Z a m e n h o f a i współpr. (133) dotyczące obecności w surowym preparacie kwasów nukleinowych z *Hemophilus influenzae* frakcji czynnej immunologicznie, o charakterze nie wielocukrów, ale zupełnie nowych niespotykanych nigdy dotąd wysokich polimerów, w których cukry, prawdopodobnie cząsteczki rybozy, są połączone ze sobą przez kwas fosforowy. Autorzy nadają tym związkom nazwę polirybofosforanów i proponują hipotetyczny wzór, który zamyka w sobie dwa łańcuchy polirybofosforanowe z zasadniczym 3 : 5 wiązaniem estrowym przez kwas fosforowy, połączone wzajemnie przez wiązanie 1 : 1 glikozydowe (tablica 12). Polirybofosforany dawałyby obraz łańcucha polirybofosforowego takiego, jaki występuje w kwasach RN, w którym miejsce puryn i pirymidyn zajęte byłoby przez drugi podobny łańcuch sprzężony z pierwszym wiązaniem glikozydowym. Z a m e n h o f i współpr. sugerują, że polirybofosforany są substancją macierzystą dla kwasów nukleinowych i zwracają uwagę na obecność tych związków w organizmach przedstawiających wcześniejsze stadium w rozwoju filogenetycznym.

Szczupłe ramy referatu nie pozwalają zamknąć w nich całości zagadnienia kwasów nukleinowych bakterii w tym aspekcie chemicznym, a zwłaszcza biologicznym, na jaki zezwala współczesny stan wiedzy. Fragmentaryczny zarys badań, przedstawiony na dzisiejszym sympozjum, spełni jednak swoje zadanie jeżeli uwypukli fakt, że gigantyczny

kompleks cukrowo-tłuszczowo-nukleoproteidowy, jaki reprezentuje drobna komórka bakteryjna, odznacza się niesłychanie bogatą strukturą nukleinową, która czeka na bardziej wnikliwe wejście bio-fizyko-chemiczne.

LITERATURA

1. Alexander H. E. i Leidy G., *J. Exp. Med.*, **93**, 345 (1951).
2. Alexander H. E. i Leidy G., *J. Exp. Med.*, **97**, 17 (1953).
3. Alexander H. E. i Redman W., *J. Exp. Med.*, **97**, 797 (1953).
4. Alloway J. L., *J. Exp. Med.*, **55**, 91 (1932).
5. Alloway J. L., *J. Exp. Med.*, **57**, 265 (1933).
6. Avery O. T., MacLeod C. M. i McCarty M., *J. Exp. Med.*, **79**, 137 (1944).
7. Baurhenn W., *Zentr. Bakt.*, **1**, Abt. Orig., **126**, 68 (1932).
8. Biełozierskij A. N., *Biochimia*, **1**, 255 (1936).
9. Biełozierskij A. N., *Mikrobiol.*, **8**, 504 (1939).
10. Biełozierskij A. N., *Mikrobiol.*, **9**, 107 (1940).
11. Biełozierskij A. N., *Mikrobiol.*, **10**, 185 (1941).
12. Biełozierskij A. N., *Mikrobiol.*, **14**, 29 (1945).
13. Biełozierskij A. N., *Mikrobiol.*, **15**, 93 (1946).
14. Biełozierskij A. N., *Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Bioll.*, **12**, 1 (1947).
15. Biełozierskij A. N., Bajlina G. D., *Biochimia*, **9**, 134 (1944).
16. Biełozierskij A. N., Kireenkowa E. G., *Mikrobiol.*, **12**, 32 (1943).
17. Biełozierskij A. N., *Wiestn. Mosk. Uniwersiteta* Nr. 2(1949); cyt. wg Szapota W. S., *Usp. Bioł. Chimii*, **1**, 115—142, Moskwa (1950).
18. Blix U., Hand C. N. i Stacey M., *Brith. J. Exp. Path.*, **35**, 241 (1954).
19. Boivin A., *C. R. Soc. Biol.*, **142**, 1258 (1948).
20. Boivin A., *Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol.*, **12**, 7 (1947).
21. Boivin A., Delaunay A., Vendrely R. i Lehoulty Y., *C. R. Acad. Sci.*, **221**, 718 (1945).
22. Boivin A., Delaunay A., Vendrely R. i Lehoulty Y., *C. R. Soc. Biol.*, **139**, 1046 (1945).
23. Boivin A., Delaunay A., Vendrely R. i Lehoulty Y., *Exper.*, **1**, 334 (1945).
24. Boivin A., Delaunay A., Vendrely R. i Lehoulty Y., *Exper.*, **2**, 139 (1946).
25. Boivin A. i Vendrely R., *Exper.*, **3**, 32 (1947).
26. Boivin A., Vendrely R. i Lehoulty Y., *C. R. Acad. Sci.*, **221**, 646 (1945).
27. Boivin A., Vendrely R. i Lehoulty Y., *C. R. Soc. Biol.*, **139**, 1047 (1945).
28. Boivin A., Vendrely R. i Tulasne R., *Arch. Sci. Physiol.*, **1**, 35 (1947).
29. Boivin A., Vendrely R. i Vendrely C., *C. R. Acad. Sci.*, **226**, 1061 (1948).
30. Brown E. B. i Johnson T. B., *J. Biol. Chem.*, **57**, 199 (1923).
31. Brown E. B. i Johnson T. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **45**, 1823 (1923).
32. Camien M. N., Salle A. J. i Dunn M. S., *Arch. Biochem.*, **8**, 57 (1945).
33. Caspersson T. i Thorsson K. G., *Klin. Wochschr.*, **31**, 205 (1953).
34. Chargaff E., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **12**, 28 (1947).
35. Chargaff E., *Exper.*, **6**, 201 (1950).
36. Chargaff E., *Feder. Proc.*, **10**, 654 (1951).
37. Chargaff E. i Moore D. H., *J. Biol. Chem.*, **155**, 493 (1944).
38. Chargaff E. i Saidel H. S., *J. Biol. Chem.*, **177**, 417 (1949).

39. Chargaff E., Zamenhof S., Brawerman G. i Kerin L., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 3825 (1950).
40. Clinton H. i Parsons I. R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **47**, 76 (1953).
41. Coghill R. D., *J. Biol. Chem.*, **90**, 57 (1931).
42. Daly M. M., Allfrey V. G. i Mirsky A. E., *J. Gen. Physiol.*, **33**, 497 (1950).
43. Dawson M. N., *J. Exp. Med.*, **51**, 123 (1930).
44. Dawson M. N. i Sia R. H. P., **54**, 681 (1931).
45. Dinzani M. U., *Exper.*, **6**, 332 (1950).
46. Dounce A. L., *Enzymologia*, **15**, 251 (1952).
47. Dunn D. B. i Smith J. D., *Nature*, **175**, 336 (1955).
48. Dunn D. B., i Smith J. D., *Biochem. J.*, **60** XVII (1955).
49. Dutta S. R., Jones A. S. i Stacey M., *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 613 (1953).
50. Ebel J. P., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **34**, 491, 498 (1952).
51. Ephrussi-Taylor H. i Laterjet R., *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 183 (1955).
52. Flösdorf E. W., Kimball A. C. i Chabers L. A., *Proc. Exp. Biol. Med.*, **41**, 122 (1939).
53. Freeland J. C. i Gale E. F., *Biochem. J.*, **41**, 135 (1947).
54. Gandelam B., Zamenhof S. i Chargaff E., *Biochim. Biophys. Acta*, **9**, 399 (1952).
55. Gale E. F. i Folkes J. P., *Nature*, **173**, 1223 (1954).
56. Gale E. F. i Folkes J. P., *Biochem. J.*, **59**, 661 (1955).
57. Gale E. F. i Folkes J. P., *Biochem. J.*, **59**, 675 (1955).
58. Gale E. F. i Folkes J. P., *Nature*, **175**, 592 (1955).
59. Griffith F., *J. Hyg. Cambridge, Eng.*, **27**, 113 (1928).
60. Henry H. i Stacey M., *Nature*, **151**, 671 (1943).
61. Henry H. i Stacey M., *Proc. Roy. Soc. Med. Ser. B. Biol. Sci.*, **133**, 391 (1946).
62. Henry H., Stacey M. i Teece E. G., *Nature*, **156**, 720 (1945).
63. Horoszewicz J., *Med. Doświad. Mikrobiol.*, **7**, 5 (1955).
64. Hotchkiss R. D., *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, **16**, 457 (1951).
65. Hotchkiss R. D., VII-th Ann. Symp. of the Biol. Division of the Oak Ridge National Laboratory, April, 1955. (Cyt. wg Glas B., *Science* **120**, 290 (1955)).
66. Johnson T. B. i Brown E. B., *J. Biol. Chem.*, **54**, 721 (1922).
67. Johnson T. B. i Brown E. B., *J. Biol. Chem.*, **54**, 731 (1922).
68. Johnson T. B. i Coghill R. D., *J. Am. chem. Soc.*, **47**, 2838 (1925).
69. Jones A. S., *Chem. a. Ind.*, **69**, 1067 (1950).
70. Jones A. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 607 (1933).
71. Jones A. S. i Marsh G. E., *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, 599 (1954).
72. Khouvine J., Barbier M. i Wyssmann L., *C. R. Acad. Sci.*, **236**, 2118 (1953).
73. Kłyszzejko L., *Post. Hig. Med. Doświad.*, **7**, 104 (1953).
74. Kłyszzejko L., *Post. Hig. Med. Doświad.*, **7**, 198 (1953).
75. Koenig V. L., *Science*, **121**, 439 (1955).
76. Koenig V. L., Larkins L. i Perrings J. D., *Arch. Biochem. Biophys.*, **39**, 355 (1952).
77. Laland S. G., Overend W. G. i Stacey M., *J. Chem. Soc.*, 303 (1952).
78. Laland S. G., Overend W. G., Webb M., *J. Chem. Soc.*, 3224 (1952).
79. Levene P. A., *J. Med. Research.*, **6**, 135 (1901).
80. Levene P. A., *J. Med. Research.* **12**, 251 (1904).
81. Marshak A., *Science*, **113**, 181 (1951).
82. Manniger R. i Nógrádi A., *Exper.*, **4**, 276 (1948).

83. McCarty M., *J. Exp. Med.*, **81**, 501 (1945).
84. McCarty M., *J. Gen. Physiol.*, **29**, 123 (1946).
85. McCarty M., *Bact. Rev.*, **10**, 63 (1946).
86. McCarty M. i Avery O. T., *J. Exp. Med.*, **83**, 89 (1946).
87. McCarty M. i Avery O. T., *J. Exp. Med.*, **83**, 97 (1946).
88. Mencil A. E. D. i Heidelberger M., *J. Biol. Chem.*, **124**, 89, 303 (1938).
89. Mirsky A. E. i Pollister A. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **28**, 344 (1942).
90. Mirsky A. E. i Pollister A. W., *J. Gen. Physiol.*, **30**, 117 (1946).
91. Mitchell P. i Moyle J., *Nature*, **166**, 218 (1950).
92. Mitchell P. i Moyle J., *J. Gen. Microbiol.*, **5**, 966 (1951).
93. Mitchell P. i Moyle J., *J. Gen. Microbiol.*, **10**, 533 (1954).
94. Neufeld F. i Levinthal W. Z., *Immunitätsforsch.*, **55**, 324 (1928).
95. Ogur M. i Rosen G., *Arch. Biochem. Biophys.*, **25**, 262 (1950).
96. Overend W. G., Stacey M., Webb M. i Ungar J., *J. Gen. Microbiol.* **5**, 268 (1951).
97. Rowen J. W. i Norman A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **51**, 524 (1954).
98. Ruppel W. G., *Z. Physiol. Chem.*, **26**, 215 (1898).
99. Schmidt G. i Thannhauser S. J., *J. Biol. Chem.*, **161**, 83 (1945).
100. Schneider W. C., *J. Biol. Chem.*, **161**, 293 (1945).
101. Schneider M. D., *J. Bact.*, **63**, 495 (1952).
102. Seibert F. B., *J. Biol. Chem.* **133**, 593 (1940).
103. Seibert F. B. i Watson D. W., *J. Biol. Chem.*, **140**, 55 (1941).
104. Sevag M. G., Lackman D. B. i Smolens J., *J. Biol. Chem.*, **124**, 425 (1938).
105. Sevag M. G., Smolens J. i Lackman D. B., *J. Biol. Chem.*, **134**, 523 (1940).
106. Sevag M. G., Smolens J. i Stern K. G., *J. Biol. Chem.*, **139**, 925 (1941).
107. Shugar D., *Post. Hig. Med. Doświad.*, **8**, 87 (1954).
- 108a. Shugar D. i Jarmolińska K., Doniesienie na VI Sympozjum Biochemików, 1955.
109. Siegel A., Singer S. J. i Wildman S. G., *Arch. Biochem. Biophys.*, **41**, 278 (1952).
110. Smith J. D. i Wyatt G. R., *Biochem. J.*, **49**, 144 (1951).
111. Smith J. i Stocker M. G. P., *Brith. J. Exp. Path.*, **32**, 433 (1951).
112. Smith J. W., Wilkinson J. F. i Duguid J. P., *J. Bact.*, **68**, 450 (1954).
113. Snellman O., Widstrom G., *Arkiv Kemi Mineral. Geol.* **19**, 1685 A (1945).
- 113a. Stacey M. i Webb M., *Nature*, **162**, 11 (1948).
114. Stokes J. L. i Gunnes M., *J. Bact.*, **52**, 195 (1946).
115. Vendrely R., *Un Symposium sur les Proteins*, Paris 1946.
116. Vendrely R., *Exper.*, **3**, 196 (1947).
117. Vendrely R. i Lehoulst Y., *C. R. Acad. Sci.*, **222**, 1357 (1946).
118. Vendrely R. i Lipardy J., *C. R. Acad. Sci.*, **223**, 342 (1946).
119. Vendrely R. i Tulasne R., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **34**, 785 (1952).
120. Vendrely R. i Tulasne R., *Nature*, **171**, 262 (1953).
121. Vendrely R. i Vendrely C., *Exper.*, **5**, 327 (1949).
122. Vischer E., Zamenhof S. i Chargaff E., *J. Biol. Chem.*, **177**, 429 (1949).
123. Webb M., *J. Gen. Microbiol.*, **3**, 410 (1949).
124. Webb J. M. i Levy H. B., *J. Biol. Chem.*, **213**, 107 (1955).
125. Weil A. J. i Binder M., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **66**, 349 (1947).
126. Winder F. i Denneny J. M., *Nature*, **174**, 353 (1954).
127. Winder F. i Denneny J. M., *Nature*, **175**, 636 (1955).
128. Wyatt G. R. i Markham R., *Biochem. J.*, **47**, VII (1950).

- 128a. Wyatt G. R. i Cohen S. S., *Nature*, **170**, 846 (1952).
129. Zamenhof S., Alexander H. E. i Leidy G., *J. Exp. Med.*, **98**, 373 (1953).
130. Zamenhof S., Brawerman G. i Chargaff E., *Biochim. Biophys. Acta*, **9**, 402 (1952).
131. Zamenhof S., Griboff G. i Marullo N., *Biochim. Biophys. Acta*, **13**, 459 (1954).
132. Zamenhof S., Leidy G., Alexander H. E., Fitzgerald P. L. i Chargaff E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **40**, 50 (1952).
133. Zamenhof S., Leidy G., Fitzgerald P. L., Alexander H. E. i Chargaff E., *J. Biol. Chem.*, **203**, 695 (1953).

ANTONI DMOCHOWSKI

Kwasy nukleinowe wirusów

Zakład Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego

Zadaniem niniejszego referatu jest próba omówienia, w szczytłych ramach naszego Sympozjum, współczesnych wiadomości o udziale kwasów nukleinowych w budowie wirusów oraz roli, odgrywanej przez te związki w działaniu wirusów na komórkę żywą.

Odpowiedź na oba powyższe pytania nie jest rzeczą ani wdzięczną, ani łatwą. Zagadnienie wirusów jest zagadnieniem tak obszernym i dotyczącym najistotniejszych właściwości substancji żywej, że nawet dokładne poznanie ich podstawowych składników chemicznych nie może rościć sobie pretensji do wyczerpania bezliku nasuwających się tematów.

Biochemia wirusów może być tylko częścią wirusologii ale, jak się stopniowo okazuje, tą częścią, która jest prawdopodobnie najbardziej powołana do wyjaśnienia istoty wirusów i mechanizmu ich działania.

Problemy wirusologii w ich ogólnym aspekcie (biologicznym i biochemicznym) były już rozpatrywane dokładnie na ostatnim grudniowym Sympozjum o biologii wirusów, toteż niniejszy przegląd stanowić będzie raczej uzupełnienie podanych wówczas wiadomości od strony znaczenia kwasów nukleinowych dla zbadania istoty wirusów, z jednoczesnym podaniem ostatnich osiągnięć w tej dziedzinie.

Wiele czasu musiało upłynąć od epokowego odkrycia Iwanowskiego (21) w 1892 roku do chwili uzyskania realnych danych, dotyczących chemii wirusów.

Dopiero wykrycie wirusa mozaiki tytoniowej przez Stanley'a (38) umożliwiło Bawdenowi i Pirie (5) w 1937 roku stwierdzenie jego budowy nukleoproteidowej. W tymże czasie Schlesinger (32) wykazał obecność dezoksyrybonukleoproteidu w bakteriofagach *E. coli*.

20 lat temu położono więc istotne fundamenty pod teorię nukleoproteidowej budowy wszelkich wirusów, a najnowsze badania zdają się

wykazywać, że nieprzeliczonej ilości form występowania wirusów odpowiada niemniejsza ilość ich składników chemicznych — nukleoproteidów, a może nawet i samych kwasów nukleinowych.

Nie możemy jeszcze w chwili obecnej podać żadnych reguł zależności form morfologicznych lub działania wirusów od obecności w nich takich lub innych kwasów nukleinowych, ale wiemy już, że takie reguły muszą istnieć i że ujawnienie ich jest tylko kwestią czasu.

Narazie stoimy wobec faktu, że najważniejsza cecha wirusów — ich zdolność reduplikacji w komórce żywej, jest funkcją t. zw. składnika nukleinowego, przy czym skala jakości i ilości tego składnika jest ogromna.

I tak jedne typy wirusów, jak np. dobrze poznane t.zw. „stałe” krystaliczne wirusy roślinne, zawierają kwas RN i to w ilościach od 5% do 40%, ale jednocześnie staje się prawdopodobne istnienie nieznanych jeszcze „niestałych” wirusów roślinnych, ogromnych rozmiarów, niekoniecznie budowy rybonukleoproteidowej, zbliżonych być może do t.zw. wirusów zwierzęcych (B r a k k e (7) i inni).

Diametralnie różne morfologicznie wirusy bakteryjne-bakteriofagi, zawierają tylko kwas DN i to w ilościach przekraczających nawet 40%, zaś wirusy owadów, drobny ułamek których jest nam dopiero znany, zawierają również kwas DN, w ilościach około 20%.

Gdy przechodzimy do t.zw. popularnie wirusów zwierzęcych, to natykamy całą gamę form występowania i takąż gamę zawartości kwasów RN i DN, oddzielnie lub razem.

Wirusy grupy „pox” np. wirus krowianki lub „*molluscum contagiosum*” zawierają jakoby kilka procent kwasu RN, a wirus grypy, według najnowszych danych (A d a i P e r r y) (1), (2) tylko kwas RN i to w ilościach około 0,8%.

Rybonukleoproteidowe, krystaliczne wirusy roślinne, jak np. wirus mozaiki tytoniowej (WMT), żółtej mozaiki rzepy (WMR), krzaczastości pomidorów i inne były od początku najdogodniejszym obiektem badań nad budową i lokalizacją składnika nukleinowego.

Dotychczasowe badania dotyczyły tylko ilości kwasów RN wirusów oraz kształtu i wielkości ich cząsteczek, ale od pewnego czasu punkt ciężkości przesuwa się w kierunku badań nad stosunkiem ilościowym poszczególnych składników purynowych i pirymidynowych odrębnych wirusów.

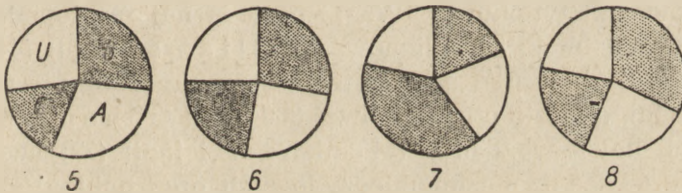
Współczesne prace dają nam powody do przypuszczeń, że świeżo opracowane metody oznaczania sekwencji nukleotydów w kwasach nukleinowych, podobnie jak i aminokwasów i łańcuchach peptydowych,

pozwolą nam wreszcie wykazać zależność charakterystycznych własności poszczególnych wirusów oraz ich odmian od drobnych różnic w ich budowie chemicznej. (Markham i inni) (27), (Knighth) (23). Nawet niewielkie różnice w trwałości wiązania kwasów RN z białkami, wywołane, być może, tą różną sekwencją elementów budowy stają się obecnie przedmiotem badań.

Tablica 1

	KRN %	w m o l a c h			
		Adenina	Guanina	Cytozyna	Uracyl
Wirus żółtej mozaiki rzepy	35	0,23	0,17	0,38	0,22
Wirus mozaiki tytoniowej	6	0,29	0,26	0,18	0,27
Wirus krzaczastości pomidorów	16	0,25	0,28	0,22	0,25
Wirus mozaiki fasoli	22	—	—	—	—
Wirus nekrozy tytoniu	17	—	—	—	—
Wirus pierścieniowatości tytoniu	40	—	—	—	—

Rozpatrzmy obecnie na paru choćby przykładach stan wiedzy o kwasach RN wirusów roślinnych.



*Skład nukleotydowy KRN wirusów roślinnych
(Markham 1953)*

*5-wirus mozaiki tytoniowej, 6-wirus krzaczastości pomidorów
7-wirus żółtej mozaiki rzepy, 8-KRN drożdży*

Rys. 1. Udział poszczególnych nukleotydów cząsteczek kwasu RN z trzech wirusów roślinnych oraz z drożdży. G — kwas guanilowy, A — adenilowy, C — cytydylowy, U — urydylowy.

Dla kilku wirusów zawartość kwasów RN i ilość poszczególnych składników purynowych i pirymidynowych jest już dobrze znana. Powyżej podajemy tabelę zawartości kwasów RN w procentach i zasad azotowych w molach (Markham i Smith) (28). Tabl. 1.

Wykres Markhama (27) ilustruje jaskrawo znaczne różnice w zawartości obu puryn i pirymidyn różnych wirusów roślinnych, przy czym odrębne szczepy mają w zasadzie skład jednakowy. (Rys. 1).

Kwas RN odczepiony z wirusa żółtej mozaiki rzepy, w ilości 35%, uważany jest za jeden z najczystszych preparatów RN otrzymanych dotychczas. Wirus ten występuje w dwóch formach kulistych, dających się rozdzielić zapomocą ultrawiwrowania. Tylko jedna z tych form zawiera kwas RN, druga jest czysto białkowa i ta szczęśliwa okoliczność pozwoliła po raz pierwszy stwierdzić niezbędność składnika nukleinowego dla procesu zakażenia rośliny.

Możemy jeszcze dodać, że wymiary obu form wspomnianego wirusa wynoszą około 23 milimikronów, ale masy cząsteczkowe ich są różne, a mianowicie 5 milionów i 3 miliony, zaś pojedynczej cząsteczki RN około 18 tysięcy (28).

Lokalizacja kwasu RN w WMR jest dość niespodziewana, gdyż, jak to już podał Prof. Baranowski na grudniowym Sympozjum wirusowym, znajduje się on w całości wewnątrz cienkiej wydrążonej kuli białkowej, grubości zaledwie paru milimikronów (Schmidt i inni) (33).

Takie rozmieszczenie wyklucza wyłączone jonowe wiązanie kwasu RN poprzez grupy fosforanowe z grupami NH_2 w zewnętrznej warstwie białkowej i wymaga zwinięcia łańcuchów nukleotydowych być może w rodzaj superspirali.

Wirus mozaiki tytoniowej (WMT) posiada najprawdopodobniej masę cząsteczkową około 50 milionów (Williams i inni) (44) i zawartość kwasu RN około 6%, a kwas ten występuje jakoby w formie spolimeryzowanej, o masie cząsteczkowej 300 000 (Cohen i Stanley) (11). Jednak nowsze badania (Markham i inni) (27) nad ilościami skrajnych grup 3,5-dwufosfonukleozydowych oraz nukleozydowych indywidualnych łańcuchów kwasów RN, zmniejszają wyżej wymienioną liczbę do kilkunastu tysięcy, tj. do napotykaney we wszystkich znanych kwasach RN.

Badania rentgenograficzne Watsona (42) wykazały z dużą dozą prawdopodobieństwa, że kwas RN wirusa mozaiki tytoniowej jest zlokalizowany wewnątrz pałeczek, stanowiąc oś lub osie dokoła których są nawinięte spiralne jednostki białkowe w ilości około 1200, o masie cząsteczkowej około 35 tysięcy każda. Ponieważ składają się one z dwóch podjednostek o charakterze odrębnych łańcuchów peptydowych mielibyśmy w rezultacie w jednej pałeczce WMT około 2500 łańcuchów. Podobną liczbę otrzymano również na drodze badań biochemicznych przez odczepianie treoniny przy pomocy karboksypolipeptydazy z WMT, a także z samego białka wirusowego. Wobec tego, że treonina stanowi jedyny skrajny aminokwas wszystkich łańcuchów pe-

ptydowych od strony kwasowej, to otrzymana wydajność 0,7% (Harris i Knight) (16), wskazywałyby na masę cząsteczkową jednej podjednostki ± 17000 , oraz ilość 2900 łańcuchów w jednej pałeczce WMT.

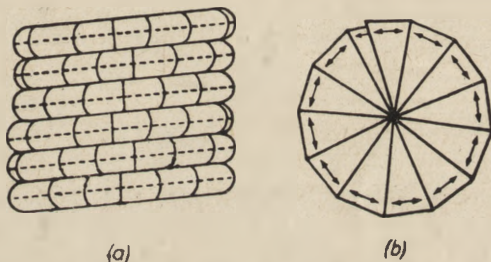
Energiczny rozkład WMT za pomocą siarczanu dodecyłu, a więc detergenta rozbijającego tylko słabe wiązania (głównie wodorowe), doprowadziły również do stwierdzenia metodą ultrawierowania wyłącznego występowania podjednostek o masie 10—20 tys.

Wszystkie te prace przemawiają zgodnie za koncepcją budowy cząsteczek WMT w postaci sztywnych wydrążonych pałeczek, złożonych z dwóch odrębnych części, wewnętrznej rybonukleinowej i zewnętrznej białkowej, utworzonej z ± 3000 jednakowych, luźno związanych zwiniętych spiralnie, podwójnych jednostek peptydowych o masie kilkunastu tysięcy każda. Ostatnie badania rentgenograficzne Franklin (12) dały nam szczegółowy obraz takiej pseudokrystalicznej pałeczki WMT, stwierdzając wybitną nieciągłość budowy i ustalając dokładne wymiary pojedynczych ogniw białkowych (Rys. 2).

Najnowsze badania (Schramm i Anderer) (34), (Braunitzer) (8), (Niu i Fraenkel-Conrat) (29) zapoczątkowały już serię prac nad sekwencją aminokwasów identycznych podjednostek i ustaliły kolejność: treonina-alanina — prolina od strony kwasowej oraz prolina-alanina — kwas glutaminowy od strony aminowej.

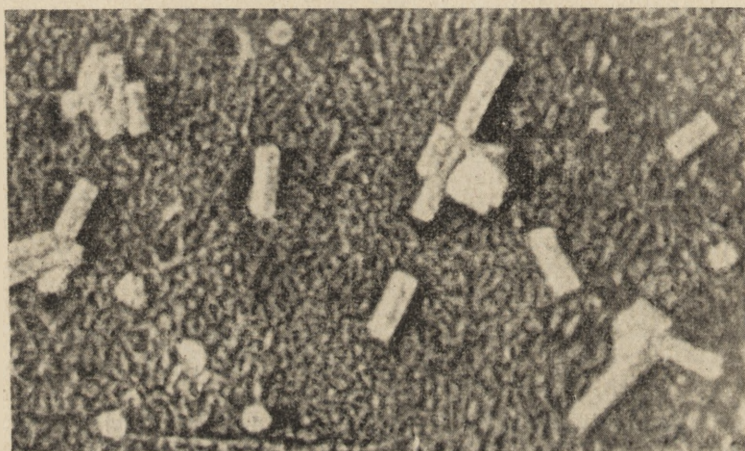
Knight (23) ustalił za pomocą działania karboksypolipetydazy, że wszystkie szczepy WMT mają identyczny skrajny składnik treoninę, natomiast u innych wirusów roślinnych np. u WMR te skrajne aminokwasy są różne. Powyższe badania oraz dane Markhama (27), stwierdzające różnice w końcowych grupach nukleotydowych np. 3,5-dwufosfonukleozydy u WMT, a 3-fosfonukleozydy u WMR nasuwają przypuszczenia ścisłej koordynacji budowy obu odpowiadających sobie rodzajów łańcuchów — aminokwasowych i nukleotydowych.

Jak skomplikowane jest jednak zagadnienie budowy i działania WMT to widać z prac Wanga i Comonera (41), którzy po normalnym wyciągnięciu roztworami buforowymi całego WMT izolowali przez dalszą ekstrakcję roztworem chlorku sodu jeszcze drugą frakcję, nazwaną



Rys. 2. Uproszczony schemat układu cząstek białkowych pałeczki wirusa mozaiki tytoniowej (bez kwasu RN). (a) Jednostki i podjednostki sześciu skrętoślubowych linii śrubowej w przekroju podłużnym. (b) 12 jednostek jednego skrętu w przekroju poprzecznym. Strzałki wskazują kierunek łańcuchów białkowych. (Franklin 1955).

przez nich I8, wprawdzie identyczną biologicznie, ale odrębną elektroforetycznie, o innym składzie aminokwasowym, a prawdopodobnie i nukleotydowym. Obok innych przypuszczeń wspomniani autorowie uważają za wielce prawdopodobne występowanie pośrednich produktów kompletnej syntezy WMT. Że istotnie produkty przejściowe istnieją, tego dowiedli ostatnio Jeener i inni (22). Izolowali oni dwa białka, immunologicznie zbliżone do WMT, t.zw. rozpuszczalne antygeny o niskiej masie cząsteczkowej, nieczynne biologicznie i nie zawierające kwasu nukleinowego. Wydawało się więc bardzo prawdopodobne, że część białkowa i kwas RN w wirusach roślinnych, zupełnie podobnie jak u wirusów zwierzęcych i bakteryjnych, są syntetyzowane oddzielnie, łącząc się następnie na pełny wirus. Warunki zewnętrzne powodujące zwolnioną syntezę kwasu RN, mogłyby wywołać nagromadzenie się od-



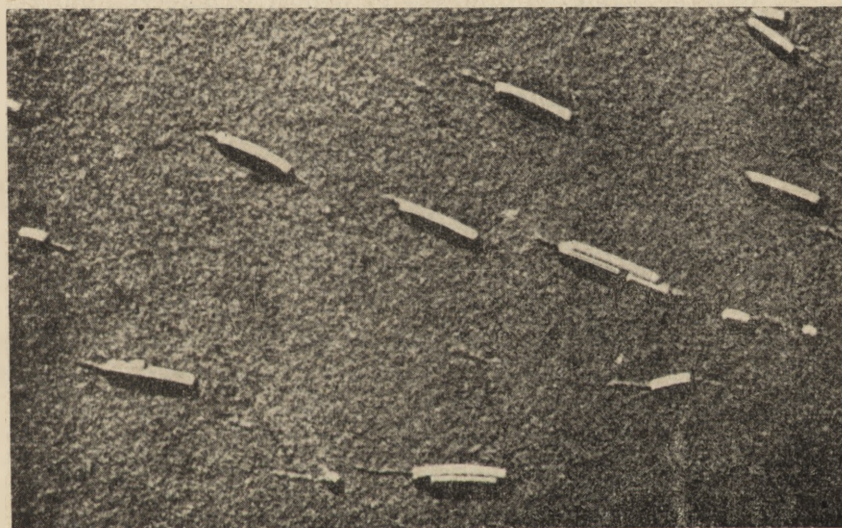
Rys. 3. Ułamki pałeczek wirusa mozaiki tytoniowej, nitki kwasu RN oraz „paciorki” białkowe, otrzymane przez degradację WMT w pH 10,3. \times 150 000. (Schramm 1955).

dzielnych składników białkowych. Pojawienie się w różnych fazach infekcji wirusem WMT określonych ciał białkowych, nieinfekcyjnych, bez kwasu nukleinowego, obserwowali także inni badacze np. Takahashi i Ishii (39), oraz Commoner i inni (10), a wszystkie te prace przemawiały zgodnie za luźnym powiązaniem obu składników wirusa t.j. białkowego i nukleinowego oraz za możliwością odrębnego ich występowania.

Poglądy te zyskały ostateczne potwierdzenie dzięki szybkim postępom mikroskopii elektronowej, umożliwiającym otrzymanie ostrych mikroelektronogramów w powiększeniach 150 tysięcy razy.

Schramm i inni (35) podali zdjęcia otrzymane po uprzednim elektroforetycznym rozdzielaniu produktów alkalicznego rozpadu WMT, a Hart (17) po rozczepieniu tego wirusa przy pomocy siarczanu dodecyłu.

W obu przypadkach otrzymane obrazy nie pozostawiają wątpliwości, że pałeczki WMT są w rzeczywistości rurkami nukleoproteidowymi, utworzonymi z połączonych w jedną linię śrubową drobnych ogniw białkowych, nawleczonych na podobieństwo koralu na nić (prawdopodobnie podwójną) z kwasu rybonukleinowego. Izolowane nitki nukleinowe były długie (do 3000 Å) lub krótkie, zależnie od warunków rozczepienia, ale jednakowej grubości 30—40 Å, a więc wymiarów podwójnego łańcucha nukleotydowego. Najmniejsze ogniwa białkowe mają przy tym budowę pierścieni zlepionych w całą gamę ułamków pałeczek różnej długości. (Rys. 3 i 4).



Rys. 4. Pałeczki wirusa mozaiki tytoniowej po ograniu z detergentami. Widoczne nitki kwasu RN wewnątrz cylindrycznych ułamków pałeczek WMT. $\times 60.000$. (Hart 1955).

Interesujące fakty, tłumaczące być może różnice symptomów zakażenia u pokrewnych odmian, podali Ginoza i inni (14). Wykryli oni w specjalnie otrzymanym, ale krystalicznym preparacie WMT barwny kompleks wirusa z nukleoproteidem zakażonej komórki roślinnej, kompleks czynny biologicznie, nie dający się rozdzielić elektroforetycznie, natomiast bardzo łatwo działaniem dwu- i trójwartościowych anionów np. buforem fosforanowym. Uszeregowanie rozczepiającego działania anionów wskazuje na prawdopodobne wiązanie chelatowe, a część barw-

na wynosząca zaledwie 0.2% całego kompleksu zawiera aż 37% kwasu RN. Różne odmiany WMT wykazywały przy tym różnice w powinowactwie komórkowej części barwnej do wirusów WMT, co może być w pewnym związku z różnicami symptomów napotykanymi w przyrodzie. Należy przypomnieć, że autorowie niemieccy już oddawna zauważyli różną siłę wiązania kwasu RN z białkiem u różnych szczepów WMT.

Badania G i n o z y są być może pierwszym krokiem do zrozumienia sposobów „włączania się” nukleoproteidów wirusowych w wir przemian materii komórki zakażonej oraz możliwości modyfikacji tych przemian i wzajemnych adaptacji, tak podkreślanych przez autorów radzieckich (T o w a r n i c k i j) (40).

Niezwykle dogodnym objektem badań biochemicznych są wirusy owadów, dzięki występowaniu w jądrach komórek licznych wtrętów o kształcie wielościanów. Wtręty te zawierają 3—5% wirusa uwięzionego w różnych stadiach rozwoju, czy to w postaci pałeczek otoczonych błoną, czy też kulistych podjednostek, o przekroju zaledwie 20 milimikronów.

Wirusy te można było otrzymać w stanie bardzo znacznej czystości, rozpuszczając wielościany rozcieńczonymi roztworami sody. Są to nukleoproteidy zawierające około 20% kwasu DN i stałe ilości żelaza. (B e r g o l d) (6). Znane są ponadto kuliste wirusy cytoplazmatyczne oraz t.zw. „kapsularne” z limfy owadów, gdzie wewnątrz kapsułki tkwi jedna pałeczka, składająca się również z kulistych podjednostek.

Frapujące elektronogramy całego cyklu rozwojowego wirusa jedwabnika otrzymali S m i t h i X e r o s (1953) (37). Pierwsze stadium — to powstanie w jądrze zbitej masy chromatynowej, t.zw. „siatki jądrowej”, z której najpierw oddzielają się pałeczki, a z nich kuleczki. Wirusy wylaniają się więc bezpośrednio z materiału komórkowego, a S m i t h uważa je wprost za wyróżnicowany produkt zmienionego metabolizmu komórki.

Gdy przechodzimy do właściwych wirusów zwierzęcych, to uderza nas wielka skala rozmiarów — od kilkunastu do trzystu milimikronów, przy czym kwas nukleinowy jest różnorodny.

Największe wirusy tego typu, z wyłączeniem grupy Psittacosis zaliczanych już obecnie do Rickettsiales, ujmowane są w najnowszym podziale wirusów w jedną grupę „poxwirusów”. Są to olbrzymy o wymiarach — 200 — 300 milimikronów, z wyraźnym t.zw. „jądrem” widocznym po strawieniu ciałek elementarnych pepsyną, a znikającym po dalszym trawieniu dezoksyrybonukleazą i na nowo pepsyną. Jądra te są więc bardzo podobne do jąder bakteryjnych, co podkreśla P e t e r s (30). Ciałka elementarne tych wirusów zawierają znaczne ilości kwasu DN i bardzo mało RN, a otoczone są błoną w rodzaju błony bakteryj-

nej. Stosunek kwasu DN do RN jest więc odwrotny niż u bakterii, natomiast prawie identyczny, jak u postaci przesączalnych „L” bakterii, gdzie znajdujemy kilkakrotnie większą ilość kwasu DN niż RN. Należy podkreślić, że rząd wielkości jąder bakteryjnych, postaci „L”, oraz wyżej omawianych wirusów jest zupełnie ten sam, wynosząc od około 100 do paru setek milimikronów.

Wirusy pośrednie co do wielkości, o rozmiarach kilkudziesięciu do ponad stu milimikronów, jak np. wirus grypy lub brodawczaka królika są niedostatecznie zbadane w swym składzie nukleinowym. Podaje się np. wartości do 9% kwasu DN u brodawczaka, a tylko wirus grypy został zbadany nieco dokładniej i A d a (1) (2) podaje w nim zawartość 0,8—1,0% kwasu RN, jako jedyne go składnika nukleinowego.

Co się tyczy zawartości kwasów nukleinowych w mniejszych kulistych wirusach, o wymiarach około 30 milimikronów, jak np. wirusa porażenia dziecięcego, żółtej febry, a wreszcie najmniejszych, jak wirusa pryszczycy o średnicy 19 milimikronów, to tutaj dane są zupełnie niepewne. W wirusie pryszczycy np. znaleziono jakoby kwas RN, a brak DN.

Bardzo ciekawe są badania i poglądy P o l s o n a (31) na budowę małych i mniejszych wirusów. Na zasadzie dokładnych pomiarów stałej sedymentacji i współczynnika dyfuzji, P o l s o n przyjmuje, że wszystkie te wirusy są zbudowane z kulistych podjednostek tej samej wielkości — 12 milimikronów. Tak więc wirus pryszczycy zawiera ich cztery, poliomyelitis — 16, a wirus afrykańskiej choroby koni o dwóch rozmiarach — 30 milimikronów i 50 milimikronów zawiera odpowiednio — 16 i 64 takich podjednostek.

Te cząstki średnicy 12 milimikronów, nie mające jednak zdolności zakażenia, byłyby cząstkami t.zw. antygeny rozpuszczalnego, wykrywanego wiązaniem dopełniacza. Byłyby one analogiczne do podjednostek wirusa grypy, wykrytych przez H o y l e'a i innych (19) w 1952 r. drogą zadziałania eterem na ciała elementarne i oddzielenia podjednostek antygeny od podjednostek hemaglutynin. Podjednostki antygeny wg. H o y l e'a (20) powstają w komórce dopiero po dwóch godzinach od chwili zakażenia i mają budowę rybonukleoproteidową, natomiast cząstki hemaglutynin budowę proteinową. Ponieważ A d a nie uważa śladów kwasu DN za składnik istotny wirusa grypy, staje się prawdopodobnym, że cały kwas RN należy właśnie do tych podjednostek antygeny rozpuszczalnego, tego pierwszego etapu tworzenia się wirusa w komórce zakażonej.

Wyżej wymienione poglądy na decydującą rolę kwasu RN w budowie wirusa grypy, znalazły zupełne potwierdzenie w pracach A d a i P e r r y (2) w 1955 roku. Stwierdzili oni paralelizm między infekcyjnością różnych szczepów wirusa grypy i ilościami kwasu RN, a ponadto

ciż sami autorzy (3) wykazali różny skład purynowy i pirymidynowy szczepów A i B. Stosunek (adenina + uracyl): (guanina + cytozyna) wyniósł odpowiednio 1,2 i 1,4, co odpowiada raczej stosunkom napotykanym zazwyczaj w kwasach DN, a nie RN (z wyjątkiem większości wirusów roślinnych). Fakt ten pozwala przypuszczać, że podobieństwa lub różnice w proporcjach składników azotowych poszczególnych kwasów nukleinowych wirusów mogą być równie ważnym źródłem podobnych lub różnych efektów biologicznych, jak przynależność do określonej grupy kwasów (DN lub RN).

Najwięcej wiadomości o roli kwasów nukleinowych w procesie tworzenia się wirusów zdołano uzyskać przy analizie skomplikowanego działania bakteriofagów na komórki bakteryjne, szczególnie fagów T_1 — T_7 na *E. coli*.

Przy zastosowaniu najsubtelniejszych metod izotopowych i odrębnym znakowaniu fosforu kwasu nukleinowego faga i siarki jego części białkowej, udało się po raz pierwszy wykazać H e r s h e y'owi i C h a s e (18) w 1952 roku, że w etapie ostatecznego przenikania faga do wnętrza drobnoustroju cała część białkowa główki i ogonka pozostaje nazewnątrz. Do wnętrza *E. coli* przenika wyłącznie cały kwas DN, znajdujący się, jak wiadomo, w ogromnej ilości, bo około 40% w główce faga.

Że kwas DN fagów *E. coli* posiada zupełnie odmienną budowę od DN *E. coli*, to stwierdzili już w 1952 roku W y a t t i C o h e n (45) izolując z nich nowy, nieznan dotychczas składnik pirymidynowy-hydroksymetylocytozynę, zastępującą zwykłą cytozynę.

Dalszym postępowaniem w tym kierunku było niespodziewane odkrycie przez S i n s h e i m e r a (36), a następnie V o l k i n a (47) w 1954 roku dodatkowego składnika węglowodanowego — glukozy, cząsteczki której nie są elementami łańcucha nukleinowego, ale prawdopodobnie są związane glukozydowo z grupą wodorotlenową hydroksymetylocytozyny.

Taka odrębność budowy kwasów DN faga od kwasu DNE. coli stwarza wyjątkowo dogodne warunki dla śledzenia kilkunastominutowego procesu replikacji faga, aż do chwili lizy komórki bakteryjnej, dając możliwość wnikięcia we wszystkie etapy stopniowej budowy fagów. Można już obecnie rozstrzygnąć sprzeczne poglądy co do udziału bądź całych cząsteczek kwasu DN z przenikającego faga, bądź tylko części składowych tegoż kwasu w procesie generacji nowych indywiduów faga. Po ostatnich pracach M a c k a l i K o z l o f f'a (25) nad fagiem T_7 , nadającym się najbardziej do tego rodzaju badań, można, zdaje się, już powiedzieć, że przemawiają one zdecydowanie za tą ostatnią koncepcją. Znakowane atomy fosforu i azotu kwasu DN faga znajdują się w potomnych fagach w zmienionych stosunkach molarnych, co przemawia za rozpadem wnikającego kwasu DN na bliżej nieokreślone składniki i dalszą

syntezą jego cząsteczek z całej puli tychże składników wytwarzanych w komórce bakteryjnej.

Ciekawe są zagadnienia, związane z lokalizacją i formą istnienia kwasu DN wewnątrz główki faga. Można wyliczyć, że całość ogromnej ilości kwasu jest zamknięta jakby w wydrążonej kuli białkowej, co wyklucza normalne wiązanie z grupami zasadowymi białek. Wiele przemawia za chelatowym wiązaniem z metalami, prawdopodobnie Ca lub Mg (Watson) (43). Takie luźne wiązania umożliwia proces t.zw. „wstrzyknięcia” kwasu DN do komórki, a samo istnienie subtelnej i chwiejnej równowagi kationowej może rzucić światło na zagadnienie indukcji lizy w lizogenicznych kulturach bakterii i przekształcania profagów w dojrzałe fagi.



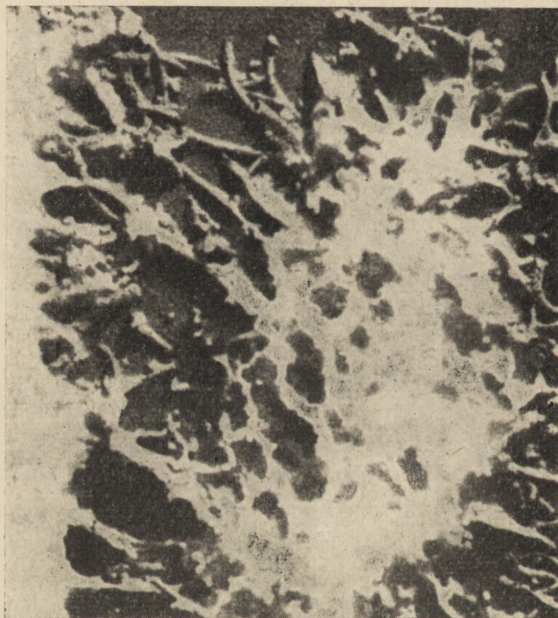
Rys. 5. Mikroelektronogram pojedynczego faga T₆, rozerwanego przez zmianę napięcia powierzchniowego. Nad pustą błoną główki faga ułożone koncentrycznie nitki kwasu DN. $\times 94.000$ (Fraser 1953).

Współczesna technika mikroskopii elektronowej umożliwia nam ujrzanie całości kwasu DN, uwolnionego przez nagłą zmianę napięcia powierzchniowego z jednego jedyne go faga, a okazało się, że ilość ta

jest rzędu 10^{-16} g. Obok pozostałego t.zw. „cienia”, zawierającego całą białkową strukturę faga (Fraser i Williams) (13), widzimy pojedyncze niteczki kwasu i to o spodziewanej teoretycznie grubości około 20 Å. (Rys. 5).

Te mikroelektronogramy najzupełniej tłumaczą wspomniane wyżej frapujące doświadczenia Hershey'a, narzucając nam hipotezę cząstek kwasu DN w główce faga nie związanych na nukleoproteidy, a tylko zwiniętych w kłębuszki czy też superspirale, gdzie wiązania wodorowe i chelatowe odgrywają główną rolę.

Ten krótki przegląd najnowszych osiągnięć nauki o kwasach nukleinowych wszelkich wirusów domaga się już obecnie jakiejś ogólnej interpretacji.



Rys. 6. Masy cząstek wirusa grypy, wyłaniające się z zakażonej komórki. $\times 8.200$. (Wyckoff 1954).

Szukając logicznej odpowiedzi na trudne pytania, dotyczące istoty i tworzenia się wirusów, widzimy, że w ostatnich czasach punkt ciężkości najważniejszego zagadnienia tyżącego się procesu reduplikacji wirusów po pierwsze przesuwa się na samą komórkę żywiciela, po drugie uwypukla coraz bardziej rolę kwasów nukleinowych w procesie.

Dawna teoria wirusa — pasożyta usuwa się coraz bardziej w cień i ma coraz to mniej zagorzałych zwolenników, jakimi np. są Burnett (9) lub Ryzkow (31a). Na jej miejsce zjawia się hipoteza, że wirus

jest produktem sił proteino-twórczych komórki żywiciela, przestawionych z dróg normalnego metabolizmu na nowe tory, czasami obojętne lub symbiotyczne, czasami zabójcze dla życia komórki. Najistotniejszym momentem jest wtargnięcie i mniej lub więcej posunięta adaptacja tego nowego aparatu wytwórczego (w rodzaju specyficznego zestawu obrabiaerek), noszącego charakter obcych kwasów nukleinowych (u pewnych wirusów DN, u innych RN).

Cały szereg najwybitniejszych wirusologów zdecydowanie głosi różne warianty tej teorii. Jeden z jej pionierów — Bauer twierdzi wprost (4), że „wirus grypy to krople schorzałej cytoplazmy komórki” o kształcie określonym przez warunki otoczenia oraz, że „wirusy są ściśle zbliżone do normalnych składników komórki i mogą z nich powstawać”, Wyckoff (46) na zasadzie swych mikroelektronogramów (Rys. 6), uważa również wspomniany wirus za produkt czynności cytoplazmy, a Hoyle (20), autor teorii 12 milimikronowych rozpuszczalnych podjednostek wirusa grypy jest podobnego zdania. O analogicznych poglądach Kenneth-Smitha na istotę wirusów owadów była już mowa poprzednio, przy czym zwalcza on pogląd, że wirus jest odrębną istotą żywą.

Spory dotyczące zasadniczego charakteru bakteriofagów, są nie mniej gorące, że przypomnę tutaj poglądy radzieckiego wirusologa — Krissasa (1953), od szeregu lat wysuwającego teorię czysto biokatalitycznego charakteru bakteriofagów i podkreślającego spiralny układ jednostek białkowych w główce faga (24).

Fakt przenikania bezbiałkowego kwasu DN faga do wewnątrz komórki bakteryjnej, zupełnie wystarczający do zainicjowania błyskawicznej multiplikacji fagów czy profagów, musi być traktowany jako jeden z argumentów przemawiających za endogennym pochodzeniem co najmniej większości wirusów.

Zreferowane tutaj współczesne poglądy na powstawanie wirusów okażą się, być może, kiedyś tylko przejściowymi hipotezami, jednak najnowsze kierunki badań nad budową kwasów nukleinowych i nukleoproteidów, w oparciu o szybki rozwój mikroskopii elektronowej dają nam rękojmię, że już w niedalekiej przyszłości zdobędziemy wystarczające dane do skonstruowania wszechstronnej teorii wirusów i ich stosunku do substancji żywej.

ADDENDUM

W ostatnich miesiącach 1955 r. ukazało się wiele wybitnych prac z dziedziny wirusologii, ściśle związanych z zagadnieniami poruszonymi w naszym artykule.

Fraenkel-Conrat i Williams (Proc. Nat. Ac. of Sc., U.S.A., 41, 690, 1955) ogłosili pracę nad udaną „resyntezą“ cząsteczek WMT, rozłożonych przy pomocy detergentów w pH 8,5, na część białkową i nukleinową, a następnie zrekonstruowanych na czynnik aktywny przez połączenie składników w pH 6.

Schaeffer i Schwerdt (Proc. Nat. Ac. of Sc. U.S.A. 41, 1020, 1955) otrzymali wirus porażenia dziecięcego (Poliomielitis) w postaci krystalicznej. Jest to pierwsza krystalizacja t.zw. wirusa zwierzęcego.

Herćik (Biochim. Biophys. Acta, 18, 1, 1955) podał mikroelektronogramy ilustrujące przebieg penetracji i rozwoju bakteriofaga T_2 wewnątrz *E. coli*, przemawiające do pewnego stopnia za teorią endogennego powstawania fagów.

Za endogenną teorią wirusów przemawiają również doświadczenia Lepine, Croissant i Wyckoff (Ann. Inst. Pasteur, 90, 13, 1956) nad kolejnymi etapami rozwoju wirusa Poliomyelitis w komórce zakażonej.

Odrębne stanowisko zajmuje nadal Ryżkow (Żurn. Obszcz. Biol. 1955) podając teorię t. zw. „wirospor“ syntezę swych dotychczasowych poglądów na istotę wirusów jako odrębnych istot żywych.

LITERATURA

1. Ada G. Z. and Perry B. T., Austr. J. Exp. Biol., **32**, 453 (1954).
2. Ada G. Z. and Perry B. T., Nature, **175**, 209 (1955).
3. Ada G. Z. and Perry B. T., Nature, **175**, 854 (1955).
4. Bauer D. J. „The nature of virus multiplication”, **73**, 76, Cambridge, (1953).
5. Bawden F. C. and Pirie N. W., Proc. Roy. Soc. B., **123**, 274 (1937).
6. Bergold G. H. and Holoway C. F., Science, **117**, 251 (1953).
7. Brakke M. U., Black L. M. and Wyckoff R. W. G., Am. J. Bot., **38**, 332 (1951).
8. Braunitzer G., Naturwiss., **42**, 371 (1955).
9. Burnet M. F., Endeavour, **14**, 4 (1955).
10. Commoner B., Jamada M., Rodenberg S., Wang T. and Basler E., Science, **118**, 529 (1953).
11. Cohen S. S. and Stanley W. M., J. Biol. Chem., **144**, 589 (1942).
12. Franklin R. E., Nature, **175**, 379 (1955).
13. Fraser D. and Williams R. C. Proc. Nat. Acad. U.S.A., **39**, 750 (1953).
14. Ginoza W., Atkinson D. E., and Wildman S. G., Science, **119**, 269 (1954).
15. Harris J. I. and Knigh C. A., Nature, **170**, 613 (1952).
16. Harris J. I. and Knigh C. H., J. Biol. Chem., **214**, 215 (1955).
17. Hart R. G., Proc. Nat. Acad. U.S.A., **41**, 261 (1955).
18. Hershey A. D. and Chase M., J. Gen. Physiol., **36**, 39 (1952).
19. Hoyle L., Reed R. and Astbury W. T., Nature, **171**, 256 (1952).
20. Hoyle L. „The nature of virus multiplication”, 239, Cambridge, 1953
21. Iwanowski J. D. St. Petersb, Acad. **35**, 67 (1892).

22. Jeener R., Lemoine P. et. Lavand'homme C. *Biochim. et Biophys. Acta*, **14**, 321 (1954).
23. Knight C. A., *J. Biol. Chem.*, **214**, 231 (1955).
24. Kriss A. E., *Usp. Sowl. Biol.*, **36**, 346 (1953).
25. Mackal R. P. and Kozloff L. M., *J. Biol. Chem.*, **209**, 83 (1954).
26. Markham R., „Nature of virus multiplication”, 93, Cambridge, 1953.
27. Markham R., Matthews R. E. T., Smith J. D., *Nature*, **173**, 537 (1954).
28. Markham R. and Smith J. D. „The Proteins”, *Acad. Press N. Y.*, 76, 1954.
29. Niu C. L. and Fraenkel-Conrat H., *Biochim. et Biophys. Acta*, **16**, 597 (1955).
30. Peters D. and Streckenius W., *Nature*, **174**, 224 (1954).
31. Polson A., *Nature*, **172**, 1154 (1953).
- 31a. Ryzkow W. L. *Priroda*, **3**, 32 (1955).
32. Schlesinger M., *Nature*, **138**, 508 (1936).
33. Schmidt P., Kaesberg, P. and Seaman W. W., *Biochim. et Biophys. Acta*, **14**, 1 (1954).
34. Schramm G. und Anderer F. A., *Naturwiss*, **42**, 74 (1955).
35. Schramm G., Schumacher G. und Zilling W., *Nature*, **175**, 549 (1955).
36. Sinsheimer R. L., *Science*, **120**, 551 (1954).
37. Smith K. M. and Xeros N., *Nature*, **172**, 670 (1953).
38. Stanley W. M., *Science*, **81**, 644 (1935).
39. Takahashi W. and Ishii M., *Am. J. Bot.*, **40**, 85 (1953).
40. Towarnickij W. I. „Uspiechi Biologiczeskoj Chimii”, 171, Moskwa 1950.
41. Wang T. J. and Commoner B., *Science*, **120**, 1001 (1954).
42. Watson J. D. „The nature of virus multiplication”, 171, Cambridge, 1953.
43. Watson J. D., *Biochim. et Biophys. Acta*, **13**, 10 (1954).
44. Williams R. C., Backus R. and Steere R. L., *Am. Chem. Soc.* **73**, 2062 (1951).
45. Wyatt G. R. and Cohen S. S., *Nature*, **170**, 1072 (1952).
46. Wyckoff R. W. G., *Nature*, **173**, 422 (1954).
47. Volkin E., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 5892 (1954).

BOHDAN RODKIEWICZ, ALEKSANDRA PRZEŁĘCKA, HANNA POZNAŃSKA

Kwasy nukleinowe w komórce

Zagadnienie występowania i metabolizmu kwasów nukleinowych interesuje zarówno biochemika jak i cytologa. Biochemik powinien znaleźć potwierdzenie swoich koncepcji i hipotez na terenie cytologii, bo przecież w ostatecznym rachunku przeważająca ilość tych procesów odbywa się w komórce. Z drugiej strony cytolog nie może ograniczyć się do opisów czysto statycznych, a musi włączyć je do ogólnofizjologicznych procesów organizmu.

Rozwój badań nad kwasami nukleinowymi, rozwój metod biochemicznych w tej dziedzinie a następnie przystosowanie wielu z nich do prac cytologicznych pozwala na coraz dokładniejsze poznanie nie tylko rozmieszczenia kwasów nukleinowych w komórce, lecz także na wysuwanie hipotez dotyczących ich roli.

Jakkolwiek metody te nie są absolutnie bez zarzutów, to jednak stosowanie ich dostarcza stale coraz to nowych ciekawych faktów (38, 45, 61, 100, 115, 138). Kwasy nukleinowe wykryto w latach 70 w. XIX, ale dopiero praca Feulgena i Rossenbecka (1924) pozwoliła oznaczyć cytochemicznie KDN oraz obaliła błędny pogląd o istnieniu odrębnych kwasów — dla zwierząt tymonukleinowego, a u roślin drożdżowego. Pojawiły się setki publikacji, które dowodziły, że w jądrach wszystkich organizmów występuje KDN. W czasie kariokinezy skupia się on w chromozomach, natomiast w interkinizie znajduje się w granulacjach lub siateczce chromatynowej — w strukturach odpowiadających chromozomom. Struktury te, podobnie jak chromozomy, miały być identyczne w jądrach organizmów danego gatunku. Ostatnio coraz częściej pojawiają się jednak prace podważające ten pogląd (102, 103, 110, 118, 133). Na symposium niemieckiego Towarzystwa Biochemicznego mówi się wyraźnie o homogenności badanych przyżyciowo w mikroskopie świetlnym jąder interkinetycznych (96). Hughes w swojej monografii „Mitotic Cycle” stwierdza, że chromozomy tworzą się w profazie i że w jądrze interkinetycznym nie dają się rozpoznać (79).

Na wspomnianym już sympozjum twierdzi się, że jądro komórkowe pod względem budowy chemicznej przedstawia jednorodny żel z nukleoprotamin, w którym nie można wykazać żadnych widzialnych struktur. Żel ten jednak posiada właściwości łatwego tworzenia włókien (55).

W jądrach, w których występowanie struktur interkinetycznych nie ulega wątpliwości, obserwuje się często, że zależą one od stanu fizjologicznego komórki. Hocqette zanotował gromadzenie się lub zanik prochromozomów w jądrach komórek fasoli zależnie od dopływu pokarmu (74, 75, 90). Wg Makarowa substancja chromatynowa — a więc i nukleoproteidy, znajduje się w jądrze interfazowym w stanie zolu (102, 103).

Za słuszością poglądów o niestałości struktur jądrowych przemawia ostatnia praca Mazia. Podaje on, że po zadziałaniu na komórkę czynnikiem wiążącym Ca lub Mg — np. kwasem etylenodwuaminoczwerooctowym następuje rozpad chromozomów na fragmenty o długości około 4000A i 200A szerokości. Wiadomo zaś z wcześniejszej pracy Roskina, że Ca jest bardzo ruchliwym składnikiem komórki. Gromadzi się on podczas kariokinezy w chromozomach, w interkinezie rozprasa się po całej komórce. W interkinezie znika więc z jądra czynnik, który między innymi warunkuje strukturę chromozomów (106, 145).

Preparaty utrwalone wykazują na ogół zróżnicowanie jąder interfazowych, jednak zagadnienie to rozstrzygnąć mogą tylko badania przyżyciowe. Stwierdzenie struktur interkinetycznych w badanych przez Casperssona (29) przyżyciowo jądrach różnych komórek negują Brumberg, Roskin i in. twierdząc, że są to artefakty, spowodowane samą techniką badania, mianowicie uszkodzeniem komórki przez promienie U.V. (25, 26, 92, 146).

Podział substancji chromatynowej — a więc i KDN — między komórki potomne odbywa się bardzo dokładnie podczas kariokinezy. Chromozomy dzielą się podłużnie na połowy, dzięki czemu każde jądro nowopowstałe otrzymuje identyczne genomy. Fakt ten był tak uderzający, że odrzucano w zasadzie możliwość istnienia innych pełnowartościowych typów podziałów jądra, jako nie gwarantujących tak równomiernego rozdziału chromatyny. Amitotyczny podział jąder uznano za wyraz stanu patologicznego komórki, tymczasem badania lat ostatnich wykazały, że zachodzi on nie tylko w komórkach podlegających działaniu pewnych czynników patogennych (137), czy w kulturach tkankowych (142), lecz także w normalnie rozwijających się organizmach (50, 82, 120, 139, 141).

Występowanie rozdziału chromatyny poprzez kariokinezę starano się wykazać we wszystkich grupach organizmów (ref. 87) — a więc i u bakterii — prace te jednak spotykają się stale z bardzo poważną krytyką (10, 11, 56, 67).

Od dawna kwestionowano powszechność występowania KDN w jądrach. Co pewien czas pojawiały się prace o braku KDN w niektórych komórkach. Negatywne wyniki przypisywano błędom technicznym (badaczy (117). Mimo że błędy takie rzeczywiście miały nieraz miejsce, okazało się jednak faktem, że w niektórych komórkach KDN nie daje się wykryć dostępnymi obecnie metodami cytochemicznymi. Takimi komórkami są u niektórych organizmów zwierzęcych i roślinnych komórki jajowe, przynajmniej w pewnym okresie swego rozwoju. Czasami pozbawione są KDN również gamety męskie — np. miłorzębu (5, 54, 43, 62, 99, 104, 149, 168, 169). Wg badań L u d w i g a (99) w okresie pierwszych podziałów w embriogenezie u szczura następuje okresowe uwalnianie się grup aldehydowych od cząsteczek KDN, wtedy reakcja Feulgen a jest negatywna.

Równolegle z tymi badaniami toczy się dyskusja na temat ilości KDN w jądrach komórek jednego gatunku. Większość autorów stoi na stanowisku, że ilość KDN jest stała dla komórek danego gatunku. Wysłunięto nawet prawo stałej ilości KDN mające zastąpić prawo stałej ilości chromozomów („prawo” Boivin — Vendrely). Różnice obserwowane wynikają wg nich tylko na skutek występowania w obrębie różnych tkanek tego samego organizmu jąder poliploidalnych — to znaczy o zwiększonej ilości chromozomów. Ilość KDN będzie wtedy ściśle proporcjonalna do ilości genomów. (68, 79, 111, 130, 173, 172, 170, 165).

Rozpatrując prace tych autorów można zauważyć dość duże wahania w danych ilościowych. Już sam błąd wynikający z metod stosowanych wynosi niekiedy kilkanaście procent, często więc operuje się wobec tego jedynie przybliżonymi wielkościami przeciętnymi.

Inna grupa badaczy przedstawia wyniki sprzeczne z powyższymi. Wg nich zarówno w obrębie tkanki jak i w różnych okresach rozwoju, ilość KDN jest niejednakowa. Zmienia się ona zależnie od funkcji i stanu fizjologicznego komórki. Do grupy tej należą tacy badacze jak Lison, Pasteels, Govaert i in. (6, 46, 64, 66, 98, 127, 128, 148, 183).

Alfert i Swift zaatakowali słuszność wniosków wyciąganych z ich prac, przypisując je błędom metody, Pasteels i jego współpracownicy stoją jednak nadal na tym stanowisku wykazując w badaniach eksperymentalnych zwiększenie ilości KDN w komórkach o wzmożonej aktywności podziałowej (126).

Ciekawy jest też fakt zaobserwowany przez Roskina. Stwierdził on, że w komórkach czuciowych układu nerwowego szczurów i królików znajduje się mniej KDN i KRN niż w komórkach ruchowych tego układu (148).

Bardzo wyraźne różnice w zdolności barwienia się jądra można otrzymać w warunkach eksperymentu. W tkankach organizmów poddanych

działaniu różnych czynników np. sulfamidów może zupełnie zanikać okresowo pozytywna reakcja na odczynnik *F e u l g e n a*. Podobnie u roślin hodowanych na bezfosforowej pożywce reakcja ta wychodzi słabo lub nawet zanika (2, 46, 52).

Odkrycie, że komórki jajowe a więc wyjściowe dla organizmu mogą być pozbawione KDN, świadczy naszym zdaniem decydująco przeciw prawu stałości KDN. Zresztą jeden z najwybitniejszych badaczy kwasów nukleinowych — *D a v i d s o n*, sam stronnik tezy o stałości KDN, mówi o niesłuszności ujmowania pojęcia tego tak, jak stałych fizycznych. *D a v i d s o n* twierdzi, że pewne wahania są dopuszczalne (4), ale w takim razie trudno już właściwie mówić o prawie „stałości”.

KDN występuje w komórce nie tylko w jądrze — chociaż tak sądzono do niedawna — ani też nie jest z nim nierozzerwalnie związany. Znalaziono KDN w mitochondriach (182) oraz w plastydach komórek roślinnych (33, 109, 154). Tego rodzaju sygnały są jeszcze nieliczne i niezbyt pewne, natomiast z dużą pewnością ogromne ilości KDN występują w cytoplazmie jaj różnych zwierząt (17, 57, 58, 76, 153). W wielu wypadkach zanotowano występowanie KDN w jąderkach, bądź jako składnika sporadycznego, bądź stałego i to zarówno w komórkach roślinnych jak i u zwierząt (3, 6, 85, 86, 121, 162). W zasadzie jąderka zawierają tylko KRN.

Kwasy nukleinowe można z jąder wytrącić działaniem różnych czynników jak trypaflawina, hydrochinon, podwyższona temperatura i in. KDN przedostaje się wówczas do cytoplazmy w postaci kuleczek lub nitek i przez dłuższy czas tam pozostaje, komórki zaś mimo to żyją nadal i zdolne są do różnicowania się (49, 89, 180).

KDN może przenikać z komórki do komórki. W czasie mikrosporoogenezy u wielu roślin okrytonasiennych stwierdzono przechodzenie substancji *F e u l g e n* — pozytywnej z komórek warstwy wyściełającej do komórek macierzystych pyłku lub z jądra do cytoplazmy (35, 157, 178). Podobnie *K o l l e r* przypuszcza, że dane dotyczące mitozy i przetrwania ułomnych ziaren pyłku w bezpośrednim otoczeniu zdrowych świadczą o możliwości przenikania materiału — jak mówi — genowego, a więc KDN poprzez błonę plazmatyczną komórek. Podobne zjawiska przenikania KDN przez błonę jądrową i plazmatyczną obserwowano także w komórkach zwierzęcych — w materiale patologicznym, jak zrakowacenia, oraz w normalnym procesie dojrzewania komórek jajowych w niektórych grupach systematycznych (88, 151, 152, 177).

Takie same zjawiska opisywano jeszcze częściej dla KRN. Całe jego cząsteczki lub ich części składowe przechodzą przez błony komórek (53, 159). Przy kiełkowaniu fasoli t. zw. zapasowy KRN z liścieni przechodzi do stożków wzrostu w postaci cząstek większych niż nukleotydy (123).

Drugi typ kwasów nukleinowych — KRN — jest niemal wszechobecny w komórce. Występuje on zarówno na terenie cytoplazmy jak i jądra komórkowego. W dojrzałych komórkach prawie cały KRN jest w postaci związanej, w młodych — embrionalnych do 80% jest w postaci wolnej (31). KRN gromadzi się w komórce w szeregu mniej lub bardziej trwałych organoidów jak mikrosomy, mitochondria. Występuje w jąderku i w jądrze komórkowym, na chromozomach i wrzecionie kariokinetycznym (40, 80, 140). Stwierdzono jego obecność w otoczce jaj niektórych zwierząt (119). Można ułożyć ziarnistość cytoplazmy według wzrastającej ich wielkości, od najmniejszych mikrosomów poprzez większe mikrosomy do mitochondriów, a u roślin dodatkowo do plastydów — przy czym wyraźnie daje się zaobserwować, równolegle do zwiększonych wymiarów tych granulacji, spadek procentowej zawartości w nich KRN (34). Wiąże się to prawdopodobnie z gromadzeniem się tam syntetyzowanego białka (84, 91, 176).

Najbogatsze w KRN są mikrosomy. Zawierają one około 60% całej jego ilości obecnej w komórce (34, 119). Mitochondrialny KRN grupuje się w drobnych ziarenkach znajdujących się w otoczce mitochondrium. Mimo swego ogromnego znaczenia w fizjologii komórki — mitochondria — stanowiące siedlisko wielu enzymów, KRN, — mogą, jak to wykazał eksperymentalnie dla komórek roślinnych P. D a n g e a r d, zanikać i powstawać *de novo* (37).

Powiązanie KRN z białkiem w mitochondriach jest rozmaite. Działanie rybonukleazy nie dosięga około 15 — 30% KRN mitochondriów. Pomimo usunięcia około 70% KRN wykazują one jednak prawie niezmienną aktywność enzymatyczną, którą niszczy dopiero dodatek proteaz. Wystarcza tu minimalna ilość proteazy, często taka, jaka występuje jako zanieczyszczenie preparatów enzymatycznych, otrzymywanych niektórymi metodami. Świadczy to o decydującym znaczeniu białek dla aktywności enzymatycznej mitochondriów (131).

Ilość KRN w komórkach waha się bardzo znacznie. Zmiany te wiążą się zwykle ze stanem funkcjonalnym komórki. Duży wzrost zawartości KRN obserwuje się przede wszystkim w strefach intensywnej produkcji białek, a więc w tkankach embrionalnych i twórczych oraz gruczołowych. Pierwszymi badaczami, którzy udokumentowali oryginalnymi metodami cytochemicznymi ten fakt, byli Brachet i Caspersson (12, 13, 14, 28, 29). Typowym przykładem takiej tkanki gruczołowej bogatej w KRN są gruczoły przędne owadów i pajaków, gdzie uderza ogromna ilość KRN zlokalizowana w części sekrecyjnej gruczołu (20, 21). Dla wielu tkanek ustalono wyraźną zależność między poziomem KRN w cytoplazmie a produkcją sekrecji (65, 97, 150).

Jak już wspomniano zmiany w ilości KRN wiążą się ze stanem fizjologicznym komórki. Obserwowano zmiany w ilości KRN w komórkach wątroby u szczurów jako wynik wstrząsów pourazowych (116). W okresie ciąży, laktacji notuje się wzrost ilości KRN (45). Podobnie przy sztucznym pobudzeniu aktywności komórek wątroby szczura obserwowano w nich pojawianie się struktur zawierających KRN (160). Odwrotnie — hamowanie aktywności np. poprzez głodzenie doprowadza do zmniejszenia ilości KRN w komórkach. Zjawisko to obserwowano zarówno u zwierząt (39) jak i u roślin, gdzie głodzenie eksperymentalne doprowadzało do zmniejszania się a nawet całkowitego zaniku jąderek (90, 122). Straty KRN cytoplazmatycznego powodowane przez dietę głodową u zwierząt odbywają się przede wszystkim kosztem mikrosomów, natomiast w mitochondriach zawartość pozostaje niezmieniona (171, 179).

Korelacja między występowaniem KRN a produkcją białek nasunęła myśl o udziale KRN w syntezie białkowej. Punktem wyjściowym tych koncepcji były wspomniane już prace Brachet'a i Caspersson'a. Badacze ci wysunęli hipotezy dotyczące roli KRN. Wg Caspersson'a pierwszym etapem w syntezie białek jest intensywna produkcja desoksyrybonukleoproteidów i białek bogatych w kwasy dwuaminowe oraz mniejszych już ilości rybonukleotydów w odcinkach chromozomów związanych bezpośrednio z jąderkiem — t.zw. heterochromatycznych. Białka wyprodukowane tutaj dyfundowałyby bądź wprost, bądź via jąderko z jądra do cytoplazmy. Następnymi, równoczesnymi ogniskami syntezy byłaby błona jądrowa i cytoplazma. Syntezie białek towarzyszy tu zawsze bogate występowanie KRN. Caspersson schemat ten wydedukował z obserwacji morfologicznych, połączonych z ilościowymi badaniami cytochemicznymi tkanek szczególnie aktywnych fizjologicznie (19). Spośród organoidów komórki dominującą rolę w biosyntezie białek przypisuje się tu jądru — ściślej jąderku i związanej z nim heterochromatycznej części chromozomów.

Na stanowisku odmiennym stoi Brachet. Zdaniem jego synteza białek odbywa się w cytoplazmie, głównie w jej ziarnistościach — mikrosomach i mitochondriach. Badania lat ostatnich prowadzone przy pomocy mikroskopu elektronowego wykazały, że mikrosomy, tak ważne dla życia komórki, bogate w KRN — stanowią cały system siateczkowaty, którego forma i wymiary zmieniają się zależnie od zmiany stanu fizjologicznego komórki (135, 136). Badania Brachet'a wskazywałyby na to, że właśnie obecność tego systemu wystarcza do normalnego przebiegu syntezy białek komórki. Pogląd ten godzi w Casperssonowską teorię o supremacji jądra.

Już dawne doświadczenie Hämmerlinga wykazały, że po podzieleniu jednokomórkowego glonu — *Acetabularia mediterranea* na

część jądrową i bezjądrową, część bezjądrowa żyje kilka miesięcy a nawet wykazuje wzrost (73).

Doświadczenia te powtórzyli Br a c h e t, C h a n t r e n n e i inni, badając przy tym przyrost białek. Zarówno przyrost azotu białkowego jak i włączanie się radioaktywnego CO_2 w obu fragmentach glonu — jądrowym i bezjądrowym — przez pierwsze 15 — 20 dni przebiega zupełnie jednakowo. Dopiero przy dłuższym trwaniu doświadczenia — po miesiącu obserwuje się, w wypadku inkorporacji piętnowanego bezwodnika węglowego, obniżenie aktywności fragmentów bezjądrowych nie przekraczające jednak 30% w stosunku do fragmentów zawierających jądro (19, 167). Podobne doświadczenia przeprowadzone na amebach doprowadziły do wniosków takich samych: siedliskiem syntezy białek jest cytoplazma; jądro — jako czynnik kontrolujący zawartość KRN w cytoplazmie i główne miejsce syntezy KRN odgrywa w tym procesie jedynie rolę pośrednią (16). Poglądy te potwierdzają badania szeregu innych autorów (23, 32, 33, 69, 132).

Obie z omówionych teorii, różniące się tak znacznie w uznawaniu jądra czy cytoplazmy za główne miejsce syntezy białek, zgodne są w jednym zasadniczym punkcie. Obie wiążą proces syntezy z obecnością kwasów nukleinowych, obie przypisują wielką rolę w tym procesie kwasowi rybonukleinowemu. Jaki jest mechanizm tego procesu, w jaki sposób łańcuchy kwasu rybonukleinowego umożliwiają utworzenie się makromolekuł białka — odpowiedzi na to zagadnienie pozostają jeszcze w stadium mniej lub bardziej udokumentowanych hipotez roboczych. Hipotezy te można podzielić na parę grup: 1) kwasy nukleinowe są wzorcem — szablonem dla budowy cząsteczki białka; 2) kwasy nukleinowe, ze względu na zdolność przyłączania dodatkowych bogatych w energię grup fosforanowych, są czynnikiem energetycznym w syntezie; 3) kwasy nukleinowe przez łączenie się z białkami syntetyzowanymi na nukleoproteidy pozwalają reakcji przebiegać w jednym kierunku; 4) polinukleotydy odgrywają rolę enzymów (30, 42).

Powstawanie wiązań peptydowych jest procesem wysoce endoergicznym (do 4000 Cal/mol), z tego też punktu wypływa główna trudność w wytłumaczeniu mechanizmu syntezy białek. Wg teorii C r a m p t o n'a i H a u r o v i t z'a (1952) transpeptydacja obniża ilość energii potrzebnej w syntezie. Autorzy ci uważają, że synteza białek przebiega dwufazowo: w I fazie prawdopodobnie w jądrze tworzy się łańcuch aminokwasów na wzorcu polipeptydowym ustalonym przez KDN, w II fazie w ziarnistościach cytoplazmy białko otrzymuje specyficzną konfigurację przestrzenną, — istnienia tej drugiej fazy dowiedli oni w badaniach nad tworzeniem się przeciwciał (70, 71, 72).

W oryginalny sposób *Dounc*e (1952) połączył teorię wzorca z teorią energetyczną. Synteza białka jest tu połączona z samopomnażaniem się kwasów nukleinowych. Kwas nukleinowy ustala porządek aminokwasów w tworzącym się łańcuchu polipeptydowym. Najpierw KN reaguje z ATP tworząc kwas dwufosfonukleinowy, pozostały kwas reaguje z aminokwasami dając związki nukleinoaminokwasowe. Następnie w związkach tych wiązania fosfoamidowe przechodzą w karboksamidowe i powstaje nowy nukleotyd i łańcuch polipeptydowy (47, 48).

Należy wspomnieć, że w roku 1947 *Spiegelman*, a w 1950 *Bressler* zwracali już uwagę na możliwość przyłączania dodatkowych grup fosforanowych do KN (24, 143, 158).

Gamow w r. 1954 podał nową koncepcję odwzorowywania się białek na kwasach nukleinowych, opartą na teorii modelu śrubowego. *Watson'a* i *Crick'a*. Wg niego wolne aminokwasy zajmują odpowiednie przestrzenie pomiędzy nukleotydami, tworząc w ten sposób łańcuch polipeptydowy (60, 175).

Binkley uważa kwasy rybonukleinowe za enzymy bezbiałkowe działające w określonym ogniwie syntezy białka. Wykrył on mianowicie w nerce świni kwas nukleinowy hydrolizujący dwupeptyd cysteinyl — glicynę. Ostatnio zaś stwierdził on obecność dwupeptydu o charakterze KN w wirusach roślinnych (8, 9).

Jak już mówiliśmy, wszystkie te teorie mają na razie jeszcze charakter mniej lub bardziej ugruntowanych hipotez roboczych. Za mechanizmem polegającym na powstawaniu kompleksów nukleoproteinowych, z których dopiero odszczepiają się cząsteczki białka, przemawiałyby obserwacje morfologów stwierdzające obfite występowanie fosfatazy w komórkach aktywnie produkujących białka. Enzym ten umożliwiałby ostatni etap procesu uwalniania się tych związków (20, 21, 181).

Oczywiście nie może być mowy o jakiejś zupełnie prostej zależności między KRN a syntezą białek. Np. nagromadzenie KRN w komórce nie jest hasłem do podziałów — a więc do podwajania jej materiału białkowego; obserwuje się niekiedy podziały zachodzące przy stosunkowo niskim poziomie KRN. Przy tworzeniu się erytrocytów mogą brać udział różne typy komórek macierzystych. Normalnie erytrocyty powstają przez podział erytroblastów, uboższych w KRN od innych macierzystych komórek, np. hemocytoblastów, rozmnażających się tylko wyjątkowo (101). Podobnie u roślin rozmnażanie się komórek kambium i prokambium zachodzi przy stosunkowo niewielkiej zawartości KRN (83). Często notuje się w komórkach gruczołowych brak wyraźnej równowagi między wydzielaniem a poziomem KRN (77, 81, 124, 166). *Beliański* (7) i *Pardee* (129) podają, że zawartość KRN w komórkach bakterii nie wiąże się w jasny sposób z syntezą białek. Dane te wskazują na brak

prostego związku między procesem syntezy białek i KRN. Jednak rola KRN jest niewątpliwa.

Brachet i in. (18, 95) traktując komórki rybonukleazą, otrzymali zahamowanie mitoz i spadek włączania się do protoplazmy znaczących aminokwasów.

Pozostawałaby jeszcze do omówienia sprawa syntezy KN w komórce. Badania przeprowadzone przy pomocy pierwiastków izotopowych wykazały, że synteza ta zachodzi przede wszystkim w jądrze i w jąderku (41). Szybkość włączania P^{32} w cząsteczce kwasów nukleinowych cytoplazmy jest o wiele powolniejsza (155, 161, 179). Istnieje też możliwość samoodtworzenia się mikrosomów wykazana przez Le Clerc, której — jak twierdzi — udało się hodować te organoidy in vitro na błonie chorionallantoinowej (94). Synteza KDN odbywa się w jądrze — przynajmniej jeżeli chodzi o przyłączanie P. Do niedawna przypuszczano, że synteza a właściwie odtwarzanie się KDN wiąże się z podwajaniem się struktur chromatynowych w kariokinezie. Badania prowadzone przy pomocy izotopów radioaktywnych oraz metodami spektrofotometrycznymi wykazują, że wbrew tym poglądom synteza ta odbywa się w stadium interkinezy, a niekiedy w telofazie (27, 51, 78, 144, 164).

W świetle badań radioaktywnymi izotopami C, N i P — KDN i KRN okazał się czynnym i ciągle przebudowującym się związkiem. Dotychczas myślno o nim jako o niezwykle stałej substancji, odtwarzającej się jednorazowo przy podziale komórki. Tymczasem pojedyncze atomy, poszczególne grupy oraz cząsteczki składowe są tu ciągle wymieniane (101, 107, 93, 105). To odkrycie (było tak szokujące, że niektórzy badacze — aby ratować koncepcję niezmienności KDN, wysunęli hipotezę o istnieniu 2 typów tego kwasu. Jeden ma być niezmienny, stały, — drugi włączony bezpośrednio w procesy przemian komórkowych sam też ulega przemianom.

Wzajemny stosunek KDN i KRN jest ciągle dyskutowany. Spotyka się w literaturze szereg danych, które przemawiają za ściślejszą zależnością między tymi dwoma związkami. Często autorzy opisują fakty, gdy zanikaniu jednego z tych kwasów w tkance czy komórce towarzyszy jednoczesne pojawianie się drugiego (4, 15, 36, 63, 65, 108, 112, 113, 125, 134, 153, 163, 183). Czy można tu mówić o jakimś „przechodzeniu” jednego związku w drugi — trudno powiedzieć. Skomplikowana ich budowa stereochemiczna wydaje się całkowicie zaprzeczać takim możliwościom. Z drugiej znowu strony trudno przypuszczać, że mamy tu do czynienia z zupełnie przypadkową zbieżnością. Niestety, dotychczasowe dane doświadczalne nie pozwalają na wyjaśnienie natury tego zjawiska.

Przy przeglądaniu literatury dotyczącej kwasów nukleinowych — a jest ona ogromna — widzi się sporo sprzecznych danych, które nie zawsze można przypisać błędom autorów; spotyka się również krańcowo różne opinie o znaczeniu związków tych w życiu komórki (22, 59). Wydaje się nam, że kwasy nukleinowe są czułym wskaźnikiem stanu fizjologicznego komórki, a ogromna plastyczność żywych organizmów sprawia, że wyniki uzyskiwane z badań na szerokim materiale są tak różnorodne. Stąd zarówno dane dotyczące występowania, miejsca syntezy jak i roli KN mogą podlegać znacznym wahaniom. Roskin znalazł u ślimaka *Viviparus viviparus* dojrzałe włókna mięsne, które mimo braku jąder spełniają wszelkie funkcje życiowe. Brak jąder został w nich skompensowany silniejszym rozwojem chondriomu i zwiększeniem zawartości KRN w hyaloplazmie (147). Ta zdolność kompensowania w pewnej mierze funkcji świadczy o tym, że rola kwasów nukleinowych zależy w znacznym stopniu od okresu rozwoju komórki i warunków, w jakich się ona znajduje.

LITERATURA

1. Alfert M i Swift H., *Exper. Cell Res.*, **5**, 455 — 460, (1953).
2. Bagiński S. i Oficerska H., *Fol. Morph.*, **11**, 424 (1952).
3. Bajer A., *Acta Soc. Bot. Pol.*, **22**, 652 — 666, (1952).
4. Balboni G., *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.*, **29**, 349 (1953).
5. Barden A. W. H., Austin C. R., *Austr. J. Biol. Sci.*, **6**, 665 — 673 (1953).
6. Bekkarewicz B., Kawiak J. i Sulgostowski J., (1955) *Folia Morphologica* w druku.
7. Beljański M., *Ann. Inst. Pasteur*, **85**, 463 — 469 (1953).
8. Binkley F., *Exper. Cell Res. Suppl.*, **2**, 145 — 161 (1952).
9. Binkley F., *Proc. Roy. Soc. Sci., London*, **142**, 170 — 174, ser. B. (1954).
10. Bisset K. A., Hale CMF., *Exper. Cell Res.*, **5**, 449 — 454 (1953).
11. Bisset K. A., *J. Bact.*, **67**, 41 — 44 (1954).
12. Brachet J., *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 88 (1940).
13. Brachet J., *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 90 (1940).
14. Brachet J., *Enzymologia*, **10**, 87 — 96 (1941).
15. Brachet J., *Symp. Soc. Exper. Biol.* **1**, 207 (1947).
16. Brachet J., *Experientia* **6**, 294 (1950).
17. Brachet J., *Arch. Biol.*, **65**, 1 — 72 (1954).
18. Brachet J., *Nature*, **174**, 876 (1954).
19. Brachet J., Chantrenne H., *Nature*, **168**, 950 (1951).
20. Bradfield J. G. R., *Exper. Cell Res. Suppl.*, **1**, 338 — 349 (1949).
21. Bradfield J. G. R., *Quart. J. Micr. Sc.*, **92**, 87 — 112 (1951).
22. Bragg L., *Nature*, **174**, 55 — 59 (1954).
23. Brenner S., *Exper. Cell Res.*, **5**, 257 — 9 (1953).
24. Bressler, DAN SSSR, (1951).
25. Brumberg E. M. i Larionov L. F., *Nature*, **158**, 663 (1946).
26. Brumberg E. M., Larionow L. F. i in., DAN SSSR, **88**, 1055 (1953).
27. Bullogh W. S., Pasteels J., *Nature*, **168**, 608 (1951).

28. Caspersson M. D. T., *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **1**, 127 — 151 (1947).
29. Caspersson M. D. T., *Cell Growth and Cell Function*, (1950).
30. Chantrenne H., *Symp. Biogen. Prot.*, Paris, 85 — 95, (1952).
31. Chesin R. B., *Usp. Sovr. Biol.*, **31**, 1, (1954).
32. Chesin R. B., *Biochimija*, **19**, 304 — 312 (1954).
33. Chesin R. B., *Biochimija*, **19**, 407 — 413 (1954).
- 33a. Chiba Y., *Cytologia (Tokyo)* **16**, 256 — 272, (stresz.), (1951).
34. Claude A., *Proc. Roy. Soc. Sc.*, London, **142**, 177 — 186 (1954).
35. Cooper D. C., *Amer. Naturalist*, **76**, 219 — 229 (1952).
36. Czepinoga O. P. i Rukina L. P., *Ukr. Bioch. Žurn.*, **25**, 388 — 398, (1953).
37. Danielli J. F., *Cytochemistry NY-London*, str. 96 — 125 (1953).
38. Dangeard P., *Le Botaniste*, **35**, 81, (Biol. Abst.), (1951).
39. Davidson J. N., *Symp. Soc. Exper. Biol.*, **1**, 77 — 85 (1947).
40. Davidson J. N., *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, London. (1950).
41. Davidson J. N., *Bull. Soc. Chim. Biol. Franc.*, **35**, 49 — 66 (1953).
42. Davidson P. F., Conway B. E. i Butler J. A. V., *Progr. Bioph. Bioph. Chem.*, **4**, 148 — 194 (1954).
43. Delay C., *Rev. Cytol. Veget.*, **13**, 93 — 118 (1952).
44. Dempsey E. W., Wislocki G. B., *Physiol. Rev.*, **26**, 1 — 27 (1946).
45. Desclin L., *C. R. Soc. Biol.*, **133**, 457.
46. Dobson W., *Amer. J. Bot.*, 384 (1946).
47. Dounce A. L., *Enzymologia*, **15**, 251 (1952).
48. Dounce A. L., *Nature v.*, **171**, 997, v. **172**, 541 (1953).
49. Dustin wg. Panijel J., *Les Problèmes de l'histochimie et la biologie cellulaire*, Paris (1951).
50. Ellengorn J. E. i Gluszczenko I., Afanasèva A. S., *Izv. AN SSSR biol. zesz.* 5 (1951).
51. Fautrez J., Fautrez-Firlefyn N., *Nature*, **172**, 119 (1953).
52. Fautrez J. i Roels H., *Arch. Biol.*, **65**, 459 — 496 (1954).
53. Fauré-Fremiet E., Courtines H., Mugard H., *Exper. Cell Res.*, **1**, 253 — 263 (1950).
54. Favre-Duchartre M., *C. R. Ac. Sci.*, Paris, **230**, 404 (1950).
55. Felix K., *Mikroskopische u. chemische Organisation d. Zelle* (1952).
56. Fitz J. P. C., *J. Bact.*, **68**, 464 — 473 (1954).
57. Fraenkel-Conrat H., *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 3826 (1950).
58. Fraenkel-Conrat H. i Ducay E. D., *Bioch. J.*, **49**, *Proceed. Bioch. Soc.* (1951).
59. Frey-Wyssling, *Submicroscopic structure of protoplasm* (1947).
60. Gamow G., *Nature*, **173**, nr 4398 (1954).
61. Gersh I., *Physiol. Rev.*, **21**, 242 — 306 (1941).
62. Godlewski H., *Rozprawy PAU. B.*, **74**, (1951).
63. Goldsztejn B. I., Kondrat'eva L. G., *Biochimija*, **17**, 354 — 361 (1952).
64. Govaert J., *C. R. Soc. Biol.*, **147**, 1494 (1953).
65. Grzycki, *Bull. Ac. Sci. L. Pol.*, B 2., 7 — 10, str. 451 — 468 (1951).
66. Gubernev M. A., Kovyrev I. I., Uszakov M. D., *DAN SSSR* 95, 1251, (1954).
67. Hale C. M. F., *Exper. Cell Res.*, **6**, 246 — 249 (1954).
68. Harrison M. F., *Nature*, **168**, 248 (1951).
69. Harvey E. B., *J. Exp. Zool.*, **102**, 253 (1946).
70. Haurovitz F., *Chemistry and Biology of Proteins N. Y.* (1950).

71. Haurovitz F., Symp. Biogen. Prot., Paris 56 — 61 (1952).
72. Haurovitz F., Crampton C. F., Exper. Cell Res. Suppl., 2, 45 — 54 (1952).
73. Hämmerring J. wg Küster E., Experimentelle Zellforschung, Jena (1949).
74. Hocquette M., C. r. Ac. Sci., 238, 607 (1954).
75. Hocquette M., Prudhomme V., C. r. Ac. Sci. Paris, 234, 1472 (1952).
76. Hoff-Jørgensen E. i Zeuthen E., Nature, 169, 245 (1952).
77. Hokin L. E., Bioch. Bioph. Acta, 8, 225 (1952).
78. Hovard A., Pelc S., Izotopy w biochemii, Moskwa (tłum.), 133 — 142 (1953).
79. Hughes A. H., The Mitotic Cycle., London (1952).
80. Jacobson W. i Webb M., Exper. Cell Res., 3, 163 — 183 (1952).
81. Karnkowska-Górska Z., w druku (1955).
82. Kater Mc J., Bot. Rev., 6, 164 — 180 (1940).
83. Kedrovskij B. V., DAN SSSR, 60, 189 (1948).
84. Kedrovskij B. V., Usp. Sovr. Biol., 31, 38 — 56 (1951).
85. Kedrovskij B. V., Usp. Sovr. Biol., 32, 309 — 329 (1951).
86. Kirpicznikova E. S. i Zelikina T. I., DAN SSSR, 65, 89 (1949).
87. Kłyszewko L., Post. Hig. Med. Dośw., 7, 1/2., 1 — 32 (1953).
88. Koller P. C., Symp. Soc. Exp. Biol., 1, 270 — 290 (1947).
89. Koller P. C., Progr. Bioph., 4, 195 — 243 (1954).
90. Konarev V. G., DAN SSSR, 89, 551 (1953).
91. Laird A. K., Nygaard O., Ris T. i Barton A. D., Exper. Cell Res., 5, 147 — 160, (1953).
92. Larionov L. F. i Brumberg E. M., DAN SSSR, 66, 267 (1946).
93. Leblond, Izotopy v Biochemii, Moskwa (tłum.), 143 — 144 (1953).
94. Le Clerc J., Experimentia, 10, 251 (1954).
95. Ledoux L., Le Clerc J. i Vanderhaeghe F., Nature, 174, 793 (1954).
96. Lehmann F. E., Mikroskopische u. chemische Organisation der Zelle, Berlin Springer Ver. (1952).
97. Leshner S., Exper. Cell Res., 2, 577 — 585 (1951).
98. Leuchtenberger C. i Schrader F., Proc. Nat. Ac. Sci., Washington, 38, 99 — 105 (1952).
99. Ludwig K. S., Arch. Biol., 65, 135 — 178 (1954).
100. Lumb E. S., Quart. Rev., Biol., 25, 278 — 291 (1950).
101. Malkin H., Bioch. Bioph. Acta, 12, 565 (1953).
102. Makarov P. V., Protiv reakcionnogo mendelizma-morganizma, Moskwa (1948).
103. Makarov P. V., Osnovy citologii, Moskwa (1953).
104. Marshak A. i Marshak C., Exper. Cell Res., 5, 288 (1953).
105. Mavvian D. H., Bioch. Bioph. Acta, 14, 501 — 506 (1954).
106. Mazia D., Proc. Nat. Ac. Sci., (USA), 40, 521 — 527 (1954).
107. Medvedev S. A., Usp. Sovr. Biol., 36, 161 — 188 (1953).
108. Mejsej M. N., Funkcional'naja morfologija drożdżevych organizmov, Moskwa (1950).
109. Metzner H., Biol. Zbl., 71, 254 — 272 (1952).
110. Milovidov P. F., Physik u. Chemie des Zellkernes, Berlin (1949).
111. Mirsky A. E., Ris H., Nature, 163, 666 (1950).
112. Mitchell J. S. (1942), wg Davidson, Symp. Soc. Exper. Biol., 1, 77, (1947).
113. Mitchell J. S. (1943), wg Davidson, Symp. Soc. Exper. Biol. 1, 77, (1947).
114. Moldave K., Heidelberger C., J. Amer. Chem. Soc., 76, 679 (1954).
115. Moog F., Surv. Biol. Progr., 2. (1952).

116. Moyson F., Arch. Biol., **64**, 2 (1953).
117. Mulnard I., Arch. Biol., **65**, 262 — 311 (1954).
118. Mundkur B. D., J Bact., **68**, 514 — 529 (1954).
119. Nejfaks A. A., Priroda, zesz. **8**, 21 — 32 (1953).
120. Olszewska M. J., Acta Soc. Bot. Pol., **23**, 59 — 68 (1954).
121. Olszewska M. J., Acta Soc. Bot. Pol., **23**, 699 — 725 (1954).
122. Olszewska M. J., Acta Soc. Bot. Pol., w druku (1955).
123. Oota Y. i Osava S., Experientia, **10**, 254 (1954).
124. Osava S. i Hayasaki O., Kagaku (Japonia), **23**, 34, Chem. Zbl., 28., 6263 (1954).
125. Painter T. S., Bot. Gazet., **105**, 58 — 68 (1940).
126. Pasteels J., Bullough W. S., Arch. Biol. **64**, 271 — 294 (1953).
127. Pasteels J. i Lison L., Arch. Biol., **61**, 445 — 474 (1950).
128. Pasteels J. i Lison L., C. R. Ac. Sc., Paris. **230**, 780 (1950).
129. Pardee A. B., Proc. Nat. Ac. Sc. (USA), **40**, 263 — 270 (1954).
130. Patterson E. K. i Dackerman M. E., Arch. Bioch. Bioph., **36**, 97 — 113 (1952).
131. Pavlova M. V., DAN SSSR, **92**, 641 (1953).
132. Perkowska E., Spraw. pos. PAN 1952, 44 (1953).
133. Pischinger A., Protoplasma, **39**, 565 (1950).
134. Pollister A. W., Lawin G. I. 1944 wg Davidson, Symp. Exper. Biol., **1**, (1947).
135. Seshechar B. R., Dass M. S., Exper. Cell Res., **5**, 248 (1953).
136. Porter K. R., J. Histochem. Cytochem., **2**, 346 — 375 (1954).
137. Przełęcka A., Bull. Soc. Sci. Let., Łódź, III, **4**, 6, (1953).
138. Przełęcka A., Post. Bioch. w druku (1956).
139. Revuckaja P. S. i Gordeeva A. F., Żurn. Obszcz. Biol., **15**, zesz. 1, (1954).
140. Ris H. i Kleinfeld R., Chromosoma, **5**, 263 — 271 (1952).
141. Ries E., Gersch M., Biologie der Zelle, Leipzig (1953).
142. Rodkiewicz B., Acta Soc. Bot. Pol., **22**, 349 — 354 (1953).
143. Rodkiewicz B., w druku (1955).
144. Roels H., Nature, **173**, 1039 (1954).
145. Roskin G. I., DAN SSSR, **69**, 585 (1949).
146. Roskin G. I., Brodskij V., DAN SSSR, **89**, 1099 (1953).
147. Roskin G. I., Kirpicznikowa E. S., Izv. AN SSSR biol. zesz. **6**, 80 — 94 (1952).
148. Roskin G. I. i Żirnova A. A., DAN SSSR, **96**, 821 (1954).
149. Rowlands D. G., Nature, **173**, 828 (1954).
150. Schrader F. i Leuchtenberger C., Exper. Cell Res., **1**, 421 — 452 (1950).
151. Schrader F., Science, **114**, 486 (1951).
152. Schrader F., Leuchtenberger C., Exper. Cell Res., **3**, 1 (1952).
153. Seshachar B. R., Dass M. S., Exper. Cell Res., **5**, 248 (1953).
154. Sisakjan N. M. i Czernjak M. S., DAN SSSR, **87**, 469 (1952).
155. Smellie R. M. S. i i., Bioch. Biph. Acta, **11**, 559 — 565 (1953).
156. Smith, Bioch. J., **45**, 294 (1949).
157. Sparrow A. H. i Hammond M. R., Amer. J. Bot., **34**, 439 — 445 (1947).
158. Spiegelman S., Kamen M., Cold Spring Harb. Symp., **12**, 211 (1947).
159. Sprivastava D. S., La Cellule, **60**, 1, (1952).
160. Stenram-Lund U., Acta Anat., **18**, 360 — 376 (1953).
161. Stich H., Hämmerling J., Z. Naturforsch., **86**, 329 (1953).

162. Stockinger L., *Protoplasma*, **42**, 365 — 414 (1953).
163. Subnikova E. A., Ginsburg A. B., *Arch. Anat. (Moskva)*, **31**, 56 — 64 (1954).
164. Swift H., *Physiol. Zool.*, **26**, 301 — 311 (1953).
165. Thomson R. J. i Fraser S. C., *Exper. Cell Res.*, **6**, 367 — 383 (1954).
166. Vallesi R. N., *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **28**, 73 (1952).
167. Vanderhaege F., *Arch. Inter. Physiol* (1952).
168. Vasart B., *C. R. Ac. Sci., Paris*, **232**, 2245 (1951).
169. Vasileva O. A., *DAN SSSR*, **95**, 163 (1954).
170. Vendrely C., *Bull. Biol. Franc. Belg.*, **86**, 1 — 87 (1952).
171. Vendrely C., Vendrely R., *C. R. Ac. Sci., Paris*, 230 — 333 (1950).
172. Vendrely C., Leuchtenberger C. i Vendrely R., *C. r. Ac. Sci.*, **232**, 2362 (1951).
173. Vendrely R. i Vendrely C., *C. r. Ac. Sci.*, **230**, 788 (1950).
174. Vervonck L., *C. r. Soc. biol.*, **148**, 932 (1954).
175. Watson J. D., Crick F. H. C., *Nature*, **171**, 737 (1953).
176. Wilson W. J., *Histoch. Cytochem.*, **2**, 317 — 321 (1954).
177. Wessing A., *Naturwiss*, **4**, 95 (1954).
178. West C., Lechmere A. E., *Ann. Bot.*, **29**, 285 — 291 (1915).
179. Wikramanayake T. W., Heagy F. C. i Munro H. W., *Bioch. Bioph. Acta*, **11**, 566 — 574 (1953).
180. Yakar N., *Bot. Gazet.*, **114**, 72 — 79 (1952).
181. Yokoyama O., Hisako, Kenneth i i., *Labor. Investig.*, **2**, 91 — 108.
182. Zollinger H. H., *Experientia*, **6**, 14 (1950).
183. Zybina E. W., *DAN SSSR*, **68**, 917 (1953).

SPIS TREŚCI

Witold Drabikowski, Bogna Wiśniewska — Izolowanie nukleoproteidów i kwasów nukleinowych z tkanek i mikroorganizmów	201
Witold Drabikowski — Budowa białek wchodzących w skład nukleoproteidów	219
Aleksandra Przełęcka — Cytochemiczne metody oznaczania kwasów nukleinowych	233
Leokadia Kłyszajko — Kwasy nukleinowe bakterii	243
Antoni Dmochowski — Kwasy nukleinowe wirusów	267
Bohdan Rodkiewicz, Aleksandra Przełęcka, Hanna Poznńska — Kwasy nukleinowe w komórce	283

Cena zł 15.—