

P 1434

P O L S K A   A K A D E M I A   N A U K  
KOMITET BIOCHEMICZNY

ACTA  
BIOCHIMICA POLONICA

KWARTALNIK

T O M   V



WARSZAWA 1958  
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

## KOMITET REDAKCYJNY

Tadeusz Korzybski, Irena Mochnacka, Włodzimierz Mozołowski

## RADA REDAKCYJNA

Tadeusz Baranowski, Irena Chmielewska, Józef Heller,  
Edmund Mikulaszek, Włodzimierz Niemierko, Ignacy Reifer,  
Bolesław Skarżyński, Janusz Supniewski,  
Mieczysław Wierzuchowski

## ADRES REDAKCJI:

Warszawa, Pałac Kultury i Nauki, XXV piętro, pokój 2512

## SPIS TREŚCI

(Tom V. 1958 r.)

### Zeszyt 1

<b>J. Heller and M. Jeżewska</b> , Nucleic acid and other phosphorus fractions in the course of metamorphosis of the chinese Tussur moth ( <i>Antheraea pernyi</i> ) . . . . .	3
<b>R. Kurnatowski, A. Szymkowiak, W. Wiśniewski i J. Pawełkiewicz</b> , Prekursory biosyntezy nukleotydocyjanokobalamin. 5. Biosynteza witaminu B <sub>12III</sub> i innych nukleotydocyjanokobalamin . . . . .	19
<b>D. Shugar, H. Sierakowska and A. Szenberg</b> , Quantitative stative staining with radioactive indicators: — Alkaline phosphatase . . . . .	27
<b>H. Wehr</b> , Badania nad własnościami pirofosfatazy z mięśnia królika . . . . .	47
<b>J. Trojanowski</b> , Częściowe oczyszczanie tyrozynazy z poczwarek <i>Sphinx pinastri</i>	59
<b>A. Grudzińska</b> , Zawartość sodu i potasu w ślinie człowieka . . . . .	67
<b>S. Angielski</b> , Aminokwasy moczu bliźniąt jedno- i dwujajowych . . . . .	75

### Zeszyt 2

<b>M. Wierzuchowski</b> , Zapoczątkowanie wysycania glikozą spoczywającego psa a rozmiary jego ciała . . . . .	93
<b>J. Krawczyński, I. Drewnowska, Z. Fleszyński i M. Rycaj</b> , Badania nad metabolizmem białkowym mózgu i mózdzku przy pomocy tyrozyny znakowanej <sup>14</sup> C . . . . .	139
<b>K. Kleczkowski</b> , Biosynteza cytruliny w kielkach roślin motylkowych . . . . .	155
<b>Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen, W. Dobryczycka i A. Króliczek</b> , Ilościowe oznaczanie taniną frakcji białkowych surowicy, rozdzielonych za pomocą elektroforezy bibułowej . . . . .	165
<b>A. Koj, J. M. Zgliczyński i W. Bicz</b> , Wpływ erytrocytów na oddychanie leukocytów ludzkich . . . . .	177
<b>Z. Szafran, H. Homańska-Szafranowa i J. Oleksy</b> , Rozmieszczenie enzymów z grupy esteraz we frakcjach białkowych soku trzustkowego psa . . . . .	189

Uchwała Wydziału Nauk Biologicznych PAN w sprawie obchodu Roku Darwinowskiego (1959) podjęta na posiedzeniu plenarnym w dniu 11.VI.1957 r. . . . .	i
Konkurs na prace badawcze z zakresu ewolucji świata organicznego . . . . .	ii
Konkurs na pracę badawczą z dziejów myśli ewolucyjnej w Polsce . . . . .	iii

Z e s z y t 3

<b>J. Krzemicka</b> , 17-ketosterydy i 17-hydroksysterydy w moczu ludzi, królików i szczurów. II. Rozdział chromatograficzny 17-ketosterydów obojętnych . . . . .	201
<b>T. Borkowski</b> , Badania nad oddychaniem tkanki mózgowej <i>in vitro</i> . . . . .	213
<b>Z. Latało, A. M. Dancewicz i T. Musiałowicz</b> , Effect of ionizing radiation on the blood clotting system <i>in vitro</i> . . . . .	225
<b>J. Janicki i J. Skupin</b> , Rozdział chromatograficzny elektroobojętnych i elektrododatnich czynników witaminu B <sub>12</sub> i B <sub>12p</sub> po elektroforezie . . . . .	235
<b>W. Mański i H. Kozdroj</b> , Badania nad wielopostaciowością substancji grupowych krwi . . . . .	245
<b>A. M. Dancewicz i B. Lipiński</b> , Wpływ promieniowania rentgenowskiego na dehydrazę kwasu δ-aminolewulinowego <i>in vitro</i> . . . . .	267
<b>I. Reifer i M. Solecka</b> , Oksydazy końcowe kielków pszenicy . . . . .	277
<b>J. Janicki i F. Pędziwilk</b> , Występowanie witaminu B <sub>12</sub> w nasionach roślin motylkowych . . . . .	295
<b>J. Janicki i F. Pędziwilk</b> , Wpływ sulfatiazolu na biosyntezę witaminów z grupy B <sub>12</sub> przez <i>Propionibacterium shermanii</i> . . . . .	299
B i o t i c a — Archives of Biochemical Pharmacology	

Z e s z y t 4

<b>M. Zdyb-Gumińska i H. Drożdż</b> , Rozmieszczenie niektórych witaminów B w mózgu ludzkim . . . . .	311
<b>J. Pawelkiewicz i W. Walerych</b> , Izolacja pseudowitaminu B <sub>12</sub> z kultur <i>Propionibacterium shermanii</i> . . . . .	327
<b>E. Gąsior, M. Pietrusiewicz, H. Kowalska i J. Opieńska-Blauth</b> , Zastosowanie węgla sulfonowanego Escarbo oraz syntetycznych żywic jonowymiennych do odsalania płynów biologicznych . . . . .	333
<b>J. Heller, M. J. Piechowska and T. Chojnacki</b> , Inorganic polyphosphate in the Hawk-moth ( <i>Celerio euphorbiae</i> ) . . . . .	343
<b>I. Reifer i K. Toczko</b> , O rozkładzie nikotyny w korzeniach machorki . . . . .	355
<b>I. Reifer and L. Buraczewska</b> , The ornithine cycle in pea seedlings . . . . .	361
<b>K. Toczko</b> , Mikrobiologiczny rozkład nikotyny . . . . .	373

<b>A. M. Dancewicz, B. Lipiński i O. Rosiek</b> , Wpływ promieniowania rentgenowskiego na dehydrację kwasu $\delta$ -aminolewulinowego <i>in vivo</i> u szczurów	381
<b>S. Niewiarowski i A. Czupryna</b> , Notatka w sprawie standaryzacji i jednostkowania kwasu szczawiooctowego i pirogronowego w surowicy krwi . . .	393
<b>P. Masłowski, H. Masłowska i W. Minakowski</b> , Zmodyfikowana metoda analizy retencyjnej aminokwasów . . . . .	401
<b>W. Ostrowski i A. Krawczyk</b> , Biochemia samożywnych bakterii siarkowych. V. Biosynteza witaminu B <sub>12</sub> znaczonego równomiernie <sup>14</sup> C . . . . .	409
<b>I. Chmielewska, K. Bełżecka, K. Raczyńska-Bojanowska i J. Manicki</b> , Wpływ glikozy na wykorzystanie przez organizm ludzki podanego dożylnie białka krwi bydlęcej. II. . . . .	419
<b>Jan J. Stanisławski</b> , Modyfikacja chromatograficznej metody wykrywania kwasu $\beta$ -indoliloctowego i przystosowanie jej do oznaczeń w kiełkach pszenicy . . . . .	427
<b>S. Angielski, R. Niemirowicz, W. Makarewicz i J. Rogulski</b> , Aminoacyduria wywołana kwasem maleinowym . . . . .	431
<b>A. Morawiecki</b> , Badania nad kinazą pirogronową. Wyznaczenie masy cząsteczkowej enzymu z mięśni królika. Tymczasowe doniesienie . . . . .	437

# ACTA BIOCHIMICA POLONICA

Contents of volume V, Nos. 1-4, 1958

## No. 1

<b>J. Heller and M. Jeżewska</b> , Nucleic acid and other phosphorus fractions in the course of metamorphosis of the chinese Tussur-moth ( <i>Antheraea pernyi</i> )	3
<b>R. Kurnatowski, A. Szymkowiak, W. Wiśniewski and J. Pawelkiewicz</b> , Precursors in the biosynthesis of nucleotidecyanocobalamins V. The synthesis of the vitamin B <sub>12III</sub> and other nucleotide cyanocobalamins	19
<b>D. Shugar, H. Sierakowska and A. Szenberg</b> , Quantitative stative staining with radioactive indicators: — Alkaline phosphatase	27
<b>H. Wehr</b> , Investigations on the pyrophosphatase of rabbit muscles	47
<b>J. Trojanowski</b> , Partial purification of tyrosinase from the pupae of <i>Sphinx pinastri</i>	59
<b>A. Grudzińska</b> , The content of sodium and potassium in human saliva	67
<b>S. Angielski</b> , Amino acids in the urine of mono- and dizygotic twins	75

## No. 2

<b>M. Wierzuchowski</b> , Priming of the saturation with intravenous glucose in a resting dog and its body size	93
<b>J. Krawczyński, I. Drewnowska, Z. Fleszyński and M. Rycaj</b> , Studies in protein metabolism of the brain cerebellum with <sup>14</sup> C-labelled tyrosine	139
<b>K. Kleczkowski</b> , Biosynthesis of citrulline in bean seedlings	155
<b>Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen, W. Dobryczycka and A. Króliczek</b> , Quantitative determination with the aid of tannin of serum protein fractions separated by paper electrophoresis	165
<b>A. Koj, J. M. Zgliczyński and W. Bicz</b> , The effect of erythrocytes on the respiration of human leucocytes	177
<b>Z. Szafran, H. Homańska-Szafranowa and J. Oleksy</b> , Distribution of enzymes of the esterases group in protein fractions of a dogs pancreatic juice	189

No. 3

<b>J. Krzemicka</b> , Les 17-cétostéroïdes et 17-hydroxystéroïdes urinaires chez l'homme, le lapin et le rat. II. Séparation chromatographique des 17-cétostéroïdes neutres . . . . .	201
<b>T. Borkowski</b> , Research on the respiration of brain tissue <i>in vitro</i> . . . . .	213
<b>Z. Lafallo, A. M. Dancewicz and T. Musiałowicz</b> , Effect of ionizing radiation on the blood clotting <i>in vitro</i> . . . . .	225
<b>J. Janicki and J. Skupin</b> , Chromatographic separation of electroneutral and electropositive factors of vitamins B <sub>12</sub> and B <sub>12p</sub> after prior electrophoresis . . . . .	235
<b>W. Mański and H. Kozdroj</b> , Research on the polymorphism of blood group-substances . . . . .	245
<b>A. M. Dancewicz and B. Lipiński</b> , The effect of X-rays on $\delta$ -aminolevulinic acid dehydrase <i>in vitro</i> . . . . .	267
<b>I. Reifer and M. Solecka</b> , Terminal oxidases in wheat seedlings . . . . .	277
<b>J. Janicki and F. Pędziwilk</b> , Vitamin B <sub>12</sub> in the seeds of leguminous plants . . . . .	295
<b>J. Janicki and F. Pędziwilk</b> , Effect of sulphathiazole on the biosynthesis of B <sub>12</sub> vitamins by <i>Propionibacterium shermanii</i> . . . . .	299
B i o t i c a — Archives of Biochemical Pharmacology	

No. 4

<b>M. Zdyb-Gumińska and H. Drożdż</b> , Distribution of some vitamins B in the human brain . . . . .	311
<b>J. Pawelkiewicz and W. Walerych</b> , The isolation of pseudovitamin B <sub>12</sub> from <i>Propionibacterium shermanii</i> cultures . . . . .	327
<b>E. Gašior, M. Pietrusiewicz, H. Kowalska and J. Opieńska-Blauth</b> , The use of Escarbo, sulphonated carbon and synthetic ion exchange resins for desalting biological fluids . . . . .	333
<b>J. Heller, M. J. Piechowska and T. Chojnacki</b> , Inorganic polyphosphates in the Hawk-moth ( <i>Celerio euphorbiae</i> ) . . . . .	343
<b>I. Reifer and K. Toczko</b> , On the distribution of nicotine in the roots of <i>Nicotiana rustica</i> . . . . .	355
<b>I. Reifer and L. Buraczewska</b> , The ornithine cycle in pea seedlings . . . . .	361
<b>K. Toczko</b> , Microbiological degradation of nicotine . . . . .	373
<b>A. M. Dancewicz, B. Lipiński and O. Rosiek</b> , The effect <i>in vivo</i> of X-irradiation on $\delta$ -aminolaevulinic acid dehydrase in rats . . . . .	381
<b>S. Niewiarowski and A. Czupryna</b> , Note on the standaryzation and calibration of serum glutamic- oxalacetic and glutamic- pyruvic transaminase . . . . .	393
<b>P. Masłowski, H. Masłowska and W. Minakowski</b> , A modified method for retention analysis of aminoacids . . . . .	410

<b>W. Ostrowski and A. Krawczyk</b> , The biochemistry of autotrophic sulphur bacteria. V. Biosynthesis of vitamin B <sub>12</sub> uniformly labelled with <sup>14</sup> C . . .	409
<b>I. Chmielewska, K. Belżeczka, K. Raczyńska-Bojanowska and J. Manicki</b> , Effect of glucose on utilization of infused bovins blood protein, hydrolyzate in human subjects . . . . .	419
<b>Jan J. Stanisławski</b> , A modification of the chromatographic method for detection $\beta$ -indolylacetic acid and its application to the assay in wheat seedlings . . . . .	427
<b>S. Angielski, R. Niemiro, W. Makarewicz and J. Rogulski</b> , Aminoaciduria induced by maleic acid . . . . .	431
<b>A. Morawiecki</b> , Research on pyruvic kinase. Determination of molecular weight of the enzyme obtained from rabbit muscles . . . . .	437



## I N D E K S   A U T O R Ó W

### A

- Angielski S.**, Aminokwasy moczu bliźniąt jedno- i dwujajowych . . . . . 75
- Angielski S., Niemiro R., Makarewicz W. i Rogulski J.**, Aminoacyduria wywołana kwasem maleinowym . . . . . 431

### B

- Bełżecka K.**, patrz Chmielewska I., Raczyńska-Bojanowska K. i Manicki J. 419
- Bicz W.**, patrz Koj A. i Zgliczyński J. M. . . . . 177
- Borkowski T.**, Badania nad oddychaniem tkanki mózgowej *in vitro* . . . . . 213
- Buraczewska L.**, patrz Reifer I. . . . . 361

### C

- Chmielewska I., Bełżecka K., Raczyńska-Bojanowska K. i Manicki J.**, Wpływ glikozy na wykorzystanie przez organizm ludzki podanego dożylnie białka krwi bydłcej. II. . . . . 419
- Chojnacki T.**, patrz Heller J. i Piechowska M. J. . . . . 343
- Czupryna A.**, patrz Niewiarowski S. . . . . 393

### D

- Dancewicz A. M. i Lipiński B.**, Wpływ promieniowania rentgenowskiego na dehydrazę kwasu  $\delta$ -aminolewulinowego *in vitro* . . . . . 267
- Dancewicz A. M.**, patrz Latałło Z. i Musiałowicz T. . . . . 225
- Dancewicz A. M., Lipiński B. i Rosiek O.**, Wpływ promieniowania rentgenowskiego na dehydrazę kwasu  $\delta$ -aminolewulinowego *in vivo* u szczurów . . . . . 381

### I X

<b>Dobryczycka W.</b> , patrz Mejbaum-Katzenellenbogen Wanda i Króliczek A. . . . .	165
<b>Drewnowska I.</b> , patrz Krawczyński J., Fleszyński Z. i Rycaj M. . . . .	139
<b>Drożdż H.</b> , patrz Zdyb-Gumińska M. . . . .	311

## F

<b>Fleszyński Z.</b> , patrz Krawczyński J., Drewnowska I. i Rycaj M. . . . .	139
---	-----

## G

<b>Gąsior E., Pietrusiewicz M., Kowalska H. i Opieńska-Blauth J.</b> , Zastosowanie węgla sulfonowanego Escarbo oraz syntetycznych żywic jonowymienionych do odsalania płynów biologicznych . . . . .	333
<b>Grudzińska A.</b> , Zawartość sodu i potasu w ślinie człowieka . . . . .	67

## H

<b>Heller J. and Jeżewska M.</b> , Nucleic acid and other phosphorus fractions in the course of metamorphosis of the chinese Tussur-moth ( <i>Antheraea pernyi</i> ) . . . . .	3
<b>Heller J., Piechowska M. J. i Chojnacki T.</b> , Inorganic polyphosphate in the Hawk-moth ( <i>Celerio euphorbiae</i> ) . . . . .	343
<b>Homańska-Szafranowa H.</b> , patrz Szafran Z. i Oleksy J. . . . .	189

## J

<b>Janicki J. i Skupin J.</b> , Rozdział chromatograficzny elektroobojętnych i elektrododatnich czynników witaminu B <sub>12</sub> i B <sub>12p</sub> po elektroforezie . . . . .	235
<b>Janicki J. i Pędziwilk F.</b> , Występowanie witaminu B <sub>12</sub> w nasionach roślin motylkowych . . . . .	295
<b>Janicki J. i Pędziwilk F.</b> , Wpływ sulfatiazolu na biosyntezę witaminów z grupy B <sub>12</sub> przez <i>Propionibacterium shermanii</i> . . . . .	299
<b>Jeżewska M.</b> , patrz Heller J. . . . .	3

## K

<b>Kleczkowski K.</b> , Biosynteza cytruliny w kielkach roślin motylkowych . . . . .	155
<b>Koj. A., Zgliczyński J. M. i Bicz W.</b> , Wpływ erytrocytów na oddychanie leukocytów ludzkich . . . . .	177

## X

<b>Kowalska H.</b> , patrz Gąsior E., Pietrusiewicz M. i Opieńska-Blauth J. . . . .	333
<b>Kozdroj H.</b> , patrz Mański W. . . . .	245
<b>Krawczyk A.</b> , patrz Ostrowski W. . . . .	409
<b>Krawczyński J., Drewnowska I., Fleszyński Z. i Rycaj M.</b> , Badania nad metabolizmem białkowym mózgu i mózdzku przy pomocy tyrozyny znakowanej <sup>14</sup> C . . . . .	139
<b>Króliczek A.</b> , patrz Mejbaum-Katzenellenbogen Wanda . . . . .	165
<b>Krzemicka J.</b> , 17-ketosterydy i 17-hydroksysterydy w moczu ludzi, królików i szczurów. II. Rozdział chromatograficzny 17-ketosterydów obojętnych . . . . .	201
<b>Kurnatowski R., Szymkowiak A., Wiśniewski W. i Pawelkiewicz J.</b> , Prekursory biosyntezy nukleotydocyjanokobalamin. 5. Biosynteza witaminu B <sub>12</sub> III i innych nukleotydocyjanokobalamin . . . . .	19

## L

<b>Latallo Z., Dancewicz A. M. i Musiałowicz T.</b> , Effect of ionizing radiation on the blood clotting system <i>in vitro</i> . . . . .	225
<b>Lipiński B.</b> , patrz Dancewicz A. M. . . . .	267
<b>Lipiński B.</b> , patrz Dancewicz A. M. i Rosiek O. . . . .	381

## M

<b>Makarewicz W.</b> , patrz Angielski S., Niemiro R. i Rogulski J. . . . .	431
<b>Manicki J.</b> , patrz Chmielewska I., Bełżecka K. i Raczyńska-Bojanowska K. . . . .	419
<b>Mański W. i Kozdroj H.</b> , Badania nad wielopostaciowością substancji grupowych krwi . . . . .	245
<b>Masłowski P., Masłowska H. i Minakowski W.</b> , Zmodyfikowana metoda analizy retencyjnej aminokwasów . . . . .	401
<b>Masłowska H.</b> , patrz Masłowski P. i Minakowski W. . . . .	401
<b>Mejbaum-Katzenellenbogen Wanda, Dobryszcka W. i Króliczek A.</b> , Ilościowe oznaczanie taniną frakcji białkowych surowicy, rozdzielonych za pomocą elektroforezy bibułowej . . . . .	165
<b>Minakowski W.</b> , patrz Masłowski P. i Masłowska H. . . . .	401
<b>Morawiecki A.</b> Badania nad kinazą pirogronową. Wyznaczenie masy cząsteczkowej enzymu z mięśni królika (tymczasowe doniesienie) . . . . .	437
<b>Musiałowicz T.</b> , patrz Latallo Z. i Dancewicz A. M. . . . .	225

## N

<b>Niemiro R.</b> , patrz Angielski S., Makarewicz W. i Rogulski J. . . . .	431
<b>Niewiarowski S. i Czupryna A.</b> , Notatka w sprawie standaryzacji i jednostkowania transaminazy kwasu szczawiooctowego i pirogonowego w surowicy krwi . . . . .	393

## XI

## O

<b>Oleksy J.</b> , patrz Szafran Z. i Homańska-Szafranowa H. . . . .	189
<b>Opieńska-Blauth J.</b> , patrz Gąsior E., Pietrusiewicz M. i Kowalska H. . . . .	333
<b>Ostrowski W. i Krawczyk A.</b> , Biochemia samożywnych bakterii siarkowych. V. Biosynteza witaminu B <sub>12</sub> znaczonego równomiernie <sup>14</sup> C . . . . .	409

## P

<b>Pawelkiewicz J.</b> , patrz Kurnatowski R., Szymkowiak A. i Wiśniewski W. . . . .	19
<b>Pawelkiewicz J. i Walerych W.</b> , Izolacja pseudowitaminu B <sub>12</sub> z kultur <i>Propionibacterium shermanii</i> . . . . .	327
<b>Pędziwilk F.</b> , patrz Janicki J. . . . .	295, 299
<b>Piechowska M. J.</b> , patrz Heller J. i Chojnacki T. . . . .	343
<b>Pietrusiewicz M.</b> , patrz Gąsior E., Kowalska H. i Opieńska-Blauth J. . . . .	333

## R

<b>Raczyńska-Bojanowska K.</b> , patrz Chmielewska I., Belżeczka K. i Manicki J. . . . .	419
<b>Reifer L. and Buraczewska L.</b> , The ornithine cycle in pea seedlings . . . . .	361
<b>Reifer I. i Toczko K.</b> , O rozkładzie nikotyny w korzeniach machorki . . . . .	355
<b>Reifer I. i Solecka M.</b> , Oksydazy końcowe kielków pszenicy . . . . .	277
<b>Rogulski J.</b> , patrz Angielski S., Niemiro R. i Makarewicz W. . . . .	431
<b>Rosiek O.</b> , patrz Danczewicz A. M. i Lipiński B. . . . .	381
<b>Rycaj M.</b> , patrz Krawczyński J., Drewnowska I. i Fleszyński Z. . . . .	139

## S

<b>Shugar D., Sierakowska H. i Szenberg A.</b> , Quantitative stative staining with radioactive indicators: — Alkaline phosphatase . . . . .	27
<b>Sierakowska H.</b> , patrz Shugar D. i Szenberg A. . . . .	27
<b>Skupin J.</b> , patrz Janicki J. . . . .	235
<b>Stanisławski Jan J.</b> , Modyfikacja chromatograficznej metody wykrywania kwa- su β-indoliloctowego i przystosowanie jej do oznaczeń w kielkach pszenicy . . . . .	427
<b>Szafran Z., Homańska-Szafranowa H. i Oleksy J.</b> , Rozmieszczenie enzymów z grupy esteraz we frakcjach białkowych soku trzuskowego psa . . . . .	189
<b>Szenberg A.</b> , patrz Shugar D. i Sierakowska H. . . . .	27
<b>Solecka M.</b> , patrz Reifer I. . . . .	277
<b>Szymkowiak A.</b> , patrz Kurnatowski R., Wiśniewski W. i Pawelkiewicz J. . . . .	19

## T

<b>Toczko K.</b> , Mikrobiologiczny rozkład nikotyny . . . . .	373
<b>Toczko K.</b> , patrz Reifer I. . . . .	355
<b>Trojanowski J.</b> , Częściowe oczyszczanie tyrozynazy z poczwarek <i>Sphinx pinastri</i> . . . . .	59

## W

<b>Walerych W.</b> , patrz Pawełekiewicz J. . . . .	327
<b>Wehr H.</b> , Badania nad własnościami pirofosfatazy z mięśnia królika . . . . .	47
<b>Wierzuchowski M.</b> , Zapoczątkowanie wysycania glikozą spoczywającego psa a rozmiary jego ciała . . . . .	93
<b>Wiśniewski W.</b> , patrz Kurnatowski R., Szymkowiak A. i Pawełekiewicz J. . . . .	19

## Z

<b>Zdyb-Gumińska M. i Drożdż H.</b> , Rozmieszczenie niektórych witaminów B w mózgu ludzkim . . . . .	311
<b>Zgliczyński M.</b> , patrz Koj A. i Bicz W. . . . .	177

## I n d e k s r z e c z o w y

### A

- Aminoacyduria:** wywołana kwasem maleinowym, S. Angielski, R. Niemirow, W. Makarewicz i J. Rogulski . . . . . 431
- Aminokwasy:** zmodyfikowana metoda analizy retencyjnej, P. Masłowski, H. Masłowska i W. Minakowski . . . . . 401
- Aminokwasy:** moczu bliźniąt jedno- i dwujajowych, S. Angielski . . . . . 75
- $\delta$ -Aminolewulinowy kwas:** wpływ promieniowania rentgenowskiego na dehydrazę, *in vitro*, A. M. Dancewicz i B. Lipiński . . . . . 269
- $\delta$ -Aminolewulinowy kwas:** wpływ promieniowania rentgenowskiego na dehydrazę, *in vivo* u szczurów, A. M. Dancewicz, B. Lipiński i O. Rosiek . . . . . 381
- Antheraea pernyi:** kwasy nukleinowe i inne, frakcje fosforowe w czasie metamorfozy, J. Heller i M. Jeżewska . . . . . 3

### B

- Białko:** hydrolizat, wpływ glikozy na wykorzystanie podanego dożylnie, I. Chmielewska, K. Bełżecka, K. Raczyńska-Bojanowska i J. Manicki . . . . . 419
- Białko:** metabolizm w mózgu badany przy pomocy  $^{14}\text{C}$ -tyrozyny, J. Krawczyński, I. Drewnomska, Z. Fleszyński i M. Rycaj . . . . . 139
- Białko:** surowicy, ilościowe oznaczanie taniną, po rozdziale elektroforetycznym, Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen, W. Dobryszczycka i A. Króliczek . . . . . 165

### C

- Celerio euphorbiae:** polifosforany nieorganiczne u motyla, J. Heller, M. J. Piechowska i T. Chojnacki . . . . . 343
- Cytrulina:** biosynteza w kielkach roślin motylkowych, K. Kleczkowski . . . . . 155

### E

- Esterazy:** rozmieszczenie we frakcjach białkowych soku trzustkowego psa, Z. Szafran, H. Homańska-Szafranowa i J. Oleksy . . . . . 189

## XIV

<b>Erytrocyty:</b> wpływ na oddychanie leukocytów ludzkich, (A. Koj., J. M. Zgliczyński i W. Bicz . . . . .	177
---	-----

## F

<b>Fosfataza alkaliczna:</b> ilościowe barwienie radioaktywnymi indykatorami, D. Shugar, H. Sierakowska i A. Szenberg . . . . .	27
<b>Fosforowe frakcje:</b> i kwasy nukleinowe w czasie metamorfozy <i>Antheraea pernyi</i> , J. Heller i M. Jeżewska . . . . .	3

## G

<b>Glikoza:</b> wpływ na wykorzystanie przez organizm ludzki podanego dożylnie hydrolizatu białka krwi bydłowej. II, I. Chmielewska, K. Belżeczka, K. Raczynska-Bojanowska i J. Manicki . . . . .	419
<b>Glikoza:</b> zapoczątkowanie wysycania spoczywającego psa a rozmiary jego ciała, M. Wierzuchowski . . . . .	93
<b>Grupowe substancje krwi:</b> badania nad wielopostaciowością, W. Mański i H. Kozdroj . . . . .	245

## H

<b>Histochemia:</b> ilościowe oznaczenie alkalicznej fosfatazy barwieniem radioaktywnymi indykatorami, D. Shugar, H. Sierakowska i A. Szenberg . . . . .	27
--	----

## I

<b><math>\beta</math>-indoliloctowy kwas:</b> modyfikacja chromatograficznej metody wykrywania i przystosowanie do oznaczeń w kielkach pszenicy, Jan J. Stanisławski . . . . .	427
--	-----

## K

<b>17-ketosterydy:</b> w moczu ludzi, królików i szczurów. II. Rozdział chromatograficzny, J. Krzemicka . . . . .	201
<b>Kielki pszenicy:</b> oksydazy końcowe, I. Reifer i M. Solecka . . . . .	277
<b>Kielki pszenicy:</b> chromatograficzna metoda do wykrywania i oznaczania kwasu $\beta$ -indoliloctowego, Jan J. Stanisławski . . . . .	427
<b>Krew:</b> wielopostaciowość substancji grupowych, W. Mański i H. Kozdroj . . . . .	245
<b>Krew krzepnięcie:</b> wpływ promieniowania jonizującego <i>in vitro</i> , Z. Latalo, A. M. Dancewicz i T. Musiałowicz . . . . .	225

## L

<b>Leukocyty:</b> wpływ erytrocytów na oddychanie, A. Koj, J. M. Zgliczyński i W. Bicz . . . . .	177
--	-----

## M

<b>Maleinowy kwas:</b> aminoacyduria wywołana, S. Angielski, R. Niemirow, W. Makarewicz i J. Rogulski . . . . .	431
<b>Mocz:</b> aminoacyduria wywołana kwasem maleinowym, S. Angielski, R. Niemirow, W. Makarewicz i J. Rogulski . . . . .	431
<b>Mocz:</b> bliźniąt jedno- i dwujajowych, zawartość aminokwasów, S. Angielski . . . . .	75
<b>Mocz:</b> ludzi, królików i szczurów, 17-ketosterydy obojętne, rozdział chromatograficzny, J. Krzemicka . . . . .	201
<b>Mózg:</b> badania nad oddychaniem <i>in vitro</i> , T. Borkowski . . . . .	213
<b>Mózg:</b> rozmieszczenie niektórych witaminów B, M. Zdyb-Gumińska i H. Drożdż . . . . .	311
<b>Mózg i mózdzek:</b> metabolizm białkowy badany przy pomocy <sup>14</sup> C-tyrozyny, J. Krawczyński, I. Drewnowska, Z. Fleszyński i M. Rycaj . . . . .	139

## N

<b>Nicotiana rustica:</b> rozkład nikotyny w korzeniach, I. Reifer i K. Toczko . . . . .	355
<b>Nikotyna:</b> mikrobiologiczny rozkład, K. Toczko . . . . .	373
<b>Nikotyna:</b> rozkład w korzeniach machorki, I. Reifer i K. Toczko . . . . .	355
<b>Nukleinowe kwasy:</b> i inne frakcje fosforowe w czasie metamorfozy <i>Antheraea pernyi</i> , J. Heller i M. Jeżewska . . . . .	3
<b>Nukleotydocyjanokobalaminy:</b> prekursor biosyntezy, R. Kurnatowski, A. Szymkowiak, W. Wiśniewski i J. Pawełekiewicz . . . . .	19

## O

<b>Oksydazy:</b> końcowe kielków pszenicy, I. Reifer i M. Solecka . . . . .	277
<b>Ornitynowy cykl:</b> w kielkach grochu, I. Reifer i L. Buraczewska . . . . .	361

## P

<b>Pirofosfataza:</b> z mięśni królika, badania nad własnościami, H. Wehr . . . . .	47
<b>Polifosforany:</b> nieorganiczne u motyla wilczomlecza, J. Heller, M. J. Piechowska i T. Chojnacki . . . . .	343
<b>Potas:</b> zawartość w ślinie człowieka, A. Grudzińska . . . . .	67

## XVI



<b>Promieniowanie jonizujące:</b> wpływ na układ krzepnięcia krwi <i>in vitro</i> , Z. La- tało, A. M. Dancewicz i T. Musiałowicz . . . . .	225
<b>Promieniowanie rentgenowskie:</b> wpływ na dehydrację kwasu $\delta$ -aminolewuli- nowego <i>in vitro</i> , A. M. Dancewicz i B. Lipiński . . . . .	267
<b>Promieniowanie rentgenowskie:</b> wpływ na dehydrację kwasu $\delta$ -aminolewuli- nowego <i>in vivo</i> u szczurów, A. M. Dancewicz, B. Lipiński i O. Rosiek . . . . .	381
<b>Propionibacterium shermanii:</b> biosynteza witaminu B <sub>12III</sub> i innych nukleo- tydocyjanokobalamin, R. Kurnatowski, A. Szymkowiak, W. Wiśniewski i J. Pawelkiewicz . . . . .	19
<b>Propionibacterium shermanii:</b> izolacja pseudowitaminu B <sub>12</sub> z kultur, J. Pa- welkiewicz i W. Walerych . . . . .	327
<b>Propionibacterium shermanii:</b> wpływ sulfatiazolu na biosyntezę witaminów z grupy B <sub>12</sub> , J. Janicki i F. Pędziwilk . . . . .	299

## R

<b>Rośliny motylkowe:</b> biosynteza cytruliny w kielkach, K. Kleczkowski . . . . .	155
<b>Rośliny motylkowe:</b> ornitynowy cykl w kielkach grochu, I. Reifer i L. Bura- czewska . . . . .	361
<b>Rośliny motylkowe:</b> występowanie witaminu B <sub>12</sub> w nasionach, J. Janicki i F. Pędziwilk . . . . .	295

## S

<b>Sód:</b> zawartość w ślinie człowieka, A. Grudzińska . . . . .	67
<b>Sphinx pinastri:</b> oczyszczanie tyrozynazy z poczwarek, J. Trojanowski . . . . .	59
<b>Surowica krwi:</b> notatka w sprawie standaryzacji i jednostkowania trans- aminazy kwasu szczawiooctowego i pirogronowego, S. Niewiarowski i A. Czupryna . . . . .	393
<b>Surowica krwi:</b> oznaczanie taniną frakcji białkowych rozdzielanych elektro- forezą bibułową, Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen, W. Dobryczycka i A. Króliczek . . . . .	165
<b>Ślina:</b> człowieka, zawartość sodu i potasu, A. Grudzińska . . . . .	67

## T

<b>Thiobacillus thioparus:</b> synteza witaminu B <sub>12</sub> oznaczonego <sup>14</sup> C, W. Ostrowski i A. Krawczyk . . . . .	409
<b>Transaminaza kwasu szczawiooctowego i pirogronowego:</b> standaryzacja i jed- nostkowanie w surowicy krwi, S. Niewiarowski i A. Czupryna . . . . .	393
<b>Trzuskowy sok:</b> rozmieszczenie enzymów z grupy esteraz we frakcjach białkowych, Z. Szafran, H. Homańska-Szafranowa i J. Oleksy . . . . .	189
<b>Tyrozynaza:</b> oczyszczanie z poczwarek <i>Sphinx pinastri</i> , J. Trojanowski . . . . .	59

## W

<b>Węgiel:</b> sulfonowany Escarbo, zastosowanie do odsalania płynów biologicznych, E. Gąsior, M. Pietrusiewicz, H. Kowalska i J. Opieńska-Blauth . . . . .	333
<b>Witamin B<sub>12</sub>:</b> biosynteza znaczonego równomiernie <sup>14</sup> C u samożywnych bakterii siarkowych, W. Ostrowski i A. Krawczyk . . . . .	409
<b>Witamin B<sub>12</sub>III:</b> prekursory biosyntezy, R. Kurnatowski, A. Szymkowiak, W. Wiśniewski i J. Pawelkiewicz . . . . .	19
<b>Witamin B<sub>12</sub>:</b> występowanie w nasionach roślin motylkowych, J. Janicki i F. Pędziwilk . . . . .	295
<b>Witamin B<sub>12</sub> i B<sub>12p</sub>:</b> rozdział chromatograficzny elektroobojętnych i elektrododatnich czynników, J. Janicki i J. Skupin . . . . .	235
<b>Witamin B<sub>12</sub> (pseudo):</b> izolacja z kultur <i>Propionibacterium shermanii</i> , J. Pawelkiewicz i W. Walerych . . . . .	327
<b>Witaminy B:</b> rozmieszczenie w mózgu ludzkim, M. Zdyb-Gumińska i H. Drożdż . . . . .	311
<b>Witaminy B<sub>12</sub>:</b> wpływ sulfatiazolu na biosyntezę przez <i>Propionibacterium shermanii</i> , J. Janicki i F. Pędziwilk . . . . .	299

## Z

<b>Zywiec jonowymienne:</b> zastosowanie do odsalania płynów biologicznych, E. Gąsior, M. Pietrusiewicz, H. Kowalska i J. Opieńska-Blauth . . . . .	333
---	-----

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

ACTA  
BIOCHIMICA POLONICA

K W A R T A L N I K

T O M   V  
Z e s z y t   1

W A R S Z A W A   1 9 5 8  
P A Ń S T W O W E   W Y D A W N I C T W O   N A U K O W E

KOMITET REDAKCYJNY

Tadeusz Korzybski, Irena Mochnacka, Włodzimierz Mozołowski

RADA REDAKCYJNA

Tadeusz Baranowski, Irena Chmielewska, Józef Heller,  
Edmund Mikulaszek, Włodzimierz Niemierko, Ignacy Reifer,  
Bolesław Skarżyński, Janusz Supniewski,  
Mieczysław Wierzuchowski

ADRES REDAKCJI: Warszawa, Śniadeckich 8

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — DZIAŁ CZASOPISM  
Warszawa 1, Miodowa 10

Nakład 804 + 96	Oddano do składania 10.XII.57
Ark. wyd. 6,75, ark. druk. 6	Podpisano do druku 3.III.1958
Papier druk sat. 80 g 70x100 III kl	Druk ukończono w marcu 1958
Cena zł 25.—	Zamówienie 489 A-16

Warszawska Drukarnia Naukowa, Warszawa, Śniadeckich 8

J. HELLER and M. JEZEWSKA

**NUCLEIC ACIDS AND OTHER PHOSPHORUS FRACTIONS  
IN THE COURSE OF METAMORPHOSIS OF THE CHINESE  
TUSSUR MOTH (*ANTHRAEA PERNYI*)**

*From the Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences,  
Warsaw*

*Department of Evolutionary Biochemistry*

The investigations were intended to explore the changes in the distribution of phosphorus in the course of metamorphosis of the oak-feeding tussur moth <sup>1</sup>. There is ample material relating to the distribution of various phosphorus fractions in the Hawk-moth in relation to the instar [8], [9]. It appeared interesting to obtain data from a cocoon-spinning species. After all, a comparison of a variety of general chemical data relative to the metamorphosis of the Hawk-moth and to that of the mulberry-feeding moth, revealed major differences between the two species [7]. Furthermore, data obtained from the Hawk-moth merely indicate the sum-total of acid insoluble fractions. Consequently, it was decided to determine more precisely the particular insoluble fractions especially with reference to the fraction of nucleic acids. The main issue involved was the question of whether the transformation of the nucleoproteids of the chrysalis to those of the ultimate instar runs a gradual course without shifting the equilibrium between the macromolecular and the micromolecular components, of whether there is a transient rise in depolymerization with a resulting large pool of nucleotides or nucleosides, or even of free bases.

---

<sup>1</sup> We are indebted to the Management of the Scientific Natural Silk Institute in Milanówek for making available chrysalides of *Antheraea pernyi*.

## EXPERIMENTAL PART

The investigations involved an aestival generation of the oak-feeding tussur moth, with a chrysalid stage lasting roughly 25 days. The analyses concerned four life stages of the insect: the spinning larva, the freshly pupated chrysalis, chrysalis 10 days after pupation, and imagines immediately after eclosion. Eggs were removed from some females and analysed separately. Also the spinning glands of some of the larvae were removed and analysed separately. The phosphorus was determined in lipid (P-lip.), acid soluble (P-sol.), nucleic acid (P-NA), and phosphoprotein (P-p) fractions.

Considering the large fat content in the chrysalides, first the phospholipids were extracted after the method of W. Niemierko [15]. The insects were ground with a chilled 5 : 1 acetone : chloroform mixture, and subsequently heated three times for three minute periods with a boiling 3 : 1 alcohol : ether mixture. Both lipid fractions, the acetone-chloroform and the alcohol-ether ones, were pooled.

From the residue, acid-soluble phosphorus compounds were extracted first with distilled water overnight in a refrigerator, and subsequently twice with 0.15 M perchloric acid for 20 min. at a temperature of 0°C. Most of the micromolecular phosphorus compounds dissolved in the water and the remainder was extracted with perchloric acid. The combined water and 0.15 M perchloric acid extracts constituted the fraction of acid-soluble compounds.

Preliminary extraction with water was used owing to the presence in the oak-feeding moth of large amounts of soluble phosphorus compounds. In order to extract all of them by proceeding after the method of Ogur and Rosen [17], extraction with only perchloric acid had to be repeated many times, whereby the solutions obtained were excessively diluted. Both methods of extracting nucleic acid fractions yield the same P-NA values.

After removing acid-soluble phosphorus compounds, it was attempted to separate nucleic acids by 0.6 M perchloric acid into the ribonucleic acid fraction (RNA), obtained at 0°C., and the desoxyribonucleic acid (DNA) at 70°C. [17]. However, the method failed with regard to our material. Tests for ribose and for desoxyribose were invariably positive in either of the two extracts obtained. Consequently, the phosphorus content of the fractions could serve as a basis not for calculating the nucleic acids separately, but for determining their over-all content. Therefore, extracts obtained with the aid of perchloric acid in 0° and in 70°C. were treated as a single nucleic acid fraction (NA), in which amounts of RNA and DNA were determined on evidence of amounts of

ribose (R) and of desoxyribose (DR). A 0.6 M concentration of  $\text{HClO}_4$  was sufficient for separating nucleic acids from proteins. The residue was dissolved in boiling 2 per cent  $\text{NaOH}$ , and this fourth fraction contained the phosphorus of phosphoproteins.

Extracts by 0.15 M and 0.6 M perchloric acid still contained some protein which interfered with determinations of pentoses and phosphorus hydrolyzable after Kerr. Therefore, one volume of ethanol was added to the solutions which were then left overnight in a refrigerator. A white precipitate, free of phosphorus, developed and was centrifuged.

Phosphorus was determined in all four fractions after digestion with sulphuric acid after the method of Fiske and Subbarow [5]. Ribose was determined in the fractions of acid-soluble compounds and of nucleic acids after the method of Mejbaum [14], and desoxyribose, also in both fractions, after Dische [4]. In the conditions entailed by the methods referred to, colour is produced merely by nucleotide pentoses combined with purines, whereas those of pyrimidine nucleotides elude detection. In the nucleic acid fractions, we determined also phosphorus (P-hydr.) hydrolyzable after Kerr [10], i. e., the P split off from purine nucleotides by 1 hour digestion with 2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  at a temperature of  $100^\circ\text{C}$ . Hydrolyzable phosphorus, when compared with total P-NA, makes it possible to determine the ratio between purines and pyrimidines in the nucleic acid fraction. Consequently, determinations of both pentoses and P-hydr. after Kerr enable us to calculate the fraction of purine nucleotides, whereby the two methods provide reciprocal control.

## RESULTS AND DISCUSSION

Tables 1—6 present the results of analyses involving larvae, recent chrysalides, 10 day old chrysalides, and imagines. Beside the values for whole larvae, there are given results obtained from analyses of the removed spinning glands, and beside the values for whole females, those obtained separately from eggs. The contents of phosphorus, ribose and desoxyribose are given in mg. per insect and in mg. per cent. All determinations were carried out parallel in duplicate, and the results showed adequate agreement. The figures quotes in the Tables are means obtained from five duplicate determinations in which instars of the same age were used. For values indicated in mg. per insect, their standard deviation was calculated.

### I

Table 1 shows the results of determination of phosphorus of particular fractions from the four life stages referred to before. By comparing data

Table 1  
Phosphorus content in particular fractions in males and females in the course  
of metamorphosis of the oak-feeding tussock moth

	P-lip.		P-sol.		P-NA		P-p		sum total						
	mg.	stand. deviation	mg.	stand. deviation	mg.	stand. deviation	mg.	stand. deviation	mg.	stand. deviation					
f e m a l e s															
larvae with glands	2.85	0.13	24.5	4.15	0.17	35.6	3.30	0.21	28.3	0.59	0.08	5.2	10.89	1.15	93.6
spinning glands alone	0.00	—	0.0	0.30	0.06	22.3	1.06	0.08	79.0	0.28	0.05	20.8	1.64	0.33	122.1
recent chrysalides	2.07	0.10	26.7	6.53	0.23	84.0	2.10	0.06	27.0	0.25	0.03	3.2	10.95	0.41	140.9
10 day old chrysalides	1.85	0.11	26.6	6.00	0.14	86.8	1.74	0.12	25.1	0.21	0.05	3.0	9.80	0.28	141.5
imagines with eggs	1.73	0.20	45.3	4.02	0.39	105.4	1.18	0.16	30.9	0.32	0.02	8.3	7.25	1.58	189.9
eggs	0.79	0.04	43.4	2.68	0.31	147.2	0.72	0.16	39.5	0.17	0.00	9.3	4.36	0.63	239.4
m a l e s															
larvae with glands	2.01	0.22	23.0	2.75	0.18	31.4	2.37	0.12	27.0	0.43	0.04	4.9	7.70	0.30	86.3
spinning glands alone	0.00	—	0.0	0.20	0.05	22.2	0.84	0.07	93.4	0.11	0.05	12.2	1.15	0.33	127.9
recent chrysalides	1.00	0.10	21.8	4.51	0.26	97.6	1.03	0.08	22.3	0.05	0.01	1.1	6.59	0.32	142.8
10 day old chrysalides	1.14	0.19	23.7	4.40	0.17	91.7	1.04	0.10	21.6	0.12	0.05	2.5	6.70	0.29	139.5
imagines	0.74	0.20	55.1	1.18	0.12	89.8	0.40	0.04	29.7	0.12	0.02	8.9	2.44	0.16	181.5



obtained from a young chrysalis with those obtained from a larva, we gain a picture of the changes occurring at the time of pupation. It can be seen that the total amount of phosphorus is but slightly reduced. The apparently paradoxical increase of 0.06 mg. in females should be attributed to the differences in the weight of the respective specimens used, and it is statistically insignificant. A very distinct fall is revealed in the nucleic acid fractions. The decrement of phosphorus of this fraction is in females 1.2 mg. i. e., 41 per cent, and in males 1.34 mg., i. e., 56.5 per cent of the original value. The reduction of P-NA content coincides with the termination of the functions and atrophy of the spinning glands which accounts for almost 1/3 of the nucleic phosphorus of larvae. Also the fraction of protein phosphorus, present in the spinning glands in relatively large amounts, is reduced in the course of pupation. There is also a reduction in the lipid phosphorus fraction, whose presence was not revealed in the spinning glands. At the expense of these fractions, there is an increase in the fraction of soluble phosphorus. The latter accounts in female larvae for 38.1 per cent of the total phosphorus of the body, and rises during pupation to 59.6 per cent of the latter. In males, we can note a similar rise from 35.7 per cent in the larvae to 68.4 per cent in recent chrysalides. These changes become clearly manifest in Table 2, where the values for particular fractions are indicated in per cent of total phosphorus.

Table 2

*Content of P in particular fractions in per cent of sum total of P taken as 100 per cent (Calculation from Table 1)*

	females				males			
	P-lip.	P-sol.	P-NA	P-p	P-lip.	P-sol.	P-NA	P-p
larvae with glands	26.2	38.1	30.3	5.4	27.9	35.7	30.8	5.6
spinning glands alone	0	18.3	64.6	17.1	0	17.4	73.0	6.6
recent chrysalides	18.9	59.6	19.2	2.3	15.2	68.4	15.6	0.8
10 day old chrysalides	18.9	61.2	17.8	2.1	17.0	65.7	15.5	1.8
imagines with eggs	23.9	55.4	16.3	4.4	30.3	48.4	16.4	4.9
eggs	18.1	61.5	16.5	3.9				

The next life stage investigated was a 10 day old chrysalis, which is close to the middle of the entire pupal stage. A comparison of the results of analyses of these chrysalides with data obtained from recent ones, outlines the changes taking place at the time of reduced metabolism and morphogenetic quiescence.

Total phosphorus cannot be reduced at that time, since the chrysalis assimilates no phosphorus compounds from without and eliminates none.

This may clearly be gathered from a comparison of results expressed in mg. per cent. The apparent drop by 1.7 mg. in the average content in females of this group, is due to the fact that the chrysalides of this group were larger and heavier than average. For males, on the other hand, the results obtained from the two groups are in agreement within the limits of scattering. The distribution of phosphorus among the particular fractions shows at that stage no statistically significant changes.

Further data shown in Table 1 indicate phosphorus fractions in imagines immediately after emergence. The differences which can be noted by comparing them with those for 10-day old chrysalides reveal the changes taking place when the mature insect is being formed inside the pupa. First of all, we note a decrement in total phosphorus, which is probably due to elimination with the meconium, discharged upon eclosion, of some of the orthophosphate [8]. The changes are more striking in males: here the total phosphorus drops from 6.7 mg. to 2.4 mg., that is to say, by almost two thirds. Nevertheless, the content in mg. per cent rises from 139.5 to 181.5; this corresponds to the pronounced reduction in the weight of the imago, as compared to that of the chrysalis. The decrement of total phosphorus is accounted first and foremost by a decrement of 3.2 mg. in the soluble fraction, and of 0.64 mg. in the phosphorus of nucleic acids. A further 0.4 mg. is accounted for by the reduction of lipid phosphorus.

In females, the differences are not as striking. The total decrement amounts to 2.55 mg., whereof almost 2 mg. are accounted for by a fall in the soluble fraction and correspond probably to the orthophosphate of the urine, while 0.56 mg. correspond to the reduction in nucleic acid phosphorus. The phosphorus of lipid and protein fractions fails to show major changes. The less pronounced decrement of phosphorus in females is at that stage explained by the large amount of its compounds found in the eggs. The latter comprise more than half of the total phosphorus of the female imago; this refers above all to the soluble and nucleic acid phosphorus, and also to the lipid phosphorus.

Table 2 shows the changes referred to above in the distribution of phosphorus still more clearly. The Table has been drawn up in such a manner that the values from the column "sum total" in Table 1 have been assumed as 100 per cent, and the values for particular fractions are expressed in per cent of the former values.

## • II

Table 3 shows the content of ribose in the soluble and nucleic acid fractions, separately for males and females, in life stages corresponding to those in Table 1. Table 4 shows an analogical survey of desoxyribose

Table 3  
Ribose content in fractions of: acid-soluble compounds (R-sol.), and nucleic acids (R-NA) in oak-feeding tussur moths during metamorphosis

	Females						Males					
	R-sol.			R-NA			R-sol.			R-NA		
	mg.	stand. deviation	mg. %	mg.	stand. deviation	mg. %	mg.	stand. deviation	mg. %	mg.	stand. deviation	mg. %
larvae with glands	2.61	0.21	22.3	5.79	0.28	49.6	2.30	0.28	26.1	4.02	0.14	45.7
spinning glands alone	0.33	0.07	24.5	1.86	0.13	138.5	0.44	0.06	48.9	1.42	0.17	157.9
recent chrysalides	2.10	0.07	27.1	3.39	0.13	43.9	1.70	0.07	36.8	2.13	0.15	46.3
10 day old chrysalides	1.99	0.09	28.7	3.16	0.34	45.5	1.73	0.14	36.0	2.20	0.13	45.8
imagines (females with eggs)	2.05	0.38	53.7	2.68	0.63	70.4	1.03	0.15	76.6	0.84	0.07	62.5
eggs	0.60	0.11	32.9	1.49	0.32	81.8						

Table 4  
Content of desoxyribose in fractions of: acid-soluble compounds (DR-sol.) and nucleic acids (DR-NA) in the oak-feeding tussur moth during metamorphosis

	Females						Males					
	DR-sol.			DR-NA			DR-sol.			DR-NA		
	mg.	stand. deviation	mg. %	mg.	stand. deviation	mg. %	mg.	stand. deviation	mg. %	mg.	stand. deviation	mg. %
larvae with glands	1.48	0.35	12.6	2.54	0.22	21.7	0.82	0.38	9.3	3.26	0.07	37.1
spinning glands alone	0.41	0.12	30.5	0.99	0.09	73.7	0.24	0.06	26.6	0.80	0.10	88.9
recent chrysalides	0.16	0.04	2.0	1.10	0.06	14.2	0.00	—	0.0	0.68	0.06	14.8
10 day old chrysalides	0.73	0.07	10.5	1.40	0.08	20.2	0.28	0.10	5.8	1.15	0.02	23.9
imagines (females with eggs)	0.00	—	0.0	0.76	0.08	19.9	0.00	—	0.0	0.97	0.14	72.2
eggs	0.00	—	0.0	0.00	—	0.0						

contents. We can see that the process of pupation is attended by a fall in the two pentoses. The females lose an over-all of 3.84 mg. of pentoses, that is to say 46.5 per cent of the content found in larvae. In males the loss amounts to 4.47 mg., which corresponds to 61.5 per cent of the original value. We can see that these changes run parallel to the loss of the phosphorus of nucleic acids, which amounts at that stage to 41 per cent in females, and to 56.5 per cent in males. The data shown in the Table indicate that there is a more pronounced loss of desoxyribose, i. e., of desoxyribonucleic acid, especially in males where the decrement amounts to 79 per cent, as compared to 47 per cent for ribonucleic acid. In females, the differences are less pronounced, although the losses are here also larger for the desoxyribonucleic acid, viz., 56 per cent as compared to 41.5 per cent of ribonucleic acid. Similarly as in the case of phosphorus, a major proportion of the decrement of pentoses in the fractions of the two nucleic acids can be explained by involution of the spinning glands.

The desoxyribose of also the soluble fraction drops rapidly during pupation; a lesser, although still distinct drop is revealed in the content of ribose in the fraction. In this respect, the behaviour of pentoses is unlike that of phosphorus in the case of which a part of the decrement of the phosphorus of the nucleic acid fraction was found to be accounted for by an increment of soluble phosphorus. Thus, the pentoses appear to play a lively part in the metabolic processes at this life stage.

During the first half of the pupal instar, the content of ribose in either fraction and sex shows no statistically significant differences. Desoxyribose increases in quantity according to our results in both the desoxyribonucleic and the soluble fractions.

As can be seen from Table 1, the fraction of nucleic acids is at that life stage of the moth more notably reduced in males and less so in females, owing to a considerable content of nucleic acids in the eggs. The relevant percentages are 32.2 for females, and 61.5 for males. Let us see whether there is a proportionate decrement of pentoses. If the two pentoses are considered in one, the females lose in the course of the final metamorphosis merely 24.5 per cent of the pentose present at the middle of the chrysalid instar, and the males lose 46 per cent. We may see that the loss in pentoses is almost one third less than the losses in nucleic acid phosphorus. However, the difference is spurious and due to the fact that at this instar a larger proportion of the pentoses present can be detected in the nucleic acids. This will be discussed in more detail further below. Consequently, the losses in pentoses taking place in the course of the development of the insect appear to be less.

Interpretation becomes still more complicated when the changes are considered separately for either of the two nucleic acids. The decrement of riboses is in females 15 per cent and statistically insignificant. In males, on the other hand, we note considerable decrement amounting to 61.8 per cent of the ribose found in the chrysalides. The difference between the two sexes is explained by the large amount of ribonucleic acid present in the eggs.

Desoxyribose diminishes in females by 45.6 per cent, tests for desoxyribose in eggs being altogether negative. In males, the decrease amounts to 15.6 per cent and is statistically not significant.

Pentoses are present also in the acid-soluble fraction, but ribose predominates. In the course of the development, the proportion of pentoses diminishes in the soluble compounds; ribose diminishes in females but slightly, as the imago contains still 78.5 per cent of the acid-soluble ribose found in the larvae. In males, the loss is more distinct, so that in the chrysalis and the imago are revealed merely 74 and 44.7 per cent respectively of the soluble pentose compounds of the larva. The content of desoxyriboses of the soluble fraction is smaller. It diminishes rapidly during pupation, appears to rise in the chrysalis, to disappear completely in the imago.

In the urine, neither of the pentoses could be detected.

### III

Table 5 shows the results of determinations of the nucleic phosphorus hydrolyzable after Kerr [10]. This phosphorus is assumed to be identical with that of purine nucleotides, i. e., of those to which both the pentoses determined are generally assumed to relate. Consequently, the phosphorus can be calculated on evidence of the values found for pentoses, provided both assumptions are correct. Table 5 shows on the left side experimental data and on the right the values calculated from pentoses. Agreement is sufficient.

Table 6 shows the proportion between the ribonucleic and the desoxyribonucleic acid as calculated on evidence of ribose and desoxyribose contained in the fractions of nucleic acids. The values for pentoses in milligrams have been converted into molarity. The proportion is higher in females than in males and ranges between 1 and 3. Only in male imagines does it diminish to 0.7, whereas in eggs only ribonucleic acid could be detected.

In the investigations referred to above, pyrimidine nucleotides gave no reaction in the course of determination of either pentoses or phosphorus hydrolyzable after Kerr. They can be reckoned indirectly by

subtracting the phosphorus of purine nucleotides, determined after Kerr or calculated from pentoses, from the total phosphorus of the fractions of nucleic acids. Table 7 shows such a calculation in which the phosphorus of pyrimidine nucleotides is expressed in per cent of total

Table 5

*Comparison of phosphorus hydrolyzable after Kerr (P-hydr.) with the amount of phosphorus calculated from the sum total of ribose and desoxyribose (P-pentoses) in the fraction of nucleic acids of the oak-feeding tussur moth*

	P-hydr.			P-pentoses		
	mg.	stand. deviation	mg.%	mg.	stand. deviation	mg.%
F e m a l e s						
larvae with glands	1.82	0.12	15.5	1.78	0.07	15.2
spinning glands alone	0.53	0.08	39.4	0.61	0.04	45.6
recent chrysalides	1.13	0.09	14.6	0.95	0.03	12.3
10 day old chrysalides	0.95	0.09	13.7	0.98	0.08	14.1
imagines with eggs	0.67	0.08	17.5	0.73	0.10	19.1
eggs alone	0.30	0.09	16.4	0.31	0.05	16.7
M a l e s						
larvae with spinning glands	1.61	0.11	18.4	1.58	0.06	18.0
spinning glands alone	0.42	0.08	61.1	0.48	0.07	53.1
recent chrysalides	0.56	0.04	12.3	0.60	0.04	13.0
10 day old chrysalides	0.55	0.02	11.4	0.72	0.02	14.9
imagines	0.38	0.04	28.2	0.40	0.03	29.6

Hydrolysis in 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 hour at 100°C.

Table 6

*The ratio of RNA to DNA calculated as the molar ratio of ribose to desoxyribose in the fraction of nucleic acids of the oak-feeding tussur moth*

	females	males
larvae with glands	2.0	1.1
spinning glands alone	1.7	1.6
recent chrysalides	2.7	2.8
10 day old chrysalides	2.0	1.7
imagines	3.1	0.7
imagines without eggs	1.4	

nucleic phosphorus. We used in this case the values obtained after Kerr as well as those calculated from pentoses. We can see from the table that the pyrimidine nucleotides are present in amounts not much inferior to those of purine nucleotides. An exception are only male imagines,

which appear to contain almost exclusively purine nucleotides. In female imagines purines predominate in almost the same manner if eggs are disregarded.

Table 7

Content of phosphorus of pyrimidine nucleotides in mg. per specimen and in per cent of total phosphorus of nucleic acids.

The values were obtained by:

- a) subtracting hydrolyzable phosphorus (Table 5) from P-NA (Table 1),
- b) subtracting phosphorus corresponding to pentoses (Table 5) from P-NA (Table 1),
- c) calculation of means from "a" and "b",
- b) expressing mean values "c" as per cent of P-NA.

	a	b	c	d
	females			
larvae with glands	1.48	1.52	1.50	45.5
glands alone	0.53	0.45	0.49	46.2
recent chrysalides	0.97	1.15	1.06	50.5
10 day old chrysalides	0.79	0.76	0.77	44.5
imagines with eggs	0.51	0.45	0.48	40.7
imagines without eggs	0.09	0.04	0.06	14.1
eggs alone	0.42	0.41	0.41	57.6
	males			
larvae with glands	0.76	0.79	0.77	32.7
glands alone	0.42	0.36	0.39	46.4
recent chrysalides	0.47	0.43	0.45	43.7
10 day old chrysalides	0.49	0.32	0.40	38.9
imagines	0.02	0.00	0.01	2.5

However, this interpretation of our findings is not the only one possible. An alternative interpretation may assume in moths a weakening of bonds in pyrimidine nucleotides, whereby pentoses are enabled to react and phosphorus to be split off after Kerr. In this case the purine : pyrimidine ratio could be analogical to the generally found in biological material.

#### IV

In the spinning glands, there is a strikingly large amount of phosphorus in the fraction of nucleic acids. There is between three and four times more of it per weight unit than in the whole larva or chrysalis, and it accounts for up to 65 per cent of the total phosphorus present in the gland. In agreement with this high proportion of P-NA, we find in the glands large amounts of ribose and desoxyribose. Approximately

half of the phosphorus of the fraction of nucleic acids can be determined after Kerr, consequently, the ratio between purine and pyrimidine nucleotides is close to 1. The amount of RNA is larger than that of DNA, and their ratio ranges between 1.6 and 1.7. The fraction of acid-soluble compounds contains little phosphorus, viz., between 16 and 18 per cent of total P contained in the gland. There is also little ribose and desoxyribose in this fraction.

The large proportion of nucleic acids in the spinning gland is probably associated with the synthesis of silk protein. This was noted already by Brachet (quoted after Chantrenne [3]). This view is further supported by the fact that when the cocoon is ready and the gland become atrophied, the nucleic acids of the latter do not pass into the chrysalid but disappear.

## V

In addition to the experiments referred to above, the fraction of acid-soluble compounds obtained from 10-days old chrysalides was assayed separately for free purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides. If the transformation of the chrysalis into an imago involved a phase of histolysis attended by depolymerization of macromolecular components, it would be reasonable to expect exactly at that phase maximum accumulation of simple components as material for future synthesis and histogenesis.

From the acid-soluble fraction we precipitated by classical methods nucleotides (by uranyl acetate) and nucleosides and free bases by silver nitrate (a convenient procedure was quoted by Kerr [11], [12]). Neither free bases nor nucleosides were found to be present in amounts sufficient to yield a precipitate of silver salts. Uranyl acetate produced a precipitate containing ribose which demonstrated the presence of nucleotides, but the amount of ribose was not in excess of the quantities detected in the fraction also at other life stages. Consequently, the possible transformation of nucleoproteids of the chrysalis proceeds gradually, without a larger pool of depolymerization products being formed. These results are analogical to those obtained by Heller [6] in investigations on the transformation of proteins. Contrary to surmises assuming pupal histolysis to be attended by proteolysis, he failed to detect in the Hawk-moth an accumulation of free amino acids at the relevant stage.

## VI

The results of our investigations on the behaviour of nucleic acid in the course of development of the oak-feeding tussur moth are in agreement with those obtained by Levenbook [13] from *Calliphora erythrocephala*,



and by Niemierko et al. [16] from the mulberry-feeding silk moth (*Bombyx mori*). Similarly to the results obtained by these authors, we found a) the level of nucleic acids to be reduced during pupation, b) absence of major changes in the chrysalid instar, and c) a second fall in the level of nucleic acids during the development and ecdysis of the imago. It ought to be emphasized that reduction in the level of nucleic acids is not attended by a rise of pentoses in the acid-soluble fraction.

In the papers by Agrell [1], [2], and by Sysakian and Gumilevskaja [19] interconversion of ribonucleic and desoxyribonucleic acids is claimed to have been noted during different stages of metamorphosis. Leaving alone the fundamental reservation that quantitative determinations warrant conclusions relating merely to differences in contents but not to a possible interconversion, our results failed to indicate fluctuations noted by the authors referred to above.

Generally, ribonucleic acid is agreed in literature to predominate quantitatively over desoxyribonucleic acid. Only Agrell [1], [2] found the DNA content in *Calliphora erythrocephala* to be larger, which can be attributed to the method he used. In our experiments, RNA : DNA ratio calculated from the determinations of phosphorus corresponding to ribose and desoxyribose of the fraction of nucleic acids differed between the two sexes (Table 6). The RNA to DNA ratio is for the oak-feeding tussur moth high, but below the value established by Levenbook [13] for *Calliphora erythrocephala*, by Niemierko and Associated [16] for the mulberry-feeding silk moth, and by Patterson [18] for *Tenebrio molitor*.

#### STRESZCZENIE

W gąsiennicy, poczwarcie i motyłu jedwabnika dębowego oznaczano fosfor kwasorozpuszczalny, lipidowy, kwasów nukleinowych i białkowy. Fosfor całkowity spada nieznacznie przy zapoczwarczeniu, silnie zaś przy wylęgu motyla (wydalanie ortofosforanu z moczem). Fosfor kwasów nukleinowych spada przy zapoczwarczeniu w związku z inwolucją gruczołów przednich, zmniejsza się fosfor lipidowy i białkowy, rośnie fosfor kwasorozpuszczalny.

W okresie poczwarkowym rozmieszczenie fosforu między wymienione frakcje nie ulega większym zmianom.

Przy rozwoju motyla zmniejsza się fosfor rozpuszczalny i fosfor kwasów nukleinowych, silniej u samców niż u samic, których jaja są bogate w związki fosforowe.

Zmiany zawartości rybozy i dezoksyrybozy bieżą równolegle do zmian fosforu nukleinowego. Zmniejszeniu ilości pentoz we frakcji kwasów nukleinowych nie towarzyszy ich wzrost we frakcji rozpuszczalnej. Oznacza-

nie fosforu odszczepialnego metodą Kerra daje wyniki zgodne z wynikami dla pentoz. Wyniki, zarówno dla pentoz jak i dla fosforu wg Kerra, rozpatrywane wedle przyjmowanej na ogół interpretacji, zdawałyby się wskazywać na występowanie u form dojrziałych prawie wyłącznie nukleotydów purynowych.

Gruczoły przedne zawierają uderzająco dużo kwasów nukleinowych, co jest prawdopodobnie związane z syntezą białka jedwabiu. Jaja zawierają praktycznie same kwasy rybonukleinowe.

W żadnym okresie nie stwierdzono gromadzenia się produktów depolimeryzacji kwasów nukleinowych we frakcji rozpuszczalnej. Przebudowa nukleoproteidów w poczwarcie musi zatem zachodzić stopniowo.

#### REFERENCES

- [1] I. Agrell, *Nature* **170**, 543, 1952.
- [2] I. Agrell, *Acta Physiol. Scand.* **28**, 306, 1953.
- [3] H. Chantrene, *II Congrès Inter. de Biochimie. Symposium sur la Biogénèse des Proteines.* **85**, Paris 1952.
- [4] Z. Dische, *Mikrochemie* **8**, 4, 1930.
- [5] C. Fiske, Y. Subbarow, *J. Biol. Chem.* **81**, 629, 1929.
- [6] J. Heller, *C. R. Soc. Biol.* **92**, 1006, 1925.
- [7] J. Heller, *Biochem. Z.* **172**, 59, 1926.
- [8] J. Heller, W. Świechowska, S. Karpiak, *Acta Physiol. Pol.* **3**, 295, 1952.
- [9] S. Karpiak, *Prace Wrocławskiego Tow. Naukowego, seria B nr 83*, 1957.
- [10] S. E. Kerr, K. Seraidarian, M. Wargon, *J. Biol. Chem.* **181**, 761, 1949.
- [11] S. E. Kerr, *J. Biol. Chem.* **132**, 147, 1940.
- [12] S. E. Kerr, K. Seraidarian, *J. Biol. Chem.* **159**, 211, 1945.
- [13] L. Levenbook, *Feder. Proc.* **10**, 82, 1951.
- [14] W. Mejbaum, *Z. physiol. Chem.* **258**, 117, 1939.
- [15] W. Niemierko, *Postępy biochemii, PZWL* **1**, 34, 1953.
- [16] S. Niemierko, P. Włodawer, A. Wojtczak, *Acta Biologicae Exper.* **XVII nr 1**, 255, 1956.
- [17] M. Ogur, G. Rosen, *Arch. Biochem.* **25**, 264, 1950.
- [18] D. S. P. Patterson, *Biochem. J.* **65**, 729, 1957.
- [19] H. M. Sysakian, H. A. Gumilewska, *Biochimia* **21**, 810, 1956.

#### Summary

Acid-soluble-, lipid-, nucleic acid- and protein-phosphorus were determined in the larvae, chrysalides and imagines of the oak-feeding tussur moth. Total phosphorus diminishes insignificantly during pupation, and notably during eclosion of the imago (elimination of orthophosphate with urine). Phosphorus of nucleic acids diminishes during pupation in

connection with the involution of spinning glands; there is also a decrement of lipid and protein phosphorus, whereas the acid-soluble phosphorus increases.

During the chrysalid stage, the distribution of phosphorus in the particular fractions does not change substantially.

Development of the imago is attended by a decrease in acid-soluble and nucleic acid phosphorus, more so in males than in females, eggs being rich in phosphorus compounds.

Changes in the contents of ribose and desoxyribose run parallel with those of nucleic acid phosphorus. Reduction of the content of pentoses in the nucleic acid fraction is not attended by a rise of the former in the acid-soluble fraction. Determinations of the phosphorus hydrolyzable after Kerr are in agreement with results for pentoses. Considered in the light of rather generally accepted interpretations, the results for pentoses as well as those for phosphorus after Kerr appear to indicate that in imagines there are almost exclusively purine nucleotides.

Spinning glands contain a strikingly large amount of nucleic acids, which is probably related with the synthesis of silk protein. Eggs virtually contain only ribonucleic acids.

No accumulation in the acid-soluble fraction of products of nucleic acid depolymerization was established in 10 day old chrysalides. Consequently, transformation of nucleoproteids in the chrysalis must be assumed to proceed gradually.

Otrzymano 22.8.57 r.





R. KURNATOWSKI, A. SZYMKOWIAK, W. WIŚNIEWSKI i J. PAWEŁKIEWICZ

## PREKURSORY BIOSYNTETY NUKLEOTYDOCYJANOKOBALAMIN<sup>\*)</sup>

### 5. BIOSYNTETA WITAMINU B<sub>12</sub> III I INNYCH NUKLEOTYDOCYJANOKOBALAMIN

Z Katedry Chemii Ogólnej (kierownik: z-ca prof. T. Kosiński) i z Katedry Biochemii (kierownik: doc. dr J. Pawełekiewicz) Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu

Badania całego szeregu ośrodków badawczych zajmujących się budową chemiczną witaminu B<sub>12</sub> (grupa Folkersa w USA, zespoły Hodgkin, Todda, Smitha i Petrova w Anglii) ustaliły wzór strukturalny tego związku. Rozszerzenie tych badań na inne znalezione w przyrodzie kobalaminy wykazało, że podobnie jak w cząsteczce witaminu B<sub>12</sub> w większości zbadanych dotąd kobalamin znajdują się ugrupowania nukleotydowe. Poszczególne kobalaminy różnią się między sobą obecnością różnych zasad nukleotydowych. W witaminie B<sub>12</sub> zasadą nukleotydową jest 5,6-dwumetylobenzimidazol. W innych kobalaminach stwierdzono obecność szeregu pochodnych purynowych. Zasady te mogą być wbudowywane do cząsteczki kobalaminowej na drodze mikrobiologicznej biosyntezy.

Prace nad mikrobiologiczną biosyntezą różnych nukleotydocyjanokobalamin, zarówno spotykanych w przyrodzie jak i innych, zawierających niespotykane w przyrodzie zasady nukleotydowe datują się od roku 1954. Procesy biosyntezy przeprowadzono przy pomocy szeregu drobnoustrojów jak *Propionibacterium shermanii* [15], [17], *Escherichia coli* [10], [11], [12], [1], [3], *Streptomyces griseus* [5], [6], *Corynebacterium diphtheriae* [18]. Szersze omówienie problemu mikrobiologicznej biosyntezy podał w pracy referatowej Pawełekiewicz [16].

W naszym laboratorium do biosyntezy nukleotydocyjanokobalamin używano bardzo wydajnego szczepu bakterii kwasu propionowego: *Propionibacterium shermanii*.

Celem niniejszej pracy było otrzymanie przy użyciu tego drobnoustroju trzech pochodnych zawierających jako zasady nukleotydowe 5-hy-

<sup>\*)</sup> Część IV: [18]

droksybenzimidazol, 5,6-dwuchlorobenzimidazol, oraz 2,3-naftimidazol i porównanie własności tych pochodnych z opisanymi już w literaturze.

5-Hydroksybenzimidazolocyjanokobalaminę izolowali po raz pierwszy w 1953 roku Friedrich i Bernhauer [13] z przefermentowanych ścieków miejskich. Autorzy ci nazwali ten związek witaminem B<sub>12III</sub>. Poza witaminem B<sub>12</sub> jest to jedyna naturalna kobalamina czynna klinicznie i (słabo) biologicznie. Związek ten otrzymali biosyntetycznie Robinson i współpr. [20] przy pomocy *E. coli* 113-3, oraz Fantes i O'Callaghan [7] przy pomocy *Streptomyces griseus*.

Tworzenie się „sztucznej” kobalaminy pochodnej 5,6-dwuchlorobenzimidazolu przy użyciu *E. coli* opisali Dellweg i współpr. [3] i Ford i współpr. [11], [12], oraz przy użyciu *Streptomyces griseus* Fantes i O'Callaghan [7]. Biosyntezę drugiej „sztucznej” pochodnej 2,3-naftimidazolowej dokonali wspomniani wyżej Dellweg i współpr. [3] (*E. coli*), oraz Fantes i O'Callaghan [7] (*Str. griseus*).

#### CZĘŚĆ DOSWIADCZALNA

##### *Związki użyte do doświadczeń*

2,3-Naftimidazol otrzymano z 2,3-naftalenodwuaminy metodą Philippsa [19]. 1,5 g 2,3-naftalenodwuaminy rozpuszczono w 15 ml 15% kwasu solnego, dodano 5 ml 25% kwasu mrówkowego i gotowano godzinę pod chłodnicą zwrotną. Po ostudzeniu i zobojętnieniu amoniakiem wytrącony osad odsączono i przekryształizowano z wodnego alkoholu po uprzednim odbarwieniu węglem aktywnym. Temperatura topnienia czystego związku 218°.

5-Hydroksybenzimidazol otrzymano z 5-etoksybenzimidazolu syntetyzowanego metodą Pawełkiewicza i Nowakowskiej [17]. 2 g 5-etoksybenzimidazolu zadano 25 ml 40% kwasu bromowodorowego i ogrzewano 1 godzinę na wrzącej łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Po ostudzeniu roztwór zobojętniono amoniakiem, a wytrącony osad rozpuszczono w wodnym alkoholu i odbarwiono węglem aktywnym. Kryształizowano z wodnego alkoholu. Temperatura topnienia otrzymanego związku 218°. Związek dawał reakcję charakterystyczną dla grupy fenolowej z odczynnikiem Millona (czerwony osad) [8].

5,6-Dwuchlorobenzimidazol o temperaturze topnienia 206° otrzymano od prof. dr K. Bernhauera.

##### *Hodowla szczepu*

Do badań nad wytworzeniem witaminów grupy B<sub>12</sub> użyto pożywki zawierającej kwasowy hydrolizat kazeiny, trypsynowy hydrolizat kazei-

ny i roztwory fosforanów, chlorku magnezu, siarczanu kobaltowego, siarczanu żelazawego, pantotenianu wapnia, biotyny, glikozy. Hodowlę *Propionibacterium shermanii* przeprowadzono według metody podanej przez Zodrowa i Pawełkiewicza [21].

Po dziesięciu dniach hodowli dodawano prekursorów w ilości 20 mg na litr hodowli. Kobalaminy izolowano z komórek bakterii propionowych po dalszych 6 dniach hodowli.

### *Izolacja witaminów z bakterii kwasu propionowego*

Zawiesinę bakterii z 3 litrowej hodowli wirowano na wirówce przy 2000 obr./min.; osad komórek bakteryjnych zawieszano w wodzie w ilości 200 ml na litr hodowli, dodawano 0,2 g cyjanku sodu, zakwaszono zawiesinę 0,5 N kwasem siarkowym do  $pH$  3 i przez 10 minut ogrzewano w temperaturze  $60^{\circ}$ . Następnie doprowadzano  $pH$  do wartości 6 roztworem wodorotlenku sodowego 15% i komórki bakteryjne wirowano. Płyn z nad osadu zawierający witaminy ekstrahowano 33% roztworem fenolu w chloroformie (v/v) i po zadaniu roztworu fenolowego równą objętością chloroformu i 1/2 objętości alkoholu butylowego witaminy reekstrahowano małymi porcjami wody. Wodny roztwór kobalamin przemywano chloroformem celem usunięcia śladów fenolu i pod zmniejszonym ciśnieniem odparowywano do sucha. W celu rozdzielania różnych kobalamin powstałych w syntezie, suchą pozostałość rozpuszczano w małej ilości wody, gęsty koncentrat nanoszono na paski bibuły chromatograficznej Whatman nr 3, po czym rozdzielano witaminy elektroforetycznie według metody Holdswortha [14], stosując jako elektrolit 2N kwas octowy zawierający 0,01% cyjanku sodu. Po rozdziale paski bibuły suszono, a główną frakcję kobalamin barwy fioletowo-czerwonej, typowej dla nukleotydocyjano-kobalamin, przesuniętą o około 3 cm od miejsca startu, ekstrahowano wodą i odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha. Suchą pozostałość rozpuszczano w małej ilości (ok. 2 ml) alkoholu metylowego i przepuszczano przez kolumnę z tlenkiem glinu. Tlenek glinu przygotowywano w następujący sposób: 100 g tlenku glinu do chromatografii zalewano 3 litrami wody destylowanej i zawiesinę zakwaszono kwasem octowym do  $pH$  6. Po 12 godzinach tlenek odsączano, kilkakrotnie przemywano wodą destylowaną i suszono na powietrzu. Nukleotydocyjano-kobalaminy wypłukiwano z kolumny alkoholem metylowym, roztwór odparowywano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem i krystalizowało dwukrotnie z wodnego acetonu. Krystaliczny witamin przemywano jeszcze acetonem i suszono na powietrzu.

### Badanie własności otrzymanych nukleotydocyjanokobalaminy

Otrzymane w stanie krystalicznym nukleotydocyjanokobalaminy (NCK) badano metodami fizyko-chemicznymi i mikrobiologicznymi.

Widma absorpcyjne wodnych roztworów otrzymanych NCK były identyczne z widmami podanymi przez innych autorów: dla 5-hydroksybenzimidazocyjanokobalaminy (5-hydroksy-BIA-CK) [13], 5,6-dwuchlorobenzimidazocyjanokobalaminy (5,6-dwuchloro-BIA-CK) [3] i 2,3-naftimidazocyjanokobalaminy (2,3-naftimidazolo-CK) [4].

Oznaczono również metodą chromatografii bibułowej wartości  $R_f$  otrzymanych związków dla dwóch układów rozpuszczalnika. Jako standardów używano wit. B<sub>12</sub> oraz wit. B<sub>12III</sub>. W tym celu wodne koncentraty NCK nanoszono obok siebie na pasek bibuły Schleicher-Schüll nr 2315. Chromatografowano w kierunku zgodnym z oznaczeniem dla tego gatunku bibuły, stosując raz rozpuszczalnik kwaśny, drugi raz rozpuszczalnik zasadowy. Skład rozpuszczalnika kwaśnego był następujący: n-butanol 10 cz., propanol-2 6,5 cz., woda 10 cz., kwas octowy 0,1 cz. (v/v), ślady NaCN

Tablica 1

Wartości  $R_f$  dla rozpuszczalników: kwaśnego i zasadowego — metoda splotowa

nukleotydocyjanokobalaminy	$R_f$	
	rozp. kwaśny	rozp. zasadowy
5,6-dwuchloro-BIA-CK	0,52	0,62
2,3-naftimidazolo-CK	0,45	0,55
5-hydroksy-BIA-CK	0,37	0,36
witamin B <sub>12III</sub>	0,38	0,36
witamin B <sub>12</sub>	0,48	0,56

i KClO<sub>4</sub> w ilości potrzebnej do nasycenia. Rozpuszczalnik zasadowy w miejsce kwasu octowego zawierał 0,25 cz. (v/v) 25% NH<sub>4</sub>OH. Wartości  $R_f$  podano w tablicy 1.

Jak wynika z tablicy, wartości  $R_f$  dla otrzymanej 5-hydroksynukleotydocyjanokobalaminy i B<sub>12III</sub> są zgodne.

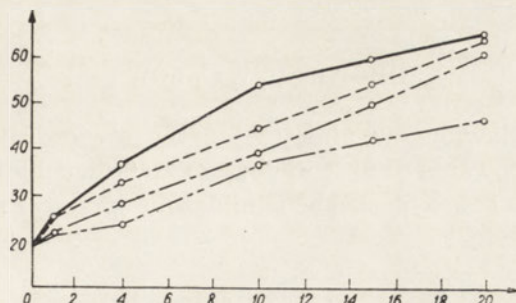
Elektroforeza przeprowadzona przy izolowaniu witaminów potwierdziła obojętny charakter nukleotydocyjanokobalaminy, a niewielkie przesunięcie w kierunku katody tłumaczy się zjawiskiem elektroosmozy.

Pomiar aktywności mikrobiologicznej otrzymanych witaminów przeprowadzono przy użyciu *Ochromonas malhamensis* według metody Forda

<sup>1</sup> Krystaliczny B<sub>12III</sub> otrzymano od prof. dr K. Bernhauera.



[9]. Wzrost drobnoustroju mierzono nefelometrycznie na nefelometrze Pulfricha (nastawienie przysłon E, 4, filtr L2). Wyniki tych pomiarów ilustruje wykres (Rys. 1).



Rys. 1. Aktywność nukleotydocyjanokobalamina (NCK) dla *Ochromonas malhamensis*. Na osi rzędnych podano odczyt na bębnie nefelometru Pulfricha. Na osi odciętych stężenie NCK w  $\mu\text{g/ml}$

- wit. B<sub>12</sub>
- - -○ 5,6-dwuchloro-BIA-CK
- · - ·○ 2,3-naftimidazolo-CK
- · - ·○ 5-hydroksy-BIA-CK

Jak wynika z wykresu, wzrost aktywności mikrobiologicznej 5,6-dwuchloro-BIA-CK i 2,3-naftimidazolo-CK jest prawie proporcjonalny do stężenia witaminu, natomiast aktywność witaminu B<sub>12</sub> i 5-hydroksy-BIA-CK wzrasta silniej w niższych stężeniach niż w wyższych. Przyjmując aktywność wit. B<sub>12</sub> za 100% otrzymano wartości wahające się w zależności od stężenia: dla 5,6-dwuchloro-BIA-CK 83-98%; dla 2,3-naftimidazolo-CK 74-93%; najmniejsze odchylenie — 67-71% dla 5-hydroksy-BIA-CK.

Wyniki poszczególnych serii pomiarów mikrobiologicznych na ogół pokrywają się z wyjątkiem jednego wypadku, gdy 5,6-dwuchloro-BIA-CK wykazywała nieco większą aktywność od witaminu B<sub>12</sub> w najwyższym stężeniu. Wyniki te różnią się nieco od danych Coates i Kona [2], którzy podają względną aktywność otrzymanych przez nas związków w porównaniu do aktywności wit. B<sub>12</sub> = 100%, dla wit. B<sub>12III</sub> 50%, dla pochodnej 5,6-dwuchlorobenzimidazolowej powyżej 100% i dla związku 2,3-naftimidazolowego 60%.

Oznaczenia mikrobiologiczne przeprowadziły mgr M. Malińska i mgr Z. Pędziwilk w Katedrze Mikrobiologii Rolnej WSR, za co w tym miejscu składamy Im serdeczne podziękowanie.

Dziękujemy również serdecznie prof. dr K. Bernhauerowi za udzielenie nam preparatów: 5,6-dwuchlorobenzimidazolu, 2,3-naftalenodwuaminy i krystalicznego witaminu B<sub>12III</sub> oraz doc. dr K. Zdrowowi za pomoc przy pracach mikrobiologicznych

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy stwierdzają zdolność włączania do ugrupowania nukleotydogo 5,6-dwuchlorobenzimidazolu, 2,3-naftimidazolu i 5-hydroksybenzimidazolu przez *Propionibacterium shermanii*.

#### STRESZCZENIE

1. Kontynuując badania nad biosyntezą pochodnych witaminu B<sub>12</sub> (nukleotydocyjanokobalamin) przy użyciu *Propionibacterium shermanii* otrzymano trzy związki nukleotydocyjanokobalaminowe zawierające jako zasadę nukleotydogą 5,6-dwuchlorobenzimidazol, 2,3-naftimidazol oraz 5-hydroksybenzimidazol. Wszystkie te pochodne otrzymano w stanie krystalicznym.

2. Otrzymane krystaliczne nukleotydocyjanokobalaminy przebadano metodami fizyko-chemicznymi oraz mikrobiologicznymi, określając ich aktywność mikrobiologiczną wobec *Ochromonas malhamensis* w porównaniu z witaminem B<sub>12</sub>.

3. Ustalono identyczność otrzymanych nukleotydocyjanokobalamin z analogicznymi pochodnymi witaminu B<sub>12</sub> syntetyzowanymi przez inne drobnoustroje. 5-Hydroksybenzimidazolocyjanokobalamina okazała się identyczna z witaminem B<sub>12III</sub> Bernhauera i Friedricha.

#### LITERATURA

- [1] Bernhauer K., Frierich W., *Angew. Chem.* 66, 776, 1954.
- [2] Coates M. E., Kon S. K., "Vitamin B<sub>12</sub> und Intrinsic Factor I Europäisches Symposion", Hamburg 1956, wyd. H. C. Heinrich, Enke Stuttgart 1957, str. 72.
- [3] Dellweg H., Becher E., Bernhauer K., *Biochem. Z.* 327, 422, 1956.
- [4] Dellweg H., Becher E., Bernhauer K., *Biochem. Z.* 328, 96, 1956.
- [5] Fantès K. H., O'Callaghan C. H., *Biochem. J.* 56, XXI, 1954.
- [6] Fantès K. H., O'Callaghan C. H., *Biochem. J.* 59, 79, 1955.
- [7] Fantès K. H., O'Callaghan C. H., *Biochem. J.* 63, 10 P, 1956.
- [8] Feigl F., "Spot Tests", Elsevier Publ. Co., New York 1954, Vol. II. str. 134.
- [9] Ford J. E., Brit J., *Nutrition* 7, 299, 1953.
- [10] Ford J. E., Holdsworth E. E., *Biochem. J.* 56, XXXV, 1954.

- [11] Ford J. E., Holdsworth E. S., Kon S. K., *Biochem. J.* **58**, XXIV, 1954.
- [12] Ford J. E., Holdsworth E. S., Kon S. K., *Biochem. J.* **59**, 86, 1955.
- [13] Friedrich W., Bernhauer K., *Angew. Chem.* **65**, 627, 1953.
- [14] Holdsworth E. S., *Nature* **171**, 148, 1953.
- [15] Pawełkiewicz J., *Acta Biochim. Polon.*, **1**, 313, 1954; *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II*, **3**, 3, 1955.
- [16] Pawełkiewicz J., *Postępy Biochemii* **3**, 3, 1957.
- [17] Pawełkiewicz J., Nowakowska K., *Acta Biochim. Polon.* **2**, 259, 1955.
- [18] Pawełkiewicz J., Zodrow K., *Acta Microbiol. Polon.* **6**, 9, 1957.
- [19] Philips J., *J. Chem. Soc.*, 2393, 1928.
- [20] Robinson F. M., Miller M. I., McPherson J. F., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 5192, 1955.
- [21] Zodrow K., Pawełkiewicz J., *Pat. Pol.*, 84431.

## PRECURSORS IN THE BIOSYNTHESIS OF NUCLEOTIDECYANOCOBALAMINS

### V. THE SYNTHESIS OF THE VITAMIN B<sub>12 III</sub> AND OTHER NUCLEOTIDE CYANOCOBALAMINS

#### Summary

1. In continued experiments on the biosynthesis of nucleotidicyanocobalamins by use *Priopionibacterium shermanii* three compounds have been obtained in crystalline form. They have contained as nucleotide bases: 5-hydroxybenzimidazole, 5,6-dichlorbenzimidazole and 2,3-naphthimidazole.

2. The nucleotidicyanocobalamins have been examined by means of physico-chemical and microbiological methods. The compounds are biologically active for *Ochromonas malhamensis*.

3. The obtained data indicate that the cobalamins are identical with those which already have been prepared biosynthetically by use of other micro-organisms. 5-Hydroxybenzimidazolecyanocobalamin is identical with the vitamin B<sub>12 III</sub> of Bernhauer and Friedrich.

Otrzymano 17.10.57 r.



D. SHUGAR, H. SIERAKOWSKA, A. SZENBERG

## QUANTITATIVE STAINING WITH RADIOACTIVE INDICATORS: — ALKALINE PHOSPHATASE

*Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warsaw*

Despite the extensive development of histochemical procedures for enzymes, progress in this field is hampered by the lack of suitable quantitative techniques which are necessary, not only for the comparison of the activity of different regions of a single tissue section as well as the activity of sections of different tissues, but also for critical studies on the validity of the various techniques employed. Simple quantitative procedures are also desirable in order to compare the behaviour of enzymes in tissue sections with that of the corresponding purified enzyme, for examining the effect of different methods of fixation, and so on.

Considerable efforts have consequently been devoted to the development of quantitative histochemical techniques: [10, 14, 21]. In the Gomori-Takamatsu [16, 35] procedure for phosphatases these include examination of the precipitate deposited in the incubated section not only by ordinary microspectrophotometry, but also by polarization microscopy [3], electron microscopy [31], phase-contrast microscopy [17]; also chemical estimation of the amount of substrate removed from the incubation medium as a result of enzymatic action [25]. A rather elegant, and fairly successful, method from the point of view of accuracy is that of Doyle [8] and Doyle, Omoto and Doyle [9] for alkaline phosphatase according to the Gomori-Takamatsu procedure with the substitution of lead for cobalt and chemical estimation of the sulfide deposited in the final lead sulfide precipitate. As pointed out by the authors this should be applicable to a number of enzymes for which the final step involves formation of a sulfide precipitate. But it apparently has not gained wide favour, presumably because of the fact that it is rather cumbersome and tedious for routine use on the large numbers of samples normally handled in histochemical investigations.

Our interest in this problem arose out of some studies on the development of quantitative procedures for Gram staining which were resolved by the use of  $^{131}\text{I}$ -labelled Lugol and  $^{14}\text{C}$ -labelled crystal violet [32, 33], the final quantitative results being obtained by simple end-window counting of the stained bacterial smears. It became clear to us that such a technique should be applicable to a wide variety of staining reactions, using appropriately labelled substances, and further work has confirmed this.

It appeared to us somewhat surprising that radioactive indicators had apparently not previously been used for this purpose in histochemical techniques, not only for enzymes but also for the quantitative estimation of various tissue components *in situ*, e. g. the silver technique for glycogen and ascorbic acid [26], both of which should be susceptible of quantitative estimation by the use of  $^{110}\text{Ag}$ . A careful survey of the literature disclosed the fact that Dalgaard [7] in 1948 suggested the use of  $^{32}\text{P}$ -labelled glycerophosphate for the quantitative histochemistry of alkaline phosphatase, but presented no experimental results and apparently did not pursue the matter further. Three years later Aros, Barka, Posalsky and Gerecze [1] and Barka, Szalay, Posalsky and Kertesz [2] used ThB, a natural isotope of lead, for the determination of alkaline phosphatase by substituting lead for cobalt in the Gomori-Takamatsu procedure. It is somewhat unusual that the literature is devoid of references to either of these publications.

#### BASIS OF PROCEDURE

In the present paper we shall outline the various procedures which we have applied to the quantitative determination of alkaline phosphatase by means of radioactive indicators. Applications to other enzymes will be dealt with elsewhere.

In the normal Gomori-Takamatsu procedure the sections are incubated in a medium containing sodium glycerophosphate and a calcium salt, resulting in the formation of a precipitate of calcium phosphate<sup>1</sup> at the sites of enzymatic activity. The section is then rinsed and flooded with a solution of some cobalt salt, as a result of which the precipitate is transformed to cobalt phosphate by exchange. Finally it is immersed in ammonium sulfide solution, leading to the formation

<sup>1</sup> Whether this precipitate is hydroxyapatite or some other form of calcium phosphate, or a mixture of several calcium phosphates, is still unsettled, but is of no relevance at this point. We hope to deal with this question elsewhere.

of a visible black or brown-black precipitate of cobalt sulfide<sup>2</sup>, delineating the sites of enzyme activity.

It follows from the above that the amount of enzymatically hydrolyzed substrate may be quantitatively estimated by incubation in a medium containing either <sup>32</sup>P-labelled glycerophosphate (or other substrate) or some salt of <sup>45</sup>Ca, followed by end-window counting of the section. A variety of other procedures may also be used, all of them based on incubation in a non-labelled medium followed by exchange of one of the components of the calcium phosphate precipitate with one which is labelled, such as the following: (a) exchange with <sup>45</sup>Ca or <sup>32</sup>PO<sub>4</sub>; (b) the use of <sup>60</sup>Co in the exchange step; (c) the use of <sup>35</sup>S in the final exchange step, a procedure which we have not used because of hazards involved; (d) the use of <sup>110</sup>Ag in the exchange step in place of cobalt, as originally suggested by Gomori [16] and extensively applied by Feigin and Wolf [11, 12].

Obviously the most convenient procedure should be that involving incubation in a medium labelled either with <sup>45</sup>Ca or <sup>32</sup>P-glycerophosphate. The principal reason for this is that the course of the reaction may then be followed continuously on a *single* section for any desired period of time by merely interrupting the incubation at suitable intervals, washing and counting, and then continuing the incubation. Finally the preparation may be used either for staining or autoradiography. The use of <sup>45</sup>Ca is the more convenient since labelled glycerophosphate must be prepared afresh regularly as a result of phosphorus decay. For either of these, however, the quantitative results for enzymatic activity are not subject to the possible artifacts resulting from the staining procedure used after incubation. While the other techniques outlined above may also be used to follow the course of the reaction, it will be shown below that they are less quantitative because of incomplete exchange, except in the case of silver; we have found them to be much more useful for studying the validity of the various steps in the Gomori procedure. On the other hand <sup>32</sup>PO<sub>4</sub> exchange has thus far proved to be the most suitable procedure for acid phosphatases, although (until we have obtained a <sup>32</sup>PO<sub>4</sub>-labelled preparation of glycerophosphate with sufficiently high specific activity) we have also been using ThB for this purpose since continuous incubation on single sections is possible as in the case of alkaline phosphatase.

#### MATERIALS

The material used in these experiments was pork kidney cortex, removed from the animal immediately after slaughter, fixed in chilled

<sup>2</sup> The exact composition of this precipitate has also been placed in doubt [20].

acetone and paraffin-embedded according to the procedure outlined by Glick [15]. In order to obtain comparative quantitative results in each experiment, a cylinder of material parallel to the surface of the kidney was removed by means of a sharp corkborer about 4 mm. in diameter, thus providing sections uniform both as regards surface area and histological structure. For any single experiment sections were cut serially, after elimination of the first few, at thicknesses of 6 or 8  $\mu$ .

Substrates were all commercial preparations of Na- $\alpha$ , $\beta$ - and Na- $\beta$ -glycerophosphates, Na-phenylphosphate and adenylic acid (3'-phosphate). Phosphate-labelled glycerophosphate was prepared according to the procedure of Reid and Copenham [27]; the product we obtained in this way had a rather low specific activity and was used only in one series of experiments. Attempts are being made to obtain a preparation with higher specific activity.

Incubation media were prepared according to Pearse [26] except that, instead of sodium diethyl barbiturate, 0.028M veronal-acetate buffer<sup>3</sup> [23] was used, at a *pH* of 9.5; *pH* control was by means of the glass electrode, using a Radiometer *pH* meter.

#### METHODS OF INCUBATION

From the very beginning it was decided that incubation in Coplin jars would be undesirable because of the larger quantities of isotopes required, with attendant increased expense and hazards; and also because of the high counts of control sections incubated without substrate and resulting from the exposure of the entire surface of the slide to the labelled medium. Subsequently several trials were made in which the slides, cut to a size only slightly larger than the sections, were incubated in thin, shallow containers requiring only 0.2—0.5 ml. incubation medium. While the results obtained were in agreement with those of the other procedures used, the controls still gave higher counts and eventually this method was abandoned, since it is less convenient as well.

The technique we found most suitable for incubation is based on the procedure used for Gram staining [32, 33] and involves covering of the section with 10—20  $\mu$ l of substrate solution, delivered by means of constriction micropipettes ("drop" method). The slides are contained in covered Petri dishes kept saturated with water vapour by means of wet

---

<sup>3</sup> Enzyme activities were about 10–15% higher in veronal-acetate than in veronal at the same *pH*. This could, of course, be due to a variation in the solubility product of calcium phosphate with the buffer system used. In a separate study we are investigating the effect of different buffers on enzyme activity.



filter paper. The cover on the Petri dish should be slightly tilted so that no condensed drops of water fall on the slide during the incubation period. After incubating for a desired interval the slides are suitably rinsed (see below), dried briefly under a current of air, counted and a fresh drop of substrate solution applied. The quantities of isotope used in this way are minimal, e. g. with  $^{45}\text{Ca}$  in the substrate medium at a level of  $2 \mu\text{C}/\text{ml.}$ , the amount of calcium pipetted onto a single section is of the order of  $0.02\text{--}0.05 \mu\text{C}$ , so that pipetting may be done quite safely by means of a 50 cm. length of rubber tubing attached to the micro-pipette. One possible disadvantage to this procedure is that long incubation periods (e.g. overnight) without change of substrate solution are not practical since the  $\text{pH}$  changes as substrate is used up. For incubation periods of several hours, with hourly or more frequent changes of substrate (which are in any event necessary if we wish to follow the course of the reaction), this procedure is quite satisfactory.

For purposes of simplification further details are included below under *Results and Discussion*. It should be emphasized that all results included here represent the means of several experiments conducted simultaneously. Except where otherwise indicated, incubation temperatures were at  $37^\circ\text{C}$ . The results of different experiments are not strictly comparable since variations in surface area of the sections were not always taken into account; furthermore variations in thickness of the sections which, according to Doyle [10], may be as high as 20% during a single cutting operations, could possibly be even greater between series of sections prepared at different times.

## RESULTS AND DISCUSSION

*Incubation by application of "drop" of substrate solution.* Table 1 illustrates the results of a typical experiment conducted in this way using 2 controls (incubated without glycerophosphate) and 4 sections incubated with substrate. The average of these results is exhibited graphically in Fig. 1. From the specific activity of the  $^{45}\text{Ca}$  in the incubation medium one may calculate the amount of calcium deposited as a result of enzyme action and hence also the number of substrate molecules hydrolyzed, if the composition of the calcium phosphate precipitate is known. In what follows 2,500 c.p.m. corresponds to about  $1 \mu\text{g Ca}$ ; self-absorption corrections are, of course, unnecessary because of the low masses of the sections as well as deposited precipitates.

It will be observed that one of the sections incubated with substrate exhibits, on the average, 15-20% lower activity than the other three, attributable perhaps to variation in thickness [10]. It should be noted too

that the controls, representing calcium bound by some components of the tissue section, as well as by the surface of the albuminized slides, remain reasonably constant and relatively low by comparison with that deposited as a result of enzymatic activity. This is a factor of considerable importance if the section is to be used subsequently for localization of sites of enzymatic activity by autoradiography<sup>4</sup>.

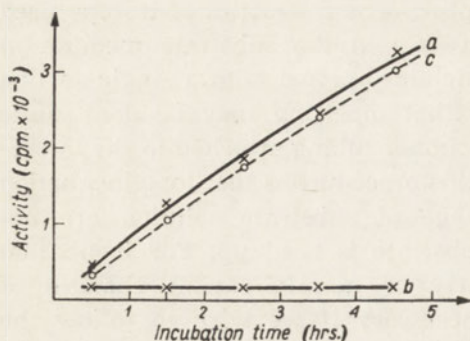


Fig. 1. Course of hydrolysis of  $\beta$ -glycerophosphate by pork kidney cortex section in  $^{45}\text{Ca}$ -medium, by "drop" method. Ordinates indicate amount of calcium deposited in section in counts/min. Curve a, with substrate; curve b, without substrate; curve c, difference between a and b. For further details see text and Table 1

control counts. Fig. 2 demonstrates the course of the reaction followed in this way. Although the results are similar to those obtained by means of

As mentioned above the counts of control sections are higher if the entire slide is incubated in a Coplin jar. A further disadvantage is that the under surface of the slide also adsorbs  $^{45}\text{Ca}$ , so that its subsequent handling becomes inconvenient. However one may incubate very small slides in tiny containers (flattened test-tubes, spectrophotometer micro-cuvettes) in order to reduce the slide surface exposed to labelled medium and thus reduce the

Table 1

Course of hydrolysis of  $\beta$ -glycerophosphate by  $6\mu$  sections,  $14\text{ mm.}^2$  area (substrate and control solutions contain  $2\ \mu\text{C}^{45}\text{Ca}$  and  $1\text{ mg. CaCl}_2$  per ml; sections counted under a  $4\text{ mg./cm.}^2$  mica window counter)

Incubation time (hours)	Control sections		Sections incubated with substrate			
	(counts/minute)					
0.5	186	214	550	412	500	395
1.5	140	174	1300	1250	1280	940
2.5	176	180	2040	1824	1900	1500
3.5	174	200	2620	2640	2670	1900
4.5	164	192	3500	3500	3300	2800

<sup>4</sup> In view of the fact that nuclear staining is frequently observed with the cobalt, but not the silver, technique [11, 12], it is of importance to know whether calcium is bound specifically by nuclei. This we are now investigating by means of autoradiography; preliminary observations indicate that such is not the case, at least under our experimental conditions.

the "drop" method, the method is nowhere near as simple technically; note in particular that the control counts are 2 to 3 times as high as in the "drop" method.

Fig. 3 demonstrates the course of hydrolysis of  $\beta$ -glycerophosphate, using phosphorus-labelled substrate, by means of the "drop" method. Curve b in this figure represents a section inactivated by ultraviolet

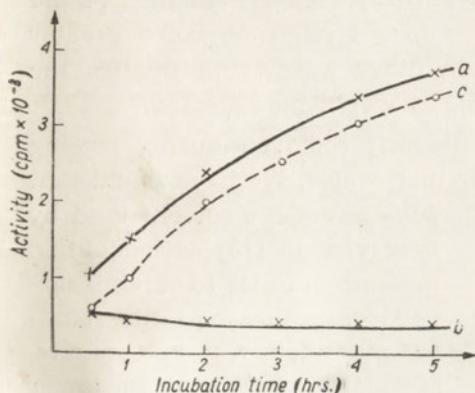


Fig. 2. Course of hydrolysis of  $\beta$ -glycerophosphate by pork kidney cortex section in  $^{45}\text{Ca}$ -medium, by incubation of sections on small slides immersed in incubation medium. Conditions otherwise same as for Fig. 1. Curve a, with substrate; curve b, without substrate; curve c, difference between a and b

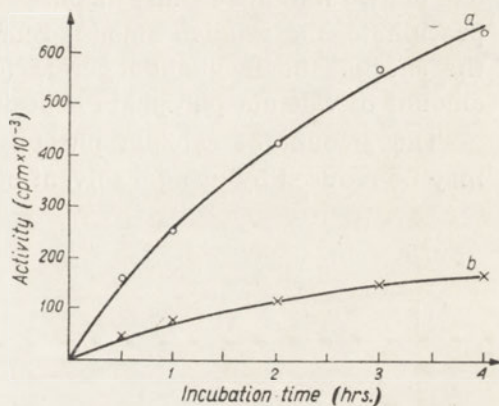


Fig. 3. Course of hydrolysis of  $^{32}\text{PO}_4$ -labelled glycerophosphate by pork kidney cortex section, by "drop" method. Ordinates indicate amount of  $^{32}\text{PO}_4$  deposited in section in counts/min. Curve a, normal section; curve b, section exposed for 10 minutes to radiation from mercury resonance lamp (2537 Å)

light and used as control; the shape of the curve shows that inactivation was not complete, a fact which was verified by staining according to the Gomori procedure after incubation. In view of the low specific activity of the glycerophosphate, further experiments in this direction were suspended pending the preparation of a product with higher specific activity<sup>5</sup>. It is, however, worth noting that the use of labelled substrate makes possible estimation of amount of substrate hydrolyzed without precise information as to the composition of the calcium phosphate precipitate (see above).

**Rinsing procedure.** Following incubation, according to the normal Gomori-Takamatsu procedure, the slide is rinsed, usually in water, prior

<sup>5</sup> Since completion of this text we have prepared labelled glycerophosphate with considerably higher activity, and are now extending our studies with this substrate. Using sections totally inactivated by heat as controls, these exhibit negligible counts after incubation with full substrate medium.

to application of the cobalt solution. While several authors advise caution during this step, more usually it is merely suggested that the preparation should be rinsed, presumably on the assumption that the solubility product of the calcium phosphate precipitate is sufficiently low so that the precipitate will be unaffected during this step. We have noted that rinsing in distilled water even for short intervals of a few seconds to one or two minutes results in the removal of appreciable amounts of the precipitate, the relative amount removed in a given time being greater the shorter the incubation period (or in other words, the smaller the amount of calcium phosphate deposited), as would be expected.

The amount of calcium phosphate deposit removed during rinsing may be reduced by using a solvent other than water. We have found that

40% acetone, a solvent used by Fredericsson [13] as incubation medium in order to obtain sharper localization, patterns, removes much less of the precipitate, presumably because of the lower solubility product of calcium phosphate in this medium. Fig. 4 exhibits the rate of removal of labelled calcium from preparations incubated for different periods of time. It will be seen that the higher the initial activity of the section in counts/min. (i. e., the longer it has been incubated) the less the percentage removal of deposited calcium.

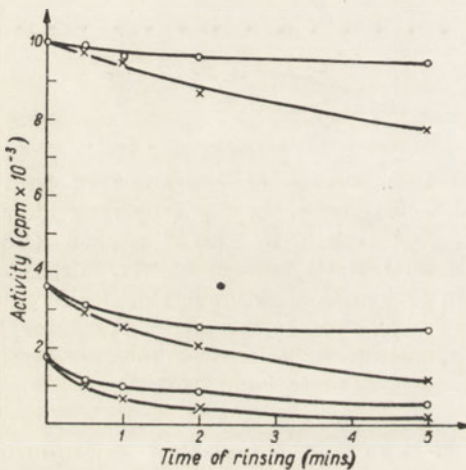


Fig. 4. Removal of calcium by rinsing in distilled water (x x x x x) or in 40% acetone (o o o o o) of pork kidney cortex sections previously incubated in labelled calcium medium

continuous swirling of the container. It is clear from the figure that 40% acetone is much more suitable for this purpose than water.

We have found it more suitable to replace the rinsing step by one in which the slide is merely dipped successively in two containers of 40% acetone so that considerably less of the calcium phosphate deposit is removed and this is the procedure we have followed throughout this work. It is our opinion, however, that this step requires further investigation since not only are quantitative results dependant on it, but so

also are the localization patterns of enzymatic activity since it follows from the above that diffusion of the precipitate takes place during rinsing.

The rinsing step is also of some importance after the transformation of the calcium phosphate precipitate to cobalt phosphate and again after exchange of the latter to cobalt sulfide. Fig. 5 demonstrates the effect of gentle rinsing on the cobalt phosphate precipitate, using water or 40% acetone, the sections having been previously incubated in a non-labelled medium and the calcium exchanged for  $^{60}\text{Co}$ . For the final cobalt sulfide precipitate the rinsing step is of somewhat lesser importance if it does not exceed one or two minutes.

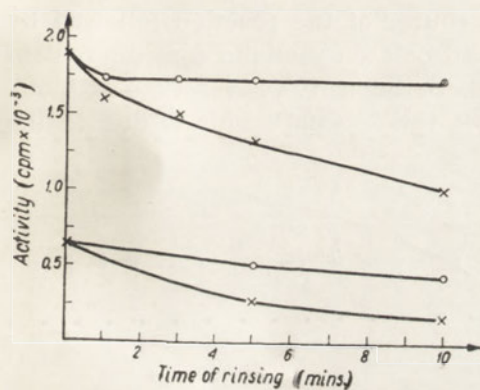


Fig. 5. Removal of cobalt by rinsing in distilled water (x x x x x) or in 40% acetone (o o o o) of sections previously incubated in non-labelled medium and then immersed in 1%  $^{60}\text{CoCl}_2$  for 5 minutes

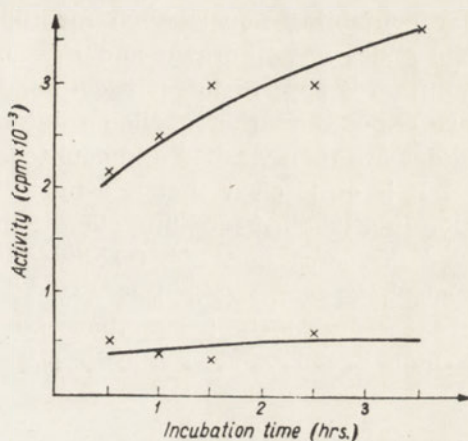


Fig. 6. Course of hydrolysis of  $\beta$ -glycero-phosphate by pork kidney cortex section, followed by phosphate exchange with  $^{32}\text{PO}_4$ . Series of sections incubated, each for definite time interval (abscissae); 15  $\mu\text{l}$  drop of 1%  $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$  (3  $\mu\text{C}/\text{ml}$ .) then applied to each section for 5 mins. Ordinates indicate amount of  $^{32}\text{PO}_4$  taken up by each section, in counts/min. Upper curve, sections incubated with substrate; lower curve, without substrate

If calcium is, however, exchanged for silver instead of cobalt the situation is entirely different. In this case the amount of silver removed even after 10 minutes approximates to only several per cent, in water.

*Methods depending on exchange of components of precipitate:* These include procedures (a), (b) and (d) referred to above, assuming that the various steps in the Gomori-Takamatsu technique are valid, i. e. that the replacement of calcium by cobalt, or calcium by silver, is quantitative. As will be shown below this is not always so. Nonetheless these procedures may be used for following the course of the reaction if only relative measurements are desired; in most instances this is all that is really necessary, since what we want to do is compare activities. The principal disadvantage is that continuous incubation is not possible

since once the exchange step has been executed, further incubation is out of the question. Of greater interest is the value of these procedures in studying the validity of the various steps in the Gomori-Takamatsu technique and, by analogy, the validity of other histochemical techniques, by means of labelled substances.

The technique involves incubation of a series of sections in a Coplin jar containing non-labelled medium. At definite time intervals one of the slides is withdrawn and rinsed. Finally, a drop of the labelled salt solution is applied to each section, care being taken that all preparations are exposed to the labelled solution for the same length of time. The slides are then washed and counted.

It is quite clear that is a much more tedious technique than incubation in a labelled medium, even if the accuracy attainable were the same.

$^{32}\text{PO}_4$  exchange. Fig. 6 shows the course of the reaction followed by phosphate exchange in this way. It will be seen that the controls remain reasonably constant but that the curve of activity vs. time exhibits a high initial value, while its slope is rather small. This is due to the

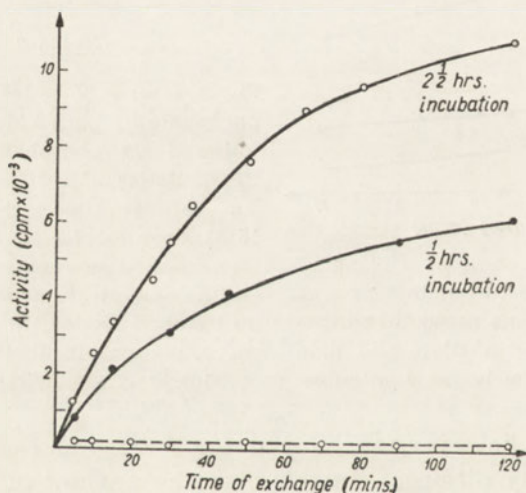


Fig. 7. Rate of replacement of phosphate component, of calcium phosphate precipitate in incubated sections, by labelled phosphate. Sections first incubated ( $1/2$  hour and  $2\frac{1}{2}$  hours) in non-labelled medium. Then drop of  $1\%$   $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$  ( $2\mu\text{C}^{32}\text{P}/\text{ml.}$ ) applied for definite time intervals to each section and amount of  $^{32}\text{PO}_4$  taken up counted. Dashed line represents control

fact that the heavier the precipitate of calcium phosphate the lower the percentage rate of exchange of the phosphate component. Fig. 7 shows the rate at which this exchange takes place for two preparations incubated for different time intervals. It will be seen that the initial rapid rate of exchange quickly falls off and that even after several hours exchange

is still far from complete. It is, however, not possible by this means to determine the actual percentage exchange of phosphate that takes place; for this purpose it would be necessary to incubate in the presence of labelled glycerophosphate so that the precipitate itself contains labelled phosphate and then to exchange this with non-labelled phosphate (see below for measurements of calcium exchange).

*Calcium exchange in Gomori-Takamatsu procedure.* Fig. 8 exhibits the rate of displacement of labelled calcium (in sections incubated in a medium containing  $^{45}\text{Ca}$ ) by non-labelled cobalt, by swirling the entire slide in a 1% solution of cobalt chloride. From the various curves shown it is clear that, the higher the initial activity of the section in counts/min. (i. e. the longer it has been incubated and therefore the greater the calcium phosphate deposit) the less rapidly is the calcium displaced by cobalt; and the more incomplete is the exchange even after considerable periods of time. The rate of this exchange is logarithmic only for the first minutes following which the first-order rate rapidly falls off.

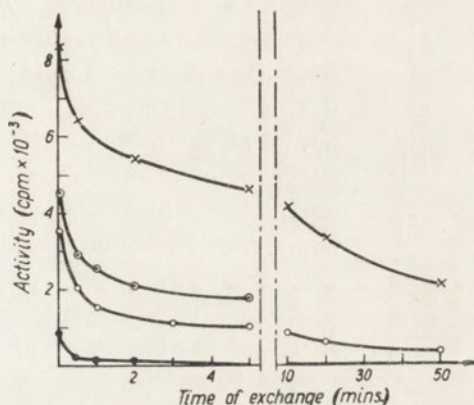


Fig. 8. Exchange of calcium by cobalt in incubated sections. Sections incubated in  $^{45}\text{Ca}$ -labeled medium until they attained definite counts (ordinates at zero time in above figure). Each section then continuously agitated in 1%  $\text{CoCl}_2$  and loss of calcium (actually replacement of calcium by cobalt) measured by counting at definite time intervals (abscissae)

In the Gomori-Takamatsu procedure exchange of Ca by Co is allowed to proceed for 5 minutes. An examination of Fig. 8 shows that for the preparation with an initial count of 3500 cpm exchange is only 70% complete after 5 minutes; while for the one with an initial count of 8400 cpm less than 50% exchange has taken place during the same period of time. It is therefore to be expected that the Gomori-Takamatsu procedure will not accurately portray the enzymatic activity; previous quantitative methods have not been sufficiently accurate to demonstrate this. However, Holter, Løvtrup and Rubin [20], on the basis of model experiments with calcium phosphate precipitates in gels, suggested that such might be the case. The effect of this phenomenon on localization patterns of enzymatic activity cannot be disregarded.

For silver, however, the situation is completely different. From Fig. 9 it will be seen that calcium is quantitatively replaced by silver in less than one minute. This may partially explain why localization patterns obtained with the silver technique are less subject to artifacts in that nuclear non-enzymatic staining is absent, whereas under the same conditions the cobalt technique may show nuclear staining [11, 12]. Feigin and Wolf suggest that the lack of nuclear staining with the silver method is due to the failure of silver to replace nuclear-bound calcium deposited, not as a result of enzymatic action, but rather through the formation of complexes of calcium proteinate or nucleinate. If this were the case displacement of calcium by silver would not be as complete as indicated by Fig. 9; in addition one would expect control sections to exhibit nuclear staining. It seems to us that one may not exclude the possibility that it is cobalt which may be bound specifically by nuclei; Liquier-Milward [22] has, in fact, reported that cobalt forms complexes with nucleic acid derivatives and nucleic acids, and such complexes have been observed *in vivo* by a number of workers (see ref. [11]).

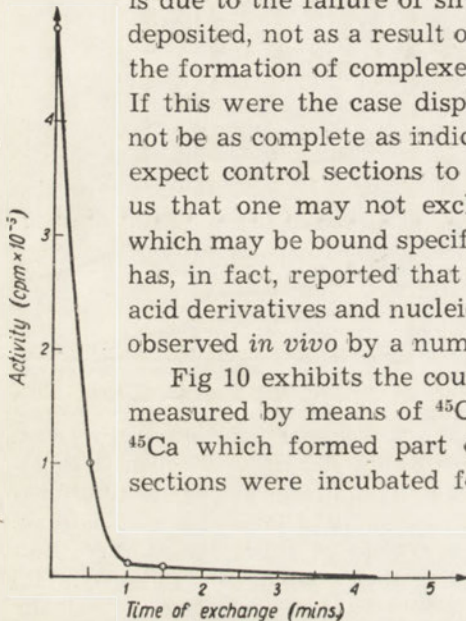


Fig. 9. Exchange of calcium by silver in incubated section. Section incubated in  $^{45}\text{Ca}$ -labelled medium until count was 4850 cpm. Then agitated in 1%  $\text{AgNO}_3$  and removal of  $^{45}\text{Ca}$  measured by counting at definite time intervals (abscissae)

Fig 10 exhibits the course of hydrolysis of glycerophosphate measured by means of  $^{45}\text{Ca}$  and  $^{110}\text{Ag}$ . The upper curve is for  $^{45}\text{Ca}$  which formed part of the incubation medium. Separate sections were incubated for the times indicated by the points on the curve. After window-counting the sections, they were all treated for 5 mins. with a 1% solution of silver nitrate labelled with  $^{110}\text{Ag}$  and again counted, giving the lower curve which exhibits practically the same slope. By suitable adjustment of the specific activity of the labelled silver solution the two curves may be made to practically coincide.

With labelled cobalt the results are somewhat variable, due to the incomplete replacement of calcium as indicated above.

*Hydrolysis of different substrates.* Fig. 11 exhibits the rates of hydrolysis of  $\beta$ -glycerophosphate, phenylphosphate and adenylic acid (3'-phosphate) by similar sections. It will be seen that glycerophosphate is hydrolyzed at about twice the rate for adenylic acid, but only 20% faster than phenylphosphate.

Cleland [6] has reported that glycerophosphate and phenylphosphate were both hydrolyzed at about the same rates, but Hancox and Nicholas



[18], using phase-contrast microscopy [17] as well as the Gomori-Takamatsu staining procedure claim that glycerophosphate is hydrolyzed much faster than phenylphosphate, but that this result is by no means evident from the staining procedure alone. With this latter conclusion we are inclined to agree.

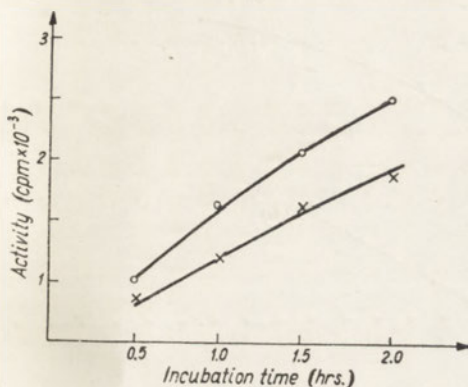


Fig. 10. Course of hydrolysis of glycerophosphate by kidney cortex section as measured with <sup>45</sup>Ca (upper curve) and <sup>110</sup>Ag (lower curve). See text for details

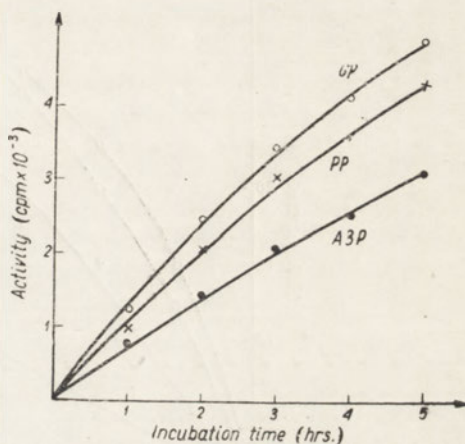


Fig. 11. Rates of hydrolysis of glycerophosphate (GP), phenylphosphate (PP) and adenylic acid (A3P) by kidney cortex section under identical conditions, using, <sup>45</sup>Ca-labelled medium (3 μC <sup>45</sup>Ca/ml.)

Unless the *pH* of the incubation medium is strictly controlled, it appears to us that measurements of the comparative rates of hydrolysis of different substrates at a single *pH* by different observers may be liable to erroneous interpretation, in view of the known differences in *pH* optimum of alkaline phosphatase towards different substrates *in vitro*. Small differences in *pH* of the incubation medium may markedly affect the relative rates of hydrolysis of different substrates, as can be seen from the *pH*-activity curves for purified alkaline phosphatase on various substrates [28]. Furthermore even findings on tissue sections may not be entirely comparable with those on the purified enzyme; Ruyter and Neumann [30] for example, have shown that the *pH* optimum of purified alkaline phosphatase is dependant, amongst other factors, on the substrate concentration. With labelled indicators it should now prove possible to investigate this question in detail.

*Effect of temperature on hydrolysis rate.* Fig. 12 exhibits the rate of hydrolysis of glycerophosphate at various temperatures in the range 15° — 51°C. The gradual falling off in activity at 51° is undoubtedly due to heat inactivation of the enzyme which takes place slowly at this

temperature (see below). Between 24° and 45°C. the change of hydrolysis rate with temperature corresponds to an activation energy for the reaction of approximately 10 kcal./mole, a value which compares favour-

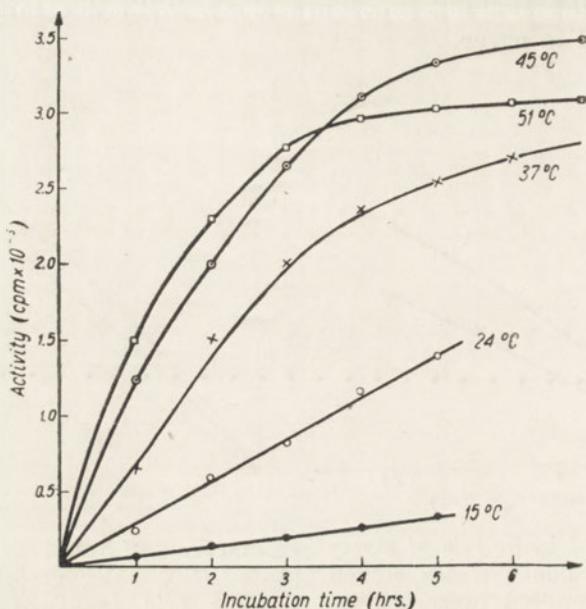


Fig. 12. Rate of hydrolysis of glycerophosphate by kidney cortex section at different temperatures, using <sup>45</sup>Ca-labelled medium (1.5 μC <sup>45</sup>Ca/ml.)

ably with that of Bodansky [4] for purified bone phosphatase *in vitro*, 9.4 kcal./mole between 20° and 40°. On the other hand, below 20° the hydrolysis rate falls off more rapidly than one would be led to expect. We have observed the same phenomenon to an even more marked extent for phenylphosphate and particularly for adenylic acid. It therefore follows that the temperature dependence of the reaction rate does not strictly accord with the Arrhenius law. The reason for this is not clear at the moment, but we are studying this phenomenon in more detail and hope to extend it to additional substrates.

In a previous communication [34] we expressed the opinion that measurements of the activation energy for hydrolysis of different substrates, together with localization patterns by means of autoradiography or staining, might provide a tool for distinguishing between phosphatases of different specificities. It is, however, clear from the above that further observations are required to establish the validity of this conclusion.

The effect of temperature on the inactivation of phosphatase in tissue sections is illustrated by Fig. 13. Each curve represents the course of

hydrolysis of glycerophosphate by a section which has previously been heated in a water bath at a given temperature for the time indicated in the figure. It will be seen that 5' at 65° C. gives practically 100% inac-

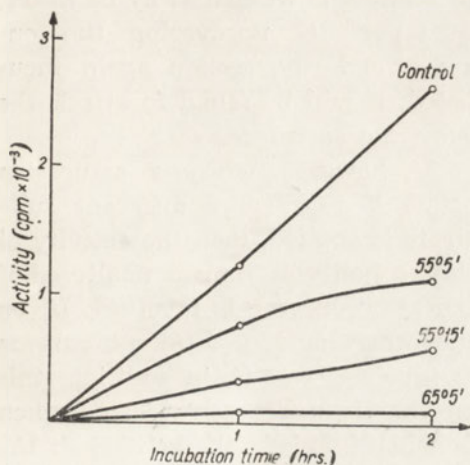


Fig. 13. Heat inactivation of alkaline phosphatase in kidney cortex sections. Sections first heated at temperatures indicated and for given periods, in distilled water. Then each section incubated in  $^{45}\text{Ca}$ -labelled medium and course of hydrolysis of glycerophosphate followed for 2 hours

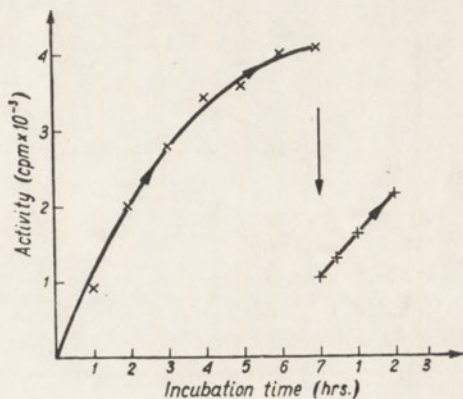


Fig. 14. Inhibition of hydrolysis of adenylic acid by precipitate formation around sites of enzymatic activity. Substrate incubated for 7 hours to attain plateau at which point count is 4050 cpm. Calcium phosphate precipitate then removed by rinsing (as indicated by arrow) in  $\text{H}_2\text{O}$  until count was 1050 cpm. Section then again incubated for further 2 hours with the same substrate

tivation. Even at 55° appreciable inactivation takes place in 5'; it is therefore not surprising that the hydrolysis rate at 51° (see Fig. 12) is not much greater than that at 45° and eventually even falls below the latter<sup>6</sup>.

*Use of 2 substrates on same section.* We have used another device in attempts to decide whether it is the same, or different, enzymes which attack glycerophosphate, phenylphosphate and adenylic acid. As a given substrate is hydrolyzed the resulting calcium phosphate precipitate should deposit around the enzyme, eventually leading to complete suppression

<sup>6</sup> Although enzymes are more sensitive to heat-inactivation in aqueous solution, it appears more than likely from the above results that at least part of the deleterious effect of paraffin embedding on enzyme activity in the case of alkaline phosphatase is due to the fact that the temperature used is close to that at which the enzyme is fairly rapidly inactivated. It is interesting to note, in this connection, that Michel, Chevrement and Firket [24] find 4 times as much phosphatase activity in sections embedded in margarine (temp. 30°) as compared to paraffin-embedded sections.

of activity since it becomes more and more difficult for the substrate molecules to attain the enzyme site. That such is actually the case is shown by the plateau attained in Fig. 14. If at this point some of the precipitate is washed away in water, thus partially uncovering the enzyme, and the section again incubated, it will be found to attack the substrate as before.

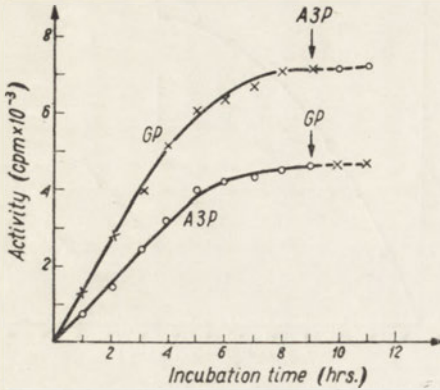


Fig. 15. Successive hydrolysis of two substrates by single section, using  $^{45}\text{Ca}$ -labelled medium. Sections first incubated with glycerophosphate (GP) or phenylphosphate (PP) for 9 hours to attain plateau following which substrates interchanged (as indicated by arrows)

If, however, when a saturation points is reached, a different substrate is applied, then the activity of the section will remain unaltered if the same enzyme is involved. If, on the other hand, a different enzyme is involved and if, in addition, this enzyme is differently located, then we should expect the activity of the section to once more show an increase. We have carried out several such experiments by incubating similar sections with glycerophosphate and adenylic acid, at  $45^\circ\text{C}$ . in order to more quickly attain the plateau. Following levelling off of activity in

each section, the slides were rinsed and the substrate interchanged for further incubation. It will be seen from Fig. 15 that no increased activity is observed in either section. Consequently it is the same enzyme which attacks both substrates, if we exclude the possibility of two different enzymes with identical or closely similar localization patterns.

It would be worth conducting the above experiment on two substrates such as glycerophosphate and naphthylphosphate which are claimed by Burgos, Deane and Karnovsky [5] to be hydrolyzed by two different phosphatases with differing localization patterns.

## CONCLUSIONS

The utility of quantitative measurements in enzyme histochemistry was already evident from the work of Doyle et al. [9]. The above results considerably extend the applicability of quantitative techniques, not only for the estimation of the enzymatic activities of histochemical preparations but also for investigating quantitatively the various steps involved

in the preparation of sections, in the incubation procedure and in the final staining techniques used for visualizing the sites of enzymatic activity.

Although we have not yet extensively investigated localization patterns following incubation in media labelled with calcium or phosphate, the preliminary autoradiograms we have obtained to date with sections incubated in  $^{45}\text{Ca}$ -labelled medium indicate that reasonably good results are to be expected. While autoradiography is clearly less convenient than a visual staining procedure, it should nonetheless exhibit two distinct advantages over the latter; [1] artifacts introduced by the staining procedure are eliminated; [2] photometry of autoradiograms is a simpler and more accurate procedure and more readily subject to control than when we have to deal with precipitates which are most often granular in character.

The techniques outlined above also make possible the study of the kinetics of enzyme reactions in tissue sections, and comparison with the behaviour of the corresponding purified enzyme *in vitro*. Such data should be of considerable value in extrapolating to the behaviour of enzymes in living organisms.

Furthermore it will probably prove feasible, by using radioactive indicators, to extend the field of application of histochemical methods to additional enzymes, since the formation of visible precipitates is no longer a prime necessity. It should be pointed out that even in those instances where substrates have been used in which stain production spontaneously accompanied enzymatic action (such as in the reduction of tetrazolium salts as a result of dehydrogenase activity [29]; or the formation of indigo by the action of hydrolytic enzymes on appropriate indoxyl derivatives [19]), the use of labelled substrates would also be of considerable value for quantitative work as well as for studying the kinetics of the reactions involved.

We should like to express our thanks to Mgr. T. Golaszewski, Mgr. F. Rzendowska and Miss H. Szemplińska for their assistance with some phases of this work.

#### STRESZCZENIE

Opisano kilka metod ilościowego histochemicznego oznaczania aktywności fosfatazy alkalicznej przy użyciu radioaktywnych wskaźników. Metody te polegały na (a) inkubacji w środowisku zawierającym znakowany wapń lub glicerofosforan, (b) inkubacji w nieznakowanym środowisku a następnie wymianie jednego ze składników osadu fosforanu wapnia na składnik radioaktywny. Dane ilościowe otrzymano mierząc aktywność skrawków licznikiem okienkowym.

Najdogodniejsza metoda polega na inkubacji w środowisku znakowanym, najlepiej przez  $^{45}\text{Ca}$ , gdyż istnieje wówczas możliwość ciągłej obserwacji przebiegu reakcji na każdym poszczególnym skrawku oraz określenia lokalizacji enzymów na tychże skrawkach przy zastosowaniu autoradiografii lub barwienia.

Metoda wymiany oddaje duże usługi przy badaniu znaczenia poszczególnych zabiegów stosowanych w opisanym przez Gomorii i Takamatsu sposobie oznaczania fosfatazy alkalicznej. Uzyskano dane ilościowe, szczególnie dla określenia roli przemywania oraz wymiany wapnia na kobalt.

Stosując roztwór inkubacyjny zawierający  $^{45}\text{Ca}$  stwierdzono, że glicerofosforan jest hydrolizowany dwukrotnie szybciej niż kwas adenylowy, zaś o 20% szybciej niż fenylofosforan. Z pomiarów zależności szybkości hydrolizy glicerofosforanu od temperatury obliczono, że energia aktywacji dla tej reakcji wynosi 10 kcal/mol. Zmierzono także przebieg inaktywacji cieplnej fosfatazy alkalicznej w skrawkach w różnych temperaturach.

Opisano metodę inkubacji skrawków kolejno w dwóch substratach dla określenia czy ten sam enzym bierze udział w obu reakcjach.

Omówiono uzyskane rezultaty oraz możliwości innego zastosowania podanych metod, a także znaczenie tych metod w rozwiązywaniu ilościowych problemów w histochemii.

#### REFERENCES

- [1] Aros B., Barka T., Posalsky Z. and Gerecse G., *Acta Morpholog, Acad. Sci. Hungar* **1**, 377, 1951.
- [2] Barka T., Szalay S., Posalsky Z. and Kertesz L., *Acta Anat.* **16**, 45, 1952.
- [3] Belanger L. F., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **77**, 266, 1951.
- [4] Bodansky M., *J. Biol. Chem.* **129**, 197, 1939.
- [5] Burgos M. H., Deane H. W. and Karnovsky M. I., *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 103, 1955.
- [6] Cleland K. W., *Proc. Linn. Soc. N. S. W.* **75**, 35 and 74, 1950.
- [7] Dalgaard J. B., *Nature* **162**, 811, 1948.
- [8] Doyle W. L., *Science* **111**, 64, 1950.
- [9] Doyle W. L., Omoto J. and Doyle M. E., *Exp. Cell Res.* **2**, 20, 1951.
- [10] Doyle W. L., *Intern. Rev. Cytology* **II**, 249, 1953.
- [11] Feigin I. and Wolf A., *Lab. Investig.* **2**, 115, 1953.
- [12] Feigin I. and Wolf A., *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 53, 1957.
- [13] Fredericsson B., *Experientia* **8**, 139, 1952.
- [14] Glick D., *Intern. Rev. Cytology* **IV**, 447, 1955.
- [15] Glick D., *Techniques of histo- and cytochemistry*, Interscience, New York, 1949.
- [16] Gomori G., *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.* **42**, 23, 1939.
- [17] Hancox N. M. and Nicholas E., *Acta Anat.* **26**, 302, 1956.

- [18] Hancox N. M. and Nicholas E., *Acta Anat.* **27**, 142, 1956.
- [19] Holt S. J., *Nature* **169**, 271, 1952.
- [20] Holter H., Løvtrup S. and Rubin I., *Acta Chem. Scand.* **5**, 194, 1951.
- [21] Kurnick N. B., *Intern. Rev. Cytology* **IV**, 221, 1955.
- [22] Liquier-Milward J., *Nature* **167**, 1068, 1951.
- [23] Michaelis L., *Biochem. Z.* **234**, 139, 1931.
- [24] Michel J. P., Chevremont M. and Firket H., *Ann. histochim.* **1**, 5, 1956.
- [25] Newman W., Kabat E. A. and Wolf A., *Am. J. Path.* **26**, 498, 1950.
- [26] Pearse A. G. E., *Histochemistry*, J. A. Churchill, London, 1953.
- [27] Reid A. F. and Copenhagen J. H., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 14, 1957.
- [28] Reis J. L., *Biochem. J.* **48**, 548, 1951.
- [29] Rutenberg A. M., Gofstein R. and Seligman A., *Canc. Res.* **10**, 113, 1950.
- [30] Ruyter J. H. and Neumann H., *Biochim. Biophys. Acta* **3**, 125, 1949.
- [31] Sheldon H., Zetterquist H. and Brandes D., *Exp. Cell. Res.* **9**, 592, 1955.
- [32] Shugar D. and Baranowska J., *Bull. Acad. Polon. Sci., Série des Sci. Biol.* **5**, 165, 1957.
- [33] Shugar D. and Baranowska J., *Intern. Conf. Radioisotopes in Scientific Research*, Unesco, Paris, 1957.
- [34] Shugar D., Szenberg A. and Sierakowska H., *Exp. Cell. Res.* **13**, 124, 1957.
- [35] Takamatsu H., *Trans. Soc. Path. Japan* **29**, 492, 1939.

### Summary

A description is given of various procedures for the quantitative histochemical determination of alkaline phosphatase by means of radioactive indicators. The methods are based on (a) incubation in a calcium- or glycerophosphate-labelled medium, or (b) incubation in a non-labelled medium followed by exchange of one of the components of the calcium phosphate precipitate for one which is radioactive. Quantitative results are obtained by end-window counting of the incubated sections.

The most convenient procedure involves incubation in a labelled medium, particularly with  $^{45}\text{Ca}$ , since the reaction may then be followed continuously for any desired period of time on a single section, and the same section may be used for staining or autoradiography to localize sites of enzymatic activity.

The exchange procedures are useful for studying the validity of the various steps in the Gomori-Takamatsu incubation and staining method. Quantitative data are presented regarding the validity of each of these steps, particularly the rinsing procedures and the extent of exchange of calcium for cobalt.

Using a  $^{45}\text{Ca}$ -labelled incubation medium it was shown that glycerophosphate is hydrolyzed at twice the rate for adenylic acid but only 20% faster than phenylphosphate. From the temperature dependance of the rate of hydrolysis for glycerophosphate, the energy of activation for the reaction is shown to be 10 kcal./mole. The heat inactivation of phosphatase in tissue sections has also been measured at various temperatures.

A method is described for incubating successively with two substrates in order to determine whether the same enzyme is involved in both reactions.

The results are discussed and other applications of the method are described, as well as the potentialities of the technique to various problems in quantitative histochemistry.

Otrzymano 28.10.57 r.



HANNA WEHR

**BADANIA NAD WŁASNOŚCIAMI PIROFOSFATAZY  
Z MIĘŚNI KRÓLIKA**

*Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Warszawie  
Kierownik: prof. dr Józef Heller*

## WSTĘP

Enzymy rozkładające nieorganiczny pirofosforan czyli pirofosfatazy są bardzo rozpowszechnione. Ich aktywność stwierdzono u bakterii [31], w drożdżach [5, 2], w tkankach roślinnych [9, 27], u owadów [29, 11]. Występują one również w bardzo wielu tkankach i narządach ssaków [24, 28, 12, 6, 3, 35]. Wobec niewielkiej ilości danych dotyczących pirofosfatazy mięśni zwierząt wyższych postanowiono częściowo oczyścić oraz zbadać własności pirofosfatazy mięśni królika.

Temat ten jest szczególnie interesujący z następujących względów: w piśmiennictwie brak dotychczas wyraźnego rozgraniczenia między pirofosfatazą a tzw. rozpuszczalną ATP-azą aktywującą się magnezem. ATP-aza taka została izolowana z mięśni królika [16, 30]. Odpowiednikiem tego enzymu u zwierząt niższych jest apyrazę wykrytą w mięśniach szarańczy [10]. Autorzy stwierdzili, że aktywność preparatu apyrazy w stosunku do pirofosforanu nieorganicznego (aktywność około 10 razy mniejsza niż dla ATP) daje się oddzielić frakcjonowaniem przy pomocy siarczanu amonu. Nie było pewne czy podobne rozdzielanie możliwe jest również w mięśniach ssaków, gdzie rozpad ATP przebiega inaczej, prowadząc do odłączenia tylko jednej reszty fosforanowej. W bieżącej pracy wykonano próby mające na celu preparatywne rozdzielanie obu enzymów. Wykonano również niektóre doświadczenia w celu porównania własności pirofosfatazy i ATP-azy aktywującej się magnezem w preparatach, które posiadały aktywność obu enzymów.

## CZĘŚĆ DOSWIADCZALNA

*Materiał*

Do badań używano wyciągu wodnego z mięśni królika lub frakcji białkowych otrzymywanych przez wysalanie siarczanem amonu. Pirofosforan sodowy  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  (PP) wolny od ortofosforanu. ATP otrzymywano metodą Szent-Györgyi [36]. Czystość otrzymanego preparatu obliczona według zawartości fosforu całkowitego wynosiła 90%. Bufor boranowy o  $\text{pH}$  8 przygotowywano według Sörensen [34]. Do oznaczania optimum  $\text{pH}$  używano zestawu buforów: octanowych i boranowych według Sörensen i weronalowego według Michaelisa [25].  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  suszony w temperaturze  $100^\circ$  do stałej wagi. Chlorowodorek cysteiny (preparat handlowy) rozpuszczony w wodzie i doprowadzony do odpowiedniego  $\text{pH}$  wodorotlenkiem sodu.

*Oznaczanie aktywności enzymatycznej*

Mieszanina reagująca zawierała: 1 ml odpowiednio rozcieńczonego roztworu enzymu; 2,5 ml buforu boranowego  $\text{pH}$  8; 0,1 ml cysteiny (40 mikromoli); 0,2 ml  $\text{MgCl}_2$  0,1 M (20 mikromoli); 0,2 ml pirofosforanu 0,01 M (odpowiada to 2 mikromolom czyli 124 mikrogramom P pirofosforanu) względnie 0,2 ml ATP zawierające 2 mg ATP (odpowiada to 3,5 mikromola czystego ATP lub 216 mikrogramów fosforu 7-minutowego czystego ATP). Całkowita objętość mieszaniny wynosiła 4 ml,  $\text{pH}$  kontrolowano przy pomocy zestawu wskaźników i papierków BDH. Po 30-minutowej inkubacji w temperaturze  $38^\circ$  strącano białko przez dodanie 4 ml 10%  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ . W przesączu oznaczano fosfor nieorganiczny metodą Fiske-Subbarowa w modyfikacji Lohmanna i Jendrassika [23], używając jako czynnika redukującego kwas fosfomolibdenowy amidolu (2,4-dwuaminofenol). Zerowe próby zawierały te same składniki co próby właściwe. Kwas trójchlorooctowy dodawano do nich przed dodaniem substratu. Ażeby pirofosforan był narażony na działanie kwasu tak samo długo w próbach zerowych jak we właściwych, dodawano go do prób zerowych dopiero po okresie inkubacji. Miarą czynności enzymu była różnica między zawartością fosforu nieorganicznego w próbce właściwej w porównaniu z próbą zerową. Aktywność enzymów wyrażano jako ilość fosforu uwolnionego przez 1 mg azotu białka enzymu w warunkach doświadczenia lub jako ilość fosforu uwolnionego przez 1 ml rozcieńczonego roztworu enzymu. Przy porównaniu aktywności pirofosfatazy i ATP-azy należy zwrócić uwagę na fakt, że rozbitcie tej samej ilości wiązań przez oba enzymy powoduje uwolnienie różnych ilości fosforu: dwa razy więcej dla pirofosfatazy niż dla ATP-azy.

Białko oznaczano metodą biuretową [17] w modyfikacji Keysera i Vaughna [15].

### Oczyszczanie pirofosfatazy

Fracjonowano siarczanem amonu p. a. *in substantia* w temp. 0°. Ilości siarczanu amonu obliczano posługując się nomogramem [8]. Sączono, lekko wilgotne osady zbierano z sączka i rozpuszczano względnie zawieszano w wodzie destylowanej w objętości najczęściej 10 razy mniejszej niż roztwór wyjściowy. Otrzymane w ten sposób frakcje przechowywano w chłodni, a przed użyciem dializowano ok. 48 godz. aż do zniknięcia reakcji na jony siarczanowe. Dializa powodowała często straty aktywności, dodanie cysteiny przywracało jednak stan pierwotny.

Tablica 1

#### Oczyszczanie i trwałość pirofosfatazy

Fracja wytrącająca się przy nasyceniu siarczanem amonu	Aktywność pirofosfatazy μg P/1 mg białka
0,45	243
0,45—0,65	880
0,65—1	9
0,50—0,60	298
0,60—1	5
0,50—0,55	1535
0,55—0,60	1390
0,50—0,55	177
0,55—0,60	132
0,45—0,65	880
to samo powtórnie frakcjonowane	
0,50—0,55	207
ten sam preparat przechowywany około 3 tygodni w postaci niedializowanej	83
0,35	530
to samo po 1 tygodniu przechowywania w postaci dializowanej	0

1 ml roztworu enzymu; 2,5 ml buforu boranowego pH 8; 40 mikromoli cysteiny; 20 mikromoli MgCl<sub>2</sub>; 2 mikromole pirofosforanu. Całkowita objętość mieszaniny 4 ml. Inkubacja 30 min w temp. 38°C

Wyniki frakcjonowania siarczanem amonu przedstawiają się w sposób następujący: pirofosfataza znajduje się głównie we frakcji „miogenowej” czyli wysalającej się pomiędzy 0,45—0,65 nasycenia. Dokładniejsze frakcjonowanie wykazało, że najwyższą aktywność posiada białko wytrącające się przy 0,50—0,60 nasycenia. Białko wytrącające się powyżej 0,65 nasycenia siarczanem amonu nie posiada praktycznie aktywności enzyma-

tycznej pirofosfatazy. Frakcja globulinowa wykazuje zawsze niewielką aktywność pirofosfatazową. W najłatwiej wytrącających się globulinach aktywność ta jest najmniejsza, w miarę zbliżania się do właściwej frakcji „pirofosfatazowej” aktywność osadu wzrasta.

Ponieważ pirofosfataza mięśni znajduje się w obrębie frakcji „miogenowej” (0,45—0,65 nasycenia  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), wydawało się interesującym sprawdzenie aktywności pirofosfatazowej miogenów krystalicznych otrzymanych metodą Baranowskiego [4]. Okazało się, że zarówno miogen A jak i miogen B nie mają czynności pirofosfatazy. W czasie preparatyki stwierdziłam, że zalecone ogrzewanie do  $52^\circ$  inaktywuje pirofosfatazę. Pomięłam więc ten zabieg jak również przewidziane po nim ponowne wytrącanie siarczanem amonu. Otrzymany w ten sposób krystaliczny miogen A również nie hydrolizował pirofosforanu.

Trwałość pirofosfatazy w przechowywanych w chłodni rozpuszczonych frakcjach niedializowanych jest znaczna. Po kilku tygodniach przechowywania aktywność zmniejsza się wprawdzie kilkakrotnie, lecz nie zanika. Natomiast przy przechowywaniu w postaci dializowanej często już po kilku dniach preparat traci zupełnie aktywność. Powtórne frakcjonowanie siarczanem amonu powodowało kilkakrotne obniżenie aktywności. Tablica 1 ilustruje podane powyżej wyniki.

Tablica 2

Rozmieszczenie pirofosfatazy i ATP-azy w poszczególnych frakcjach siarczanowo amonowych

Frakcja wytrącająca się przy nasyceniu siarczanem amonu	Aktywność pirofosfatazy $\mu\text{g P/1 mg białka}$	Aktywność ATP-azy $\mu\text{g P/1 mg białka}$
0,35	149	646
0,35—0,50	319	402
0,50—0,60	891	35
0,35	530	1060
0,35—0,50	522	522
0,50—0,60	1557	77

1 ml roztworu enzymu, 2,5 ml buforu boranowego  $\text{pH } 8$ , 40 mikromoli cysteiny, 20 mikromoli  $\text{MgCl}_2$ , 2 mikromole pirofosforanu lub 3,5 mikromola ATP. Całkowita objętość mieszaniny 4 ml. Inkubacja 30 min w temp.  $38^\circ$

Rozpuszczalna ATP-aza wytrąca się natomiast głównie przy stężeniu siarczanem amonu do 0,35 nasycenia. Aktywność ATP-azy w kolejnych frakcjach zmniejsza się, frakcja 0,50—0,60 posiada już aktywność bardzo małą. Białko strącone powyżej 0,65 nasycenia nie ma czynności ATP-azy. Przykłady ilustrujące rozłożenie obu enzymów w poszczególnych frakcjach przedstawione są w tablicy 2.

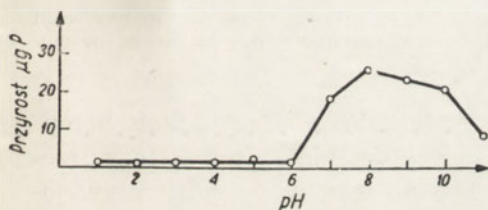
### Własności pirofosfatazy

We wszystkich opisanych doświadczeniach, z wyjątkiem badania optimum  $pH$ , przez pirofosfatazę rozumiemy frakcję wytrącającą się pomiędzy 0,50 a 0,60 nasycenia siarczanem amonu.

*Optimum  $pH$ .* Do doświadczeń użyto dializowanego wyciągu wodnego z mięśni, ponieważ istniała możliwość wykrycia dwu lub więcej pirofosfataz o różnym optimum  $pH$ , z których każda mogła występować w innej frakcji białkowej.

Wyciąg wodny wykazywał tylko jedno optimum aktywności enzymatycznej pirofosfatazy między 7 a 10,2. Zależność aktywności od  $pH$  przedstawiona jest na rys. 1.

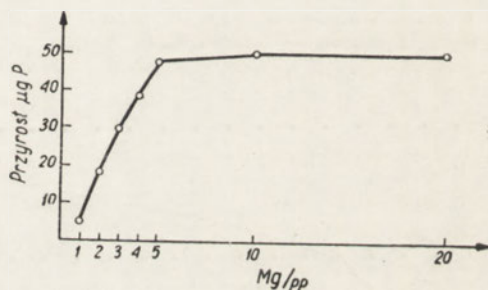
*Aktywacja jonami magnezu.* Enzym wymaga do swego działania obecności jonów magnezu. Bez dodania  $Mg^{++}$  nie stwierdza się żadnej aktywności lub jest ona nieznaczna — wynosi tylko kilka procent aktywności w obecności  $Mg^{++}$ . Z prac innych autorów wynika, że właściwym substratem dla pirofosfatazy jest kompleks pirofosforanowo-magnezowy [7, 32]. Czynnikiem decydującym jest więc nie stężenie magnezu, lecz stosunek molowy magnezu do pirofosforanu.



Rys. 1. Optimum  $pH$  dla pirofosfatazy 1 ml. dializowanego wyciągu z mięśni, 2,5 ml buforu, 40 mikromoli cysteiny, 20 mikromoli  $MgCl_2$ , 2 mikromole pirofosforanu. Całkowita objętość mieszaniny 4 ml.

Inkubacja 30 min. w temp.  $38^\circ$ .

Dla  $pH$  od 1,1 do 6 bufony cytrynianowe, dla  $pH$  7 bufor weronałowy dla  $pH$  od 7,7 do 11 bufony boranowe



Rys. 2. Zależność aktywności enzymu od stosunku  $Mg/PP$

1 ml. roztworu enzymu, 2,5 ml buforu boranowego  $pH$  8, 40 mikromoli cysteiny, 2—40 mikromoli  $MgCl_2$ , 2 mikromole pirofosforanu. Całkowita objętość mieszaniny 4 ml. Inkubacja 30 min. w temp.  $38^\circ$

Ilość magnezu potrzebną do maksymalnego działania enzymu oznaczano w bieżącej pracy przy stałej ilości substratu, a następnie wyliczono optymalny stosunek molowy  $Mg/PP$ . Wynosił on 5 lub więcej. Poniżej tej wartości aktywność enzymu była znacznie mniejsza. Zależność aktywności enzymu od stosunku  $Mg/PP$  podana jest na rys. 2. Wyniki nie pokrywają się z wynikami Lohmanna [24], u którego optymalny stosunek magnezu do pirofosforanu wynosił 2.

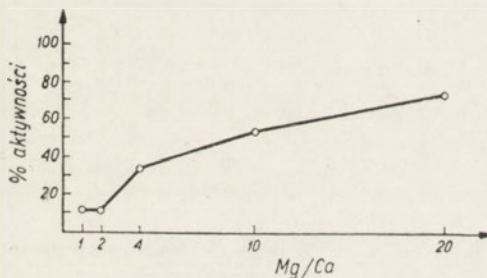
**Aktywacja cysteiną.** Cysteina jest aktywatorem reakcji enzymatycznego rozpadu pirofosforanu. W nieobecności cysteiny stwierdziłam w wielu przypadkach zupełny brak aktywności, w innych aktywność była niewielka i wzrastała przeważnie znacznie pod wpływem cysteiny. Aktywacja następowała natychmiast, czas preinkubacji cysteiny z enzymem nie odgrywał żadnej roli, natomiast długotrwałe ich przechowywanie razem (jeden dzień w temperaturze 0°) powodowało lekki spadek aktywności.

Zbadano wpływ innych czynników działających ochronnie na grupy SH enzymów. Nie znaleziono aktywacji przy użyciu glikokolu i 8-oksychinoliny (Tablica 3).

Tablica 3  
Aktywacja pirofosfatazy

Aktywator	Stężenie końcowe	Aktywność (mg P uwolnionego)
—	—	2
cysteina	$10^{-2}$ M	55
glikokol	$10^{-2}$ M	1
8-oksychinolina	$10^{-2}$ M	4

1 ml roztworu enzymu, 2,5 ml buforu boranowego pH 8, 40 mikromoli cysteiny, 20 mikromoli  $MgCl_2$ , 2 mikromole pirofosforanu. Całkowita objętość mieszaniny 4 ml. Inkubacja 30 min w temp. 38°



Rys. 3. Zależność aktywności enzymu od stosunku Mg/Ca

1 ml roztworu enzymu, 2,5 ml buforu boranowego pH 8, 40 mikromoli cysteiny, 10–40 mikromoli  $MgCl_2$ , 1–20 mikromoli  $CaCl_2$ , 2 mikromole pirofosforanu. Całkowita objętość mieszaniny 4 ml. Inkubacja 30 min. w temp. 38°. Aktywność wyrażano jako ilość mikrogramów fosforu uwolnionego w warunkach doświadczenia. Za 100% aktywności przyjęto ilość mikrogramów fosforu uwolnionego w nieobecności wapnia przy stężeniu magnezu 20 mikromoli w inkubacie

**Inhibitory.** Z czynników hamujących działanie pirofosfatazy przebadano między innymi wpływ jonów wapnia, które są antagonistami jonów magnezu. Stwierdzono, że decydujące znaczenie posiadają nie absolutne ilości magnezu i wapnia, lecz ich stosunek molowy. Przy stosunku magnezu do wapnia równym 1 stwierdza się zaledwie ślady aktywności enzymatycznej. Przy stosunku 10 hamowanie wynosi około 50%. Stosunki ilościowe pokazuje rys. 3.

Wysokie stężenia ortofosforanu hamują działanie pirofosfatazy. Hamowanie staje się wyraźne dopiero przy stężeniach równych  $2 \times 10^{-3}$  M. Stężenia poniżej  $10^{-3}$  M nie odgrywają żadnej roli.

Silnym inhibitorem reakcji jest fluorek. W stężeniu końcowym równym  $5 \times 10^{-4} \text{M}$  hamuje on rozpad pirofosforanu w 70%. Przy stężeniu  $5 \times 10^{-3}$  zahamowanie jest zupełne.

Użyte w tym samym stężeniu cyjanek sodu i azydek sodu nie wykazują żadnego działania hamującego. Przy stężeniach  $5 \times 10^{-2} \text{M}$  cyjanki wykazu-

Tablica 4

## Hamowanie pirofosfatazy

Nr dośw.	Inhibitor	Stężenie końcowe	Stężenie końcowe cysteiny	Aktywność (mg P uwolnionego)	% zahamowania
1.	—	—	$10^{-2} \text{M}$	56	—
	fluorek sodu	$5.10^{-5} \text{M}$	„	58	0
	„	$5.10^{-4} \text{M}$	„	17	70
	„	$5.10^{-3} \text{M}$	„	3	94
2.	—	—	„	50	—
	fluorek sodu	$5.10^{-3} \text{M}$	„	0	100
	azydek sodu	$5.10^{-3} \text{M}$	„	53	0
3.	—	—	„	40	—
	jodoocetan sodu	$5.10^{-3} \text{M}$	„	39	0
	cyjanek sodu	$5.10^{-3} \text{M}$	„	44	0
	azydek sodu	$5.10^{-3} \text{M}$	„	41	0
	cyjanek sodu	$5.10^{-2} \text{M}$	„	37	8
	cyjanek sodu	$5.10^{-1} \text{M}$	„	7	83
4.	—	—	„	54	—
	jodoocetan sodu	$2.5.10^{-3} \text{M}$	„	54	0
	„	$5.10^{-3} \text{M}$	„	54	0
	„	$2.5.10^{-2} \text{M}$	„	42	22
	„	$5.10^{-2} \text{M}$	„	27	50
	—	—	$2.10^{-2} \text{M}$	52	—
	jodoocetan sodu	$5.10^{-2} \text{M}$	„	43	17
	—	—	$5.10^{-3} \text{M}$	52	—
	jodoocetan sodu	$5.10^{-2} \text{M}$	„	46	12
	—	—	0	52*)	—
jodoocetan sodu	$2.5.10^{-3} \text{M}$	0	1	98	

\*) Do tego doświadczenia użyto celowo preparat enzymatyczny, który posiadał aktywność bez dodatku cysteiny.

1 ml roztworu enzymu, 2,5 ml. buforu boranowego pH 8, 20–60 mikromoli cysteiny, 20 mikromoli  $\text{MgCl}_2$ , 2 mikromole pirofosforanu. Całkowita objętość mieszaniny 4 ml. Inkubacja 30 min. w temp.  $38^\circ$

ją zaledwie 8% zahamowania, dopiero w  $2 \times 10^{-1} \text{M}$  roztworze zahamowanie wynosi 80%. Jodoocetan sodu  $5 \times 10^{-3} \text{M}$  przy stężeniu cysteiny  $10^{-2} \text{M}$  również nie wykazuje działania hamującego,  $5 \times 10^{-2} \text{M}$  hamuje reakcję w 50%. Użycie wyższych stężeń cysteiny zmniejsza procent zahamowania jodoocetanem, w preparatach wykazujących aktywność w nieobecności cysteiny zahamowanie jest zupełne już w  $2,5 \times 10^{-3} \text{M}$  roztworze. Przykłady zebrane są w tablicy 4.

*Specyficzność.* Badano aktywność preparatu enzymatycznego w stosunku do następujących substratów: trójpirofosforan  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , trójmetafosforan  $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , tetrametafosforan  $\text{Na}_3\text{P}_4\text{O}_{12} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , sól Grahama  $(\text{NaPO}_3)_x \cdot \text{H}_2\text{O}$ , glicerofosforan  $\text{Na}_2\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_6\text{P}$ . Nie stwierdzono przyrostu ortofosforanu pod wpływem preparatu enzymatycznego.

### Porównanie własności pirofosfatazy i ATP-azy

Frakcjonowanie przy pomocy siarczanu amonu nie doprowadziło do całkowitego rozdzielenia pirofosfatazy i ATP-azy. Istnieją dwie możliwości: jedna — enzym „albuminowy” (frakcja 0,50—0,60 nasycenia siarcza-

Tablica 5

#### Porównanie niektórych własności pirofosfatazy i ATP-azy

Nr dośw.	Frakcja wytrącająca się przy nasyceniu siarczanem amonu	Substrat	Aktywność preparatu	Czynnik działający	Aktywność po zadziałaniu danego czynnika	Wynik
1.	0,35—0,50	PP	52	Przechow. przez	53	bez zmian
	0,35—0,50	ATP	60	10 dni w temp. 0°	12	spadek 80%
2.	0,50—0,60	PP	48	fluorek stężenie	11	spadek 77%
	0,35	ATP	27	$5 \cdot 10^{-1}\text{M}$	27	bez zmian
3.	0,50	PP	36	ortofosforan	15	spadek 59%
	0,50—0,60	PP	58	stężenie $3 \cdot 10^{-3}\text{M}$	24	spadek 59%

1 ml roztworu enzymu, 2,5 ml buforu boranowego pH 8, 40 mikromoli cysteiny, 20 mikromoli  $\text{MgCl}_2$ , 2 mikromole pirofosforanu lub 3,5 mikromola ATP. Całkowita objętość mieszaniny 4 ml. Inkubacja 30 min w temp. 38°. Aktywność wyrażano jako ilość mikrogramów fosforu uwolnionego w warunkach doświadczenia

nem amonu) jest pirofosfatazą i wykazuje dodatkowe niespecyficzne działanie na ATP; odwrotna sytuacja byłaby we frakcji euglobulinowej (frakcja 0—0,35 nasycenia siarczanem amonu): enzym byłby ATP-azą rozkładającą niespecyficznie pirofosforan. Druga możliwość polega na tym, że właściwe frakcje: pirofosfatazowa i ATP-azowa są zanieczyszczone drugim enzymem, frakcja zaś środkowa (0,35—0,50 nasycenia siarczanem amonu) stanowi mieszaninę obu enzymów.

Przebadano wpływ różnych czynników (jak przechowywanie, inhibitory) na preparaty posiadające aktywność w stosunku do pirofosforanu i ATP. Przechowywanie roztworu, który posiadał aktywność w stosunku do jednego i drugiego substratu (frakcja 0,35—0,50 nasycenia siarczanem amonu) wykazało większą labilność ATP-azy. Po 10 dniach przechowywania w temperaturze 0° aktywność pirofosfatazy pozostała bez zmian, natomiast aktywność ATP-azy spadła o 80%. Doświadczenie z inhibitorami



wykonano równolegle na różnych frakcjach. Dodanie fluorku w stężeniu równym  $5 \times 10^{-4} \text{M}$  powodowało przeszło 70% zahamowania pirofosfatazy, natomiast na ATP-azę nie wpływało zupełnie.

Zbadano również wpływ ortofosforanu na aktywność pirofosfatazową w różnych frakcjach. Stwierdzono ten sam procent zahamowania w obecności tych samych stężeń inhibitora niezależnie od tego, jaka frakcja była źródłem pirofosfatazy. Porównanie własności pirofosfatazy i ATP-azy zestawione jest w tablicy 5.

#### DYSKUSJA

Zebranie podanych wyników pozwala przypuszczać, że występowanie aktywności pirofosfatazy i ATP-azy w tych samych preparatach nie polega na niespecyficznym działaniu jednego enzymu na dwa podobne pod względem strukturalnym substraty, lecz, że mamy do czynienia raczej z dwoma różnymi enzymami. Za istnieniem dwu enzymów przemawia zarówno ich rozdzielenie w poszczególnych frakcjach uzyskanych przez wysalanie siarczanem amonu jak i różnice we własnościach. ATP-aza silniej ulega inaktywacji pod wpływem przechowywania, pirofosfataza natomiast okazała się bardziej wrażliwa na hamowanie przez fluorki. Również jednakowo silne hamowanie aktywności pirofosfatazy w różnych frakcjach przez ortofosforan przemawia za istnieniem w nich tego samego enzymu.

Wzrastające coraz bardziej w ostatnich latach zainteresowanie pirofosforanami nieorganicznymi uzasadnione jest stwierdzeniem udziału pirofosforanu w wielu najrozmaitszych reakcjach metabolicznych, jak na przykład: synteza koenzymów [18, 33, 26], aktywacja kwasów tłuszczowych [19], synteza wiązania peptydowego [13], synteza mononukleotydów purynowych i pirymidynowych [20, 21, 22]. Bardziej interesująca staje się więc niewyjaśniona również dotąd rola pirofosfataz. Bardzo mało zajmowano się dotychczas sprawą czy rozpad pirofosforanu katalizowany przez pirofosfatazę prowadzi do bezużytecznego uwolnienia tak dużej ilości energii, czy też energia ta zostaje w jakiś sposób wykorzystana, na przykład za pośrednictwem przeniesienia reszty fosforanowej na jakiś akceptor. Wiadome jest, że zwykle fosfomonoesterazy poza aktywnością hydrolityczną posiadają do pewnego stopnia działanie feraz — przenoszą resztę fosforanową z jednego substratu na drugi [1]. Przypuszczenie, że pirofosfataza mogłaby również być ferazą, wydaje się prawdopodobne także i z powodu wykrycia w drożdżach [14] i w bezkomórkowych wyciągach *Mycobacterium smegmatis* [37] enzymu przenoszącego resztę fosforanową z metafosforanu na ADP. Enzym ten — metafosfokinaza — daje możliwość użytkowania energii zawartej w metafosforanie.

W bieżącej pracy wykonano wstępne doświadczenia, aby wyjaśnić czy badany preparat enzymatyczny z mięśni (frakcja 0,50—0,60 nasycenia

siarczanem amonu) nie posiada własności katalitycznych umożliwiających tego rodzaju reakcje przenoszenia reszty fosforanowej. Jako ewentualne akceptory reszty fosforanowej użyto następujące związki: glukozę, glicerol, kwas pirogronowy i kwas cytrynowy. Oznaczano przyrost fosforu nieorganicznego oraz zawartość fosforu 7-minutowego przed i po okresie inkubacji. Próby zerowe i właściwe nie wykazywały różnic w ilości fosforu 7-minutowego. Nie jest wykluczone, że reakcja tego typu zachodzi w ściśle określonych warunkach, które nie zostały w doświadczeniach uchwycone. Mogłoby to na przykład być sprzężenie z jakąś inną reakcją uwalniającą pirofosforan.

#### STRESZCZENIE

Pirofosfatazę z mięśni królika oczyszczono częściowo przez frakcjonowanie siarczanem amonu. Najwyższą aktywność posiada frakcja wytrącająca się pomiędzy 0,50—0,60 nasycenia. Miogen krystaliczny nie posiada aktywności pirofosfatazy.

Optimum *pH* enzymu mieści się w granicach 7—10,2. Do jego działania niezbędne są wolne grupy SH oraz jony magnezu. Jony wapnia posiadają działanie antagonistyczne w stosunku do jonów magnezu. Silnym inhibitorem reakcji jest fluorek.

Enzym jest specyficzny w stosunku do pirofosforanu nieorganicznego. Nie rozkłada innych polifosforanów ani glicerofosforanu. Pewna aktywność preparatu w stosunku do ATP wynika najprawdopodobniej z zanieczyszczeń ATP-azą.

#### L I T E R A T U R A

- [1] Axelrod B., *J. Biol. Chem.* **176**, 295, 1948.
- [2] Bailey K., Webb E. C., *Biochem. J.* **38**, 394, 1944.
- [3] Bamann E., Gall H., *Biochem. Z.* **293**, 1, 1937.
- [4] Baranowski T., *C. R. Soc. Biol.* **130**, 1182, 1939.
- [5] Bauer E., *Naturwiss.* **23**, 866, 1935.
- [6] Binkley F., Olson C. K., *J. Biol. Chem.* **186**, 725, 1950.
- [7] Bloch-Frankenthal L., *Biochem. J.* **57**, 87, 1954.
- [8] Brenner-Holzach O., Stachelin M., *Helv. Physiol. Acta*, **11**, 212, 1953.
- [9] Fleury P., Courtois J., *Enzymologia* **14**, 34, 1953.
- [10] Gilmour D., Calaby J. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **41**, 83, 1952.
- [11] Gilmour D., Calaby J. H., *Enzymologia* **14**, 34, 1953.
- [12] Gordon J., *Biochem. J.* **46**, 96, 1950.
- [13] Hoagland M. B., *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 288, 1953.
- [14] Hoffman-Ostenhof C., Kennedy J., Keck K., Gabriel O., Schönfelling H. W., *Biochim. Biophys. Acta* **14**, 285, 1954.
- [15] Keyser J. W., Vaughn J., *Biochem. J.* **44**, XXII, 1949.

- [17] Kingsley G. R., *J. Lab. Clin. Med.* **27**, 840, 1942.
- [18] Kornberg A., Pricer W. E., *J. Biol. Chem.* **191**, 535, 1951.
- [19] Kornberg A., Pricer W. E., *J. Biol. Chem.* **204**, 329, 1953.
- [20] Kornberg A., Liebermann I., Simms E. S., *J. Biol. Chem.* **215**, 389, 1955.
- [21] Kornberg A., Lieberman I., Simms E. S., *J. Biol. Chem.* **215**, 417, 1955.
- [22] Liebermann I., Kornberg A., Simms E. S., *J. Biol. Chem.* **215**, 403, 1955.
- [23] Lohmann K., Jendrassik L., *Biochem. Z.* **178**, 424, 1926.
- [24] Lohmann K., *Biochem. Z.* **262**, 137, 1933.
- [25] Michaelis L., *Biochem. Z.* **234**, 139, 1931.
- [26] Munch-Petersen A., Kalckar H. M., Cutolo E., Smith E.E.B., *Nature* **172**, 1036, 1953.
- [27] Naganna B., Sripathi C. E., *Nature* **174**, 593, 1954.
- [28] Naganna B., Narayana Menon V. K., *J. Biol. Chem.*, **174**, 501, 1948.
- [29] Niemierko S., Wojtczak A., *Acta Physiol. Polon.*, Prace III Zjazdu P.T.F. 217, 1952.
- [30] Perry S. W., *Biochim. Biophys. Acta* **8**, 499, 1952.
- [31] Pett L. B., Wynne A. M., *Biochem J.*, **32**, 563, 1938.
- [32] Robbins E. A., Stulberg M. P., Bayer P. D., *Arch. Biochem. Biophys.* **54**, 215, 1955.
- [33] Schrecker A. W., Kornberg A., *J. Biol. Chem.* **182**, 795, 1950.
- [34] Struszyński M., *Analiza ilościowa i techniczna*, Warszawa, 1954.
- [35] Swanson M. A., *J. Biol. Chem.* **191**, 577, 1951.
- [36] Szent-György A., *Chemistry of Muscular Contraction*, New-York, 1947.
- [37] Winder F., Denneny J. M., *Congrès International de Biochimie* III, 31, 1955.

## INVESTIGATIONS ON THE PYROPHOSPHATASE OF RABBIT MUSCLES

### Summary

The pyrophosphatase of rabbit muscle was partially purified by fractionated precipitation with ammonium sulphate. The greatest activity was found in the fraction that was precipitated at the saturation between 0.50—0.60. Crystalline myogen did not show pyrophosphatase activity.

The optimum *pH* of the enzyme was between 7—10.2. Free SH groups and magnesium ions were necessary for the activity. Calcium ions were antagonists in relation to magnesium ions. Fluoride ions were found strong inhibitors of the reaction.

The enzyme was specific for inorganic pyrophosphate. It did not split other polyphosphates nor glicerophosphate. It was shown, that the slight activity of the preparation against ATP was attributed to ATP-ase contamination.

Otrzymano 14.9.57 r.



J. TROJANOWSKI

**CZĘŚCIOWE OCZYSZCZANIE TYROZYNAZY Z POCZWAREK  
*SPHINX PINASTRI***

Z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN

Dyrektor: prof. dr Józef Heller

## WSTĘP

Tyrozynazę w materiale owadzie (larwa *Tenebrio molitor*) wykrył Biedermann [1]. Próbę wydzielenia surowego preparatu enzymu z hemolimfy poczwarek motyli podjęli Fürth i Schneider w roku 1901 [5], stosując jednorazowe wytrącenie preparatu enzymatycznego siarczanem amonu. Następnie, badacze tyrozynazy owadziej ograniczali się tylko do sporządzania wyciągów tego enzymu w różnych rozpuszczalnikach, jak woda z dodatkiem chloroformu [17], 0,1% kwas octowy [16], bufor fosforanowy  $pH = 7,4$  [2], roztwór NaCl [3] i inne.

Na podstawie badań Hellera [6] można przypisać tyrozynazie ważną rolę fizjologiczną w oddychaniu owadów. Badania Pryora i współprac. [15] wskazują na udział tego enzymu w procesie twardnienia powłoki ciała owadów.

Tyrozynazę udało się dotychczas wydzielić w stanie oczyszczonym jedynie z materiału roślinnego [8, 9, 10, 12].

Próba wydzielenia i oczyszczenia tyrozynazy owadziej jest przedmiotem obecnej pracy.

Przy wydzielaniu tyrozynazy z owadów poważną trudność stanowi szybkie czernienie wyciągów i inaktywacja enzymu wskutek endogenego utlenienia obecnych w miazdze fenoli. Jak wykazali Heller i Mochacka [7], w ciele motyla wilczomlecza znajduje się znaczna ilość polifenoli. Zasadniczym warunkiem uzyskania aktywnego preparatu tyrozynazy jest zatem szybkie usunięcie z miazgi związków fenolowych. W tym celu zastosowano do wytrącania enzymu 55% roztwór wodny acetonu, wzorując się na metodzie oczyszczania tyrozynazy z ziemniaka według Kubowitza [10]. Dalsze stadia oczyszczania tyrozynazy opra-

cowano niezależnie, gdyż należało uwzględnić odmienne od roślinnego właściwości użytego materiału owadziego.

W pracy niniejszej uzyskano trwały preparat tyrozynazy owadziej o aktywności około 40-krotnie większej niż materiał wyjściowy.

## CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

### 1. Przygotowanie preparatu tyrozynazy

Do badań użyto poczwarek *Sphinx pinastri* w stanie diapauzy dostarczonych w grudniu 1956 roku przez Zespoły Ochrony Lasu z różnych rejonów kraju. Z materiału usunięto osobniki martwe i zagrzybione. W tablicy 1 podano aktywność tyrozynazy w świeżej miazdze poczwarek *Sphinx pinastri* w porównaniu z innymi gatunkami owadów.

Homogenat z poczwarek przygotowano w czterokrotnej ilości 0,15 M buforu fosforanowego  $pH = 7,1$  w mechanicznym homogenizatorze szybkoobrotowym z ostrzami ze stali nierdzewnej, w którym utrzymywano temperaturę około  $0^{\circ}$ . Po odwirowaniu homogenatu w chłodzonej wirówce w temperaturze  $-2^{\circ}$  przy  $1700 \times g$  i odrzuceniu osadu oraz górnej warstwy tłuszczowców uzyskano zawiesinę I, barwy jasnozielonej, zawierającą 24,5 mg suchej masy w 1 ml. Do zawiesiny tej dodano natychmiast aceton w ilości 55% na objętość zawiesiny, chłodząc mieszaninę do temperatury  $-5^{\circ}$ . Wytrącony acetonem osad niezwłocznie odwirowano, odrzucając brązowy klarowny roztwór, pozbawiony całkowicie aktywności tyrozynazowej. Osad zawieszono w 0,15 M buforze fosforanowym  $pH = 7,1$ . Zawiesinę wirowano przez 15 minut przy  $2000 \times g$  w niskiej temperaturze, otrzymując po odrzuceniu osadu zawiesinę II, barwy jasnozielonkawej, o zawartości 14,5 mg suchej masy w 1 ml. Zawiesina II przechowywana z dodatkiem toluenu w temperaturze  $0^{\circ}$  wykazywała niezmienną aktywność w ciągu miesiąca.

Z zawiesiny II wytrącono przez zakwaszenie kwasem octowym do  $pH = 4,7$  żółtawy osad (Os), który oddzielano przez wirowanie w niskiej temperaturze od zielonego, zupełnie nieaktywnego płynu i przenoszono do buforu o  $pH = 7$ . Otrzymywano żółtawą zawiesinę III, która w 1 ml zawierała 8 mg suchej masy. Zawiesinę III można przechowywać w temperaturze  $0^{\circ}$  z dodatkiem toluenu przez 1 miesiąc. Zamrażanie tej zawiesiny powoduje nieodwracalne wytrącanie kłaczkowatego osadu, który jednak zachowuje aktywność enzymatyczną. Dializa w niskiej temperaturze wobec wody destylowanej nie zmniejsza aktywności zawiesiny III.

Zawiesinę III frakcjonowano dalej przez wirowanie w niskiej temperaturze. Przy  $40\,000 \times g$  uzyskiwano prawie całą aktywność enzyma-

Tablica 1

Autor	Gatunek — tkanka	$\mu\text{O}_2$ na 1 godz. 1 g świeżej masy	Substrat
Bhagvat i Richter 1938, [2]	<i>Odonestis potatoria</i> , larwa, limfa	5340	homokatechol
„	<i>Lasiocampa quercifolia</i> , larwa, limfa	623	„
„	<i>Lasiocampa quercifolia</i> , larwa, skórka	3680	„
„	<i>Lasiocampa quercifolia</i> , larwa, wnętrznosci	1001	„
„	<i>Bombyx quercus</i> , larwa, hemolimfa	3310	„
„	<i>Bombyx quercus</i> , larwa, skórka	8680	„
„	<i>Bombyx quercus</i> , larwa, wnętrznosci	2782	„
„	<i>Eumorpha elpenor</i> , poczw., hemolimfa	5130	„
„	<i>Eumorpha elpenor</i> , poczw., wnętrznosci	3576	„
„	<i>Locusta migratoria</i> , imago, wnętrznosci	1946	„
„	<i>Periplaneta americana</i> , dojrzały owad, wnętrznosci	141	„
„	<i>Dysdercus intermedius</i> , dojrzały owad, odwłok	4841	„
Pryor 1955, [15]	<i>Drosophila melanogaster</i> , larwa dojrzała	800	tyramina· ·HCl
„	<i>Calliphora erythrocephala</i> , larwa dojrzała	1060	„
„	<i>Tenebrio molitor</i> , larwa dojrzała	1900	„
Heller 1947, [7]	<i>Celerio euphorbiae</i> , poczwarka, maks.	300	endogeny
„	<i>Celerio euphorbiae</i> , poczwarka, minim.	40	„
Bodine 1943, [3]	<i>Melanoplus differentialis</i> , jaja, 20 dni	600	tyrozyna
Trojanowski 1957	<i>Sphinx pinastri</i> , poczwarka	316	catechol

tyczną w osadzie, który przenoszono do buforu o  $pH = 7$ , uzyskując bezbarwną zawiesinę IV o zawartości 1 mg suchej masy w 1 ml. Aktywności kolejnych frakcji w toku oczyszczania preparatu tyrozynazy przedstawiono w tablicy 2.

T a b l i c a 2

Kolejne stadia oczyszczania tyrozynazy z poczwarek *Sphinx pinastri*

Preparat	Zawartość suchej masy w mg/ml	Obj. całkowita preparatu w ml	Aktywność <sup>1, 2</sup>					
			pomiar manom.		pomiar kolorymetryczny			
			Q <sub>O<sub>2</sub></sub> dla katecholu	Q <sub>O<sub>2</sub></sub> dla p-krezolu	A <sub>k</sub> dla katecholu	A <sub>k</sub> dla p-krezolu	A <sub>k</sub> dla tyrozyny	A <sub>k</sub> dla pirogallolu
(I) homogenat odwirowany przy 1700 × g	24,5	1000	7,9	7,8	—	—	—	—
(II) frakcja wytrącona z homogenatu przez wysycenie acetonem do 55 % obj.	14,5	1000	9,4	8,1	28,7	15	11	18
(III) frakcja wytrącona kwasem octowym przy pH 4,7	8	200	51	16*)	265	29*)	—	—
(IV) osad odwirowany przy 40 000 × g	1	100	308	76**) 41***)	765	103***)	117**)	682

1 Q<sub>O<sub>2</sub></sub> oznacza ilość tlenu w  $\mu$ l pobraną w aparacie Warburga przez 1 mg suchej masy preparatu wobec 8 mg substratu w temp. 20° przy pH 7,1 w ciągu 1 godz. (jednostka używana przez Kellina i Manna [8])

2 A<sub>k</sub> oznacza aktywność zmierzoną kolorymetrycznie po 15 min. reakcji z 8 mg substratu przy pH 7,1 i wyrażoną jako stosunek  $\frac{1000 E_{458}}{1 \text{ cm}}$  mg suchej masy

\*) Po 1,5 godzinnym okresie indukcji.

\*\*) Z dodatkiem kropli 0,004% roztworu dopa.

\*\*\*) Bez dodatku dopa, po dwu godzinnym okresie indukcji.

Homogenat I otrzymano przez odwirowanie zawiesiny miążgi poczwarki w 4-krotnej objętości 0,15 M buforu fosforanowego pH = 7,1.

W preparacie IV (por. tabl. 2) oznaczono zawartość miedzi metodą mikrokolorymetryczną Erdmann-Müller i Hornbartela w modyfikacji Opieńskiej-Blauth i współprac. [13]. Preparat przed analizą dializowano przez 3 dni w chłodni wobec wody redestylowanej ze szkła. Spalano metodą mokrą. Pomiaru ekstynkcji barwnego połączenia miedzi dokonywano w rurkach absorpcyjnych o długości 5 cm w fotometrze Pulfricha przy



filtrze S<sub>47</sub>. Przy oznaczaniu uwzględniono ślady miedzi obecne w odczynnikach. Znalaziono 0,018% miedzi w przeliczeniu na suchą masę organiczną preparatu IV.

## 2. Frakcjonowane wirowanie preparatu

Wobec niemożności uzyskania klarownego roztworu tyrozynazy z poczwerek *Sphinx pinastri* postanowiono określić w przybliżeniu stopień rozdrobnienia enzymonośnych ziarnistości. W tym celu poddano frakcjonowanemu wirowaniu zawiesinę III w 0,15 M buforze fosforanowym  $pH = 7,1$  (por. tabl. 3).

T a b l i c a 3

Frakcjonowane wirowanie zawiesiny tyrozynazy owadziej z *Sphinx pinastri* w 0,15 M buforze fosforanowym o  $pH 7,1$

Frakcja	$Q_{O_2}$ wobec katecholu
osad przy 1700 × g	55
osad przy 24 000 × g	168
osad przy 38 000 × g	300
płyn znad osadu przy 38 000 × g	17
płyn znad osadu przy 40 000 × g	2,4

Jak wynika z tablicy 3, maksimum aktywności w danych warunkach stwierdzano w osadzie uzyskanym przez 20-minutowe wirowanie przy 40 000 × g. Płyn znad tego osadu wykazywał tylko nieznaczną aktywność ( $Q_{O_2} = 2,4$ ). Preparaty odwirowane przy mniejszej szybkości miały mniejszą aktywność.

## 3. Próby ekstrakcji enzymu z ziarnistości

Część osadu (Os), wytraconego kwasem octowym, zawieszano w 0,15 M buforze fosforanowym  $pH = 7,1$ . Zawiesinę wirowano w niskiej temperaturze przy 240 × g i odrzucano nieznacznego osad. Tak uzyskany płyn wirowano następnie w ciągu 15 minut przy 15 000 × g w niskiej temperaturze. Uzyskany przy 15 000 × g osad zawieszano w 2 ml 10% roztworu wodnego taurocholalanu sodu i pozostawiano w lodzie na przeciąg 1 godziny, wstrząsając. Po upływie tego czasu ponownie wirowano zawiesinę w taurocholalanie przy 15 000 × g. Przeprowadzona reakcja testowa z katecholem w warunkach porównywalnych wykazała wzrost ekstynkcji  $E_{1\text{cm}}^{478}$  po traktowaniu taurocholalanem z  $E_1 = 0,4$  do  $E_2 = 1,85$ . W ten sposób wykazano, że taurocholalan zwiększa stopień dyspersji ziarnistości enzymonośnych. Enzym pozostaje jednak nadal związany z ziarnistościami, gdyż przesączenie przez sączonek Seitz K zawiesiny preparatu

traktowanego przez godzinę 1% roztworem taurocholanu usuwa z przesączu aktywność enzymatyczną. Podobny efekt jak roztwór taurocholanu daje woda.

#### DYSKUSJA

Częściowo oczyszczony preparat tyrozynazy wydzielonej z poczwarek *Sphinx pinastri* zawiera enzym związany z ziarnistościami. Potrzebne są dalsze badania dla określenia morfologii tych ziarnistości. Również badania Wojtczaka [18] i nie ogłoszone wyniki Szarkowskiej wskazują na prawdopodobieństwo związania tyrozynazy owadziej z elementami strukturalnymi. Tyrozynaza u zwierząt kręgowych jest także zlokalizowana w strukturach komórkowych. W melanocytach u myszy znaleźli Lerner i współprac. [11] tyrozynazę w mitochondriach i mikrosomach, z których nie udało się enzymu uwolnić. Danneel [4] stwierdził zanik aktywności tyrozynazowej w ekstrakcie z poczwarek *Drosophila melanogaster* po przesączeniu przez grubą warstwę azbestu.

Jak się wydaje, tyrozynaza owadów jest więc zlokalizowana w ziarnistościach komórkowych, analogicznie jak tyrozynaza kręgowców. Stąd wynika niemożność przeprowadzenia tego enzymu w stan roztworu drogą prostej ekstrakcji buforem, jak to jest możliwe w przypadku tyrozynazy roślinnej. Stanowi to przeszkodę dla uzyskania czystego enzymu z materiału owadziego.

W miarę oczyszczania tyrozynazy z poczwarek *Sphinx pinastri* zaobserwowano wydatne zmniejszanie się stosunku aktywności krezolazowej do katecholazowej (por. tabl. 2). To samo stwierdzili Keilin i Mann [8] odnośnie tyrozynazy z pieczarek.

Zawartość miedzi w preparacie okazała się niewielka i wynosiła 0,018%, podczas gdy w czystym preparacie tyrozynazy roślinnej znajdowano od 0,30% [8] do 0,20% [9] miedzi. Preparat nasz był oczyszczony tylko częściowo (około 40-krotnie) i wydaje się, w analogii do badań Keilina i Manna [8], że niecała, oznaczona przez nas, miedź jest miedzią enzymu, przy tym prawdopodobny jest fakt, że część znalezionej przez nas miedzi pochodzi od towarzyszących enzymowi zanieczyszczeń.

Doświadczenia z taurocholanem wskazują na możliwość zwiększenia stopnia dyspersji zawiesiny tyrozynazy owadziej przez działanie detergentami.

Składam serdeczne podziękowanie Panu Prof. Dr J. Hellerowi, Dyrektorowi Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN za umożliwienie mi pracy w pracowniach Instytutu oraz za cenne wskazówki i okazaną mi życzli-

wość. Dziękuję również Pani Adjunkt L. Szarkowskiej i Panu Adjunktowi J. W. Szarkowskiemu za koleżeńską pomoc i dyskusje w toku wykonywania pracy.

#### STRESZCZENIE

Oczyszczano tyrozynazę z poczwarki *Sphinx pinastri*. Z homogenatu wytrącano enzym acetonem 55%, preparat frakcjonowano następnie przez zakwaszenie do  $pH = 4,7$  oraz wirowanie przy  $40\ 000 \times g$ . Preparat uzyskany w postaci zawiesiny był trwały w temperaturze  $0^\circ$  przez 1 miesiąc. Aktywność wobec katecholu wyniosła  $Q_{O_2} = 308$ , wobec p-krezolu  $Q_{O_2} = 41$ , co przewyższa około 40 razy aktywność miazgi oznaczoną wobec katecholu. Zawartość miedzi w preparacie wynosiła 0,018%.

#### LITERATURA

- [1] Biedermann W., *Arch. f. ges. Physiol.* 72, 105, 1898.
- [2] Bhagvat K., Richter D., *Biochem. J.* 32, 1397, 1938.
- [3] Bodine J. H., Tahmisian T. N., *Biol. Bull.* 85, 157, 1943.
- [4] Danneel L., *Biol. Zbl.* 63, 377, 1943.
- [5] Fürth O., Schneider H., *Beitr. Chem. Physiol. Path.* 1, 229, 1901.
- [6] Heller J., *Acta Biol. Exper.* 14, 229, 1947.
- [7] Heller J., Mochnacka I., *Sprawozdania Wrocławskiego Tow. Naukowego* 6, Dod. 3, 1951.
- [8] Keilin D., Mann T., *Proc. Roy. Soc. London* 125, (B), 187, 1938.
- [9] Kertesz D., Zito R., *Nature* 179, 1017, 1957.
- [10] Kubowitz F., *Biochem. Z.* 292, 221, 1937.
- [11] Lerner A. B., Fitzpatrick T. B., Calkins E., Summer son W. H., *J. Biol. Chem.* 178, 185, 1949.
- [12] Mallette M. F., Lewis S., Ames S. R., Nelson J. M., Dawson C. R., *Arch. Biochem.* 16, 283, 1948.
- [13] Opieńska-Blauth J., Sz waj M., Pietrusiewicz M., *Ann. UMCS, Pol. Praca w druku.*
- [14] Pryor M. G. M., *J. Exptl. Biol.* 32, 468, 1955.
- [15] Pryor M. G. M., Russell P. B., Todd A. R., *Biochem. J.* 40, 627, 1946.
- [16] Pugh C. E. M., *Biochem. J.* 24, 1442, 1930.
- [17] Raper H. S., *Erg. Enzymforsch.* 1, 270, 1932.
- [18] Wojtczak L., (przygotowana do druku).

#### PARTIAL PURIFICATION OF TYROSINASE FROM THE PUPAE OF *SPHINX PINASTRI*

#### Summary

Tyrosinase from the pupa of *Sphinx pinastri* was purified. The enzyme was precipitated from the homogenate by 55 per cent acetone. The

preparation was fractionated, acidified to  $pH$  4.7, and centrifuged at  $40\,000 \times g$ .

The preparation obtained in the form of a suspension was stable for 1 month at  $0^\circ C$ . Activity toward catechol was  $Q_{O_2} = 308$ , and toward p-cresol  $Q_{O_2} = 41$ , which was roughly 40 times the activity of the homogenate determined with reference to catechol.

Copper content of the preparation was 0.018 per cent.

Otrzymano 9.11.57 r.

A. GRUDZINSKA

**ZAWARTOŚĆ SODU I POTASU W ŚLINIE CZŁOWIEKA***Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Gdańsku**Kierownik: prof. dr Wł. Mozotowski*

Dzięki fotometrii płomieniowej badania nad regulacją hormonalną i farmakologiczną gospodarki jonami sodowymi i potasowymi objęły znacznie szersze kręgi, niż miało to miejsce dawniej. W zakres tych badań włączono i ślinę. Zajmowali się tym zagadnieniem liczni autorzy. Jedni z nich badali działanie takich hormonów jak ACTH, desoksykortykosteron, kortison [2, 9]; inni zaś wpływ czynników farmakologicznych jak np. pilokarpiny [6, 8]. Wyniki prac poszczególnych autorów wykazują jednak stosunkowo znaczne różnice liczbowe. Istotą tych różnic zdaje się być to przede wszystkim, że ślina jest wydzieliną o bardzo zmiennym składzie; źródłem zmienności składu śliny może być rozmaity udział różnych gruczołów ślinowych oraz zmienność wydzieliny poszczególnych gruczołów. Jest więc rzeczą istotną znalezienie „normalnych” wartości, z którymi można by porównać wyniki otrzymane pod wpływem różnych bodźców. Wartości podawane jako normalne przez różnych autorów wykazują bowiem bardzo duże wahania, a średnie różnią się od siebie niekiedy kilkakrotnie. Celem obecnej pracy było oznaczenie takich wartości w odniesieniu do jonów sodu, potasu i chloru. Jako wartości charakteryzujące chemicznie ślinę oznaczano obok jej ilości także azot całkowity oraz aktywność amylazy.

**METODY**

Sód i potas oznaczano fotometrem płomieniowym firmy Zeiss model III [3]; chlorki metodą jodometryczną Kinga z tym, że mucynę wytrącano nie wolframianem sodu w 0,15 M kw. fosforowym, lecz tylko kwasem fosforowym [4]; azot całkowity metodą Kjeldahla (spalano z  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , destylowano do kwasu borowego); aktywność amylazy oznacza-

no metodą Willstättera i współpracowników według opisu Bertho i Grasmanna [1]; każde oznaczenie było wykonane w dwóch rozcieńczeniach, których wyniki musiały być proporcjonalne do ilości użytej śliny; w razie braku proporcjonalności stosowano większe rozcieńczenie.

Ślinę pobierano na czczo po wymyciu ust. Dla pobudzenia wydzielania śliny poruszano tylko językiem i odpluwano. Czas zbierania zawsze wynosił 30 minut. Ślinę po pobraniu odwirowywano.

### WYNIKI I DYSKUSJA

Pierwsza seria oznaczeń dotyczy 12 osób obojga płci w wieku 20 do 30 lat. Średnie wartości wraz ze średnim odchyleniem podaje tablica 1.

Tablica 1

*Średnia zawartość sodu, potasu, chloru, azotu całkowitego oraz aktywność amylazy śliny człowieka*

Liczba badanych osób	N-całkowity mg%	Aktywność amylazy jednostek [1] w 100 ml śliny	Na <sup>+</sup> mE/L	K <sup>+</sup> mE/L	Cl <sup>-</sup> mE/L	Ilość ml śliny wydzielonej w 30 min.
12	46,0±13,0	10,5±6,2	10,4±3,9	22,0±4,7	22,0±3,7	16,0±6,0

Dane tej tablicy wykazują bardzo duży rozrzut wartości. Może to być spowodowane albo tym, że skład śliny mimo pobierania w tych samych warunkach jest zmienny u tej samej osoby albo że poszczególne jednostki różnią się pod tym względem od siebie. Należy również rozważyć czy skład śliny pobieranej w tych samych warunkach jest stały, np. czy w dwóch półgodzinnych okresach następujących po sobie można spodziewać się takiej samej zawartości badanych substancji (w dostępnym mi piśmiennictwie brak takich danych). Fakt dużej zmienności składu śliny może oczywiście być spowodowany różnym udziałem poszczególnych gruczołów i byłoby rzeczą cenną uzyskanie danych, czy przez zbadanie składu śliny nie można by wnioskować o większym lub mniejszym udziale poszczególnych gruczołów. Dla uzyskania odpowiedzi na powyższe pytania przeprowadzono następną serię doświadczeń. Badano ślinę 10 osób innych aniżeli te, których dane zawiera tablica 1. Każdą z osób badano w dwóch różnych dniach. Każdego dnia zbierano ślinę w dwóch porcjach w odstępach półgodzinnych. Jednego dnia pierwsza porcja była śliną mieszaną, zaś drugą półgodzinną porcją pobierano po założeniu wafka ligniny na ujścia gruczołów przyusznych celem ograniczenia udziału śliny tych gruczołów. W innym dniu u tej samej osoby zmieniano kolejność pobierania. Wyniki liczbowe podają tablice 2a, 2b, 3a i 3b.

T a b l i c a 2 a

Zawartość sodu, potasu, chloru, azotu całkowitego i aktywność amylazy w ślinie mieszanej pobieranej w pierwszej kolejności

L. p.	Symb.	N-całkowity mg %	Aktywność amylazy jednostek [1] w 100 ml śliny	Na <sup>+</sup> mE/L	K <sup>+</sup> mE/L	Cl <sup>-</sup> mE/L	Ilość ml śliny wy- dzielonej w 30 min.	Data
1	Top.	42,0	26,8	7,3	21,2	20,8	20	10.III.
2	Lesz.	32,8	9,2	4,9	18,7	15,9	8	10.III.
3	Lut.	39,5	10,2	10,1	19,0	23,4	12	12.III.
4	Zabl.	40,6	13,5	12,4	18,2	20,2	23	12.III.
5	Żoł.	30,2	13,5	10,5	12,8	15,8	32	13.IV.
6	Zebr.	33,9	5,1	3,8	19,6	18,6	17	15.IV.
7	Gr.	31,6	4,2	7,2	19,0	17,7	10	24.IV.
8	Lor.	34,2	6,4	5,4	19,9	19,1	13	4.V.
9	Żyd.	44,0	3,7	7,6	19,9	30,1	5	29.V.
10	Ang.	74,5	23,0	14,7	29,5	25,3	5	20.V.
		40,39±12,8	11,5±7,9	8,4±3,5	19,8±4,1	20,8±4,6	14,5±9	

T a b l i c a 2 b

Zawartość sodu, potasu, chloru, azotu całkowitego i aktywność amylazy w ślinie z ograniczeniem udziału gruczołów przyusznych pobranej w drugiej kolejności

L. p.	Symb.	N-całkowity mg%	Aktywność amylazy jedn. [1] w 100 ml śliny	Na <sup>+</sup> mE/L	K <sup>+</sup> mE/L	Cl <sup>-</sup> mE/L	Ilość ml śliny w 30 min.	Data
1	Top.	26,3	8,8	5,5	18,7	17,7	15	10.III.
2	Lesz.	20,5	5,4	4,0	10,3	14,1	7	10.III.
3	Lut.	30,0	5,1	9,1	14,2	18,9	10	12.III.
4	Zabl.	35,8	8,8	8,7	16,0	16,6	15	12.III.
5	Żoł.	22,7	10,8	14,6	11,9	16,3	22	13.IV.
6	Zebr.	19,2	2,4	3,8	16,8	17,7	15	15.IV.
7	Gr.	23,3	1,7	4,5	16,8	14,4	9	24.IV.
8	Lor.	18,5	2,0	4,1	16,7	14,9	13	4.V.
9	Żyd.	45,0	1,7	6,8	23,0	35,2	8	29.V.
10	Ang.	60,5	16,1	13,0	26,3	27,9	6	29.V.
		30,2±13,4	6,3±4,8	7,4±3,9	17,1±4,8	19,4±5,9	12,0±5	

Tablice 2a oraz 3b zawierają dane o składzie śliny mieszanej; tablice 2b oraz 3a przedstawiają skład śliny z ograniczonym udziałem gruczołów przyusznych. Z tych danych jest widoczne, że skład śliny u poszczególnych jednostek nie ulega wielkim wahaniom. Wystarczy porównać

Tablica 3a

Zawartość sodu, potasu chloru, azotu całkowitego i aktywność amylazy w ślinie z ograniczeniem udziału gruczołów przyusznych, pobieranej w pierwszej kolejności

L. p.	Symb.	N-całkowity mg %	Aktywność amylazy jedn. [1] w 100 ml śliny	Na' mE/L	K' mE/L	Cl' mE/L	Ilość ml śliny wydalanej w 30 min.	Data
1	Top.	28,6	6,5	4,7	18,2	21,7	10	8.V.
2	Lesz.	35,1	3,7	5,1	14,0	19,1	5	9.V.
3	Lut.	36,4	3,3	11,2	15,4	21,7	6	11.V.
4	Zabł.	40,2	11,8	8,6	15,6	18,6	9	13.V.
5	Żoł.	22,4	6,5	15,5	10,3	20,0	19	15.V.
6	Zebr.	17,6	1,7	3,8	14,2	16,3	15	15.V.
7	Gr.	23,0	2,0	3,8	14,5	15,5	12	20.V.
8	Lor.	20,7	3,3	4,1	15,9	16,9	13	23.V.
9	Żyd.	42,6	1,7	9,1	23,0	30,7	5	8.VI.
10	Ang.	51,5	11,3	15,0	23,0	33,2	6	8.VI.
		31,8±11,1	5,2±3,8	8,1±4,5	16,4±4,0	21,3±6,0	10,0±5	

Tablica 3b

Zawartość sodu, potasu, chloru, azotu całkowitego i aktywność amylazy w ślinie mieszanej pobieranej w drugiej kolejności

L. p.	Symbol	N-całkowity mg%	Aktywność jednostek [1] w 100 ml śliny	Na' mE/L	K' mE/L	Cl' mE/L	Ilość ml śliny w 30 min.	Data
1	Top.	51,3	23,0	4,7	20,2	21,7	14	8.V.
2	Lesz.	40,0	11,3	5,1	20,6	20,2	6	9.V.
3	Lut.	46,6	10,2	10,6	18,0	22,0	9	11.V.
4	Zabł.	47,6	16,7	9,5	16,8	18,3	19	13.V.
5	Żoł.	32,8	13,5	10,6	14,3	18,3	18	15.V.
6	Zebr.	28,6	3,7	3,4	16,8	15,8	15	15.V.
7	Gr.	30,8	5,1	5,5	17,8	18,9	14	20.V.
8	Lor.	33,3	12,9	6,3	18,3	20,0	15	23.V.
9	Żyd.	42,6	3,7	6,6	23,0	23,9	8	8.VI.
10	Ang.	66,0	13,5	14,5	25,3	32,6	4	8.VI.
		41,9±11,4	11,3±6,1	7,7±3,5	19,1±3,2	21,2±4,6	12,0±5,0	

wartości przypadków 10 i 6 tablicy 2a i 3b oraz 2b i 3a. Gdy pierwszy z nich wykazuje w dwóch różnych dniach wysokie stężenie poszczególnych substancji przy małej ilości wydzielanej śliny, drugi zachowuje się odwrotnie. Ogólnie biorąc można w oparciu o dane tych



tablic stwierdzić, że skład chemiczny śliny w odniesieniu do badanych w tej pracy substancji jest dla poszczególnych jednostek znacznie mniej zmienny niż można by sądzić ze średnich wartości; duża dyspersja jest przede wszystkim uwarunkowana znacznymi różnicami osobniczymi.

Dane tablic 2a i 3b odnoszą się do tych samych osób z tym, że wartości tablicy 2a dotyczą śliny pobieranej w pierwszej półgodzinie, a tablicy 3b w drugiej w innym dniu. Na podstawie tych liczb można przyjąć, że ślina wydzielana pobudzeniem przez ruch języka nie wykazuje istotnie większych zmian między dwoma półgodzinnymi okresami następującymi po sobie. Ma to znaczenie ze względów doświadczalnych, gdyż w oparciu o to można porównać skład śliny pod wpływem różnych bodźców, biorąc jako porównanie skład śliny zbieranej w ciągu półgodziny przed stosowaniem bodźca.

Wpływ ograniczenia udziału gruczołów przyusznych przedstawiają tablice 2b oraz 3a. W porównaniu z danymi tablic 2a i 3b stwierdza się wyraźny spadek stężenia azotu całkowitego i aktywności amylazy, zaznacza się tendencja do zmniejszania stężenia potasu, natomiast nie widać jakiegokolwiek wpływu na zawartość jonów sodowych i chlorkowych. Nie jest jednak możliwe związanie liczbowe stężenia azotu całkowitego z aktywnością amylazy względnie stężeniem potasu.

Oprócz wyżej podanych wniosków liczby tablic 1, 2a oraz 3b mogą służyć dla oznaczenia średnich wartości oraz ich dyspersji: azotu całkowitego  $42,6 \pm 12,0$  mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>; aktywności amylazy  $11,1 \pm 6,1$  jednostek amylazowych w 100 ml śliny [1]; stężenia jonów sodowych  $8,8 \pm 3,3$  mE/L; potasowych  $20,3 \pm 3,9$  mE/L; chlorkowych  $21,3 \pm 4,1$  mE/L oraz ilości wydzielanej śliny  $14,0 \pm 6,4$  ml (w warunkach naszego postępowania w ciągu pół godziny).

Dane omówionych tablic wskazują również na możliwość zmienności indywidualnej składu śliny. Wniosek ten wymagał kontroli doświadczalnej i dlatego wykonano dla jednej osoby (Gr), której ślinę badano już w czterech półgodzinnych próbach, jeszcze pięć dalszych oznaczeń. Tablice 4 i 4a podają wszystkie te dane w liczbie dziewięciu, z których cztery dotyczą śliny pobieranej z ograniczeniem udziału gruczołów przyusznych. Wydaje się więc uzasadniony pogląd, że skład śliny (przynajmniej w odniesieniu do badanych składników) jest dla poszczególnych jednostek w różnych dniach mało zmienny.

Ponieważ zadaniem tej pracy było oznaczenie wartości normalnych śliny dla badanych jonów nieorganicznych, należy zestawić uzyskane liczby z danymi piśmiennictwa (Tablica 5).

Z zestawień tej tablicy widoczne jest, że wyniki obecnej pracy są zbliżone do wyników Niedermeiera, Soiva'y, Warming-Larsena, natomiast odbie-

Tablica 4

Zawartość sodu, potasu, chloru oraz N-całkowity i aktywność amylazy w ślinie mieszanej pobieranej u jednej osoby

L. p.	Symbol	N-całkowity mg%	Aktywność amylazy jednostek [1] w 100 ml śliny	Na <sup>+</sup> mE/L	K <sup>+</sup> mE/L	Cl <sup>-</sup> mE/L	Ilość ml śliny na 30 min.	Data
1	Gr.	37,4	4,2	6,1	21,8	17,6	11	15.III.
2	Gr.	31,6	4,2	7,2	19,0	17,7	10	24.IV.
3	Gr.	31,6	6,5	7,5	17,7	17,3	11	15.V.
4*)	Gr.	30,8	5,1	5,5	17,8	18,9	14	20.V.
5*)	Gr.	37,0	6,2	5,9	20,0	18,8	11	24.II.
		33,7±3,2	5,2±1,1	6,4±0,8	19,2±1,7	18,0±0,7	11,4±1,5	

\*) ślina mieszana pobierana w drugiej kolejności

Tablica 4a

Zawartość sodu, potasu, chloru oraz N-całkowity i aktywność amylazy w ślinie z ograniczeniem udziału ślinianki przyusznej pobieranej u jednej osoby

L. p.	Symbol	N-całkowity mg%	Aktywność amylazy jednostek [1] w 100 ml śliny	Na <sup>+</sup> mE/L	K <sup>+</sup> mE/L	Cl <sup>-</sup> mE/L	Ilość ml śliny na 30 min.	Data
1	Gr.	23,0	2,0	3,8	14,5	15,5	12	20.V.
2	Gr.	26,0	1,7	3,8	15,5	16,3	10	24.II.
3*)	Gr.	23,3	1,7	4,5	16,8	14,4	9	24.IV.
4*)	Gr.	24,0	2,0	4,8	15,6	13,8	11	15.III.
		24,0±1,3	1,8±0,2	4,2±0,5	15,6±0,9	15,0±1,1	10,5±1,4	

\*) ślina z ograniczeniem udziału ślinianki przyusznej pobierana w drugiej kolejności

Tablica 5

Zawartość jonów sodowych, potasowych i chlorkowych mieszanej śliny człowieka według różnych autorów

L. p.	Autor (Nazwisko)	Na <sup>+</sup> mE/L	K <sup>+</sup> mE/L	Cl <sup>-</sup> mE/L
1	Warming-Larsen 1952 [9]	8,3 (4,8—14,6)	19,9 (6,0—26,6)	—
2	White 1955 r. [10]	26,4±11,8	19,7±3,9	29,0±8,8
3	Soiva 1955 r. [6]	8,2 (3,0—14,7)	18,2 (13,3—23,3)	16,8 (12,4—21)
4	Niedermeier 1956 [5]	11,2±5,5	23,7±5,4	—
5	Handbook of Biological Data 1956 [7]	17,4 (8,7—23,9)	14,1 (12,8—16,1)	15,5 (8,4—17,7)
6	Obecna praca	8,8±3,3	20,3±3,9	21,3±4,1

Prace wymienione pod: L. p. 1 i 3 podają średnie oraz w nawiasach skrajne wartości; pod l. p. 5 średnie wartości, zaś w nawiasach zakres 95%; pod l. p. 2, 4 i 6 średnie wartości wraz z dyspersją

gają bardzo znacznie od wartości podanych pod l.p. 2, jak również od zestawień z Handbook of Biological Data z 1956 r. [7]. Sprzeczne wyniki, podane w tablicy 5 pod l.p. 2, tłumaczy to, że ślinę zbierano żując parafinę, a ślina pobierana przez żucie parafiny ma znacznie większe stężenie sodu, a nieco mniejsze potasu od śliny pobieranej bez żadnych bodźców [5]. Natomiast brak wytłumaczenia dla danych pod l.p. 5.

Oznaczenie wartości średniej, a w większej jeszcze mierze stwierdzenie nieznacznej zmienności indywidualnej składu śliny, a także wykazanie, że skład śliny nie ulega zmianie przy porównywaniu dwóch okresów półgodziny następujących po sobie, stwarza warunki umożliwiające badanie wpływu rozmaitych czynników na skład jonowy śliny.

### STRESZCZENIE

1. W ślinie mieszanej człowieka pobieranej w przeciągu 30 minut bez żadnych bodźców, średnie stężenie azotu całkowitego wynosi:  $42,6 \pm 12,0$  mg %; aktywność amylazy  $11,1 \pm 6,1$  wyrażona w jednostkach używanych przez Willstättera w 100 ml śliny; średnie stężenie sodu  $8,8 \pm 3,3$  mE/L; potasu  $20,3 \pm 3,9$  mE/L; chlorków  $21,3 \pm 4,1$  mE/L; oraz ilość wydzielanej śliny  $14,0 \pm 6,4$  ml. Wartości te oznaczono w 32 próbkach śliny pochodzących od 22 osób.

2. Ślina pobierana z ograniczeniem udziału gruczołów przyusznych zawiera mniejsze stężenie azotu całkowitego, mniejszą aktywność amylazy; zaznacza się tendencja zmniejszania stężenia jonów potasowych, natomiast stężenie jonów sodowych i chlorkowych nie ulega zmianie.

3. Skład jonowy śliny jest dla poszczególnych jednostek wielkością mało zmienną. Wielki rozrzut wartości jest w dużej mierze uwarunkowany różnicami między poszczególnymi jednostkami.

### LITERATURA

- [1] Bertho A., Grassmann W., *Biochemisches Praktikum*, Walter de Gruyter, Berlin-Leipzig, 1936 str. 128.
- [2] Dreisen S., Niedermeier W., Reed A. I. and Spies T., *J. Dent. Res.* **31**, 271, 1952.
- [3] Hilgers A., *Z. physiol. Chem.* **294**, 61, 1954.
- [4] King E. J., Bain D. S., *Biochem. J.* **48**, 51, 1951.
- [5] Niedermeier W., Dreisen S., Stone E., Spies T., *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **9**, 426, 1956.
- [6] Soiva K., Parviainen S., *Acta Endocrinologica* **20**, 161, 1955.
- [7] Spector W. S., ed. *Handbook of Biological Data*, W. B. Saunders Comp., Philadelphia, London, 1956 str. 60 poz. 50.
- [8] Thaysen I. H., Thorn N. A., Schwartz J. L., *Am. J. Physiol.* **178**, 155, 1954.

- [9] Warming-Larsen A., Hamburger Ch., Spechler M., *Acta Endocrinologica* **11**, 400, 1952.
- [10] White A. G., Entmacher P. S., Rubin G., Leiter L., *J. Clin. Inv.* **34**, 246, 1956.

#### THE CONTENT OF SODIUM AND POTASSIUM IN HUMAN SALIVA

##### Summary

1. Analysis of mixed saliva of man collected without stimuli over 30 minutes produced the following results: average concentration of total nitrogen:  $42.6 \pm 12.0$  mg. per cent; activity of amylase expressed in units used by Willstätter in 100 ml. of saliva:  $11.1 \pm 6.1$ ; average concentration of sodium:  $8.8 \pm 3.3$  mE/L; potassium:  $20.3 \pm 3.9$  mE/L; chlorides:  $21.3 \pm 4.1$  mE/L; total amount of saliva secreted:  $14.0 \pm 6.4$  ml. The values were obtained from 32 samples of saliva collected from 22 persons.

2. Saliva collected under conditions of restricted participation of parotid glands showed reduced concentration of total nitrogen, lesser activity of amylase, and a tendency towards reduced potassium ion concentration, whereas the concentrations of sodium and chloride ions remained unchanged.

3. Ionic composition of the saliva varies little as between particular individuals. Notable scattering of the values is largely due to differences between particular individuals.

Otrzymano 9.11.57 r.

S. ANGIELSKI

**AMINOKWASY MOCZU BLIŹNIĄT JEDNO- i DWUJAJOWYCH***Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Gdańsku**Kierownik: prof. dr Wł. Mozolowski*

Zagadnienia związane z ustaleniem norm i wpływu pewnych czynników fizjologicznych na zmienność biologiczną płynów ustrojowych u ludzi zdrowych były przedmiotem prac naszego Zakładu [3,17,18,19]. Pojęcie normy, a ściślej „normalnej zmienności” stosujemy do wszystkich płynów biologicznych, cechujących się pewną stałością składu. Natomiast w odniesieniu do moczu zmienność wszystkich niemal składników jest cechą normalną, a stałość stanem patologicznym. Wśród związków występujących w moczu w ilościach stałych dla danego osobnika wymienia się kreatyninę; w tej grupie związków należałoby rozważyć zachowanie się niektórych aminokwasów. Pierwszą trudnością w ilościowej ocenie wydalania aminokwasów moczu jest znalezienie układu, w stosunku do którego wyraża się te wielkości. Takimi układami oprócz bezwzględnej ilości wydalonej w ciągu doby mogą być: a) ilość moczu, b) zawartość azotu całkowitego, c) zawartość kreatyniny, d) stosunek do wagi i powierzchni ciała [11]. To, że wyniki tego rodzaju badań wyraża się w niejednolity sposób, sprawia duże trudności w interpretacji liczbowej normalnych wartości, a niekiedy uniemożliwia porównanie wyników takich prac, w których są podane różne układy odniesienia. Jednym z najczęściej stosowanych sposobów wyrażania jest podawanie zawartości aminokwasów w dobowej ilości moczu. W wielu pracach zwłaszcza wykonywanych z genetycznego punktu widzenia odnosi się ilość wydalonych aminokwasów do zawartości kreatyniny. Takie ujęcie nasuwa wątpliwości, jak to przedstawił już Dent [7]. Szczególnie ma to miejsce wtedy, gdy oznaczenia dokonuje się jedynie w próbce moczu, a nie w dobowej mieszanej ilości. Ponadto, stosowane metody ilościowego oznaczania aminokwasów muszą podlegać krytycznej ocenie otrzymanych wyników. Że w tej dziedzinie mają miejsce trudne do pogodzenia sprzeczności, świadczy choćby zestawienie podane przez Braunsteina i Wilenkinę, dotyczące wydalania histydy w mo-

czu kobiet w ciąży [4]. Nie brak jednak faktów, które zdają się mieć dostateczne podstawy doświadczalne: na przykład, wydalanie 1-metylohistydyny związane jest z dietą mięsną [6,10,11,13], zawartość kwasu  $\beta$ -aminoizomasłowego moczu ma natomiast podlegać kontroli genetycznej [5,12,13]. Co do innych aminokwasów zdania są podzielone; według badań Berry i współpracowników oraz Gartlera i współpracowników [2, 12] wydalanie niektórych tylko aminokwasów ma być uwarunkowane genetycznie; dotyczy to kwasu  $\beta$ -aminoizomasłowego, treoniny, lizyny, tyrozyny, inne natomiast aminokwasy, badane przez tych autorów, mają nie podlegać takiej kontroli. Wymienieni autorzy posługiwali się w swoich badaniach porównaniem zawartości aminokwasów moczu bliźniąt jedno- i dwujajowych. Badane osoby były dorosłe (18—54 lat), zatem ich „indywidualność biochemiczna” zależała w mniejszym stopniu od danych genetycznych, niż miałyby to miejsce u dzieci bliźniaczych, które z natury rzeczy podlegały krócej działaniu warunków otoczenia. Tym można by uzasadnić celowość podjętych w tej pracy badań, a mianowicie porównania zawartości aminokwasów w dobowych mieszanych moczach bliźniąt jedno- i dwujajowych w wieku od 2,5 do 5 lat. W tego rodzaju badaniach można by łatwiej wykazać zależność genetyczną wydalania poszczególnych aminokwasów.

## METODY

Przedmiotem badań były: trzy pary bliźniąt jednojajowych i pięć par bliźniąt dwujajowych w wieku od 2,5 do 5 lat. Dzieci były zdrowe; pozostawały pod opieką domową. Do badania brano tylko te dzieci, których rodzice chętnie godzili się na badania i podejmowali się trudu starannego zbierania moczu. Badanie przerywano w razie choroby dziecka (miało to miejsce jeden raz) i danych tych nie podaje się w tej pracy. Również odrzucono bez badania mocze, w których matka podawała w wątpliwą obronę całkowitego moczu dobowego. Przynależność do typu jedno- czy dwujajowego oparto na: a) uderzającym podobieństwie lub jego braku, b) płci obydwu bliźniąt, c) grupach krwi, d) liniach papilarnych, e) cechach szczególnych. W związku z tym, że niektórzy rodzice nie zgodzili się na pobranie krwi od dzieci dla zbadania cech grupowych, w doborze bliźniąt dwujajowych kierowano się zdecydowaną różnicą w wyglądzie zewnętrznym oraz różnicą w płci. W tablicy 1 podano cechy, na podstawie których zaliczano bliźnięta do jednojajowych.

Dobową ilość moczu zbierano dwukrotnie w dowolnym odstępie czasu od każdej pary bliźniąt jednocześnie. U jednej pary bliźniąt jednojajowych i u jednej pary bliźniąt dwujajowych zbierano dobowe ilości moczu czterokrotnie, a to w celu zbadania ewentualnej zmienności wydalania amino-

Tablica 1

Zestawienie cech, na podstawie których stwierdzono przynależność do bliźniąt jednojajowych

		Płeć	Grupy krwi	Typy linii papilarnych na dziesięciu palcach										Suma indeksów 10 palców
				ręka prawa					ręka lewa					
				Numer kolejny palca										
				I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	
I	A. Z.	Chłopak	AB, MN, Rh +	E	E	O	O	O	J	J	O	O	J	217
	J. Z.	Chłopak	AB, MN, Rh +	E	E	O	O	O	J	J	O	O	J	216
II	J. L.	Dziewczyna	B, MN, Rh —	E	E	E	O	E	U	J	J	J	J	74
	G. L.	Dziewczyna	B, MN, Rh —	E	E	E	O	E	U	J	J	J	J	80
III	G. Zb.	Chłopak	nie oznaczano	E	E	E	E	E	J	O	J	J	J	145
	K. Zb.	Chłopak	nie oznaczano	E	E	E	E	E	J	O	E	O	J	161

Typy linii papilarnych oraz obliczenie sumy indeksów podano według klasyfikacji przyjętej w badaniach daktyloskopijnych w Polsce [14]

Tablica 2

Porównanie przydatności Dowex 50 i Zeo Karb 215 dla odsolenia roztworu aminokwasów. Roztwory aminokwasów zawierały przed przepuszczeniem przez kolumnę 1,5 g NaCl oraz 0,5 g KCl w 100 ml roztworu

	Dowex 50			Zeo Karb 215		
	mg na 100 ml roztworu		Odzyskano w %	mg na 100 ml roztworu		Odzyskano w %
	Przed odsoleniem	Po odsoleniu		Przed odsoleniem	Po odsoleniu	
Histydyny HCl	72	72	100	—	—	—
Lizyny HCl	36	36	100	—	—	—
Alanina	30	31,5	105	60	53	88
Tyrozyna	60	60	100	60	40	67
Walina	30	28,5	95	60	53	88
Leucyna	30	29	98	60	55	92
Glutamina	30	24	80	—	—	—
Glicyna	30	29	98	60	51	85
Seryna	30	28,5	95	60	50	83
Treonina	60	57	95	60	50	83

kwasów w czasie. Aminokwasy oznaczano w mieszanej dobowej (od godziny 8<sup>00</sup> do 8<sup>00</sup>) ilości moczu; dla konserwacji dodawano kryształek tymolu. Analizę wykonywano w dniu zakończenia zbierania moczu. Azot całkowity oznaczano metodą Kjeldahla (spalając z  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i destylując do kwasu borowego). Azot  $\alpha$ -aminowy metodą Trolla i Cannoniego [23], po uprzednim usunięciu amoniaku przez zalkalizowanie moczu i wyparowanie w próżni nad stężonym kwasem siarkowym; rozpuszczoną w wodzie suchą pozostałość zakwaszono do pH 5 ÷ 6 na uniwersalny papierek indykatorowy. Prócz tego oznaczano azot  $\alpha$ -aminowy w próbce moczu odsolonego. W przebiegu odsolenia usuwa się częściowo i inne związki, które utrudniałyby analizę chromatograficzną; między innymi mocznik, kreatyninę, kwas moczowy, a także związki dające barwny odczyn z ninhydryną, a nie będące wolnymi aminokwasami. Dla odsolenia moczu użyto Dowex 50 o wielkości ziarn 100-200 oczek (mesh). Przedtem próbowano do tego celu zastosować ekstrakcję różnymi stężeniami etanolu zakwaszonego kwasem solnym, oraz roztworem fenolu w butanolu w stosunku 3:2 [25]. Próbowano stosować Zeo Karb 215 [20, 21]. Wyniki zadowalające otrzymano jednak tylko z Dowex 50. Przykładem są dane tablicy 2.

Dla odsolenia dawano na kolumnę (wymiary 5 cm × 1 cm) po 5 ml moczu, po upływie 30 min. przepłukiwano 40 mililitrami wody podwójnie destylowanej, następnie eluowano 10 mililitrami 6N  $\text{NH}_4\text{OH}$  (w czasie 30 min.). Regenerowano kolumnę 40 ml 2N HCl i przemywano 50 ml wody. Uzyskany eluat amoniakalny odparowywano w 40 do 50°; suchą pozostałość rozpuszczano w 1 ml zakwaszonego izopropanolu (4 ml HCl 6N w 1 l izopropanolu). 0,4 ml uzyskanego roztworu uwalniano od amoniaku, jak podano przy oznaczaniu azotu  $\alpha$ -aminowego w moczu nieodsolonym. Pozostała ilość odsolonego i zagęszczonego eluatu poddano analizie chromatograficznej. Stosowano rozdział jednokierunkowy, wstępujący na paskach bibuły Whatman nr 1 o szerokości 3 cm w układzie n-butanol: kwas octowy: woda = 4 : 1 : 5, rozwijano trzykrotnie w temperaturze 22—25° przez 12 godz. każdorazowo. Nakrapiano paski po 5, 10, 20, 40  $\mu\text{l}$  roztworu (dwukrotnie każdą próbkę); odpowiadało to w przybliżeniu od 2 do 16  $\mu\text{g}$  azotu  $\alpha$ -aminowego w każdej próbce. W układzie tym oznaczano lizynę, histydynę, glutaminę, alaninę, tyrozynę, metioninę z waliną, fenyloalaninę oraz leucynę z izoleucyną. Inne związki, które dają barwną reakcję z ninhydryną, wędrują w użytych układach wolniej od wszystkich badanych w tej pracy aminokwasów. O tym, że związki te zdają się być peptydami, świadczy to, że po kwaśnej hydrolizie znikają odpowiadające im plamy. Dla rozdzielenia kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, seryny, glicyny i treoniny stosowano układ fenol : woda = 75 : 25 na bibule Whatman nr 1; przeprowadzono chromatografię zstępującą, jednokierunkową w ciągu 20 godz. W oznaczeniu ilościowym postępowano według R. E. Kay'a



i współpracowników [16] z tą różnicą, że kolorymetrowano w aparacie Pufricha w mikrokiwetach długości 5 cm przy użyciu filtra  $S_{57}$ . Chromatogramy układu fenolu suszono przez 48 godzin w temperaturze pokojowej w strumieniu powietrza. Sprawdzano tożsamość każdej plamy a) przez jednoczesne rozwijanie standardu aminokwasowego, b) przez dodawanie odpowiedniej ilości badanego aminokwasu do próbki badanego moczu; robiono to każdorazowo dla kilku aminokwasów w każdym układzie, c) przez reakcje właściwe dla danego aminokwasu (dla histydyny oraz argininy). Dla moczu każdej pary bliźniąt wykonywano ponadto chromatogram dwukierunkowy w układach: 1) fenol : woda w stosunku objętościowym 75 : 25 i 2) n-butanol : kwas octowy : woda 4 : 1 : 5 (dwukrotnie rozwijany). Celem tego rozdziału było także uwidocznienie plam, które przy

T a b l i c a 3

*Odsetki odzyskanych aminokwasów nakrapianych do prób odsolonego moczu*

		Zawartość w próbce mocz w $\mu\text{g}$	Dodano w $\mu\text{g}$	Odzyskano w $\mu\text{g}$	Odzyskano w %
1	Histydyna	5,1	5,0	9,8	98
2	Lizyna	1,6	3,0	4,4	96
3	Glutamina	3,5	3,0	6,8	105
4	Alanina	2,1	3,0	5,2	102
5	Tyrozyna	2,3	5,0	7,0	97
6	Fenylalanina	4,1	5,0	8,6	94
7	Leucyna	2,3	3,0	4,8	91
8	Kwas glutaminowy	2,4	3,0	5,4	100
9	Seryna	2,6	3,0	5,7	98
10	Glicyna	3,5	3,0	5,8	89
11	Treonina	1,9	5,0	6,7	97
12	Kwas asparaginowy	0	5,0	4,9	98

Chromatografowano: 1—7 w układzie butanol : kwas octowy : woda w stosunku 4 : 1 : 5, a 8—12 w układzie fenol : woda w stosunku 75 : 25. Przebieg ilościowego postępowania jak w tekście

rozwijaniu w układzie jednokierunkowym mogły odpowiadać dwóm lub większej liczbie aminokwasów. Chodziło tu szczególnie w układzie butanol : kwas octowy : woda, o histydynę wędrującą razem z metylohistydyną, a w układzie fenol : woda o glicynę z asparaginą. Ponieważ te aminokwasy, których nie oznaczano (metylohistydyna, względnie asparagina), wydają się w ilości mniejszej od tych, które oznaczano (histydyna, względnie glicyna), nakropienie odpowiednio zmniejszonej ilości moczu pozwoliło w dużym stopniu na zmniejszenie ich wpływu w ilościowej ocenie. Dokładność takiego ilościowego oznaczania jest w tych warunkach obciążona błędem 10 do 15%.

Należy zaznaczyć, że część glutaminy po przejściu przez kolumnę z Dowex 50 rozkłada się na kwas glutaminowy, ale dla tej samej długości kolumny i jednakowego czasu odsalania straty te wynoszą stale około 20%; uwzględniono to przy podawaniu wyników. W używanych układach walina wędruje razem z metioniną; zabarwienia, które dają te aminokwasy z ninhydriną różnią się natężeniem od siebie i dlatego wyniki podane dla waliny są obciążone stosunkowo większym błędem. We wszystkich badanych moczach stwierdzono plamę odpowiadającą kwasowi asparaginowemu, ale małe natężenie barwy nie pozwalało na ilościowe oznaczenie.

Używano następujących substancji chemicznych: fenol, destylowany dwukrotnie według [8], n-butanol f-my Estron, kwas dl-asparaginowy, l-leucynę, lizyny jednochlorowodorek f-my Schuchard, alaninę i glicynę f-my Merck, dl-treoninę (Chemapol Czechosłowacja), walinę-ZSRR, histydyny jednochlorowodorek f-my Fluk, tyrozynę i fenyloalaninę niewiadomego pochodzenia (przepakowano w Gliwicach), kwas glutaminowy (przepakowano w Łodzi), ninhydrinę B.D.H.-Londyn; glutaminę otrzymano od prof. dr J. Opieńskiej-Blauth.

#### WYNIKI DOŚWIADCZEŃ

Wyniki badań ośmiu par bliźniąt (trzech par jednojajowych i pięciu dwujajowych) przedstawiono w czterech tablicach. Tablica 4 podaje dane dla bliźniąt jednojajowych: G. i J. L. (dziewczynki, w wieku lat 2,5) oraz G. i K. Zb. (chłopcy, w wieku lat 3,5). Tablica 5 dotyczy bliźniąt dwujajowych: M. (dziewczynka) i J. (chłopak) K. 2,5 lat; J i D. R. (dziewczynki 5 lat); J. i K. N. (chłopcy w wieku 3,5 lat); K. i W. R. (chłopcy w wieku 2,5 lat). Dane tych dwóch tablic pozwalają na porównanie różnic między rodzeństwem bliźniaczym oraz różnic między poszczególnymi parami. Natomiast dla zbadania zmienności zachodzącej u tych samych osobników w różnych dniach, przeprowadzono oznaczenia zawarte w tablicy 6 i 7 (tablica 6 dotyczy jednej pary bliźniąt jednojajowych A. i J. Z. (chłopcy w wieku 2,5 lat), badanych czterokrotnie w różnych odstępach czasu w ciągu miesiąca. Tablica 7 podaje analogiczne dane dla jednej pary bliźniąt dwujajowych: M. i A. A. (dziewczynki w wieku 2,5 lat). Dane liczbowe tablic dotyczą: 1) ilości moczu wydalonego na dobę, 2) zawartości azotu całkowitego, 3) azotu  $\alpha$ -aminowego przed i po odsoleniu oraz 4) ilości dwunastu aminokwasów wydalonych. W ostatniej pozycji tablicy podano azot  $\alpha$ -aminowy, obliczony z zawartości poszczególnych aminokwasów. Ilość dobową moczu bliźniąt jednojajowych zdaje się być bardziej do siebie podobna niż u dwujajowych; jednak dane liczbowe tablic 4 i 5 nie są dostatecznie przekonujące; dokładniejszą odpowiedź znajdujemy w tablicach 6 i 7.

T a b l i c a 4  
Zawartość wolnych aminokwasów dobowego moczu jednojajowych bliźniąt (w miligramach)

Data	Ilość dobowa mocz w ml	Azot całkowity w g/24 godz	Azot α-aminowy bez odsolenia w mg/24 godz.	Azot α-aminowy po odsoleniu w mg/24 godz	His.	Gly	Glu- -NH <sub>2</sub>	Ser	Ala	Tyr	Thr	Lys	Phe	Glu	Leu	Val	Obliczony azot α-aminowy badanych aminokwasów
G. L. lat 2,5	470	4.70	51	42	93	48	55	19	20	22	14	28	5	6	4	6	37
J. L. "	420	4.26	52	44	96	52	51	19	22	22	17	23	7	8	4	5	38
G. L. "	380	3.10	57	49	92	56	47	25	22	23	18	23	7	10	4	5	39
J. L. "	450	3.25	54	46	93	62	56	24	27	20	16	26	6	9	4	6	41
G. Zb. lat 3,5	360	4.20	69	39	105	30	46	24	16	18	12	16	9	5	4	4	31
K. Zb. "	350	3.96	67	37	95	33	54	23	19	19	12	16	10	4	4	5	32
G. Zb. "	260	3.86	67	36	76	30	32	19	14	19	11	23	10	5	3	3	27
K. Zb. "	250	4.05	75	32	68	32	29	17	13	16	11	21	10	6	3	3	26

T a b l i c a 5  
Zawartość wolnych aminokwasów dobowego moczu dwunajowych bliźniat (w miligramach)

	Data	Ilość dobowa mocz w ml	Azot całkowity w g/24 godz	Azot α-aminowy bez odsolenia w mg/24 godz	Azot α-aminowy po odsoleniu w mg/24 godz	His.	Gly	Glu- -NH <sub>2</sub>	Ser	Ala	Tyr	Thr	Lys	Phe	Glu	Leu	Val	Obliczony azot α-aminowy badanych aminokwasów
M. K. lat 2,5	21.VI	350	3.14	54	50	60	45	—	27	20	18	20	8	8	2	4	4	27
K. J. "	21.VI	450	3.64	49	45	56	60	—	25	12	16	26	17	7	3	3	0	29
M. K. "	30.VI	500	3.96	61	44	83	50	—	36	16	24	—	12	6	4	5	5	30
K. J. "	30.VI	350	2.86	49	40	52	64	—	10	12	16	10	11	4	8	3	0	26
J. R. lat 5	16.VII	320	2.66	52	45	68	61	—	32	23	16	19	13	12	3	4	6	34
D. R. "	16.VII	350	2.43	40	36	60	70	—	3	17	12	14	0	9	16	5	2	28
J. R. "	19.VII	580	4.45	65	59	102	86	—	43	29	23	22	23	14	5	3	6	45
D. R. "	19.VII	530	4.00	64	58	75	81	—	47	20	20	20	0	12	8	4	3	40
J. N. lat 3,5	28.VII	300	3.88	63	53	114	42	64	72	20	24	10	28	10	6	2	4	46
K. N. "	28.VII	500	5.30	71	55	145	45	51	32	17	48	31	27	13	22	5	7	48
J. N. "	6.VIII	710	2.90	44	37	54	42	53	24	18	22	11	24	7	4	3	4	31
K. N. "	6.VIII	630	4.00	50	41	78	41	28	13	14	32	18	20	10	11	4	6	30
K. R. lat 2,5	6.VI	450	4.21	53	—	66	60	—	22	9	84	14	—	5	4	2	4	31
W. R. "	6.VI	430	3.42	40	—	69	70	—	12	11	45	10	—	3	6	4	3	29
K. R. "	18.VII	450	3.54	41	37	59	68	—	20	12	69	15	9	6	5	0	2	32
W. R. "	18.VII	330	3.90	46	40	50	72	—	10	14	50	9	14	5	4	4	3	30

Tablica 6

Zawartość wolnych aminokwasów dobowego moczu jednojajowych bliźniąt A.Z. i J.Z. w wieku 2,5 lat

	24.VIII		27.VIII		6.VIII		19.VIII	
	A. Z.	J. Z.	A. Z.	J. Z.	A. Z.	J. Z.	A. Z.	J. Z.
Ilość dobową moczu w ml	280	290	320	330	700	660	480	450
N-całkowity w g/24 godz.	2,86	2,46	3,38	3,06	5,90	4,50	4,95	4,30
N- $\alpha$ -aminowy bez odsolenia w mg/24 godz.	44	45	40	42	88	83	67	64
N- $\alpha$ -aminowy po odsoleniu w mg/24 godz.	39	40	31	32	80	75	56	54
	mg aminokwasów dobowego moczu							
Histydyna	105	99	73	66	168	161	130	119
Glicyna	34	35	64	66	53	64	50	45
Glutamina	34	42	21	22	98	105	80	67
Seryna	28	25	0	0	39	40	42	36
Alanina	18	17	10	10	33	33	13	13
Tyrozyna	31	28	27	26	61	57	58	63
Treonina	14	16	0	0	67	61	13	10
Lizyna	22	23	8	8	57	52	63	61
Feniloalanina	8	7	4	3	11	13	11	9
Kw. glutaminowy	6	6	10	6	7	8	7	8
Leucyna + izoleucyna	3	4	2	2	6	6	5	4
Walina + metionina	4	5	3	3	8	9	5	6
Obliczony azot $\alpha$ -aminowy aminokwasów badanych w mg	34	34	27	26	67	67	51	47

Tablica 7

Zawartość wolnych aminokwasów dobowego moczu dwujajowych bliźniąt A.A. i A.M. w wieku 2,5 lat

	10.VIII		18.VIII		19.VIII		20.VIII	
	A. A.	M. A.	A. A.	M. A.	A. A.	M. A.	A. A.	M. A.
Ilość dobową moczu w ml	940	810	730	520	640	760	670	1050
Azot całkowity w g/24 godz.	3.72	3.64	6.60	3.90	5.00	5.28	—	—
Azot $\alpha$ -aminowy bez odso- lenia w mg/24 godz.	61	93	93	67	51	64	53	65
Azot $\alpha$ -aminowy po odso- leniu w mg/24 godz.	55	76	76	59	46	60	46	60
	mg aminokwasów dobowego moczu							
Histydyna	144	168	210	120	105	161	89	130
Glicyna	64	106	52	77	39	64	54	110
Glutamina	69	60	80	66	51	61	72	55
Seryna	3	22	47	38	33	38	26	12
Alanina	49	41	48	44	27	19	36	13
Tyrozyna	13	10	31	22	18	16	19	12
Treonina	8	16	26	41	9	14	13	21
Lizyna	15	15	25	23	10	21	19	21
Fenylalanina	4	5	13	10	9	6	4	10
Kw. glutaminowy	6	4	5	6	6	—	8	10
Leucyna	5	4	6	4	3	3	3	—
Walina	5	3	6	5	3	3	3	4
Obliczony azot $\alpha$ -aminowy aminokwasów badanych w mg	45	57	61	55	36	46	41	49

Zawartość azotu całkowitego jest u wszystkich niemal bliźniąt bardzo podobna, co znajduje swoje uzasadnienie w tym, że żyją one w tych samych warunkach. Jedynie w parze J. i K. N. występują duże różnice.

Azot  $\alpha$ -aminowy stanowi 1% do 2% azotu całkowitego; jego zawartość w obydwu typach bliźniąt jest wewnątrz par do siebie bardzo podobna. Azot  $\alpha$ -aminowy po odsoleniu przedstawia się rozmaicie u różnych par, wykazując duże podobieństwo wewnątrz par obydwu typów. Różnice między parami polegają (jak to widać najlepiej z porównania danych tablicy 4) na mniejszym lub większym ubytku azotu aminowego w przebiegu odsolenia.

Materiał liczbowy zawarty w tablicach pozwala na scharakteryzowanie wydalania aminokwasów moczu zdrowych dzieci. Dane piśmiennictwa ujmujące dobowe wydalanie poszczególnych aminokwasów u dzieci w tym wieku są stosunkowo skąpe [15]. Na ogół można stwierdzić (choć mają miejsce i wyraźne odchylenia), że w największej ilości wydalają się histydyna, na drugim miejscu stoją ilościowo glicyna i glutamina, na trzecim znajduje się seryna, alanina, tyrozyna i treonina, a pozostałe aminokwasy wydalają się w ilości jeszcze mniejszej. Taki obraz wydalania aminokwasów różni się istotnie od tego, co stwierdzono (Dustin, Wolf, Norman i Fowler) dla dzieci w pierwszych sześciu miesiącach życia, a jest raczej zbliżony do tego, co w moczu dorosłych znajdował Stein [22]. Dokładniejsze rozważenie danych liczbowych pozwala jednak na stwierdzenie, że poszczególne jednostki mają pewien właściwy dla nich typ wydalania aminokwasów. I tak dane dla J. K. (Tablica 5) stwierdzają brak waliny, większą lub równą ilość glicyny w porównaniu z histydyną, podczas gdy jego siostra M. K. wydalala pewne ilości waliny, a histydyny wyraźnie więcej niż glicyny. Para K. i W. R. cechuje się dużą ilością wydalanej tyrozyny, z tym, że mocz jednego z rodzeństwa (K. R.) zawiera wyraźnie więcej tego aminokwasu aniżeli mocz drugiego (W. R.). Para J. i K. N. wydalala więcej lizyny niż alaniny odmiennie od wszystkich innych.

Dla właściwej oceny wartości podanych wyników jest istotne zdanie sobie sprawy, jaką część azotu  $\alpha$ -aminowego po odsoleniu stanowi azot  $\alpha$ -aminowy badanych aminokwasów. Dlatego podano we wszystkich tablicach pozycję „obliczony azot  $\alpha$ -aminowy badanych aminokwasów”. Wartości tej pozycji stwierdzają, że w postępowaniu doświadczalnym stosowanym w tej pracy nie uwidoczniła się, w postaci jakich aminokwasów znajduje się 10 do 30% azotu  $\alpha$ -aminowego; w tablicy 5 ten brak jest spowodowany w dużej mierze tym, że nie oznaczono glutaminy, we wszystkich innych dołączałby się brak oznaczania asparaginy, argininy, metylohistydyny, kwasu  $\beta$ -aminoizomasłowego. Uwzględnienie brakujących aminokwasów dałoby obraz pełniejszy, ale dla stwierdzenia typów jednostkowych dane przedstawionych tablic wydają się wystarczające.

Dane tablic 4 i 5 stwierdzają, że podobieństwo dotyczące wydalania aminokwasów moczu bliźniąt jednojajowych jest szczególnie wyraźne. Różnice zawartości poszczególnych aminokwasów tych bliźniąt nie przekraczają wielkości błędu stosowanej metody; natomiast u bliźniąt dwujajowych są wyraźnie większe od takiego błędu. Ten wniosek zdaje się mieć istotne znaczenie dla genetycznej oceny tych zjawisk.

Dla stwierdzenia, jakiej zmienności ulega wydalanie aminokwasów moczu w różnych dniach, przeprowadzono oznaczenia zawarte w tablicy 6 i 7. Tablica 6 podaje wyniki dla jednej pary bliźniąt jednojajowych w ciągu czterech różnych dni; tablica 7 analogiczne dane dla bliźniąt dwujajowych. Dane tych tablic nie pozwalają na znalezienie łączności między ilością moczu, a zawartością azotu  $\alpha$ -aminowego. Szczególną uwagę w tych tablicach zwraca zmienność wydalania w różnych dniach poszczególnych aminokwasów u tej samej jednostki, np. około trzykrotne wahania histydyny, brak seryny i treoniny w niektórych dniach, przy znacznej zawartości w innych dniach, około dwukrotne wahania w zawartości glicyny. Podobieństwo sposobu reagowania na warunki zewnętrzne występuje wyraźnie u bliźniąt jednojajowych (Tabl. 6), np. w tym, że brak seryny i treoniny ma miejsce w tym samym dniu. Dane dla tych samych aminokwasów u bliźniąt dwujajowych (Tabl. 7) wykazują wyraźną odmienną zachowania się. W ocenie wyników liczbowych tych tablic można stwierdzić, że podobieństwo występujące u bliźniąt jednojajowych każe właściwie ocenić wpływ genetyczny, natomiast różnice stwierdzane w różnych dniach, a więc i odmiennych zewnętrznych warunkach, wskazują na istotną rolę środowiska.

#### DYSKUSJA

Wydalaniem aminokwasów moczu bliźniąt zajmowano się w Instytucie Badań Zmienności Człowieka w Columbia University [2, 12]. Z wynikami tych badań należy porównać dane tej pracy. Porównanie to nie jest łatwe, nie tylko dlatego, że wiek badanych jest różny w obydwu seriach prac, lecz także i to, że autorzy amerykańscy odnoszą uzyskane wyniki do ilości kreatyniny wydalanej w danej próbce moczu, a w pracy obecnej odnosi się wszystkie ilości do dobowego mieszanego moczu. Użycie kreatyniny jako układu odniesienia wydalania aminokwasów w moczu dzieci kryje w sobie większe możliwości błędów, niż analiza dobowego mieszanego moczu, która powinna dać ściślejsze wyniki. O ile idzie o podobieństwo wewnątrz par bliźniąt jednojajowych, to wyniki tej pracy wykazują większą zgodność, niż to ma miejsce u autorów amerykańskich. Wyraźnie to wystąpi przy porównaniu bliźniąt tej samej pary.

Liczby porównawcze uzyskano, jak to podano w pracy H. K. Berry [1], przez obliczenie wariancji  $\sigma_i^2$ . Wartość  $\sigma_i^2$  równa się liczbowo różnicy war-



tości dla poszczególnych bliźniaków tej samej pary, podniesionej do kwadratu i podzielonej przez dwa.

Zmienność wydalania aminokwasów przez te same osobniki w różnych dniach jest w badaniach tej pracy znacznie większa niż stwierdzają to badacze amerykańscy. Uzgodnienie tych wyników dotyczących bardzo róż-

Tablica 8.

Wariancje wydalania aminokwasów bliźniąt tej samej pary w oparciu o tablice 6—7

	W a r i a n c j e $\sigma_2^2$		Stosunek $\sigma_2^2$ dwujajowych do $\sigma_2^2$ jedno- jajowych	Analogiczny stosunek $\sigma_2^2$ dwu- jajowych do $\sigma_2^2$ jednojajowych wg prac. [2,12]
	u bliźniąt jedno- jajowych	u bliźniąt dwo- jajowych		
Histydyna	27,0	725	27,0	—
Glicyna	14,0	285	20,0	3,08
Glutamina	29,0	128	4,4	1,40
Seryna	3,3	173	52,0	—
Alanina	2,5	23	9,0	3,31
Tyrozyna	4,4	112	25,5	3,2
Treonina	3,4	45	13,0	21,65
Lizyna	4,2	43	10,0	4,6
Feniloalanina	1,0	4	4,0	—
Kwas glutaminowy	1,6	14	9,0	—
Leucyna	0,13	1,9	7,0	1,3
Walina	0,38	3,6	9,5	7,4

nego materiału biologicznego, ponadto wyrażonego w innym układzie odniesienia nie byłoby wdzięcznym zadaniem. Te sprzeczności nie są jednak istotne, jeżeli wynik ogólny ujmie się tak, jak robią to autorzy amerykańscy [12] (str. 118 i 119) w słowach „to, co się dziedziczy, to nie jest ściśle określona ilość wydalanej substancji, ale taki sposób reagowania na warunki zewnętrzne, że w danych warunkach ma miejsce wydalanie pewnych określonych ilości”.

Kierownikowi Zakładu prof. dr W. Mozołowskiemu dziękuję za wybór tematu i życzliwe ustosunkowanie się w czasie wykonywania i pisanja tej pracy.

W dziedzinę daktyloskopii wprowadzili mnie i zawsze udzielali życzliwej pomocy w ciągu przeprowadzanych badań: ppor. A. Swirniak, chor. Michalina Oźga i chor. Stefan Oźga, którym składam za to podziękowanie.

Pragnę także podziękować: prof. dr T. Korzybskiemu za użyczenie Dowex 50, dr B. Michejdzinie za oznaczenie grup krwi i prof. J. Opieńskie-Blauth za użyczenie glutaminy.

#### STRESZCZENIE

1. Zbadano dobowy mieszany mocz ośmiu par bliźniąt (trzech par jednojajowych i pięciu par dwujajowych), dzieci w wieku od 2,5 do 5 lat. Oznaczano ilość wydalonego moczu, azot całkowity, azot  $\alpha$ -aminowy przed i po odsoleniu oraz dwanaście aminokwasów. Aminokwasy oznaczano chromatograficznie na bibule.

2. Podobieństwo wydalania aminokwasów moczu jest u bliźniąt jednojajowych wyraźnie większe niż to, jakie spotyka się u bliźniąt dwujajowych.

3. Wydalanie aminokwasów moczu jest zmienne w czasie, to jest w różnych dniach. Jednak ta zmienność dotyczy obydwu jednostek tej samej pary bliźniąt jednojajowych w jednakowy sposób, co wyraża się zgodnością aminokwasowego składu moczu w tym samym dniu. U bliźniąt dwujajowych zgodność ta jest wyraźnie mniejsza.

#### LITERATURA

- [1] Berry H. K., *Am. J. Phys. Anthropol.* **11**, 559, 1953.
- [2] Berry H. K., Dobzhansky Th., Gartler S. M., Levene H., Osborne R. H., *Am. J. Hum. Genet.* **7**, 93, 1955.
- [3] Bielański W., Żydowo M., Chyrek-Borowska S., Jusko J., Manitiu A., Niemiro R., Wołowski R., *Acta Biochim. Polon.* **2**, 49, 1955.
- [4] Braunstein A. E., Wilenkin G. J., *Wopr. Mied. Chim.* **3**, 28, 1957.
- [5] Crumpler R., Dent C. E., Harris H., Westall R. G., *Nature* **167**, 307, 1951.
- [6] Datta S., Harris H., *Nature* **168**, 246, 1951.
- [7] Dent C. E., *Exp. Med. Surg.* **12**, 229, 1954.
- [8] Draper O., Pollard W., *Science* **109**, 408, 1949.
- [9] Dustin J. P., Moore S., Bigwood E. J., *Metabolism* **4**, 75, 1955.
- [10] Evered D. E., *Biochem. J.* **62**, 46, 1956.
- [11] Fowler D. J., Norton P. M., Cheung M. W., Pratt E. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **68**, 452, 1957.
- [12] Gartler S. M., Dobzhansky Th., Berry H. K., *Am. J. Hum. Genet.* **7**, 108, 1955.
- [13] Harris H., *Rapports III Congrès de Biochimie Bruxelles* **34**, 1955.
- [14] Horoszowski P., *Kryminalistyka*, PWN, Warszawa, 1955.
- [15] Huisman T. H. J., *Archiv. Fran. de Pediatr.* **14**, 166, 1957.
- [16] Kay R. E., Harris D. C., Entennan C., *Arch. Biochem. Biophys.* **63**, 4, 1956.
- [17] Manitiu A., *Acta Biochim. Polon.* **2**, 231, 1955.

- [18] Manitiuș A., Bielański W., Niemiro R., *Pol. Tyg. Lek.* **11**, 1009, 1956.
- [19] Mozołowski W., *Acta Biochim. Polon.* **1**, 59, 1954.
- [20] Partridge S. M., Westall R. G., *Biochem. J.* **44**, 419, 1949.
- [21] Partridge S. M., Brimley R. C., *Biochem. J.* **44**, 513, 1949.
- [22] Stein W., *J. Biol. Chem.*, **201**, 45, 1953.
- [23] Troll W., Cannon K. J., *J. Biol. Chem.* **200**, 803, 1953.
- [24] Wolf L. J., Norman A. P., *Journ. Pediatr.*, **50**, 217, 1957.
- [25] Wergheșe N., Remarkrishan R. J., *Clin. Patholog.* **10**, 104, 1957.

#### AMINO ACIDS IN THE URINE OF MONO- AND DIZYGOTIC TWINS

##### Summary

1. Investigations involved 8 pairs of twins (three monozygotic pairs and five dizygotic ones), aged between 2,5 and 5 years. The total volume of urine eliminated by each twin over 24 hours was assayed quantitatively for total nitrogen,  $\alpha$ -amino nitrogen before and, after desalting, and for twelve amino acids. Amino acids were determined by paper chromatography.

2. Analogies in elimination with urine of amino acids are in monozygotic twins distinctly greater than those found in dizygotic twins.

3. Elimination with urine of amino acids varies between particular days. The changes, however, were parallel in both individuals of a pair of monozygotic twins, which became manifest in the identical amino acid composition of urine collected from the two individuals on the same day. In dizygotic twins, this similarity is distinctly less manifest.

Otrzymano 5.11.57 r.



И. ГЕЛЛЕР и М. ЕЖЕВСКА

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ДРУГИЕ ФОСФОРНЫЕ ФРАКЦИИ  
ПРИ МЕТАМОРФОЗЕ ДУБОВОГО ШЕЛКОПРЯДА *ANTHERA EA PERNYI*

Резюме

В гусеницах, куколках и *itago* дубового шелкопряда определяется кислоторастворимый, липоидный и белковый фосфор, а также фосфор нуклеиновых кислот. Содержание общего фосфора снижается незначительно при закукливании, а сильно падает при вылупливании бабочки (выделение ортофосфата в моче). Фосфор нуклеиновых кислот падает при закукливании в связи с инволюцией прядильных желез, уменьшается липоидный и белковый фосфор, увеличивается количество кислоторастворимого фосфора.

У куколки распределение фосфора между вышеуказанными фракциями не подвергается значительным изменениям.

При развитии бабочки растворимый фосфор и фосфор нуклеиновых кислот уменьшается сильнее у самцов, чем у самок, яйца которых богаты фосфорными соединениями.

Содержание рибозы и дезоксирибозы изменяется параллельно изменениям нуклеинового фосфора. Уменьшение содержания пентоз во фракции нуклеиновых кислот не сопровождается увеличением их содержания в растворимой фракции. Определение гидролизуемого фосфора по методу Керра дает результаты, совпадающие с результатами для пентоз. Результаты определений как для пентоз, так и для фосфора по Керру, рассматриваемые согласно общепринятой интерпретации указывают, что у *itago* дубового шелкопряда встречаются, по видимому, почти исключительно пуриновые нуклеотиды.

Прядильные железы содержат поразительно много нуклеиновых кислот; это связано, по видимому, с синтезом белка шелка. Яйца содержат практически исключительно рибонуклеиновые кислоты.

Ни в одном периоде метаморфозы не обнаружено накопление продуктов деполимеризации нуклеиновых кислот в растворимой фракции. Следовательно, перестройка нуклеопротеидов в куколке должна происходить постепенно.

ПРЕКУРСОРЫ БИОСИНТЕЗА НУКЛЕОТИДЦИАНКОБАЛАМИНОВ

5. Биосинтез витамина В<sub>12</sub> III и других нуклеотидцианкобаламинов

Резюме

1. При дальнейших исследованиях над биосинтезом витамина В<sub>12</sub> (нуклеотидцианкобаламинов) при помощи *Propionibacterium shermanii* были получены три нуклеотидцианкобаламиновые соединения, содержащие в качестве нуклеотидного основания 5,6-дихлорбензимидазол, 2,3-нафтимидазол и 5-гидрокси-бензимидазол. Все эти производные были получены в кристаллическом виде.

2. Полученные кристаллические нуклеотидцианкобаламины были исследованы при помощи физико-химических и микробиологических методов, причем определялась их микробиологическая активность по отношению к *Ochromonas malhamensis* по сравнению с витамином В<sub>12</sub>.

3. Была установлена идентичность полученных нуклеотидцианкобаламинов с аналогичными производными витамина В<sub>12</sub>, выделяемыми другими микроорганизмами. 5-Гидроксибензимидазолцианкобаламин оказался идентичным с витамином В<sub>12</sub> III Бернгауэра и Фридриха.

Д. ШУГАР, Г. Г. СЕРАКОВСКА и А. ШЕНБЕРГ

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОКРАШИВАНИЕ ПРИ ПОМОЩИ РАДИОАКТИВНЫХ ИНДИКАТОРОВ: ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА

Резюме

Описывается несколько методов количественного гистохимического определения активности щелочной фосфатазы при помощи радиоактивных индикаторов. Эти методы состояли в: а) инкубации в среде, содержащей меченый кальций или глицерофосфат, б) инкубации в среде, не содержащей изотопов, с последующей заменой одной из составных частей осадка фосфата кальция радиоактивным элементом. Количественные данные были получены путем измерения активности среза при помощи оконного счетчика.

Наиболее выгодный метод состоит в инкубации в меченой среде, лучше всего, при помощи <sup>45</sup>Са, так как в этом случае возможно непрерывное наблюдение за ходом реакции на каждом отдельном срезе, а также локализация ферментов на том же самом срезе при помощи автордиографии или окраски.

Метод замены удобен при исследовании значения отдельных манипуляций, применяемых в описанном Гомори и Такаматсу методе определения щелочной фосфатазы. Получены количественные данные, в особенности, для определения роли промывания, а также замены кальция кобальтом.

При применении инкубационного раствора, содержащего  $^{45}\text{Ca}$  установлено, что глицерофосфат гидролизуеться вдвое быстрее, чем адеиноловая кислота и на 20% быстрее, чем фенилфосфат. Из измерений зависимости скорости гидролиза глицерофосфата от температуры вычислено, что энергия активации для этой реакции составляет 10 ккал/мол.

Измерялось также течение тепловой инактивации щелочной фосфатазы в срезах в различных температурах.

Описывается метод инкубации срезов поочередно в двух субстратах для определения — принимает ли определенный фермент участие в обеих реакциях.

Обсуждаются полученные результаты, а также возможность иного применения приведенных методов и их значение при решении количественных проблем в гистохимии.

Г. ВЭР

## ИССЛЕДОВАНИЯ СВОЙСТВ ПИРОФОСФАТАЗЫ ИЗ МЫШЦ КРОЛИКА

### Резюме

Пирофосфатаза из мышц кролика частично очищена фракционированием сернокислым аммонием. Наибольшую активность проявляет фракция, выделяющаяся между 0,50—0,60 насыщения. Кристаллический миоген не проявляет активности пирофосфатазы.

Оптимум рН энзима заключается в пределах от 7 до 10,2. Для его действия необходимы свободные группы SH а также ионы магния. Ионы кальция проявляют антагонистическое действие по отношению к ионам магния. Сильным ингибитором реакции являются фтористые ионы.

Энзим проявляет специфическое действие по отношению к неорганическому пирофосфату. Других полифосфатов и глицерофосфата энзим не разлагает. Небольшая активность препарата по отношению к АТФ является, по всей вероятности, следствием загрязнений аденозин-3-фосфатазой.

ЧАСТИЧНАЯ ОЧИСТКА ТИРОЗИНАЗЫ ИЗ КУКОЛОК *SPHINX PINASTRI*

Резюме

Подвергалась очистке тирозиназа из куколок *Sphinx pinastri*. Из гомогената фермент осаждался 55% ацетоном, затем препарат фракционировался подкислением до  $pH=4,7$  и центрифугированием при  $40.000\times g$ . Препарат, полученный в виде суспензии был стабилен при температуре  $0^{\circ}$  в течение одного месяца. Активность по отношению к катехолу составляла  $Q_0 = 308$ , а по отношению к *p*-крезолу  $Q_0 = 41$ , что превышает приблизительно в 40 раз активность гомогената, определяемую по отношению к катехолу.

Содержание меди в препарате составляло 0,018%.

А. ГРУДЗИНСКА

СОДЕРЖАНИЕ НАТРИЯ И КАЛИЯ В ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ СЛЮНЕ

Резюме

1. В смешанной человеческой слюне, собранной в течение 30 минут, без применения каких-либо стимулов, содержание общего азота составляет в среднем  $42,6 \pm 12,0 \text{ мг}^0/\text{о}$ ; активность амилазы, выраженная в единицах, применяемых Вилльштеттером  $11,1 \pm 6,1$  единиц в 100 *мл* слюны; содержание натрия в среднем  $8,8 \pm 3,3 \text{ мЕ/л}$ ; калия  $20,3 \pm 3,9 \text{ мЕ/л}$ ; хлоридов:  $21,3 \pm 4,1 \text{ мЕ/л}$ ; количество выделяемой слюны  $14,0 \pm 6,4 \text{ мл}$ . Полученные значения являются результатом определения 32 порций слюны, взятой у 22 человек.

2. Слюна, взятая при ограничении участия околоушных желез, содержит меньше общего азота, меньшую активность амилазы, наблюдается тенденция уменьшения содержания ионов калия, тогда как содержание ионов натрия и хлора не подвергается изменению.

3. Ионный состав слюны является для отдельных лиц мало изменяющейся величиной. Большая степень дисперсии результатов в значительной мере обусловлена различиями между отдельными лицами.



АМИНОКИСЛОТЫ В МОЧЕ ОДНО- И ДВУЯЙЦЕВЫХ БЛИЗНЕЦОВ

Резюме

1. Исследовалась смешанная суточная моча восьми пар близнецов (трех пар однояйцевых и пяти пар двуяйцевых), в возрасте от 2,5 до 5 лет. Определялось количество выделяемой мочи, общий азот,  $\alpha$ -аминный азот до и после обессоливания, а также двенадцать аминокислот. Аминокислоты обозначались хроматографически на бумаге.

2. Сходство выделения аминокислот в моче у однояйцевых близнецов значительно больше, чем то, которое наблюдается у двуяйцевых близнецов.

3. Выделение аминокислот в моче изменяется со временем, то есть в различных днях. Но эта изменчивость относится одинаковым образом к обоим особям каждой пары однояйцевых близнецов, что выражается одинаковым аминокислотным составом мочи с одного и того же дня.

У двуяйцевых близнецов такое совпадение имеет место в значительно меньшей степени.