

P. SZAFRAŃSKI and E. SUŁKOWSKI

ACTIVATION OF AMINO ACIDS IN VARIOUS ORGANS OF THE GUINEA PIG

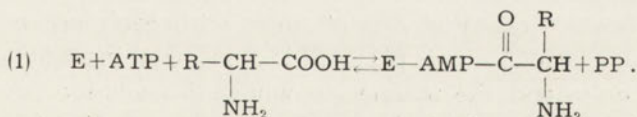
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

Zakład Biochemii Ewolucyjnej

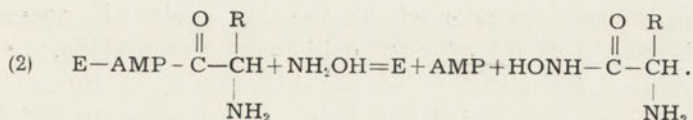
Kierownik: prof. dr Irena Mochńska

It is generally admitted that activation of carboxyl groups of amino acids is the preliminary indispensable stage in the protein biosynthesis.

Hoagland demonstrated in 1955 [4] that homogenates of rat livers produced adenilic acid (AMP) and pyrophosphate (PP) in the presence of adenosine triphosphate (ATP) and amino acids. More detailed studies on these reactions led to the conclusion that the groups activated were the carboxylic ones, the anhydride of adenylation being the intermediate product which combined with the amino acids activating enzyme:



Two methods are known to be useful for estimating the rate of amino acids activation. The first consists in combining the activated amino acid with hydroxylamine to form a hydroxamate:



The hydroxamate reacts with ferric chloride in an acid solution to give a pink-brown colour, the intensity of which is proportional to the amount of the activated amino acid. Since the reaction is reversible the pyrophosphate formed inhibits the rate of reaction. Thus an addition of pyrophosphatase is necessary to decompose the PP formed.

The second known method is based on the reversibility of the reaction of activation (1). It consists in the addition of the labelled pyrophosphate

($^{32}\text{P}^{32}\text{P}$), which is recovered subsequently in ATP. Thus the rate of pyrophosphate incorporation into ATP allows to appreciate the rate of the amino acid activation.

Since the isoelectric point of amino acids activating enzymes is always somewhat about pH 5, they are often called "pH 5 enzymes". As yet nearly all reported researches deal with the activation of a mixture of various amino acids, while not so much is known about the activation of single amino acids. Therefore, we studied the enzymes which should activate individual amino acids in various organs of the guinea pig. It could be expected that the results should ascertain whether there is any relationship between the rate of amino acids activation and their quantitative share in the protein of a given organ. The data obtained were also expected to enable the choice of the most suitable organ for eventual future isolation of enzymes activating individual amino acids.

EXPERIMENTAL

Guinea pigs 6 to 9 months old were used. One series of experiments consisted of three guinea pigs starved for about 20 hours then, after stunning, killed by decapitation. Liver, intestines, abdomen muscles, limbs muscles, kidneys, brain, spleen, pancreas, heart and skin were removed and the acetone powders prepared. The enzymatic preparations were made subsequently from these powders. The hydroxamic method was used to determine the rate of amino acids activation [4]. The measurements were repeated 3 or 4 times with each organ, every time, with a new group of guinea pigs. Skin was examined in one series of experiments only, and the manner in which the acetone powder of skin was prepared diverged a little from the procedure applied to other organs.

Acetone powders. The isolated guinea pig organs were washed with ice cooled physiological saline solution, then finely minced by means of a small laboratory meat-mill with 0.05 mm. holes in the disk. 10 g. of minced tissue were transferred to the ice cooled homogenizer with a polyacrylic piston, 20 ml. of -30° cold acetone was added, and the whole was homogenized for about 10 sec. at 1000 r.p.m. A further 50 ml. of -30° cold acetone was added and homogenization continued for 1 min. The suspension was then filtered on Büchner's funnel, the sediment washed with 50 ml. of cold acetone, its residue being pressed out on the filter. The remaining powder was dried in the stream of cold air for about 40 min. until the smell of acetone disappeared. The powders were stored in the vacuum desiccator over CaCl_2 at 3° . The enzymatic activity of these powders did not show any essential change during a period of ten days.

A modified procedure was applied when acetone powders of skin were prepared. The isolated skin was placed on ice and, after shearing the hair with scissors, it was cut into small slices and transferred into the M. S. E. homogenizer surrounded by solid CO_2 . Then, 80 ml. of -30° cold acetone was added and the whole homogenized for about 2 minutes at 14 000 r.p.m. The homogenate was filtered through a metal grill. The remainder was removed from the grill and homogenized once more as described above, then filtered again. The filtrate containing a fine suspension of homogenized skin was then passed through Büchner's funnel. The sediment on the filter was washed with cold acetone, dried and stored in the similar manner as those prepared from other organs.

Enzymatic preparations. All manipulations related with enzymatic preparations were carried out in ice. The 250 mg. portion of acetone powder was homogenized with 5 ml. of the 0.02 M "tris" buffer pH 7.76 in a Potter homogenizer, left for 15 min., stirred at short intervals, then centrifuged at 0° in M. S. E. centrifuge at 28 000 *g* for 15 min. The saturated ammonium sulphate solution was added to the supernatant until the 0.6 saturation was reached. Generally the obtained mixtures had a pH about 5.5. They were adjusted to pH 5.0 with 0.2 N HCl, and were centrifuged after 5 minutes at 10 000 *g* for 10 min. at 0° . The sediment was dissolved in 0.2 M "tris" buffer pH 7.76 to a final volume of about 2.5 ml. The protein contents in preparations was determined by the biuret method [4].

The method used eliminates free amino acids present in acetone powders as they may render the control test values too high. Other authors get rid of free amino acids by means of dialysis, this procedure resulted, however, in partial, inactivation of enzymes reaching up to 20%.

MEASUREMENTS

The incubated mixture contained in 1 ml.: MgCl_2 10 μ moles, 0.2 ml. of 0.2 M "tris" buffer pH 7.76, L-amino acid 10 μ moles, ATP 11 μ moles, hydroxylamine 1 500 μ moles, pyrophosphatase 5 μ g., and 0.1 ml. of enzymatic preparation. The sequence of addition of all components was as mentioned above. The protein contents in enzymatic preparations varied from 20 to 50 mg. per ml.

The ATP employed was the potassium salt prepared from rabbit muscles [9]. ATP and amino acids were dissolved in 0.2 M "tris" buffer pH 7.76. Crystalline Kunitz pyrophosphatase dissolved in water was used. A 6 N water solution of salt-free commercial hydroxylamine was used.

The activation of 10 amino acids was studied: L-arginine (Gliwice), L-aspartate (Roche), L-cysteine (Gliwice), glycine (FOCH Gliwice), L-glutamate (Xenon, Łódź), L-Histidine (Laokoon, Lwów), L-hydroxyproline (Light), L-leucine (Gliwice), L-lysine (Schuhardt), L-proline (Katowice).

The control experiment with the inactivated enzyme was carried out for each amino acid parallel to the proper test. In the control $MgCl_2$, "tris" buffer and the examined amino acid were added to the enzyme solution before its inactivation. The inactivation was obtained by heating the enzyme for 1.5 min. in boiling water. The test tube was then cooled in ice and the remaining components were added within the sequence referred to above. The absorption values of control tests differed slightly from one another. The differences reached up to 0.03. Yet this inaccuracy was reduced, since the control test was performed for each amino acid individually.

The samples were incubated for 30 min. at 37° . The reaction was stopped by adding 2.3 ml. of the mixture containing trichloroacetic acid, 50.5 g. concentrated hydrochloric acid, 25 ml. and 60.0 g. ferric chloride and water to 1 l. [2]. Then the samples were shaken, centrifuged and the supernatant carefully decanted into test tubes. Measurements were made on the "Unicam" spectrophotometer at $520 m\mu$. The amounts of hydroxamates formed were calculated from the standard curve prepared for glycine-hydroxamate according to Safir and Williams [7].

RESULTS

The results are listed in Table 1. The figures represent mean values from 3 or 4 experiments performed on various groups of guinea pigs. The values expressed as traces are those that did not exceed 0.01μ moles per 1 hour per 1 mg. of protein. Standard deviations of the mean allow to appreciate differences in the rate of activation of the same amino acid. In several cases considerable discrepancies were observed between activities of various acetone powder preparations deriving from various animals. These variations are probably of biological origin, since the preparations of the same powder showed the same activity over a period of ten days. The activity lowered, however, after prolonged storage. The gut acetone powder, which is one of the most active, did not exhibit any activity after four months of storage at -20° in a vacuum desiccator over $CaCl_2$. The powders used in these experiments were stored not longer than for ten days.

Our experiments showed that the rate of amino acids activation varies with various organs. Liver, gut, abdominal muscles, and kidneys showed

Table 1
Rate of amino acids activation in various organs of guinea pig
The figures given are mean values of 3-4 series of experiments

No.	Amino acid	μ mole of hydroxamates/1 hour (\pm S.D. of the mean)										
		Liver	Gut	abdomen muscles	limbs muscles	kidney	brain	spleen	heart	skin*	Pancreas	
1	L-arginine	0.062 \pm 0.017	0.037 \pm 0.013	0.115 \pm 0.036	0	0.039 \pm 0.022	0	traces	traces	0	0.035 \pm 0.035	
2	L-aspartate	0.041 \pm 0.034	0.072 \pm 0.036	0.068 \pm 0.050	0	0.061 \pm 0.028	0	traces	0.074 \pm 0.049	0	0.045 \pm 0.022	
3	L-cysteine	0.049 \pm 0.010	0.143 \pm 0.096	0.062 \pm 0.062	0	0	0	0	0.019 \pm 0.019	0	0	
4	Glycine	0.039 \pm 0.038	0.233 \pm 0.120	0.133 \pm 0.049	0.042 \pm 0.042	0.042 \pm 0.007	0	0	0.020 \pm 0.020	0	0	
5	L-glutamate	0.066 \pm 0.034	0.077 \pm 0.032	0.056 \pm 0.032	0.019 \pm 0.019	1.005 \pm 0.325	1.150	0	0.032 \pm 0.032	0	0.034 \pm 0.012	
6	L-histidine	0.070 \pm 0.035	0.032 \pm 0.017	0.082 \pm 0.052	0	0.080 \pm 0.022	0.033 \pm 0.013	traces	0.049 \pm 0.024	traces	0	
7	L-hydroxyproline	0.030 \pm 0.030	0.121 \pm 0.093	0.070 \pm 0.035	0	0.102 \pm 0.031	0	0	0.129 \pm 0.053	0	0	
8	L-leucine	0	0.086 \pm 0.057	0.079 \pm 0.004	0.133 \pm 0.105	0.086 \pm 0.023	0	traces	0.130 \pm 0.030	0	0.030 \pm 0.015	
9	L-lisine	0.088 \pm 0.046	0.093 \pm 0.049	0.163 \pm 0.072	0	0.030 \pm 0.030	0	0	0.020 \pm 0.020	0	0	
10	L-proline	0.045 \pm 0.045	0.181 \pm 0.047	0.101 \pm 0.064	0.117 \pm 0.016	0.116 \pm 0.081	0	0	0.093 \pm 0.030	traces	0.060 \pm 0.030	

* One series only.

the highest rate of amino acids activation as compared with other examined organs. On the contrary, limb muscles activated but few amino acids. The heart muscle preparations appeared to be more active than those deriving from other muscles. As much as 5 of the tested amino acids were not activated by pancreatic preparations, although the synthesis of protein is known to be very intense in this organ. Spleen showed traces of activity with regard to a few amino acids only. Brain strongly activated glutamic acid, but not other amino acids, histidine being the only exception when slight activation was observed.

We failed to find any activation of amino acids by skin in a single series of experiments performed with this organ. The fact may be due to inactivation of enzymes since the organ was somewhat homogenized otherwise.

When comparing the rates of activation of the given individual amino acids it became obvious that the order of values is always the same in all the organs tested. The only exception was glutamic acid which was more intensively activated by brain and kidneys than by other organs. These results suggested that the rate of activation of an amino acid is not related to its contents in the proteins of a given organ. Thus the higher content of an amino acid was not accompanied by a higher rate of activation.

Table 2

Activation of amino acids in the normal and regenerating rat liver
 μ mole of hydroxamate formed/mg of protein/hour

No.	Amino acids	Normal	Regenerating
1	L-Glutamic acid	0.88	0.92
2	L-Proline	0.12	0.10
3	L-Lysine	0.06	0.06
4	L-Arginine	0.04	0.04

Since we concluded that there is no relationship between the rate of activation and that of incorporation of amino acid into protein it is to be doubted whether the increased protein synthesis is accompanied by greater activity of the amino acids activating enzymes. To clear up the question we performed an experiment with normal and regenerating rat liver. The experiment was performed 18 hours after partial removal of the liver. The values obtained with the excised part of the liver were accepted as standard. The results listed in Table 2 revealed no differences between the normal and regenerating tissue. The values of Table 2 cannot

be compared to those of Table 1 for liver, because of the difference in species (rat and guinea pig).

These results, as well as earlier ones, led to the conclusion that the activity of amino acids activating enzymes is by no means a factor limiting the rate of protein synthesis.

DISCUSSION

Although activation of amino acids is a rather well known stage of protein biosynthesis, yet there still remain many doubts that have to be cleared up. The general outline of the activation mechanism is certainly consistent with that referred to by Hoagland [4]. However, many experimental data now suggest that the process is much more complex and requires some additional, as yet unknown, cofactors.

The question of specificity of amino acids activating enzymes still remains unsolved. It should be remembered that only the tryptophan activating enzyme was purified to a higher degree by Davie, Koningsberger and Lipmann [2] and even crystallised (Szafranski and Work [10]). Other enzymes were studied in a crude state, and therefore it is impossible to say anything about their specificity.

The results presented here show that there is no relationship between the rate of activation of a given amino acid and its contents in protein. This may indicate either that the activation by "pH 5 enzymes" is not the unique mechanism leading to protein synthesis, or that the activated amino acids may be used in any way other than protein synthesis. The latter possibility is rather imposing when considering the high rate of tryptophan activation [2, 10] as against its low contents in protein.

There is also no correlation between the values obtained by the hydroxamic method and those obtained when the exchange of $^{32}\text{P}^{32}\text{P}$ with ATP is measured. The highly activated amino acids as measured with hydroxamic method do not account for any visible exchange of labelled pyrophosphate. On the contrary, amino acids which show a high rate of pyrophosphate exchange do not provide hydroxamic derivatives at all. [6]. On the basis of these facts Novelli and De Moss suggest that there are some amino acids which can be activated indirectly by means of transacylation with other already activated amino acids [6]. This suggestion, however, does not seem to be very convincing. The question arises to how are incorporated these amino acids which are not activated either directly or by means of transacylation. These considerations lead to the conclusion that there exists some mechanism introducing amino acids into the chain of reactions of protein biosynthesis other than the indisputable activation of carboxyl groups.

SUMMARY

The rate of activation of ten amino acids (tested individually) was studied in ten various organs of guinea pig. The estimations were made using the hydroxamic method and acetone powder preparations were used as a source of enzyme.

Liver, gut, abdomen muscles, heart muscle and kidneys showed the highest rate of amino acids activation, while limb muscles and pancreas activated slightly some few amino acids only. Spleen, brain and skin showed traces of activation only, with the exception of glutamate, which was highly activated in the brain.

The activity of amino acids activating enzymes regenerating liver appeared to be of the same order of value as in normal liver. Thus the more intense protein synthesis does not run parallel to an increased rate of amino acids activation.

We wish to thank to Miss K. Derkus for her skilled technical assistance.

REFERENCES

- [1] Beinert H., Green D. E., Hele P., Hift H., von Korff R. W. and Ramakrishnan C. V., *J. Biol. Chem.* **203**, 35, 1953.
- [2] Davie E. W., Koningsberger V. A., Lipmann F., *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 21, 1956.
- [3] Heller J., Szafranski P., Sulkowski E., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 1959.
- [4] Hoagland M. B., *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 288, 1955.
- [5] Kingsley C. R., *J. Lab. Med.* **27**, 840, 1942.
- [6] Novelli G. D., De Moss J. A., *J. Cell. Compar. Physiol.* **50**, suppl. 1, 173, 1957.
- [7] Safir S. R. and Williams J. H., *J. Org. Chem.* **17**, 1298, 1952.
- [8] Schweet R. S., Holley B. W., i Allen E. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **71**, 311, 1957.
- [9] Szent-György A., *Chemistry of Muscular Contraction*, Acad. Press. New York, 1947.
- [10] Szafranski P., Work T. S., *Rapports of Nationale Institute for Medical Research*, London, Mill Hill, 1957.

AKTYWACJA AMINOKWASÓW W RÓŻNYCH NARZĄDACH
ŚWINKI MORSKIEJ

Streszczenie

Zbadano poziom aktywacji 10 poszczególnych aminokwasów w 10 różnych narządach świnki morskiej. Pomiary przeprowadzono metodą hydroksamową na preparatach z proszków acetonowych. Wątroba, jelito, mięśnie

brzuszne, serce, nerki wykazują największą aktywację. Mięśnie kończyn i trzustka aktywują tylko niektóre aminokwasy i w małym stopniu. Śledziona, mózg, skóra wykazują śladową aktywację, z wyjątkiem dużej aktywacji kwasu glutaminowego w mózgu. Aktywność enzymów aktywujących w wątrobie regenerującej jest tego samego rzędu co w wątrobie normalnej. Zatem wzmożona synteza białka nie idzie w parze ze zwiększoną aktywacją aminokwasów.

Otrzymano 6.10.58 r.

M. WIEWIÓROWSKI, J. AUGUSTYNIAK, H. SKRZYPIŃSKA,
J. PRZYBYLSKA i Z. KOCIAŁKOWSKI

Z BADAŃ NAD BIAŁKIEM ŁUBINOWYM

III. PRZYCZYNEK DO POZNANIA SYNTEZY BIAŁEK W NASIONACH ŁUBINU

Zakład Hodowli Roślin PAN, w Poznaniu
Kierownik: prof. dr S. Barbacki

Metabolizm azotu w dojrzewających nasionach różnych roślin był i jest przedmiotem prac licznych autorów. Szczególnie intensywnie badany jest metabolizm azotu w dojrzewających nasionach grochu. Zagadnieniem tym zajmowali się ostatnio: C. E. Danielsson [4], I. D. Raacke [21—23], T. G. Hyde [11] oraz S. P. Spragg [24]. Duża koncentracja badań na tym odcinku oraz nowoczesne metody analityczne w nich stosowane doprowadziły do licznych, interesujących i zgodnych stwierdzeń oraz hipotez. Nie brak jednak i tutaj licznych niejasności, a nawet sprzeczności i dlatego nie można uznać tych badań za zakończone.

Kontynuując nasze badania nad białkiem łubinowym [26, 28], postanowiliśmy prześledzić metabolizm azotu w dojrzewających nasionach łubinu; tym bardziej, że proces ten był dotychczas badany fragmentarycznie i to tylko przy pomocy metod klasycznych.

W poprzedniej naszej pracy [26] staraliśmy się określić zawartość różnych form azotu w dojrzałych nasionach różnych gatunków i biotypów łubinu. Stwierdziliśmy, że zawartość azotu ogólnego i niebiałkowego jest w trzech badanych gatunkach łubinu bardzo różna, natomiast poziom azotu białkowego jest bardzo wyrównany i wynosi około 4% suchej masy nasion. We wszystkich badanych nasionach stwierdziliśmy obecność peptydów, przy czym wydawało się, że różnice międzygatunkowe w zawartości azotu ogólnego i niebiałkowego są głównie spowodowane różną zawartością peptydów. Praca niniejsza miała wyjaśnić rolę peptydów w syntezie zapasowych białek nasion łubinowych, a także naświetlić stosunki biosyntetyczne między albuminami a globulinami i między poszczególnymi frakcjami globulinowymi.

Tak postawione zadanie staraliśmy się rozwiązać oznaczając w badanym materiale różne formy azotu, przy czym chcąc uniknąć błędów i sprzeczności wynikających ze stosowania różnych ekstrakcji do poszczególnych oznaczeń, przyjęliśmy zasadę dotąd nie stosowaną, aby wszystkie analizy przeprowadzić na ekstrakcie jednego typu, mianowicie na wyczerpującym ekstrakcie 0,2 M-chlorkiem sodowym zbuforowanym do pH 7. Takie postępowanie umożliwiło nam kontrolowanie dokładności przeprowadzonych oznaczeń na drodze rachunkowego ich bilansowania. Od przyjętej zasady musieliśmy w jednym przypadku odstąpić, mianowicie dla oznaczenia wzajemnego stosunku poszczególnych składników globulinowych stosowaliśmy oddzielną ekstrakcję 2 M roztworem chlorku sodu, a to dlatego, ponieważ frakcjonowanie składników globulinowych wymagało preparatu oczyszczonego na drodze dwukrotnej dializy, co z kolei zmuszało do pracy z roztworami białek o większym stężeniu aniżeli w ekstrakcie zasadniczym.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Przygotowanie materiału

Przedmiotem naszych badań były rozwijające się nasiona łubinu białego (Przebędowski średnio wczesny grupa V ród 342) i wąskolistnego (Obornicki) ze stacji hodowlanej I. U. N. G. w Przebędowie. W obu przypadkach pobieranie prób rozpoczęliśmy w 23 dniu od początku kwitnienia kwiatostanu pędu głównego. Ponieważ nie ma ściśle sprecyzowanego botanicznego kryterium oceny stopnia dojrzałości nasion, dlatego próby pobieraliśmy w określonych odstępach czasu: około 5-dniowych dla łub-

Tablica 1

Masa 100 świeżych nasion w różnych fazach rozwoju

Łubin biały			Łubin wąskolistny		
Data zbioru	Symbol próby	Masa 100 nasion (g)	Data zbioru	Symbol próby	Masa 100 nasion (g)
4.VII.57	B ₁	—	4.VII.57	W ₁	11,0
19.VII.57	B ₂	52,2	9.VII.57	W ₂	29,6
25.VII.57	B ₃	67,0	14.VII.57	W ₃	31,0
2.VIII.57	B ₄	91,2	19.VII.57	W ₄	33,0
13.VIII.57	B ₅	131,2	25.VII.57	W ₅	22,0
23.VIII.57	B ₆	141,1			
4.IX.57	B ₇	136,0			
14.IX.57	B ₈	141,3			
25.IX.57	B ₉	142,0			

binu wąskolistnego i 10-dniowych dla łubinu białego. Dodatkowo oznaczaliśmy masę 100 świeżych nasion (Tabl. 1). Po zbiorze, nasiona oddzielaliśmy od strąków, zamrażaliśmy w temp. około -20° i liofilizowaliśmy. Zawartość wody w zliofilizowanym materiale nie przekraczała 0,1%.

Ekstrakcja zasadnicza i analiza ekstraktu

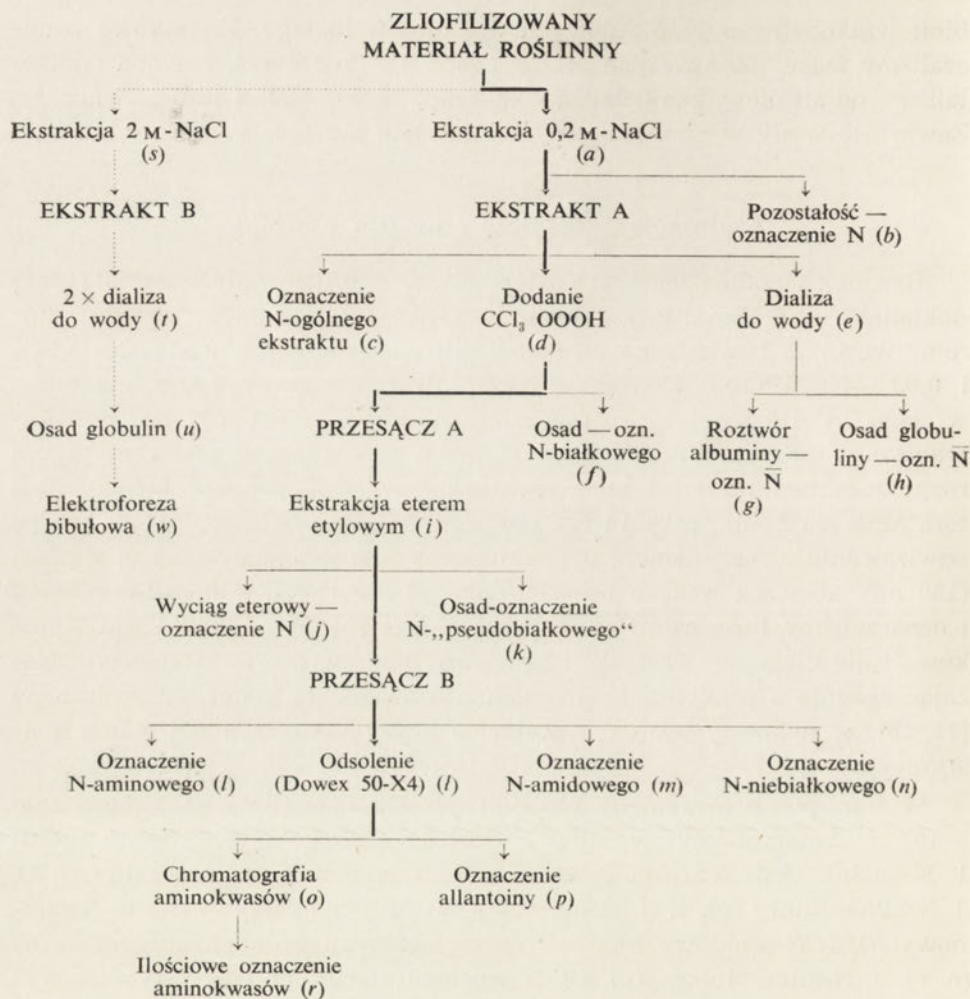
Rysunek 1 podaje schemat postępowania. Zliofilizowany materiał (1,5 g) dokładnie rozdrabnialiśmy i ekstrahowaliśmy (a) „standardowym buforem“ wg C. E. Danielssona [3] (skład buforu 0,2 M-NaCl, 0,02 M- NaH_2PO_4 i 0,03 M- Na_2HPO_4). Ekstrakcję przeprowadzaliśmy w temp. około 4° w ciągu 7 dni 6 porcjami rozpuszczalnika, dzięki czemu materiał był ekstrahowany prawie wyczerpująco¹⁾. Przy zmieszaniu z pierwszą porcją rozpuszczalnika materiał homogenizowaliśmy przy pomocy homogenizatora MSE (ca 2 min. przy 14 tys. obr./min.). Połączone porcje ekstraktu po odwirowaniu sączyliśmy, uzupełnialiśmy do standardowej objętości (150 ml), a sącze wraz z pozostałością po ekstrakcji mineralizowaliśmy i oznaczaliśmy ilość azotu nierozpuszczalnego (b). Przy omawianiu wyników N nie ulegający ekstrakcji będziemy doliczać do N-białkowego uważając zgodnie z praktyką analityczną, stosowaną do materiału roślinnego [11, 16], że związany jest on w postaci trudno rozpuszczalnych białek konstytucyjnych.

W ten sposób otrzymany ekstrakt przechowywaliśmy w temp. około -10° i oznaczaliśmy w nim zawartość następujących form azotu: 1. N-ogólny ekstraktu (na Rys. 1 (c)), 2. N-białkowy rozpuszczalny (f, k), 3. N-albuminowy (g), 4. N-globulinowy (h), 5. N-niebiałkowy (n), 6. N-aminowy (l), 7. N-amidowy (m), 8. N-poszczególnych wolnych aminokwasów (o, r), 9. N-allantoinowy (p), 10. N-wyciągu eterowego (j). Wszystkie wymienione oznaczenia były przeprowadzone w 2 powtórzeniach w 3 oddzielnych seriach ekstraktu.

Ad 1. N-ogólny ekstraktu (c) oznaczaliśmy mineralizując określoną część (10 ml) ekstraktu, metodą Kjeldahla w modyfikacji C. H. Perrina [27]. Amoniak destylowaliśmy w półmikroaparatach Parnasa.

Ad 3 i 4. 20-ml ekstraktu poddaliśmy wyczerpującej dializie (e) w stosunku do wody (około 70 godz. w małych woreczkach celofanowych). Wytrącone w wyniku dializy globuliny (h) oddzielaliśmy przez wirowanie od roztworu albumin (g) i w każdej z tych frakcji oznaczaliśmy azot, który

¹⁾ I. D. Raacke [21] badając zawartość niektórych form azotu w nasionach grochu, stosowała ekstrakcję 20-minutową. Nasze obserwacje wykazały, że w przypadku nasion łubinu taki czas ekstrakcji był stanowczo za krótki.



Rys. 1. Schemat postępowania analitycznego

w dalszym ciągu będziemy nazywali odpowiednio N-globulinowym i N-albuminowym.

Ad 2. Azot białkowy rozpuszczalny oznaczaliśmy mineralizując osad (f) otrzymany działaniem kwasu trójchlorooctowego na 40 ml ekstraktu w temp. ca 90°. Wytrącanie białka dokonywaliśmy na gorąco, ponieważ tym sposobem chcieliśmy spowodować całkowite wytrącenie również albumin. Nasz sposób postępowania uznaliśmy za poprawny, ponieważ suma N-albuminowego i N-globulinowego, oznaczanych po dializie wykazywała dużą zgodność z wartościami azotu białkowego rozpuszczalnego,

oznaczonego w wyżej podany sposób. Stężenie kwasu trójchlorooctowego doprowadzaliśmy do około 9%.

Przesącz i popłuczyny po wytrąceniu białka zagęszczaliśmy do objętości około 25 ml, w wyniku czego znacznie wzrosło stężenie kwasu trójchlorooctowego. Chcąc uniknąć przy dalszych oznaczeniach komplikacji związanych z dużym stężeniem tego kwasu, usuwaliśmy go ekstrahując eterem etylowym w aparacie Tielepapa (*i*). Podczas procesu „odkwaszania“ wytrącał się osad, który po odsączeniu mineralizowaliśmy (*k*), a zawarty w nim azot, który będziemy w dalszym ciągu nazywali N-pseudo-białkowym, doliczaliśmy do azotu białkowego²⁾.

Ad 10. Chcąc uzyskać pełny bilans pomiędzy azotem ogólnym, a poszczególnymi frakcjami, oznaczaliśmy również azot zawarty w wyciągu eterowym (*j*), otrzymanym przy usuwaniu kwasu trójchlorooctowego z bezbiałkowego ekstraktu.

Ad 5, 6, i 7. W przesączu po wytrąceniu białka (odkwaszonym, zagęszczonym i uzupełnionym do 50 ml) oznaczaliśmy zawartość N-niebiałkowego mineralizując 5 ml roztworu (*n*). W dalszych 10 ml oznaczaliśmy N-aminowy (*l*) metodą A. A. Albanese i V. Irby [1], oraz w 5 ml N-amidowy (*m*) metodą J. E. Varner'a i wsp. [25]. W celu pośredniego określenia zawartości peptydów, N-aminowy oznaczaliśmy dodatkowo po hydrolizie 5 ml tego przesączu. Stosowaliśmy trzy typy hydrolizy: 6_N kwasem solnym pod chłodnicą zwrotną przez 8 godz., 3_N kwasem solnym w 120° w zatopionych probówkach przez 24 godz., oraz mieszaniną kwasu solnego i mrówkowego [10].

Ad 8 i 9. W 10 ml bezbiałkowego przesączu oznaczaliśmy zawartość N-allantoinowego (*p*) oraz azotu poszczególnych wolnych aminokwasów (*o*). Przed analizą chromatograficzną aminokwasów okazało się konieczne odsalanie przesączu (*l*). Przeprowadzaliśmy to na kolumnach kationitu Dowex 50-x 4 (200—400 oczek) wg D. L. Buchanana [2], zbierając przy pomocy automatycznego kolektora oddzielnie frakcje zawierające allantoinę i aminokwasy. Stosowaliśmy kolumny o średnicy 6 mm i pojemności 6 ml. Kolumny o takich rozmiarach posiadały pojemność jonowymienną około 8 milirównoważników. Zaabsorbowaną na kolumnie allantoinę eluowaliśmy wodą, a aminokwasy 0,5_M wodnym roztworem pipe-rydyny [2].

Zawartość allantoiny oznaczaliśmy spektrofotometrycznie metodą E. G. Young'a i C. F. Conway'a [32] przy długości fali świetlnej 528 m μ i szczeliny 0,015 mm.

²⁾ Osadu tego dotychczas bliżej nie zbadaliśmy, przypuszczamy, że ma on charakter kompleksu lipoidowo-białkowego [14].

Rozdział i identyfikację wolnych aminokwasów przeprowadzaliśmy przy pomocy chromatografii dwukierunkowej wg N. Wolfe'a [29]. Całkowity rozdział aminokwasów uzyskaliśmy przy rozwijaniu chromatogramu techniką zstępującą przepływową, przez 26 godz. w pierwszym kierunku i 18 godz. w drugim kierunku (temp. 21°). Każdorazowo przed rozwinięciem chromatogramu stosowaliśmy 3-godzinne kondycjonowanie bibuły parami rozpuszczalnika. Jako komory chromatograficzne służyły oszklone skrzynie drewniane o wymiarach 120×25×60 cm, w których jednocześnie rozwijaliśmy po 5 chromatogramów. Celem identyfikacji aminokwasów ekstraktu, równocześnie z 4 chromatogramami wolnych aminokwasów rozwijaliśmy 1 chromatogram ze standardową mieszaniną aminokwasów. Chromatogram ten wywoływaliśmy 0,5% roztworem ninhydryny w acetonie.

Odsolone frakcje aminokwasowe (zebrane z kolektora) łączyliśmy razem (około 12 ml) i odparowywaliśmy do sucha w łaźni wodnej, temp. 80°. W celu hydrolizy amidów³⁾, które zaciemniały stosowany przez nas rozdział chromatograficzny aminokwasów — pozostałość rozpuszczaliśmy w 5 ml 1 N kwasu solnego i podgrzewaliśmy przez 5 godz. na wrzącej łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Po odpędzeniu kwasu solnego pozostałość rozpuszczaliśmy w małej ilości wody (2 krople) i roztwór ten „oczkiem“ platynowym nakładaliśmy na co najmniej 3 chromatogramy.

Chromatogramy frakcji wolnych aminokwasów wywoływaliśmy wstępnie 0,02% roztworem ninhydryny w acetonie [7], celem lokalizacji plam aminokwasów (Rys. 8). Następnie wycinaliśmy plamy aminokwasów, usuwaliśmy z nich amoniak metodą L. Fowden'a [8], po czym przeprowadzaliśmy reakcję ninhydryną metodą E. W. Yemma i E. C. Cocking [30] uwzględniając modyfikację N. Wolfe'a [29] oraz własne doświadczenia [27]. Odczyty doświadczalne korygowaliśmy wartościami ślepych prób. Przy ilościowej ocenie aminokwasów opieraliśmy się na krzywych kalibracyjnych wykreślonych na podstawie chromatogramów ze standardowymi roztworami aminokwasów. Uzyskane w ten sposób wyniki przedstawiają wzajemną korelację azotu α -aminowego poszczególnych wolnych aminokwasów (Rys. 10 i 12). Procentowy udział wolnych aminokwasów w suchej masie nasion, przedstawiony na rys. 9 i 11 został obliczony w oparciu o wartości podane w tablicy 2 (pozycja 11).

³⁾ W związku z przeprowadzaną hydrolizą amidów oznaczaliśmy tylko sumaryczną zawartość kwasu glutaminowego i glutaminy oraz kwasu asparaginowego i asparaginy.

Azot ogólny

Ogólną zawartość azotu w badanych nasionach wyliczaliśmy sumując azot pozostający w materiale po ekstrakcji z azotem ogólnym ekstraktu. Sporadycznie azot oznaczaliśmy bezpośrednio w materiale roślinnym. Wyniki tych oznaczeń zgadzały się z wartościami obliczonymi z dokładnością $\pm 3^0/\text{}$.

Oznaczenie wzajemnego stosunku poszczególnych składników globulinowych

Oznaczenie to wykonano frakcjonując globuliny przy pomocy elektroforezy bibułowej (*w*) wg opisanego poprzednio postępowania [28]. Oprócz dotychczas stosowanego buforu boranowego, używaliśmy dodatkowo 0,2 M bufor weronalowy o pH 8,6, przy czym warunki analizy były następujące: bibuła Whatman No. 4, pasek o „długości roboczej“ 20 cm, napięcie 200 V. Mieszaninę białek nakładaliśmy w odległości około 6 cm od katodowego końca paska bibuły. Rozdzielone na bibule frakcje białkowe wybarwialiśmy błękitem bromofenolowym [6]. Po wybarwieniu poszczególne plamy wycinaliśmy eluowaliśmy z nich barwnik 0,01 N ługiem sodowym [12], a następnie oznaczaliśmy kolorymetrycznie, stosując filtr pomarańczowy. Przyjęliśmy, że procentowy udział poszczególnych frakcji w ogólnej ilości globulin jest równy procentowemu udziałowi ekstynkcji poszczególnych frakcji w stosunku do sumy ekstynkcji wszystkich frakcji [15].

Globuliny do elektroforezy przygotowywaliśmy, ekstrahując je ze zliofilizowanych nasion 2 M roztworem chlorku sodu (*s*) i oczyszczając na drodze dwukrotnej dializy do wody (*t*).

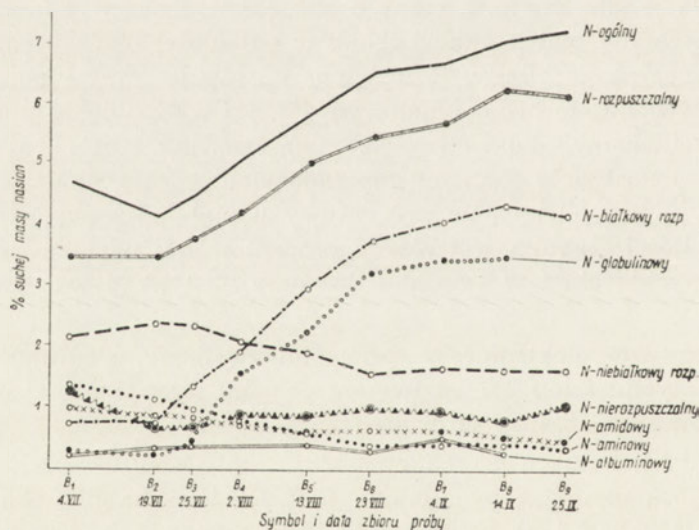
Preparaty konglutyn α i β (odpowiednikami Osbornowskich [18], konglutyn α i β są legumina i wicilina wg C. E. Danielssona [5], a wg F. J. Jouberta [13] frakcja A i B), potrzebne do identyfikacji frakcji globulinowych rozdzielonych elektroforetycznie w buforze weronalowym, otrzymaliśmy rozdzielając mieszaninę globulin metodą F. J. Jouberta [13].

WYNIKI

Uzyskane wyniki są podane w tabl. 2 oraz na rysunkach. Jak wykazuje tablica 2 oraz rys. 2 i 3, ilość azotu w nasionach badanych gatunków łubinu zwiększa się w miarę postępującego dojrzewania. Największy przyrost azotu obserwuje się w początkowych fazach dojrzewania, w późniejszych fazach dopływ związków azotowych jest znacznie mniejszy.

Wyjątek stanowi druga faza rozwoju nasion łubinu białego (B_2 , Tabl. 2, Rys. 2). Spadku tego nie obserwuje się w przypadku nasion łubinu wąskolistnego.

Wzrost zawartości azotu ogólnego w stosunku do suchej masy świadczy o szybszym nagromadzeniu przez nasiona łubinu związków azotowych niż węglowodanów i tłuszczowców. W zależności od fazy rozwojowej, azot dopływający do nasion jest reprezentowany przez poszczególne frakcje w różnych proporcjach. W pierwszej fazie rozwoju nasion obserwuje się dużą zawartość niskocząsteczkowych związków azotowych i niski poziom azotu białkowego. Za azot białkowy uważamy sumę azotu białek dających się wyekstrahować oraz azot nie ulegający ekstrakcji. Spadek procentowej zawartości azotu białkowego w fazie B_2 , wynika wyłącznie ze znacznego spadku procentowej zawartości białek konstytucyjnych (nie

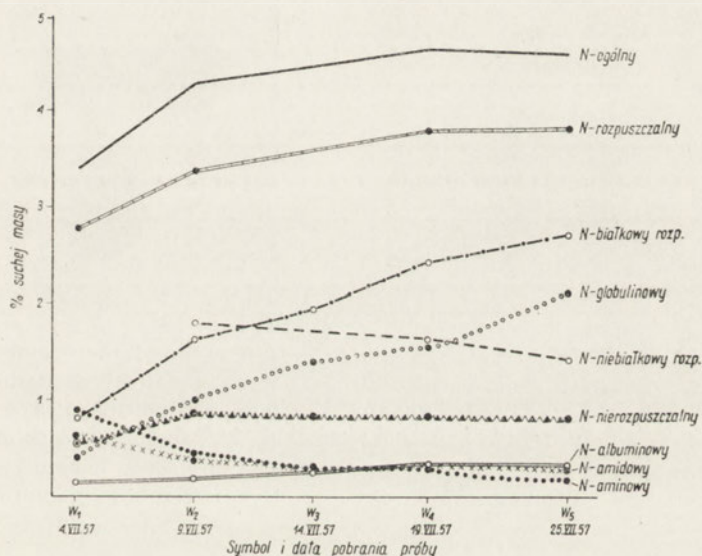


Rys. 2. Zmiany zawartości różnych form azotu (w procentach suchej masy) w czasie rozwoju nasion łubinu białego

ulegających ekstrakcji). W pozostałych fazach w obu badanych gatunkach zawartość azotu nie ulegającego ekstrakcji utrzymuje się na mniej więcej równym poziomie, stanowiąc około 0,8% suchej masy (Rys. 2 i 3). Poczynając od drugiej fazy dojrzewania nasion łubinu białego, obserwujemy aż do fazy 6 (Rys. 2) gwałtowny wzrost azotu białkowego. Od 6 fazy tempo przyrostu białek wyraźnie maleje. W nasionach łubinu wąskolistnego (Rys. 3) wzrost ten jest równomierny w ciągu całego okresu rozwoju. Na podkreślenie zasługuje fakt, że intensywny wzrost azotu białkowego

wynika niemal wyłącznie z silnego przyrostu globulin. Azot albuminowy wzrasta o wiele wolniej i dość równomiernie w ciągu całego okresu dojrzewania. Zdecydowanie różna szybkość syntezy globulin i albumin nasuwa przypuszczenie, że obydwa wymienione typy białek są syntetyzowane zupełnie niezależnie od siebie.

Wyniki analizy elektroforetycznej sugerują, że również poszczególne składniki globulinowe syntetyzowane są niezależnie od siebie. W poprzedniej pracy donieśliśmy [28], iż przy zastosowaniu buforu boranowego, glo-

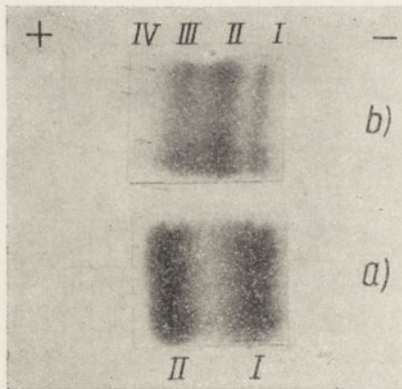


Rys. 3. Zmiany zawartości różnych form azotu (w procentach suchej masy) w czasie rozwoju nasion łubinu wąskolistnego

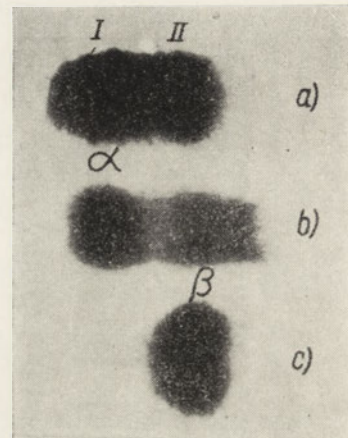
buliny z nasion łubinu wąskolistnego, rozdzielają się na 3 frakcje, a globuliny z nasion łubinu białego — wyraźnie na 2. W warunkach analizy przeprowadzanej przy użyciu buforu weronalowego globuliny z nasion łubinu białego można rozdzielić na 4 frakcje, nazwane kolejno: I, II, III, IV, (Rys. 4), a globuliny z nasion łubinu wąskolistnego tylko na dwie frakcje nazwane odpowiednio frakcjami I i II. Wyniki te potwierdzają nasze poprzednie obserwacje o wyraźnych międzygatunkowych różnicach w charakterze kompleksów białek zapasowych. W przypadku globulin łubinu wąskolistnego stwierdziliśmy (Rys. 5), że frakcja I z buforu weronalowego zawiera konglutynę β , a frakcja II — konglutynę α . Podobnego oznaczenia nie udało się nam przeprowadzić z globulinami łubinu białego, gdyż w wyniku frakcjonowania globulin na skalę preparatywną w analogiczny

sposób, jak w przypadku nasion łubinu wąskolistnego, otrzymano preparaty będące zawsze mieszaniną kilku różnych globulin.

Procentowy udział w suchej masie frakcji I, III i IV globulin łubinu białego (Rys. 6) wzrasta równomiernie w miarę dojrzewania nasion, nato-

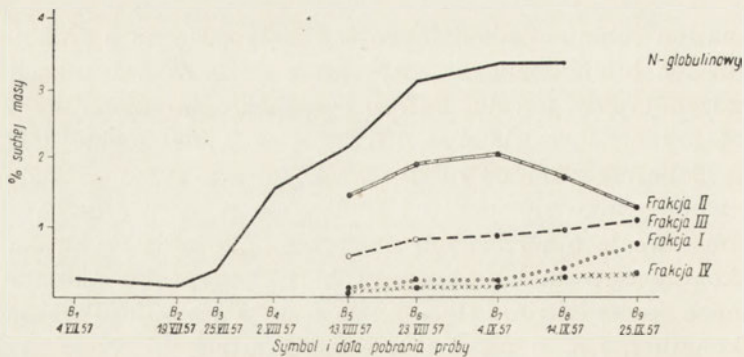


Rys. 4. Rozdział elektroforetyczny globulin w dojrziałych nasionach łubinu wąskolistnego (a) i łubinu białego (b), przeprowadzony przy zastosowaniu buforu weronalowego

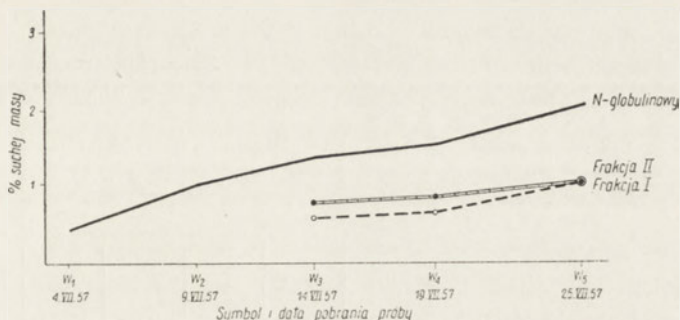


Rys. 5. Identyfikacja elektroforetyczna frakcji globulinowych z dojrziałych nasion łubinu wąskolistnego; a — preparat konglutyny α (silnie zanieczyszczony konglutyną β), b — mieszanina globulin, c — preparat konglutyny

miast frakcja II po osiągnięciu maksimum w fazie 7 wykazuje wyraźny spadek. Interpretowanie jednak tego spadku przemianą tej frakcji w inne składniki globulinowe jest stanowczo przedwczesne. Z rys. 6 wynika, że frakcja II



Rys. 6. Zmiany procentowej zawartości poszczególnych frakcji globulinowych w czasie rozwoju nasion łubinu białego



Rys. 7. Zmiany procentowej zawartości frakcji globulinowych w czasie rozwoju nasion łubinu wąskolistnego

jest syntetyzowana najwcześniej i w największych ilościach; frakcje pozostałe powstają później, są one nagromadzane wolniej i w mniejszych ilościach.

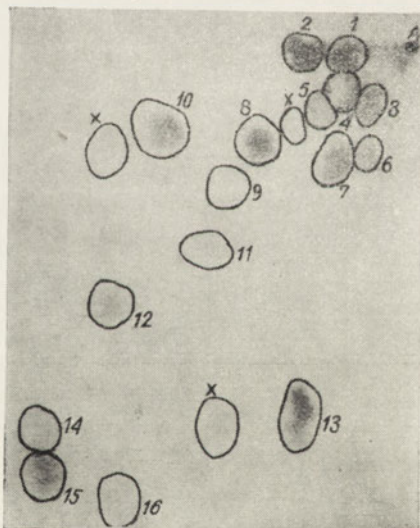
Zmiany wzajemnego stosunku globulin podczas dojrzewania nasion łubinu wąskolistnego są przedstawione na rys. 7.

Proporcjonalnie do wzrostu azotu białkowego zmniejsza się w miarę dojrzewania nasion zawartość azotu niebiałkowego. Widać to szczególnie wyraźnie przy porównaniu udziału poszczególnych form azotu w azocie ogólnym (Tabl. 2, kolumny b).

Przeważająca część azotu niebiałkowego przypada na azot amidowy i aminowy. Zawartość N-amidowego w miarę dojrzewania nasion wyraźnie się zmniejsza, przy czym najsilniejszy spadek zaznacza się w pierwszym okresie rozwoju nasion. Jak widać na rys. 2 i 3, najszybszy spadek poziomu N-amidowego ma miejsce z równoczesnym silnym wzrostem N-białkowego.

Podobnie przedstawiają się zmiany zawartości N-aminowego. Różnica jednak pomiędzy zawartością N-aminowego na początku i na końcu okresu rozwoju nasion jest znacznie wyższa niż w przypadku N-amidowego.

Omówione zmiany zawartości azotu aminowego są wypadkową zmian,



Rys. 8. Chromatogram wolnych aminokwasów łubinu białego, wstępnie wywołany

A — punkt startowy, 1 — kwas asparaginowy, 2 — kwas glutaminowy, 3 — lizyna, 4 — arginina, 5 — glicyna, 6 — histydyna, 7 — seryna, 8 — alanina, 9 — prolina, 10 — kwas, γ -aminomasłowy, 11 — tyrozyna, 12 — walina, 13 — treonina, 14 — izoleucyna, 15 — leucyna, 16 — fenyloalanina, x — plamy niezidentyfikowane

T a b l i

Zawartość różnych form azotu
a) w ‰/‰ suchej masy

Lp.	Symbol próby Data zbioru	B ₁ 4.7.57		B ₂ 19.7.57		B ₃ 25.7.57	
		a	b	a	b	a	b
1	N-ogólny	4,70	—	4,10	—	4,39	—
2	N-nierozpuszczalny (b)*)	1,25	26,59	0,65	15,85	0,64	14,58
3	N-ogólny ekstraktu (c)	3,45	73,41	3,45	84,14	3,75	85,42
4	N-białkowy rozpuszczalny (f)	0,52	11,06	0,55	13,41	1,10	25,06
5	N-pseudo białkowy (k)	0,22	4,68	0,21	5,12	0,21	4,78
6	Suma 4+5	0,74	15,74	0,76	18,54	1,31	29,84
7	Suma 2+6	1,99	42,34	1,41	34,39	1,95	44,42
8	N-globulinowy (h)	0,28	5,96	0,17	4,15	0,40	9,11
9	N-albuminowy (g)	0,22	4,68	0,21	5,12	0,34	7,74
10	Suma 8+9	0,50	10,64	0,38	9,27	0,74	18,86
11	N-aminowy (l)	1,35	28,72	1,11	27,07	0,96	21,87
12	N-amidowy (m)	0,98	20,85	0,84	20,49	0,86	19,59
13	N-allantoinowy (p)	0,11	2,33	0,08	1,95	0,08	1,82
14	N-niebiałkowy (n)	2,15	45,74	2,34	57,08	2,33	53,07
15	N-wyciągu eterowego (j)	0,48	10,21	0,22	5,36	0,18	4,10
16	Suma 6+14+15	3,37		3,32		3,82	
17	Różnica pomiędzy N-niebiałkowym obliczonym a oznaczonym (3 — (6+15) — 14	—0,08		+0,12		+0,07	

*) Litery w nawiasach odnoszą się do schematu postępowania (Rys. 1).

jakim podlegają poszczególne aminokwasy. Dlatego też przeprowadziliśmy ilościowe oznaczenia wolnych aminokwasów w kolejnych fazach rozwoju nasion. We wszystkich fazach rozwojowych stwierdziliśmy obecność 16 następujących aminokwasów: kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, lizyny, argininy, histydyny, seryny, glicyny, alaniny, kwasu γ -aminomasłowego, tyrozyny, treoniny, waliny, izoleucyny, leucyny, fenyloalaniny oraz proliny. Nie stwierdziliśmy występowania uchwytynych ilości cystyny, metioniny i tryptofanu, a histydyna występowała w ilościach śladowych. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że w trakcie stosowanej przez nas kwaśnej hydrolizy amidów tryptofan uległ rozkładowi; dlatego też niewykrycie przez nas tryptofanu nie jest równoznaczne z jego niewystępowaniem w badanym materiale. We wszystkich fazach dojrzewania

c a 2

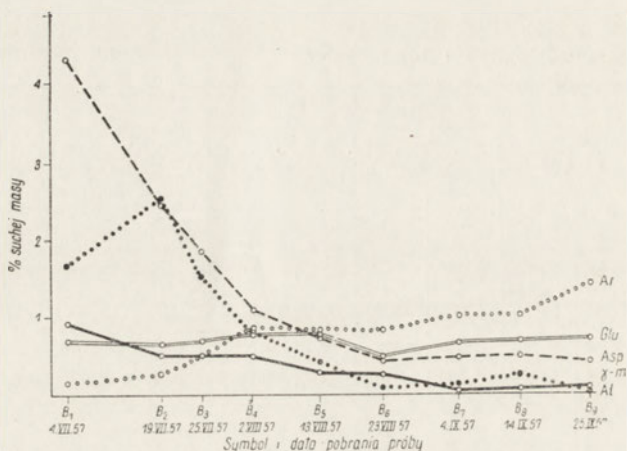
w dojrzewających nasionach lubinu białego

b) w ‰ azotu ogólnego

B ₄ 2.8.57		B ₅ 13.8.57		B ₆ 23.8.57		B ₇ 4.9.57		B ₈ 14.9.57		B ₈ 25.9.57		Odchylenie standardowe
a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	
5,04	—	5,76	—	6,41	—	6,51	—	6,90	—	7,01	—	
0,90	17,86	0,84	14,58	1,03	16,07	0,94	14,44	0,78	11,30	1,09	15,55	±0,07
4,14	82,14	4,92	85,42	5,38	83,93	5,57	85,56	6,12	88,70	5,92	84,45	±0,10
1,66	32,93	2,64	45,83	3,31	51,64	3,61	55,45	3,91	56,67	3,67	52,35	±0,06
0,20	3,97	0,26	4,51	0,36	5,62	0,36	5,53	0,31	4,49	0,36	5,13	±0,06
1,86	36,90	2,90	50,35	3,67	57,25	3,97	60,98	4,22	61,16	4,03	57,49	
2,76	54,76	3,74	64,93	4,70	73,32	4,91	75,42	5,00	72,46	5,12	73,04	
1,53	30,36	2,18	37,85	3,16	49,30	3,37	51,77	3,37	48,84	—	—	±0,05
—	—	0,31	4,58	0,27	4,21	0,45	6,91	0,30	4,35	—	—	±0,07
—	—	2,49	43,23	3,43	53,51	3,82	58,68	3,67	53,19	3,99	56,92	
0,75	14,88	0,55	9,53	0,36	5,62	0,39	5,99	0,39	5,65	0,32	4,56	±0,03
0,71	14,09	0,60	10,42	0,65	10,14	0,63	9,68	0,54	7,83	0,48	6,85	±0,07
0,07	1,46	0,07	1,15	0,06	1,01	0,07	1,02	0,06	0,93	0,06	0,80	
2,09	41,47	1,89	32,81	1,51	23,56	1,67	25,65	1,61	23,33	1,62	23,11	
0,15	2,98	0,22	3,82	0,20	3,12	0,12	1,84	0,23	3,33	0,20	2,85	
4,10		5,01		5,38		5,76		6,06		5,85		
-0,04		+0,09		0,00		+0,19		-0,06		-0,07		

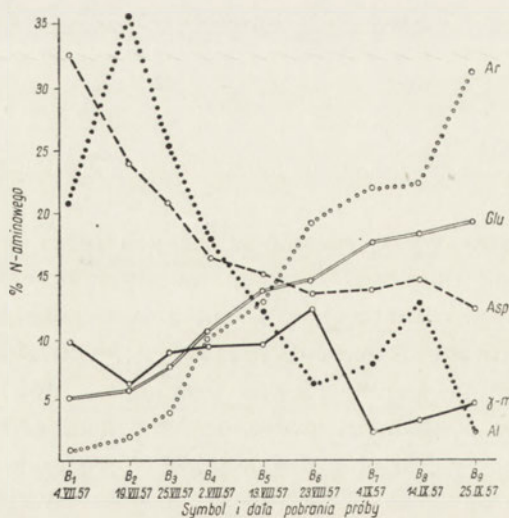
nasion stwierdziliśmy występowanie znacznych ilości proliny, nie oznaczaliśmy jej jednak ilościowo z uwagi na nieprzystosowanie kolorymetrycznej metody ninhydronowej do oznaczania tego aminokwasu.

Na szczególną uwagę (Rys. 9—12) zasługują: kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, arginina, alanina i kwas γ -aminomasłowy, ponieważ udział tych aminokwasów w ogólnym azocie aminowym ulega bardzo ciekawym zmianom. Procentowy udział azotu alaniny w N-aminowym wzrastając w pierwszej fazie od 20 do 33‰ spada następnie w miarę dojrzewania nasion lubinu białego do 1,5‰ przy czym najsilniejszy spadek ma miejsce pomiędzy 2 a 4 fazą rozwoju (Rys. 10). Również i kwas asparaginowy bardzo znacznie zmniejsza swój udział w ogólnej puli N-aminowego, najsilniej w początkowych fazach rozwojowych. Równocześnie ze spadkiem obu



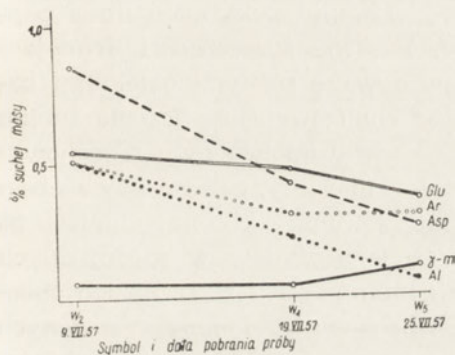
Rys. 9. Zmiany zawartości kwasu glutaminowego, kwasu asparaginowego, argininy, kwasu γ -aminomasłowego i alaniny (w procentach suchej masy) w czasie rozwoju nasion łubinu białego

tych aminokwasów obserwujemy wzrost kwasu glutaminowego oraz bardzo gwałtowny wzrost argininy, której procentowy udział w N-aminowym

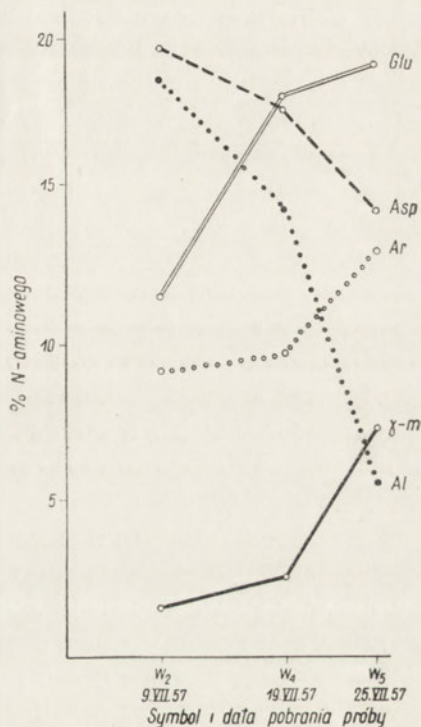


Rys. 10. Zmiany procentowego udziału azotu α -aminowego niektórych aminokwasów w azocie ogólnym aminowym w czasie rozwoju nasion łubinu białego

wzrasta pod koniec dojrzewania nasion do przeszło 30% (Rys. 10). Udział pozostałych aminokwasów w N-aminowym nie ulega zasadniczym zmianom w ciągu całego okresu rozwoju nasion.



Rys. 11. Zmiany zawartości kwasu glutaminowego, kwasu asparaginowego, argininy, kwasu γ -aminomasłowego i alaniny (w procentach suchej masy) w czasie rozwoju nasion łubinu wąskolistnego



Rys. 12. Zmiany procentowego udziału azotu α -aminowego niektórych aminokwasów w czasie rozwoju nasion łubinu wąskolistnego

DYSKUSJA

Metabolizm związków azotowych w dojrzewających nasionach łubiniowych przebiega w licznych fragmentach inaczej, aniżeli wykazały ostatnie badania w odniesieniu do nasion grochu. Stwierdziliśmy, że w łubinach procentowy udział azotu w suchej masie w trakcie dojrzewania nasion rośnie, podczas gdy w grochu maleje [4]. Świadczy to, że w okresie dojrzewania nasion łubinu dominuje synteza białka, podczas gdy w grochu szybciej postępuje synteza węglowodanów. Fakt ten ma na pewno zasadniczy wpływ na kształtowanie się innych zauważonych różnic.

I tak I. D. Raacke [21] i S. P. Spragg [24], a także C. E. Danielsson [4] zgodnie sugerują, że prekursorami w syntezie globulin nasion grochu są peptydy, ponieważ maksimum ich nagromadzenia w niedojrzałych nasionach ściśle zbiega się z początkiem gwałtownej syntezy globulin.

Nasze natomiast badania nie wykazały obecności poważniejszych ilości peptydów w żadnej fazie dojrzewania nasion łubinu. Fakt ten był dla nas bardzo zaskakujący, byliśmy bowiem pod silnym wrażeniem pracy I. D. Raacke [21—23], a przede wszystkim wyników naszej poprzedniej pracy [26], w której donieśliśmy o występowaniu pokaźnych ilości peptydów w dojrzałych nasionach łubinu. Pozorne sprzeczności istniejące między naszymi wynikami zostały spowodowane różnymi obiektami badań, a mianowicie: w poprzedniej pracy analizowaliśmy nasiona łubinu dojrzałe w warunkach polowych, nasiona przed analizą były przechowywane w temp. pokojowej przez okres około 6 miesięcy, podczas gdy w obecnej pracy nasiona ze wszystkich faz dojrzewania były natychmiast po wyluszkaniu ze strąków liofilizowane. Brak peptydów w niedojrzałych i dojrzałych a liofilizowanych nasionach łubinowych i wyraźna ich obecność w nasionach dojrzałych, nie liofilizowanych i magazynowanych przed analizą przez okres około 6 mies. sugeruje, że w przypadku łubinów peptydy nie stanowią prekursorów syntetyzowanych globulin — są natomiast produktami ich odbudowy w okresie „dojrzewania wtórnego“. Badania, które obecnie prowadzimy mają wyjaśnić mechanizm tworzenia się peptydów w dojrzałych nasionach.

Należy podkreślić, że różnice w interpretacji funkcji peptydów w procesie dojrzewania nasion łubinu i grochu, o których wyżej wspomnieliśmy, nie wypływają z porównywalnych faktów doświadczalnych. I. D. Raacke [21—23] uważała za azot peptydowy różnicę między azotem niebiałkowym a sumą niebiałkowego azotu aminowego i amidowego, przy czym wszystkie wartości liczbowe były obliczone, a nie pochodziły z bezpośrednich oznaczeń. Azot niebiałkowy stanowił różnicę między azotem ogólnym a azotem białkowym, natomiast niebiałkowy azot aminowy i amidowy wyliczono odejmując od doświadczalnie oznaczonego azotu aminowego i amidowego ogólnego wartość azotu aminowego i amidowego białkowego (również oznaczonego doświadczalnie).

W naszej poprzedniej pracy [26] obliczaliśmy, podobnie jak I. D. Raacke, azot peptydowy z różnicy między azotem niebiałkowym a sumą azotu aminowego i amidowego. Różnica między postępowaniem I. D. Raacke a naszym polega na tym, że wszystkie wymienione formy azotu oznaczaliśmy doświadczalnie, a co więcej — dopiero wtedy zdecydowaliśmy się na matematyczne obliczenie azotu peptydowego, kiedy stwierdziliśmy wyraźny wzrost azotu aminowego po hydrolizie ekstraktu uwolnionego od białka.

W obecnej pracy wykazaliśmy, że we wszystkich analizowanych nasionach nie występowały uchwytne ilości peptydów, gdyż mimo dużych różnic między azotem niebiałkowym a sumą azotu amidowego i amino-

wego, nie stwierdziliśmy w żadnym przypadku wzrostu azotu aminowego po hydrolizie ekstraktów uwolnionych od białka (mimo stosowania trzech różnych typów hydrolizy). Między postępowaniem I. D. Raacke a naszym jest jeszcze ta różnica, że I. D. Raacke oddzielała białko z ekstraktu przy pomocy dializy, my natomiast wytrącaliśmy je na gorąco około 9% kwasem trójchlorooctowym. I. D. Raacke [21] na podstawie prób wykonanych na preparatach białkowych wyizolowanych z grochu przestrzega przed stosowaniem kwasu trójchlorooctowego do wytrącania białek, gdyż zależnie od warunków, może on spowodować niekompletne wytrącanie białek, a szczególnie albumin, jak również może łącznie z białkami wytrącić wszystkie lub część peptydów. W tym stanie rzeczy nasz pośredni dowód na nieobecność peptydów w ekstrakcie odbiałczonym przy pomocy kwasu trójchlorooctowego może wydawać się mało przekonywujący, gdyż peptydy mogły być wytrącone razem z białkiem. To przypuszczenie jest jednak niesłuszne, gdyż, jak już wspomnieliśmy, azot oznaczany w osadzie wytrąconym z ekstraktu zasadniczego kwasem trójchlorooctowym wykazuje dużą zgodność z sumą azotu globulinowego i albuminowego, oznaczonego po dializie ekstraktu.

Jak już wspomnieliśmy, również i S. P. Spragg [24] stwierdził obecność dużych ilości peptydów we wczesnych fazach rozwojowych grochu. S. P. Spragg ekstrahował zliofilizowany materiał roślinny najpierw 70% etanolem, a z pozostałości ekstrahował „peptydy“ przy pomocy gorącej wody. Chociaż postępowanie to nie jest bez zarzutu, (arginina nie da się całkowicie wyekstrahować przy pomocy etanolu, a także niektóre albuminy nie ulegają termicznej koagulacji) to jednak autor wykazał w sposób przekonywujący, że w jego frakcji wodnej znajdowały się peptydy.

W tym stanie rzeczy udział peptydów w syntezie globulin grochu wydaje się być dość pewny, niemniej przyłączamy się skwapliwie do stwierdzenia E. W. Yemma i B. F. Folkesa [31], że „konieczne są bardziej krytyczne metody rozdziału i charakterystyki roślinnej frakcji peptydowej“ — wtedy bowiem dopiero będzie istniała płaszczyzna umożliwiająca porównanie wyników uzyskanych przez różnych autorów.

Na zakończenie dyskusji o peptydach chcielibyśmy zwrócić uwagę na tak zwany przez nas azot „pseudo białkowy“, który otrzymaliśmy mineralizując osad wytrącający się z odbiałzonego ekstraktu w trakcie usuwania z niego kwasu trójchlorooctowego przy pomocy eteru. Jak już wspomnieliśmy, osadu tego nie badaliśmy, istnieje więc możliwość, że w skład niego wchodzi również frakcja peptydowa. Przypuszczamy jednak, na podstawie warunków, w których uległ on wytrąceniu, że należy on do lipoproteidów, na co wskazywałaby również bardzo wyrównana jego

zawartość we wszystkich fazach rozwojowych nasion (Tabl. 2 — pozycja 5).

Następną sprawą, którą należy przedyskutować, to bilans azotu niebiałkowego. Oprócz pierwszej fazy rozwoju nasion łubinu białego, gdzie suma azotu aminowego, amidowego i allantoinowego osiąga wartość azotu niebiałkowego (a nawet nieco ją przewyższa), we wszystkich fazach rozwoju łubinu białego i wąskolistnego istnieje deficyt bilansowy, który w miarę dojrzewania nasion wyraźnie się pogłębia. Jak już uzasadniliśmy, nie możemy tej luki wytłumaczyć obecnością frakcji peptydowej, należałoby się więc zastanowić czym ją wytłumaczyć. Niewątpliwie, uwzględnienie azotu alkaloidowego, purynowego a także azotu innych zasad organicznych wpłynęłoby na pewne poprawienie obecnego bilansu. Przypuszczamy jednak, że ważniejszą przyczyną obecnych trudności bilansowych jest operowanie przez nas wartością azotu aminowego zamiast wartością azotu występującego we frakcji wolnych aminokwasów. Różnica między tymi dwiema wartościami może być bardzo znaczna, a szczególnie wtedy, gdy frakcja wolnych aminokwasów będzie bogata w aminokwasy zasadowe — a szczególnie w argininę. Chcemy też zwrócić uwagę na pewną zbieżność obserwowaną szczególnie wyraźnie u łubinu białego — a mianowicie wyraźnemu pogłębieniu się deficytu bilansowego w miarę rozwoju nasion towarzyszy bardzo wyraźny wzrost procentowej zawartości argininy w puli wolnych aminokwasów (od 1% do 33%). Tak więc dodatkowe uwzględnienie azotu reszty guanidynowej argininy (nie można go oznaczyć metodą C. G. Pope'a i M. F. Stevens'a [20]) w ostatniej fazie rozwoju łubinu białego powiększy bardzo wyraźnie wartości azotu „aminowego“ — a przez to zmniejszy bardzo pokaźnie istniejącą w tej fazie największą różnicę między N-niebiałkowym, a sumą N-aminowego i amidowego. Niemniej sprawa ta wymaga dalszych dokładnych badań.

Mimo, że przeprowadzona w tej pracy analiza ilościowa wolnych aminokwasów wykazuje pewne luki, uzyskane wyniki są bardzo ciekawe. A oto niektóre z nich: istnieje wyraźna różnica we frakcji wolnych aminokwasów łubinu białego i wąskolistnego — różnica ta dotyczy zarówno poziomu jak i korelacji poszczególnych aminokwasów i wreszcie kierunku zmian zachodzących w trakcie rozwoju nasion (Rys. 9—12). W przypadku łubinu białego gwałtownej syntezy globulin (Tabl. 2 — stadium 2—6) towarzyszy gwałtowny spadek zawartości kwasu asparaginowego (asparaginy) i alaniny oraz wyraźny wzrost argininy, podczas gdy poziom kwasu glutaminowego (wzgl. glutaminy) ulega tylko drobnym wahaniom (Rys. 9 i 10). W dojrzałych nasionach łubinu białego arginina jest aminokwasem dominującym i stanowi 1/3 całej frakcji wolnych aminokwasów, przy czym w dojrzałych nasionach łubinu wąskolistnego głównymi amino-

kwasami są: kwas glutaminowy, arginina i kwas asparaginowy. Brak ilościowego oznaczenia proliny uniemożliwia nam prześledzenie stosunków panujących w „rodzinie“ aminokwasów kwasu glutaminowego [31]. Pokażne ilości argininy i kwasu glutaminowego wskazują wyraźnie, że aminokwasy tej „rodziny“ odgrywają bardzo ważną rolę w metabolizmie azotu w nasionach łubinów.

Elektroforeza bibułowa globulin łubinu białego i wąskolistnego w buforze weronalowym wykazuje odpowiednio 4 i 2 frakcje.

Różne zachowanie się tej samej mieszaniny globulin w czasie elektroforezy bibułowej w różnych buforach pozwala domniemywać, że precyzyjne ilościowe oznaczenie wszystkich składników globulinowych będzie trudne, tym bardziej, że sprawa dodatkowo się komplikuje odwracalnymi procesami dysocjacyjno-asocjacyjnymi [13, 9]. Mimo to sądzimy, że dokonana w tej pracy ilościowa wycena składników globulinowych rozdzielonych na drodze elektroforezy bibułowej upoważnia nas do stwierdzenia, że synteza poszczególnych składników globulinowych przebiega w różnych okresach z różną szybkością i dla każdego składnika oddzielnie, przy czym nie wydaje się prawdopodobne, że np. kosztem jednego składnika globulinowego następowała synteza drugiego. Wniosek ten jest zgodny z wynikami analizy składu aminokwasowego poszczególnych frakcji globulinowych uzyskanymi przez Th. Gerritsena [9]. Wykazał on, że różne frakcje globulin różnią się składem aminokwasowym, a więc jedna globulina nie może być prekursorem drugiej, gdyż wtedy ich skład aminokwasowy musiałby być bardzo podobny.

Praca nie dostarczyła dowodów, które by wskazywały na to, że w procesie syntezy białek biorą bezpośrednio udział aminokwasy. Ich ubytek obserwujemy również w okresie poprzedzającym gwałtowną syntezę globulin, w którym to okresie następuje prawdopodobnie intensywny spadek zawartości azotu ogólnego (Tabl. 2 i rys. 2). Dlatego wydaje się, że wolno nam w formie hipotezy stwierdzić, że syntetyzowane globuliny mogą wywodzić się z węglowodanów i z prostych związków azotowych.

STRESZCZENIE

W dziewięciu fazach rozwoju nasion łubinu białego i pięciu — nasion łubinu wąskolistnego oznaczano: N-ogólny, N-nierozpuszczalny, N-rozpuszczalny, N-białkowy, N-albuminowy, N-globulinowy, N-poszczególnych frakcji globulinowych, N-aminowy, N-amidowy, N-aminowy poszczególnych wolnych aminokwasów, N-allantoinowy.

Stwierdzono, że w nasionach łubinu białego i wąskolistnego synteza związków azotowych jest szybsza niż węglowodanów i tłuszczowców.

Intensywny wzrost azotu białkowego wynika niemal wyłącznie z przyrostu globulin. Różne krzywe syntezy globulin i albumin sugerują, że obydwa typy białek są syntetyzowane niezależnie od siebie. Również niezależne od siebie są drogi syntezy poszczególnych frakcji globulinowych.

Suma N-aminowego i N-amidowego nie stanowi 100% azotu niebiałkowego. Różnica tej nie stanowi N-peptydowy, gdyż w badanych (liofilizowanych) nasionach nie stwierdzono obecności peptydów. Peptydy więc nie stanowią frakcji pośredniej na drodze syntezy białek w dojrzewających nasionach łubinu. Wydaje się natomiast, że są produktami ich odbudowy, gdyż wyraźne ilości peptydów stwierdziliśmy dopiero w nasionach dojrziałych i magazynowanych w temperaturze pokojowej [26].

We wszystkich fazach rozwoju nasion zidentyfikowano 16 wolnych aminokwasów. Duże ilości oraz zmiany zawartości kwasu glutaminowego, kwasu asparaginowego, alaniny, kwasu γ -amino-masłowego, a szczególnie argininy, sugerują duże znaczenie tych aminokwasów w metabolizmie rozwijających się nasion łubinu. Praca jednak nie dostarczyła dowodu, że globuliny są syntetyzowane wprost z wolnych aminokwasów.

LITERATURA

- [1] Albanese A. A., Irby V., *J. Biol. Chem.* **153**, 583, 1944.
- [2] Buchanan D. L., *Anal. Chem.* **29**, 1877, 1957.
- [3] Danielsson C. E., *Acta Chem. Scand.* **5**, 541, 1951.
- [4] Danielsson C. E., *Acta Chem. Scand.* **6**, 149, 1952.
- [5] Danielsson C. E., *Biochem. J.* **44**, 387, 1949.
- [6] Durrum E. L., *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 2943, 1950.
- [7] Fowden L., *Annals of Botany* **18**, 417, 1954.
- [8] Fowden L., *Biochem. J.* **48**, 327, 1951.
- [9] Gerritsen Th., *Biochim. Biophys. Acta* **22**, 269, 1956.
- [10] Gurnani S. U., Kumta U. S., Sahasrabudhe M. B., *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 553, 1955.
- [11] Hyde T. G., *Proc. Roy. Soc. Edinburgh (B)* **65**, 299, 1954.
- [12] Jencks W. P., Jettan M. R., Durrum E. L., *Biochem. J.* **60**, 205, 1955.
- [13] Joubert F. J., *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 370, 1955.
- [14] Lüderitz O., Westphal O., Eichenberger E., Neter E., *Biochem. Z.* **330**, 21, 1958.
- [15] Magas S., *Postępy Biochemii* **2**, 157, 1956.
- [16] Mothes K., Engelbrecht L., *Flora*, **143**, 428, 1956.
- [17] Nehring K., Schwerdtfeger E., *Lebens. Unters. u. Forsch.* **105**, 12, 1957.
- [18] Osborne T. B., w *Abderhalden, Handlexikon der biologischen Arbeitsmethoden* t. 4, Berlin, 1911.
- [19] Perrin C. H., *Anal. Chem.* **25**, 968, 1953.
- [20] Pope C. G., Stevens M. F., *Biochem. J.* **33**, 1070, 1939.
- [21] Raacke I. D., *Biochem. J.*, **66**, 101, 1957.
- [22] Raacke I. D., *Biochem. J.*, **66**, 110, 1957.
- [23] Raacke I. D., *Biochem. J.*, **66**, 113, 1957.

- [24] Spragg S. P., *Nitrogen Metabolism in the Developing Pea Seed* (praca doktorska), Bristol, 1955, cyt. za Yemm E. W. i Folkes B. F. [31].
- [25] Varner J. E., Bullen W. A., Vanecko S., Burrell R. C., *Anal. Chem.* **25**, 1529, 1953.
- [26] Wiewiórowski M., Augustyniak J., Skrzypińska H., *Roczn. Nauk. Roln.* **79-A-1**, 19, 1958.
- [27] Wiewiórowski M., Przybylska J., Kociałkowski Z., *Roczn. Nauk. Roln.* **79-A-1**, 453, 1958.
- [28] Wiewiórowski M., Augustyniak J., *Acta Biochim. Polon.* **3**, 345, 1956.
- [29] Wolfe N., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 186, 1957.
- [30] Yemm E. W., Cocking E. C., *Analyst* **80**, 209, 1955.
- [31] Yemm E. W., Folkes B. F., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **9**, 245, 1958.
- [32] Young E. G., Conway C. F., *J. Biol. Chem.* **142**, 839, 1942.

STUDIES ON LUPINE PROTEIN

Summary

Authors have estimated the various nitrogen compounds during several stages of ripening in lupine seeds (*Lupinus albus* and *Lupinus angustifolius*). The following values of nitrogen were determined: total, insoluble, protein, albumin, globulin, of separate globulin fractions, amino, amido, of individual amino acids and allantoine.

The seeds showed a higher rate of the synthesis of nitrogen compounds than that of carbohydrates and lipids one. The considerable increase in protein nitrogen is mainly due to the increase of globulins. The different shapes of the curves illustrating the rate of globulins and albumins synthesis suggest that the two processes run independently one from another. The synthesis of separate globulin fractions appears also to run its own way for each fraction.

The sum of amino-N and of amido-N does not account for 100% of non-protein N. Peptide N is not responsible for the deficiency, since authors have not found any peptides in the tested (liophilized) seeds. Thus peptides are not any intermediate stage in protein synthesis. It seems possible, however, that peptides are some products of protein reconstruction, since authors have found greater amounts of peptides in ripened and stored at room temperature seeds only [26].

Authors have identified 16 free amino acids during all stages of seeds growth. The large amounts and apparent changes in the contents of glutamate, aspartate, alanine, γ -aminobutyric acid and especially arginine suggest that these amino acids might play some important role in the metabolism of ripening lupine seeds.

This report did not provide, however, any evidence for the direct globulin synthesis from free amino acids.

Otrzymano 7.10.1958 r.

J. HELLER, P. SZAFRAŃSKI and E. SUŁKOWSKI

AMINO ACIDS ACTIVATION IN RELATION TO THE SYNTHESIS OF SILKPROTEIN

*Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa
Zakład Biochemii Ewolucyjnej*

A study of the amino acid carboxyl groups activation in various organs of guinea pig reported in our previous paper [10] raised doubts whether there is any relationship between the rate of activation of an amino acid and its contents in protein. The silk glands of a silkworm lend themselves particularly well to the study of such a problem. The two parts of these glands produce two different proteins, namely fibroin and sericin, the amino acid composition of these two proteins being well known. Therefore it was of interest to study if there exists any quantitative relationship between the rate of activation of individual amino acids and their contents in fibroin and sericin.

EXPERIMENTAL AND RESULTS

The silkworm caterpillars (*Bombyx mori*, White Adrianopol race) were used. The caterpillars were anaesthetized with ether on the 5-th to 7-th day of the last larval period, then bleed and posterior as well as middle silk glands were removed.

Enzymatic preparations. The posterior silk glands isolated from 10 caterpillars were washed with distilled water, homogenized in a glass Potter homogenizer for 1.5 min. at about 1000 r.p.m. with 5 ml. 0.02M "tris" buffer pH 7.8 and allowed to stand for 15 min. in ice. All further operations were performed at temperature near 0°. The sediment was then discarded and the supernatant adjusted to an adequate pH with 0.1 N-HCl.

It is admitted generally that the protein precipitated at pH 5 is the most active one. Our experiments revealed, however, that the fraction precipitated from the silk glands homogenate at pH 4.3 was the most active towards glycine and tryptophane. When pH was lower than 4.3 denatura-

tion of protein occurred. Thus, pH 4.5 was chosen to avoid the risk of denaturation. The precipitated protein was centrifuged as soon as possible and dissolved in 1 ml. of 0.2 M "tris" buffer pH 7.8. The insoluble residue was removed by centrifugation, the supernatant being used in experiments.

The middle silk glands isolated from 10 caterpillars were washed with water, placed in ice cold water, and the jellied silk substance was removed. This manipulation lasted for about 20 minutes. The homogenization and the whole further procedure was the same as that applied to the posterior silk glands.

The haemolymph deriving from 10 caterpillars was treated with saturated ammonium sulphate solution (acidified with 1 N-HCl to pH 3.5) to final 0.6 saturation. All manipulations were carried out at 0°. The mixture was then adjusted to pH 5 with 0.1 N-HCl, allowed to stand for 10 min., the precipitate centrifuged and dissolved in 1 ml. of 0.2 M "tris" buffer pH 7.8. This solution was used in experiments.

The biuret method [4] was used to determine the protein contents in the enzymatic preparations. The protein contents ranged from 15 to 50 mg. per ml. The incubation mixture and conditions of incubation and the determination were identical with those described in our former paper [10]. Amino acids tested were as follows: DL-alanine, glycine, L-histidine, L-glutamic acid, DL-serine, L-tryptophan and L-tyrosine. When DL-amino acids were employed their concentration was twice that used for L-amino acids. The control test contained 0.2 ml. of "tris" buffer instead of amino acid solution. Each experiment was repeated 3—4 times, the enzymatic preparation being a new one every time deriving from another portion of caterpillars.

The results obtained are listed in Table 1, the standard deviations of the means being included. The results show that all examined amino acids do undergo some activation. The rate of activation varies with various amino acids. This holds as well for the rates of activation of various amino acids in one tissue as for the same amino acid in posterior or middle silk glands or in haemolymph. Tryptophan and tyrosine were the two amino acids which showed the highest rate of activation in posterior and middle silk glands. The posterior silk glands activated the serine carboxyl groups to a great extent, while glutamate and histidine were highly activated by middle silk glands. The rate of tyrosine and tryptophan activation in haemolymph was by far not so high as in silk glands. However, in the case of tyrosine it was still twice that found for other amino acids, glutamate excluded. In general, the rate of amino acids activation was rather more steady in haemolymph than in silk glands. Glycine showed the lowest rate of activation in examined tissues. It was several times

Table 1

Activation of amino acids in the silk glands and haemolymph of caterpillars of *Bombyx mori* L.

Values means \pm S. D. of the mean of 3-4 different samples

No.	Amino acids	μ mole of hydroxamates/mg of protein/hour		
		Posterior glands	Middle glands	Haemolymph
1	DL-Alanine	0.068 \pm 0.03	0.088 \pm 0.03	0.085 \pm 0.04
2	Glycine	0.038 \pm 0.00	0.073 \pm 0.01	0.057 \pm 0.02
3	L-Histidine	0.098 \pm 0.01	0.286 \pm 0.15	0.060 \pm 0.02
4	L-Glutamic acid	0.031 \pm 0.02	0.258 \pm 0.07	0.105 \pm 0.03
5	DL-Serine	0.318 \pm 0.05	0.168 \pm 0.04	0.079 \pm 0.02
6	L-Tryptophan	0.623 \pm 0.10	0.406 \pm 0.21	0.071 \pm 0.03
7	L-Tyrosine	0.600 \pm 0.19	0.370 \pm 0.18	0.150 \pm 0.06

lower than that found for tyrosine and tryptophan. The fact is all the more surprising in view of a high glycine concentration in fibroin.

These results induced us to consider another way of activation, perhaps by means of transacylation [6, 7]. In view of the high rate of activation of tryptophan and tyrosine it seemed possible that the active forms of these two amino acids might participate in the transfer of the adenilic residue to glycine. We investigated this possibility using the enzymatic preparations of posterior silk glands. The rate of activation of glycine alone was studied as well as that of glycine in the presence either of tryptophan or of tyrosine. Incubation was carried on for 60 min., then the reaction was stopped by heating to 100°, and samples for paper chromatography were prepared. The chromatographic analysis was needed to differentiate the hydroxamates formed as they all produce the same colour in colorimetric assays. The heat denatured protein was removed by centrifugation, the supernatant evaporated and the remaining free hydroxylamine removed by distillation over concentrated sulfuric acid. The hydroxamates were extracted from the residue by means of the acidified ethanol (0.5 ml. of concentrated hydrochloric acid per 10 ml. of ethanol). Then the suspension was centrifuged and the ethanol extract dried over calcium chloride. The sediment was dissolved in one drop of water and transferred on Whatman No. 1 filter paper, and the descending chromatography was carried out. The solvent used was *n*-butanol-glacial acetate-water (90 : 10 : 10) [5]. The chromatograms were developed with a mixture containing trichloroacetic acid, hydrochloric acid and ferric chloride [2].

When glycine alone was the substrate we could not demonstrate any glycine-hydroxamate on the chromatogram. This is due to a low rate of

glycine activation as well as to some loss related usually to the extraction of the hydroxamates from the incubated mixture. The standard solution of the glycine-hydroxamate had an $R_F = 0.02$. The chromatographic analysis of the samples containing either glycine and tryptophan or glycine and tyrosine did not reveal the presence of glycine-hydroxamate, too. We found only tryptophan- or tyrosine-hydroxamates ($R_F = 0.23$ and 0.22 , respectively). The R_F values of these hydroxamates diverge so much from the R_F of glycine-hydroxamate that it is impossible to overlook the presence of glycine. The results we obtained prove that the presence of activated tryptophan or tyrosine does not influence the rate of glycine activation. Thus, our experiments do not support the transacylation hypothesis.

DISCUSSION

Many authors stated that some amino acids show an extremely high rate of activation as compared to others. These are first of all tryptophan and tyrosine. We found a similar fact in our experiments, where it was especially outstanding when compared to the quantitative share of these amino acids in silkproteins. The amino acid composition of these proteins is given in Table 2. Fibroin contains as much as 42% of glycine, while

Table 2

The percentage of some amino acids in silkproteins after Fukuda et al. [3]

Amino acids	Fibroin (posterior glands)	Sericin (middle glands)
Alanine	28.30	4.00
Glycine	42.80	8.60
Histidine	0.35	1.39
Glutamic acid	1.37	10.65
Serine	14.70	30.10
Tryptophan	0.26	—
Tyrosine	13.75	3.80

sericin contains 30% of serine. The rate of activation of these amino acids is unproportionally low in comparison with their concentration in protein. On the other hand, other amino acids such as tryptophan and tyrosine are strongly activated in spite of their low concentration in silkprotein. Our experiments show therefore that there is no relationship between the rate of activation of an amino acid and its concentration in protein.

These results could be comprehensible from the standpoint of the theory of activation if one assumed that some amino acids might be activated indirectly by other already activated amino acids. We failed, however, to obtain any transacylation in our attempts to find an activation of glycine in the presence of highly activated tryptophan and tyrosine. Thus, the question as to how glycine, the main constituent of fibroin, is introduced to the course of silkprotein synthesis still remains open. It is incorporated, may be, as a component of some peptides. Unequal distribution of ^{14}C -glycine, when injected to haemolymph [9] may be considered as an evidence supporting this suggestion. Yet synthesis of the known peptides requires also activation of amino acids [1]. Thus, the observed rate of glycine activation should also be high in such a case. We did not find it in our experiments with glycine, as well as in those performed with serine and alanine. Thus, we are faced with the possibility that the incorporation of some amino acids into protein must occur by means other than the activation of carboxyl groups.

SUMMARY

The rate of activation of seven amino acids was studied in silk glands and in haemolymph of silkworm caterpillars. The hydroxamic method was used.

Tryptophan and tyrosine showed the highest rate of activation in posterior silk glands as well as in the middle ones, whereas glycine showed the lowest rate of activation in these tissues.

We failed to find the glycine transacylation with activated tryptophan and tyrosine.

Since fibroin contains over 40% of glycine and 0.26% of tryptophan only, our results suggest that some amino acids might be incorporated into protein otherwise than by carboxyl group activation.

We wish to thank to Eng. St. Kędzierski from the Silk Institute in Milanówek for kindly supplying the silkworm caterpillars for this study, and we are indebted to Miss K. Derkus for her technical assistance.

REFERENCES

- [1] Borsook H., *3-ème Congr. Int. Biochim.*, Bruxelles, Rapports, **54**, 1955.
- [2] Davie E. W., Koningsberger V. V., Lipmann F., *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 21, 1956.
- [3] Fukuda T., Kirimura J., Matuda M., Suzuki T., *J. Biochem.* **42**, 341, 1955.

- [4] Kingsley G. R., *J. Lab. Clin. Med.* **27**, 840, 1942.
[5] Koningsberger V. V., Van Der Grinten Ch. O., Overbeek J., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 483, 1957.
[6] De Moss J. A., Novelli G. D., *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 592, 1955.
[7] Novelli G. D., De Moss J. A., *J. Cell. Comp. Physiol.* **50**, suppl. 1, 173, 1957.
[8] Safir S. R., Williams J. H., *J. Organ. Chem.* **17**, 1298, 1952.
[9] Shimura K., Fukui H., Sato J., Saeki R., *J. Biochem.* **43**, 101, 1956.
[10] Szafranski P., Sulkowski E., *Acta Biochim. Polon.* **6** (this issue), 133, 1959.

AKTYWACJA AMINOKWASÓW W SYNTEZIE BIAŁEK JEDWABIU

Streszczenie

Przebadano aktywację siedmiu aminokwasów w gruczołach przednich oraz hemolimfie gąsienic *Bombyx mori* L. W badaniach stosowano metodę hydroksamową.

Najintensywniej aktywowanymi aminokwasami w gruczołach przednich zarówno tylnych jak i środkowych są tryptofan i tyrozyna, najslabiej glicyna. Aktywacja aminokwasów w hemolimfie jest bardziej równomierna.

Nie stwierdzono transacylacji glicyny za pośrednictwem zaktywowanych form tryptofanu i tyrozyny. Ponieważ fibroina zawiera ponad 40% glicyny i ślady tryptofanu rezultaty sugerują, że niektóre aminokwasy mogą być włączone do syntezy białka na innej drodze niż aktywacja grupy karboksylowej.

Otrzymano 5.11.1958 r.

W. RZECZYCKI

**KWAS NEURAMINOWY BIAŁEK SUROWICY KRWI.
SPOSOBY JEGO OZNACZANIA***Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Gdańsku**Kierownik: prof. dr Wł. Mozolowski*

Kwas neuraminowy występuje jako składnik części węglowodanowej pewnych białek ustrojowych, a między innymi i białek surowicy krwi człowieka. Ocena ilościowa tego związku w białkach ustrojowych, a szczególnie w białkach surowicy, ma coraz istotniejsze znaczenie, nie tylko teoretyczne ale i praktyczne. Bliższe dane o budowie i znaczeniu biologicznym kwasu neuraminowego podałem w pracy przeglądowej ogłoszonej w *Postęпах Biochemii* [6].

Oznaczanie kwasu neuraminowego w białkach surowicy krwi opiera się na reakcjach barwnych z takimi odczynnikami jak: orcyna, dwufeniloamina, rezorcyna czy też tryptofan z kwasem nadchlorowym. Oczywiście swoistość tych reakcji jest różna i wyniki uzyskane tymi metodami mogą różnić się znacznie pomiędzy sobą. Stosując nawet tę samą metodę można otrzymać odmienne wyniki w zależności od tego, jakich pochodnych kwasu neuraminowego użyto jako standardów do oznaczeń kolorymetrycznych. Odpowiedzi więc wymaga pytanie, czy oznaczając kwas neuraminowy jedną z wymienionych metod, oznaczamy rzeczywiście ten związek, oraz jaki jest wpływ innych substancji na uzyskany wynik. W pracy tej starałem się dojść do uzyskania odpowiedzi na powyższe pytanie dwiema drogami. Jedną z nich było porównanie wyników ilościowego oznaczania tego związku w surowicy krwi różnymi metodami. Drugą zaś znalezienie sposobu, którym by oznaczano tylko i wyłącznie kwas neuraminowy.

PREPARATY I UŻYTE ODCZYNNIKI

Kwas metoksyneuraminowy. Materiałem wyjściowym była mucyna ślinianek podszczękowych wołu, otrzymana według sposobu podanego przez Blixa [2]. Z mucyny preparowałem kwas, metoksyneuraminowy, według przepisu Weyganda i Rinno [14], zastępując żywicę jonowymienną

Dowex 2×10 odpowiadającą ilością Amberlitu IRA 400. Otrzymany związek charakteryzował się następującymi własnościami: $[\alpha]_D^{20} = -57,5^\circ$ ($c = 0,4$), zawartość azotu (oznaczona metodą Kjeldahla) 4,4%. Chromatograficznie dawał jedną plamę w układach *n*-butanol-kwas octowy-woda 4 : 1 : 5 (obj.) o $R_F = 0,09$ i *n*-propanol-woda 7 : 3 (obj.) o $R_F = 0,24$. Chromatogramy rozwijano techniką wstępującą i wywoływano według Böhma [3]. Z ninhydryną daje odczyn dodatni.

Kwas N-acetyloneuraminowy. Dla uzyskania tego związku z białek surowicy krwi człowieka posłużyłem się przepisem Svennerholma [8]. Preparat miał następujące własności: $[\alpha]_D^{20} = -32^\circ$ ($c = 0,4$). Zawartość azotu oznaczonego metodą Kjeldahla 4,5%. Chromatograficznie preparat dawał jedną plamę w układach *n*-butanol-kwas octowy-woda 4 : 1 : 5 (obj.) o $R_F = 0,15$ i butanol II rzędowy-kwas octowy-woda 4 : 1 : 5 (obj.) o $R_F = 0,59$. Chromatogramy rozwijano techniką wstępującą i wywoływano odczynnikiem używanym do wykrywania ketocukrów: orcyna-kwas trójchlorooctowy [1]. Kryształy oglądane pod mikroskopem były jednorodne i dawały obraz identyczny z kryształami otrzymanymi przez Failarda [4]. Próba redukcyjna wypadła dodatnio. Odczyn z ninhydryną ujemny.

Inne odczynniki. Chlorowodorek glikozaminy otrzymano hydrolizując kwasem solnym chitynę skorup raków i następnie oczyszczając przez krystalizację. D(+)-Galaktoza firmy The British Drug Houses LTD. D(—)-Mannoza dar, prof. dra Leona Kamińskiego. Orcyna cz. (Merck). Rezorcyna cz. (Merck) po przekrystalizowaniu z mieszaniny woda-alkohol etylowy. Dwufeniloamina cz. d.a. (radziecka). Kwas siarkowy cz. (Merck) po uprzednim 3 godzinnym gotowaniu. Kwas solny cz. d.a. firmy J. D. Riedel, Berlin. Kwas octowy lodowaty cz. produkcji polskiej po przedestyłowaniu. Alkohol *n*-butylowy firmy Xenon. Alkohol butylowy II-rzędowy cz. produkcji Fluka, Szwajcaria. Alkohol *n*-propylowy cz. wyrabiany przez VEB Schering Adlershof, Berlin.

PORÓWNANIE METOD ILOŚCIOWEGO OZNACZANIA KWASU NEURAMINOWEGO W SUROWICY KRWI

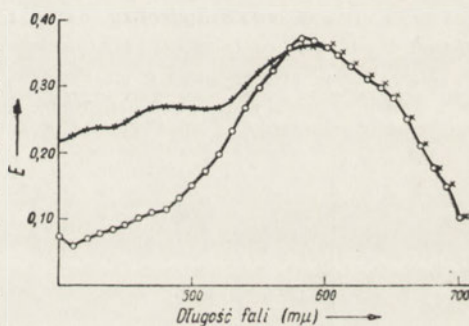
Porównano ze sobą trzy metody: orcynową, rezorcynową i dwufeniloaminową. Nie włączyłem w zakres swej pracy sposobu posługującego się odczynnikiem aldehydowym Ehrlicha [13] oraz tryptofanem z kwasem nadchlorowym [15]. Próbę Ehrlicha uważa się za mało swoistą [9], a zatem nie nadającą się do oznaczania kwasu neuraminowego w surowicy krwi. Reakcji barwnej z tryptofanem i kwasem nadchlorowym, chociaż używanej do tego celu [15], nie włączyłem w zakres porównywanych metod dla-

tego, że charakteryzuje ją stosunkowo mała czułość (około 5—6 razy mniejsza od metody orcynowej czy też rezorcynowej), a oznaczanie odbywa się przy długości fali (równej 500 $m\mu$), przy której nie ma wyraźnego maksimum absorpcji.

Oznaczanie przy użyciu odczynnika orcynowego wykonywano według przepisu Böhma [3], przystosowując objętość końcowego roztworu tak, aby można było wykonać oznaczenia w probówkach 6—304 spektrofotometru Coleman Junior, przy długości fali 570 $m\mu$ [5].

Reakcję z dwufeniloaminą przeprowadzono według Seifera i Gerstenfelda [7]. Absorbpcję odczytywano w spektrofotometrze Coleman Junior, przy długości fali 530 $m\mu$.

Przydatność metody rezorcynowej do oznaczania kwasu neuraminowego w białkach surowicy krwi oparto na spostrzeżeniach Svennerholma i własnym doświadczeniu. Posługiwano się odczynnikiem rezorcynowym, sporządzonym według przepisu podanego przez Svennerholma [10]: 2 g rezorcyny rozpuszczono w 100 ml wody destylowanej (roztwór trwały przez miesiąc w lodówce). Do 10 ml tego roztworu dodano 80 ml stężonego kwasu solnego i 0,25 ml 0,1 M siarczanu miedziowego. Objętość odczynnika doprowadzono do 100 ml wodą destylowaną. Odczynnik jest trwały przez tydzień, jeżeli jest przechowywany w lodówce. Z pracy Svennerholma było wiadomo, że odczynnik rezorcynowy daje zabarwienie z kwasem neuraminowym i z różnego rodzaju cukrami. W mieszaninie kwasu neuraminowego i cukrowca można metodą orcynową oznaczyć te związki obok siebie. Dla stwierdzenia czy ten odczynnik da się zastosować do oznaczeń kwasu neuraminowego w surowicy krwi, przeprowadziłem następujące doświadczenia. Sporządziłem wykresy absorpcji w reakcji rezorcynowej dla roztworu kwasu metoksyneuraminowego i surowicy, tak dobierając stężenie kwasu metoksyneuraminowego, aby absorpcja dwóch porównywanych płynów przy długości fali 580 $m\mu$ była sobie równa. Z wykresu (Rysunek 1) ilustrującego to doświadczenie widać, że maksimum absorpcji dla standardów kwasu neuraminowego i dla surowicy jest w 580 $m\mu$ i, że prawie (od



Rys. 1. Absorbpcja światła w reakcji rezorcynowej: surowicy krwi $\times-\times$, roztworu kwasu metoksyneuraminowego $-●-$. Stężenie kwasu metoksyneuraminowego dobrano tak, by absorpcja w 580 $m\mu$ odpowiadała absorpcji uzyskanej z 0,1 ml surowicy. Absorbpcję odczytywano na spektrofotometrze Coleman Junior model 6 w probówkach 6-304

związki obok siebie. Dla stwierdzenia czy ten odczynnik da się zastosować do oznaczeń kwasu neuraminowego w surowicy krwi, przeprowadziłem następujące doświadczenia. Sporządziłem wykresy absorpcji w reakcji rezorcynowej dla roztworu kwasu metoksyneuraminowego i surowicy, tak dobierając stężenie kwasu metoksyneuraminowego, aby absorpcja dwóch porównywanych płynów przy długości fali 580 $m\mu$ była sobie równa. Z wykresu (Rysunek 1) ilustrującego to doświadczenie widać, że maksimum absorpcji dla standardów kwasu neuraminowego i dla surowicy jest w 580 $m\mu$ i, że prawie (od

maksimum) strony krzywych (dla tych substancji) pokrywają się ze sobą. Natomiast ich lewe strony przebiegają odmiennie, a mianowicie krzywa dla surowicy biegnie wyżej i ma tendencję do drugiego maksimum przy 470 m μ . Z danych tych można wyciągnąć wniosek, że różnica ta jest związana z nakładaniem się na wynik innych związków powstających podczas ogrzewania białka z odczynnikiem rezorcynowym. W kwaśnej hydrolizie, jaka ma miejsce przy ogrzewaniu z odczynnikiem rezorcynowym, mogą odszczepić się poszczególne składniki białek jak aminokwasy i cukry. Dlatego zbadano absorpcję reakcji rezorcynowej tych związków przy długości fali 470 m μ i 580 m μ (Tablica 1). Wykazano, że istotny wpływ może mieć przede wszystkim galaktoza i mannoza. Wykreślenie

Tablica 1

Absorpcja światła w długości fali 470 oraz 580 m μ związków, które mogą uwolnić się w czasie hydrolizy białka z odczynnikiem rezorcynowym

Próby: 2 ml roztworu badanego, 4 ml odczynnika rezorcynowego, ogrzewane 15 minut w 100°. Powstały barwik ekstrahowano 6 ml alkoholu amylowego. Absorbencję oznaczono w spektrofotometrze Coleman Junior model 6 w probówkach 6-304

Składnik	μ g	A _{470mμ}	A _{580mμ}
Galaktoza 400		0,23	0,04
Mannoza 500		0,42	0,09
Mieszanina aminokwasów I*)	1140	0	0
Mieszanina aminokwasów II**)	1000	0	0
Mieszanina aminokwasów III***)	1000	0	0
Tryptofan 500		0,04	0,01
Glikozamina-HCl	400	0,03	0

*) Mieszanina składająca się z ilości ekwimolarnych seryny, kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, glicyny, argininy i feniloalaniny.

***) Mieszanina składająca się z ilości ekwimolarnych lizyny, histydyny, alaniny, tyrozyny, feniloalaniny, walny i leucyny.

****) Mieszanina składająca się z ilości ekwimolarnych alaniny, kw. asparaginowego, cysteiny, glicyny, histydyny, leucyny, metioniny i treoniny.

krzywych absorpcji dla galaktozy i mannozy wykazuje, że istotnie maksimum absorpcji dla tych cukrów przypada przy 470 m μ (Rysunek 2). Wobec tego oznaczanie kwasu neuraminowego w białkach surowicy przeprowadza się jak w mieszaninie kwasu neuraminowego i galaktozy z mannozą.

Jeżeli zmieszamy odpowiednie ilości kwasu metoksyneuraminowego z mannozą i galaktozą otrzymuje się wykres absorpcji (Rysunek 2) bardzo podobny do wykresu uzyskanego z surowicą (Rysunek 1). Przyjmuje się, że w białkach surowicy stosunek galaktozy do mannozy jest jak 1 : 1 [15]. Barwik powstający w reakcji rezorcynowej mieszaniny tych cukrów i kwasu neuraminowego wykazuje absorpcję, która w długości fali 470 oraz 580 $m\mu$ jest wartością addytywną poszczególnych składników; można zatem ułożyć następujące 2 równania:

$$A_{470} = K_2 C_1 + K_4 C_2,$$

$$A_{580} = K_1 C_1 + K_3 C_2.$$

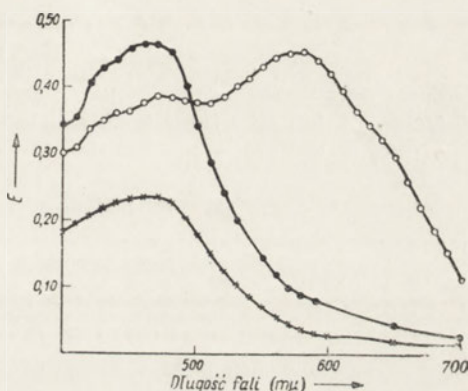
Symbole A_{470} i A_{580} oznaczają wielkość absorpcji mieszaniny cukru i kwasu neuraminowego odpowiednio w 470 i 580 $m\mu$. K_1 jest współczynnikiem absorpcji dla kwasu neuraminowego w długości fali 580 $m\mu$; K_2 — współczynnikiem absorpcji dla kwasu neuraminowego w długości fali 470 $m\mu$; K_3 — współczynnikiem absorpcji mieszaniny cukrów w długości fali 580 $m\mu$; K_4 — współczynnikiem absorpcji mieszaniny cukrów w długości fali 470 $m\mu$; C_1 — zawartość kwasu neuraminowego w próbce oznaczanej; C_2 — zawartość mieszaniny cukrów galaktozy z mannozą (w stosunku 1 : 1) w próbce oznaczanej.

Współczynnik absorpcji K , to jest stosunek $\frac{A}{C}$, wylicza się z oznaczonej absorpcji określonej ilości danego składnika w odpowiadającej długości fali.

Na tej podstawie można obliczyć zawartość kwasu neuraminowego surowicy z wzoru:

$$C_1 = \frac{A_{580} \cdot K_4 - A_{470} \cdot K_3}{K_1 \cdot K_4 - K_2 \cdot K_3}$$

Słuszność tego założenia potwierdza fakt, że dodatek standardów kwasu neuraminowego do białek surowicy daje się ilościowo odzyskać przy oznaczaniu.



Rys. 2. Absorpcja światła w reakcji rezorcynowej 400 μg galaktozy $\times-\times$, 500 μg mannozy $\bullet-\bullet$; mieszaniny złożonej z 50 μg kwasu metoksyneuraminowego, 125 μg galaktozy i 125 μg mannozy $\circ-\circ$. Absorpcję odczytywano na spektrofotometrze Coleman Junior model 6 w próbkach 6-304

Przebieg oznaczenia. Do probówek wirówkowych kalibrowanych na 2 ml, daje się 5 ml acetonu i kroplami 0,5 względnie 0,25 ml surowicy rozcieńczonej wodą. (Rozcieńczano wodą 3 ml surowicy w kolbie miarowej do 25 ml). Powstałe osady odwirowuje się; płyn znad osadu dekantuje i osad przemywa dwa razy acetonem. Osady w probówce dopełnia

Tablica 2

Zawartość kwasu neuraminowego wyrażona jako kwas N-acetyloneuraminowy (ac-neur.), lub jako kwas metoksyneuraminowy (m-neur.) w surowicy krwi ludzi zdrowych oznaczona jednocześnie metodą orcynową, rezorcynową i dwufeniloaminową

Wyniki podano w mg na 100 ml surowicy

Lp.	Symbole	Metoda orcynowa		Metoda rezorcynowa		Metoda dwufeniloaminowa
		m-neur	ac-neur	m-neur	ac-neur	ac-neur
1	T.K.	70	91	55	66	71
2	A.S.	53	70	48	57	71
3	K.C.	59	76	44	54	67
4	B.L.	64	86	52	63	73
5	J.R.	51	66	43	51	65
6	D.M.	59	76	49	63	73
7	E.S.	59	76	52	64	71
8	M.K.	53	70	46	58	71
9	Z.S.	53	70	52	64	71
10	D.P.	56	73	53	65	75
11	S.A.	56	73	49	58	57
12	R.N.	71	91	60	73	71
13	W.R.	56	73	49	58	59
14	A.S.	62	80	53	66	66
15	J.P.	67	86	59	72	71
16	J.R.	62	80	55	67	66
17	J.K.	63	80	53	67	73
18	Z.J.	59	76	48	58	73
19	J.P.	59	76	49	63	75
20	B.K.	63	80	54	67	81
21	E.J.	64	86	59	73	79
Średnia arytmetyczna ze średnim odchyleniem		60±6	78±7	52±4,5	63±6	70±5,5

się do dwóch ml wodą, dodaje się 2 ml odczynnika rezorcynowego [10] i ogrzewa się we wrzącej łaźni wodnej dokładnie 20 minut. Probówki podczas ogrzewania są zakryte stożkowatymi probówkami wirówkowymi napełnionymi wodą. Następnie chłodzi się je w wodzie z lodem i wytrząsa się z 6 ml alkoholu amyloвого, przenosi warstwę alkoholu amyloвого

do próbek wirówkowych, chłodzi się w wodzie z lodem i klaruje przez wirowanie. Absorbencję światła ekstraktu alkoholowego oznacza się przy 470 i 580 m μ w stosunku do próby ślepej, którą otrzymujemy w identycznej procedurze, dając zamiast 2 ml roztworu białka 2 ml wody. Odczyty przeprowadzono w spektrofotometrze Coleman Junior, model 6 w próbkach 6—304. Wyniki wylicza się z dwóch równań, które można ułożyć na podstawie oznaczania absorpcji standardów kwasu neuraminowego i mieszaniny galaktozy z mannozą, postępując podobnie jak z surowicą krwi.

W metodzie orcykowej i rezorcynowej użyto jako standardów kwasu N-acetyloneuraminowego i metoksyneuraminowego; w metodzie dwufeniloaminowej ograniczono się tylko do kwasu N-acetyloneuraminowego, ponieważ kwas metoksyneuraminowy nie może w tej reakcji służyć jako standard. Otrzymane wartości dla 21 badanych zdrowych ludzi podaje tablica 2.

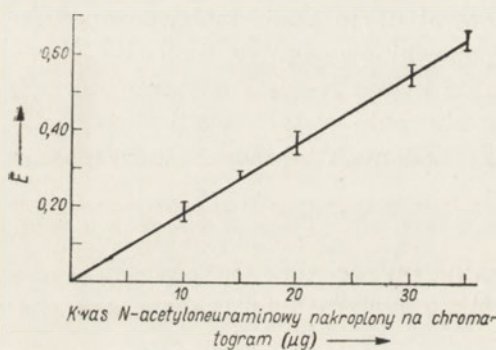
CHROMATOGRAFICZNE OZNACZANIE KWASU NEURAMINOWEGO W HYDROLIZATACH BIAŁEK SUROWICY KRWI

Opracowanie odpowiedniego postępowania ujęto w dwa etapy: 1) ilościowe chromatograficzne oznaczanie kwasu neuraminowego przy użyciu standardów oraz 2) przeprowadzenie hydrolizy białek surowicy bez zniszczenia kwasu neuraminowego, a umożliwiające jego chromatograficzne oznaczanie.

Dla ilościowego oznaczania standardów na chromatogramach próbowano początkowo zastosować poprzednio opracowane barwne reakcje. Wywołanie plam odczynnikami orcykowym podanym przez Böhma [3], a następne eluowanie alkoholem amylowym nie dało wyników proporcjonalnych do stężenia kwasu neuraminowego. Próby wyzyskania własności redukcyjnych kwasu N-acetyloneuraminowego również zakończyły się niepowodzeniem z powodu bardzo małej czułości tej reakcji. Wobec tego eluowałem kwas neuraminowy z bibuły wodą, a następnie wywoływałem zabarwienie w eluacie jednym z odczynników używanym poprzednio do oznaczeń. Początkowo zbadałem odczyn orcykowy i nie uzyskałem jednoznacznych wyników. Przyczyną niepowodzenia był fakt, że bibuła używana do chromatografii (Whatman 1), nawet jeżeli ją płukano początkowo 0,4% wersenianem sodu, a następnie szereg razy (do 10 razy) wodą, dawała dużą próbę ślepą, ciągle się zmieniającą. Również i odczyn z rezorcyną nie dawał się zastosować z tych samych powodów, chociaż Svennerholm [11] stosował go do tego rodzaju oznaczeń. Natomiast dobre wyniki otrzymałem z odczynem dwufeniloaminowym. Jeżeli eluuje się kawałek bibuły Whatman 1 przez wytrząsanie z 4 ml wody w ciągu 20 minut

na trzęsawce, to po odwirowaniu daje ten płyn z odczynnikiem dwufeniloaminowym takie samo zabarwienie jak woda destylowana. Odczyn z dwufeniloaminą okazał się więc odpowiedni.

Dla chromatograficznego oznaczania standardów kwasu neuraminowego postępowano w następujący sposób. Na paski bibuły szerokości 3 cm nakrapiano po 10, 20, 30 i 35 μg kwasu N-acetyloneuraminowego i chromatogramy rozwijano w układzie butanol II-rzędowy-kwas octowy-woda w stosunku (4:1:5) techniką zstępującą (14 godzin, 18—20°). Każdą z wymienionych prób nakrapiano na cztery lub więcej pasków bibuły.



Rys. 3. Zależności absorpcji światła w reakcji dwufeniloaminowej od zawartości kwasu N-acetyloneuraminowego w chromatografii standardów. 2 ml eluatu i 4 ml odczynnika dwufeniloaminowego ogrzewano przez 30 minut w 100°. Absorbpcję oznaczano w fotometrze Pulfricha używając filtru S_{52} i mikrokiwet długości 5 cm

niloaminowego [7]; po wymieszaniu zakrywano stożkowatymi probówkami napełnionymi wodą, służącymi jako chłodniczki i ogrzewano przez 30 minut we wrzącej łaźni wodnej. Po oziębieniu odczytywano absorbpcję powstałego zabarwienia w fotometrze Pulfricha przy filtrze S_{52} w mikrokiwetach długości 5 cm, w stosunku do próby ślepej, którą otrzymujemy w podobny sposób z paska bibuły, przez który przepłynął tylko rozpuszczalnik. Dokładność takiego oznaczenia ilustruje wykres (Rysunek 3) przedstawiający wyniki oznaczeń eluatów po chromatografowaniu standardów kwasu N-acetyloneuraminowego.

Dla przeprowadzenia hydrolizy białek surowicy, mającej na celu uwolnienie kwasu N-acetyloneuraminowego bez jego zniszczenia, posłużyłem się 5% kwasem trójchlorooctowym, podobnie do postępowania przy oznaczaniu tego związku z odczynnikiem dwufeniloaminowym. O tym, że przy hydrolizie białek surowicy krwi człowieka odszczepia się kwas N-acetylo-

neuraminowy świadczy R_F plamy uzyskanej przy chromatografii hydrolizatu oraz to, że po dodaniu standardu kwasu N-acetylneuraminowego otrzymuje się tylko jedną plamę. To ostatnie stwierdzenie oparto na chromatografii w dwóch układach *n*-butanol-kwas octowy-woda (4:1:5) i butanol II-rzędowy-kwas octowy-woda (4:1:5). Doświadczenie wykazało, że po dziesięciu minutach hydrolizy wartość absorpcji w reakcji dwufenilaminowej nie wzrasta, a przy dłuższym ogrzewaniu zmniejsza się tylko nieznacznie (Tablica 3). Przyjęto więc jako czas hydrolizy 20 minut.

Tablica 3

Reakcja dwufenilaminowa kwasu N-acetylneuraminowego wydzielonego chromatograficznie z hydrolizatu białek surowicy

Białko wytrącone acetonem z 0,5 ml surowicy hydrolizowano w 5% kwasie trójchlorooctowym w ciągu czasu podanego w tablicy. Po usunięciu kwasu trójchlorooctowego i liofilizacji, rozpuszczono pozostałość w 0,5 ml wody i odpowiednie ilości chromatografowano jak podano w tekście. Oznaczano absorpcję w fotometrze Pulfricha, filtr S_{52} w mikrokiwetach o długości 5 cm.

Ilość μ l nakropionego hydrolizatu	Czas hydrolizy			
	10 minut	20 minut	30 minut	40 minut
20	0,24	0,25	0,23	0,20
40	0,46	0,47	0,42	0,44
40	0,46	0,45	0,43	0,42

W oparciu o podane wyżej rozważania przyjąłem następujące postępowanie. Do 5 ml acetonu wkraplano 0,5 ml surowicy. Osad powstały odwirowano, a płyn znad osadu zdekantowano. Pozostały osad zawieszono ponownie w 2 ml acetonu, wirowano i płyn dekantowano. Zabieg ten powtórzono ponownie. Tak otrzymane białko surowicy zawieszano w 2,5 ml wody i dodawano 2,5 ml 10% świeżo sporządzonego roztworu trójchlorooctowego. Probówki zamykano chłodniczkami powietrznymi o długości 40 cm i wstawiano do wrzącej łaźni na 20 minut. Po ochłodzeniu sączono przez bibułę Whatman 1. Probówki płukano 3 razy po 2 ml wody, za każdym razem przenosząc popłuczyny na sączek. Z przesączu usuwano kwas trójchlorooctowy przez czterokrotne wytrząsanie z równą ilością eteru i każdorazowe usuwanie warstwy eterowej. Eter rozpuszczony w przesączu usuwa się przez 5-minutowe ogrzewanie probówki w gorącej wodzie. Tak przygotowaną próbę suszono przez liofilizację. Po wysuszeniu rozpuszczono pozostałość w 0,5 ml wody i nakrapiano na bibułę Whatman 1, zwykle w ilości 20 i 40 μ l płynu. Chromatogramy rozwijano i następnie oznaczano kwas neuraminowy tak, jak opisano powyżej dla standardu.

Opisany sposób postępowania sprawdzono na sześciu równoległych oznaczeniach wykonanych na tej samej surowicy krwi. Do trzech wymienionych prób (IV—VI, Tabl. 4) dodano przed hydrolizą (a więc do białka 0,5 ml surowicy wytrąconego i przemytego acetonem) po 200 μg kwasu N-acetyloneuraminowego. Każda z sześciu badanych prób była chromatograficznie oznaczana na czterech równoległych paskach. Wyniki podaje tablica 4. Dla hydrolizatów prób I, II i III wartości wahają się od 225 μg do 312 μg , a więc w przybliżeniu jak 75 : 100. Wartość średnia wynosi 258 μg kwasu N-acetyloneuraminowego. Dla prób IV, V i VI zawierających dodatek 200 μg kwasu N-acetyloneuraminowego wyniki wahają się od 362 do 500 μg , a więc podobnie jak 75 : 100. Wartość średnia wynosi 447 μg , a więc o 190 μg więcej niż średnia prób I, II i III, a dodatek wynosił 200 μg na próbę.

Tablica 4

Chromatograficzne oznaczanie metodą dwufeniloaminową kwasu N-acetyloneuraminowego w hydrolizatach białek surowicy krwi człowieka.

Oznaczenia I, II i III dotyczą tej samej surowicy; postępowanie, zaczynając od wytrącenia białka, było dla wszystkich trzech oznaczeń oddzielne. Dla każdego hydrolizatu wykonano cztery osobne oznaczenia chromatograficzne oznaczone 1, 2, 3 i 4.

Oznaczenia IV, V i VI dotyczą prób tej samej surowicy, do których przed hydrolizą dodano po 200 μg kwasu N-acetyloneuraminowego.

Liczby podają w mikrogramach zawartość kwasu N-acetyloneuraminowego w 0,5 ml surowicy.

Dodatek		Chromatogram			
		1	2	3	4
I	—	295	250	275	256
II	—	256	250	225	275
III	—	312	250	225	225
IV	200 μg kwasu N-acetyloneuraminowego	485	425	375	480
V	200 μg kwasu N-acetyloneuraminowego	475	455	415	500
VI	200 μg kwasu N-acetyloneuraminowego	362	425	500	475

Odpowiedź na pytanie, czy reakcją dwufeniloaminową wykonaną wprost z surowicy krwi człowieka oznacza się tylko kwas N-acetyloneuraminowy, starałem się uzyskać przez porównanie wyników oznaczenia wprost z hydrolizatem surowicy krwi z wynikami otrzymanymi po chro-

matograficznym wydzieleniu kwasu N-acetyleneuraminowego z białka surowicy. Z porównania wartości podanych dla dwóch różnych surowic krwi człowieka (Tablica 5) można wyciągnąć wniosek, że (w granicach wcale znacznego błędu) wyniki uzyskane obydwoma sposobami są zgodne.

Tablica 5

Zawartość kwasu N-acetyleneuraminowego, oznaczonego reakcją dwufeniloaminową wprost w hydrolizacie oraz po rozdziale chromatograficznym hydrolizatu
Wartości podano w mg kwasu N-acetyleneuraminowego w 100 ml surowicy

Nr badanej surowicy	Oznaczenie wprost	Oznaczenie po rozdziale chromatograficznym
1	60, 62 64, 64	45, 45, 45, 50, 50, 50, 51, 51, 55, 55, 59, 60
2	53, 53, 53, 55, 57	50, 51, 52, 54, 55, 56, 56, 56, 60

DYSKUSJA

Ilościowa ocena zawartości kwasu neuraminowego w białkach surowicy krwi, oparta o kolorymetryczne metody, które przecież nie są w pełni swoiste, może być obciążona dużym błędem [9, 15]. Błędy te mogą dotyczyć z jednej strony substancji innych niż kwas neuraminowy, dających dany barwny odczyn, z drugiej zaś strony możliwości, że w czasie ogrzewania w mocno kwaśnym środowisku odszczepiony kwas neuraminowy może ulec zmianom i wskutek tego inaczej reagować z odczynnikami niż pochodna kwasu neuraminowego użyta jako wzorzec [12]. O tym, że zastrzeżenia te opierają się na realnych podstawach, świadczą dane tablicy 2. Wyniki otrzymane różnymi metodami, a także tą samą metodą standaryzowaną wobec różnych pochodnych kwasu neuraminowego, są odmienne; wprawdzie na ogół stwierdzenie wyższej wartości jedną metodą idzie w parze z wyższym wynikiem w innej, ale nie jest to regułą dającą się ściśle liczbowo ująć. Np. pozycje 14, 17 i 20 w tablicy 2 przedstawiają dla metody orcynowej standaryzowanej wobec kwasu N-acetyleneuraminowego wartości po 80 mg⁰%, a dla metody dwufeniloaminowej, standaryzowanej wobec tej samej pochodnej, mamy odpowiednio 66, 73 i 81 mg⁰%. Wprawdzie w doświadczeniach opisanych w tej pracy wykazano, że w metodzie rezorcynowej można uniknąć błędów powodowanych reakcją innych związków przez obliczenie odpowiedniej poprawki, a dla metody dwufeniloaminowej udało się wykazać, że oznaczaną pochodną jest kwas N-acetyleneuraminowy, nie wystarcza to jednak dla ścisłego zdania sobie sprawy z istoty oznaczanych substancji.

Dlatego wydawało się potrzebne bliższe scharakteryzowanie substancji odpowiedzialnych za reakcję kolorymetryczną. Udało się to w odniesieniu do reakcji dwufeniloaminowej dzięki postępowaniu, w którym białko hydrolizowano z kwasem trójchlorooctowym, a uwolniony od kwasu hydrolyzát chromatografowano; kwas neuraminowy eluowany z bibuły oznaczano ilościowo metodą dwufeniloaminową. Wykazano w ten sposób, że reakcją dwufeniloaminową oznacza się w surowicy krwi ludzi zdrowych kwas N-acetyloneuraminowy. Analityk chętnie widziałby mniejszy rozrzut tych wartości; taki np. jaki stwierdza się przy chromatografii roztworu kwasu N-acetyloneuraminowego (Rysunek 3). Jednak większy rozrzut wartości przy rozdzielaniu i późniejszym eluowaniu chromatogramów hydrolizatu białek nie jest niespodzianką; wiadomo przecież, że rozdział poszczególnych związków może zależeć od obecności innych substancji, a tych w hydrolizatach białkowych przecież nie brak. Jeżeli uwzględnić to ostatnie zastrzeżenie, to wydaje się, że uzyskana zgodność między oznaczeniem wprost, a oznaczeniem po rozdziale chromatograficznym jest zadowalająca. Na tej podstawie można twierdzić, że w reakcji dwufeniloaminowej, wykonywanej na surowicy krwi zdrowego człowieka, oznacza się kwas N-acetyloneuraminowy; nie można jednak wykluczyć, że w pewnym niewielkim stopniu ma się tu do czynienia także z innymi substancjami występującymi w ilościach rzędu błędu stosowanej w tej pracy metody chromatograficznej.

Kierownikowi Zakładu Prof. dr W. Mozłowskiemu dziękuję za wybór tematu i życzliwe ustosunkowanie się w czasie wykonywania i pisania tej pracy.

Pragnę także podziękować: Prof. dr J. Hellerowi za użyczenie Dowex 50×10, Prof. dr L. Kamińskiego za mannozę i Prof. dr T. Korzybskiemu za Dowex 50.

STRESZCZENIE

1. Stwierdzono przydatność metody rezorcynowej Svennerholma do oznaczania kwasu neuraminowego w białkach surowicy krwi.
2. Porównano na tej samej surowicy wyniki równoczesnych oznaczeń kwasu neuraminowego metodą orcynową, rezorcynową i dwufeniloaminową. Jako standardów użyto kwasu metoksyneuraminowego i N-acetyloneuraminowego. Wyniki poddano dyskusji.
3. Podano sposób oznaczania chromatograficznego kwasu N-acetyloneuraminowego w białkach surowicy krwi hydrolizowanych 5% kwasem trójchlorooctowym.

L I T E R A T U R A

- [1] Block R. J., Durrum E. L., Zweig G., *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Academic Press, New York, 1955, str. 136.
- [2] Blix G., *Z. Physiol. Chem.* **240**, 43, 1936.
- [3] Böhm P., Dauber S., Baumeister L., *Klin Wschr.* **32**, 289, 1954.
- [4] Faillard H., *Z. Physiol. Chem.* **307**, 62, 1957.
- [5] Rzeczycki W., *Bull. Acad. Pol. Sci. Série Biol.* **6**, 278, 1958.
- [6] Rzeczycki W., *Postępy Biochemii* **4**, 481, 1958.
- [7] Seifer A., Gerstenfeld S., *J. Lab. Clin. Med.*, **50**, 17, 1957.
- [8] Svennerholm L., *Acta Soc. Med. Upsal.*, **61**, 75, 1956.
- [9] Svennerholm L., *Biochem. J.*, **64**, 11p, 1956.
- [10] Svennerholm L., *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 604, 1957.
- [11] Svennerholm E., Svennerholm L., *Nature* **181**, 1154, 1958.
- [12] Svennerholm L., *Acta Chem. Scand* **12**, 547, 1958.
- [13] Werner L., Odin L., *Acta Soc. Med. Upsal.* **57**, 230, 1952.
- [14] Weygand F., Rinno H., *Z. Physiol. Chem.* **306**, 173, 1957.
- [15] Winzler R. J., *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 2, Academic Press, New York 1955, str. 279.

NEURAMIC ACID OF BLOOD SERUM PROTEINS.
THE METHOD FOR ESTIMATION

S u m m a r y

1. The availability of the Svennerholm's resorcinol method for the determination of neuramic acid in blood serum protein was stated.

2. The results obtained by the orcinol method as well as by the resorcinol and diphenylamine one were compared. Metoxyneuramic acid and N-acetylneuramic acid were used as standards. The results were discussed.

3. A method for chromatographic estimation of N-acetylneuramic acid in blood serum proteins hydrolysed with 5% trichloroacetic acid is reported.

Otrzymano 10.12.1958 r.

P. SZAFRAŃSKI and E. SUŁKOWSKI

**INCORPORATION OF ^{14}C -AMINO ACIDS AND ^{32}P INTO
SOLUBLE NUCLEOPROTEINS FROM GUINEA-PIG
LIVER CYTOPLASM***Zakład Biochemii Ewolucyjnej, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa*

Recent investigations on protein biosynthesis show that a considerable part of reactions related to the process occurs in soluble fraction of cytoplasm. In the year 1957 Hoagland *et al.* [7] showed that activated amino acids combine with some small-molecule soluble ribonucleic acids (S-RNA). Other authors did so later [9, 11]. It is accepted that S-RNA may participate in the transfer of amino acids to microsomes [8], where the protein synthesis is likely to occur. It is not excluded, however, that peptide-linkage formation takes place already in the soluble cellular fraction. In such a case S-RNA should be an acceptor of amino acids, and the formed nucleotide-amino-acid compound might react with one another to give either larger and larger polypeptides with liberation of free nucleotides or growing chains of polynucleotides and free amino acids [14]. Apparently these two processes should run parallel and be balanced by one another. Thus, if nucleotide-amino-acid compounds were an intermediate in protein synthesis as well as in that of nucleic acids, one might suppose that the formation of these two moieties of nucleoproteins runs parallel. However, the question whether the protein synthesis calls for a simultaneous synthesis of nucleic acids still remains open. We then decided to investigate whether there is any relationship between the synthesis of protein and that of ribonucleic acid in the soluble nucleoprotein subfractions derived from guinea pig liver cytoplasm.

EXPERIMENTAL **^{14}C -Amino acids**

^{14}C -Amino acids were prepared by the hydrolysis of labelled protein derived from alga, *Chlorella pyrenoidosa*. The *Chlorella* culture was carried out in conditions similar to those described by Sorokin and

Myers [16]. To preserve the Tamiya cycle the culture was illuminated for about 20 hours followed by 20 hours in the dark. The culture grown in such conditions yields over 90% of dark cells with a high rate of photosynthesis. At the appropriate stage of culture growth, cells were collected by centrifuging, then 300 mg. of cells were suspended in 30 ml. of 0.1 M phosphate buffer, pH 6.8. The suspension was transferred into a 50 ml. Warburg vessel containing in the side-arm 0.7 ml. of 0.03 M- $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ with an activity of 800 μc . The two outlets were stopped with rubber stoppers, the stopper of the side outlet was provided with a small stop-cock funnel. The vessel was placed near the bottom of the glass water-bath at 29°. Then a magnetic mixer was set in motion, the cell suspension in the vessel being mixed as well as water in the bath. Three reflectors, 250 V each, were placed by two sides and under the bath. The latter was first switched on and the cell suspension was thus illuminated for 1 hr. After such a preliminary lightening pressure inside the vessel was adjusted to the atmospheric one, and radioactive carbonate was transferred into the main compartment. Then the vessel was placed again in a water-bath and two other reflectors were switched on. Photosynthesis was allowed to proceed under such conditions for 20 hrs., care being taken for temperature not to exceed 30°. The vessel containing cells was then removed from the bath and 3 ml. of 40% potassium hydroxide was added through the funnel into the side-arm and left for 30 min. to remove traces of $^{14}\text{CO}_2$ from the vessel atmosphere. The cell suspension was collected with a pipette and then centrifuged. Cells were ground for 5 min. in a glass Potter homogenizer at 1000 r.p.m. with 10 ml. of 1 N KOH. They were allowed to stand for 30 min., and then centrifuged to remove insoluble particles. Trichloroacetic acid (TCA) was added to the supernatant in an amount adequate to reach up the 10% final concentration. The precipitate was centrifuged off after 10 min. standing, washed with 5 ml. of water, then with several portions of 95% ethanol and dried in a desiccator over calcium chloride. The dried protein precipitate was hydrolysed with 50 volumes of 6 N hydrochloric acid in a sealed glass pipe for 16 hrs. at 105°. The hydrolysate thus obtained was filtered through a thick filter paper and the excess of hydrochloric acid was distilled out in vacuum over potassium hydroxide. 4 ml. of water were then added to the residue and pH adjusted to 7.2 with 0.1 N potassium hydroxide. The liquid was filtered through a filter paper and its nitrogen content was estimated by Kjeldhal method, while radioactivity was measured with a thin-window Geiger-Müller counter. The activity as calculated per 1 mg. of nitrogen was 94 μc . The nitrogen contents were 0.2 mg. per 1 ml. Thus prepared ^{14}C -amino acid solution was employed in further experiments.

Animals

Guinea pigs 6 to 8 months old were starved for 24 hours before experiment. When protein synthesis had to be studied, the *Chlorella* protein hydrolysate was injected into the jugular vein in an amount of $35\ \mu\text{c}$ per 1 kg. of body weight, while $600\ \mu\text{c}$ of ^{32}P as $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ were given when nucleic acids synthesis had to be followed.

Soluble fraction derived from liver cytoplasm

The stunned animals were killed by decapitation 30 min. after injection and livers were removed. All further manipulations were performed at 0° . Each liver was washed with isotonic saline and minced in a laboratory meat-mill with a disk having apertures of about 0.5 mm. 12 g. of minced tissue were treated with an equal quantity of $0.25\ \text{M}$ sucrose and homogenized with a polyacrylic piston for 45 sec. at 1000 r.p.m. Then $0.25\ \text{M}$ sucrose solution was added to make up 10 times the weight of the tissue. The suspension was centrifuged for 15 min. at $5000\ g.$, the sediment being discarded; centrifugation was continued for a further 15 min. at $10\ 000\ g.$ The sediment was again discarded and the supernatant containing microsomes was left for 10 min. in solid CO_2 which brought pH down to 6.3. This slight acidification aids microsomes to sink during centrifugation, which was carried out for 1.5 hours at $42\ 000\ g.$, in MSE refrigerated centrifuge. The resulting supernatant containing soluble nucleoproteins was employed for fractionation. It contained, however some microsomes, but their contents might be insignificant, since the results obtained by means of such fractioning were entirely consistent with those found earlier when Spinco Model E ultracentrifuge had been used.

Soluble nucleoproteins subfractions

40 ml. of the supernatant obtained as above, containing 8 to 9 mg. of protein per 1 ml., were used for fractionation. Protein was estimated by the spectrophotometric method [17] in the Unicam SP 500 spectrophotometer at $290\ \text{m}\mu$, the standard curve being prepared for the supernatant proteins. All manipulations throughout fractionation were carried out in ice. Fractionation was effected at various concentrations of calcium chloride and of ammonium sulphate. The final concentrations of calcium chloride were identical with those applied by Hultin [10]. $0.1\ \text{M}$ -calcium chloride was added until $0.004\ \text{M}$ concentration was reached. The mixture was centrifuged after 15 min. for 15 min. at $32\ 000\ g.$ on Servall centrifuge. The precipitate was rinsed out into a test tube with 5 ml. of $0.1\ \text{N}$ -po-

tassium hydroxide and left in ice. 0.1 M-calcium chloride was added again to the supernatant to make up 0.012 M final concentration and after 15 min. centrifuged as described above. The resulting precipitate was treated in a similar manner as the first one was, while saturated solution of ammonium sulphate was added to the supernatant to give a final saturation of 0.15. After 15 min. the precipitate was collected by centrifuging and suspended in 5 ml. of 0.1 N-potassium hydroxide. The supernatant was fractionated further in the same manner, the following saturation of ammonium sulphate being used: 0.20; 0.25; 0.30; 0.35; 0.40; 0.45; 0.50; 0.60; 1.0.

Estimation of ribonucleic acid and proteins

Suspension of centrifuged sediments of each subfraction in 5 ml. of 0.1 N-potassium hydroxide was treated with 1 ml. of 3 N-perchloric acid and centrifuged at 0°. The precipitates were washed with 2 ml. of 0.5 N-perchloric acid and centrifuged once more. Then 4 ml. of N-perchloric acid were added, precipitates crumbled thoroughly and ribonucleic acids extracted at room temperature for approximately 16 hours. After

Table 1

The contents of protein and of RNA in particular fractions of the soluble nucleoproteins of the guinea-pig liver cytoplasm.

40 ml. portions of supernatant were taken for fractionating, which corresponds to 4 grams of liver

Final salt concentration	Protein (mg.)	RNA (mg.)	Protein (%)	RNA (%)	RNA / Protein
					Protein
CaCl ₂ 0.004-M	20.00	0.47	4.15	7.63	0.023
CaCl ₂ 0.012-M	12.50	0.79	2.63	12.81	0.065
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.15 satur.	5.00	0.21	1.05	3.48	0.042
0.20 ..	3.75	0.12	0.79	2.73	0.032
0.25 ..	7.00	0.20	1.47	3.29	0.028
0.30 ..	14.65	0.30	3.08	4.80	0.020
0.35 ..	34.30	0.48	7.22	7.82	0.014
0.40 ..	33.50	0.26	7.05	4.27	0.0078
0.45 ..	50.00	0.15	10.50	2.47	0.0030
0.50 ..	67.00	0.17	14.10	2.75	0.0025
0.60 ..	91.00	0.57	19.20	9.17	0.0062
1.00 ..	135.70	2.47	28.90	39.70	0.018
sum	476.4	6.19	100	100	0.0129

centrifuging the insoluble protein precipitate was collected. Nucleic acids were estimated in the supernatant by spectrophotometric method of Ogur and Rosen [12] with the Unicam SP 500 spectrophotometer at 260 $m\mu$. Yeast ribonucleic acid was used as standard solution. The hot extraction of remaining precipitates with 5% TCA did not reveal any deoxyribonucleic acid.

The insoluble protein precipitates from each subfraction were dissolved in 4 ml. of N -potassium hydroxide each and left in it for 15 min. at 37°. Insignificant amounts of insoluble material were removed by centrifuging for 15 min. at 42 000 g., then protein was estimated in the clear supernatants by spectrophotometric method. The contents of proteins and of nucleic acids in each fraction are listed in Table 1.

Estimation of proteins radioactivity

The guinea pigs injected with ^{14}C -amino acids were used when protein radioactivity had to be studied. The procedure of obtaining subfractions was identical with that described above, estimation of protein contents included. The samples in which protein had been estimated were treated with 0.25 ml. of the neutralised casein hydrolysate containing 0.2 mg. of

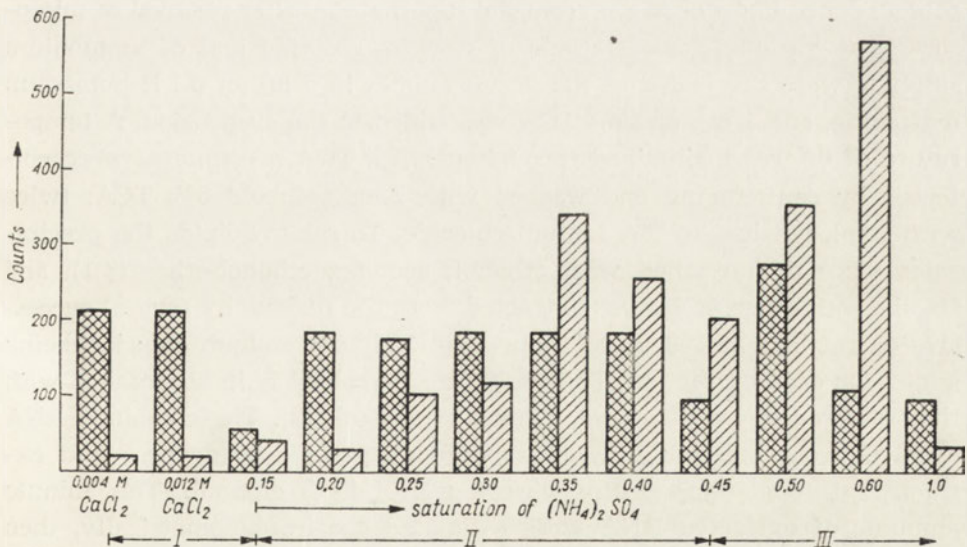


Fig. 1. Radioactivity of protein and nucleic acid of soluble nucleoproteins of the guinea-pig liver cytoplasm. Radioactivity is expressed in counts/hour/mg. of protein and counts/min./mg. of RNA. The animals were killed 30 min. after injection of radioactive material

nitrogen. They were cooled in ice and 1.8 ml. of 70% TCA was added. The precipitates were collected by centrifuging at 0°, washed successively with 5% TCA, acetone, ethanol-ether (3:1) mixture and finally with ether according to the procedure described by Simkin and Work [15]. The obtained powders were suspended in 5 ml. ethanol-ether (3:1) and homogenized by means of a polyacrylic piston. The suspension was poured in a Büchner funnel and was evenly plated on a thin (2 mg./cm.²) filter paper disk, 3.7 cm.² in area. The paper disks with protein of infinite thinness were placed on a microscopic slide and their radioactivities were measured in an end-window G-M counter (1.2 mg./cm.²). After the measurement protein was extracted with N-potassium hydroxide and estimated spectrophotometrically, filter paper being previously removed by centrifuging. The values of radioactivity as calculated per 1 mg. of protein per 1 hour are shown in Fig. 1.

*Isolation of nucleic acids
and determination of their radioactivity*

The supernatants derived from liver cytoplasm of guinea pigs injected with radioactive phosphorus was used in these experiments. The nucleoprotein precipitates obtained from the supernatant (after removal of microsomes) at various concentrations of calcium chloride and of ammonium sulphate were suspended as the previous ones in 5 ml. of 0.1 N-potassium hydroxide, and 1 ml. of 30% TCA was added to the suspension. A temperature of 0° was maintained throughout. The TCA precipitates were collected by centrifuging and washed with 2 ml. of cold 5% TCA, twice with 2 ml. portions of 5% sodium chloride. To remove lipids the precipitates were then washed with ethanol, acetone, ethanol-ether (3:1), and finally with ether. RNA was extracted from the residue by several successive extractions at 100° for 1 hour, 1 ml. of 10% sodium chloride being added for each extraction. The procedure described is in accordance with that referred to by Bhargava, Simkin and Work [2]. The combined RNA extracts from individual fractions were evaporated to dryness and extracted at room temperature with 4 ml. of 95% ethanol. The minute amounts of extracted RNA were estimated spectrophotometrically, then transferred to ebonit planchets, 2 cm. in diameter. Ethanol being evaporated, nucleic acids radioactivity was measured in an end-window G-M counter (2 mg./cm.²). The values of activity as calculated per 1 mg. of RNA per 1 min. are shown in Fig. 1.

RESULTS

Table 1 demonstrates the protein and RNA contents in individual subfractions obtained from soluble liver cytoplasm, expressed in absolute values and as percentage of the sum of all fractions, as well as the RNA to protein ratios. The sum of protein contents in all subfractions is 95% of the amount found in the supernatant before fractionation, while RNA is recovered in 80% only. This loss is due to the lability of RNA and it arises during fractionation.

The highest RNA to protein ratio is found in the subfraction precipitated at 0.012 *M*-calcium chloride. This points to the presence of some non-centrifuged residual microsomes in which this ratio appears to be high, and amounts up to 0.114 according to Simkin and Work [15]. It is also known that microsomes precipitate in the presence of calcium chloride and then are easily centrifuged (De Duve and Berthet [4]).

Fig. 1, illustrating the rate of ^{14}C -amino acids incorporation into the supernatant proteins, shows the presence of three radioactive fractions. The first (I) is the calcium chloride one, the second (II) that precipitated at 0.15 to 0.45 saturation of ammonium sulphate, while the third (III) active fraction is that obtained at 0.45 to 1.0 ammonium sulphate saturation. The ^{32}P radioactivity of nucleic acids in the II and III fractions runs parallel to the ^{14}C activity of the proteins related to them. The nucleic acid fraction precipitated at 0.45 to 1.0 saturation of ammonium sulphate shows a higher specific activity than the former one, and so does the respective protein fraction.

The results indicate that biosynthesis of cytoplasm proteins is conjugated with the simultaneous nucleic acids synthesis. Nucleoproteins precipitated with calcium chloride do not exhibit, however, any significant incorporation of ^{32}P into nucleic acids in spite of the high radioactivity of proteins related to these nucleic acids. Yet, it can be understood, since these fractions are contaminated with microsomes not entirely centrifuged off. It is known that, under conditions similar to those of our investigation, microsomal protein shows a high radioactivity on the contrary to the nucleic acids related to it [2].

DISCUSSION

It is generally accepted that RNA is required for protein biosynthesis. There are, however, some contradictions as regards the question, whether the presence itself of RNA is sufficient or its simultaneous synthesis is necessary to the process. Many reports support the latter opinion [1, 6], but, on the other hand, investigations excluding such a relationship are

not scarce. Wisseman *et al.* [18], e. g., have shown, that the addition of chloramphenicol strongly inhibits protein synthesis in *Escherichia coli*, while nucleic acid synthesis remains undamaged. Gale and Folkes [5] have obtained similar results when working with *Staphylococcus aureus*. There are, however, some essential doubts with regard to the biological activity of the RNA formed under conditions of the chloramphenicol action. Recent reports point out that such a RNA does not participate in protein synthesis. Nucleic acids accumulated in *E. coli* as a result of chloramphenicol action are first eliminated out of the cells, and only then does protein synthesis occur as well as divisions of cells [6].

It seems possible that these apparent contradictions concerning the probable role of RNA in protein synthesis would be easier to comprehend if one realises the variety of examined material in various experiments. Thus, Hultin [10], when studying RNA synthesis in soluble nucleoproteins as well as in microsomes, found in the latter a considerably lower RNA turnover than in the soluble cytoplasmatic fraction. Bhargava, Simkin and Work [2] also stated that microsomal RNA had a low rate of turnover. Smelli and Davidson [13] have shown that nuclear RNA had still a higher rate of turnover than that of cytoplasm, whereas for protein related to these nucleic acids the reverse is true. The question would be somewhat elucidated if it were assumed that the processes occurring in various subcellular components might correspond to various stages of protein synthesis.

The high radioactivity found in our experiments in nucleic acids related to the soluble proteins of liver cytoplasm suggests that synthesis of polypeptides occurs already in the soluble fraction of cytoplasm. Thus, protein molecule formed in the soluble fraction might combine, to obtain its spheric structure, with microsomal nucleic acid, which did not participate directly in the proper synthesis of the molecule. One could explain in such a way the fact that we have found in the supernatant a close correlation between the radioactivity of proteins and that of nucleic acids, whereas there is no such relationship in microsomal nucleoproteins [2]. The fractionation of microsomes, based on principles similar to those described here for the supernatant, points to the presence of the same protein fractions in microsomes as those found in soluble nucleoproteins of cytoplasm (Szafranski and Wehr, to be published). Identification of these proteins is the object of our further investigations.

The authors are grateful to Professor Dr. J. Supniewski for the *Chlorella pyrenoidosa* strain, which he kindly supplied, and to Miss K. Derkus for valuable technical assistance.

SUMMARY

The relationship between protein synthesis and that of RNA was studied in soluble nucleoproteins derived from guinea pig liver cytoplasm. The protein synthesis was followed with ^{14}C -amino acids, while ^{32}P was employed to follow the synthesis of nucleic acids.

Microsomes being removed by centrifugation, the supernatant was subfractionated with calcium chloride and ammonium sulphate.

The radioactive proteins fractions corresponded to the active groups of nucleic acid fractions. These results show that the biosynthesis of the soluble cytoplasm protein is conjugated with the simultaneous nucleic acids synthesis.

REFERENCES

- [1] Ben-Ishai R., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 477, 1957.
- [2] Bhargava P. M., Simkin J. L., Work T. S., *Biochem. J.* **68**, 265, 1958.
- [3] Beleher R., Godbert A. L., *Semi-Micro Quantitative Organic Analysis*, Longmans, Green and Co. London-New York-Toronto, 1945 p. 87.
- [4] De Duve Chr., Berthet J., *Internat. Rev. Cytol. Acad. Press. Inc.*, New York, 1954.
- [5] Gale E. F., Folkes J. P., *Biochem. J.* **53**, 493, 1953.
- [6] Hahn F. E., Schaechter M., Ceglowski W. S., Hopps H. E., Ciak J., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 469, 1957.
- [7] Hoagland M. B., Zamecnik P. C., Stephenson M. L., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 215, 1957.
- [8] Hoagland M. B., *Symposium No. VIII, IV Intern. Congress of Biochemistry*, Vienna, 1958.
- [9] Holley R. W., Prock P., *Federation Proc.* **17**, 244, 1958.
- [10] Hultin T., *Exp. Cell. Res. Suppl.* **3**, 210, 1955.
- [11] Ogata K., Nohara H., *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 659, 1957.
- [12] Ogur M., Rosen G., *Arch. Biochem.* **25**, 262, 1950.
- [13] Smellie R. M. S., Davidson J. N., *Experientia* **12**, 422, 1956.
- [14] Simkin J. L., Work T. S., *Nature* **179**, 1214, 1957.
- [15] Simkin J. L., Work T. S., *Biochem. J.* **65**, 307, 1957.
- [16] Sorokin C., Myers J., *J. Gen. Physiol.* **40**, 579, 1957.
- [17] Warburg O., Christian W., *Biochem. Z.* **310**, 384, 1941.
- [18] Wisseman C. L., Smadel J. E., Hahn F. E., Hopps H. E., *J. Bacteriol.* **67**, 662, 1954.

WŁĄCZANIE ^{14}C -AMINOKWASÓW I ^{32}P DO ROZPUSZCZALNYCH
NUKLEOPROTEIDÓW CYTOPLAZMY WĄTROBY ŚWINKI MORSKIEJ

Streszczenie

Zbadano zależność między syntezą białka i RNA w rozpuszczalnych nukleoproteidach cytoplazmy wątroby świnki morskiej. Syntezę białka śledzono za pomocą znaczonych ^{14}C -aminokwasów, syntezę kwasów nukleinowych za pomocą ^{32}P .

Płyn po odwirowaniu mikrosomów rozfrakcjonowano przy użyciu chlorku wapnia i siarczanu amonu. Wyniki wskazują, że biosynteza rozpuszczalnych białek cytoplazmatycznych jest sprzężona z równoczesną syntezą kwasów nukleinowych.

Otrzymano 11.12.1958 r.

K. BEŁŻECKA, K. RACZYŃSKA-BOJANOWSKA and J. HELLER

STUDIES ON TRANSAMINATION IN INSECTS

I. ASPARTIC- α -KETOGLUTARIC TRANSAMINASE IN *CELERIO EUPHORBIAE* L.

*Zakład Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna,
Zakład Biochemii Ewolucyjnej, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa*

In recent years transamination in insects has been the subject of several publications. Most of them, however, deal with the whole insects and the reported results are qualitative or semi-quantitative based on the spot intensity on the chromatograms. Some quantitative data on a wide variety of transaminations in different tissues of *Bombyx mori* were reported by Japanese workers [7]. Kilby *et al.* [9, 10, 6] determined the activity of aspartic- α -ketoglutaric and alanine- α -ketoglutaric transaminases in fat body of adult *Schistocerca gregaria* and *Caliphora erythrocephala* larvae.

All available data indicate that in insects as well as in mammals and birds aspartic- α -ketoglutaric transaminase is the most active aminopherase. This transamination reaction is specially significant as it links with oxidation processes through Krebs cycle or glutamate dehydrogenase and DNP cytochrome *c* reductase reactions. On the other hand, it consists a part of dezaminating mechanism. Therefore, it seems of interest to examine this process in different tissues of insect in various stages of its development.

The present paper deals with aspartate- α -ketoglutarate transamination reaction in muscles, fat body and haemolymph of pupae and muscles of adult Hawk-moth (*Celerio euphorbiae*). Application of quantitative, spectrophotometric method made possible a more detailed study of this process.

EXPERIMENTAL

Materials

Enzyme preparations. Isolated muscles and fat body of pupae and flight muscles of the adult *C. euphorbiae* were homogenized in a chilled all glass Potter homogenizer with 9 vol. of cold 0.01 M phosphate buffer,

pH 7.4. The resultant homogenates were centrifuged for 15 minutes at 4000 r.p.m. at 4° and supernatants dialyzed for 24 hrs. against 1 l. of 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4 at 4°. The upper thin lipid layer was removed mechanically from supernatants of fat body homogenates before dialysis. Pupal haemolymph was dialyzed directly.

Malic dehydrogenase. MDH was prepared from acetone powder of hog heart according to Ochoa [14].

Reduced diphosphopyridine nucleotide. DPNH was obtained by enzymatic reduction of DPN⁺ with alcohol dehydrogenase in 0.5 M tris buffer, pH 10.1. 21% pure DPN⁺ was used as prepared from brewers' yeast by the method of Ohlmeyer [15]. 1 ml. of DPNH solution contained ca. 3.5 μ moles of DPNH.

α -Ketoglutaric acid. This was synthesized by L. Friedman and E. Kowser method, described in Organic Syntheses [16].

Oxalacetic acid. This was synthesized by the method reported by Mieszkowa and Sjewierin [11].

Calcium salt of pyridoxal phosphate. It was prepared from commercial pyridoxamine dichloride by compiled methods of Peterson, Sober, Meister [17] and Wilson, Harris [19].

L-Aspartic acid. Commercial reagent BDH.

L-Glutamic acid. Commercial reagent, Merck.

Methods

Transaminase activity in *C. euphorbiae* tissues was determined by ascending paper chromatography and spectrophotometric measurements.

Chromatographic technique. 0.2 ml. of dialyzed preparations of muscles or fat body, or 0.4 ml. of dialyzed haemolymph were incubated for 5 hrs. with 25 μ moles of aspartate, 50 μ moles of α -ketoglutarate and 0.2 μ moles of calcium salt of pyridoxal phosphate under the conditions used by Gunsalus, Umbreit and Bellamy [8]. Samples were taken at 1-hr. intervals from mixture incubated at 37°, deproteinized with 2 vol. of 96% ethanol, centrifuged out, and then 0.1 ml. samples were run on Whatman No. 1 paper previously saturated with borate buffer, pH 10. Phenol-water system was used, and the chromatograms were developed with 0.2% ninhydrin solution in ethanol. The reverse reaction, i. e. glutamic-oxalacetic transamination was demonstrated in the same manner.

Spectrophotometric technique. The following system was used: aliquots of dialyzed preparations, 100 μ moles of sodium aspartate and 20 μ moles of sodium α -ketoglutarate in phosphate buffer, pH 7.4, 80 units of malic dehydrogenase and 0.35 μ moles of DPNH.

Oxalacetate arisen during transamination is subsequently reduced with simultaneous oxidation of DPNH. Decrease of absorption at $340\text{ m}\mu$ due to DPNH oxidation is strictly proportional to transaminase concentration. Incubation of the preparations and spectrophotometric measurements were performed according to Steinberg *at al.* [20, 21]. Specific transaminase activity was expressed as μmoles of DPNH oxidized/min./mg. of protein and as GOT units/mg. of protein; one unit of GOT being the amount of the enzyme, that cause the reading at $340\text{ m}\mu$ to decrease at the rate of 0.001 of optical density /min/ cm. light path [21] under the conditions considered.

Determination of protein. Protein content was determined by spectrophotometric method based on absorption measurements at $260\text{ m}\mu$ and $280\text{ m}\mu$, according to Warburg and Christian [18]: mg. protein /ml. = $1.55 E_{280} - E_{260} \times \text{dilution factor}$. The above method may be used provided E_{280}/E_{260} is above 0.7, i. e. nucleic acid concentration does not exceed 10%. Nucleic acid content in our preparations as calculated from Warburg and Christian tables was 3-5%.

Absorption spectrum measurements were made with Unicam spectrophotometer SP 500 or Beckman spectrophotometer S. F. 4.

RESULTS

Chromatographic analysis shown that aspartic- α -ketoglutaric transaminase occurs in muscles, fat body and haemolymph of *C. euphorbiae* pupae. Glutamic acid spot appeared on the chromatograms after 1 hr. of incubation when muscle and fat body homogenates were examined;

Table 1

Effect of pyridoxal phosphate on the activity of aspartic- α -ketoglutaric transaminase in dialysed preparations of C. euphorbiae
 μmoles of DPNH oxidized/min./mg. of protein

Tissue	control	pyridoxal phosphate added ($3\text{ }\mu\text{g.}/\text{ml.}$)
Flight muscles of the moth	26	27
Muscles of diapausing pupae	3.3 (*3.6)	2.9 (*3.7)
	6.6 (*6.4)	6.8
	5.3	5.2
Fat body of diapausing pupae	0.64	0.63
Pigeon heart muscle	0.0	15.0

*) Undialyzed preparations.

Table 2

Specific activity of aspartic- α -ketoglutaric transaminase in muscles, fat body and haemolymph of C. euphorbiae pupae diapausing at 4°

The values are expressed in GOT units and μ moles of DPNH oxidized/min./mg. of protein.

Each series consisted of 7–8 pupae; values averaged from 3 determinations; max. deviation 6%.

Series	Muscles		Fat body		Haemolymph	
	GOT	DPNH (μ mole)	GOT	DPNH (μ mole)	GOT	DPNH (μ mole)
I	854	5.3	97	0.60	9	0.03
II	1080	6.6	103	0.64	42	0.13
Average	967	5.9	100	0.62	25	0.08

the intensity of the spot increasing as the time of incubation was prolonged. In case of haemolymph in spite of 20 times greater amount of the enzymic preparation glutamic acid spot appeared only after 4 hrs. of incubation.

Under the same experimental conditions glutamic-oxalacetic transformation was demonstrated proving thus that aspartic- α -ketoglutaric transamination is reversible in examined preparations.

Table 3

Specific activity of aspartic- α -ketoglutaric transaminase in flight muscles of adult C. euphorbiae

The values are expressed in GOT units and μ moles of DPNH oxidized/min./mg. of protein

Moth	GOT	DPNH (μ mole)
I	9 782	30.4
II	9 111	28.3
III	13 043	41.0
IV	8 670	27.0
Average	10 151	31.7

Preliminary spectrophotometric studies (Tabl. 1) shown that addition of pyridoxal phosphate either to dialyzed or to undialyzed preparations had no effect on the activity of aspartic- α -ketoglutaric transaminase. Comparative determinations made with the same preparation from pigeon heart muscle shown that addition of pyridoxal phosphate to the dialyzed preparations was necessary for transaminase activity.

Specific activities of aspartic- α -ketoglutaric transaminase in muscles, fat body and haemolymph of pupae diapausing at 4° and in flight muscle of the moth are given in Tables 2 and 3 and in Fig. 1. The specific activity of the transaminase in pupal stage is the highest in muscles, approximately 10 times lower in fat body and insignificant in haemolymph. In the flight muscles of the moth the transaminase activity is 6 times higher than in the same tissue in the pupal stage. The activity of transaminase in the flight muscles is noteworthy since it is ^{twice} half as high as in pigeon heart muscle. Fig. 2 shows the course of transamination as studied with the preparations of pigeon heart muscle and flight muscles of Hawk-moth. Fig. 3 includes kinetic data on this reaction occurring in enzymatic preparations from *C. euphorbiae* pupae.

The specific activities of aspartic- α -ketoglutaric transaminase during pupal development are given in Table 4. It is interesting to note that this transaminase is more active in pupae kept during diapause at 18° than in the pupae diapausing at 4°.

Our experimental data indicate that during pupal development the activity of aspartic- α -ketoglutaric transaminase decreases, and is then raised ca. 10-fold in the flight muscles, of the moth, i. e. the activity of this enzyme is twice as high as in pigeon heart muscle.

Table 4

Specific activity of aspartic- α -ketoglutaric transaminase in muscles of *C. euphorbiae* during metamorphosis

The values are expressed in GOT units and μ moles of DPNH oxidized/min./mg. of protein

			Muscles		Fat body		Haemolymph	
			GOT	DPNH (μ mole)	GOT	DPNH (μ mole)	GOT	DPNH (μ mole)
Pupa	diapausing	at 4°	967	5.9	100	0.62	25	0.08
		at 18°	3290	10.5	252	0.78	11	0.03
	beginning of development		427	2.7	100	0.30	—	—
	development almost completed		422	2.6	—	—	—	—
Moth			10151	31.7	—	—	—	—
Pigeon heart muscle			3320—4830	10—15	—	—	—	—

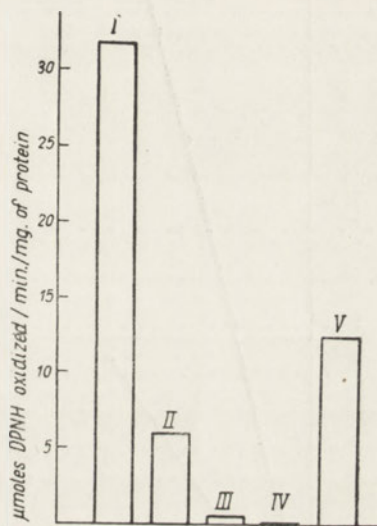


Fig. 1. Specific activity of aspartic- α -ketoglutaric transaminase in muscles, fat body and haemolymph of pupae and flight muscles of the moth *C. euphorbiae*

(I) Flight muscles, (II) Pupal muscles, (III) Pupal fat body, (IV) Pupal haemolymph, (V) Pigeon heart muscle

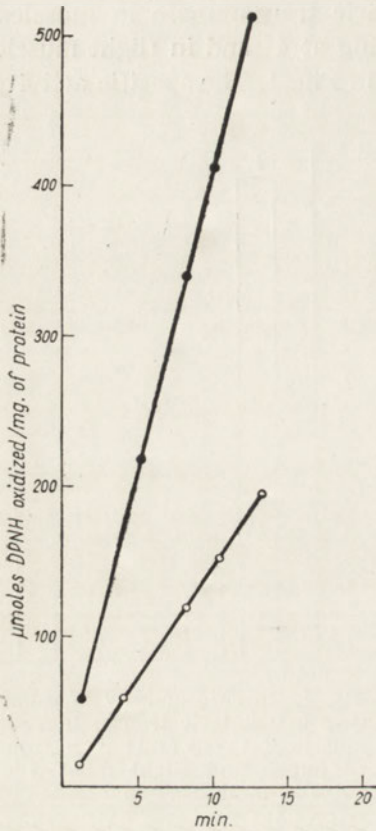


Fig. 2. Aspartate- α -ketoglutarate transamination in flight muscles of the adult *C. euphorbiae* and pigeon heart muscle

- — Flight muscles of the moth,
- — Pigeon heart muscle

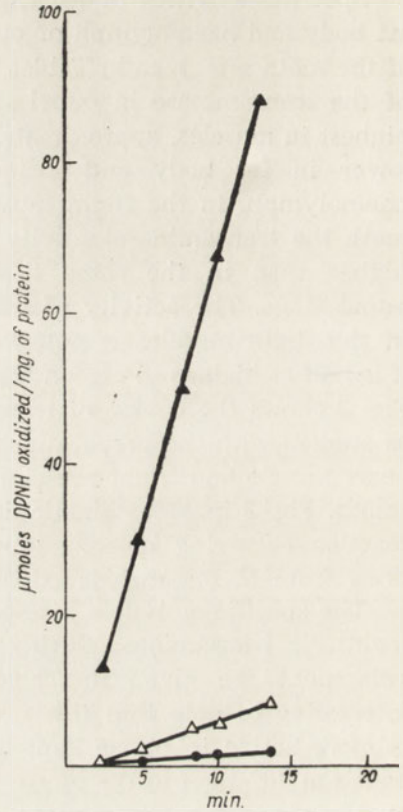


Fig. 3. Aspartate- α -ketoglutarate transamination in muscles, fat body and haemolymph of *C. euphorbiae* pupae diapausing at 4°C

- ▲ — Muscles, △ — Fat body,
- — Haemolymph

DISCUSSION

It is generally accepted, that pyridoxal phosphate plays the role of a coenzyme in transamination systems in insects as well as in the other animals. Kilby [10] found that the addition of pyridoxal phosphate increase the activity of dialyzed homogenates and cell fragments of *Schistocerca gregaria* fat body, while in undialyzed preparations it has no effect on their enzymic activity.

Desai and Kilby [6] observed that the activity of aspartic- α -ketoglutaric and alanine- α -ketoglutaric transaminases in the fat body homogenates of *Calliphora erythrocephala* is reduced upon dialysis to 20%, and is

restored only to 52% on subsequent addition of 1.3 mg. of pyridoxal phosphate per ml. of the incubation mixture. Mc Allen data reported by Bheemeswar [1] show that purified aspartic- α -ketoglutaric transaminase from *Musca domestica* requires an addition of pyridoxal phosphate for its enzymic activity.

In our experiments the activity of aspartic- α -ketoglutaric transaminase was found to be the same within experimental error in dialyzed and undialyzed preparations of pupal muscles and fat body, and muscles of the adult *Celerio euphorbiae*. In either case pyridoxal phosphate added has no effect on the enzymic activity. The same preparations from pigeon heart muscle are inactive unless fortified with pyridoxal phosphate.

Cammarata and Cohen [3, 4] and Nisonoff and Barnes [13] found in the kinetic studies on transamination in hog heart and liver, that the addition of pyridoxal phosphate is necessary for the enzymic activity of preparations obtained by the same method. Results similar to our data have been recorded by Nagayama, Muramatsu and Shimura [12] who studied alanine-ketomalonic transaminase in *Bombyx mori* larvae. Their purified preparation was ca. 18 times as active as the starting material but pyridoxal phosphate has no effect on the activity.

The results given in experimental part show that aspartic- α -ketoglutaric transaminase occur in fat body, muscles and haemolymph of *C. euphorbiae* pupae. Other authors as referred by Bheemeswar [1] did not observed any transaminase activity in insect haemolymph in spite of high amino-acidaemia. Our chromatographic and spectrophotometric studies carried out on the haemolymph of pupae show transaminating activity, although small as compared with that of other tissues; in the scale used in Fig. 1 it seems insignificant.

The aspartic- α -ketoglutaric transaminase in pupae was found to be more active, ca. 7 fold in muscles than in fat body. This result is especially significant since many workers consider fat body as the major site of intermediary protein metabolism somewhat analogous to the mammalian liver. For this reason Kilby [10] carried out his determinations on fat body while studying protein metabolism in *Schistocerca gregaria*. Under conditions used by this author glutamate was synthesized from α -ketoglutarate at a rate of about 200 μ moles/g. tissue/hour, i.e. corresponding to the transamination activity reported by Awapara and Seale for rat liver and kidney.

High activity of aspartic- α -ketoglutaric transaminase in pupal muscle of *C. euphorbiae* proves the participation of this tissue in protein metabolism in insect. The activity of this transaminase is ca. 3 times lower during pupal development than in diapausis stage. In this connection it

has to be mentioned that pupal development is characterised by intense protein synthesis [2].

An emphasis should be also put on the very high transamination value in the flight muscles of the moth, exceeding 5 fold the activity of this enzyme in pupal muscle during diapausis and twice the activity of pigeon heart muscle. It is possible that high activity of aspartic- α -ketoglutaric transaminase is due to the intense respiratory metabolism in the insect muscles during flight. It should also be noticed that the activity of aspartic- α -ketoglutaric transaminase is higher in pupae diapauzing at 18° than when kept at 4°.

The above observations suggest that the activity of this transaminase is related to the direction of protein metabolism in insects. Similar relationship was observed by Cohen [5] who measured aspartic- α -ketoglutaric transaminase activities in various tissues. He concluded that the activity of this enzyme was inversely related to protein synthesis.

It seems interesting therefore whether the relationship between transamination and general protein metabolism observed in homoiothermal animals implies to poikilothermal insects.

SUMMARY

1. Aspartic- α -ketoglutaric transaminase was demonstrated in muscles, fat body and haemolymph of pupae and flight muscles of the Hawk-moth (*C. euphorbiae*) by paper chromatography and spectrophotometric measurements. The reaction catalyzed by this transaminase is reversible under described conditions.

2. Addition of pyridoxal phosphate either to dialyzed or undialyzed preparations has no effect on the activity of this enzyme.

3. Specific activity of aspartic- α -ketoglutaric transaminase in pupal stage is the highest in muscles, ca. 10 times lower in fat body and insignificant in haemolymph.

4. Specific activity of the moth flight muscles transaminase is 6 fold higher than in pupal muscles and twice as high as in pigeon heart muscle.

5. Specific transaminase activity is higher in pupae kept during diapausis at 18° as compared with pupae diapauzing at 4°.

REFERENCES

- [1] Bheemeswar B., Symposium XII. IVth Intern. Congress of Biochemistry, Vienna, 1—6 Sept. 1958.
- [2] Bricteux-Gregoire S., Verly W. C., Florkin M., *Nature* **179**, 678, 1957.
- [3] Cammarata P. S., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **187**, 439, 1950.
- [4] Cammarata P. S., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **193**, 45, 1951.

- [5] Cohen P. P., Hekhuis G. L., *Cancer Research* **1**, 620, 1941.
- [6] Desai R. M., Kilby B. A., *Arch. Inter. Physiol. Biochimie* **66**, 248, 1958.
- [7] Fukuda F., Hayashi T., *J. Biochem. (Tokio)* **45**, 469, 1958.
- [8] Gunsalus J. C., Umbreit W. W., Bellamy R., *J. Biol. Chem.* **161**, 743, 1945.
- [9] Kilby B. A., Neville E., *Biochim. Biophys. Acta* **19**, 389, 1956.
- [10] Kilby B. A., Neville E., *J. Exp. Biol.* **34**, 276, 1957.
- [11] Mieszkowa N. S., Sjewierin S., *Praktikum po biochemii zwierotnych*. Moskwa, 1950. Polskie tłum. Państw. Wydaw. Roln. i Leśne, 1954.
- [12] Nagayama H., Muramatsu M., Shimura K., *Nature* **181**, 417, 1958.
- [13] Nisonoff A., Barnes F. W., *J. Biol. Chem.* **199**, 713, 1952.
- [14] Ochoa S. in *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc. **1**, 736, New York, 1955.
- [15] Ohlmeyer P., *Biochem. Z.* **297**, 67, 1938.
- [16] *Organic Syntheses*, New York, **26**, 42, 1946.
- [17] Peterson E., Sober H. A., Meister A., *Biochemical Preparation*, New York, **3**, 29—34, 1953.
- [18] Warburg O., Christian W., *Biochem. Z.* **310**, 384, 1941/42.
- [19] Wilson A. N., Harris S. A., *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 4693, 1951.
- [20] Steinberg D., Ostrow B. W., *Proc. Exptl. Biol. Med.* **89**, 31, 1955.
- [21] Steinberg D., Baldwin D., Ostrow B. W., Publication of National Heart Institute, National Institutes of Health Bethesda, 1957.

TRANSAMINACJA U OWADÓW

I. TRANSAMINAZA KWAS ASPARAGINOWY-KWAS α -KETOGLUTAROWY U *CELERIO EUPHORBIAE* L.

Streszczenie

1. Wykazano metodą chromatograficzną i spektrofotometryczną występowanie transaminazy-kwas asparaginowy-kwas α -ketoglutarowy w mięśniach, ciele tłuszczowym i hemolimfie poczwarki oraz mięśniach piersiowych motyla wilczomlecza (*C. euphorbiae*). Reakcja katalizowana przez ten enzym jest odwracalna w opisanych warunkach.

2. Dodatek fosforanu pirydoxalu do homogenatów badanych tkanek bez dializy i po dializie nie ma wpływu na aktywność enzymu.

3. Aktywność właściwa badanej transaminazy jest u poczwarek największa w mięśniach, ok. 10 razy niższa w ciele tłuszczowym i nieznaczna w hemolimfie.

4. Mięśnie piersiowe motyla wykazały ok. 6 razy wyższą aktywność transaminazy w porównaniu z mięśniami poczwarki.

5. Aktywność transaminazy jest wyższa u poczwarek przechowywanych podczas diapauzy w temp. 18° w stosunku do aktywności tego enzymu u poczwarek w tym samym okresie rozwoju lecz przechowywanych w temp. 4°.

Otrzymano 12.12.1958 r.

Z. SZAFRAN, H. SZAFRAN i J. OLEKSY

**HYDROLIZA ESTRÓW KARBOKSYLOWYCH PRZEZ ESTERAZY
SOKU TRZUSTKOWEGO PSA***Zakład Chemii Fizjologicznej A. M. w Krakowie**Kierownik: prof. dr B. Skarżyński**i Zakład Fizjologii A. M. w Krakowie**Kierownik: prof. dr J. Kaulbersz*

Zagadnienie esteraz soku trzustkowego było podejmowane w dotychczasowym piśmiennictwie tylko fragmentarycznie. Bezspornie wszyscy badacze potwierdzają obecność lipazy w soku trzustkowym, jakkolwiek nazwą tą obejmowali niewątpliwie mieszaninę kilku enzymów hydrolizujących wiązania estrowe.

Użycie metody elektroforezy stworzyło możliwości rozdziału białek soku trzustkowego i tym samym zróżnicowania związanych z nimi enzymów. Badania tego typu zapoczątkowali Munro i Thomas [24], a następnie rozwinęli Grossberg i współp. [10] oraz Byrne i współp. [5], lokalizując w wyodrębnionych frakcjach białkowych trzy główne enzymy soku trzustkowego psa. A. i R. Delcourt [6] oraz Rotschild i Junqueira [27], stosując elektroforezę bibulową, rozszerzyli te badania także na inne enzymy występujące w soku trzustkowym. Pierwsi z nich zlokalizowali lipazę, esterazę i esterazę pseudochoolinową w soku trzustkowym psa, drudzy, rozdzielając na bibule sok trzustkowy szczura, oznaczali rozmieszczenie m. in. lipazy, esterazy i rybonukleazy. Rozróżnienie między lipazą i esterazą w obu tych pracach jest nieprzekonywające, ponieważ opierało się tylko na różnicach w hamowaniu taurocholanem sodu. Wyniki tych wszystkich prac są rozbieżne i nie pozwalają na dokładniejsze określenie własności badanych enzymów, ani też na jednoznaczne umiejscowienie ich we frakcjach elektroforetycznych.

Badania przeprowadzone poprzednio w naszych pracowniach na soku trzustkowym psa, posługujące się elektroforezą na bibule [18] i na żelu agarowym [31] wykazały obecność co najmniej czterech różnych esteraz,

a mianowicie lipazy, niespecyficznej esterazy, esterazy cholinowej i zasadowej fosfatazy. Niniejsza praca ma na celu dokładniejsze scharakteryzowanie tych esteraz przy użyciu różnych substratów i inhibitorów oraz zaliczenie ich do przyjętych ostatnio typów aktywności esterolitycznej.

METODY

Sok trzustkowy psa otrzymywano z przetoki ostrej po podaniu preparatu sekretyny, pankreozyminy lub pilokarpiny, albo z przetoki stałej według Thomasa [32], stosując dodwunastniczo roztwór kwasu solnego. Sok zagęszczony 2-4-krotnie przez dializę względnie 50% roztworu gumy arabskiej rozdzielano elektroforetycznie na płytkach szklanych powleczonych żelazem agarowym z hyflo super-cel. Metodę elektroforezy oraz eluowania białka z warstw żelaznego agarowego opisano poprzednio [31]. W części doświadczeń elektroforezę przeprowadzano w pomieszczeniu chłodnym (ok. 15°) przy równoczesnym chłodzeniu wanierek z roztworem buforowym i naczyń elektrodowych lodem.

Substratami używanymi do oznaczeń aktywności enzymatycznej były następujące estry: trójbutyryna, trójacetyna, oliwa, maślan etylu, octan amyłu, octan *p*-nitrofenolu, octan indoksyłu, octan cholesterolu, stearynian cholesterolu i chlorek acetylocholino. Wszystkie te związki, z wyjątkiem octanu *p*-nitrofenolu otrzymanego według metody Hugginsa i Lapidesa [20], były odczynnikami handlowymi. Jako inhibitory stosowano ezerynę i kwas dwuizopropylodifluorofosfonowy (D₂FP), udostępniony nam uprzejmie przez dra E. Chodorowskiego.

Aktywność enzymatycznej hydrolizy trójbutyryny, trójacetyny, oliwy, maślanu etylu i octanu amyłu oznaczano według zmodyfikowanej metody Overbeeka i Van der Viesa [26]. Roztwory substratów sporządzano dodając po 0,35 μ mola estru do 9,5 ml roztworu zawierającego 0,25% (wag./obj.) soli sodowej weronalu i 0,5% taurocholanu sodu. W przypadku oliwy stosowano taurocholan sodu w stężeniu 2%. W celu otrzymania jednorodnej emulsji, mieszaninę umieszczano w łaźni o temperaturze 45° na 30 minut przy stałym wstrząsaniu. Do 10 ml emulsji dodawano 0,5 ml roztworu zawierającego enzym i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 37°, a następnie zatrzymywano reakcję przez dodanie 20 ml alkoholu etylowego 96% i miareczkowano 0,1 N alkoholowym roztworem KOH w obecności fenoltaleiny i błękitu tymolowego. Za jednostkę aktywności enzymatycznej przyjęto tę ilość enzymu, która w warunkach oznaczenia rozkłada w czasie 2 godzin 10 μ moli estru. Hydrolizę octanu indoksyłu oznaczano metodą histochemiczną Holta [17] przystosowaną do naszych celów. Adaptacja polega na tym, że 1 ml roztworu octanu indoksyłu zawierającego 1,5 μ moli tej substancji inkubuje się z 1 ml buforu fosfo-

ranowego 0,066 M o $\text{pH} = 7,0$ i 3 ml roztworu zawierającego odpowiednią ilość enzymu w temperaturze 25° . Dokładnie po oznaczonym czasie mierzy się intensywność niebieskiego zabarwienia indyga na fotokolorymetrze Coleman Junior przy długości fali $650 \text{ m}\mu$. Jednostką przyjętą dla tej metody jest ilość enzymu, która w warunkach oznaczenia w czasie 20 minut powoduje przyrost gęstości optycznej o 0,100. Hydrolizę pozostałych substratów oznaczano jak w pracach poprzednich [19, 31].

Przy wszystkich oznaczeniach z użyciem inhibitorów, przed oznaczeniem aktywności enzymatycznej inkubowano roztwór zawierający enzym z roztworem inhibitora przez 20 minut w temperaturze 37° .

W eluatach z poszczególnych frakcji elektroforetycznych oznaczano również stężenie białka poprzednio opisaną metodą [19] i aktywność enzymatyczną przeliczano na 1 mg białka.

WYNIKI

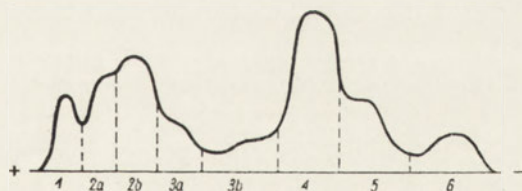
Doświadczenia przeprowadzono na sokach uzyskanych z przetok ostrych (12 psów) i przewlekłych (3 psy). Na otrzymanym materiale (30 próbek soku trzustkowego) przeprowadzono w sumie 49 rozdziałów

Tablica 1

Średnie wartości rozkładu procentowego białka we frakcjach elektroforetycznych soku trzustkowego psa

Wartości średnie obliczono z 49 oznaczeń białka we frakcjach

frakcje	1	2a	2b	3a	3b	4	5	6
wzgl. %	6,5 $\pm 0,5$	10,4 $\pm 0,6$	13,3 $\pm 0,8$	7,3 $\pm 0,4$	7,4 $\pm 0,5$	34,4 $\pm 1,2$	12,9 $\pm 0,7$	7,8 $\pm 0,3$



Rys. 1. Rozmieszczenie białka na elektroforogramach soku trzustkowego z zaznaczonym podziałem na frakcje

elektroforetycznych. Zastosowana technika elektroforezy na żelu agarowym zawierającym hyflo super-cel umożliwia rozdzielenie białek soku trzustkowego na 6—8 frakcji, oznaczanych kolejno liczbami 1, 2a, 2b, 3a,

3b, 4, 5 i 6, licząc od dodatniego bieguna prądu (Rys. 1). Przeciętny rozkład procentowy białka na poszczególne frakcje przedstawiony jest w tabelicy 1 i nie różni się od wartości otrzymywanych poprzednio.

Tablica 2

Wartości średnie aktywności enzymatycznej poszczególnych frakcji białkowych soku trzustkowego psa

substrat	ilość ozn.	frakcje								
		1	2a	2b	3a	3b	4	5	6	
trójbutyryna	11	11,7 ±5,1	1,9 ±1,5		0,8 ±0,3	1,3 ±0,3	44,6 ±9,0	39,6 ±6,5	0,1 ±0,05	
oliwa	15	1,2 ±0,6	0,6 ±0,3			1,1 ±0,4	12,6 ±2,8	30,4 ±5,1	53,8 ±5,6	0,3 ±0,2
trójacetyna	11	1,1 ±0,4	0,5 ±0,3			1,9 ±0,5	10,1 ±2,9	23,0 ±3,6	63,3 ±4,5	0,3 ±0,1
maślan etylu	14	3,9 ±2,1	0,9 ±0,5		0,4 ±0,2	0,6 ±0,2	11,6 ±2,6	21,2 ±4,1	59,9 ±4,0	1,5 ±0,9
octan amylu	9	4,4 ±1,7	1,9 ±0,9			5,5 ±2,3	10,3 ±1,7	17,9 ±3,9	57,8 ±5,5	2,0 ±1,0
octan <i>p</i> -nitrofenolu	16	56,8 ±4,5	26,6 ±3,2	9,8 ±1,7	3,4 ±0,9	1,7 ±0,5	1,2 ±0,6		0,4 ±0,1	0,4 ±0,2
octan indoksyłu	8	42,5 ±7,0	39,4 ±4,5	10,3 ±4,9		3,5 ±1,2	2,7 ±1,1		0,9 ±0,2	0,7 ±0,4
octan cholesterolu	4	59,7 ±12,5	24,6 ±10,2	12,3 ±5,8		1,6 ±0,7	0,9 ±0,5		1,0 ±0,5	0,0 ±0,0
stearynian cholesterolu	2	57,0 ±1,0	23,8 ±10,9			0,0 ±0,0	12,9 ±12,9		6,3 ±3,0	0,0 ±0,0
chlorek acetylocholinu	31	41,7 ±6,8	8,7 ±2,5	4,6 ±1,4	8,7 ±2,6	26,8 ±6,1	9,3 ±3,0		0,2 ±0,1	0,1 ±0,1

Poszczególne liczby przedstawiają procent całej aktywności enzymatycznej względem danego substratu w każdej frakcji elektroforetycznej.

Wyniki oznaczeń aktywności enzymatycznej hydrolizy zastosowanych substratów przez poszczególne frakcje białkowe są przedstawione w tabelicy 2. Z podanych tam liczb widać, że trójglicerydy i estry alkoholi alifatycznych zachowują się zasadniczo w jednakowy sposób. Są one hydrolizowane głównie przez frakcje 4 i 5 i w znacznie mniejszym stopniu przez frakcję 1. Szybkość hydrolizy jest największa dla trójbutyryny i małeje w kolejności: trójbutyryna, oliwa, trójacetyna, maślan etylu, octan amylu (Tablica 3). Frakcje 4 i 5 nie rozkładają ani estrów fenoli ani też estrów cholesterolu i acetylocholinu.

Estry zawierające układ cykliczny, to znaczy octan *p*-nitrofenolu, octan indoksyli, octan i stearynian cholesterolu są rozkładane głównie przez frakcję 1 i w słabszym stopniu przez frakcje sąsiadujące 2a i 2b. Rozkład tych substratów przez frakcje 2a i 2b może być spowodowany działaniem innego enzymu; wskazują na to różnice w inaktywacji cieplnej. Enzym (lub enzymy) we frakcji 1 jest termolabilny i jeżeli przeprowadza

Tablica 3

Szybkość hydrolizy trójglicerydów i estrów alifatycznych przez frakcję 5

substrat	trójbutyryna	oliwa	trójacetyna	maślan etylu	octan amylu
ilość jednostek na 1 mg białka	5800	985	145	90	27

się elektroforezę soku trzustkowego w temperaturze pokojowej, to wskutek ogrzania warstw żelu agarowego na powierzchni płytek, ulega on często całkowitej inaktywacji. W tych przypadkach frakcja 1 nie rozkłada żadnego z zastosowanych substratów, natomiast rozkład octanu *p*-nitrofenolu odbywa się wtedy, chociaż z mniejszą szybkością, pod działaniem frakcji 2a i 2b (Tablica 4). Aktywność ta pokrywa się z aktyw-

Tablica 4

Hydroliza octanu p-nitrofenolu i acetylocholinę przy inaktywacji cieplnej frakcji 1

substrat		ilość dośw.	frakcje							
			1	2a	2b	3a	3b	4	5	6
octan <i>p</i> -nitrofenolu	a	16	56,8	26,6	9,8	3,4	1,7	1,2	0,4	0,4
	b	13	13,7	27,1	34,6	9,6	5,0	5,0	3,5	1,4
acetylocholina	a	12	69,9	14,8	5,5	3,8	3,4	2,5	0,0	0,0
	b	12	4,9	1,2	2,3	8,8	61,8	20,5	0,3	0,0

Poszczególne liczby oznaczają procent całej aktywności w danej frakcji, szereg „a”: doświadczenia przy elektroforezie chłodzonej, szereg „b”: doświadczenia z zinaaktywowaną frakcją 1 (elektroforeza w temperaturze pokojowej).

nością proteolityczną tych frakcji [18]. Biorąc pod uwagę stwierdzone w kilku dawniejszych pracach esterolityczne działanie trypsyny, chymotrypsyny i karboksypeptydazy względem tego typu substratów [8, 11, 15, 21], można tłumaczyć tę aktywność działaniem któregoś z tych enzymów, najprawdopodobniej trypsyny.

Hydroliza acetylocholinyl zachodzi pod działaniem dwóch frakcji: 1 i 3b ¹⁾, przy czym 41,7% całej aktywności przypada na frakcję 1, a 26,8% na frakcję 3b. Enzym we frakcji 3b nie występował we wszystkich przebadanych w ten sposób próbkach soku, a tylko w 11 na 19; fakt ten nie pozostaje w żadnej uchwytnej łączności z rodzajem soku. Wydaje się, że acetylocholina, ani też estry cholesterolu nie ulegają hydrolizie pod wpływem frakcji 2a i 2b, co można najlepiej zaobserwować w tych przypadkach, gdzie frakcja 1 uległa inaktywacji cieplnej.

Rozmieszczenie poszczególnych typów aktywności esterolitycznej widoczne jest wyraźniej przy uwzględnieniu aktywności właściwej, to znaczy ilości jednostek enzymu przypadających na 1 mg białka w każdej frakcji elektroforetycznej. Wartości aktywności właściwej hydrolizy wszystkich badanych substratów przedstawione są w postaci diagramów na rys. 2.

W celu dokładniejszego umiejscowienia maksimum aktywności esterazy z frakcji 4 i 5 przeprowadzono doświadczenie, w którym każdą z tych frakcji podzielono na dwie części. W eluatach z tych odcinków oznaczono szybkość hydrolizy oliwy i dla porównania oznaczono równolegle aktywność amylazy, której maksimum przypada na frakcję 4 [18] (Tablica 5).

Tablica 5

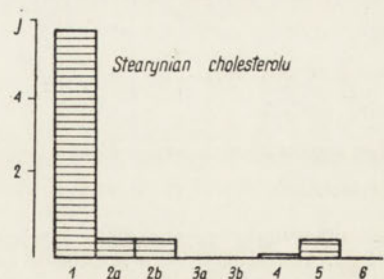
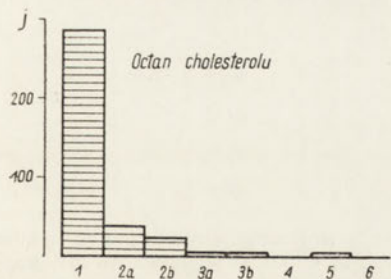
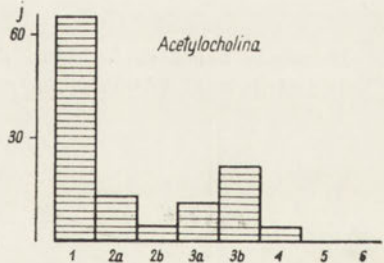
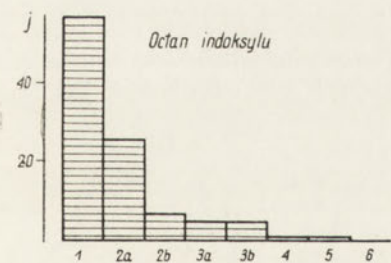
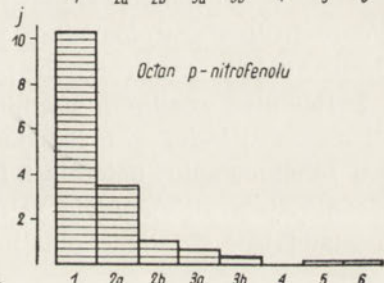
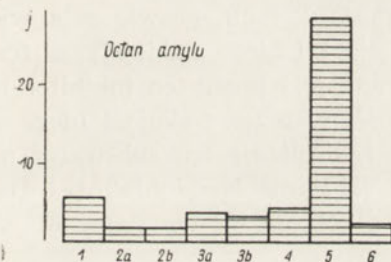
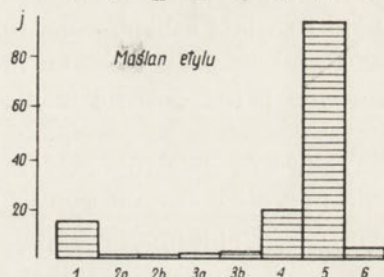
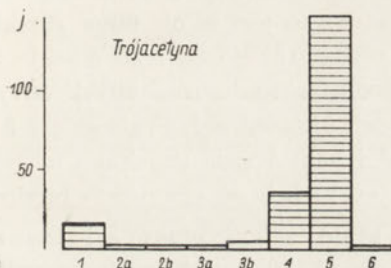
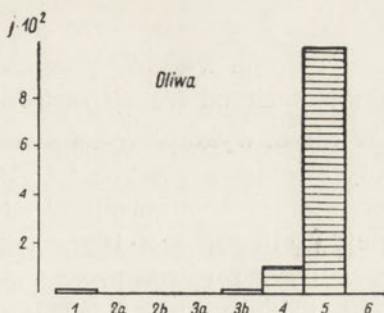
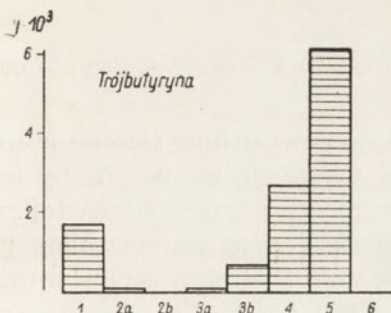
Porównanie hydrolizy oliwy i skrobi (aktywność amylazy) przez sąsiednie odcinki frakcji 4 i 5

Nr dośw.	Substrat	Fracje			
		4a	4b	5a	5b
9upz ₁	oliwa	44,8	203,0	319,3	80,7
	skrobia	336,0	272,0	28,8	37,8
9upz ₂	oliwa	33,9	115,7	5340,0	81,0
	skrobia	424,0	396,0	59,0	0,0

Podane liczby przedstawiają ilość jednostek aktywności na 1 mg białka.

Z doświadczeń tych wynika, że najwyższa aktywność hydrolizy oliwy przypada na tę część frakcji 5, która sąsiaduje z frakcją 4, jakkolwiek poważny procent aktywności wykazuje także przyległa część frakcji 4. Aktywność amylazy rozdzielona jest równo na obie części frakcji 4 i tylko w niewielkim stopniu daje się wykryć w sąsiednich odcinkach. Wydaje się więc, że frakcja białkowa zawierająca esterazę (to znaczy frakcja 5)

¹⁾ Poprzednio [31] ustalono maksimum hydrolizy acetylocholinyl we frakcji 3a. Obecnie, ze względu na nieco inny podział odcinków na elektroforogramach, miejsce to pokrywa frakcja 3b.



Rys. 2. Średnie wartości aktywności właściwej hydrolizy różnych estrów przez frakcje elektroforetyczne soku trzustkowego

Wysokość słupków odpowiada średnim wartościom aktywności w jednostkach aktywności na 1 mg białka według skali umieszczonej przy każdym diagramie

rozciga się na większej przestrzeni i zachodzi na frakcję 4, zwykle ostro odcinając się od frakcji sąsiednich.

W części wykonanych doświadczeń użyto powszechnie stosowane inhibitory esteraz — ezerynę i DFP. Ezerynę uważa się za specyficzny inhibitor esterazy cholinowej. W istocie w granicach użytych stężeń tej substancji ($5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ — $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$), hamuje ona hydrolizę acetylocholinę prawie w 100%, zarówno przez frakcję 1 jak i 3b. Hydroliza octanu *p*-nitrofenolu, trójbutyryny, maślanu etylu i octanu indoksyłu przez tę samą frakcję 1 zostaje zahamowana tylko częściowo, to jest w ok. 60%. Rozkład octanu *p*-nitrofenolu i octanu indoksyłu przez frakcje 2a i 2b zostaje zahamowana przez ezerynę w nieco mniejszym stopniu (ok. 50%), co jest również dowodem na odrębność tych dwóch aktywności. Frakcje 4 i 5 są niewrażliwe na działanie ezeryny i wartości hamowania uzyskane na podstawie hydrolizy trójbutyryny i maślanu etylu leżą w granicach błędu.

DFP jest inhibitorem silniejszym ale mniej selektywnym od ezeryny. W granicach używanych stężeń ($2,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ — $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) hamuje on całkowicie hydrolizę acetylocholinę przez frakcje 1 i 3b, prawie całkowicie hydrolizę octanu *p*-nitrofenolu przez frakcję 1 i nieco słabiej przez frakcję 2. Również w silnym stopniu hamowana jest przez ten inhibitor hydroliza octanu indoksyłu. Rozkład trójbutyryny przez frakcję 1 ulega silnemu zahamowaniu, natomiast frakcja 5 hydrolizuje ten substrat z niewiele mniejszą aktywnością w obecności DFP niż bez inhibitora. Dane przedstawiające działanie obu inhibitorów zebrane są w tablicy 6.

Tablica 6

Działanie hamujące ezeryny i kwasu dwuizopropylodifluorofosfonowego na aktywność esterolityczną frakcji białkowych soku trzustkowego psa

substrat	ezeryna					DFP				
	ilość dośw.	frakcje				ilość dośw.	frakcje			
		1	2a	2b	3b		5	1	2a	2b
trójbutyryna	5	60,9	—	—	2,9	8	69,5	—	—	8,5
maślan etylu	1	56,1	—	—	1,0	—	—	—	—	—
octan <i>p</i> -nitrofenolu	8	43,2	40,3	—	—	9	90,5	72,4	—	—
octan indoksyłu	3	68,5	56,8	—	—	2	89,0	97,1	—	—
octan cholesterolu	1	57,6	—	—	—	1	97,0	—	—	—
acetylocholina	11	97,9	—	99,4	—	5	98,5	—	99,2	—

Poszczególne liczby przedstawiają procent zahamowania hydrolizy estrów wskutek inkubacji eluatów frakcji białkowych z roztworem inhibitora przez 20 minut w temperaturze 37°. Ezerynę używano w stężeniach $5 \cdot 10^{-6}$ — $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ kwas dwuizopropylodifluorofosfonowy (DFP) w stężeniach $2,5 \cdot 10^{-6}$ — $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

W większości zamieszczonych tablic zestawiono wartości średnie z podanej ilości doświadczeń wraz z wartością prawdopodobnego błędu średniej. Podanie zestawienia wyników wszystkich oznaczeń nie jest możliwe ze względu na ograniczoną objętość pracy. Stosunkowo dość duże odchylenia od średniej wynikają z różnic indywidualnych użytych zwierząt doświadczalnych i licznych możliwości błędów w czasie długiej procedury dializy, elektroforezy, eluowania i oznaczeń analitycznych.

DYSKUSJA

W piśmiennictwie spotyka się względnie dużo prac zajmujących się zagadnieniem specyficzności i identyfikacji enzymów hydrolizujących wiązania estrowe. Prace te dotyczą najczęściej enzymów surowicy krwi, wątroby, trzustki, rzadziej innych tkanek i płynów ustrojowych i wyodrębniają poszczególne enzymy w mieszaninie na podstawie szybkości hydrolizy różnych substratów i hamowania przez różne inhibitory. Tylko w nielicznych przypadkach posługiwano się oczyszczonymi preparatami, a w większości używano do badań surowych homogenatów tkanek lub nierozdzielonych białek w przypadku surowicy krwi lub innych płynów.

Obecnie w literaturze ugruntował się już pewien schemat klasyfikacji enzymów esterolitycznych. Zapoczątkował go Aldridge [1], rozróżniając dwa typy esteraz — esterazę A odporną na działanie związków organofosforowych i esterazę B, wrażliwą na działanie tych związków. Bergmann i współprac. [4] uzupełnili tę klasyfikację dodając trzeci typ — esterazę C. Enzym ten występuje w nerce, nie ulega hamowaniu przez związki organofosforowe i nie hydrolizuje ich, czym różni się właśnie od esterazy A Aldridge'a. E. E. Underhay [33] w swojej klasyfikacji opiera się nie tylko na działaniu organofosforanów, ale także na specyficzności substratowej i używa nazwy „esteraza alifatyczna“ (odpowiadająca esterazie B) i „esteraza aromatyczna“ (odpowiadająca esterazie A). Słuszność tych nazw została jednak zakwestionowana przez E. E. Hobbigera [13], który wykazał, że substraty zawierające układ aromatyczny mogą być hydrolizowane przez oba typy esteraz i dlatego używa dłuższego określenia „esteraza odporna na działanie związków organofosforowych“ i „esteraza wrażliwa na działanie związków organofosforowych“. Jest rzeczą widoczną, że proponowana nomenklatura jest daleka od doskonałości i nie daje możliwości zidentyfikowania poszczególnych esteraz występujących w różnych tkankach, płynach ustrojowych i sokach trawiennych.

Osobną grupę stanowią esterazy cholinowe. Tutaj dawniejszy podział na esterazy pseudocholinowe i właściwe (true) został ostatnio zastąpiony nomenklaturą uwzględniającą najszybciej rozkładany substrat [3, 34].

Wszystkie esterazy cholinowe są hamowane przez związki organofosforowe już w bardzo małym stężeniu i przez ezerynę, która jest dla nich specyficznym inhibitorem.

Piśmiennictwo dotyczące esteraz soku trzustkowego jest bardzo szczupłe. Dotychczasowe prace przeprowadzane w większości na całym soku trzustkowym nie dają gwarancji uchwycenia pojedynczych enzymów, a wskutek trudności w uzyskaniu dostatecznie dużej ilości materiału nie przeprowadzono dotąd prób oczyszczania enzymów soku trzustkowego. Możliwość częściowego oddzielenia enzymów od innych białek daje w tym przypadku jedynie metoda elektroforezy i przy jej pomocy udało się już rozdzielić i zidentyfikować kilka podstawowych typów aktywności enzymatycznej soku trzustkowego [5, 10, 18, 24, 27]. Elektroforeza nie daje oczywiście gwarancji oddzielenia wszystkich enzymów z mieszaniny, ponieważ w jednej frakcji białkowej może występować mieszanina kilku enzymów o jednakowej ruchliwości i dlatego w niniejszych badaniach zastosowano dodatkowo w celu dokładniejszego ich zróżnicowania różne typy substratów i inhibitorów.

Na podstawie poprzednich badań [31] ustalono, że przy rozdziale elektroforetycznym białek sodu trzustkowego trzy frakcje, to jest 1, 3b i 5 hydrolizują estry kwasów organicznych. Obecnie udowodniono, że odrębną aktywność esterolityczną wykazuje także frakcja 2 i że frakcja 1 zawiera co najmniej dwa, a być może nawet trzy enzymy tego typu, posiadające jednakową ruchliwość elektroforetyczną. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń, dzięki zastosowaniu różnych substratów i inhibitorów, uzyskano możliwość porównania zbadanych enzymów poszczególnych frakcji białkowych soku trzustkowego z opisanymi w literaturze typami esteraz.

Frakcja 1 hydrolizuje wszystkie użyte substraty, wykazując stosunkowo najmniejsze powinowactwo do oliwy. Różnorodność rozkładanych substratów i różnice w hamowaniu przez ezerynę i DFP wskazują na działanie więcej niż jednego enzymu w tej frakcji. Jednym z działających enzymów jest esteraza cholinowa, hamowana całkowicie przez niewielkie stężenia ezeryny i DFP. Enzym ten jest odpowiedzialny za całą hydrolizę acetylocholinylu i co najmniej część hamowanej przez oba inhibitory hydrolizy octanu indoksyli, substratu wykazującego strukturalne podobieństwo do acetylocholinylu [16]. Wiadomo, że esterazy cholinowe mogą także rozkładać estry fenoli [13, 34], jednakże na podstawie danych z literatury hydrolizę estrów cholesterolu, trójglicerydów i estrów alkoholi alifatycznych hamowaną przez ezerynę i DFP można przypisać, przynajmniej częściowo, odrębnej esterazie o niskiej specyficzności substratowej, wrażliwej na działanie związków organofosforowych i wysoce termolabilnej. Sądząc z tych własności byłaby to esteraza alifatyczna (wg Underhaya [33])

typu B (wg Aldridge'a [1]), przypuszczalnie identyczna z esterazą cholesterolową [23].

Ponieważ nawet przy użyciu większych stężeń inhibitorów nie udało się całkowicie zahamować hydrolizy badanych substratów z wyjątkiem acetylocholinę, tę niewrażliwą na działanie ezeryny i DFP aktywność przypisać należy odrębnemu enzymowi, który według własności można by zaliczyć do typu A Aldridge'a [1] lub typu C według Bergmanna i współpracowników [4]. Jest to również enzym o małej specyficzności, podobny pod tym względem do drugiej omówionej poprzednio esterazy i tylko niewrażliwością na działanie ezeryny i DFP zbliżony do aromatycznej esterazy surowicy.

Aktywność esterolityczną frakcji 2a i 2b musi się, choćby w części, przypisać działaniu odrębnego enzymu, na co wskazuje zachowana aktywność tych frakcji względem octanu *p*-nitrofenolu przy inaktywacji cieplnej enzymów frakcji 1. Ponieważ w tej frakcji występuje samoistna aktywność proteolityczna [18] działanie to należy przypisać trypsynie, o której wiadomo, że rozkłada tego typu substraty [8, 21].

Esteraza z frakcji 3b rozkłada tylko acetylocholinę i w słabym stopniu octan indoksyli i jest całkowicie hamowana przez ezerynę i DFP, nawet przy najmniejszym z użytych stężeń tych inhibitorów. Jest to esteraza cholinowa o większej specyficzności, której dokładniejsze scharakteryzowanie byłoby możliwe tylko przy użyciu innych estrów cholinę.

Spośród zbadanych obecnie esteraz soku trzustkowego najłatwiejszym do sklasyfikowania enzymem jest esteraza z frakcji 4 i 5. Jest to niewątpliwie lipaza trzustkowa. Hydrolizuje ona w warunkach oznaczenia trójbutyrynę, oliwę, trójacetynę, maślan etylu i octan amylu (w kolejności malejącego powinowactwa), nie rozkłada (lub tylko bardzo wolno) octanu *p*-nitrofenolu, octanu indoksyli, estrów cholesterolu i acetylocholinę i nie jest wrażliwa na działanie ezeryny i DFP. Wszystkie te cechy pokrywają się z charakterystyką lipazy podaną przez innych autorów [2, 7, 22, 23, 25, 28, 35].

Możliwość występowania w soku trzustkowym, poza lipazą, jeszcze dwóch niespecyficznych esteraz i dwóch esteraz cholinowych jest elementem nowym i tylko częściowo pokrywa się z przeprowadzonymi przez różnych autorów badaniami enzymów esterolitycznych trzustki i soku trzustkowego [7, 9, 12, 14, 22, 23, 29, 30, 31]. W tych przypadkach, kiedy enzymy występują w oddzielonych frakcjach białkowych, ich odrębność jest oczywista, natomiast stwierdzenie z absolutną pewnością, że esterazy

występujące we frakcji 1 są odrębnymi enzymami, byłoby możliwe tylko po ich rozdzieleniu i oczyszczeniu, co dotąd nie zostało przeprowadzone.

Pragniemy złożyć podziękowanie Panu Prof. dr. B. Skarżyńskiemu za pomoc i opiekę, które umożliwiły nam wykonanie tej pracy.

STRESZCZENIE

Zbadano hydrolizę dziesięciu różnych estrów, a mianowicie trójbutyryny, trójacetyny, oliwy, maślanu etylu, octanu amyłu, octanu cholesterolu, stearynianu cholesterolu, octanu *p*-nitrofenolu, octanu indoksyłu i acetylocholinę przez rozdzielone elektroforetycznie frakcje białkowe soku trzustkowego psa. Zbadano również wpływ inhibitorów esteraz: ezeryny i kwasu dwuizopropylodifluorofosfonowego na szybkość hydrolizy zastosowanych estrów.

Stwierdzono możliwość występowania sześciu odrębnych enzymów esterolitycznych zgrupowanych w czterech frakcjach białkowych. Są to: lipaza, dwie esterazy cholinowe, dwie esterazy niespecyficzne różniące się wrażliwością na działanie ezeryny i kwasu dwuizopropylodifluorofosfonowego i aktywność esterolityczna przypisywana trypsynie. Przedyskutowano właściwości i kryteria klasyfikacji tych enzymów w świetle aktualnych poglądów.

L I T E R A T U R A

- [1] Aldridge W. N., *Biochem. J.* **53**, 110, 1953.
- [2] Aldridge W. N., *Biochem. J.* **57**, 692, 1954.
- [3] Augustinsson K. w D. Glick *Methods of Biochemical Analysis*, tom V, Interscience Publishers, New York-London, 1957.
- [4] Bergmann F., Segal R., Rimon S., *Biochem. J.* **67**, 481, 1957.
- [5] Byrne G. M., Phinney J. I., Schachter M., Gordon-Young E., *J. Biol. Chem.* **192**, 683, 1951.
- [6] Delcourt A., Delcourt R., *C. R. Soc. biol.* **147**, 1104, 1953.
- [7] Desnuelle P., Constantin M. J., Sarda L., *Bull. Soc. Chim. biol.* **38**, 625, 1956.
- [8] Dixon G. H., Neurath H., *J. Biol. Chem.* **226**, 1049, 1957.
- [9] Goutier R., Goutier-Pirrote M., *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 558, 1955.
- [10] Grossberg A. L., Komarov S. A., Shay H., *Am J. Physiol.* **168**, 269, 1952.
- [11] Gutfreund H., Sturtevant J. M., *Biochem. J.* **63**, 656, 1956.
- [12] Hernandez H. H., Chaikoff J. L., *J. Biol. Chem.* **228**, 447, 1957.
- [13] Hobbiger E. E., *Biochem. J.* **67**, 600, 1957.
- [14] Hofstee B. H. J., *J. Biol. Chem.* **199**, 357, 1952.
- [15] Hofstee B. H. J., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 211, 1957.
- [16] Holt S. J., *Nature* **169**, 271, 1952.
- [17] Holt S. J., *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 541, 1956.

- [18] Homańska-Szafranowa H., Oleksy J., *Acta Biochim. Polon.* 3, 663, 1956.
- [19] Homańska-Szafranowa H., Oleksy J., Szafran Z., *Acta Physiol. Polon.* 9, 233, 1958.
- [20] Huggins C., Lapidus J., *J. Biol. Chem.* 170, 467, 1947.
- [21] Kilby B. A., Youatt G., *Biochem. J.* 57, 303, 1954.
- [22] Myers D. K., *Biochem. J.* 64, 740, 1956.
- [23] Myers D. K., Schotte A., Boer H., Borsje-Bakker H., *Biochem. J.* 61, 521, 1955.
- [24] Munro M. P., Thomas J. E., *Am. J. Physiol.* 145, 140, 1945.
- [25] Nachlas M. M., Blackburn R., *J. Biol. Chem.* 230, 1051, 1958.
- [26] Overbeek G. A., Van der Vies J., *Biochem. J.* 60, 665, 1955.
- [27] Rotschild H. A., Junqueira L. C. U., *Nature* 178, 258, 1956.
- [28] Sarda L., Marchis-Mouren G., Constantin M. J., Desnuelle P., *Biochim. Biophys. Acta* 23, 264, 1957.
- [29] Swell L., Treadwell C. R., *J. Biol. Chem.* 212, 141, 1955.
- [30] Swell L., Dailey R. E., Field Jr. H., Treadwell C. R., *Arch. Biochem. Biophys.* 59, 393, 1955.
- [31] Szafran Z., Homańska-Szafranowa H., Oleksy J., *Acta Biochim. Polon.* 5, 189, 1958.
- [32] Thomas J. E., *The External Secretion of the Pancreas* C. Thomas, Springfield, 1950, str. 27 i nast.
- [33] Underhay E. E., *Biochem. J.* 66, 383, 1957.
- [34] Whittaker V. P., *Physiol. Rev.* 31, 312, 1951.
- [35] Wills E. D., *Biochem. J.* 69, 17P, 1958.

HYDROLYSIS OF CARBOXYLIC ESTERS BY ESTERASES DERIVED FROM DOG PANCREATIC JUICE

S u m m a r y

Authors have studied hydrolysis of ten esters by various electrophoretic fractions of protein derived from the dog pancreatic juice.

The following esters were tested: tributyrin, triacetin, olive oil, ethyl butyrate, amyl acetate, cholesteryl acetate, cholesteryl stearate, par-nitrophenyl acetate, indoxyl acetate and acetylcholine.

Authors have also studied the effect of the known esterases inhibitors, such as eserine and diisopropylfluorophosphate upon the rate of hydrolysis of the tested esters.

The obtained results point to the probable presence of six separate esterases contained in four electrophoretic fractions. The following enzymes were found: lipase, two cholinesterases, two non-specific esterases differing one from another by their susceptibility towards the two inhibitors tested, and an esterase activity attributed to trypsin.

Characteristics of the enzymes as well as principles of their classification have been discussed with regard ideas on the matter.

Otrzymano 15.12.1958 r

I. REIFER i L. BURACZEWSKA

MIKROMETODA OZNACZANIA ORNITYNY

*Zakład Biochemii Roślin
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa*

Van Slyke i współpracownicy [3] zauważyli, że prolina, lizyna i ornityna tworzą z ninhydriną w $\text{pH} = 1,0$ barwny produkt, podczas gdy większość innych aminokwasów w tym pH daje tylko nieznaczne zabarwienia.

Chinard [1] przebadał spektrofotometrycznie barwne produkty aminokwasów z ninhydriną w $\text{pH} = 1,0$ i stwierdził, że przy długości fali $515 \text{ m}\mu$, prolina i ornityna mogą być oznaczone ilościowo. Ze względu na intensywność zabarwienia z ninhydriną, tylko cytrulina, cysteina, lizyna i hydroksypolina uniemożliwiają oznaczenie proliny i ornityny, jeżeli obecne są w stężeniach molarnych 10-krotnie wyższych aniżeli te dwa wymienione aminokwasy.

Work [4] podaje, że w $\text{pH} = 1,0$ lub niższym, dwuaminodwukarboksyłowe kwasy reagują w podobny sposób z ninhydriną; autor uważa, że reakcja ta może być wykorzystana do oznaczania dwuaminopimelinowego kwasu pod warunkiem, że oznaczona próba nie zawiera tryptofanu, cystyny, ornityny, proliny i lizyny.

W niniejszej pracy opisano metodę chromatograficznego rozdzielania ornityny i lizyny od innych przeszkadzających aminokwasów (proliny, hydroksyproliny, cysteiny, cytruliny i tryptofanu) oraz metodę kolorymetrycznego oznaczania ornityny w obecności lizyny.

METODA

Odczynniki do chromatografii: (1) alkohol *n*-butylowy, (2) 25% roztwór kwasu solnego (1 cz. HCl o c.w. 1,18 i 3 cz. wody); (3) toluen; (4) 0,25% roztwór ninhydriny w 96% alkoholu etylowym.

Do oznaczania kolorymetrycznego: (5) 1,5% roztwór ninhydriny. Ninhydrinę rozpuszcza się w kilkunastu ml lodowatego kwasu octowego w temperaturze nie przekraczającej 70° i dopełnia kwasem octowym do

odpowiedniej objętości. Przechowany w lodówce roztwór pozostaje trwały przez kilka dni. (6) Mieszanina kwasu *o*-fosforowego o c. w. 1,75 z lodowatym kwasem octowym. 30 ml kwasu fosforowego uzupełnić w kolbie miarowej do 100 ml kwasem octowym. (7) Stężony kwas solny, c. w. 1,18. (8) Chloroform destylowany. (9) 96% alkohol etylowy.

2 do 20 μg ornityny przenoszono pipetami Carlsberga (5 do 100 μl) na bibułę Whatman 1, stosując technikę krążkową. Fazę rozwijającą przygotowano w sposób następujący: 100 ml *n*-butanolu wytrząsano z 300 ml 25% kwasu solnego. Odrzucono fazę wodną, a do fazy alkoholowej dodano 25 ml toluenu i wytrząsano. Po kilku minutach oddziela się reszta fazy wodnej od fazy organicznych rozpuszczalników, którą używa się po przesączeniu przez sączek z bibuły. Szczegółowe dane odnośnie przygotowania chromatogramu opisane są w pracy Reifera i współprac. [2].

Chromatogramy rozwijano około 48 godzin, osuszano za pomocą suszarki fryzjerskiej, a następnie w eksykatorze próżniowym podłączonym do pompy wodnej przez około 15 do 20 minut. W celu usunięcia pozostałych w bibule śladów kwasu solnego chromatogramy przetrzymywano przez kilka minut pod kloszem w atmosferze amoniaku, którego nadmiar usuwano za pomocą suszarki fryzjerskiej. Chromatogramy opryskano 0,25% roztworem ninhydryny i wywołano przez 10 minut w temperaturze 70°. W tych warunkach rozdziału chromatograficznego spośród przebadanych 29 aminokwasów ¹⁾, 6 posiada R_F od 0,04 do 0,09. Są to oprócz ornityny: lizyna, histydyna, arginina, kwas djenkolowy i cystyna. Z tych aminokwasów w opisanych niżej warunkach oprócz ornityny również lizyna, kwas djenkolowy i cystyna tworzą z ninhydryną barwny produkt, wtedy gdy znajdują się w roztworze w stężeniach kilkadziesiąt razy większych aniżeli ornityna. Inne z przeszkadzających aminokwasów (jak prolina, tryptofan, hydroksyprolina, cytrulina i cysteina) doskonale oddzielają się na chromatogramie od ornityny.

Plamy z bibuły odpowiadające ornitynie, pocięte na skrawki umieszczano w probówkach 160 \times 16 mm. Do każdej probówki dodawano pipetą Carlsberga 0,10 ml wody, 0,05 ml mieszaniny kwasów: fosforowego i octowego oraz 0,5 ml 1,5% roztworu ninhydryny. Próbę ślepą stanowiły odczynniki z odpowiednimi wycinkami bibuły z wywołanego chromatogramu. Próby wstawiano na 25 minut do łaźni wodnej o temp. 80° (\pm 1°), chłodzono pod bieżącą wodą i dodawano 2 ml stężonego kwasu solnego.

¹⁾ Leucyna, tryptofan, seryna, fenylalanina, kwas asparaginowy, asparagina, izoleucyna, prolina, kwas glutaminowy, glutamina, kwas α -aminomasłowy, cytrulina, kwas djenkolowy, metionina, cysteina, norwalina, cystyna, norleucyna, walina, hydroksyprolina, tyrozyna, glicyna, homocystyna, treonina, alanina, ornityna, lizyna, histydyna, arginina.

(Intensywność zabarwienia nie zmienia się w ciągu 2 godzin w temp. poniżej 4°). Następnie przenoszono zawartość probówki do lejka rozdzielczego o pojemności 25 ml i probówkę przepłukiwano 2 ml chloroformu. Chloroform przenoszono do lejka i wytrząsano przez 1 minutę, po czym barwną fazę chloroformową przenoszono do probówki kolorymetrycznej. Przemycanie probówki i wytrząsanie w lejku powtarzano jeszcze raz z 2 ml chloroformu. Połączone wyciągi chloroformowe klarowano 1 ml 96% alkoholu etylowego i mierzono wartość ekstynkcyjną na kolorymetrze Leitza przy filtrze C wobec próby ślepej.

W wyżej opisanych warunkach do chloroformu przechodzi cały barwny produkt reakcji ninhydryny z ornityną i połowa (50—52%) produktu reakcji z lizyną.

Aby oznaczyć zawartość lizyny w próbie dodaje się do fazy wodnej w lejku rozdzielczym, pozostałej po oznaczeniu ornityny, 2 ml wody i wytrząsa dwukrotnie z 2 ml chloroformu. W tych warunkach barwny produkt lizyny, pozostały w roztworze wodnym przechodzi ilościowo do chloroformu. Wyciąg chloroformowy klaruje się i oznacza jak wyżej.

WYNIKI

W celu porównania wyników ilościowego oznaczania ornityny i lizyny po rozdziale chromatograficznym, wykonano przede wszystkim oznaczenia tych aminokwasów bezpośrednio z roztworów wodnych. Średnie wartości wyników z wielokrotnych oznaczeń równoległych, w różnych stężeniach aminokwasów przedstawiono w tablicy 1. Różnice między poszczególnymi odczytami wynosiły od 0,5 do 2% przepuszczalności. Wyniki wykazują, że wartość ekstynkcyjną ornityny w granicach od 2 do 20 μg i lizyny w granicach od 50 do 200 μg zgodne są z prawem Beera i Lamberta. Przy użyciu filtra wartość ekstynkcyjną ornityny jest około 35 razy większa od wartości dla połowy lizyny. Tym samym obecność lizyny w próbie o rzędzie stężeń ornityny nie wpływa na wyniki oznaczeń. Z drugiej strony procentowy rozdział produktu lizyny z ninhydryną w wyciągach chloroformowych I i II jest niezależny od absolutnych ilości lizyny w próbie, co umożliwia zastosowanie ogólnego wzoru dla obliczenia ilości ornityny i lizyny w mieszaninach obu aminokwasów:

$$\mu\text{g ornityny} = (E_I - E_{II} \cdot 1,038) \cdot \frac{100}{1,25} = (E_I - E_{II} \cdot 1,038) \cdot 80,$$

$$\mu\text{g lizyny} = E_{II} \cdot \frac{100}{0,0345} = E_{II} \cdot 2899.$$

Tablica 1

Wartości ekstynkcyj dla ornityny i lizyny oznaczonych bezpośrednio i z chromatogramów *)

Ornityna μg	Lizyna μg	bezpośrednio		z chromatogramów	
		E_I	E_{II}	E_I	E_{II}
2,0	0,0	0,0245	0,0000	0,0224	0,0000
5,0	0,0	0,0630	0,0000	0,0580	0,0000
10,0	0,0	0,1277	0,0000	0,1189	0,0000
20,0	0,0	0,2480	0,0000	0,2365	0,0000
0,0	50,0	0,0178	0,0165	0,0178	0,0165
0,0	100,0	0,0363	0,0350	0,0338	0,0338
0,0	200,0	0,0693	0,0693	0,0682	0,0682
2,0	50,0	0,0433	0,0178	0,0422	0,0165
2,0	100,0	0,0603	0,0338	0,0567	0,0330
5,0	100,0	0,0997	0,0353	0,0916	0,0338
10,0	100,0	0,1611	0,0353	0,1428	0,0343

*) Wartości ekstynkcyj pierwszego wyciągu chloroformowego (ornityna + 50% lizyny) wyrażono symbolem E_I , zaś wartości ekstynkcyj drugiego wyciągu (50% lizyny) symbolem E_{II} .

gdzie: E_I = ekstynkcyj pierwszego wyciągu chloroformowego, który zawiera całą ornitynę i połowę lizyny,

E_{II} = ekstynkcyj drugiego wyciągu chloroformowego, który zawiera drugą połowę lizyny.

Jak widać w tablicy 1 wartości ekstynkcyj dla oznaczeń ornityny i w nieznanym stopniu dla lizyny, wykonanych z chromatogramów, są niższe od wartości oznaczeń bezpośrednich. Różnice te wynoszą około 7%, zostały one uwzględnione w skorygowanych wzorach dla oznaczeń ornityny i lizyny z chromatogramów:

$$\mu\text{g ornityny} = (E_I - E_{II} \cdot 1,036) \cdot \frac{100}{1,16} = (E_I - E_{II} \cdot 1,036) \cdot 86,2,$$

$$\mu\text{g lizyny} = E_{II} \cdot \frac{100}{0,0333} = E_{II} \cdot 3003.$$

W tablicy 2 umieszczone są wartości ekstynkcyj aminokwasów o R_F zbliżonym do ornityny. Jak widać aminokwasy te dają barwę z ninhydriną dopiero w stężeniach wielokrotnie wyższych od ornityny. W tablicy 3 umieszczone są wyniki oznaczeń ornityny w obecności 20-krotnie wyższych stężeń argininy, histydyny i kwasu djenkolowego, bez chromatografowania. Z wymienionych aminokwasów jedynie histydyna w większych stężeniach

Tablica 2

Wartości ekstynkcji dla różnych stężeń aminokwasów o R_F zbliżonym do ornityny

Aminokwas	Dano (μg)	E_I
arginina	50	0,0000
	100	0,0000
	250	0,0000
	500	0,0021
	1000	0,0043
kwas djenkolowy	25	0,0000
	50	0,0021
	100	0,0043
	250	0,0111
	500	0,0224
cystyna	100	0,0064
	500	0,0630
histrydina	50	0,0000
	100	0,0000
	500	0,0043

Tablica 3

Oznaczenie ornityny w obecności aminokwasów o R_F zbliżonym do ornityny (bez chromatografowania)

Dodatek	E_I ornityny 5 μg
—	0,0630
arginina 100 μg	0,0630
cystyna 100 μg	0,0630
kwas djenkolowy 100 μg	0,0656
histrydina 25 μg	0,0656
histrydina 50 μg	0,0705
histrydina 75 μg	0,0730
histrydina 100 μg	0,0755

przeszkadza w oznaczeniu ornityny, mimo że sama w opisanych warunkach nie barwi się z ninhydriną nawet w ilości 500 μg w badanej próbce.

Ze znanych związków poza przebadanymi aminokwasami jedynie jeszcze

hydroksylizyna i kwasy dwuaminodwukarboksyłowe mogą występować w materiale roślinnym i wpływać niekorzystnie na oznaczanie ornityny. Wpływ tych aminokwasów nie był przez nas badany, ponieważ związki te nie były nam dostępne.

Zastosowanie metody do oznaczania ornityny w materiale roślinnym

Opracowaną metodę zastosowano do oznaczania ornityny w materiale roślinnym. W tym celu chromatografowano wyciągi materiału roślinnego bez dodatku i z dodatkiem znanych ilości ornityny. Wyciąg przygotowano w sposób następujący: 5 g kielków grochu, lub źdźbła życicy trwałej rozcierano w moździerzu 3-krotnie z około 15 ml 96% alkoholu etylowego, każdorazowo odwirowując przez 5 min. przy 6000 obr./min. Z połączonych płynów znad osadu odparowano alkohol pod zmniejszonym ciśnieniem

Tablica 4

Oznaczenie ornityny i wykrywanie dodanej ornityny w wyciągach roślinnych po rozdziale chromatograficznym

Material roślinny mg	dodano ornityny μg	E_I	E_{II}	wykryto ornityny μg	wykryto lizyny μg	
kielki grochu	50	—	0,0294	0,0111	1,5	33
	100	—	0,0580	0,0245	2,9	73
	50	2	0,0531	0,0132	3,4	39
	50	5	0,0888	0,0132	6,5	39
	50	10	0,1459	0,0132	11,4	39
źdźbła życicy	50	—	0,0111	0,0064	0,4	19
	100	—	0,0224	0,0111	0,9	33
	50	2	0,0363	0,0086	2,4	25
	50	5	0,0705	0,0086	5,3	25
	50	10	0,1338	0,0086	10,7	25

niem w temp. 50 do 55°. Pozostałość przenoszono do 10 ml wody i wirowano przez 10 minut przy 6000 obr./min. Otrzymany płyn наносzono na bibułę w ilościach odpowiadających 50 i 100 mg świeżej masy. Wyniki analiz po chromatografii, zebrane w tablicy 4, wykazują wyraźnie, że kielki grochu oraz źdźbła życicy zawierają bardzo małe ilości ornityny, a dodaną ornitynę odnajduje się ilościowo.

Opisana metoda nadaje się do identyfikacji i ilościowego oznaczania ornityny w materiale roślinnym, jeżeli ilość jej w badanej próbie wynosi

powyżej 2 μg . A więc stężenie ornityny w materiale roślinnym musi wynosić powyżej 2 mg^0/o w świeżej masie, ponieważ nakraplanie nadmiernej ilości wyciągu roślinnego uniemożliwia prawidłowy rozdział chromatograficzny aminokwasów.

STRESZCZENIE

Opisano metodę oznaczania ornityny w czystych roztworach, jak również w mieszaninie z innymi aminokwasami. Metoda polega na oddzieleniu ornityny od przeszkadzających aminokwasów przy pomocy rozdzielczej chromatografii bibułowej i jej kolorymetrycznym oznaczeniu z ninhydriną w kwaśnym środowisku. Lizyna jest jedynym aminokwasem, który nie oddziela się od ornityny chromatograficznie i barwi z ninhydriną w opisanych warunkach. Oznaczenie ornityny w obecności lizyny polega na ekstrakcji do chloroformu barwnych produktów obydwu aminokwasów z ninhydriną z kwaśnych roztworów.

Opisana metoda nadaje się do oznaczania ornityny w materiale roślinnym, jeżeli występuje ona w stężeniach powyżej 2 mg^0/o .

L I T E R A T U R A

- [1] Chinard F. P., *J. Biol. Chem.* **199**, 91, 1952.
- [2] Reifer I., Przeździecka J., Kleczkowska D., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 17, 1959.
- [3] Van Slyke D. D., Dillon R. T., Mac Fadyen D. A., and Hamilton P., *J. Biol. Chem.* **141**, 627, 1941.
- [4] Work E., *Biochem. J.* **67**, 416, 1957.

A MICROMETHOD FOR THE DETERMINATION OF ORNITHINE

S u m m a r y

A method for the determination of ornithine in presence of other aminoacids has been described. The method depends upon partition of ornithine from other interfering aminoacids by means of paper chromatography, followed by the colorimetric determination of the aminoacid with ninhydrine. Some aminoacids such as arginine, cystine and djenkolic acid with rates of flow similar to the R_F of ornithine do not interfere with the determination even if present in quantities amounting to 50 times the molar concentration of ornithine. Lysine is the only aminoacid investigated which could not be chromatographically partitioned from ornithine and which gives a coloured product with ninhydrine if present in molar concentration 25 times bigger than ornithine. The described method

permitting the determination of ornithine in presence of lysine is based upon the extraction of the coloured products of both amino acids into chloroform from acid media.

The method has been adapted for the determination of ornithine in plant material and yields satisfactory results providing the concentration of ornithine in the investigated sample is no less than 2 mg⁰/₀ on fresh weight basis.

Otrzymano 8.1.1959 r.

I. REIFER i L. BURACZEWSKA

ENZYMY I SUBSTRATY CYKLU ORNITYNOWEGO W ŻYCICY TRWAŁEJ (*LOLIUM PERENNE*)

Zakład Biochemii Roślin

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

Obecność enzymów i substratów cyklu ornitynowego w materiale roślinnym została stwierdzona przez wielu badaczy (patrz Reifer i Buraczewska [8]). W ostatnich latach przyjmuje się, że przemiany cyklu ornitynowego przebiegają w zielonych roślinach podobnie jak w tkance zwierzęcej.

W niniejszej pracy podano wyniki przemian dwuzasadowych aminokwasów cyklu ornitynowego w życicy trwałej. Do materiału roślinnego wprowadzano znaczne ilości tych aminokwasów (do 500 mg na 100 g świeżej masy) i po upływie 4 godzin oznaczano ilościowo zawartość ornityny, cytruliny, argininy i mocznika w doświadczalnym materiale.

MATERIAŁ DOSWIADCZALNY I METODY

Nasiona życicy trwałej wysiewano w krystalizatorach na ziemi kompostowej. Rośliny hodowano przez 17 do 26 dni w słonecznym miejscu. Sześciogramowe naważki nadziemnych części roślin, odciętych około 1 cm nad powierzchnią ziemi, pozostawiano na bibule przez 1 godzinę. W tym czasie źdźbła traciły znaczne ilości wody, co umożliwiło szybsze wchłanianie podawanych aminokwasów. Następnie źdźbła zanurzano w zlewkach odciętymi końcami (do wysokości około 3 cm) w 5 ml 0,3 lub 1,5% roztworu: ornityny, cytruliny, argininy względnie mocznika. Próbę kontrolną zanurzano w wodzie destylowanej. Transpirację przyspieszano umieszczając próby w termostacie z wentylacją w temperaturze 30° na 3 godziny. W tym czasie każda próba o masie 6 g wchłaniała około 2 ml roztworu. Po dokładnym opłukaniu źdźbeł w wodzie destylowanej oznaczano pozostały, nie wchłonięty nadmiar substratu. Źdźbła osuszano bibułą i próbę rozważano na dwie równe części dla wykonania oznaczeń

równoległych. Po upływie jednej godziny od wyjęcia z roztworu, żdźbła, pocięte na skrawki o długości około 1 cm, gotowano w około 5 ml wody przez 5 minut w celu zainaktywowania enzymów. Materiał roślinny dokładnie rozcierano w moździerzu i przenoszono do kolbki miarowej, uzupełniając wodą do 25 ml. Zawiesinę sączono przez gazę i wirowano przez 10 minut na wirówce typu Sorvall przy 7000 g. W odwirowanym wyciągu oznaczano ornitynę i mocznik, a po odbiałczeniu wyciągu wodorotlenkiem kadmu, wg metody Fujita i Iwatake [3], oznaczano cytrulinę i argininę.

Ornitynę oznaczano metodą Reifera i Buraczewskiej [9]. W tym celu 0,5 ml wyciągu odparowano w probówce na łaźni wodnej w 100°, a pozostałość rozpuszczano w 0,1 ml 70% alkoholu etylowego i nakraplano na chromatogram. W celu dokładnego wycięcia próbki czynność tę powtarzano jeszcze dwukrotnie.

Cytrulinę oznaczano metodą Łazariewa w modyfikacji Kleczkowskiego [4]. Argininę oznaczano przy pomocy metody Ceriotti i Spandrio [1], stosując 0,3% roztwór podbrominu. Obecność znacznych ilości mocznika przeszkadza w oznaczaniu argininy tą metodą. Z tej przyczyny otrzymane wyciągi z roślin wzbogaconych mocznikiem alkalizowano do pH 7,6—8,0 i przepuszczano przez kolumnę z Decalso (wymiar 5 × 100 mm). Kolumnę następnie przemywano 25 ml wody destylowanej, aby wycić z niej mocznik. Argininę eluowano 25 ml 10% NaCl i oznaczano jak wyżej. 10% NaCl jednocześnie regeneruje jonit i przemycie kolumny wodą destylowaną umożliwia jej kolejne użytkowanie.

Mocznik oznaczano metodą dyfuzyjną Conwaya [2] w 2 ml wyciągu.

WYNIKI DOŚWIADCZEŃ

Wyniki z analiz przedstawiono w mg% świeżej masy roślin. Podane wartości liczbowe są średnimi 4 oznaczeń wykonanych na 2 próbach równoległych.

Żdźbła wzbogacone ornityną

Doświadczenia wykonano z roślinami 22- i 25-dniowymi. 6 g żdźbeł pobrało średnio z 5 ml 0,3% roztworu około 7 mg, a z roztworu 1,5% około 25 mg ornityny. W żdźbłach wykryto tylko od 34—39% pobranej ornityny, reszta uległa przemianie do innych związków. Wyniki podano w tablicy 1.

Zawartość cytruliny w żdźbłach karmionych ornityną zwiększyła się około dwukrotnie z 2,1 mg% na 4,1 mg% w przypadku wzbogacenia 0,3% roztworem ornityny, a około czterokrotnie z 2,1 mg% na średnio 7,8 mg% w przypadku wzbogacenia 1,5% roztworem ornityny. Zawartość argininy zwiększyła się odpowiednio z 4,3 mg% na 5,4 mg%, względnie z 4,3 mg%

na 6,6 mg⁰/. W źdźbłach dokarmianych ornityną przyrostu mocznika nie stwierdzono.

Tablica 1

Zawartość ornityny, cytruliny, argininy i mocznika w źdźbłach życicy wzbogacanych ornityną

wiek roślin (dni)	mg% w świeżej masie											
	ornityny			cytruliny			argininy			N-mocznika		
	kontro- la	wzbogacone ornityną		kontro- la	wzbogacone ornityną		kontro- la	wzbogacone ornityną		kontro- la	wzbogacone ornityną	
		0,3%	1,5%		0,3%	1,5%		0,3%	1,5%		0,3%	1,5%
22	ślady	39,5	160,2	2,1	4,3	8,1	4,1	5,2	6,3	0,68	0,69	0,68
25	„	41,6	166,6	2,1	4,4	7,5	4,4	5,7	6,8	0,73	0,74	0,76

Żdźbła wzbogacone cytruliną

Również w tym przypadku źdźbła pobrały znaczne ilości aminokwasu z roztworu. Na przykład, z 5 ml 0,3⁰/o roztworu średnio 7,25 mg, natomiast z 1,5⁰/o roztworu od 25—35 mg cytruliny. Cytrulina ulega również szybkiej przemianie, bo tylko 30—32⁰/o ilości pobranej znaleziono w źdźbłach. Jak widać w tablicy 2 w źdźbłach wzbogacanych cytruliną wy-

Tablica 2

Zawartość ornityny, cytruliny, argininy i mocznika w źdźbłach życicy wzbogacanych cytruliną

wiek roślin (dni)	mg% w świeżej masie											
	ornityny			cytruliny			argininy			N-mocznika		
	kontro- la	wzbogacone cytruliną		kontro- la	wzbogacone cytruliną		kontro- la	wzbogacone cytruliną		kontro- la	wzbogacone cytruliną	
		0,3%	1,5%		0,3%	1,5%		0,3%	1,5%		0,3%	1,5%
21	ślady	3,0	7,3	2,2	—	118,7	4,2	—	6,8	0,87	—	0,87
22	„	2,1	6,7	2,2	43,7	145,8	4,1	5,1	6,3	0,78	—	0,78
26	„	2,2	6,7	2,0	37,1	144,3	4,2	5,2	6,7	0,95	0,90	0,95

kryto znaczne ilości ornityny. Przyrost argininy wynosi podobnie jak w przypadku wzbogacania ornityną od 1,1 do 2,4 mg⁰/. Przyrostu mocznika nie wykryto.

Żdźbła wzbogacone arginina

Pobrane ilości argininy z roztworów, jak też szybkość jej przemiany w źdźbłach były tego samego rzędu co w przypadku wzbogacania ornityną, czy cytruliną.

Jak widać z zestawionych wyników w tabelicy 3, w źdźbłach wzbogaczonych arginina wykrywa się znaczne ilości ornityny oraz ponad dwukrotny przyrost mocznika. Zawartość cytruliny zwiększyła się średnio z 2,1 mg⁰/o na 3,2 mg⁰/o w przypadku wzbogacania 1,5⁰/o roztworem argininy.

Tabela 3

Zawartość ornityny, cytruliny, argininy i mocznika w źdźbłach życicy wzbogaczonych arginina

wiek roślin (dni)	mg% w świeżej masie											
	ornityny			cytruliny			argininy			N-mocznika		
	kontrola	wzbogacone arginina		kontrola	wzbogacone arginina		kontrola	wzbogacone arginina		kontrola	wzbogacone arginina	
		0,3%	1,5%		0,3%	1,5%		0,3%	1,5%		0,3%	1,5%
17	ślady	1,8	6,3	2,1	2,2	3,0	4,3	28,7	136,7	0,82	—	2,24
21	„	2,3	7,9	2,2	2,3	3,6	4,2	33,6	136,5	0,87	1,35	2,04
22	„	—	7,4	2,2	—	3,0	4,1	61,6	199,5	0,78	1,20	1,57

Źdźbła wzbogacone mocznikiem

Z 0,3⁰/o roztworu źdźbła pobrały średnio 6,5 mg mocznika, a z 1,5⁰/o średnio 30 mg. Pobrany mocznik ulegał szybkiej przemianie, gdyż znajdowano tylko od 40—50⁰/o ilości pobranej z roztworów.

Tabela 4

Zawartość ornityny, cytruliny, argininy i mocznika w źdźbłach życicy wzbogaczonych mocznikiem

wiek roślin (dni)	mg% w świeżej masie											
	ornityny			cytruliny			argininy			N-mocznika		
	kontrola	wzbogacone mocznikiem		kontrola	wzbogacone mocznikiem		kontrola	wzbogacone mocznikiem		kontrola	wzbogacone mocznikiem	
		0,3%	1,5%		0,3%	1,5%		0,3%	1,5%		0,3%	1,5%
17	ślady	ślady	ślady	2,2	2,2	2,2	4,2	4,2	4,2	0,87	19,73	101,61
21	„	„	„	2,1	2,1	2,2	4,1	4,2	4,2	0,81	25,08	142,91
22	„	„	„	2,2	2,2	2,2	4,1	4,1	4,1	0,90	22,62	130,20

Wyniki przedstawione w tabelicy 4 wskazują zgodnie z przewidywaniami, że azot mocznika nie wpływa na ilość aminokwasów cyklu ornitynowego. Natomiast z analiz chromatograficznych w układzie fenol-woda stwierdzono wyraźny przyrost asparaginy i glutaminy, zwłaszcza w źdźbłach wzbogaczonych mocznikiem z 1,5⁰/o roztworu.

DYSKUSJA

Żdźbła życicy trwalej pobierają z roztworów w krótkich okresach czasu znaczne ilości ornityny, cytruliny względnie argininy. Z roztworu zawierającego 0,3% aminokwasu 100 g rośliny w ciągu 3 godzin pobiera około 120 mg, a z roztworu zawierającego 1,5% aminokwasu około 500 mg. Przemiana w roślinie pobranych aminokwasów odbywa się bardzo szybko i po 4 godz., od początku wprowadzania wykrywano zaledwie 30—40% w niezmienionym stanie. Wprowadzony do rośliny którykolwiek z trzech aminokwasów cyklu ornitynowego ulega w pewnym stopniu przemianie do pozostałych dwóch. I tak rośliny pobierając z 1,5% roztworu ornitynę wykazują przyrost cytruliny wynoszący średnio 5,7 mg% i argininy około 2,4 mg%. Podobnie rośliny po wprowadzeniu cytruliny wykazują przyrost około 2,4 mg% argininy i około 6 mg% ornityny. Wreszcie rośliny wzbogacane arginina zawierają około 1 mg% więcej cytruliny, około 7 mg% więcej ornityny oraz średnio 1,2 mg% więcej azotu mocznika, aniżeli rośliny kontrolne. Przyrost mocznika z argininy wskazuje na obecność arginazy w życicy trwalej.

Z naszej pracy o enzymach cyklu ornitynowego w kielkach grochu [8] wynika, że rośliny wyższe posiadają komplet enzymów katalizujących reakcje tego cyklu. W niniejszej pracy stwierdzono występowanie cyklu ornitynowego w życicy trwalej i dzięki opracowanej metodzie zdołano rozszerzyć badania obejmujące oznaczenie ornityny w materiale roślinnym. Należy podkreślić, że działanie cyklu ornitynowego w roślinach wyższych nie wyklucza możliwości reakcji przebiegających w kierunku przeciwnym, a mianowicie hydrolizy argininy do cytruliny przy pomocy dwuhydrolazy argininowej, jak wykazali Oginsky i Gehrig [5]; biosyntezy cytruliny z argininy poprzez kwas argininobursztynowy, na co wskazują Ratner i Petrack [6]; względnie rozkład cytruliny do ornityny w obecności karbamylotransferazy ornitynowej, jak dowiódł Reichard [7].

Aktywność enzymów katalizujących biosyntezę argininy w życicy jest czynnikiem ograniczającym szybkość reakcji, ponieważ poziom argininy jest niezależny od zawartości cytruliny w materiale roślinnym. Przyrost zawartości argininy wynosi około 2,4 mg na 100 g niezależnie od tego, czy roślina zawiera 150 mg% cytruliny, czy też tylko 8 mg% cytruliny (Tabl. 2 i 1). Podobnie przedstawia się kataliza hydrolizy argininy do ornityny, której przyrost wynosi około 7 mg%, mimo że w jednym przypadku rośliny zawierały 150 mg% a w drugim 7 mg% argininy (Tabl. 3 i 2). Natomiast biosynteza cytruliny zależy prawdopodobnie od stężenia substratu, ponieważ żdźbła życicy trwalej zawierające około 160 mg% ornityny wykazały przyrost cytruliny około 6 mg%, natomiast w żdźbłach zawierających 7 mg% ornityny przyrost ten wynosił zaledwie 1 mg% (Tabl. 1 i 3).

Obecność enzymów cyklu ornitynowego w badanym materiale potwierdza dodatkowo przyrost mocznika w źdźbłach wzbogacanych arginina. Zgodnie z naszymi badaniami nad kielkami grochu, rośliny wzbogacane ornityną, lub cytruliną nie wykazały przyrostu mocznika, ponieważ nieznaczne ilości argininy i wynikające z jej hydrolizy małe ilości mocznika ulegały przypuszczalnie szybkiemu rozkładowi przy pomocy ureazy, powszechnie obecnej w materiale roślinnym.

STRESZCZENIE

Przedstawiono wyniki ilościowych badań nad przemianą aminokwasów cyklu ornitynowego w źdźbłach życicy trwałej (*Lolium perenne*), które wzbogacano ornityną, cytruliną, arginina, względnie mocznikiem. Źdźbła trawy w ciągu 3 godzin pobierały z 0,3% roztworu aminokwasu około 120 mg substratu, a z 1,5% roztworu około 500 mg substratu na 100 g świeżej masy. Stwierdzono, że w ciągu 4 godzin pobrane aminokwasy ulegały przemianie w 60—70%. W wyniku przemiany ornityny stwierdzono syntezę cytruliny i argininy; z cytruliny powstawała arginina i ornityna, natomiast wprowadzona do rośliny arginina ulegała hydrolizie do ornityny i mocznika oraz przemianie do cytruliny.

Źdźbła życicy trwałej zawierają enzymy katalizujące wybiórczo przemianę wszystkich trzech wymienionych aminokwasów, jak też arginazę, która katalizuje hydrolizę argininy do ornityny i mocznika. Tym samym źdźbła życicy, podobnie jak kielki grochu posiadają komplet enzymów katalizujących przemianę cyklu ornitynowego.

LITERATURA

- [1] Ceriotti G., Spandrio L., *Biochem. J.* **66**, 603, 1957.
- [2] Conway E. J., *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*, Crosby Lockwood and Son. Ltd., London, 1947.
- [3] Fujita A., Iwatake D., *Biochem. Z.* **242**, 43, 1931.
- [4] Kleczkowski K., *Acta Biochim. Polon.* **5**, 155, 1958.
- [5] Oginsky E. L., Gehrig R. F., *J. Biol. Chem.* **198**, 791, 1952.
- [6] Ratner S., Petrack B., *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 582, 1956.
- [7] Reichard P., *Acta Chim. Scand.*, **11**, 523, 1957.
- [8] Reifer I., Buraczewska L., *Acta Biochim. Polon.* **5**, 361, 1958.
- [9] Reifer I., Buraczewska L., *Acta Bioch. Polon.*, **6** 219, 1959.

SUBSTRATES AND ENZYMES OF THE ORNITHINE CYCLE IN PERENNIAL
RYEGRASS (*LOLIUM PERENNE*)

S u m m a r y

Ornithine, citrulline and arginine, respectively, were introduced into the blades of perennial ryegrass. These amino acids were rapidly absorbed into the plant material. 60—70% of the amino acids were metabolised within the period of 4 hours. The introduction of ornithine led to partial synthesis of citrulline and arginine; blades enriched with citrulline have shown marked increases of ornithine and arginine, whereas arginine was metabolised to citrulline as well as hydrolysed to ornithine and urea.

It was proved that perennial ryegrass contains all enzymes catalising the interconversion of the three named amino acids, as well as active arginase which caused the hydrolysis of arginine into ornithine and urea.

Otrzymano 8.I.59 r.

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

ZOFIA TRAMER and D. SHUGAR

STUDIES ON PHENOLIC HYDROXYL BINDING IN PROTEINS

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

The marked spectral red-shift and increase in extinction coefficient, accompanying the dissociation of the phenolic hydroxyl groups of tyrosine, has been used extensively as a tool for the study of the ionization of these groups in polypeptides by spectral procedures [2, 6, 31] which make possible relatively accurate titrations in highly alkaline media. Interest in such measurements has been further stimulated by the observation that it is possible, by means of this technique, to differentiate between "free" and "bound" phenolic hydroxyls (see ref. [2] for review) and this has now been done for a variety of proteins including, amongst others, insulin [6], ovalbumin [6], lysozyme [9], ribonuclease [31, 36], desoxy-ribonuclease [33].

The suggestion originally advanced by Crammer and Neuberger [6], that the failure of most of the phenolic groups of ovalbumin to dissociate at pH values below 13 is due to hydrogen bonding of these groups to carboxylate acceptors, has gained wide support in its application to other proteins. However, while hydrogen bonding may be a possible mechanism in some instances, evidence has accumulated more recently to show that its application is not as universal as hitherto assumed [18, 20, 32, 34, 36].

In previous studies on the kinetics of heat inactivation of lysozyme [34] and ribonuclease [10, 11] it was found that the thermodynamic constants for the inactivation process were of the same order of magnitude as for ordinary chemical reactions. These results were interpreted as indicating that hydrogen bonding was not an important factor in the maintenance of the native configuration of the molecules necessary for enzymatic activity, in agreement with analogous conclusions arrived at independently on the basis of other experimental findings [5, 18, 26]. Subsequent studies showed that the isotope effect for inactivation in light and heavy water

$$k_H/k_D \sim 1$$

as would be expected from the above results. Since, however, both spectral data [31, 36] and deuterium exchange [17] indicate the presence in ribonuclease of labile bonds, it became of interest to determine whether the lability of such bonds becomes evident during the course of heat inactivation.

We have therefore investigated the effect of various treatments on the liberation of phenolic hydroxyl groups in ribonuclease, ovalbumin and bovine serum albumin. A few measurements have also been made on several other proteins for comparative purposes.

Since hydrogen bonding involving phenolic groups has also been postulated in a number of proteins on the basis of secondary spectral modifications in acid medium [7, 12, 13, 21, 28, 29, 30] we have devoted some attention to this question as well.

Materials

The ribonuclease preparations included one from Light, several Worthington samples and one Armour preparation, for the latter of which we are indebted to Drs. L. Ledoux and F. Vanderhaege. These preparations were not uniform as regards ratio of maximum to minimum extinction coefficients (cf. ref. [31]), or of background absorption above 310 $m\mu$ but this proved to be without marked influence on the results obtained. Ovalbumin was prepared according to Kekwick and Cannan [19] and recrystallized 5 times. Pepsin was a Worthington preparation; chymotrypsin was obtained from Sigma and bovine serum albumin from Light. Insulin was a product of the Warsaw Serum and Vaccine Plant (provided through the courtesy of T. Spasowicz) and gave results practically identical to those of an Eli Lilly sample kindly provided by Dr. E. Fredericq. The β -lactoglobulin was prepared according to the procedure of Palmer [23].

Oxidized proteins were prepared as described by Hirs, Stein and Moore [15] for ribonuclease, with the exception that for ovalbumin and bovine serum albumin the time of reaction was held to 30 minutes, for reasons given below; while for insulin the procedure of Sanger [27] was used. The reduced bovine serum albumin was prepared according to Bielicer *et al.* [4].

Experimental

Protein samples were heated in a Hoeppler ultrathermostat, using small glass-stoppered tubes to avoid losses by evaporation. Suitable dilutions of HCl and NaOH, as well as phosphate buffers, were used for

adjustment of pH which was measured by means of the glass electrode, using a Radiometer pH meter.

Most spectral measurements were made with a Unicam spectrophotometer. A Hilger instrument was used for the direct measurement of difference spectra, but in every instance the results were checked by normal spectrophotometry of the solutions under study, from which the difference spectra were also obtained by subtraction (cf. Wetlaufer, Edsall and Hollingworth [40]).

RESULTS

Ribonuclease

Fig. 1 illustrates the effect of heating on a solution of RN-ase, 0.5 mg./ml. at pH 7.8 and 80°. At the concentration used, heating at this pH resulted in the formation of a slight turbidity with a resultant small increase in extinction, as shown by curve k' ; however, the accompanying small shift of the maximum to the violet as a result of heating is a real one (since it remains following removal of the turbidity by centrifugation) and is already indicative of some modification in binding of the phenolic groups (cf. ref. [29]); a similar shift is observed in the spectrum of pepsin in the presence of 8 M urea [24]. Alkalization of the heated solutions results in the complete disappearance of the turbidity, as might be expected. Adjustment of the pH to 12 following heating for different time intervals demonstrates a step-wise release of bound phenolic groups, which ceases after 30 minutes heating. Curve 6 is that obtained by adjustment of the pH of an unheated control solution to pH 13.

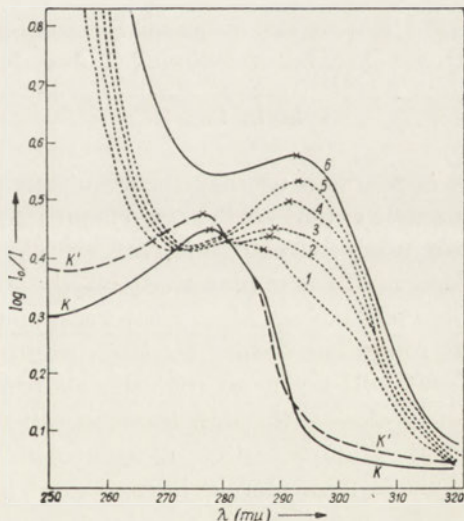


Fig. 1. Effect of heating RN-ase (0.5 mg./ml.) at pH 7.8 and 80° on dissociation of phenolic groups:

pH 7.8	$\left\{ \begin{array}{l} k - \text{unheated} \\ k' - \text{following 30 min. heating} \end{array} \right.$
pH 12.0	1 — unheated
	2 — after 5 min. heating
	3 — " 10 " "
	4 — " 20 " "
	5 — " 30-50 " "
pH 13.0	6 — unheated

Note: Actually all "free" phenolic groups in ribonuclease are not fully dissociated at pH 12; this occurs only at about pH 12.2 [31]. However pH 12 is a more convenient reference point for this purpose and is used throughout this work. An

The extent of liberation of phenolic hydroxyls was estimated quantitatively from the increase in extinction in the range 285—300 $m\mu$ following alkalization to pH 12. Fig. 2 exhibits the course of this increase with time of heating, and corresponds fairly

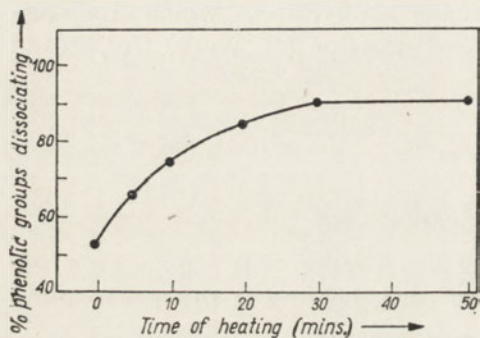


Fig. 2. Percentage of phenolic groups in RN-ase dissociating following heating for given periods (abscissa) at 80°. Conditions as in Fig. 1

closely to the course of enzymatic inactivation by heat under the same conditions [10, 11]. If we accept the curve at pH 13 of an unheated solution (curve 6 in Fig. 1) to represent the complete dissociation of phenolic groups, then curve 5 (Fig. 1) suggests that, following complete heat inactivation, 10% of these groups are still bound, and this was our initial conclusion [38]. However the fact that, in the neighbourhood of 270—280 $m\mu$, curve 6 is far removed from the isosbestic points is clearly evidence that alkaline denaturation has occurred [31], and

it appears to us that the resulting extraneous absorption may extend to a small extent to the wavelength region above 285 $m\mu$ where extinctions are used for estimation of tyrosine dissociation. That this may be the case is further indicated by the fact that the difference in extinction between curves k' and 5 corresponds to a tyrosine content of 6 residues, as found chemically by Hirs, Stein and Moore [16].

It will be noted that the alkaline curves of the heated solutions pass fairly closely through the isosbestic points; the small divergences evident in the figure testify, most probably, to the occurrence of more drastic changes than merely liberation of phenolic groups as a result of heating.

Attention should also be drawn to the fact that the rate of release of phenolic groups was found also to correspond to the rate of heat inactivation of the enzyme [10, 11] not only in alkaline, but in acid medium as well.

It was not found possible to do a complete reversible titration curve on heated RN-ase since, following alkalization, subsequent acidification resulted in the appearance of turbidity at about pH 10.7 which made accurate spectral measurements to the acid side of pH 10.7 doubtful. However, from the forward titration curve, as well as from Fig. 1, it is

additional advantage of using pH 12 as a reference point is that time-dependent changes in absorption due to alkaline denaturation at slightly higher pH values [31, 36], which would complicate measurements, are avoided.

clear that the apparent pK of the phenolic hydroxyls in heat-inactivated RN-ase is about 10.4. It is of interest to compare this with insulin in which, although none of the phenolic groups are bound as in RN-ase [6], yet the apparent pK is quite high, about 11.2. Heating of an insulin solution for 3 hours at pH 3.7 and 83°, under which conditions about 50% inactivation of hormone activity occurs [22], did not modify either the nature of the titration curve nor the apparent pK of the phenolic hydroxyls.

Ovalbumin

Fig. 3 exhibits the analogous results for ovalbumin following heating at pH 7.8 and 75°. In this case, however, there is a significant difference in behaviour from that for RN-ase, in that liberation of phenolic groups

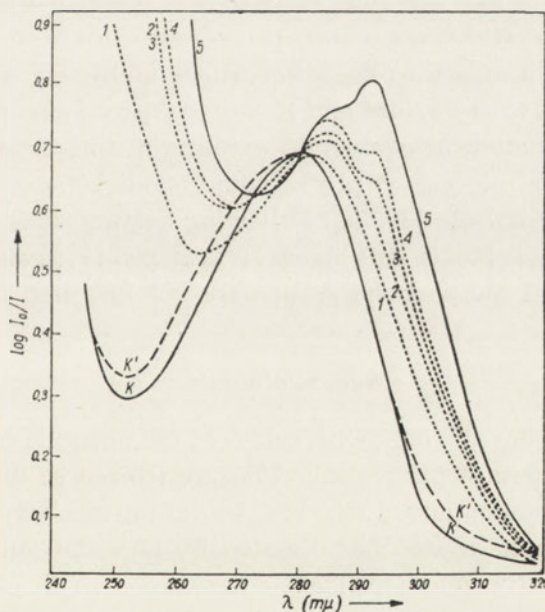


Fig. 3. Dissociation of phenolic groups in ovalbumin following heating at 75°; 1 mg./ml. pH 7.4, unbuffered:

pH 7.3	{	<i>k</i> — unheated
		<i>k'</i> — heated 20 min.
pH 12.0	{	1 — unheated
		2 — heated 2 min.
		3 — " 6–10 min.
		4 — " 20–30 "
pH 12.0	{	5 — unheated

by heating either at 75° or 85° ceases when only 70% of the phenolic hydroxyls are free. It will also be observed from the figure that for this

protein there is little extraneous absorption in unheated solutions brought to pH 13, so that we may accept with a fair degree of confidence that 30% of the phenolic groups do not freely dissociate following heat denaturation. Although we have made no systematic measurements of the rate of liberation of phenolic groups with temperature, our observations for ovalbumin indicate that the dependence is quite high and that the resultant activation energy for this reaction must therefore also be high, in accordance with the known high activation energy for ovalbumin denaturation, using coagulation as a criterion of denaturation [35].

We have found that, if a solution of native ovalbumin is brought to pH 13 and then back to pH 12, the resulting absorption spectrum at the latter pH corresponds to that obtained by bringing the above-mentioned heated solution to pH 12. This is additional confirmation that further heating is without effect.

Furthermore, contrary to the observations of Bencze and Schmidt [3], but in agreement with Tanford and Roberts [37] we have noted that above pH 12.3 the extinction of ovalbumin exhibits a time-dependent increase, the extent of this increase at pH 13 being about 20% or about one-half that exhibited by RN-ase [31, 36]. Following heating, this time-dependent increase is reduced, but is still about 10% at pH 13, again showing that, unlike RN-ase, all the phenolic groups are not liberated by heating.

Serum albumin

For bovine serum albumin, where 63% of the phenolic groups dissociate in the native protein at pH 12, only 78% are ionized at this pH following heat treatment, leaving about 25% still bound (or masked). An interesting observation made here was that occasionally unheated albumin solutions at pH 12 exhibited a time-dependent downward drift in pH, accompanied by a simultaneous decrease in extinction coefficient at 285–310 $m\mu$ (corresponding, clearly, to a decrease in phenolic hydroxyl dissociation) until the pH attained a value of about 11.6. In these instances it was necessary, therefore, to add alkali to bring the pH back to 12. The cause of this time-dependant uptake of hydroxyl ions is not clear, but the phenomenon has also been observed by Tanford and Roberts [37]. Attempts to investigate it in further detail were abandoned when it was found that it could not always be reproduced.

For convenience some of the above results, as well as a few observations on other proteins, are included in Table 1.

Table 1

Percentage dissociation of phenolic hydroxyls in various protein at pH 12 before and after various treatments *)

Protein	Treatment	Dissociation of phenolic groups at pH 12 (%)	Increase following treatment (%)
Ribonuclease	Native	54	—
	Heated, 80°; pH 7.8; 5 mins.	67	13
	10 "	74	20
	20 "	83	29
	30 "	90	36
	Heated, 90°; pH 2; 3 hrs.	86	32
	Performic acid oxidized	96	42
Ovalbumin	Native	36	—
	Heated, 75°; pH 7.4:		
	2 mins.	54	18
	6—10 "	60	24
	20 "	70	34
	30 "	70	34
	Heated, 80°; pH 7.4, 30 mins.	70	34
	Heated, 85°; pH 7.4, 30 mins.	70	34
Performic acid oxidized	96	60	
Bovine serum albumin	Native	63	—
	Heated, 75°; pH 7.4, 10—15 mins.	78	15
	Reduced with Na SO	78	15
	Performic acid oxidized	98	35
Pepsin	Native	92	—
	In 8 M-urea	100	8
	Autodigested 24 hrs. at pH 2.2	100	8
Chymotrypsin	Native	57	—
β -lactoglobulin	Native	67	—

*) All measurements of extent of dissociation of phenolic groups based on optical density measurements at 300 m μ . Optical densities at pH 13 taken to represent 100% dissociation (see text for discussion of validity of this in case of RN-ase)

Effect of oxidation of -S-S- bridges

It has been shown by Harrington and Schellman [14]) that oxidation of RN-ase with performic acid according to Hirs *et al.* [16] results in a product which, at neutral pH, exhibits an absorption spectrum with an extinction corresponding to a tyrosine content of 5.75 residues as compared to a chemically determined value of 5.82 [16], based on a molecular weight of

13 900. Physico-chemical studies indicated that oxidized RN-ase in aqueous solution is a flexible, long-chain molecule, devoid of the characteristics attributable to secondary folding of polypeptides. It differs from the native protein chemically in that the 4 cystine bridges are replaced by 8 sulfonic acid groups.

Fig. 4 (a) shows the absorption spectrum of oxidized RN-ase at neutral pH and at several pH values up to pH 13. It will be observed that,

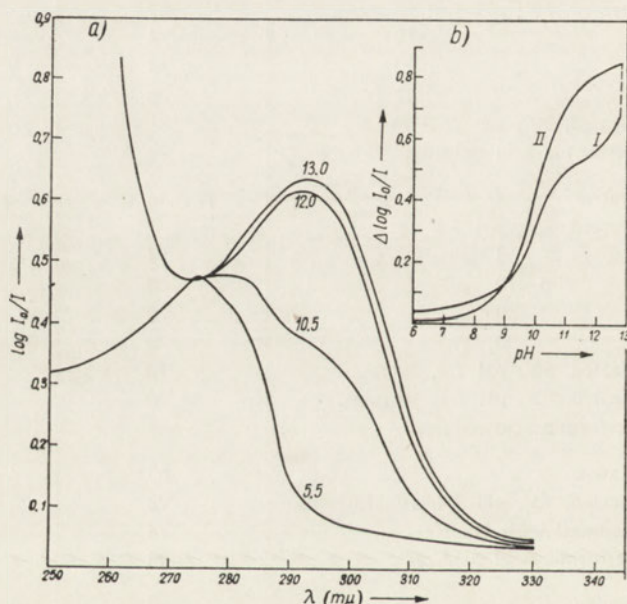


Fig. 4. (a) Absorption spectrum of performic acid oxidized RN-ase, 0.5 mg./ml. at various pH values indicated

(b) Spectrophotometric titration of phenolic groups in native (I) and performic acid oxidized (II) RN-ase at 288 $m\mu$.

although the isosbestic points are not quite the same as in native RN-ase, all the curves intersect up to pH 13 where dissociation of phenolic groups is complete; actually it is practically complete at pH 12. Furthermore the dissociation of the phenolic hydroxyls is this time completely reversible between pH 13 and 7. The titration curve for oxidized RN-ase is shown in Fig. 4 (b), where it is compared with that for native RN-ase. The titration curve for the oxidized protein is seen to be completely normal ¹⁾,

¹⁾ Bigelow, of the Carlsberg Laboratorium (personal communication) also finds the titration curve of oxidized RN-ase in alkaline solution to be normal.

with an apparent pK for the phenolic groups of 10.4. In addition if we accept Harrington and Schellman's [14] value for the extinction coefficient of oxidized RN-ase at neutral pH, then the tyrosine content of the protein, calculated from the increase in extinction at pH 13, in the range 2850—300 $m\mu$, works out to 6 residues, in agreement with chemically determined values.

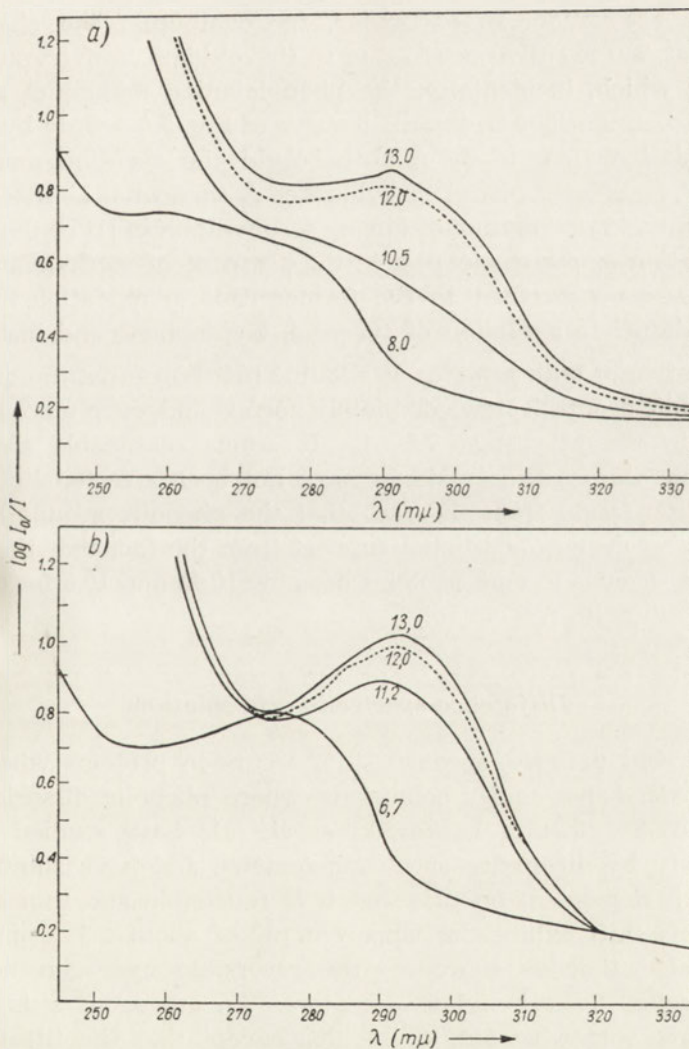


Fig. 5. (a) Absorption spectrum of performic acid oxidized ovalbumin, 1.1 mg./ml. at various pH values indicated (below pH 8.0 solution is cloudy and no spectra are shown).

(b) Absorption spectrum of performic acid oxidized bovin serum albumin, 1 mg./ml. at various pH values indicated.

For oxidized insulin the absorption spectrum at alkaline pH was similar to that for ribonuclease; the titration curve was likewise normal, with an apparent pK for the phenolic groups of 10.4.

The absorption spectra of oxidized ovalbumin and bovine serum albumin are shown in Figs. 5 (a) and 5 (b), from which it will be observed that performic acid oxidized products in this case possess considerable background absorption. In particular, for ovalbumin the characteristic maximum at 280 $m\mu$ disappears, due to the oxidation of tryptophane (as a result of which, incidentally, the phenylalanine maximum at 280 $m\mu$ can be just distinguished in the pH 8 curve of Fig. 5 (a). Only by reduction of the oxidation time to 30 minutes could the tyrosine maximum at alkaline pH be clearly placed in evidence. A somewhat similar spectrum results from the X-irradiation of bovine serum albumin [1] or the sensitized photo-oxidation of β -lactoglobulin in the presence of methylene blue [39]; and this has been ascribed in the former case to oxidation of tyrosine and in the latter to oxidation of tyrosine, tryptophane and histidine.

Examination of both proteins at alkaline pH shows that the dissociation of the phenolic groups is now completely normal and, even more important, reversible in the pH range 7.5—13. It seems reasonable therefore to conclude that the tyrosine residues have not been affected by performic acid oxidation (aside from the fact that the phenolic groups have been freed) and this derives additional support from the fact that the apparent pK's of these groups in both proteins are now 10.45 and 10.5 for ovalbumin and serum albumin, respectively.

Difference spectra in acid solution

A small, but definite, spectral shift occurs in proteins when titrated with acid [31], hence under conditions where phenolic dissociation may be excluded. For insulin Laskowski *et al.* [21] have studied this shift quantitatively by difference spectrophotometry and have shown that its magnitude is dependent on pH, that it is reversible and that a titration curve of this shift exhibits an apparent pK of about 2.6, from which it was concluded that its source is the reversible hydrogen bonding of phenolic groups to carboxylate acceptors. An analogous study of ribonuclease gave somewhat similar results, except that the titration curve is much steeper while the apparent pK of the presumed acceptors was in the neighbourhood of 1.7 [28]. The conclusion of Laskowski *et al.* [21] has been generally accepted and such measurements have now been extended to numerous proteins; as well as to the demonstration of bonding involving other absorbing chromophores, in acid medium [7].

If the spectral shifts in acid medium are really due to *specific* hydrogen bonding by carboxylate acceptors, it seems reasonable to assume that such bonds would be abolished following destruction of the native configuration of the polypeptide chains.

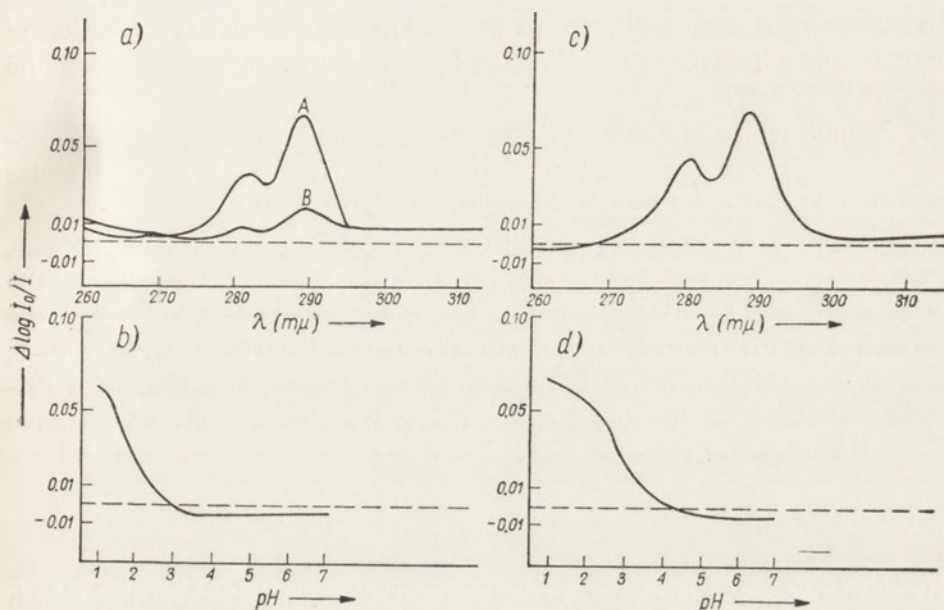


Fig. 6. Difference spectra of native and heated RN-ase (1.4 mg./ml.) in acid medium vs. enzyme in neutral solution

- (a) Native RN-ase at pH 1.05 (curve A) and pH 1.95 (curve B) vs. enzyme at pH 6.9
 (b) Native RN-ase — titration curve of differential spectrum at 288 m μ .
 (c) RN-ase heated 3 hrs. at 90° at pH 2.0; pH 1.05 or pH 1.95 vs. heated enzyme at pH 6.9
 (d) Heated RN-ase — titration curve of differential spectrum at 288 m μ .

Fig. 6 (a) exhibits the difference spectrum of RN-ase at two pH values, 1.05 and 1.95, measured against a control at pH 6.95. Fig. 6 (b) is the titration curve of the difference spectrum, using optical density values at 288 m μ . The results are quite similar to those of Scherega [28], with the exception that the pK of the carboxylate acceptors is perhaps slightly lower than his value. Fig. 6 (c) shows the difference spectrum for RN-ase heated under conditions leading to practically complete enzymatic inactivation [10, 11]²⁾, while Fig. 6 (d) represents the titration curve of

²⁾ Additional evidence for the complete inactivation of the enzyme used in these experiments is furnished by the observation that subsequent alkalization of a sample showed all the phenolic hydroxyl groups to be dissociated at pH 12.

the difference spectrum under these conditions. It will be seen that a "difference" spectrum exists following heating, but the titration curve is less steep and its apparent pK is now about 2.6 instead of 1.8, in other words corresponds more closely to the dissociation of carboxylate groups. The reversibility of the titration curve for the heated RN-ase is, on the other hand, not as quantitative as for the native protein, the position of the curve varying slightly as titration is carried first in one direction and then in the other.

Although we have made no detailed studies on insulin, a few measurements on partially heat-inactivated samples indicated that a similar behaviour is exhibited by this protein.

Attempts were made to run a difference spectrum on oxidized RN-ase, but these were complicated by the appearance of a slight turbidity as the pH was brought from acid medium to pH values above 3.5. At best we can state that no difference spectrum was apparent in the pH range 1—3, where the maximum effect is normally encountered; and that, if a difference spectrum is exhibited above pH 3, its apparent pK would have to be at least above pH 4.

DISCUSSION

The point of departure of the present study was our desire to establish whether so-called hydrogen bonds are ruptured during the heat inactivation of ribonuclease, bearing in mind the fact that the thermodynamic constants for the inactivation process are of the order of magnitude normally encountered in ordinary chemical reactions. The results represented by Fig. 1 show quite clearly that what are widely accepted as phenolic hydrogen bonds are in fact liberated by heating and, in view of the deuterium-exchange studies of Hvidt [17] on native and heat-denatured RN-ase, it seems reasonable to assume that other such bonds are likewise broken, although spectral methods cannot be expected to fully clarify this point.

It is of interest to note that the apparent pK of the phenolic hydroxyl groups in heat denatured RN-ase, pK about 10.5, is practically identical to that for oxidized RN-ase, pK about 10.4. Bearing in mind the fact that oxidized RN-ase in aqueous solution is in the form of a fully unfolded, random, chain, and that the total number of charges on the two molecules is not markedly different, it appears likely that a similar situation prevails for heat inactivated RN-ase despite the presence of 4 disulfide bridges (it should be recalled that only 16% of the native molecule is in the form of an α -helix). Such extensive unfolding as a result of heat inactivation

seems rather surprising in view of the low entropy changes involved [10, 11, 32].

It is, however, pertinent to inquire whether these phenolic hydroxyl bonds are in fact hydrogen bonds, as is generally assumed. If such is, indeed, the case it is surprising that some of them, at least, in both ovalbumin and serum albumin are so resistant to heat denaturation. One can only conclude that, if the failure of some of the phenolic groups in these proteins to be liberated following heat denaturation is due to hydrogen bonding, they must be hydrogen bonds of a rather unusual type.

From the above data one may divide phenolic hydroxyls qualitatively into at least three groups which may be distinguished by the extent to which they are free to dissociate (or not) prior to and following heat denaturation. Although our observations suggest the possibility of a further subdivision, of those which are not free to dissociate in the native protein, the titrations were not of sufficient accuracy to define these as we had originally expected. Rice and Doty [25] have found a somewhat similar situation to prevail in the case of the heat denaturation of DNA.

Of particular interest are the results for insulin in which the high apparent pK of the phenolic groups, due to the distribution of charge on a molecule of specific shape, drops from 11.2 in the native protein to 10.4 for the oxidized form, as is to be expected for extensive unfolding if the total charge on the molecule is not appreciably altered, and as is also the case for RN-ase. On the other hand, even following 50% heat inactivation, the apparent pK is unchanged. This suggests that little or no unfolding of the molecule has taken place, in contrast to the situation prevailing for RN-ase. From this it may be deduced that the failure of some groups in ovalbumin or bovine serum albumin to dissociate following heat inactivation could be due to the location of such groups in a particular portion of the molecule, whose configuration is not markedly altered as a result of denaturation, so that the local charge distribution is sufficient to inhibit the dissociation, even in the absence of hydrogen bonding. The existence of such localized charge effects is also suggested by the fact, previously pointed out [31], that the dissociation of the phenolic groups of insulin apparently proceeds in two stages, despite the fact that these groups are not bound (or masked) as they are in RN-ase, ovalbumin and bovine serum albumin.

It should further be noted that the presence of -S-S-bridges does not appear to play a particular role in the masking of phenolic groups since in RN-ase with 4 such bridges all phenolic hydroxyls are released by heating whereas in ovalbumin with one such bridge some of the phenolic groups are still masked following heating. It is probably more likely that the more

important factor is the extent to which the polypeptide chain exists in the α -helix form, which is 16% for RN-ase but 46% for ovalbumin [8].

Turning now to the question of difference spectra in acid solution, it is surprising that such spectra still exist following total heat-inactivation of RN-ase, the resultant unfolding of which is testified to not only by liberation of all the masked phenolic hydroxyls; but also by the appreciable drop in apparent pK of all the phenolic hydroxyls to a value only 0.5 pH units in excess of the intrinsic pK of these groups in RN-ase [36].

Although it is not possible at the moment to give an unequivocal answer to the question as to which of the phenolic hydroxyls are involved in the interaction revealed in acid medium, it is nonetheless of significance that with all 6 phenolic groups unmasked in the inactivated enzyme, the magnitude of the difference spectrum is undiminished. This is supporting evidence for the conclusion that the phenolic-carboxylate interaction in acid medium involves rather those phenolic groups not masked in the native protein.

The fact that the difference spectrum in oxidized RN-ase is non-existent or, at most (see above) only a fraction of that exhibited by the native protein suggests, therefore, that heat-inactivated RN-ase is not as fully unfolded as the oxidized enzyme, in agreement with the fact that in the latter all the disulfide bridges have been ruptured. It is therefore of some significance that the titration curve for the difference spectrum in acid medium of the heat-inactivated enzyme is not fully reversible in the forward and backward directions, but oscillates roughly about the mean shown in Fig. 6 (d). This can be interpreted in terms of continued interaction between certain phenolic and carboxylate groups in the inactivated enzyme but, since the polypeptide chain no longer possesses the unique configuration of the native state, this interaction may vary to some extent as a result of the increased flexibility of the molecule. It is, however, somewhat difficult to interpret such interactions in terms of hydrogen bonding and it appears much more likely that it is due to local electrostatic influences of carboxyl groups on neighbouring phenolic rings. This derives qualitative support from the observation of Wetlaufer *et al.* [40] that purely electrostatic effects can provoke spectral shifts in the spectrum of tyrosine similar to those exhibited by this amino acid in proteins in acid solution.

SUMMARY

The heat inactivation of ribonuclease is accompanied by a step-wise release of "masked" phenolic groups at a rate corresponding to the rate of destruction of enzymatic activity; practically all phenolic groups are released by heating. For ovalbumin and serum albumin some of the masked

groups are still masked following heat denaturation and it is possible in this way to distinguish at least three types of phenolic hydroxyls in proteins. While hydrogen bonding is not excluded as the source of masking of some of the phenolic groups, the results indicate that this cannot be the only explanation and that strong local electrostatic effects are also involved.

Performic acid oxidation of ribonuclease, insulin, ovalbumin and bovine serum albumin in all cases gives products in which all the phenolic groups titrate normally with apparent pK values of 10.4–10.5. Only in the case of ribonuclease does heat inactivation release bound phenolic groups to the extent that their apparent pK is practically the same as for the oxidized protein, thus providing some indication of the extent of unfolding resulting from inactivation.

Although the difference spectrum of oxidized ribonuclease (as well as insulin) in acid medium is practically eliminated, that for heat-inactivated ribonuclease is not only equal in magnitude to that for the native enzyme, but the titration curve for the difference spectrum is more normal, with a pK more nearly in accord with that for involvement of carboxyl groups. The overall results suggest that electrostatic effects, rather than hydrogen bonding, are the source of difference spectra in acid medium, and, in the case of ribonuclease, that the masked (or "bound") phenolic groups are not the ones responsible for the difference spectrum in acid medium.

REFERENCES

- [1] Barron E. S. G. and Finkelstein P., *Arch. Biochem. Biophys.* **41**, 212, 1952.
- [2] Beaven G. H. and Holiday E. R., *Ad. Protein Chemistry* **7**, 320, 1952.
- [3] Bencze W. L. and Schmidt K., *Anal. Chem.* **29**, 1193, 1957.
- [4] Bielicer W. A., Kotkova K. I., Lobachewskaja O. W. and Cikalowskaja G. N., *Doklad. Akad. Nauk USSR* **116**, 451, 1957.
- [5] Blumenfeld O. and Levy M., *Arch. Biochem. Biophys.* **76**, 97, 1958.
- [6] Crammer J. L. and Neuberger A., *Biochem. J.* **37**, 302, 1953.
- [7] Donovan J. W., Laskowski M. jr., and Scherega H. A., *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 457, 1958.
- [8] Doty P., *Coll. Czech. Chem. Comm.* **22**, 5, 1957.
- [9] Fromageot C. and Schnek G., *Biochim. Biophys. Acta* **6**, 113, 1950.
- [10] Gajewska E. and Shugar D., *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II*, **3**, 117, 1955.
- [11] Gajewska E. and Shugar D., *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II*, **4**, 157, 1956.
- [12] Glazer A. N., Mc Kenzie H. A. and Wake R. G., *Nature* **180**, 1286, 1957.
- [13] Harrington W. F., *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 450, 1955.
- [14] Harrington W. F. and Schellman J. A., *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Ser. chim.* **30**, 23, 1956.
- [15] Hirs C. H. W., Moore S. and Stein W. H., *J. Biol. Chem.* **219**, 611, 1956.
- [16] Hirs C. H. W., Stein W. H. and Moore S., *J. Biol. Chem.* **211**, 941, 1954.

- [17] Hvidt A., *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 306, 1955.
[18] Jirgenson B., *Arch. Biochem. Biophys.* **41**, 333, 1952.
[19] Kekwick R. H. and Cannan R. K., *Biochem. J.* **30**, 227, 1936.
[20] Klotz I. M., *Science* **128**, 815, 1958.
[21] Laskowski M. jr., Widom J. M., McFadden M. L. and Scherega H. A., *Biochim. Biophys. Acta* **19**, 581, 1956.
[22] Lens J., *J. Biol. Chem.* **169**, 313, 1947.
[23] Palmer A. H., *J. Biol. Chem.* **104**, 360, 1934.
[24] Perlmann G. E., *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 210, 1956.
[25] Rice S. A., and Doty P., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3937, 1957.
[26] Sanger F., *Biochem. J.* **44**, 126, 1949.
[27] Sage H. J. and Singer S. J., *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 663, 1958.
[28] Scherega H. A., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 196, 1957.
[29] Sela M. and Anfinsen C. B., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 229, 1957.
[30] Sela M., Anfinsen C. B. and Harrington W. F., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 502, 1957.
[31] Shugar D., *Biochem. J.* **52**, 142, 1952.
[32] Shugar D. and Gajewska E., *J. Polymer Sci.* **31**, 281, 1958.
[33] Shugar D. and Rzendowska F., in preparation.
[34] Shugar D. and Syruczek E., *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II*, **2**, 73, 1954.
[35] Stearn A. E., *Ad. Enzymol.* **9**, 25, 1949.
[36] Tanford C., Hauenstein J. D. and Rands D. G., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 6409, 1955.
[37] Tanford C. and Roberts G. L., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 2509, 1952.
[38] Tramer Z. and Shugar D., *IV Intern. Congr. Biochem.*, Vienna, Comm. No. 2, 43, 1958.
[39] Weil L. and Buchert A. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **34**, 1, 1951.
[40] Wetlaufer D. B., Edsall J. T. and Hollingworth B. R., *J. Biol. Chem.* **233**, 1421, 1958.

BADANIA NAD WIĄZANIEM HYDROKSYLI FENOLOWYCH W BIAŁKU

Streszczenie

Ciepłej inaktywacji rybonukleazy towarzyszy stopniowe odsłanianie „zamaskowanych“ grup fenolowych odpowiadające szybkości ustępowania aktywności enzymatycznej. Praktycznie wszystkie grupy fenolowe rybonukleazy odsłaniają się przez ogrzanie. Po ciepłej denaturacji albuminy jaja i albuminy surowicy, pewne grupy fenolowe pozostają zamaskowane, i w ten sposób można wyróżnić co najmniej trzy rodzaje hydroksyli fenolowych w białkach. Chociaż nie można wykluczyć, że „zamaskowanie“ niektórych grup fenolowych spowodowane jest przez wiązanie wodorowe, to jednak wyniki badań wskazują, że nie może to być jedynym wytłumaczeniem, i że grają tu rolę również silne miejscowe oddziaływania elektrostatyczne.

Przy utlenieniu rybonukleazy, insuliny, albuminy jaja oraz bydłowej albuminy surowicy kwasem nadmanganowym otrzymuje się produkty,

w których wszystkie grupy fenolowe miareczkują się normalnie i dają pozorną wartość pK 10,4—10,5. Ciepła inaktywacja jedynie w przypadku rybonukleazy powoduje odsłonięcie grup fenolowych w takim stopniu, że ich pozorne pK jest praktycznie takie samo jak dla utlenionego białka. Daje to pewne wskazówki co do stopnia rozwinięcia pofałdowań białka spowodowanego inaktywacją.

Chociaż utleniona rybonukleaza (jak też i insulina) praktycznie nie wykazuje różnicowego widma absorbcyjnego w środowisku kwaśnym, to ciepłem zinaktywowana rybonukleaza ma nie tylko widmo różnicowe równe co do wielkości z otrzymanym dla enzymu rodzimego, ale również i krzywa miareczkowania dla widma różnicowego jest bardziej normalna, z pK blisko odpowiadającym grupom karboksylowym. W sumie wyniki sugerują, że raczej elektrostatyczne wpływy, aniżeli wiązania wodorowe są przyczyną widma różnicowego w środowisku kwaśnym, i że w przypadku rybonukleazy za to widmo różnicowe nie są odpowiedzialne zamaskowane (lub „związane“) grupy fenolowe.

Otrzymano 4.2.1959 r.

Każdy autor winien dokładnie zapoznać się z treścią „wytycznych dla autorów“ jeszcze przed przystąpieniem do pisania swej pracy i skrupulatnie stosować się do nich. Prace nie odpowiadające pod względem formy postawionym wymogom nie będą mogły być brane pod uwagę i zostaną zwrócone autorom. Fakt przesłania pracy do redakcji uważany jest jako równoznaczny ze zgodą autora na treść „wytycznych“.

WYTYCZNE DLA AUTORÓW

1. Acta Biochimica Polonica publikują prace biochemiczne i z dziedzin pokrewnych biochemii, zawierające nie ogłoszone dotychczas wyniki badań doświadczalnych. Ogłaszane prace winny zawierać element nowości naukowej. Językiem prac zgłaszanych do publikacji w Acta Biochimica Polonica jest język polski lub jeden z języków kongresowych.

2. Prace powinny być pisane możliwie zwięźle, ale zwięzłość nie powinna powodować niejasności przedstawienia. Artykuły są przeznaczone przede wszystkim dla czytelnika wyspecjalizowanego w danym temacie, mimo to artykuły powinny być zrozumiałe dla ogółu czytelników. Opis doświadczeń powinien być taki, by mógł je powtórzyć każdy, kto dysponuje odpowiednim materiałem, wyposażeniem i techniczną sprawnością. Należy unikać technicznych neologizmów. Używane skróty należy wyjaśnić w tekście.

3. Układ artykułów. Prace należy przysyłać do redakcji w postaci gotowej do druku, w trzech egzemplarzach pisanych na maszynie jednostronnie, z marginesem szerokości około 4 cm po lewej stronie i około 1 cm po prawej stronie, z podwójną interlinią oraz z numeracją stron. Pierwszy egzemplarz należy pisać na papierze piśmiennym (białym). W tekście maszynopisu nie należy robić żadnych poprawek, przekreśleń lub podkreśleń na maszynie ani atramentem. Dopuszczalna największa ilość poprawek wynosi trzy na jednej stronie. Autor może proponować oznaczenia typograficzne przez odpowiednie określenie (tekst rozspacjowany, złożony kursywą, czcionką grubą itp.), ale wyłącznie ołówkiem. Nie należy stawiać kropek po tytułach i podtytułach, ani po skrótach takich jak: ml, cm, g, kg. Dla wyrażenia mikrograma służy skrót „ μ g“, a nie „ γ “. Na osobnych kartkach poza tekstem pracy należy umieścić: a) streszczenie polskie, b) cytowaną literaturę, c) tablice, d) rysunki lub fotografie wraz z objaśnieniami (patrz pkt. 8 i 9), e) pełne imię i nazwisko autora (ów), adres dla przesłania korekty i honorarium oraz skróconą wersję tytułu nie przekraczającą 60 miejsc literowych, przeznaczoną dla umieszczenia jej nad strona-
mi tekstu pracy. Należy podać nazwisko i adres osoby upoważnionej do przeprowadzenia korekty, w przypadku nieobecności autora. W tekście należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie w przybliżeniu miejsca, w których powinny być umieszczone tablice i rysunki. Prace nie odpowiadające wymaganiom zawartym w punk-

cie 3 zostaną przepisane na koszt autora, a odpowiednia kwota zostanie potrącona z honorarium autorskiego.

4. Na pierwszej stronie pracy należy podać: imię i nazwisko autora (-ów), tytuł możliwie zwięzły, ale jasno charakteryzujący treść pracy, zakład naukowy, w którym wykonano pracę i nazwisko kierownika zakładu, odpowiedzialnego za jego działalność. W interesie autora leży, aby *tytuł pracy* zawierał w najkrótszej formie podstawowy wynik pracy, a nie tylko zagadnienie. Należy unikać tytułów w rodzaju: „Badania nad...”. Wskazane jest podawanie już w tytule głównego wniosku wynikającego z pracy, nawet w przypadku, gdy jest on negatywny. Tytuł może wtedy przybrać postać: „Niemożność...”, lub podobnie.

5. Tekst pracy powinien składać się z następujących części: a) zwięzły wstęp wyjaśniający cel i założenie pracy, b) opis metod doświadczalnych, charakterystyka, pochodzenie lub sposób preparatywnego uzyskania używanych chemikaliów oraz opis szczegółów, które są potrzebne dla powtórzenia opisanych doświadczeń i sprawdzenia przeprowadzonych obliczeń, c) opis wyników ujęty możliwie zwięzle najlepiej w postaci tablic lub wykresów, d) dyskusja o uzyskanych wynikach, e) streszczenie lub wnioski — objętości nie przekraczającej 3% rozmiarów pracy. Streszczenie lub wnioski winny być tak sformułowane, aby zawierały, w postaci możliwie najbardziej zwięzłej, wyniki pracy wraz z głównymi danymi liczbowymi. Wnioski winny wynikać bezpośrednio z doświadczeń. Wnioski pośrednie mogą być zamieszczone w tym punkcie wyłącznie pod warunkiem wyraźnego określenia, że mają one charakter dyskusyjny lub podobny.

6. Metody doświadczalne powinny być przedstawione bardzo starannie. Jeżeli autor posługiwał się znaną metodą publikowaną, wystarczy powołanie się na odnośną pracę, ewentualnie omówienie istoty danej metody. Należy wymienić wszelkie, nawet pozornie niewielkie, odchylenia od pierwotnej metody; stwierdzenie, że posługiwano się odnośną metodą „z niewielkimi modyfikacjami” nie jest dopuszczalne.

7. Stężenie roztworów pospolitych kwasów i zasad wyraża się pojęciem normalności (N), natomiast dla roztworów soli należy posłużyć się pojęciem molarności (M): 0,25 N HCl, 0,15 M NaH₂PO₄. Stężenie ułamkowe należy wyrazić systemem dziesiętnym, np. 0,25 N HCl, a nie N/4 HCl. Pojęcie „procent”, „‰” używa się w ścisłym znaczeniu, tj. w gramach na 100 gramów roztworu. Procenty objętościowe należy wyrażać symbolem „‰ obj./obj.”, a procenty wagowo-objętościowe „‰ wag./obj.”.

8. Poszczególne tablice powinny mieć nagłówek opisujący ich treść. Sens tablic powinien być zrozumiały bez powoływania się na tekst pracy. Nie jest konieczne ogłaszanie wszystkich liczbowych wyników podobnych doświadczeń, jeżeli poda się wartość średnią wraz z jego „średnim odchyleniem”, ew. liczbę indywidualnych rezultatów.

9. Rysunki i fotografie należy wykonywać w postaci nadającej się do reprodukcji lub przerysowania. Każdy rysunek lub fotografia winny być przygotowane na oddzielnej kartce. Na odwrocie każdego rysunku, lub fotografii należy podać ołówkiem: nazwisko autora, pierwsze słowa tytułu pracy, kolejny numer rysunku oraz pierwsze słowa legendy, która ma być umieszczona pod nim. Do rysunków i fotografii należy dołączyć wykaz (na maszynie) zawierający kolejne numery wraz z tytułami i legendą. Należy unikać podawania na rysunkach objaśnień tekstowych. Na fotografiach nie należy dopisywać żadnych oznaczeń. Jeśli fotografie takich oznaczeń wymagają, należy umieścić je na przypiętej do fotografii kalce technicznej. Nadmierna ilość rysunków może być wykonana wyłącznie na *koszt autora*. Krzywe wyrażające zależności zbadane eksperymentalnie winny mieć wyraźnie zaznaczone punkty, których wartości uzyskano doświadczalnie.

10. Cytowaną *literaturę* należy wypisać na oddzielnej karcie, wymieniając pozycje w alfabetycznej kolejności autorów. W wykazie podawać kolejno: numer pozycji, nazwisko autora, pierwsze litery imion, skrócony tytuł czasopisma, tom (rocznik), początkową stronę artykułu i rok wydania. Np. [8] Parnas J. K., *Acta Biol. Exp.* **11**, 292, 1937. Jeżeli cytowany artykuł ma kilku autorów, należy w wykazie literatury podać nazwiska i początkowe litery imion wszystkich autorów. Dla cytowanych książek (nie czasopism) należy podać także tytuł książki, wydawcę, miejsce oraz rok wydania. Np. [12] Śniadecki J., *O fizycznym wychowaniu dzieci*, Turrowski, Sanok 1855. Wykaz używanych skrótów czasopism podają Roczniki Chemii **26**, 497, 1952. Prace kilkakrotnie cytowane należy podawać jeden raz, a wszystkie odsyłacze do tej pracy powinny mieć ten sam numer. Powołanie się w tekście na odnośną pozycję cytowanej literatury następuje przez wymienienie numeru pozycji wykazu w nawiasie, np. [13].

11. Autora obowiązuje *korekta autorska*, którą należy zwracać redakcji w ciągu trzech dni. Nieodesłanie przeprowadzonej korekty w oznaczonym przez redakcję terminie oznacza *rezygnację autora* z umieszczenia pracy w bieżącym numerze czasopisma. Zaleca się wykonanie korekty ołówkiem kolorowym, barwy odmiennej od ołówka korektora, ale nie czerwonym. Koszty spowodowane zmianą tekstu, poza poprawą błędów drukarskich, ponosi autor.

12. Autorowi przysługuje bezpłatnie 25 egzemplarzy *odbitek pracy*. Żądanie większej ilości odbitek winno być wyrażone na piśmie, jednocześnie ze złożeniem pracy w redakcji, najpóźniej przy pierwszej korekcie szpaltowej. Koszt za dodatkowe egzemplarze ponosi autor.

13. *Redakcja nie uważa się za uprawnioną do przeprowadzania jakichkolwiek zmian w pracy bez zgody autora*. Dla dokonania zmian uważanych przez redakcję za celowe dwa egzemplarze pracy odsyła się autorowi, trzeci pozostaje w aktach redakcji.