

939
POLSKA AKADEMIA NAUK
KOMITET BIOCHEMICZNY

POSTĘPY
BIOCHEMII


KWARTALNIK

TOM II

1956

ZESZYT I

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE
WARSZAWA


<http://rcin.org.pl>

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

POSTĘPY BIOCHEMII

Kwartalnik

TOM II

1956

ZESZYT 1

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

KOMITET REDAKCYJNY

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — DZIAŁ CZASOPISM
WARSZAWA, KRAKOWSKIE PRZEDMIEŚCIE 79

Nakład 1214 + 127 egz.	Oddano do składania 26.11.55.
Ark. wyd. 15,4, Ark. druk. 12,5	Podpisano do druku 16.4.56.
Papier druk. sat. kl. V, 70 g, 70 × 100	Druk ukończono 20.4.56.
Cena zł 15.—	Zam. 1595c/55. B-7-23479.

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

B. SKARŻYŃSKI

Dzieje zagadnienia kwasów nukleinowych

Dzisiejszy biolog wychodząc z przesłanek materializmu dialektycznego musi zmodyfikować słynną definicję życia sformułowaną przez Engelsa, będącą podłożem współczesnej materialistycznej biologii. Dla Engelsa ośrodkiem rozważań dotyczących istoty życia była cząsteczka białka i jej bezustanne przemiany, natomiast dla dzisiejszego biologa elementarną jednostką żywej materii jest pozacząsteczkowa struktura zbudowana z proteidów, a więc białek złożonych z udziałem substancji niebiałkowych, a szczególnie kwasów nukleinowych. Zajęcie tego nowoczesnego punktu widzenia wysuwa na czoło podstawowych składników żywej materii oprócz białek — które tę pozycję zajmowały od 125 lat — również kwasy nukleinowe, związki chemiczne jeszcze mało zbadane, a przecież stanowiące jeden z najbardziej aktualnych problemów bieżącej biochemii. Dziedzina kwasów nukleinowych, jeszcze dwadzieścia lat temu interesująca zaledwie niektórych uczonych, w owym czasie pozornie mało płodna i obiecująca, stała się obecnie terenem masowego natarcia armii badaczy uzbrojonych w najnowocześniejszy oręż. Jaki będzie ostateczny wynik tego ataku, jak prędko nastąpi zwycięstwo, trudno na razie przewidzieć, ale rzut oka w przeszłość pozwalający objąć w jedną całość coraz to szybsze narastanie naszych wiadomości o kwasach nukleinowych, może nastroić nas najbardziej optymistycznie.

Kolebka kwasów nukleinowych jako obiektu badań naukowych stała w Tybindze, w kuchni starego pałacu książęcego, zamienionej w latach sześćdziesiątych ubiegłego stulecia na laboratorium instytutu chemii stosowanej tamtejszego prowincjonalnego uniwersytetu. Na czele instytutu stał młody jeszcze badacz, ale już wsławiony w świecie naukowym jako były współpracownik *Virchowa* w Berlinie, odważnie atakujący metodami chemicznymi problemy fizjologiczne i patologiczne. Badacz ten, *Feliks Hoppe*, adoptowany później przez swego szwagra, pod nowym swym nazwiskiem *Hoppe-Seyler* stał się chorążym młodziutkiej, wynurzającej się z powijaków gałęzi wiedzy — chemii fizjologicznej. Do pracowni jego w Tybindze zdążyli adepti nowej nauki z całej Europy.

W szeregu jego współpracowników w owym czasie widzimy reprezentantów wszystkich narodowości, nie brak i nazwiska polskiego — Hermana Fudakowskiego, późniejszego pierwszego profesora chemii fizjologicznej w Polsce, w Szkole Głównej Warszawskiej.

Wieloletnie dociekania Hoppe-Seylera dotyczyły głównie cieczy ustrojowych, krwi i moczu, jako łatwiej dostępnym badaniu, ale uczeń i współpracownik Virchowa zdawał sobie sprawę z wagi tajemnic, jakie kryje w sobie chemia komórki. W poszukiwaniu materiału, który by był skupieniem jednolitych komórek, wolnym od substancji międzykomórkowej, Hoppe-Seyler zwrócił uwagę na leukocyty. Zadanie chemicznego przebadania leukocytów powierzył w r. 1868 nowemu gościowi w swej pracowni, 24-letniemu Szwajcarowi z Bazylei, Fryderykowi Miescherowi. Sąsiednia klinika chirurgiczna dostarczyła opatrunków z ropiejących ran, z których Miescher wypłukiwał roztworem soli kuchennej komórki, uzyskując istotnie zupełnie jednorodną zawiesinę leukocytów. Oczywiście, stosownie do dominujących wówczas poglądów, główny nacisk został położony na badanie białek, których Miescher zidentyfikował w komórce ciałek ropnych aż 5 rodzajów, cyfra przy ówczesnym stanie badań imponująca.

W toku swych badań Miescher zwrócił uwagę na uderzającą odporność jąder leukocytów, które pozostawały nienaruszone podczas traktowania komórek bardzo rozcieńczonym kwasem solnym, rozpuszczającym wszystkie białka protoplazmy. Jeszcze dogodniejszy sposób izolowania jąder znalazł Miescher w soku żołądkowym trawiącym protoplazmę a pozostawiającym jądra ciałek ropnych nienaruszone. Oczywiście, uzyskany w ten sposób materiał stał się obiektem badań Mieschera, który stwierdził, że głównym tworzywem jąder leukocytów jest jakaś substancja rozpuszczalna już w słabo zasadowych roztworach, natomiast nierozpuszczalna w kwasach, zawierająca ok. 14% N i przeszło 5% P. Widząc w niej charakterystyczny składnik jądra, nadał jej odpowiednią nazwę — nukleina. Intuicyjnie odgadł Miescher znaczenie opisanego przez siebie związku. W zakończeniu swej pierwszej publikacji pisał: „Znajomość wzajemnego stosunku między materiałem jądrowym, białkami i ich produktami przemian, zerwie z czasem zasłonę kryjącą przed nami istotę procesu wzrostu komórki“.

Hoppe-Seyler miał widocznie początkowo wątpliwości co do słuszności wniosków swego młodego ucznia. Praca Mieschera przeleżała w biurku mistrza przez dwa lata, zanim zdecydował się opublikować ją w r. 1871, razem ze swoją własną pracą nad chemizmem ropy, w której podkreślił, że skontrolował wszystkie wyniki Mieschera, potwierdzając je całkowicie. Co więcej, w publikacji tej Hoppe-Seyler doniósł, że również w komórkach drożdży znalazł on ciało wybitnie przy-

pominające nukleinę *Mieschera*. Zresztą w tym samym czasie, w pracowni tybingeńskiej dr *Plósz* z Budapesztu badał jądra erytrocytów, ptaków i węży, dochodząc do wniosków analogicznych z wnioskami *Mieschera*.

W tym czasie, gdy świat naukowy dowiadywał się o egzystencji nukleiny, *Miescher* pracował już w swej rodzinnej Bazylei jako profesor fizjologii, następca słynnego embriologa i anatoma *Wilhelma Hisa*. Tarła łososi w górnym biegu Renu dostarczyły mu nowego obiektu do badań. Zdawano sobie już wówczas sprawę z tego, że główki plemników odpowiadają jądru komórek i sperma łososi, łatwo dostępna w Bazylei w porze godowej tych ryb, stała się materiałem, na którym skupił uwagę *Miescher*. W r. 1874 ogłosił doniesienie, z którego wynikało, że nukleina plemników łososi, bardzo zbliżona do nukleiny jąder leukocytów, jest solą jakiegoś kwasu z jakąś organiczną zasadą, nazwaną przez niego protaminą. Dla kwasu związanego z protaminą wprowadził 5 lat później *Altman* nazwę — kwas nukleinowy.

Badając nukleinę ze spermy łososia *Miescher* zaobserwował bardzo ważny fakt. Próbką tej substancji odparowywana ze stężonym HNO_3 pozostawiała na parownicze żółtą plamę, która po zwilżeniu amoniakiem przybierała barwę fiołkową. Dodatni wynik tej znanej od czasów *Wöhlera* i *Liebiga* próby mureksydowej, charakterystycznej dla kwasu moczowego i jego pochodnych, skłonił *Mieschera* do dalszych dociekań. *Piccard*, któremu *Miescher* powierzył to zagadnienie, zidentyfikował istotnie w nukleinie *Mieschera* znane już wówczas związki — gwaninę i hipoksantynę. Mniej udane były dalsze wnioski, które wyciągał *Piccard* ze swych badań twierdząc, że gwanina i hipoksantyna są składnikami protaminy, a nie związanego z nią kwasu.

W międzyczasie *Hoppe-Seyler* opuścił swą ciasną i niewygodną pracownię w Tybindze, obejmując kierownictwo pierwszego w Niemczech instytutu chemii fizjologicznej, w przemianowanym na niemiecki, byłym francuskim uniwersytecie w Strassburgu. Osoba kierownika i doskonale wyposażony zakład ściągał z daleka żądnych wiedzy adeptów, wśród których znalazł się przybyły w r. 1877 z Rostocka 24-letni *Albert Kossel*. Młody *Kossel* zajął się nukleina, od razu pierwszymi publikacjami skierował badania nad tym związkiem na nowe tory i kontynuując je przez przeszło 20 lat, naprzód w Berlinie, potem w Marburgu, stworzył podwaliny chemii kwasów nukleinowych.

Już w pierwszych swych doświadczeniach *Kossel* potwierdził wyniki *Piccarda*, wydzielając z nukleiny hipoksantynę i gwaninę, wykazując równocześnie, że te związki, nazywane wówczas „zasadami allok-surowymi“ powstają z kwasu nukleinowego, a nie z białkowej komponenty nukleiny. W r. 1885 odkrył *Kossel* adeninę i doszedł do wniosku,

że związek ten jest właściwym składnikiem kwasu nukleinowego a hipoksyantyna tylko wtórnie z niego powstającym produktem. Gwaninę i adeninę potraktował jako najcharakterystyczniejsze składniki kwasu nukleinowego, wyróżniające go z wszystkich białek i innych organicznych połączeń fosforu, z jakimi wówczas kwas nukleinowy często mieszano. Nawiązując do równocześnie rozwijających się wspaniałych badań w zakresie organicznej syntezy, prowadzonych przez Emila Fischera, formułującego pojęcie grupy związków „purynowych (zamiast „alloksurynowych“), Kossel wykazał istotną genezę kwasu moczowego w organizmie ludzkim, rewolucjonizując pojęcia klinicystów w tej dziedzinie.

Kossel był tym, który pierwszy zwrócił uwagę na grasicę, jako na szczególnie dogodne źródło otrzymywania kwasu nukleinowego, zapewniając w ten sposób naszym pracownikom do dziś dnia możliwość korzystania z względnie taniego produktu. W kilka lat później, w r. 1889 Altmann opisał metodę otrzymywania kwasu nukleinowego z drożdży, wprowadzając na długie dziesiątki lat do terminologii kwasów nukleinowych odpowiednie nazwy dla dwóch typów tych związków — kwas grasicowy i kwas drożdżowy.

Na ostatni dziesiątek lat ubiegłego stulecia przypada odkrycie związków pirymidynowych w kwasach nukleinowych. W r. 1893 opisał Kossel i Neumann w produktach rozkładu kwasów nukleinowych tyminę, w następnym roku ci sami badacze zidentyfikowali cytozynę, a wreszcie w r. 1900 w instytucie Kossela, Ascoli opisał uracyl jako składnik kwasu nukleinowego drożdżowego.

W r. 1893 zauważył Kossel, że w kwasie nukleinowym drożdżowym znajduje się jakiś składnik przechodzący w furfural lub w kwas lewulinowy, a więc że prawdopodobnie w skład tego kwasu nukleinowego wchodzi jakiś cukier. Salkowski na podstawie osazonu zidentyfikował ten cukier w r. 1899 jako pentozę, ale dopiero w 10 lat później Levene mógł stwierdzić, że pentoza ta jest rybozą. Natomiast komponenta cukrowca kwasu grasicowego czekała jeszcze długo na identyfikację, którą zawdzięczamy Levene'owi dopiero w ostatnich latach przedwojennych.

Albert Kossel otrzymał w r. 1910 Nagrodę Nobla. Przyznano mu to najwyższe odznaczenie w ówczesnym świecie naukowym nie za jego badania nad kwasami nukleinowymi, ale za jego badania nad strukturą protaminów. Dziś, gdy chemia białek szczyci się tak fantastycznymi osiągnięciami, jak wyjaśnienie długich łańcuchów peptydowych, dociekania Kossela nad protaminami zdają się być raczej badaniami biegnącymi na bocznym torze. Być może, że dzisiejsza chemia białek, gdyby z niej wykreślić prace Kossela, osiągnęłaby taki sam poziom, na jakim się znajduje. Natomiast chemia kwasów nukleinowych jest nie do pomyślenia bez

pionierskiego wkładu, jaki wiążemy z nazwiskiem tego badacza. Fakt ten jest bardzo znamieny. Lat temu czterdzieści kilka każdy krok posuwający naprzód naszą wiedzę o białkach, uważany był za epokową zdobycz; najistotniejsze zagadnienia biochemiczne wiązano wówczas z problemem struktury białka. Kwasy nukleinowe znajdowały się wtedy na uboczu głównego nurtu zainteresowań biochemików. Nie wiedziano jeszcze, co począć w interpretacji chemizmu zjawisk życiowych z tymi związkami o nieokreślonej strukturze a o jeszcze mniej wyraźnej pozycji biologicznej.

Początek XX stulecia stanowi koniec pierwszego okresu badań nad kwasami nukleinowymi, uwieńczony zidentyfikowaniem poszczególnych składników tych związków. Przed nauką otworzyło się nowe zadanie — powiązanie poszczególnych składników w strukturę cząsteczki, wyjaśnienie budowy samych kwasów nukleinowych. O ile okres pierwszy, do końca ubiegłego stulecia, jest w dziedzinie kwasów nukleinowych ściśle związany z nazwiskiem Alberta Kossela, to okres następny, pierwsze dwudziestolecie bieżącego stulecia, jest okresem, któremu nadaje piętno Phoebus Aron Levene.

Ten pochodzący z Polski absolwent wojenno-medycznej akademii w Petersburgu, po krótkim okresie pracy z Emilem Fischerem i Albertem Kosselą stworzył ze swego laboratorium w Nowym Jorku na długie lata główny ośrodek badań nad kwasami nukleinowymi. Punktem wyjścia jego dociekań był otrzymany jeszcze w r. 1894 przez Olafa Hammarstena z trzustki bydłowej — kwas gwanilowy. Levene wyjaśnił zasadniczą budowę tego związku, dostrzegł analogię ze znanym od czasu Liebiga, kwasem inozynowym, wyosobnił z produktów rozkładu kwasu nukleinowego inne związki tego typu i sformułował tak dziś dla nas podstawowe pojęcie nukleotydu i nukleozydu. Gdy nauczone się wydzielać nukleotydy z każdego kwasu nukleinowego i gdy rozliczne dane analiz przeprowadzanych w różnych pracowniach zgodnie przemawiały za egzystencją czterech różnych nukleotydów w każdym kwasie nukleinowym, tylko jeden krok dzielił od sformułowania hipotezy, w myśl której każdy kwas nukleinowy jest połączeniem czterech nukleotydów. Hipotezę tę postawił po raz pierwszy już w r. 1906 uczeń Kossela, Steudel, ale przyjęła się ona w całym świecie naukowym głównie dzięki autorytetowi Levene'a i jego współpracowników, szczególnie Jonesa, autorytetowi wspartemu na olbrzymiej ilości najróżnorodniejszych analiz. Około roku 1920 poglądy były już ustalone — kwasy nukleinowe są tetranukleotydami. Dalsze badania miały na celu tylko wyjaśnienie sposobów, w jaki wiążą się ze sobą poszczególne nukleotydy i kolejność, w jakiej są one ze sobą powiązane w cząsteczce kwasów nukleinowych.

Zaznaczyć należy, że wyjaśnienie struktury nukleotydów, jak i sformułowanie hipotezy tetranukleotydowej umożliwione zostało dzięki zastosowaniu nowego typu metod analitycznych, które z początkiem bieżącego stulecia dopiero z wolna zakorzeniły się w badaniach biochemicznych. Tym nowatorskim krokiem było wykorzystanie swoiście działających enzymów. Możliwość posługiwania się sokami trawiennymi lub wyciągami z tkanek, zawierającymi nukleinyazy, nukleotydyazy i nukleozydyazy dostarczyła *Levene'owi* i innym pracownikom w tej dziedzinie sposobu rozkładania cząsteczek kwasów nukleinowych, który swą precyzją przewyższał wielokrotnie brutalne metody hydrolizy przy pomocy kwasów lub zasad. Balastem ciężącym na tych sposobach postępowania była konieczność posługiwania się mieszaninami różnych enzymów, działającymi w sposób bardzo różnorodny. Dopiero, gdy w r. 1939 *Kunitz* uzyskał krystaliczną rybonukleinazę, a w 10 lat później krystaliczną dezoksyrybonukleinazę, oba te czyste enzymy stały się podstawowym orężem badaczy kwasów nukleinowych.

Oczywiście nie mogły ująć uwagi badaczy różnice zachodzące między kwasem nukleinowym drożdżowym i kwasem nukleinowym grasicowym. Stosunkowo szybko zorientowano się, że jedną z łatwo uchwytnych cech odróżniających oba typy tych związków jest obecność tyminy w jednym z nich a uracylu w drugim. Ponieważ już w r. 1902 *Osborne* wydzielił z kiełków pszenicznych kwas nukleinowy, cechujący się własnościami analogicznymi do kwasu drożdżowego, fakt ten doprowadził do pochopnych uogólnień, które znalazły wyraz w twierdzeniu — że oba typy kwasów nukleinowych są charakterystycznymi składnikami dwóch typów świata żywego. Równoległe z nazwami kwas nukleinowy grasicowy czyli tymonukleinowy i kwas nukleinowy drożdżowy czyli zymonukleinowy znajdowały zastosowanie nazwy — kwas nukleinowy zwierzęcy i kwas nukleinowy roślinny. Jakkolwiek niektórzy badacze podnosili zastrzeżenia przeciwko tej klasyfikacji i jakkolwiek rozporządzano zbyt małym materiałem doświadczalnym, aby móc przypisywać przynależność kwasu nukleinowego grasicowego wyłącznie do tkanek zwierzęcych, nazwy te utrzymywały się jeszcze do niedawna, ciężąc niekorzystnie na dyskusjach o charakterze biologicznym, które musiały wciągać kwas nukleinowy w zakres tych rozważań.

Z chwilą, gdy struktura obu typów kwasów nukleinowych zdawała się być w ogólnych zarysach wyjaśniona i gdy hipoteza tetranukleotydowa tłumaczyła najważniejsze wyniki doświadczeń, badania w tym zakresie zacieśniły się do szczegółowych dociekań bardzo cennych, ale nie powodujących zasadniczych zmian w ustalających się poglądach. W dalszym ciągu badania te koncentrowały się w pracowni *Levene'a* w Nowym Jorku, w której badacze różnej narodowości dorzucali ze swej strony ce-

giełki do gmachu naszej wiedzy o kwasach nukleinowych i ich składowych nukleotydach. Nie pozostały na uboczu w tym zakresie badania nauki polskiej, znajdującej reprezentanta tego kierunku w osobie prof. D m o c h o w s k i e g o, z którego nazwiskiem związane są ważne osiągnięcia dotyczące kwasu adenilowego.

Na ogół jednak zainteresowania badaczy zwróciły się w innym kierunku, z chwilą gdy zidentyfikowano w tkankach związku, których struktura odpowiadała schematowi budowy nukleotydów uprzednio wydzielonych z kwasów nukleinowych. Tzw. kwas adenilowy mięśniowy, czyli adenylo-5-jednofosforowy, a szczególnie kwas adenylotryfosforowy odkryty w r. 1928 przez L o h m a n n a, skupiły na sobie uwagę wszystkich biochemików. Wkrótce okazało się, że nukleotydy te odgrywają doniosłą rolę w metabolizmie żywego ustroju. Współdziałanie tych nukleotydów w glikolizie mięśniowej i w fermentacji drożdżowej stało się tematem setek prac doświadczalnych, które ostatecznie doprowadziły do przyznania kwasowi adenylotryfosforowemu przez L i p m a n n a centralnej pozycji w procesach gromadzenia i przetwarzania energii w żywych ustrojach. Dziś możemy patrzeć z dumą na ten okres badań nad nukleotydami, gdyż właśnie nauka polska, prof. Jakub Parnas we Lwowie i najbliżsi jego współpracownicy, Klimek, Paweł Ostern, Tadeusz Baranowski, Tadeusz Korzybski, Wanda Meibaum byli tymi, którzy stworzyli podstawy naszej wiedzy o biologicznej roli nukleotydów adenilowych i opracowali zasadnicze metody badawcze w tej dziedzinie.

Jeszcze inny ośrodek badawczy w Polsce poniósł w okresie międzywojennym wielkie zasługi w dziedzinie, może nie tyle biochemii samych kwasów nukleinowych, co zasad purynowych. Pracownia prof. Przyłęckiego w Warszawie przeprowadziła szeroko zakrojone badania nad rozkładem zasad purynowych w organizmach zwierzęcych, wypełniając swoimi osiągnięciami nowy i ważny rozdział biochemii porównawczej.

W okresie międzywojennym narastał szybko zasób oderwanych faktów doświadczalnych, wzbogacający naszą wiedzę o chemii i biologii kwasów nukleinowych, ale brak było prób szerszych uogólnień, brak nowych podstawowych faktów, które by ten dział chemii fizjologicznej kierowały na nowe tory. Jednym spośród szczególnie cennych osiągnięć była barwna reakcja na kwas nukleinowy grasicowy, opisana w roku 1924 przez F e u l g e n a, która w swej histochemicznej modyfikacji odgrywa do dzisiejszego dnia doniosłą rolę we wszelkich dociekaniach zmierzających do lokalizacji kwasów nukleinowych w komórce. Właśnie zastosowanie tej reakcji Feulgena przez Behrensa oraz przez Kizela i Biełozierskiego podważyło po raz pierwszy słuszność podziału kwasów nukleinowych na grasicowy-zwierzęcy i drożdżowy-roślinny. Analogiczne

wątpliwości nasunęły również badania Jorpesa w pracowni Hammarstena w Sztokholmie, których wynikiem było wyosobnienie z trzustki zwierzęcej kwasu nukleinowego, zawierającego uracyl, a więc składnik uważany do owych czasów za znamionną cechę kwasu nukleinowego roślinnego. Na ogół jednak odkrywcze badania tego typu nie wzbudziły żywszego zainteresowania w świecie naukowym, chemia kwasów nukleinowych zdawała się być skodyfikowaną w tetranukleotydowej hipotezie struktury tych związków, niezbyt płodnej i ograniczającej rozmach koncepcji naukowych.

Ostatnie lata przedwojenne przyniosły jednak w zakresie chemii kwasów nukleinowych pewne nowe odkrycia, które — co prawda — początkowo nie znalazły należytego oddźwięku wśród szerszych rzesz badaczy, ale wreszcie z czasem zrewolucjonizowały nasze poglądy na budowę i rolę biologiczną tych substancji, otwierając czwarty i ostatni okres badań, w których pełni w chwili obecnej znajdujemy się. Ojczyzną tych przełomowych dociekań była Szwecja, pracownia imiennika znakomitego Olafa Hammarstena, Einara Hammarstena. Hammarsten stwierdził, że przy zastosowaniu łagodnych zabiegów zmierzających do wyosobnienia kwasu nukleinowego z grasicy, przy wyeliminowaniu wszelkich drastycznych czynników mogących modyfikować pierwotną strukturę rodzimego kwasu nukleinowego, uzyskuje się preparaty cechujące się odmiennymi własnościami fizycznymi od tych, jakie okazują produkty otrzymane metodami klasycznymi. Roztwory uzyskanego w ten sposób kwasu nukleinowego grasicowego okazują własności roztworów ciał wielkocząsteczkowych. Szczęśliwy zbieg okoliczności, polegający na tym, że jedyny w owym czasie ośrodek, w pełni dysponujący tak cenną dla badań związków wielkocząsteczkowych metodą ultrawirowania, znajdował się zaledwie w odległości 60 km od Sztokholmu, w Upsali, pozwolił na dokładne przebadanie uzyskanych metodą Hammarstena kwasów nukleinowych. Okazało się, że istotnie kwas nukleinowy grasicowy, wyosobniony z zachowaniem wszelkich środków ostrożności, jest związkiem wielkocząsteczkowym cechującym się masą cząsteczkową w rzędzie wielkości setek tysięcy lub nawet milionów, a więc, że nie jest czteronukleotydem, ale że musi być zbudowany z setek lub nawet tysięcy pojedynczych nukleotydów. Do podobnych wyników, jakkolwiek nie zawsze zgodnych ze sobą, doprowadziły badania kwasu nukleinowego drożdżowego. Fakt, że kwasy nukleinowe są polinukleotydami nie od razu został przyjęty z uznaniem przez wszystkich zainteresowanych badaczy. Zwolna jednak gromadziło się coraz więcej dowodów, przemawiających za takim ujęciem budowy cząsteczki kwasów nukleinowych, co z kolei zmuszało do gruntownej rewizji pojęć w zakresie zagadnień biologicznych. O ile hipoteza tetranukleotydowa dopuszczała teoretycznie możliwość egzystencji zaledwie kilkunastu od-

mian kwasu nukleinowego, koncepcja polinukleotydoma zakładała teoretycznie możliwość egzystencji liczby odmian kwasów nukleinowych, wyrażającej się astronomicznymi cyframi. Można było już myśleć o kwasach nukleinowych cechujących się swoistością gatunkową, co więcej, o kwasach nukleinowych właściwych każdej odmiennej tkance jednego i tego samego gatunku. Istotnie, wysubtelnienie metod badawczych, a szczególnie zastosowanie analizy chromatograficznej dostarcza coraz to więcej dowodów przemawiających za słusznością tego rodzaju wniosków. Sprawy tej jednak poruszać już nie będę, gdyż dotyczy ona najbardziej aktualnej terażniejszości badań nad kwasami nukleinowymi, której przecież poświęcone jest całe nasze Sympozjum.

W tej samej pracowni Hammarstena w Sztokholmie — 26-letni jego asystent, Torbjörn Caspersson, przystępując do swej dysertacji doktorskiej opracował w roku 1936 fizykochemiczną ultramikrometodę pozwalającą na dokładne zlokalizowanie w pojedynczych komórkach obu odmian kwasów nukleinowych. Opierając się na dawnych doświadczeniach Marchlewskiego i Wierzuchowskiej, z których wynikało, że zasady purynowe i pirymidynowe swoiście absorbują światło pozafioletkowe o długości fali 263 m μ , Caspersson zastosował metodę mikrografii niebarwionych preparatów histologicznych w jednobarwnym świetle pozafioletkowym o tej właśnie długości fali. Postępując w ten sposób, Caspersson otrzymywał na płycie fotograficznej obraz preparatu histologicznego, w którym wszystkie miejsca komórki zawierające jedną z dwu odmian kwasów nukleinowych zaznaczały się wyraźnie w odpowiedni sposób. Uzupełniając tę mikrograficzną metodę barwieniem metodą Feulgena, mógł Caspersson określić, które miejsca w komórce zajęte są przez kwas nukleinowy grasicowy, a które zaś przez kwas nukleinowy drożdżowy. Ta histochemiczna metoda doprowadziła od razu do zasadniczych, pod pewnym względem rewelacyjnych, wyników. Okazało się, że występowanie kwasu nukleinowego grasicowego ograniczone jest wyłącznie do jądra komórkowego, niezależnie od tego, czy jądro należy do komórki roślinnej, czy zwierzęcej. Okazało się również, że wszystkie komórki, zarówno roślinne jak i zwierzęce zawierają kwas nukleinowy drożdżowy, ale rozmieszczony przede wszystkim w cytoplazmie komórki. Wyniki te, będące uzupełnieniem dawniejszych już badań Behrensa i Biełozierskiego, o których była poprzednio mowa, wykazały w całej pełni brak wszelkiego uzasadnienia dla podziału kwasów nukleinowych na roślinne i zwierzęce, doprowadzając do wniosku, że oba typy kwasu nukleinowego występują w każdej komórce, różna jest tylko ich lokalizacja. Dalszą konsekwencją tych odkryć była nowa nomenklatura kwasów nukleinowych, która powoli i z trudem lecz ostatecznie zwycięsko utrwaliła się w terminologii biochemicznej, biorąc jako

punkt wyjścia komponentę cukrową, odróżniającą obie odmiany kwasów nukleinowych. Mówimy dziś o kwasie rybonukleinowym i dezoksyrybonukleinowym, zamiast jak dawniej, o kwasie nukleinowym drożdżowym czyli roślinnym i grasicowym, czyli zwierzęcym. Zaznaczyć przy tym należy, że niektórzy badacze są na tyle ostrożni, iż nie wykluczają możliwości odkrycia w przyszłości jeszcze innych pentoz, jako składników kwasów nukleinowych, mówią więc przezornie o kwasach pentozonukleinowych i dezoksy-pentozonukleinowych.

Metoda Casperssona doprowadziła do dalszych, jeszcze bardziej ogólnych wniosków. Na podstawie badań nad rozmieszczeniem kwasów nukleinowych i nad ilością tych związków w komórkach wolno i szybko rosnących oraz w komórkach gruczołowych produkujących białkową wydzielinę i komórkach znajdujących się w spoczynku, Caspersson wysnuł tezę, która do dziś dnia zwycięsko utrzymuje się w nauce o kwasach nukleinowych. Doszedł on do wniosku, że istnieje ścisła zależność między syntezą białka w komórce, a ilością kwasu nukleinowego. W myśl tych poglądów kwasy nukleinowe pozostają w najściślejszej łączności z procesem syntezy białka. Obecność ich jest warunkiem dla przebiegu tej syntezy, a więc — co za tym idzie — dla wzrostu i rozmnażania się komórek. Synteza białek stanowiących tworzywo jądra jest uwarunkowana obecnością kwasu dezoksyrybonukleinowego, synteza białek cytoplazmatycznych zależy od obecności kwasu rybonukleinowego. Zaznaczyć należy, że Caspersson posunął się w swych wnioskach może nawet za daleko i że usiłował na podstawie swej metody snuć hipotezy o mechanizmie biologicznej syntezy białek. Wnioski te nie utrzymały się, jak również pierwotny zachwyt nad jego trudną i zawiłą metodą osłabł znacznie. Wiemy dziś, że zasięg tej metody posiada granice, które skutecznie mogą przekroczyć wysubtelnione metody analityczne oparte na czysto chemicznych przesłankach. Pracownia Casperssona, stworzony specjalnie dla niego zakład biofizyki Instytutu Noblowskiego w Sztokholmie, przestała być wyrocznią w zakresie biochemii i biologii kwasów nukleinowych. Niemniej etap obecny rozwoju badań nad kwasami nukleinowymi musi traktować Casperssona jako jednego ze swych pionierów. Zaznaczyć również należy, że wnioski Casperssona w ogólnych zarysach zostały całkowicie poparte przez badania Bracheta w Brukseli i Davidsona w Londynie, którzy dociekania nad lokalizacją obu typów kwasów nukleinowych w komórce przeprowadzili przy zastosowaniu prostszych metod enzymologicznych, czy też metod opartych na klasycznej technice mikrochemii.

Ścisła łączność między kwasami nukleinowymi a tak elementarnym zjawiskiem jak synteza białka i wzrost oraz podział komórki uwydatniła się jeszcze bardziej w miarę postępu badań nad wirusami. Dziś wiemy, że

w skład wszystkich wirusów, nawet najprostszych wirusów roślinnych, wchodzi oprócz białka jeszcze kwas nukleinowy. Bez względu na to jak będziemy się zapatrywać na istotę wirusów i na ich pozycję w linii ewolucyjnej żywej materii, nukleoproteidowy charakter tych tworów uwydatnia w całej pełni zasadniczą rolę biologiczną związków będących przedmiotem naszego Sympozjum.

Ziarno rzucone przez Fryderyka Mieschera kiełkowało długo, ale dziś daje plony przebogate. Przewidywania jakie wiązał ten młody badacz z odkrytymi przez siebie ciałami spełniają się całkowicie. Kwasy nukleinowe stają się obiektem zainteresowań wszystkich gałęzi nauk o przyrodzie żywej i poddawane są badaniu z najróżnorodniejszego punktu widzenia. Fakt ten w pewnej mierze nastrajający optymistycznie, kryje w sobie również poważne niebezpieczeństwo. Problem biologii i biochemii kwasów nukleinowych jest szczególnie trudnym i zawiłym i atakowanie tego problemu wymaga bardzo gruntownego metodycznego i teoretycznego przygotowania. Niestety, narastająca powódź publikacji w tej dziedzinie, z których znaczna część okazuje się zupełnie bezwartościowa, budzi poważny niepokój. Nasuwają się na myśl słowa wypowiedziane przed 60-ciu laty przez naszego wielkiego Marcelego Nenckiego w związku z ówczesnymi badaniami nad barwnikiem krwi: „Zagadnienia, przed którymi cofa się gruntownie przygotowany i doświadczony chemik, są z naiwną ufnością atakowane przez gromady adeptów medycyny, którym brak najelementarniejszych, niezbędnych do tego rodzaju badań podstaw“. Dlatego jestem przekonany, że dwudniowe nasze Sympozjum, przedstawiając choćby tylko częściowo zawiłość problematyki kwasów nukleinowych, wprowadzi pewien porządek w zakresie panujących jeszcze dosyć powszechnie chaotycznych pojęć i nada badaniom w tej dziedzinie u nas określony kierunek zgodny z naszymi możliwościami.

BRONISŁAW FILIPOWICZ

Budowa kwasów nukleinowych

W latach siedemdziesiątych zeszłego stulecia, w pracowni Hoppe-Seylera w Tybindze pracował młody biochemik — Fryderyk Miescher, interesujący się zagadnieniem budowy i składu chemicznego jądra komórkowego. W tym celu Miescher trawił pepsyną ropę z bandaży chirurgicznych, aby usunąć materiał cytoplazmatyczny. Z niestrawionej pozostałości wyodrębnił Miescher substancję, którą, dla podkreślenia jej jądrowego pochodzenia nazwał nukleina. (206)

Nukleina okazała się substancją złożoną, zbudowaną z zasadowego białka o niewielkiej masie cząsteczkowej oraz z drugiego, niebiałkowego składnika, posiadającego właściwości wielozasadowego kwasu o znacznej zawartości fosforu.

W owym czasie jedynym znanym organicznym składnikiem tkanki, zawierającym fosfor, była lecytyna. Wyizolowanie drugiego, bogatego w fosfor, składnika wywołało zrozumiałe zainteresowanie. Szczególnie pracą Mieschera zainteresował się Hoppe-Seyler i polecił swoim współpracownikom sprawdzić spostrzeżenia Mieschera na innym materiale.

W latach 1869—71 wyizolowano nukleinę z komórek zwierzęcych, z kazeiny, z żółtka jaja, z komórek drożdżowych (220, 196, 119, 207).

Białkowy składnik nukleiny został nazwany przez Mieschera (208) protamina. Badaniem tego składnika zajęto się później w pracowniach Kossela i Fischera.

Drugi, niebiałkowy składnik został wyizolowany w czystej postaci dopiero w dwadzieścia lat później przez Altmanna (4) i nazwany przez niego kwasem nukleinowym. Altmann swój czysty pozbawiony białka, kwas nukleinowy wyizolował z grasicy, z żółtka jaja, z plemników łososia i z drożdży. Nie stwierdził on żadnych różnic w tych, otrzymanych z różnego materiału, kwasach nukleinowych.

Okazało się później, że kwasy nukleinowe tkanki zwierzęcej, a szczególnie związki wyizolowane z grasicy, różnią się w swoich właściwościach

od kwasów nukleinowych wyizolowanych z drożdży. Stąd geneza pierwszego podziału kwasów nukleinowych na:

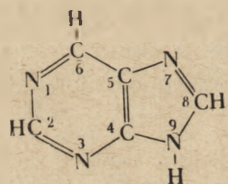
I — zwierzęce lub tymonukleinowe (grasicowe),

II — roślinne lub drożdżowe,

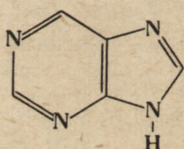
gdyż materiał wyizolowany z tkanek roślinnych posiadał właściwości kwasu nukleinowego drożdżowego.

Puryny

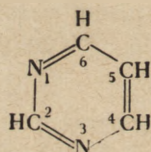
Badania składu chemicznego kwasów nukleinowych i pierwsze prace na ten temat związane są z nazwiskami Mieschera, Kossela, Hammarstena, Levene'a. Jeszcze w zeszłym stuleciu Hammarsten (107) podaje, że rozpad nukleiny daje między innymi tzw. „ciała ksantynowe“. Związki te przebadał później i opisał Emil Fischer (87, 93, 95) i ujął wspólną nazwą „ciała purynowe“, (Purinkörper od purum i uricum), gdyż w każdym z tych związków występuje dwupierścieniowy układ purynowy o następującej strukturze (rys. 1):



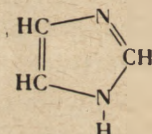
Rys. 1.



Rys. 2. Puryna.



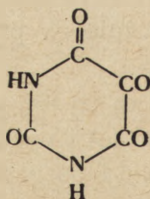
Rys. 3. Pirymidyna.



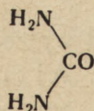
Rys. 4. Imidazol.

Często, dla większej przejrzystości wzoru, nie wpisuje się do pierścienia purynowego węgla i związanych z nimi wodorów (rys. 2).

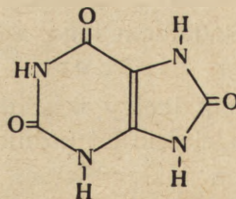
Puryna jest jakby produktem kondensacji pierścienia pirymidynowego (rys. 3) i imidazolowego (rys. 4).



Rys. 5.
Alloksan.



Rys. 6.
Mocznik.



Rys. 7. Kwas moczowy.

W całkowicie utlenionym pierścieniu purynowym można również dostrzec się pierścienia alloksanowego (rys. 5) oraz mocznika (rys. 6).

Dlatego też K o s s e l i K r ü g e r (145) zaproponowali dla omawianych związków nazwę: „zasady alloksurowe“ (Alloxurbasen), lecz nazwa ta nie zyskała prawa obywatelstwa.

Pewne związki o budowie purynowej były już znane od dawna. S c h e e l e w roku 1774 znajduje w moczu kwas moczowy, który, jak się później okazało, jest 2,6,8-trójoksypuryną (rys. 7). Związek ten został znacznie później otrzymany syntetycznie z mocznika i glikokolu (120), a także z kwasu izodialurowego i mocznika (19).

Hipoksantyna (6-hydroksypuryna) już w roku 1850 znaleziona została przez S c h e r e r a (223) w mięśniu sercowym. Znaleziono ją również w niewielkich ilościach w moczu (222). Syntezy tego związku dokonał po raz pierwszy F i s c h e r (88) z trójchloropuryny, przeprowadzając ten związek w środowisku alkalicznym w 6-oksy-2,8-dwuchloropurynę, a następnie, po podziałaniu jodowodorem, na hipoksantynę.

Ksantyna (2,6-dwuhydroksypuryna) również znajduje się w niewielkich ilościach w moczu, skąd wyizolowano ją po raz pierwszy w postaci czystego związku (149). Znacznie wcześniej znaleziono ją w kamieniach moczowych (198). Syntetycznie została otrzymana ksantyna przez F i s c h e r a (89, 92) z trójchloropuryny, po zastosowaniu podobnych zabiegów, jak przy otrzymywaniu hipoksantyny.

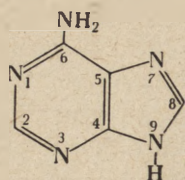
Guaninę (2-amino-6-hydroksypurynę) znaleziono w roku 1844 w guano (255). Znaleziono ją również w mięśniach i stawach chorych świń (256). W roku 1897 F i s c h e r przeprowadza syntezę tego związku (90). H o r b a c z e w s k i był pierwszym, któremu udało się otrzymać ksantynę i guaninę w postaci krystalicznej (121).

Adeninę (6-aminopurynę) po raz pierwszy izoluje K o s s e l z trzustki (140), a jednocześnie znajduje ją także w hydrolizacie nukleiny drożdżowej (141). Występuje ona również w niewielkich ilościach w moczu (150). Synteza tego związku została przeprowadzona przez F i s c h e r a (91), a produktem wyjściowym była trójchloropuryna, którą ogrzewał z amoniakiem i przeprowadził w 6-amino-2,8-dwuchloropurynę. Związek ten, po podziałaniu jodowodorem, przeszedł w adeninę. W tymże czasie udaje się K r ü g e r o w i (147) przeprowadzić adeninę w hipoksantynę przez podziałanie azotanem sodowym na roztwór adeniny w rozcieńczonym H_2SO_4 . Próbuje on także ustalić wzór obu tych zasad (148). Nad enzymatycznymi procesami przejścia adeniny i guaniny w kwas moczowy pracuje w następnych latach S c h i t t e n h e l m (225, 240).

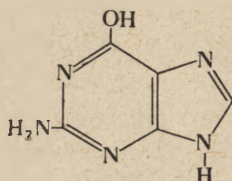
Z innych pochodnych purynowych, znalezionych w przyrodzie, należy wspomnieć, że skarmiając zwierzęta znaczną ilością adeniny, stwierdzono odkładanie się w nerkach krystalicznego osadu 2,8-dwuhydroksyadeniny. Podobny efekt uzyskuje się, podając bądź 2-hydroksyadeninę (izoguaninę), bądź 8-hydroksyadeninę (21). Donoszono również o wy-

izolowaniu izoguaniny z materiału roślinnego (56, 57) i zwierzęcego (44), lecz późniejsze badania nie potwierdziły tych odkryć.

Ostatnio w grzybie *Agaricus nebularis* znaleziono (36) związek nazwany nebularyną (nebularine). Analiza wykazała (195), że związek ten złożony jest z puryny i rybozy. Porównano ten związek z syntetycznie



Rys. 8. Adenina.



Rys. 9. Guanina.

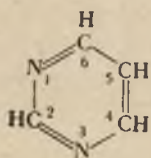
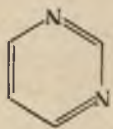
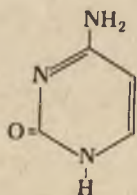
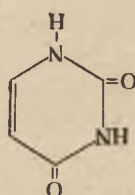
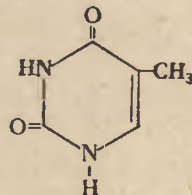
otrzymaną 9- β -D-rybofuranozylpuryną i okazało się, że są to identyczne związki (43). Jest to jedyny przypadek znalezienia w przyrodzie pierścienia purynowego bez podstawników.

Z omawianych wyżej zasad purynowych w kwasach nukleinowych znaleziono tylko adeninę

(rys. 8) i guaninę (rys. 9). Hipoksantyna, ksantyna, kwas moczowy są to produkty przemian tych dwóch zasad. W roku bieżącym doniesiono również o wyizolowaniu z *B. coli* KDN, który w swoim składzie zawiera 6-metyloaminopurynę (75).

Pirymidyny

W hydrolizatach kwasów nukleinowych już w zeszłym stuleciu znaleziono trzy pochodne pirymidyny (rys. 10 i 11): cytozynę (rys. 12), uracyl (rys. 13) i tyminę (rys. 14).

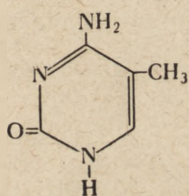
Rys. 10.
PirymidynaRys. 11.
Pirymidyna.Rys. 12.
Cytozyna.Rys. 13.
Uracyl.Rys. 14.
Tymina

Cytozyna (6-amino-2-oksypirymidyna) została po raz pierwszy otrzymana w roku 1894 z hydrolizatu kwasu tymonukleinowego (143), a w kilka lat później ustalono budowę tego związku (146). W tymże czasie wykonano również syntezę cytozyny (266).

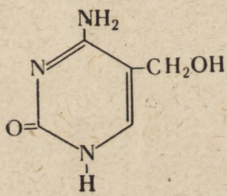
Uracyl (2,6-dwuoksypirymidyna) otrzymany został po raz pierwszy w roku 1900 (8) z kwasu nukleinowego drożdżowego. Wkrótce potem przeprowadzono jego syntezę przez kondensację kwasu akrylowego z mocznikiem (94).

Tyminę (5-metylouracyl) otrzymali Kossel i Neumann (142, 144) z kwasu tymonukleinowego grasicy i śledziony. Syntezę wykonano w pracowni Fischera z mocznika i kwasu metakrylowego przez ogrzewanie roztworu tych związków w temp. 210—220°. Powstały 5-metylohydroksyuracyl, podgrzany do 100° w lodowatym kwasie octowym, w obecności bromu przechodzi w tyminę. Należy wspomnieć, że związek ten występuje wyłącznie w kwasie tymonukleinowym, uracyl — w kwasie nukleinowym typu drożdżowego, gdy obecność cytozyny stwierdzono w obu rodzajach kwasów.

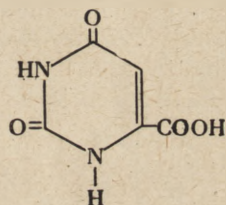
W ostatnich latach stwierdzono występowanie w świecie organicznym jeszcze dwu pochodnych pirymidynowych. Pierwsza z nich to 5-metylocytozyna (rys. 15), sygnalizowana przez Hotchkissa (122), a znaleziona w roku 1950 przez Wyatta (169, 270, 271) i następnie przez Cohena (60) w różnym materiale zwierzęcym i roślinnym (grasica cielęca, śledziona wołowa, szpik kostny szczurów, plemniki baranie, plemniki ryb,



Rys. 15. 5-metylocytozyna.



Rys. 16. 5-hydroksymetylocytozyna.



Rys. 17. Kwas orotowy.

kiełki pszenicy, szarańcza). Nie udało się natomiast potwierdzić doniesienia Johnsona i Coghilla (123), że związek ten występuje w kwasie nukleinowym wyizolowanym z *Mycobacterium tuberculosis*. Druga — to 5-hydroksymetylocytozyna (rys. 16), wyizolowana w dwa lata później z kwasu nukleinowego bakteriofaga (272).

Dotychczas żadnej z omówionych pochodnych pirymidynowych w przyrodzie w stanie wolnym nie znaleziono.

Na zakończenie rozdziału o pirymidynach należy wspomnieć o kwasie orotowym (rys. 17), który jest dobrym prekursorem zasad pirymidynowych. Po wprowadzeniu znaczonego ^{15}N kwasu orotowego do ustrojów zwierzęcych, izotop azotu znaleziony został przez wielu autorów (7, 23, 264, 265) w pierścieniu pirymidynowym i to zarówno w uracylu jak i w cytozynie. Zaledwie ślady ^{15}N znaleziono w pierścieniu purynowym.

Związek ten znany już był w roku 1904 (26) jako składnik mleka. Został nazwany kwasem orotowym od greckiej nazwy *oros* — serwatka. Budowa tego związku została ustalona dopiero w roku 1930 (11). Jest to kwas 2,6-dwuhydroksy-4-pirymidynokarboksylowy.

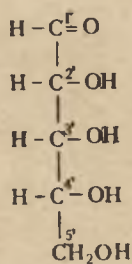
Cukry

W hydrolizatach KN, obok wspomnianych wyżej zasad purynowych i pirymidynowych, znaleziono również cukry i kwas ortofosforowy.

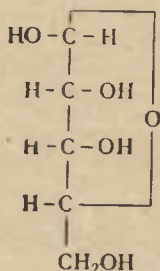
Olaf Hammersten badając osazony tych węglowodanów, doszedł do wniosku, że są to pentozy. Kolejno mylnie identyfikowano te pentozy jako; *d*-ksylozę (210, 211, 212), *d,l*-arabinozę (18), *d*-liksozę (113, 114).

Przypuszczenie że cukier występujący w KN typu drożdżowego, jest to *D*-ryboza, wysunęli po raz pierwszy w roku 1919 L e v e n e i jego współpracownicy (162, 163), po wyizolowaniu tej pentozy, przeprowadzeniu jej w postać krystaliczną i po przebadaniu właściwości otrzymanego związku (punkty topnienia badanej pentozy oraz jej fenylo- i *p*-bromofenyloosazonu, benzylofenylohydrazonu, kąt skręcania płaszczyzny polaryzacji). Występowanie *D*-rybozy w KN typu drożdżowego zostało później potwierdzone przez wielu innych badaczy (77, 47, 48, 49, 131, 240, 193, 226).

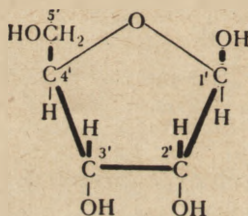
Niżej podane są wzory *D*-rybozy, odmiany okso- (rys. 18) i odmiany cyklicznej furanozowej wg Tollensa (rys. 19) i Hawortha (rys. 20).



Rys. 18.
D(-)-Ryboza.



Rys. 19. β -*D*-
-Rybofuranaza.



Rys. 20. β -*D*-Rybofura-
noza.

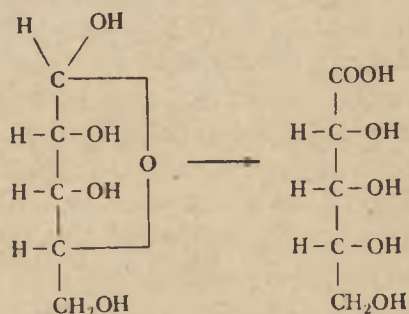
W kwasie nukleinowym grasicowym stwierdzono występowanie innego cukru niż w kwasie drożdżowym. Początkowo przypuszczano, że jest to heksoza, gdyż w kwaśnych hydrolizatach KN grasicowego znajdowano kwas lewulinowy ($\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), który powstaje również po zagotowaniu heksoz z kwasem solnym.

Pierwszy Feulgen zwrócił uwagę na odmienne właściwości tego cukru (84, 85). Dopiero jednak w latach 1929—30 współpracownicy L e v e n e ' a (173, 175, 176) udowodnili, że cukier, występujący w KN typu grasicowego, jest to 2-dezoksy-*D*-ryboza (ryboza pozbawiona tlenu przy węglu 2). W parę lat później K l e i n (136) wyizolował większą ilość tego cukru i dokładnie przebadał jego właściwości fizyczne i chemiczne. Te wykrycia spowodowały, że kwasy nukleinowe typu drożdżowego zaczęto nazywać

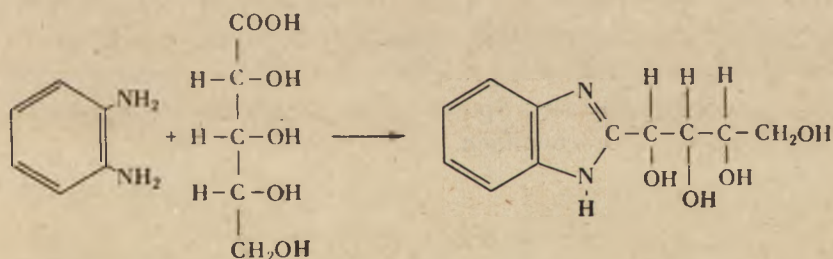
„kwasami rybonukleinowymi“ (KRN), a kwasy grasicowe — „dezoksyrybonukleinowymi“ (KDN).

Trzeba jednak nadmienić, że większość prób, mających na celu stwierdzenie identyczności omawianych cukrów w KN, opierano przede wszystkim na ich reakcjach barwnych. Okazało się, że reakcje te nie są specyficzne. Tak np. barwną reakcją z orycyną dają obok rybozy także inne pentozy. Podobnie barwny związek z dwufenyloaminą dają wszystkie 2-dezoksy-pentozy (218, 219) i, jak ostatnio stwierdzono, także 3-dezoksy-pentozy (1). Zaproponowano przeto (258), aby nazwy omawianych kwasów zastąpić terminami: „kwas pentozo- i dezoksy-pentozonukleinowy” i ten projekt zyskał dość dużo zwolenników.

W pracowni Gullanda (15, 16) udało się jednak stwierdzić, że cukier występujący w KRN drożdżowym to D(—)-ryboza. Cukier ten po wyizolowaniu przeprowadzono w odpowiedni kwas aldonowy (rys. 21), a ten, po skondensowaniu z o-fenylenodwuaminą, dał odpowiedni benzimidazol, który zidentyfikowano jako D-rybobenzimidazol (rys. 22).



Rys. 21. D-Ryboza. Kw. D-rybonowy.



Rys. 22. o-Fenylenodwuamina. D-Rybobenzimidazol.

W następnych latach w pracowni Chargaffa (259, 260) przebadano chromatograficznie cukry KRN: trzustki, wątroby, pałeczki gruźlicy, wirusa choroby mozaikowej, wirusa żółtej rzepy i stwierdzono, że cukry te są identyczne z rybozą, znalezioną w KRN drożdżowym. W tymże czasie Davidson i Wymouth znaleźli D-rybozę z KRN, wyizolowanym z wątroby (67), a Schwerdt i Loring (233) stwierdzili, że kwasy: guanilowy, urydylowy i cytydylowy, wyizolowane z wirusa choroby mozaikowej tytoniu, posiadają identyczną budowę z podobnymi kwa-

sami drożdżowymi. W roku 1953 wyizolowano cukry z KRN jedenastu szczepów wirusa mozaiki tytoniowej i przeprowadzono te cukry w kryształiczne dwu-*n*-propylomerkaptalopentozy. Po porównaniu otrzymanych związków z dwu-*n*-propylomerkaptalami syntetycznej rybozy, stwierdzono ich identyczność (202). Podobnie metodą chromatograficzną udowodniono obecność dezoksyrybozy w KDN grasicy i wątroby ludzkiej i wołowej, grasicy świńskiej i owczej, w KDN plemników łososia, prątków gruzliczych i innych (52). Nie udało się natomiast stwierdzić występowania innych cukrów w KN. Dotychczasowe wzmianki nie znalazły potwierdzenia. Tak np. w roku 1943 podano, że w KDN drożdżowym występuje L-liksoza (103). W innych pracowniach nie znaleziono tego cukru. W roku 1954 Sinheimer (237) w hydrolizacie KDN bakteriofaga T₂r, w jednym z nukleotydów, stwierdził obecność heksozy (obok dezoksyrybozy). Okazało się, że cukier ten związany jest glikozydowo z grupą hydroksylową 5-hydroksymetylocytozyny, a tego rodzaju wiązania nie występują w kwasach nukleinowych.

Z powyższego wynika, że nazwy: „kwasy rybonukleinowe i dezoksyrybonukleinowe“, mimo zastrzeżeń niektórych autorów, słusznie zyskują sobie prawo obywatelstwa w nomenklaturze biochemicznej.

Możliwe, że istnieją jeszcze inne odmiany kwasów nukleinowych. Tak np. Kizel i Szamszikowa (1938) (134) — z dojrzewających torebek nasiennych maku, a Biełozierskij (1941) (25) — ze *Spirillum volutans* wyodrębnili dwa kwasy nukleinowe zawierające wszystkie zasady, jakie spotykamy w KDN. Zdaniem tych autorów, w jednym z tych kwasów jedynym cukrem jest pentoza, a w drugim znaleźli zarówno pentozę jak i dezoksy-pentozę. Spostrzeżenia te nie zostały dotychczas potwierdzone w innych pracowniach.

Nukleozydy

Cukier powiązany glikozydowo z zasadą purynową lub pirymidynową tworzy tzw. nukleozyd. W nazwie tej podkreślono obecność w tych związkach zasady nukleinowej i wiązania glikozydowego. Nazwy nukleozydów tworzy się od nazw odpowiednich zasad:

uracyl-ryboza	— urydyna
cytozyna-ryboza	— cytydyna
adenina-ryboza	— adenozyrna
guanina-ryboza	— guanozyrna
hipoksanryna-ryboza	— inozyrna

Do nazw odpowiednich połączeń z dezoksyrybozą dodaje się przedrostek dezoksy — dezoksytydyna, dezoksyadenozyna itd. Tymina powiązana z dezoksyrybozą nosi nazwę tymidyny.

Związki tego typu poznano w końcu zeszłego stulecia, po wyizolowaniu z ekstraktów roślinnych rybozydu guaniny (229, 231), a następnie rybozydu hipoksantyny (inozyna) z ekstraktu zwierzęcego (112, 115). W roku 1919 *Levene* i *Jacobs* stwierdzili występowanie tego typu związków w hydrolizatach KN (163).

Pozostało do stwierdzenia w jakiej odmianie cyklicznej występują te cukry i ustalenie miejsca przyłączenia cukrów do zasad. Rozwiązywanie tych zagadnień trwało dwadzieścia kilka lat.

Dla cukrów stale sugerowano budowę furanową ($<1,4>$), ponieważ od dawna znany był nukleotyd — kwas inozynowy (połączenie hipoksantyny z rybozą i kwasem fosforowym), w którym C_5 rybozy blokowany był kwasem fosforowym. Dopiero w latach 1932 — 35 zarówno w pracowni *Levene*'a (181, 182, 185, 186, 188) jak i *Brederecka* (29, 30, 28) ustalono, przeważnie metodą metylowania, że naturalne nukleotydy zarówno purynowe jak i pirymidynowe, posiadają budowę furanową. Uzyskane wyniki zostały później potwierdzone przez *Todda* metodą nadjordanową (253).

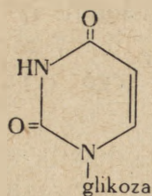
Glikozydowy charakter wiązania cukru z zasadą stwierdzono najpierw dla nukleozydów purynowych. Związki te, po podziałaniu słabym kwasem mineralnym, łatwo hydrolizują na zasadę i cukier oraz dają barwną reakcję z orcyną, co pozwala na stwierdzenie obecności w tych związkach pentozy. Nukleozydy pirymidynowe są bardziej odporne na hydrolityczne działanie kwasów i nie dają lub dają tylko bardzo słabą reakcję barwną z orcyną.

Nukleozydy pirymidynowe

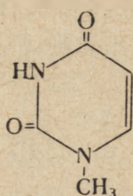
Miejsce przyłączenia cukru do zasady ustalono najpierw dla nukleozydów pirymidynowych. Występowanie obu tych związków w nukleozydach stwierdzono po podziałaniu kwasem bromowodorowym na urydynę. Powstał bromouracyl i kwas rybonowy (170) w ekwimolarnych stosunkach.

Dyskutując możliwości przyłączenia rybozy do pierścienia pirymidynowego, należy pamiętać, że z sześciu atomów pierścienia pozycje 2 i 6 są zablokowane tlenami lub grupą aminową zarówno w uracylu jak i w cytozynie i w tyminie. W tyminie zablokowana jest również pozycja 5 (patrz rys. 12, 13, 14). Znane są również pochodne urydyny, w których zablokowano pozycje 4 i 5 (179) (grupą nitrową, bromem, fenylołohydrazyną).

Z właściwości nukleozydów wynika również, że cukier związany jest z azotem a nie z węglem. Dowodem są syntetyczne związki otrzymane przez Hilberta i Johnsona, takie jak glikozydouracyl (117) lub metylouracyl (118), które, jak stwierdzono, posiadają następującą budowę (rys. 23 i 24):



Rys. 23.
3-Gliko-
zydouracyl.



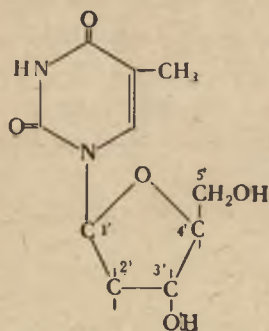
Rys. 24.
3-Metylo-
uracyl.

Z tego wynika, że jedynym miejscem, w którym cukier może wiązać się z pierścieniem pirymidynowym, jest N_3 (157), tym bardziej, że N_1 cytozyny nie posiada wodoru, który mógłby być podstawiony cukrem.

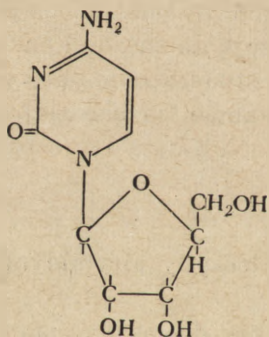
Te wywody zostały następnie potwierdzone przez Leven'e'a i Tipsona

(186) eksperymentem. Autorzy ci po zmetylowaniu urydyny i hydrolizie powstałego związku, znaleźli w hydrolizacie cukier i N_1 -metylouracyl. Z powyższego wynika że cukier w urydynie związany był z N_3 pierścienia pirymidynowego (rys. 25):

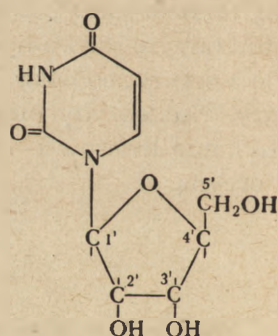
Przy użyciu podobnej metody stwierdzono również, że w tymidynie dezoksyryboza wiąże się z N_3 tyminy (31).



Rys. 25. Urydyna (3- β -D-
rybofuranozydouracyl).



Rys. 26. Cytydyna (3- β -
D-rybofuranozydocyto-
zyna).



Rys. 27. Tymidyna (3- β -
D-dezoksyrybofuran-
zydotymina).

Po raz pierwszy znaleziono cytydynę (169) i urydynę (168) w latach 1911/12 w hydrolizatach kwasu nukleinowego drożdżowego. Tymidynę i dezoksytydynę otrzymano znacznie później po przeprowadzeniu enzymatycznej hydrolizy kwasu tymonukleinowego (252, 136, 24, 173, 174, 177,

Żadnego z omawianych nukleotydów pirymidynowych w postaci wolnej w przyrodzie nie znaleziono.

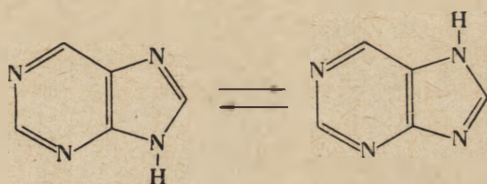
Nukleozydy purynowe

Na większe trudności natrafiono przy ustaleniu miejsca wiązania cukru z pierścieniem purynowym.

Należy przypuszczać, że wszystkie nukleozydy purynowe mają podobną budowę, gdyż podobne jest również ich zachowanie pod wpływem czynników chemicznych i enzymatycznych.

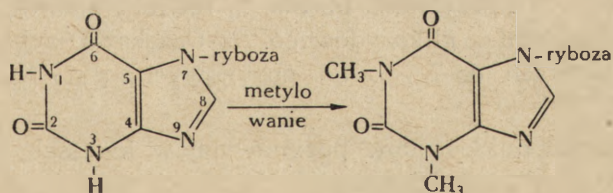
Rozważając możliwości przyłączenia cukru do pierścienia purynowego, należy wykluczyć C₂ i C₆, gdyż w guaninie i adeninie węgle te są zablokowane grupami aminowymi (patrz rys. 8, 9). Należy również wykluczyć N₁ i N₃ oraz C₄ i C₅, gdyż w adeninie azoty te i węgle są całkowicie wysycone. Jako miejsce przyłączenia pozostaje pierścień imidazolowy, a w nim niezablokowany C₈ oraz N₇ lub N₉. Przyłączenie cukru do C₈ jest mało prawdopodobne, gdyż powstałby łańcuch węglowy, który byłby znacznie trwalszy niż wiązanie glikozydowe, jakie stwierdzono w omawianych nukleozydach.

Pozostaje przeto do rozważenia możliwość przyłączenia cukru do N₇ lub N₉. Rozstrzygnięcie byłoby trudne, gdyż puryny prawdopodobnie mogą występować w dwu odmianach tautomerycznych (rys. 28):



Rys. 28. Tautomeryczne odmiany puryny.

Levene (156) przyjął, że cukier związany jest w nukleozydach z N₇, opierając się na eksperymentach przeprowadzonych z ksantozyną. Levene zmetylował ksantozynę i otrzymał rybozyd teofiliny (rybozyd 1,3-dwumetyloksantyny) (rys. 29):

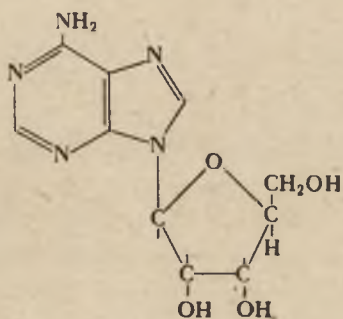


Rys. 29. Ksantozyna. Rybozyd teofiliny.

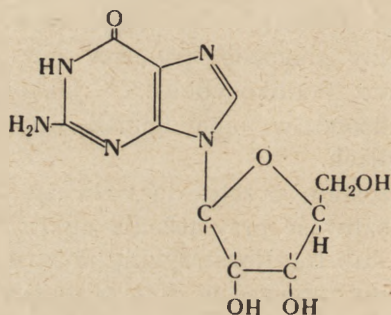
Autor ten dowodził, że gdyby w ksantozynie nie był zablokowany N₇, wówczas po procesie metylowania zamiast rybozydu teofiliny powstałaby pochodna kofeiny, która jak wiadomo, ma trzy grupy metylowe przy azotach 1, 3 i 7. Ten pogląd Levene'a przetrwał przez wiele lat, mimo że autor podkreślał, iż dowody jego nie są dostateczne dla ostatecznego stwierdzenia budowy nukleozydów.

Zagadnienie to rozwiązali wreszcie Gulland i Holiday (100), którzy porównywali widma wodnych roztworów ksantozyny i guanozyny z widmami monometylopo pochodnych ksantyny i guaniny i doszli do wniosku, że w wymienionych nukleozydach pentoza związana jest z N₉. Stwierdzono bowiem duże podobieństwo widm nukleozydów do widm odpowiednich zasad purynowych zmetylowanych w pozycji 9. Podobne wnioski wyciągnięto również po porównaniu widm adenozyzny i 9-metyloadenyiny (101, 102).

Uzyskane wnioski zostały ostatecznie potwierdzone syntezami, wykonanymi w pracowni Todd'a. Stwierdzono, że naturalna adenozyzna (rys. 30) posiada identyczną budowę z syntetyczną 9-β-D-rybofuranozydoadeniną (132), a naturalna guanozyzna (rys. 31) posiada wszystkie właściwości syntetycznej 9-β-D-rybofuranozydoganiny (72).



Rys. 30. Adenozyzna (9-β-D-rybofuranozydoadenina).



Rys. 31. Guanozyzna (9-β-D-rybofuranozydoganina).

Synteza nukleozydów dezoksyrybozowych nie została jeszcze całkowicie wykonana, lecz przypisują im (33, 1) również budowę furanową i β konfigurację wiązania glikozydowego. 2-Dezoksy-D-ryboza przyłącza się w tych związkach do N₉ zasad purynowych, a do N₃ pirymidynowych (1).

Z omawianych nukleozydów purynowych w kwasach nukleinowych znaleziono adenozyne i guanozyne.

Adenozyzna została po raz pierwszy otrzymana przez Levene'a i Jacobsa (163, 165) w roku 1909, po zhydrolizowaniu KN drożdżowego. W niewielkich ilościach znaleziono ją również w wyciągu z mięśnia sercowego oraz w moczu. W obecności kwasu azotowego adenozyzna ulega dezaminacji (166) i przechodzi w inozynę (9-rybofuranozydohipoksantyna), znany składnik kwasu inozynowego, występującego w mięśniach. Syntezę adenozyzny wykonano w roku 1948 w pracowni Todd'a (71).

Guanozyne znaleziono znacznie wcześniej (r. 1885) w wyciągu wod-

nym czerwonej koniczyny (230). Okazało się później, że wchodzi ona również w skład hydrolizatów kwasów nukleinowych (163). Dezaminacja guanozyny prowadzi do powstawania ksantozyny (9-D-rybofuranozydokszantyna) (164, 171). Syntezę guanozyny przeprowadzono w latach 1946/48 (69, 70).

Należy dodać, że w wątrobie znaleziono również rybozyd kwasu moczowego (82), o istnieniu którego wspomniano już znacznie wcześniej (68, 213). Możliwe, że związek ten, podobnie jak i rybozyd ksantyny i hipokszantyny są produktami przemian adenozyiny i guanozyiny, lecz brak na to dostatecznych dowodów.

Dezoksyadenozyina i dezoksyguanozyina zostały otrzymane z enzymatycznych hydrolizatów KDN. Najlepsze wyniki otrzymano w pracowni Thannhausera (24, 252, 135, 139, 136). Otrzymano również dezoksyinozynę (27), która jest prawdopodobnie produktem dezaminacji dezoksyadenozyiny.

Nukleotydy

Nukleozydy zestryfikowane kwasem fosforowym tworzą nukleotydy. Pierwszy nukleotyd, nazwany kwasem inozynowym, został wyizolowany z tkanki mięśniowej przed przeszło stu laty przez Liebiga (190). W czterdzieści lat później Haiser (111) znajduje w kwasie inozynowym hipokszantynę, a znacznie później w pracowni Levene'a stwierdzają w związku z tym obecność D-Rybozy (161, 167).

Już w tym czasie, przy badaniu właściwości kwasu inozynowego, stwierdzono, że kwas fosforowy jest związany bezpośrednio z pentozą, a pentoza — z zasadą purynową. Zaobserwowano bowiem, że po przeprowadzeniu kwaśnej hydrolizy zostaje przerwane wiązanie glikozydowe i otrzymuje się zasadę i ester fosforowy pentozy, gdy w środowisku alkalicznym nukleotyd zostaje rozszczepiony na kwas fosforowy i nukleozyd (179).

Hydroliza alkaliczna

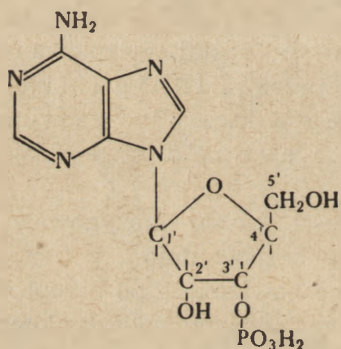
Kwas fosforowy — pentoza — zasada

Hydroliza kwaśna

Stwierdzenie faktu, że w nukleotydach kwas fosforowy związany jest z cukrem oraz znajomość budowy nukleozydów pozwala na ustalenie a priori miejsca wiązania kwasu z nukleozydem. Kwas fosforowy może przyłączyć się tylko do tych węgli cukru, które posiadają wolną grupę hydroksylową. W nukleozydach rybozowych wolne grupy hydroksylowe występują przy C₂, C₃ i C₅; w nukleotydach dezoksyrybozowych — przy C₃ i C₅ (patrz rys. 26 i 27).

Nukleotydy mogą przeto występować w kilku odmianach izomerycznych i w przyrodzie znaleziono te odmiany. Na pierwsze izomery natrafiono przy badaniu kwasów adenilowych, wyizolowanych z drożdży i z mięśni. Kwas adenilowy drożdżowy został wyizolowany z drożdży i otrzymany w postaci krystalicznej równocześnie przez Jonesa i współpracowników (124, 125, 126, 128) oraz przez Thannhausera i współpracowników (250, 251). W następnych latach w pracowni Embdena oraz w pracowni Parnasa wyizolowano z mięśni związek o podobnym składzie (79, 80, 216). Okazało się, że związki te różnią się rozpuszczalnością, punktem topnienia, własnościami optycznymi. Okazało się również, że kwas adenilowy mięśniowy pod wpływem enzymu, wyizolowanego z mięśni przez Schmidta (227), ulega dezaminacji i przechodzi w znany już kwas inozynowy, gdy kwas adenilowy drożdżowy nie poddaje się działaniu tego enzymu (81).

Przyczynę różnic w zachowaniu się obu rodzajów kwasów wyjaśnili później Levene i Harris (180, 184). Stwierdzili oni, że w kwasie adenilowym drożdżowym grupa fosforanowa przyłączona jest do C₃



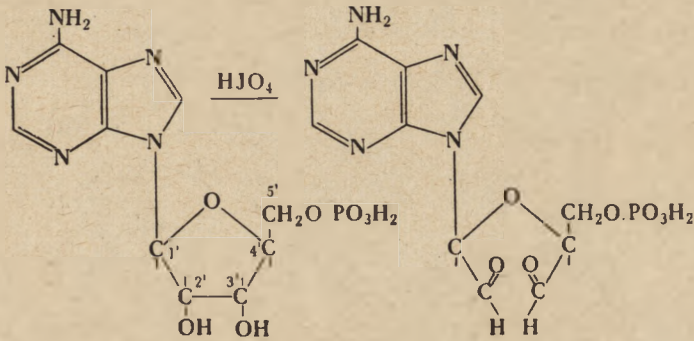
Rys. 32. Kwas adenilowy drożdżowy (kwas adenozy-no-3'-fosforowy).

(rys. 32), gdyż kwas ten nie ulega utleniającemu działaniu nadjodanu. Nadjodanem, jak wiadomo, utleniane są tylko związki posiadające ugrupowanie glikolowe (dwie, wolne, sąsiadujące grupy hydroksylowe w położeniu *cis*). Grupy te utleniają się do grup aldehydowych, a jednocześnie zostaje przerwane wiązanie między sąsiadującymi węglami. Powstałe aldehydy dają barwną reakcję z odczynnikiem Schiffa. Kwas adenilowy mięśniowy, po podziałaniu nadjodanem, daje odpowiedni dwualdehyd, można przeto przyjąć, że w kwasie tym grupa fosforanowa związana jest z C₅ (rys. 33).

Budowę kwasu adenilowego mięśniowego potwierdzono syntezą chemiczną (189, 32, 13). Otrzymano również ten związek, fosforylując adenozyne (217).

Na podstawie wyżej wspomnianych rozważań można było przewidzieć istnienie jeszcze jednego izomerycznego rybonukleotydu z grupą fosforową przy C₂'. Nukleotyd ten został otrzymany przez Cartera i Cohna (1949) (53). Badacze ci rozdzielali chromatograficznie hydrolizat KN drożdżowego i otrzymali dwa izomeryczne kwasy adenilowe, nazwane przez nich *a* i *b*. Zdaniem autorów, jeden z tych kwasów jest kwasem adenozy-no-2'-fosforowym. Sprawdzono później (34), że oba kwasy są odporne na

działanie nadjodanem, co potwierdza sugestię Cartera i Cohna. W następnym roku otrzymano z hydrolizatu KN drożdżowego również izomeryczne odmiany *a* i *b* kwasów: guanilowego, cytydylowego i urydylowego (62, 63). Przy sprawdzaniu budowy tych nukleotydów stwierdzono np. że alkaliczna dezaminacja kwasu cytydylowego *b* dała kwas urydylowy *b*, co dowodzi, że grupa fosforylowa w obu związkach zajmuje to samo miejsce w pierścieniu rybofuranozowym (35).



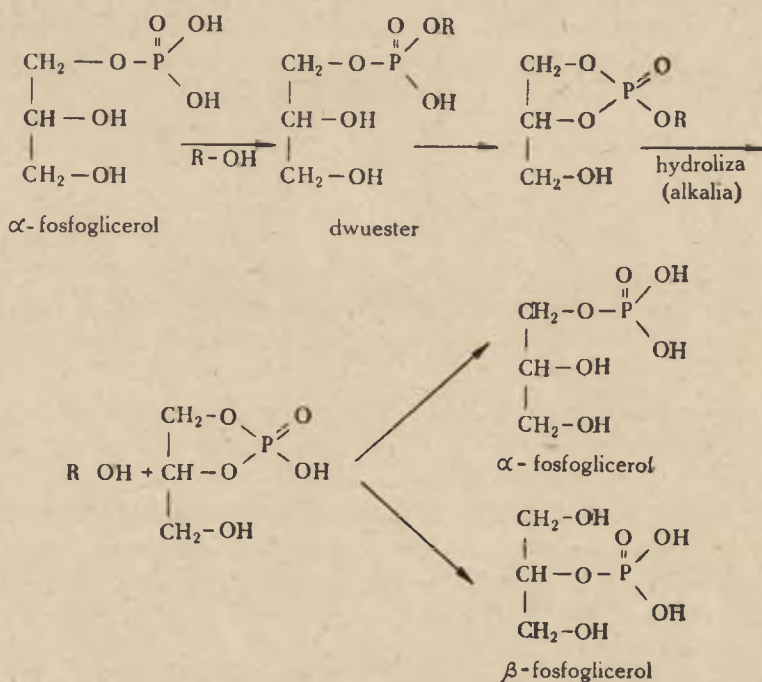
Rys. 33. Kwas adenilowy mięśniowy (kwas adenozy-no-5'-fosforowy).

W roku 1952 Brown i Todd (36), fosforylując 5'-trytyloadenozynę, otrzymali zarówno izomer *a* jak i *b*, lecz nie zdołali ustalić, która z tych odmian jest 2'-fosfoadenozyną, a która jest odmianą 3'. Stwierdzili oni natomiast, że w kwasie organicznym (80% kwas octowy) każdy z tych związków przechodzi częściowo w drugą odmianę izomeryczną; w roztworze powstaje wtedy mieszanina złożona z mniej więcej jednakowej ilości obu odmian. Tego rodzaju konwersja jednej odmiany w drugą znana jest organiczom pracującym ze związkami o podobnej budowie np. z fosfoglicerolami i wytłumaczona jest łatwą wędrówką grupy fosforowej na sąsiedni węgiel zawierający wolną grupę wodorotlenową w położeniu *cis*. Należy zaznaczyć, że tego rodzaju konwersja nie przebiega w środowisku alkalicznym. Natomiast pochodne tego typu związków, np. dwuestry kwasu fosforowego, ulegają alkalicznej hydrolizie; odszczepia się alkohol i powstają dwie izomeryczne odmiany.

Opierając się na pracach Bailey'ego i Gauma (17) oraz Baera i Katesa (14), dla fosfoglicerolu można by te przemiany ująć w następujący schemat (rys. 34).

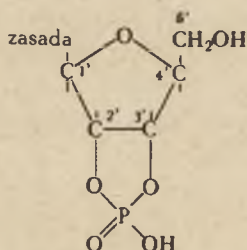
W oparciu o omawiane spostrzeżenia, Brown i Todd w roku 1952 (36), konstruuja teorię, tłumacząc powstawanie izometrycznych odmian omawianych nukleotydów rybozowych. Zdaniem tych autorów, powstawanie odmian *a* i *b* należy przypisać temu, że podczas hydrolizy KRN

tworzą się pośrednie związki cykliczne, podobnie jak podczas procesów przedstawionych na rys. 34. Budowę takiego cyklicznego połączenia przedstawia rys. 35. Tego typu związki, pochodne cykliczne adenozy,...



Rys. 34. Schemat konwersji α -fosfoglicerolu.

guanozyny, cytydyny i urydyny zostały otrzymane syntetycznie w pracowni Todd'a (38), a wkrótce potem Markham i Smith (200), po przeprowadzeniu łagodnej hydrolizy KRN drożdżowego (działaniem węgla baru lub amoniaku), jak również drogą enzymatyczną, otrzymali cykliczne nukleotydy purynowe i pirymidynowe o właściwościach identycznych z odpowiednimi cyklicznymi nukleotydami syntetycznymi.



Rys. 35. Nukleotydy cykliczne.

Poznanie budowy cyklicznych nukleotydów miało duży wpływ na wytłumaczenie różnic w zachowaniu się obu rodzajów kwasów nukleinowych oraz na wysunięcie koncepcji ich budowy, co zostanie szerzej omówione w rozdziale o budowie KN.

Wracając do budowy nukleotydów — ostatnie dwa lata pozwoliły na wyjaśnienie struktury obu odmian: *a* i *b*. Po przeprowadzeniu analizy przy użyciu promieni rentgenowskich (39, 42), po przebadaniu właściwoś-

ci tych związków różnymi metodami chemicznymi i fizycznymi (skręcalność, widma w nadfiolecie i podczerwieni, chromatografia bibułowa i przy użyciu wymienników jonowych) (194, 99, 205, 133) stwierdzono, że odmiana *a* posiada budowę kwasu rybonukleozydo-2'-fosforowego, a odmiana *b* jest to kwas rybonukleozydo-3'-fosforowy. Przeprowadzono również syntezę obu odmian (42).

W tymże czasie *Cohn* i *Volkin* (64), po przeprowadzeniu enzymatycznej hydrolizy kwasu rybonukleinowego wątroby cielęcej, znaleźli w hydrolizacie kwasy rybonukleozydo-5'-fosforowe. Hydrolizę przeprowadzono dodając kolejno rybonukleazę, a następnie fosfatazę jelitową w obecności arsenianu, aby zahamować działanie fosfomonoesterazy, odszczepiającej kwas fosforowy od nukleotydów. Poznano przeto i otrzymano wszystkie teoretycznie przewidziane izomeryczne odmiany nukleotydów rybozowych i wyjaśniono pewne subtelności ich budowy.

Kwasy dezoksyrybonukleinowe, jak było do przewidzenia, nie dają cyklicznych nukleotydów, ani kwasów nukleozydo-2'-fosforowych. Hydroliza enzymatyczna prowadzi do powstawania kwasów dezoksynukleozydo-5'-fosforowych (54). Syntetycznie otrzymano obie odmiany, zarówno 3'-jak i 5'-fosforowe (204, 205, 110). Stwierdzono, że otrzymane związki mają budowę podobną do odpowiednich dezoksynukleotydów, otrzymanych metodą *Kleina* i *Thannhausera* (137, 138, 139).

Polinukleotydy

Z kolei należy omówić poglądy na temat konstrukcji łańcucha polinukleotydowego i co za tym idzie — poglądy na temat budowy KN.

Na pierwszych koncepcjach zaciążyła teoria o tetranukleotydowej budowie KN. Genezą tej teorii były spostrzeżenia, że KN, zarówno roślinne jak i zwierzęce, zawierają w swej cząsteczce dwie zasady purynowe i dwie pirymidynowe w stosunkach ekwimolarnych. Jednymi z pierwszych byli *Ostborne* i *Harris* (214), którzy w roku 1902, po zanalizowaniu tzw. „kwasu tritikonukleinowego“, stwierdzili występowanie w nim tylko dwóch zasad purynowych: adeniny i guaniny i to w stosunku 1 : 1. Wkrótce potem *Steudel* (241), a po nim *Levene* i *Mandel* (159), hydrolizując różnymi metodami KN grasicowe i analizując otrzymane hydrolizaty, uzyskali podobne wyniki.

Trudniej poszło z ustaleniem zawartości zasad pirymidynowych. Niektórzy z ówczesnych badaczy KN utrzymywali, że zasady pirymidynowe są produktami degradacji puryn (45). Pogląd ten nie utrzymał się. Stwierdzono eksperymentalnie, że w hydrolizacie KN, zarówno drożdżowym jak i grasicowym, po usunięciu puryn (przy pomocy kwasu fosforowolframo-

wego lub soli srebra), w pozostałości znajdują się dwie zasady pirymidynowe (160, 215) i to również w ilościach ekwimolarnych (241, 158, 152).

Pozostaje do rozważenia, w jaki sposób omówione wyżej zasady lub nukleotydy wiążą się w cząsteczki KN.

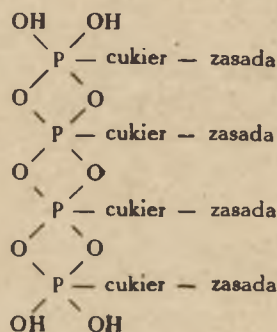
A priori nukleotydy mogą wiązać się w trojaki sposób:

- 1) przez powiązanie się reszt kwasów fosforowych,
- 2) przez powiązanie się cukrów wiązaniem eterowym,
- 3) przez utworzenie wiązania estrowego pomiędzy kwasem fosforowym jednego nukleotydu i grupą hydroksylową cukru drugiego nukleotydu.

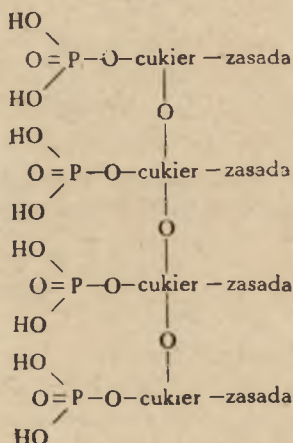
Wszystkie te koncepcje były rozważane i proponowano odpowiednie schematy.

W roku 1912 *Steu del* (242) przedstawia projekt budowy cząsteczki KN, w którym nukleotydy powiązane są rodnikami kwasowymi (rys. 36).

Eksperyment nie potwierdzał takiego typu budowy. Tak zbudowany związek zawiera dwie pierwszo- i dwie dru-



Rys. 36.

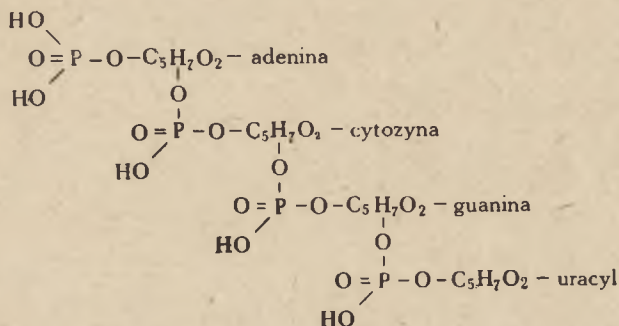


Rys. 37.

gorzędowe grupy kwasu fosforowego. Takich ilości grup kwasowych nie stwierdzono eksperymentalnie. Podany wzór nie tłumaczy również możliwości powstawania dwufosfonukleozydów pirydynowych, a takie związki otrzymywano.

W następnych latach *Jones* i współpracownicy (124, 125, 126, 127) zaproponowali schemat tetranukleotydu, w którym główny trzon zbudowany jest z eterowo powiązanych cukrów (rys. 37). Krytycy zarzucali takiej hipotetycznej cząsteczce dużą zawartość drugorzędowych grup kwasowych, gdy w naturalnych kwasach znajdowano wówczas zaledwie jedną grupę drugorzędową na cztery pierwszorzędowe. Poza tym tak zbudowany KN z racji posiadania eterowych wiązań, powinien być znacznie trwalszy niż stwierdzono eksperymentalnie.

Z innych, dość licznych koncepcji największym uznaniem cieszył się pogląd *Levene*'a (153, 154, 155), że w łańcuchu tetranukleotydomym zarówno KDN jak i KRN, nukleotydy powiązane są kwasem fosforowym, podwójnie zestryfikowanym grupami alkoholowymi cukrów. Zasady purynowe i pirymidynowe w takim tetranukleotydzie przeplatają się wzajemnie (rys. 38).



Rys. 38. Schemat tetranukleotydu.

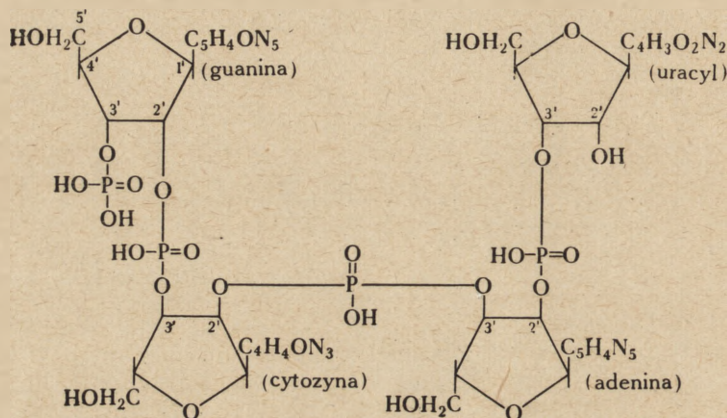
W następnych latach *Levene* i współpracownicy (172), potencjometrycznym miareczkowaniem stwierdzają, że KRN drożdżowy na każde cztery atomy fosforu posiada cztery grupy fosforanowe dysocjujące jako pierwszorzędowe i jedną drugorzędową, co wpłynęło na ugruntowanie wysuniętej teorii.

W tym mniej więcej czasie udaje się *Levene*'owi i *Demochowskiemu* (178), przez dezaminację kwasu guanilowego, otrzymać kwas ksantylowy, a z niego kwas rybozofosforowy. Otrzymanie tego związku odegrało poważną rolę w ustaleniu miejsca przyłączenia kwasu fosforowego w nukleotydach otrzymanych z KRN drożdżowego. Ustalono również, że w nukleotydach cukry występują w postaci furanowej, a ponieważ już poprzednio udało się w pracowni *Levene*'a (155) wyizolować z KDN dwufosfotymidynę i dwufosfodezoksytydyne, to w oparciu o te spostrzeżenia można było pokusić się o skonstruowanie bardziej szczegółowego schematu budowy cząsteczki KN. Projekt takiego schematu przedstawiają w roku 1935 *Levene* i *Tipson* (187, 188) — zarówno dla KRN (rys. 39) jak i dla KDN.

W podanym schemacie kwas fosforowy estryfikuje grupę hydroksylową C₃' jednego nukleotydu oraz C₂' drugiego. W nukleotydach KDN przy C₂' brak grupy hydroksylowej, toteż *Levene* i *Tipson* wysunęli koncepcję, że w tych związkach kwas fosforowy wiąże C₃' jednego i C₅' drugiego nukleotydu.

Tetranukleotydoma teoria mimo jej wielkiej popularności, nie ostała

się wobec wyników, uzyskanych przy użyciu bardziej precyzyjnych metod analitycznych. Już dokładniejsze potencjometryczne miareczkowanie wykazało występowanie znacznych różnic (97, 273, 106) w zawartości zarówno pierwszo- jak i drugorzędowych grup wodorotlenowych kwasu fosforowego w porównaniu z danymi, uzyskanymi w pracowni *Levene'a*. Podobnie analizy składu różnych KN coraz częściej dawały wyniki, które

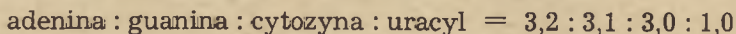


Rys. 39. Schemat tetranukleotydu rybozowego.

przeczyły tetranukleotydowej koncepcji. *Feulgen* (86) już w roku 1919 znajduje w KRN trzustki znacznie więcej guaniny niż adeniny. *Hammarsten* (108), w tzw. β -nukleoproteidzie wyizolowanym z tegoż narządu, znajduje trzy razy więcej guaniny niż adeniny i na tej podstawie zakłada, że KRN jest heksanukleotydem. *Steudel* (243) w tym samym β -nukleoproteidzie znajduje, że stosunek adeniny do guaniny wynosi 1:4; występujący przeto w tym związku kwas nukleinowy miałby budowę heptanukleotydową.

W późniejszych latach *Gulland* i współpracownicy (104), po zanalizowaniu KRN drożdżowego, znaleźli, że stosunek azotu purynowego do pirymidynowego wynosi 1,86, gdy w myśl koncepcji *Levene'a*, stosunek ten powinien wynosić 2.

Szczególnie duży wpływ na poznanie składu i budowy KN oraz na podważenie tetranukleotydowej teorii *Levene'a* wywarło wprowadzenie w roku 1947 przez *Vischera* i *Chargaffa* (257, 261, 259, 262, 260) nowej metody badań tych związków. Była to metoda chromatograficzna w połączeniu ze spektrofotometrią. W pracowni *Chargaffa* (50, 51), przy użyciu tych metod, analiza KRN drożdżowego dała następujące stosunki występujących w tym kwasie zasad:



W hydrolizacie KDN grasicy znaleziono:

adenina : guanina : cytozyna : tymina = 1,6 : 1,3 : 1,0 : 1,5

Podobnie w KRN trzustki świńskiej (52) znaleziono większą zawartość puryn niż pirymidyn (stosunek molowy wynosił 2,3). Wykryto również w hydrolizatach KRN (200) jak i KDN (236, 238, 239) dwunukleotydy lub fosfodwunukleozydy zbudowane z tego samego rodzaju zasad np. układ: cytydyna-kwas fosforowy-cytydyna lub tymidyna-kwas fosforowy-tymidyna, a nawet trójnukleotydy takie jak kwas adeninodwuguanilowy i inne (203).

Te wyniki podważyły teorię Levene'a o wzajemnym przeplataniu się zasad purynowych i pirymidynowych w tetranukleotydzie. Również bliższe poznanie właściwości fizycznych KN podważyło koncepcje o tetranukleotydowej budowie tych związków. Znaczny wpływ na to zagadnienie wywarły badania, dotyczące masy cząsteczkowej tych związków.

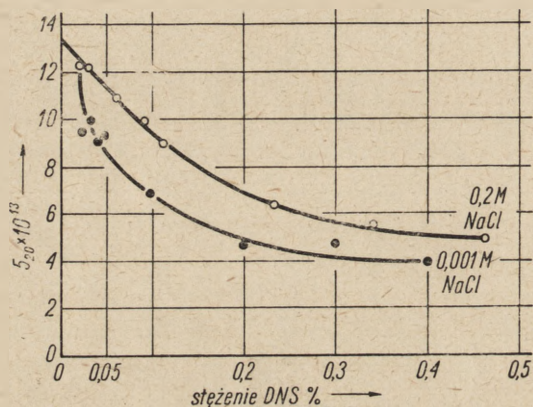
Masy cząsteczkowe KN

W myśl teorii tetranukleotydowej masa takiego agregatu powinna wynosić około 1350.

Już Miescher w swoich pierwszych pracach nad kwasami nukleinowymi plemników łosia podaje, że wyizolowane związki należy zaliczyć do wielkocząsteczkowych (209).

Późniejsze prace, prowadzone na przełomie obecnego stulecia przez Feulgena, Kossela, Levene'a (151) nie mogły dać pełnego obrazu wielkości cząsteczki, gdyż w większości wypadków wykonywane były na materiale zdepolimeryzowanym, uszkodzonym drastycznymi metodami używanymi przy izolowaniu. Jednym z pierwszych, który utrzymywał, że wyizolował z grasicy kwas nukleinowy w jego stanie naturalnym, był Hammarsten (109) i kwas ten, zdaniem autora, był związkiem o olbrzymim ciężarze cząsteczkowym. Dopiero wprowadzenie do analizy bardziej precyzyjnych metod fizyko-chemicznych pozwoliło na częściowe rozwiązanie tego zagadnienia. Okazało się np. że roztwory KDN optycznie bierne w spoczynku, odznaczają się znacznym podwójnym załamaniem podczas przepływu. Dowodzi to, że cząsteczki posiadają budowę długich nitek i udało się nawet wyliczyć stosunki osiowe soli sodowej KDN, które wynoszą 200 : 1, 400 : 1 (232), a nawet 710 : 1 (104). Dla KRN znajdowano niższe stosunki. Mikrofotografia elektronowa KDN także wskazuje na włókienkową budowę kwasów nukleinowych (234); taki obraz również dają badania, uzyskane przy użyciu promieni rentgenowskich (9, 10).

Późniejsze badania wykazały, że KN są to związki cechujące się dużą labilnością, wielką wrażliwością na czynniki zewnętrzne (stężenie jonów wodorowych, temperatura, wstrząsy, siła jonowa elektrolitów i inne) i przy interpretacji wyników należy liczyć się z tymi czynnikami. Przykładem prace Sterna i współpracowników (214) nad właściwościami fizyko-chemicznymi soli sodowej kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNS). Stwierdzili oni, że sól ta, rozpuszczona w wodzie destylowanej, wykazuje dużą lepkość i silnie zaznaczone zjawisko podwójnego załamania prądowego.



Rys. 40. Zależność stałej sedimentacji od stężenia soli sodowej KDN i od siły jonowej (K. G. Stern 1952).

stwierdzono znaczny wpływ rozcieńczenia i obecności elektrolitów na wielkość stałej sedimentacji. Gdy stężenie DNS zmieniano od 0,46‰ do 0,03‰, przy stałym stężeniu elektrolitu (0,2 M NaCl) stała sedimentacji (224) zmieniała się od 4,8 do 12,0 S (jednostek Svedberga).

Stwierdzono również zależność stałej sedimentacji od siły jonowej elektrolitu. W przeprowadzonym doświadczeniu stężenie DNS pozostawało bez zmian (0,57‰), gdy stężenie NaCl zmieniało się od zera do 4,5 M. Stwierdzono, że dla stężeń NaCl w granicach od 0,001 do 0,1 M stała sedimentacji wykazywała wzrost z 5,7 do 10,9 jednostek Svedberga. Dalsze podwyższanie stężenia NaCl pozostawało już bez wpływu na szybkość sedimentacji.

Pomiary dyfuzji DNS wykazują również zależność stopnia dyfuzji od stężenia. Zależność ta jest jednakże znacznie mniejsza niż zależność szybkości sedimentacji od stężenia (58, 249). Toteż przy wyliczaniu masy cząsteczkowej ze współczynnika szybkości dyfuzji, ze stopnia lepkości, czy z wielkości stałej sedimentacji, należy brać pod uwagę wspomniane czynniki.

Dodanie niewielkiej ilości obojętnej soli znacznie redukuje te właściwości. Zmiany te tłumaczone są przez autorów tym, że w roztworze wodnym siła jonowa równa się zero i cząsteczki DNS są całkowicie rozciągnięte. Po dodaniu elektrolitu, gdy siły jonowe rosną, łańcuch cząsteczki ulega połamaniu, co wpływa na obniżenie lepkości. Lepkość służy często jako miernik stopnia polimeryzacji cząsteczki. Podobnie, przy pomiarze masy cząsteczkowej

Mimo tych trudności udało się oznaczyć masy cząsteczkowe KRN i KDN różnego pochodzenia. Masa dla pierwszego rodzaju kwasów mieści się w granicach od kilkunastu do kilkudziesięciu tysięcy, a nawet wyżej, czego dowodem praca C o h e n a i S t a n l e y a (61), którym udało się wyizolować z wirusa mozaiki tytoniowej KRN o masie cząsteczkowej około 300 000. Wielkość masy cząsteczkowej uzależniona jest w znacznej mierze od warunków izolowania, przechowywania (Tablica I) i rozdzielania, gdyż upaść musi już pogląd, że istnieje tylko jeden rodzaj kwasu rybo- i jeden rodzaj dezoksyrybonukleinowego.

T a b l i c a I
Masy cząsteczkowe KRN

Rodzaj kwasu	Pochodzenie	Masa cząsteczkowa	Autor
KRN	drożdże	17 000	Loring
„	drożdże (prep. handlowe)	10 000	Fischer i wsp.
„	różnego pochodzenia (prep. handlowe)	10 000 — 23 000	Fletcher i wsp.
„	Wirus mozaiki tytoniowej	300 000	Cohen i Stanley
„ po samoczynnym rozpadzie	„ „ „	61 000	„
KRN po podziałaniu alkaliami na zimno	„ „ „	15 000	„
KRN	„ „ „	37 000	Loring

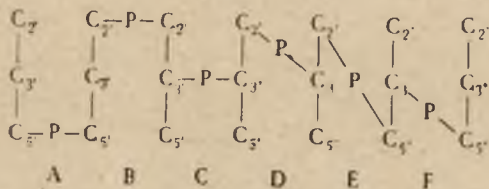
Masy cząsteczkowe KDN są przeważnie wyższe i wahają się w granicach od 0,5 do 8 milionów (228, 235, 104, 105, 249, 221). I dla tych kwasów różni autorzy otrzymują różne wyniki. Tak np. C e c i l i O g s t e n (58) ustalili masę cząsteczkową KDN grasicy cielęcej na 820 000, gdy R e i c h m a n n i współpracownicy (221) znaleźli dla tego samego związku wielkość 7 700 000.

Prowadzona jest dyskusja na temat, czy naturalne KDN posiadają rzeczywiście tak dużą cząsteczkę. C o h e n (59) utrzymuje, że naturalny KDN, związany z białkiem, ma znacznie mniejszą masę cząsteczkową i dopiero po uwolnieniu z nukleoproteidu wiąże się na większe agregaty. Dowodem tego jest zwiększanie się lepkości roztworu po strawieniu białka nukleoproteidu. Wzrost lepkości tłumaczyć można agregacją uwolnionych cząsteczek KDN.

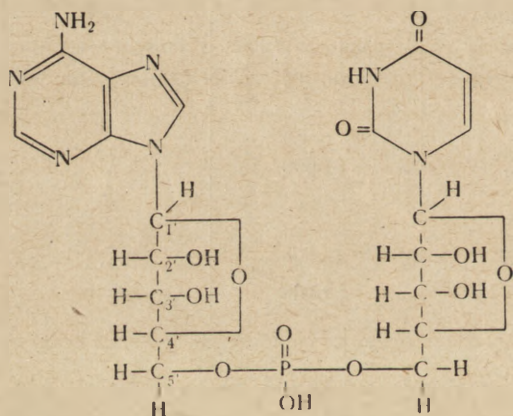
Wiązania międzynukleotydowe

Pozostaje do wyjaśnienia jak w długim łańcuchu polinukleotydowym wiążą się ze sobą nukleotydy.

W oparciu o znaną już budowę nukleotydów, dla KRN można wyprowadzić kilka teoretycznie możliwych rodzajów wiązań, jak to widać na rys. 41. Dla jasności obrazu na rysunku tym nukleotydy rybozowe przedstawione są w skrócie jako $C_2'-C_3'-C_5'$, gdyż tylko przy tych węglach rybozy są wolne grupy wodorotlenowe, mogące brać udział w wiązaniach międzynukleotydowych. Reszta fosforanowa w tym schemacie zaznaczona jest literą P.



Rys. 41. Schemat teoretycznie możliwych połączeń w łańcuchu KRN.



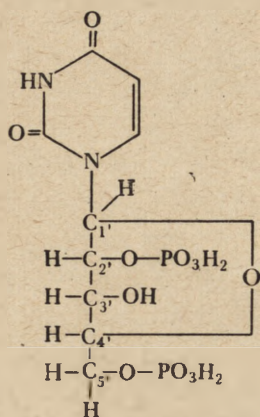
Rys. 42. Dwueter adenozy-5'-urydyno-5'-fosforowy. (Elmore i Todd 1952).

Wiązanie $C_5'-C_5'$ (A) jest mało prawdopodobne, gdyż wiązanie takie jest odporne na działanie alkaliów (3, 254). Otrzymano np. syntetyczny ester adenozy-5'-urydyno-5'-fosforowy (rys. 42), hydrolizowano następnie otrzymany związek w 0,5 normalnym NaOH, w temperaturze 37° przez 16 godzin bez żadnego efektu (78). W tych warunkach KRN ulega całkowitemu rozszczepieniu.

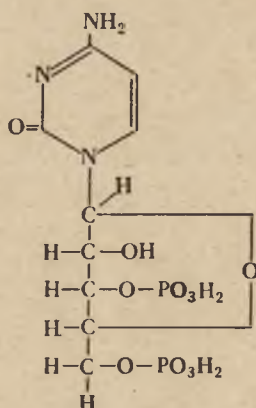
Wiązania $C_2'-C_2'$ (B), $C_3'-C_3'$ (C), $C_2'-C_3'$ (D) poddają się działaniu alkaliów i są teoretycznie możliwe jako wiązania międzynukleotydowe. Należy jednak pamiętać, że KRN po podziałaniu diesterazą wyizolowaną z jadu węża (65) lub po podziałaniu nukleazą, a następnie fosfatazą jelitową (64), rozpada się na 5'-fosfonukleozydy. W wiązaniach międzynukleotydowych bierze przeto udział C_5' ; należy więc wykluczyć fragmenty B, C i D schematu 41. Pozostaje przeto wiązanie $C_2'-C_5'$ (E) i $C_3'-C_5'$ (F) jako najbardziej prawdopodobne i do niedawna wiele przemawiało za tym, że zarówno pierwszy jak i drugi typ wiązania występuje w KRN. Alkaliczna hydroliza KRN, jak to już omawiano przy nukleotydach, daje mieszaninę 2' i 3'-fosfonukleozydową.

W enzymatycznym hydrolizacie KRN drożdżowego, wątroby cielęcej,

grasicowego stwierdzono (263, 65, 66) obecność takich związków jak: 2', 5' i 3', 5'-dwufosfourydyna (rys. 43) oraz 2', 5' i 3', 5'-dwufosfocytydyna (rys. 44).

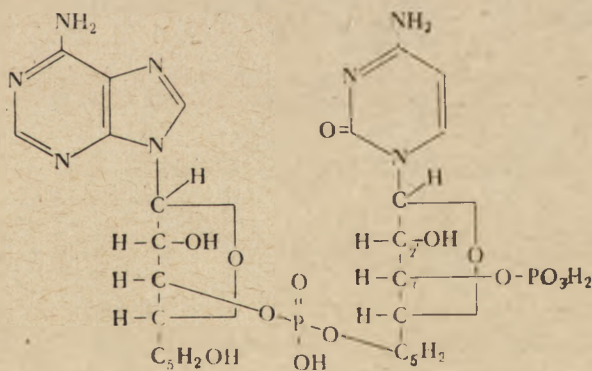


Rys. 43. 2',5'-Dwu-
fosfourydyna.



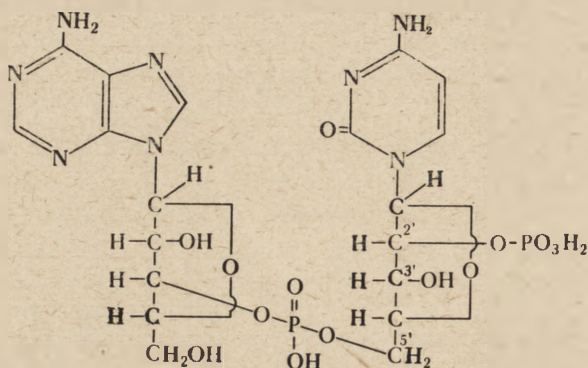
Rys. 44. 3',5'-Dwu-
fosfocytydyna
(Cohn i Volkin 1952).

W kwaśnym hydrolizacie KRN drożdżowego (6 normalny HCl, 25°C, przez 3 minuty) znaleziono np. kwas 5'-adenililo-cytydylowy a (rys. 45), kwas 5'-adenililo-cytydylowy b (rys. 46) i wiele innych podobnych układów (203).

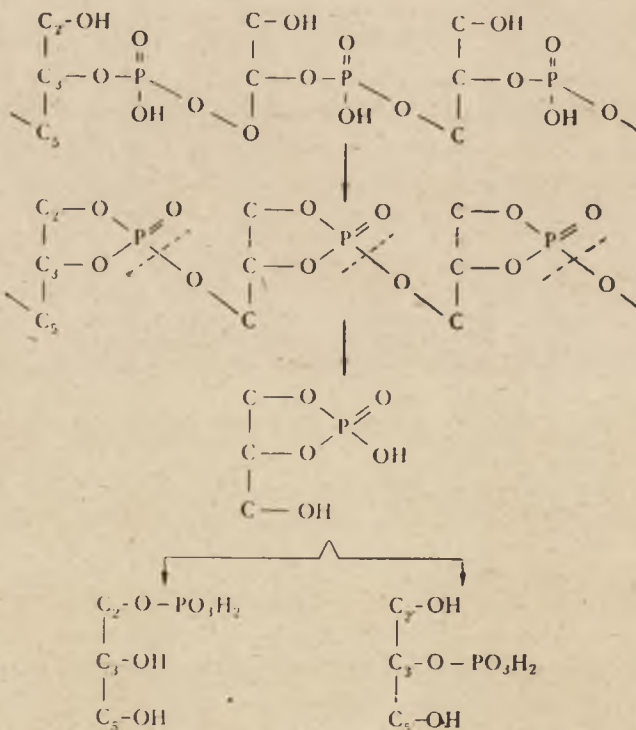


Rys. 45. Kwas 5'-adenililocytydylowy a.

Opierając się na tych i innych znanych już faktach, Brown i Todd (37) zaproponowali schemat budowy poliribonukleotydu oraz cyklicznego produktu pośredniego, które tłumaczyłyby powstawanie dwu odmian nukleotydu: odmiany a i odmiany b (rys. 47).



Rys. 46. Kwas 5'-adenylicydylowy *b* (Merrfield i Wooley 1952).



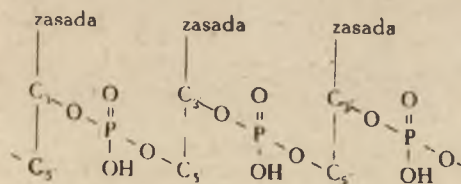
Rys. 47. Schemat alkalicznej hydrolizy KRN (Brown i Todd 1952).

W schemacie swoim **Brown i Todd** przyjęli połączenie $C_{3'}-C_{5'}$, jako podstawowe wiązanie międzynukleotydowe KRN, przez analogię do podobnych wiązań w KDN. W tym ostatnim związku, wobec braku tlenu przy $C_{2'}$, jedynym możliwym wiązaniem międzynukleotydowym jest układ $C_{3'}-C_{5'}$. Późniejsze badania wykazały całkowitą słuszność takiego ujęcia.

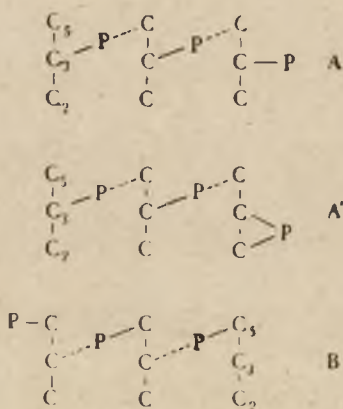
Schemat **Browna i Todda** tłumaczy podatność KRN na alkaliczną hydrolizę. Zdaniem tych autorów, jeśli dla wiązań międzynukleotydowych $C_{3'}-P-C_{5'}$, istnieją możliwości powstania przejściowych układów cyklicznych, to w środowisku alkalicznym wiązania takie ulegają przerwaniu pomiędzy P i $C_{5'}$, co zaznaczono na rysunku linią przerywaną. Powstają znane nam już cykliczne mononukleotydy, które następnie przechodzą w postaci izomeryczne *a* i *b*. W środowisku kwaśnym każda z izomerycznych odmian łatwo daje mieszaninę obu odmian; w środowisku alkalicznym powstałe izomery są bardziej trwałe.

Nukleotydy KDN nie mogą tworzyć odmian cyklicznych i tym należy tłumaczyć odporność KDN na alkaliczną hydrolizę. Według **Browna i Todda**, budowę KDN można ująć w następujący schemat (rys. 48):

Potwierdzeniem takiej budowy było otrzymanie 3', 5'-dwufosfonukleozydów pirymidynowych w kwaśnych hydrolizatach KDN (73), oraz 5'-fosfonukleozydów w hydrolizatach enzymatycznych (54); 5'-fosfonukleozydy dezo-



Rys. 48. Łańcuch kwasu dezoksyrybonukleinowego. (Brown i Todd 1952).



Rys. 49. Dwa typy hipotetycznych łańcuchów KRN (Markham, Matthews i Smith 1954).

ksyrybozowe otrzymano również w pracowni **Todda** syntetycznie (204, 205). Stwierdzono identyczność związków syntetycznych z produktami enzymatycznej hydrolizy. Syntetycznie otrzymano także 3'-fosfonukleozydy dezoksyrybozowe (205).

Przy omawianiu budowy nierozgałęzionego łańcucha polinukleotydowego należy wspomnieć o ciekawych spostrzeżeniach **Markhama** i współpracowników na temat różnic w zachowaniu KRN różnego pochodzenia i interpretacji tych spostrzeżeń.

W łańcuchach KRN dominuje wiązanie typu fosfodwuestru, wiążące pozycje 3' jednego nukleotydu z pozycją 5' drugiego. Zdaniem Markhama i współpracowników (199a) łańcuchy takie mogą być zbudowane w dwojaki sposób, jak to widać na powyższych schematach A i B.

Typ A jest jakby zbudowany z 3-fosfonukleozydów, gdy w drugim typie (B) dominuje 5-fosfonukleozyd. Pierwszy typ występuje w KRN drożdżowym i w wirusie choroby mozaikowej żółtej rzepy, gdy drugi typ przeważa w KRN wirusa mozaiki tytoniowej i kartoflanym wirusie X. Wnioski te wyciągnięto, analizując hydrolizaty omawianych kwasów. W drugim typie KRN w alkalicznym hydrolizacie znaleziono oprócz mononukleotydu pewną ilość (jedna reszta na pięćdziesiąt) dwufosfonukleozydów i taką ilość nukleozydów (w KRN wirusa mozaiki tytoniowej ilość nukleozydów troszkę większa). W hydrolizacie KRN drożdżowego i wirusa żółtej rzepy tych fragmentów nie stwierdzono. Jeśli przed hydrolizą KRN trawiono oczyszczoną fosfomonoesterazą prostaty — w hydrolizatach dwufosfonukleozydów nie stwierdzono.

Działanie nukleaz

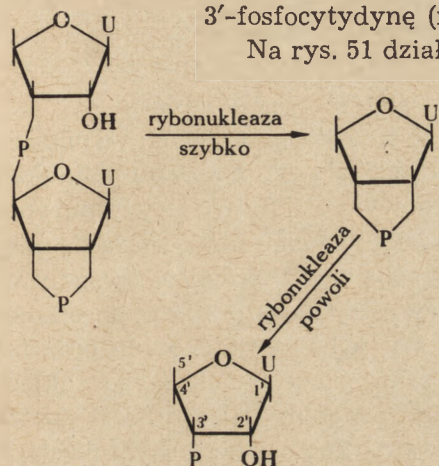
W tym samym czasie, gdy Brown i Todd snuli swoje koncepcje na temat budowy łańcuchów polinukleotydu, w pracowni Chargaffa i pracowni Markhama otrzymano ciekawe wyniki, badając produkty enzymatycznej hydrolizy KRN. Wyniki te pozwoliły na częściowe odtworzenie struktury tych związków. Przede wszystkim stwierdzono, że hydroliza enzymatyczna, przeprowadzona rybonukleazą trzustkową, daje w rezultacie materiał niejednorodny. Otrzymano mieszaninę złożoną z mononukleotydu wyłącznie pirymidynowych, dwu- i trójnukleotydu oraz z niedializującej reszty, odpornej na działanie rybonukleazy trzustkowej (197). W tej reszcie występowały krótkie łańcuchy zbudowane z nukleotydu purynowych, lecz zakończone nukleotydem pirymidynowym (200). Stwierdzono również, że po krótkim działaniu krystaliczną rybonukleazą trzustkową na KRN, powstają, obok dłuższych fragmentów, cykliczne 2':3'-fosforany cytydyny i urydyny (199, 200). Po dłuższym działaniu tą samą nukleazą z cyklicznych mononukleotydu powstają 3'-fosfonukleozydy pirymidynowe, a pozostałe dłuższe łańcuchy rozszczepiają się na dwu- i trójnukleotydy, z których każdy zakończony jest nukleotydem pirymidynowym w postaci cyklicznej lub w postaci 3'-fosfonukleozydu (rys. 50). Na załączonym rysunku litera U oznacza uracyl, litera P — resztę fosforanową:

Działanie rybonukleazy trzustkowej sprawdzono w pracowni Todda (35, 40) na związkach syntetycznych i potwierdzono poprzednie wnioski,

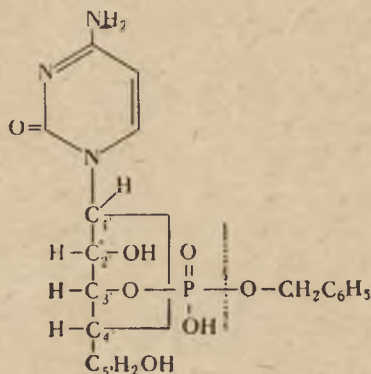
że rybonukleaza działa podobnie do alkaliów, z tą różnicą, że rybonukleaza odszczepia tylko nukleotydy pirymidynowe i to wyłącznie w postaci fosforylowanej przy C_3' .

Tak np. estry benzytowe kwasu urydyno- lub cytydyno-3'-fosforowego, po podziałaniu rybonukleazą trzustkową ulegały hydrolizie (via odpowiedni związek 2' : 3' cykliczny) na 3'-fosforydynę lub 3'-fosfocytydynę (rys. 51).

Na rys. 51 działanie enzymu zaznaczono linią przerywaną.



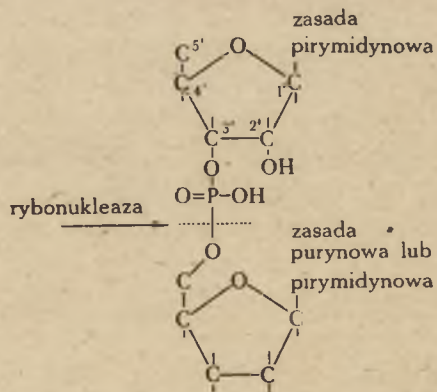
Rys. 50. Schemat działania rybonukleazy trzustkowej (Markham i Smith).



Rys. 51. Działanie trawienne rybonukleazy trzustkowej.

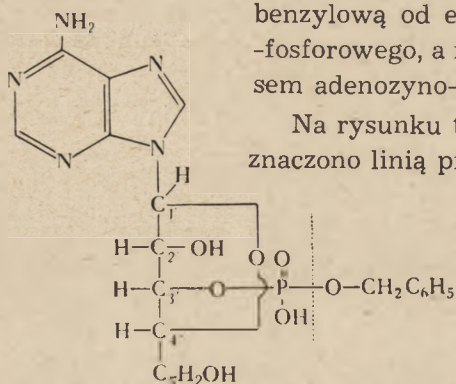
ną. Odpowiednie estry benzytowe nukleozydu 2'-fosforowego w podobnych warunkach nie ulegały hydrolitycznemu działaniu rybonukleazy. Nukleotydy cykliczne są produktami pośrednimi w tych procesach hydrolitycznych i z tych nukleotydów rybonukleaza trzustkowa rozszczepia pierścień tylko nukleotydów cyklicznych pirymidynowych, dając również tylko nukleotyd w konfiguracji b (3'-fosfonukleotyd). Z tego wynika, że rybonukleazę trzustkową można uważać za specyficzną fosfodwuesterazę, która rozszczepia tylko drugorzędowe wiązanie estrowe 3'-fosfonukleozydu pirymidynowego (201). Rozszczepia ona również cykliczny nukleotyd, gdyż i w nim występuje tego typu wiązanie (rys. 52).

Mniej specyficzne działanie wykazuje rybonukleaza wyizolowana ze śledziony, gdyż odszczepia zarówno



Rys. 52. Mechanizm działania rybonukleazy trzustkowej (Markham i Smith 1952).

nukleotydy purynowe jak i pirymidynowe. Produkty działania tego enzymu są to również w znacznej większości 3'-fosfonukleozydy (116, 41). W pracowni Todd'a sprawdzono działanie tego enzymu na estrach syntetycznych. Stwierdzono, że enzym ten odszczepia resztę benzyłową od estru benzyłowego kwasu adenozyno-3'-fosforowego, a nie atakuje podobnego połączenia z kwasem adenozyno-2'-fosforowym (rys. 53).



Rys. 53. Działanie trawienne rybonukleazy śledzionowej (Brown, Heppel i Hilmoie 1954).

Na rysunku tym hydrolityczne działanie enzymu zaznaczono linią przerywaną.

Z omówionych danych wynika, że w rozgałęzionym łańcuchu polinukleotydowym KRN nukleotydy purynowe jak i pirymidynowe wiążą się między sobą w ten sposób, że kwas fosforowy estryfikuje grupę wodorotlenową C_3' jednego nukleotydu oraz taką samą grupę C_5' drugiego nukleotydu, podobnie jak w KDN (patrz rys. 48). Znalezione w hydrolizatach

KRN kwasy nukleozydo-2'-fosforowe są prawdopodobnie artefaktami.

Łańcuchy rozgałęzione

Rozważano również możliwości występowania rozgałęzień w łańcuchu KRN.

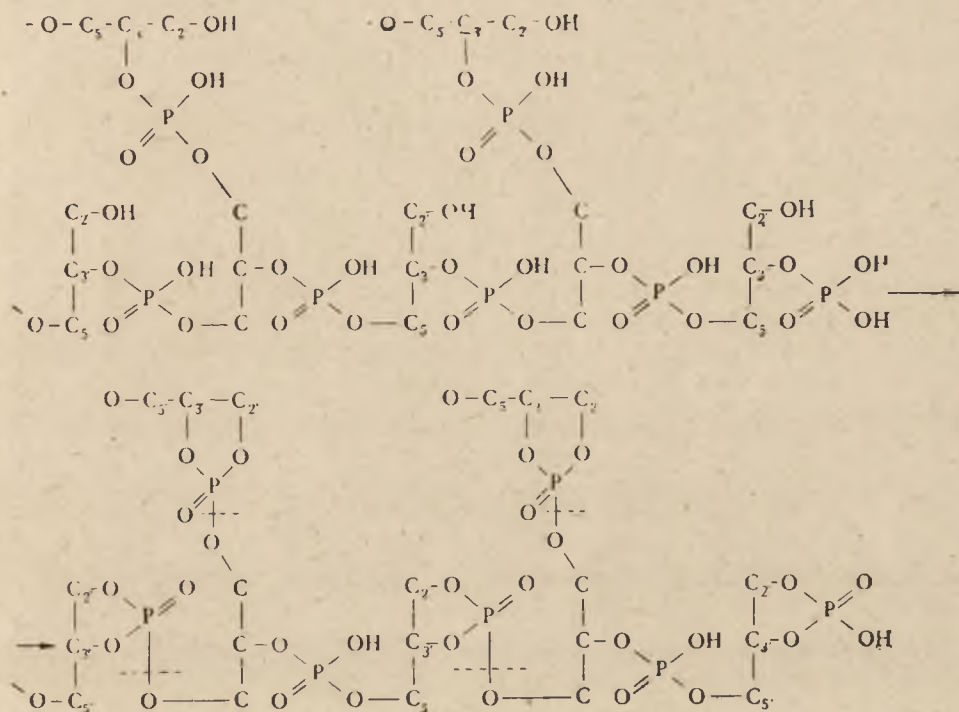
Najbardziej prawdopodobnym miejscem przyłączenia łańcucha bocznego do łańcucha głównego jest C_2' związany grupą fosforanową z C_3' pierwszego nukleotydu rozgałęzienia. Tylko takie połączenie umożliwia powstawanie w łańcuchu bocznym ugrupowania cyklicznego, a po odszczepieniu łańcucha bocznego — także w łańcuchu głównym.

Możliwością powstawania takich wiązań tłumaczona jest podatność KRN na alkaliczną hydrolizę. Powiązanie C_2' łańcucha głównego z C_5' łańcucha bocznego wykluczałoby możliwość takiego wewnątrzcząsteczkowego przegrupowania i tworzenia układu cyklicznego.

Omawianą koncepcję budowy łańcucha KRN starali się udowodnić Anderson i współpracownicy (5) metodą metylowania KRN. Jak widać z rysunku 54 ryboza może być jedno-, dwu- lub trzykrotnie fosforylowana (na zakończeniach łańcucha, w środku i w miejscach rozgałęzień). Po zmetylowaniu KRN i ostrożnej hydrolizie, w hydrolizacie powinna występować mieszanina dwumetylorybozy (powstająca z jednofosforylo-

wanej rybozy), monometylorybozy (z dwufosforylowanego cukru) i rybozy (z trójfosforylowanego związku). Analiza hydrolizatu stwierdziła występowanie wszystkich trzech rodzajów pochodnych rybozy.

Miejscem rozgałęzienia może być również kwas fosforowy i taką sugestię wysunęli już przed kilku laty Fletcher i współpracownicy (97). Za taką sugestią przemawiają również wyniki potencjometrycznego miareczkowania pierwszorzędowych grup fosforanowych.

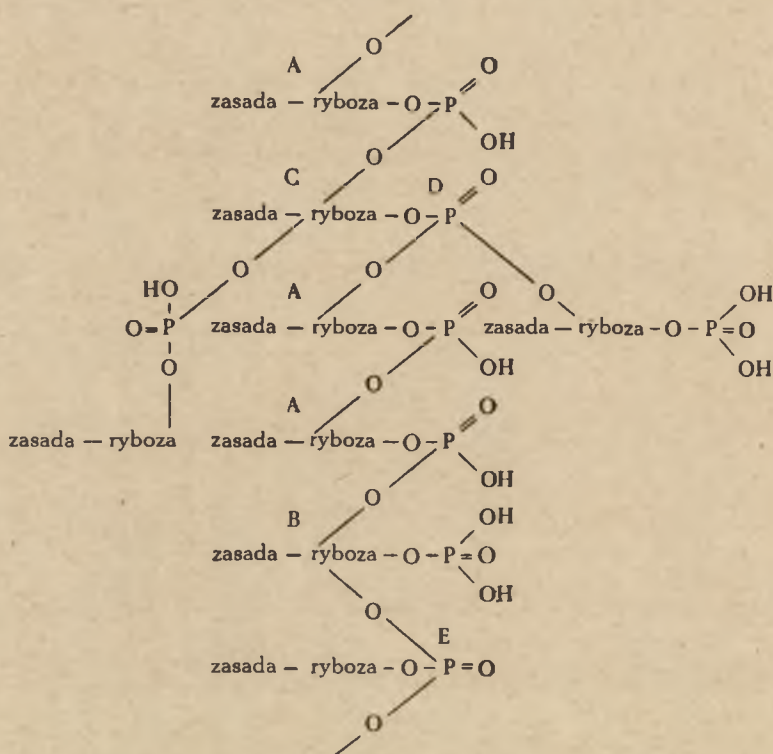


Rys. 54. Schemat rozgałęzionego łańcucha KRN (Brown i Todd 1952).

W przedstawionym schemacie (rys. 54) na każdą cząsteczkę kwasu fosforowego przypada jedna wolna grupa pierwszorzędowa. Grupa drugorzędowa występuje tylko na zakończeniu łańcucha. Wyniki miareczkowań wykazały obecność znacznych ilości grup drugorzędowych (93, 273), natomiast zawartość grup pierwszorzędowych — mniejszą niż wynika z teoretycznych rozważań. Ten niedobór pierwszorzędowych grup fosforanowych wskazuje na możliwości rozgałęzienia łańcucha KRN przez trzykrotną estryfikację kwasu fosforowego (46). Układ taki jest mało odporny na działanie alkaliów, toteż tego typu rozgałęzienia są mało prawdopodobne w łańcuchu KDN.

W oparciu o omawiane wyniki Jordan (130) w 1952 r. zaproponował następujący schemat łańcucha KRN (rys. 55).

W schemacie tym najczęściej spotykane wiązanie międzynukleotydo-
we, w którym ryboza jest podwójnie zestryfikowana, zaznaczono literą A.
Literą B zaznaczono wiązanie międzynukleotydo-
we, w którym ryboza jest potrójnie zestryfikowana. Takie wiązanie tłumaczyłoby pewien nadmiar
drugorzędowych grup fosforanowych, stwierdzonych potencjometrycz-



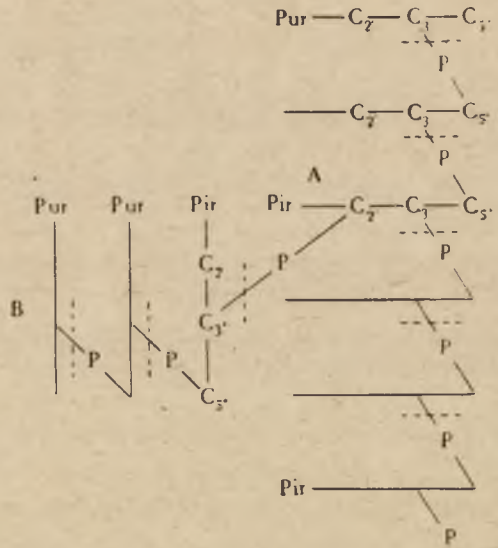
Rys. 55. Schemat rozgałęzionego łańcucha KRN (Jordan 1952).

nym miareczkowaniem przez Fletchera i współpracowników (97); Zitle (273) i innych. Grupy drugorzędowe, jak już wspomniano wyżej, mogą występować również na zakończeniach łańcucha. Miejsca rozgałęzienia łańcucha za pośrednictwem wolnej grupy wodorotlenowej rybozy (ryboza potrójnie zestryfikowana) zaznaczono literą C. Punkty zaznaczone literą D podają nam miejsca rozgałęzienia przez trzykrotną estryfikację kwasu fosforowego. Jordan przewiduje również możliwości powiązania łańcucha przez kwas fosforowy potrójnie zestryfikowany, tak jak podano w punkcie E. Za tego typu wiązaniem przemawiają prace Becke-

ra i Allena (12). Stwierdzili oni, że w KRN drożdżowym na każde 25 ryboz przynajmniej jedna posiada dwie wolne grupy hydroksylowe przy C_2' i C_3' (ugrupowania glikolowe). Do wniosków tych doszli wymienieni autorzy na podstawie reakcji utleniania KRN, przeprowadzanej przy pomocy czteroocianu ołowiu. Proces ten prowadzący, podobnie jak i utlenianie nadjodanem, do rozszczepiania ugrupowania glikolowego, jest jednakże znacznie szybszy — kończy się już po upływie 5 minut (83).

W kilku innych pracowniach również stwierdzono, że w enzymatycznym (rybonukleaza) hydrolizacie KRN drożdżowego występuje pewna ilość związków dających się miareczkować nadjodanem lub czteroocianem ołowiu (2, 55).

Prawdopodobieństwo występowania rozgałęzionych łańcuchów KRN zostało zwiększone przez ostatnie prace Cohna i Volkina (66). Hydrolizowali oni KRN (drożdżowy, wątroby cielej, grasicy) dwueterazą, otrzymaną z jadu węży i po unieczynnieniu 5'-nukleotydyzy otrzymali w hydrolizacie przede wszystkim 5'-fosfonukleozydy (80%) zarówno purynowe jak i pirymidynowe. Stwierdzono również, że w otrzymanym hydrolizacie znaczna część cytydyny i urydyny występuje w postaci mieszaniny 2', 5'-dwufosfonukleozydów i 3', 5'-dwufosfonukleozydów. Znalaziono tam także prawie taką samą ilość nukleozydów purynowych. Autorzy tłumaczą to tym, że pierwsze z tych produktów (dwufosfonukleozydy) powstają podczas hydrolizy rozgałęzionego łańcucha z miejsc oznaczonych na rysunku literą A. Nukleozydy purynowe powstają na zakończeniach tych rozgałęzień w miejscach oznaczonych literą B, jak to widać z załączonego schematu (rys. 56). Linia przerywaną zaznaczono działanie dwueterazy.



Rys. 56. Schemat rozgałęzionego łańcucha KRN. (Cohn i Volkin 1953).

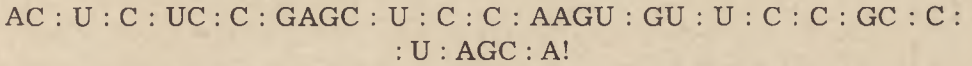
Należy jednakże dodać, że mimo wielu sugestii, do dziś dnia brak jest przekonujących, bezspornych dowodów, stwierdzających występowanie rozgałęzień w łańcuchu KRN.

Sekwencja nukleotydów

Postępy w badaniach struktur łańcucha KN wpłynęły na wzmożenie zainteresowań składem tych związków, a następnie kolejnością ułożenia poszczególnych składników w długim łańcuchu polinukleotydowym. To ostatnie zagadnienie staje się coraz bardziej palące, gdyż wyniki analiz wskazują, że tkanki różnych gatunków roślin czy zwierząt różnią się nie tylko zawartością obu rodzajów kwasów, ale należy się liczyć także z różnicami w składzie i właściwościach tych związków. Tak np. Bendich i współpracownicy (20, 22), po przebadaniu KDN wyizolowanych z jelit, śledziony, trzustki, nerek, mózgu, jąder i regenerującej się wątroby, stwierdzili w każdym z tych narządów występowanie przynajmniej dwu rodzajów KDN, różniących się rozpuszczalnością w 0,87% NaCl. Douncé (74), zakładając, że KN służą do syntezy łańcucha białkowego, wysuwa nawet hipotezę, że w każdej komórce występuje tyle różnego rodzaju KN, ile powstaje tam rodzajów specyficznych białek. Taka różnorodność w budowie cząsteczek KN jest możliwa, gdyż, przyjmując np. masę cząsteczki KN na 100 000 i całkowitą swobodę w rozmieszczaniu czterech nukleotydów w długim łańcuchu polinukleotydowym, to teoretycznie mogłoby powstać 4×10^{87} różnych KN. Toteż w ostatnich latach wiele wysiłków poświęcono poszukiwaniom metod, pozwalających na ustalenie sekwencji nukleotydów w łańcuchu KN.

Stara teoria Levene'a, zakładająca, że w łańcuchach tych związków nukleotydy purynowe i pirymidynowe przeplatają się wzajemnie, upadła, stwierdzono bowiem, że w wielu KRN stosunek puryn do pirymidyn daleko odbiega od jedności. Znalezione również w hydrolizatach zarówno KRN (200) jak i KDN (236, 238, 239) dwunukleotydy lub fosfodwunukleozydy, zbudowane z tego samego rodzaju zasad. Szczególnie owocne były prace, wykonane w pracowni Markhama i Smitha (201). Autorzy ci trawili KRN rybonukleazą, dializowali powstały hydrolyz i analizowali następnie zarówno składniki, które przeszły przez błonę półprzepuszczalną, jak i fragmenty, które pozostały w worku celofanowym. Te ostatnie uważano dotychczas za rdzeń kwasu nukleinowego, długi łańcuch zbudowany z nukleotydów purynowych (197). Okazało się, że są to tylko krótkie segmenty, zbudowane z dwu do czterech nukleotydów purynowych, a zakończonych nukleotydem pirymidynowym *a* lub *b*. W dializacie stwierdzono natomiast występowanie przede wszystkim nukleotydów pirymidynowych oraz minimalnej ilości cyklicznych mononukleotydów purynowych. Po przeanalizowaniu omawianych fragmentów, Markham i Smith ustalili podany niżej schemat KRN (rys. 56a), w którym nukleotydy powiązane są w długi, nierozgałęziony łańcuch o dość

urozmaiconym składzie. Sekwencji poszczególnych fragmentów nie udało się jednak ustalić:

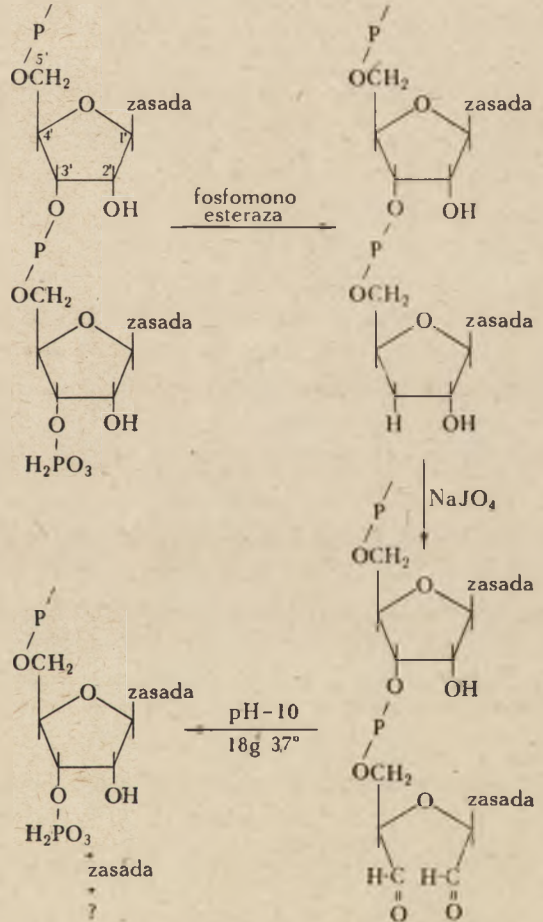


Rys. 56a. Schemat nierozgałęzionego łańcucha KRN (Markham i Smith 1952).

W podanym łańcuchu literami A, G, C, U oznaczono kwasy: adenilowy, guanilowy, cytydylowy i urydylowy. Dwukropkiem oznaczono wiązania ulegające hydrolytycznemu działaniu rybonukleazy, wykrzyknikiem — cykliczny nukleotyd purynowy, znajdujący się na końcu łańcucha. Na pytanie, czy łańcuch KRN może być także zakończony nukleotydem pirydynowym, autorzy nie mogą odpowiedzieć, gdyż cykliczne wiązanie w nukleotydach pirymidynowych ulega rozszczepieniu w czasie trawienia rybonukleazą. Dowolnie także rozmieszczono w łańcuchu poszczególne, znalezione w hydrolizatach fragmenty, brak bowiem metody pozwalającej na ustalenie ich kolejności. Może ostatnia praca, jaka wyszła w listopadzie 1954 r. z pracowni Markhama (267, 268) pozwoli choć w części na rozwiązanie tego zagadnienia.

Metoda polega na defosforylacji końcowego nukleotydu przy pomocy fosfomonoesterazy. Dzięki usunięciu kwasu fosforowego, na zakończeniu łańcucha powstaje ugrupowanie glikolowe, które utlenia się nadjodanem. Rozszczepiony końcowy nukleotyd można następnie oderwać od łańcucha polinukleotydowego

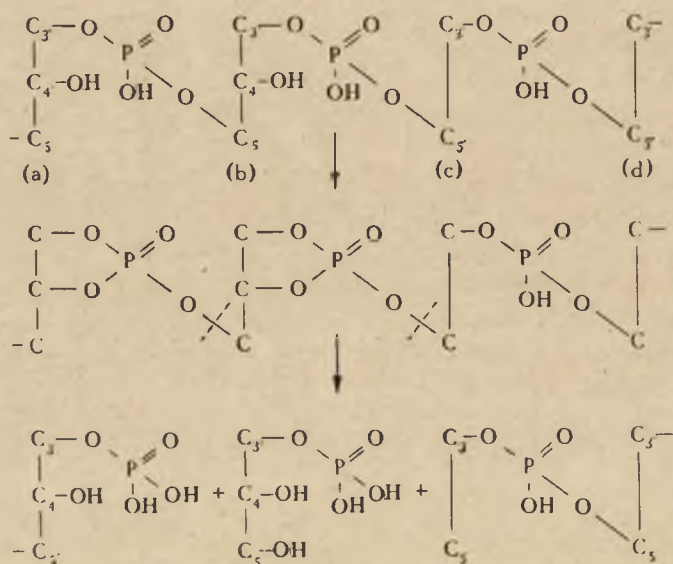
przez podgrzanie roztworu do temp. 37° przez 18 godzin w środowisku alkalicznym (pH-10). Powstaje łańcuch skrócony o 1 nukleotyd (rys. 57).



Rys. 57. Degradacja oligonukleotydu. (Whitfeld 1954).

Przez powtarzanie tego procesu można usuwać kolejno następne nukleotydy. Metoda ta została wypróbowana z dobrym efektem na kilku dwu- i trójnukleotydach. Czy będzie ją można zastosować do dłuższych łańcuchów — przyszłość pokaże. Należy zaznaczyć, że tą metodą można oznaczać sekwencje nukleotydów tylko w łańcuchu poliribonukleotydowym nierozgałęzionym.

W ostatnich dwóch latach przeprowadzono również pewne próby w celu ustalenia sekwencji nukleotydów w łańcuchu KDN. Pewne światło na te zagadnienia rzucają prace Tamma i Chargaffa (248, 245, 246, 247), którzy, hydrolizując KDN w środowisku kwaśnym (pH-1,6, przez 24 godziny w temp. 37°), usunęli z niego wszystkie zasady purynowe bez naruszenia struktury łańcucha i rozmieszczenia zasad pirymidynowych. Podczas tych procesów KDN ulega pewnej depolimeryzacji i powstają

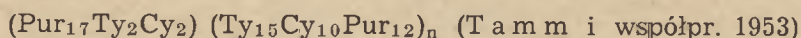


Rys. 58. Degradacja łańcucha kwasu apurynowego w środowisku alkalicznym. (Tamm i współpr. 1953).

mniejsze agregaty o masie około 1500, nazwane przez autorów „kwasami apurynowymi“. Łańcuch kwasu apurynowego zbudowany jest z nukleotydów pirymidynowych oraz z dezoksyrybofosforanów. W tych ostatnich stwierdzono obecność wolnych grup aldehydowych (barwna reakcja z odczynnikiem Schiffa). Okazało się, że kwas apurynowy, podobnie jak KRN, w środowisku alkalicznym ulega częściowej degradacji. Zjawisko to autorzy tłumaczą tym, że po oderwaniu się puryn część dezoksyryboz przechodzi z postaci półacetalowej w postać aldehydową, dzięki czemu

przy C_4' powstaje wolna grupa hydroksylowa. Takie ugrupowanie jest podatne na działanie alkaliów, gdyż powstają możliwości tworzenia się przejściowych układów cyklicznych, jak to podano na rys. 58.

Na rysunku tym (a) i (b) przedstawiają fosfodezoksycukry w postaci aldehydowej, (c) i (d) — nukleotydy pirymidynowe lub fosfodezoksyrybozę w postaci półacetalowej. Analiza fragmentów, otrzymanych podczas hydrolizy kwasu apurynowego wykazała, że w łańcuchu KDN występują kolejno pewne przestrzenie nukleotydów pirymidynowych, przeplatane fragmentami, w których dominują nukleotydy purynowe. Na podstawie tych analiz, zdaniem autorów, łańcuch KDN możnaby ująć w następującej wzór:



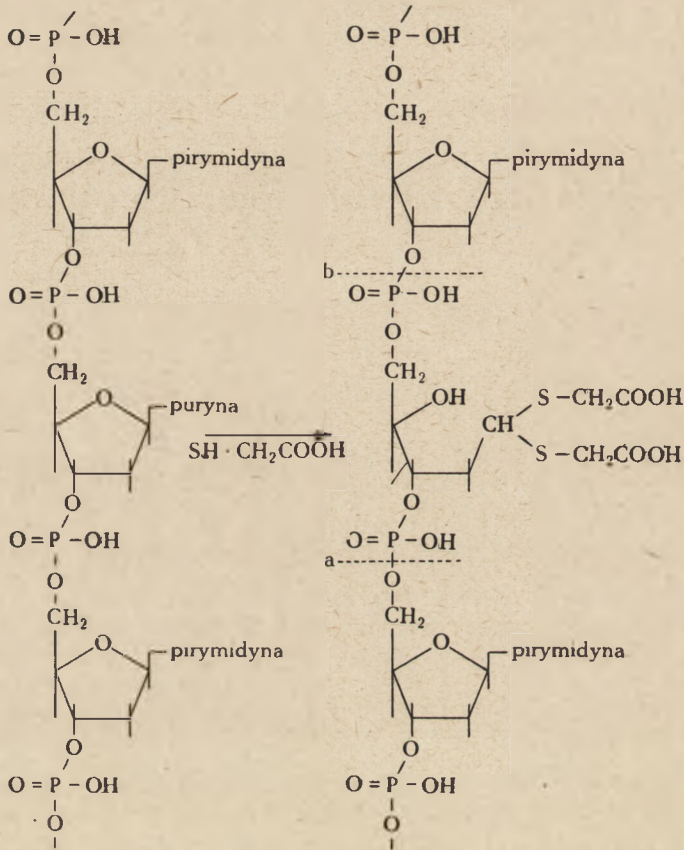
W podanym wyżej wzorze litery: Pu, Ty i Cy oznaczają nukleotydy purynowe, kwas tymidyłowy i cytydyłowy.

W roku 1954 wprowadzono (129) drugą metodę, która może pozwoli na choćby częściowe ustalenie sekwencji w łańcuchu KDN. Metoda opiera się na spostrzeżeniach Li i współpracowników (191) oraz T a m m a i współpracowników (245), że KDN, trawiony słabym kwasem mineralnym, traci zasady purynowe, a związane z łańcuchem KDN dezoksyrybozy przechodzą w postać aldehydową. Powstaje kwas apurynowy. Po podziałaniu stężonym kwasem tioglikolowym (98%) w obecności katalizatorów (chlerek cynkowy i bezwodny siarczan sodu), na miejsce każdej puryny przyłączają się dwie grupy karboksymetylmerkaptolowe, jak to zaznaczono na rys. 59.

Taki łańcuch, w myśl omawianej teorii B r o w n a i T o d d a, powinien ulegać hydrolitycznemu działaniu alkaliów, gdyż w otwartym łańcuchu dezoksyrybozy powstaje przy C_4' wolna grupa hydroksylowa. Dzięki temu powstaje możliwość utworzenia się cyklicznego dwuestru fosforanowego, podobnie jak przy alkalicznej hydrolizie KRN. Łańcuch może zostać przerwany w miejscach zaznaczonych linią przerywaną (a i b). I w jednym i w drugim przypadku powstanie mieszanina polinukleotydów pirymidynowych, z których każdy zakończony jest grupą 2-dezoksy-D-rybofosforanową ze związanymi z nią dwoma grupami karboksymetylmerkaptalowymi. Po rozdzieleniu mieszaniny (chromatograficznie, jonoforetycznie) oznaczanie stosunku P:S pozwala na ustalenie ilości nukleotydów pirymidynowych w rozdzielonych fragmentach łańcucha. W jednym z takich fragmentów znaleziono np. 1,95 moli tyminy, 1 mol cytozyny i 3,94 atomy fosforu na 2 atomy siarki. Z danych tych wynika, że analizowany związek był trójnukleotydem pirymidynowym zakończonym fosfodezoksyrybozą z dwoma grupami karboksymetylmerkaptalowymi. Jest

to zarazem jeszcze jeden z dowodów, że w łańcuchu KDN może występować obok siebie kilka nukleotydów pirymidynowych.

Przy podsumowaniu dotychczasowych osiągnięć na temat budowy kwasów nukleinowych można dziś przyjąć, że budowa nukleozydów i nukleotydów została ustalona, co potwierdzono syntezą. Ustalono również,



Rys. 59. Oznaczenie kolejności nukleotydów w KDN.
(Jones i Letham 1954).

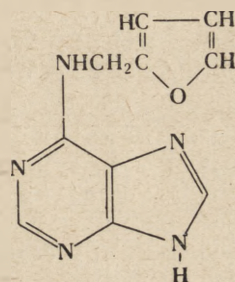
że w łańcuchach zarówno KRN jak i KDN wiązania międzynukleotydowe są typu dwuestru, w którym C₃ jednego nukleozydu jest powiązany kwasem fosforowym z C₅ drugiego. Łańcuchy KDN są nierozgałęzione, a rozgałęzień w KRN dotychczas nie udowodniono. Należy przyjąć również dużą różnorodność w rozmieszczeniu nukleotydów purynowych i pirymidynowych. Ustalono budowę mniejszych fragmentów łańcucha i stwierdzono, że mogą w nich występować obok siebie nukleotydy o takich samych

zasadach. Sekwencji dłuższych fragmentów nie udało się dotychczas ustalić.

W tym krótkim referacie omówiono tylko najważniejsze prace, gdyż badania na ten temat, szczególnie w ostatnich latach, mnożą się w postępie geometrycznym.

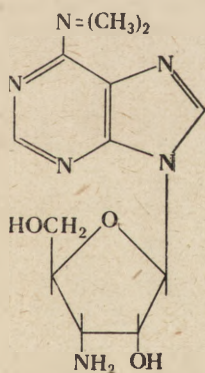
Ostatnie miesiące przyniosły nowe osiągnięcia, znaleziono nowe pochodne purynowe nieznanne dotychczas.

W KDN różnego pochodzenia stwierdzono występowanie czynnika niezbędnego do procesu podziału komórki (274). Czynniki ten, nazwany kinetyną (275), okazał się aktywny w bardzo wielkim rozcieńczeniu (0,01 część na milion), lecz tylko w obecności auksyny (kwas indoloocetowy). Udało się wyizolować kinetynę z KDN spermy śledzi, z KDN grasicy cielej a następnie zanalizować, a nawet otrzymać syntetycznie aktywną kinetynę (276). Okazało się że jest to 6-furfuryloaminopuryna, związek o następującej budowie (rys. 60).



Rys. 60.

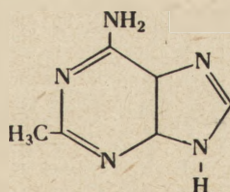
Podobnie nową pochodną adeniny, metylowaną przy grupie aminowej, znaleziono w antybiotyku puromycynie, a nawet otrzymano ją syntetycznie (277—279). Okazało się że puryna ta powiązana jest w puromycynie wiązaniem glikozydowym z aminorybozą, tworząc aminonukleozyd: 6-dwumetyloamino-9-(3'-amino-3'-dezoksy-β-D-rybofuranozyl)-purynę (rys. 61).



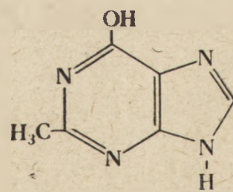
Rys. 61.

Aminonukleozyd ten świetnie zwalcza gruczołaki i *Trypanosoma equiperdum* myszy (280).

Nieznanne dotychczas pochodne adeniny znaleziono również w grupie witaminy B₁₂. Są to 2-metylopuryny. Jedną z nich znaleziono w tzw. czynniku A



Rys. 62.



Rys. 63.

(factor A) wyizolowanym z treści przewodu pokarmowego i z kału cieląt (281). Czynniki ten tym różni się od witaminy B₁₂, że w swojej cząsteczce, zamiast 5,6-dwumetylobenzimidazolu, zawiera 2-metyloadeninę (rys. 62). Drugą znaleziono w czynniku H, wyizolowanym z nawozu świń (282). Znaleziono tam 2-metylohipoksantynę (rys. 63).

L I T E R A T U R A

1. Alberton R., Overend G. W., Stacey M., *J. Chem. Soc.*, 255 (1952).
2. Allen F. W., *Federation Proc.*, **10**, 155 (1951).
3. Allen F. W., *Annual Rev. Biochem.*, **23**, 99 (1954).
4. Altmann R., *Archiv. Anat. Physiol.*, 524 (1889).
5. Anderson A. S., Barker G. R., Gulland J. M., Lock M. V., *J. Chem. Soc.*, 369 (1952).
6. Anderson W., Hayes D. H., Michelson A. M., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 1882 (1954).
7. Arvidson H., Eliasson N. A., Hammarsten E., Reichard P., Ubisch H., Bergstrom S., *J. Biol. Chem.*, **179**, 169 (1949).
8. Ascoli A., *Z. Physiol. Chem.*, **31**, 161 (1900/01).
9. Astbury W. T., *Nucleic Acid Cambridge*, 1947, str. 66.
10. Astbury W. T., Bell F. O., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **6**, 109 (1938).
11. Bachster M., *Ber.*, **63**, 1000 (1930).
12. Backer R. A., Allen F. W., *J. Biol. Chem.*, **195**, 429 (1952).
13. Baddailay J., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 648 (1947).
14. Baer E., Kates M., *J. Biol. Chem.*, **185**, 615 (1950).
15. Barker J. R., Gulland J. M., *J. Chem. Soc.*, 625 (1943).
16. Barker J. R., Farrar K. R., Gulland J. M., *J. Chem. Soc.*, 21 (1947).
17. Baily, Gaume J. W., *Bull. Soc. Chim.*, **2**, 354 (1935).
18. Bauer F., *Hofmeisters Beitrage*, **10**, 345 (1907).
19. Behrend R., Roosen O., *Liebigs Ann.*, **251**, 235 (1888).
20. Bendich A., *Exper. Cell Research. Supl.* **2**, **181**, (1952).
21. Bendich A., Brown J. B., Philips F. S., Thiersch J. B., *J. Biol. Chem.*, **183**, 267 (1950).
22. Bendich A., Russel P. J., Brown G. B., *J. Biol. Chem.*, **203**, 307 (1953).
23. Bergstrom S., Arvidson H., Hammarsten E., Eliasson N. A., Reichard P., Ubisch H., *J. Biol. Chem.*, **177**, 495 (1949).
24. Bielischowsky F., Klein W., *Z. physiol. Chem.*, **207**, 202 (1932).
25. Biełozierskij A. N., *Mikrobiologia*, **8**, 504 (1941).
26. Biscaro G., Belloni A., *Annual Soc. Chim. Milano*, **II**, 18 (1904).
27. Brady T., *Biochem. J.* **36**, 478 (1942).
28. Bredereck H., *Z. physiol. Chem.*, **223**, 61 (1934).
29. Bredereck H., *Ber.*, **65**, 1830 (1932).
30. Bredereck H., *Ber.*, **66**, 198 (1933).
31. Bredereck H., Muller G., Berger E., *Ber.*, **73**, 1058 (1940).
32. Bredereck H., Berger E., Ehrenberg J., *Ber.*, **73**, 269 (1940).
33. Brown D. M., Lythgoe B., *J. Chem. Soc.*, 1990 (1950).
34. Brown D. M., Haynes L. J., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 3299 (1950).
35. Brown D. M., Dekker C. A., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 2715 (1950).
36. Brown D. M., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 44 (1952).
37. Brown D. M., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 52 (1952).
38. Brown D. M., Magrath D. J., Todd A. R., *Chem. Soc.*, 2708 (1952).
39. Brown D. M., Fasman J. D., Magrath D. J., Todd A. R., Cochran W., Woolfson M. M., *Nature*, **172**, 1184 (1953).
40. Brown D. M., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 2040 (1953).
41. Brown D. M., Heppel L. A., Hilmoer R. J., *J. Chem. Soc.*, 40 (1954).

42. Brown D. M., Fasman J. D., Magrath D. J., Todd A. R., Cochran W., Woolfson M. M., *J. Chem. Soc.*, 1448 (1954).
43. Brown G. B., Weliky V. S., *J. Biol. Chem.*, **204**, 1019 (1953).
44. Buell M. V., Perkins M. E., *J. Biol. Chem.*, **72**, 745 (1927).
45. Burian R., *Exp. Physiol.*, **3**, 48 (1904).
46. Butler G., *Canad. J. Med. Science*, **31**, 222 (1953).
47. Calvery H. O., *J. Biol. Chem.*, **77**, 489 (1928).
48. Calvery H. O., *J. Biol. Chem.*, **77**, 497 (1928).
49. Calvery H. O., Remsen D. B., *J. Biol. Chem.*, **73**, 593 (1927).
50. Chargaff E., Vischer E., *J. Biol. Chem.* **177**, 429 (1949).
51. Chargaff E., Vischer E., Doniger R., Green C., Misani F., *J. Biol. Chem.*, **177**, 405 (1949).
52. Chargaff E., *J. Cell. comp. Physiol.*, **38**, 41 (1951).
53. Carter C. E., Cohn W. E., *Federation Proc.*, **8**, 190 (1949).
54. Carter C. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 1537 (1951).
55. Cavalieri L. F., Kerr J. E., Angelos A., *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 2567 (1951).
56. Chebulier E., Bernard K., *Helv. Chim. Acta*, **15**, 464 (1932).
57. Chebulier E., Bernard K., *Helv. Chim. Acta*, **15**, 978 (1932).
58. Cecil R., Ogston A. G., *J. Chem. Soc.*, 1982 (1948).
59. Cohen S. S., *J. Biol. Chem.*, **158**, 255 (1945).
60. Cohen S. S., *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 2811 (1951).
61. Cohen S. S., Stanley W. M., *J. Biol. Chem.*, **144**, 589 (1942).
62. Cohn W. E., *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 1471 (1950).
63. Cohn W. E., *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 2811 (1950).
64. Cohn W. E., Volkin E., *Nature*, **167**, 483 (1951).
65. Cohn W. E., Volkin E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **35**, 465 (1952).
66. Cohn W. E., Volkin E., *J. Biol. Chem.*, **203**, 319 (1953).
67. Davidson J. N., Waymouth C., *Biochem. J.*, **38**, 375 (1944).
68. Davis A. R., Newton E. B., Benedict S. R., *J. Biol. Chem.*, **54**, 595 (1922).
69. Davoll J., Lythgoe B., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 233 (1946).
70. Davoll J., Lythgoe B., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 964 (1948).
71. Davoll J., Lythgoe B., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 967 (1948).
72. Davoll J., Lovy B. A., *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 1650 (1951).
73. Dekker C. A., Michelson A. M., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 947 (1953).
74. Dounce A. L., *Enzymologia*, **15**, 251 (1952).
75. Dunn D. B., Smith J. D., *Nature*, **175**, 336 (1955).
76. Ehrenberg L., Hedström H., Löfgren N., Takman B., *Svensk Kem Tidskr.*, **58**, 269 (1946).
77. Ekenstein W. A., Blanksman J. J., *Chem. Weekblad*, **11**, 182 (1914).
78. Elmore D. T., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 3681 (1952).
79. Embden G., Zimmermann M., *Z. physiol. Chem.*, **167**, 137 (1927).
80. Embden G., Zimmermann M., *Z. physiol. Chem.*, **179**, 149 (1928).
81. Embden G., Schmiedt G., *Z. physiol. Chem.*, **181**, 130 (1929).
82. Falconer R., Gulland J. M., *J. Chem. Soc.*, 1369 (1939).
83. Fawaz G., Seraidarian K., *J. Amer. Chem. Soc.* **69**, 966 (1947).
84. Feulgen R., *Z. physiol. Chem.*, **92**, 54 (1914).
85. Feulgen R., *Z. physiol. Chem.*, **100**, 241 (1917).
86. Feulgen R., *Z. physiol. Chem.*, **106**, 249 (1919).
87. Fischer E., *Ber.* **30**, 557 (1897).

88. Fischer E., Ber. **30**, 2227 (1897).
89. Fischer E., Ber., **30**, 2232 (1897).
90. Fischer E., Ber., **30**, 2251 (1897).
91. Fischer E., Ber., **30**, 2238 (1897).
92. Fischer E., Ber., **31**, 2562 (1898).
93. Fischer E., Ber., **32**, 448 (1899).
94. Fischer E., Roder G., Ber., **34**, 3751 (1901).
95. Fischer E., „Untersuchungen in der Puringruppe“, Berlin, Springer (1907).
96. Fischer E., Böttger J., Lehmann-Echternacht H., Z. physiol. Chem., **271**, 246 (1941).
97. Fletcher W. E., Gulland J. M., Jordan D. O., J. Chem. Soc., **33**, (1944).
98. Fletcher W. E., Gulland J. M., Jordan D. O., Dibben H. E., J. Chem. Soc., **30** (1944)
99. Fox J. J., Cavalieri L. F., Chang N., J. Amer. Chem. Soc. **75**, 4315 (1953).
100. Gulland J. M., Holiday E. R., Nature, **132**, 782 (1933).
101. Gulland J. M., Holiday E. R., J. Chem. Soc., 765 (1936).
102. Gulland J. M., Holiday E. R., J. Chem. Soc. 692 (1938).
103. Gulland J. M., Barker G. R., J. Chem. Soc., 625 (1943).
104. Gulland J. M., Jordan D. O., Threlfall C. J., J. Chem. Soc., 1129 (1947).
105. Gulland J. M., Jordan D. O., Taylor H. F., J. Chem. Soc., 1131 (1947).
106. Gulland J. M., Jordan D. O., Nature, **161**, 561 (1948).
107. Hammarsten O., Z. physiol. Chem., **19**, 19 (1894).
108. Hammarsten E., J. Biol. Chem., **43**, 243 (1920).
109. Hammarsten E., Biochem Z., **144**, 338 (1924).
110. Hayes D. H., Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1954.
111. Heiser F., Monatsh, **16**, 190 (1895).
112. Heiser F., Wenzel F., Monatsh, **29**, 157 (1908).
113. Heiser F., Wenzel F., Monatsh, **30**, 147 (1909).
114. Heiser F., Wenzel F., Monatsh, **30**, 377 (1909).
115. Heiser F., Wenzel F., Monatsh, **31**, 357 (1910).
116. Heppel L. A., Markham R., Hilmoie J. R., Nature, **171**, 1152 (1953).
117. Hilbert G. E., Johnson T. B., J. Amer. Chem. Soc., **52**, 1489 (1930).
118. Hilbert G. E., Johnson T. B., J. Amer. Chem. Soc., **52**, 2001 (1930).
119. Hoppe-Seyler F., Med. Chem. Unters. Lab. angew. Chem. Tübingen, 486 (1871).
120. Horbaczewski J., Monatsh f. Chem., **3**, 796 (1882).
121. Horbaczewski J., Z. physiol. Chem., **23**, 226 (1897).
122. Hotchkiss R. D., J. Biol. Chem., **175**, 315 (1948).
123. Johnson T. B., Coghill R. D., J. Amer. Chem. Soc., **51**, 874 (1925).
124. Jones W., Richards A. E., J. Biol. Chem., **17**, 71 (1914).
125. Jones W., Germann H. C., J. Biol. Chem., **25**, 93 (1916).
126. Jones W., Read B. E., J. Biol. Chem., **31**, 39 (1917).
127. Jones W., Read B. E., J. Biol. Chem., **29**, 111 (1917).
128. Jones W., Kennedy R. P., J. Biol. Chem., **33**, 425 (1918).
129. Jones A. S., Letham D. S., Biochim. Biophys. Acta, **14**, 438 (1954).
130. Jordan D. O., Annual Rev. Biochem., **21**, 209 (1952).
131. Jorpes E., Acta Med. Scand., **68**, 503 (1928).

132. Kenner G. W., Taylor C. W., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 1620 (1949).
133. Khyrn J. X., Cohn W. E., *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 1818 (1954).
134. Kizel A. R., Szamszikowa G. A., *Biull. ob.-wa usp. prirody*, **47**, 20 (1938).
135. Klein W., *Z. physiol. Chem.*, **207**, 125 (1932).
136. Klein W., *Z. physiol. Chem.*, **255**, 82 (1938).
137. Klein W., Thannhauser S. J., *Z. physiol. Chem.*, **218**, 173 (1933).
138. Klein W., Thannhauser S. J., *Z. physiol. Chem.*, **224**, 252 (1934).
139. Klein W., Thannhauser S. J., *Z. physiol. Chem.*, **231**, 96 (1935).
140. Kossel A., *Z. physiol. Chem.*, **10**, 250 (1886).
141. Kossel A., *Ber.*, **18**, 1928 (1885).
142. Kossel A., Neumann A., *Ber.*, **26**, 2753 (1893).
143. Kossel A., Neumann A., *Ber.*, **27**, 2215 (1894).
144. Kossel A., Neumann A., *Ber.*, **27**, 2217 (1894).
145. Kossel A., Krüger M., *Z. physiol. Chem.*, **20**, 177 (1895).
146. Kossel A., Steudel H., *Z. physiol. Chem.*, **37**, 177 (1903).
147. Krüger M., *Z. physiol. Chem.*, **18**, 423 (1894).
148. Krüger M., *Z. physiol. Chem.*, **18**, 459 (1894).
149. Krüger M., Salomon G., *Z. physiol. Chem.*, **26**, 358 (1898).
150. Krüger M., Salomon G., *Z. physiol. Chem.*, **24**, 364 (1898).
151. Levene P. A., *J. Amer. Chem. Soc.*, **22**, 329 (1900).
152. Levene P. A., *Biochem. Z.*, **17**, 120 (1909).
153. Levene P. A., *J. Biol. Chem.*, **33**, 229 (1918).
154. Levene P. A., *J. Biol. Chem.*, **40**, 415 (1919).
155. Levene P. A., *J. Biol. Chem.*, **48**, 119 (1921).
156. Levene P. A., *J. Biol. Chem.*, **55**, 437 (1923).
157. Levene P. A., *J. Biol. Chem.*, **63**, 653 (1925).
158. Levene P. A., Mandel J. A., *Z. physiol. Chem.*, **49**, 466 (1906).
159. Levene P. A., Mandel J. A., *Biochem. Z.*, **10**, 215 (1908).
160. Levene P. A., Mandel J. A., *Biochem. Z.*, **9**, 233 (1908).
161. Levene P. A., Jacobs W. A., *Ber.*, **42**, 1198 (1909).
162. Levene P. A., Jacobs W. A., *Ber.*, **42**, 2102, 2469 (1909).
163. Levene P. A., Jacobs W. A., *Ber.*, **42**, 2474, 2703 (1909).
164. Levene P. A., Jacobs W. A., *Ber.*, **43**, 3150 (1910).
165. Levene P. A., Jacobs W. A., *Ber.*, **43**, 3154 (1910).
166. Levene P. A., Jacobs W. A., *Ber.*, **43**, 3161 (1910).
167. Levene P. A., Jacobs W. A., *Ber.*, **44**, 746 (1911).
168. Levene P. A., Jacobs W. A., *Ber.*, **44**, 1031 (1911).
169. Levene P. A., La Forge F. B., *Ber.*, **45**, 608 (1912).
170. Levene P. A., La Forge F. B., *Ber.*, **45**, 614 (1912).
171. Levene P. A., Jacobs W. A., *J. Biol. Chem.*, **55**, 437 (1923).
172. Levene P. A., Simms H. S., *J. Biol. Chem.*, **70**, 327 (1926).
173. Levene P. A., London E. S., *J. Biol. Chem.*, **81**, 711 (1929).
174. Levene P. A., London E. S., *J. Biol. Chem.*, **83**, 793 (1929).
175. Levene P. A., Mori T., *J. Biol. Chem.*, **83**, 803 (1929).
176. Levene P. A., Mikeska L. A., Mori T., *J. Biol. Chem.*, **85**, 785 (1930).
177. Levene P. A., Dillon R. T., *J. Biol. Chem.*, **88**, 753 (1930).
178. Levene P. A., Dmochowski A., *J. Biol. Chem.*, **93**, 563 (1931).
179. Levene P. A., Bass L. W., *Nucleic Acids. The Chemical Catalog Comp. Inc. New York*, 1931.

180. Levene P. A., Harris S. A., J. Biol. Chem., **98**, 9 (1932).
181. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., **94**, 809 (1932).
182. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., **97**, 491 (1932).
183. Levene P. A., Dillon R. T., J. Biol. Chem., **96**, 461 (1932).
184. Levene P. A., Harris S. A., J. Biol. Chem., **101**, 419 (1933).
185. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., **101**, 529 (1933).
186. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., **104**, 385 (1934).
187. Levene P. A., Tipson R. S., Z. physiol. Chem., **234**, V (1935).
188. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., **109**, 623 (1935).
189. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., **121**, 131 (1937).
190. Liebig J., Ann. **62**, 257 (1847).
191. Li C. F., Overend W. G., Stacey M., Nature, **163**, 538 (1949).
192. Loring H. S., J. Biol. Chem., **130**, 231 (1939).
193. Loring H. S., J. Biol. Chem., **130**, 251 (1939).
194. Loring H. S., Hammel M. I., Levy L. W., Rortner H. W., J. Biol. Chem., **196**, 821 (1952).
195. Löfgren N., Lünig B., Acta Chim. Scand., **7**, 225 (1953).
196. Lübawin N., Med.-chem., Unters. Lab. angew. Chem., Tübingen 485 (1371).
197. Magasanik B., Chargaff E., Biochem. Biophys. Acta, **7**, 396 (1951).
198. Marcet A. — „An essay on the chemical history and medical treatment of calcul disorders“, London 1817.
199. Markham R., Smith J. D., Nature, **168**, 406 (1951).
- 199a. Markham R., Matthews R. E. F., Smith J. D., Nature **173**, 539 (1954).
200. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., **52**, 558 (1952).
201. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., **52**, 565 (1952).
202. McDonald D. L., Knight C. A., J. Biol. Chem., **202**, 45 (1953).
203. Merrifield R. B., Wooley D. W., J. Biol. Chem., **197**, 521 (1952).
204. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 951 (1953).
205. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 34 (1954).
206. Miescher F., cytow. wg Hoppe-Seyler F., „Medizinisch-chemische Untersuchungen“, A. Hirschwald, Berlin, **4**, 441 (1871).
207. Miescher F., Med.-chem., Untersuch. Lab. angew. Chem., Tübingen, 502 (1871).
208. Miescher F., Verhandl. Naturf. Ges. Basel., **6**, 138 (1874).
209. Miescher F., *Die histologischen und physiologischen Arbeiten*, F. C. Vogel, Lipsk 1897.
210. Neuberg C., Ber., **35**, 1467 (1902).
211. Neuberg C., Ber., **35**, 1473 (1902).
212. Neuberg C., Brahn B., Biochem. Z., **5**, 438 (1907).
213. Newton E. B., Davis A. R., J. Biol. Chem., **54**, 601 (1922).
214. Osborne T. B., Harris J. F., Z. Physiol. Chem., **36**, 85 (1902).
215. Osborne T. B., Heyl F. W., A. J. Physiol., **21**, 157 (1908).
216. Ostern P., Biochem. Z., **221**, 64 (1930).
217. Ostern P., Baranowski T., Teraszakowéc J., J. Physiol. Chem., **251**, 258 (1938).
218. Overend W. G., Shafizadeh F., Stacey M., J. Chem. Soc., 671 (1950).
219. Overend W. G., Shafizadeh F., Stacey M., J. Chem. Soc., 1027 (1950).
220. Plósz P., Med.-chem. Unters. Lab. angew. Chem., Tübingen, 463 (1871).

221. Reichmann M. E., Vavin R., Doty P., *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 3203 (1952)
222. Salomon G., *Z. Physiol. Chem.*, **11**, 410 (1889).
223. Scherer J., *Liebigs Ann.*, **73**, 328 (1850).
224. Schittenhel A., *Z. Physiol. Chem.*, **42**, 251 (1904).
225. Schittenhel A., *Z. Physiol. Chem.*, **43**, 228 (1905).
226. Schlenk F., *J. Biol. Chem.*, **146**, 619 (1942).
227. Schmidt G., *Z. physiol. Chem.*, **179**, 243 (1928).
228. Schmidt G., Pickels E. G., Levene P. A., *J. Biol. Chem.*, **127**, 251 (1939).
229. Schulze E., Bosshard E., *Z. Physiol. Chem.*, **9**, 443 (1885).
230. Schulze E., Bosshard E., *Z. physiol. Chem.*, **9**, 420 (1885).
231. Schulze E., Bosshard E., *Z. physiol. Chem.*, **10**, 80 (1886).
232. Schwander H. i współpr., *Chelv. Chim. Acta*, **32**, 2356, 2508, 2510 (1949).
233. Schwerdt C. E., Lorrington H. S., *J. Biol. Chem.*, **167**, 593 (1947).
234. Scott J. F., *Biochim. Biophys. Acta*, **2**, 1 (1948).
235. Signer R., Caspersson T., Hammarsten E., *Nature*, **141**, 128 (1938).
236. Sinsheimer R. L., Koerner J. F., *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 283 (1952).
237. Sinsheimer R. L., *Science*, **120**, 551 (1954).
238. Smith J. D., Markham R., *Biochim. Biophys. Acta*, **8**, 350 (1952).
239. Smith J. D., Markham R., *Nature*, **170**, 120 (1952).
240. Spies J. R., Drahe N. L., *J. Amer. Chem. Soc.*, **57**, 775 (1935).
241. Steudel H., *Z. physiol. Chem.*, **49**, 406 (1906).
242. Steudel H., *Z. physiol. Chem.*, **77**, 497 (1912).
243. Steudel H., *Z. physiol. Chem.*, **241**, 84 (1936).
244. Stern K. G., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **34**, 663 (1952).
245. Tamm C., Hodes M. E., Chargaff E., *J. Biol. Chem.*, **195**, 49 (1952).
246. Tamm C., Shapiro H. S., Chargaff E., *J. Biol. Chem.*, **199**, 313 (1952).
247. Tamm C., Shapiro H. C., Lipshitz R., Chargaff E., *J. Biol. Chem.*, **203**, 673 (1953).
248. Tamm C., Chargaff E., *J. Biol. Chem.*, **203**, 689 (1953).
249. Tennent H. G., Vilbrandt C. F., *J. Amer. Chem. Soc.*, **65**, 424 (1943).
250. Thannhauser S. J., Dorfmueller G., *Z. physiol. Chem.*, **95**, 259 (1915).
251. Thannhauser S. J., *Z. Physiol. Chem.*, **107**, 187 (1919).
252. Thannhauser S. J., Angermann M., *Z. physiol. Chem.*, **186**, 13 (1929).
253. Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 647 (1946).
254. Todd A. R., *Proc. Nat. Ac. Science USA*, **40**, 748 (1954).
255. Unger B., *Liebigs Ann.*, **51**, 395 (1844).
256. Virchow R., *Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol.*, **35**, 358 (1866).
257. Vischer E., Chargaff E., *J. Biol. Chem.*, **168**, 781 (1947).
258. Vischer E., Chargaff E., *Ann. Rev. Biochem.*, **17**, 201 (1948).
259. Vischer E., Chargaff E., *J. Biol. Chem.*, **176**, 715 (1948).
260. Vischer E., Zamenhof E., Chargaff E., *J. Biol. Chem.*, **177**, 429 (1948).
261. Vischer E., Chargaff E., *J. Biol. Chem.*, **176**, 703 (1948).
262. Vischer E., Chargaff E., *Federation Proc.*, **7**, 197 (1948).
263. Volkin E., Carter W. E., *Federation Proc.*, **11**, 303 (1952).
264. Weed L. L., *Cancer Res.*, **11**, 470 (1951).
265. Weed L. L., Wilson D. W., *J. Biol. Chem.*, **189**, 435 (1951).
266. Wheeler H. L., Johnson T. B., *Amer. Chem. J.*, **29**, 492 (1903).

267. Whitfield P. R., Markham R., *Nature*, **171**, 1151 (1953) .
268. Whitfield P. R., *Biochem. J.*, **58**, 390 (1954).
269. Wyatt G. R., *Biochem. J.* **47**, VII (1950).
270. Wyatt G. R., *Biochem., J.* **48**, 581 (1951).
271. Wyatt G. R., *Exp. Cell. Res. Supl.*, **2**, 201 (1952).
272. Wyatt G. R., Cohen S. S., *Nature*, **170**, 1072 (1952).
273. Zittle C. A., *J. Biol. Chem.*, **166**, 491 (1946).
274. Jablonski J. R., Skoog F., *Physiol. Plantar.*, **7**, 16 (1954).
275. Miller C. O., Skoog F., Saltza M. H., Strong F. M., *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 1392 (1955).
276. Miller C. O., Skoog F., Okumura F. S., Saltza M. H., Strong F. M., *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 2662 (1955).
277. Backer B. R., Joseph J. P., Williams J. H., *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 1 (1955).
278. Backer B. R., Schaub R. E., Williams J. H., *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 7, (1955).
279. Backer B. R., Schaub R. E., Joseph J. P., Williams J. H., *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 12 (1955).
280. Backer B. R., Schaub R. E., *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 2396 (1955).
281. Brown F. B., Cain J. C., Gant D. E., Parker L. F. J., Smith E. L., *Bioch. J.*, **59**, 82 (1955).
282. Brown F. B., Smith E. L., *Bioch. J.*, **56**, Proc. Bioch. XXXIV (1954).

WANDA LEYKO i BRONISŁAW FILIPOWICZ

Przestrzenna budowa kwasów nukleiniowych

Kwasy nukleinowe (KN) są to polimery o długim łańcuchu i o dużym ciężarze cząsteczkowym. Dość dobrze poznane zostały elementy wchodzące w skład nukleotydów, monomerów, z których zbudowany jest łańcuch. Ustalono miejsca powiązania tych elementów: puryn i pirymidyn z cukrami i kwasem fosforowym, a uzyskane wyniki potwierdzono syntezami. Ustalono również, że głównym, jeżeli nie jedynym, wiązaniem międzynukleotydowym jest wiązanie typu dwuestru, w którym kwas fosforowy wiąże grupę hydroksylową C_3 , jednego nukleozydu z grupą hydroksylową C_5 , drugiego nukleozydu. Odtworzono mniejsze fragmenty łańcuchów różnego rodzaju kwasów nukleiniowych, opracowano metody izolowania tych związków w możliwie niezmienionym składzie itp. Na otrzymanie tych wyników złożyła się osiemdziesięcioletnia praca całej plejady uczonych. Natomiast przestrzenna budowa kwasów nukleiniowych jest jeszcze daleka od ostatecznego wyjaśnienia, ale i historia wysiłków nad rozwiązaniem tego zagadnienia nie jest jeszcze zbyt długa. Badania ostatnich lat podają jednak wiele ciekawych koncepcji struktury tych związków. Przytoczmy w dużym skrócie najważniejsze prace na ten temat.

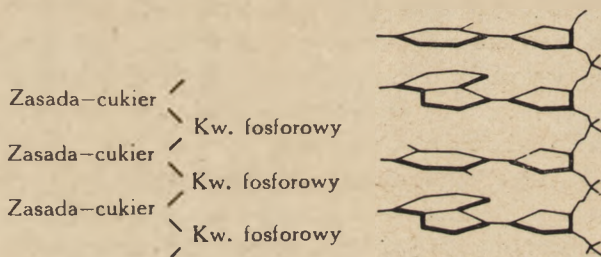
Pierwsze poglądy na budowę przestrzenną kwasów nukleiniowych ogłosił w roku 1938 *Astbury* (3, 4), a następnie przedstawił w roku 1946 na Sympozjum o kwasach nukleiniowych w Cambridge (2). Na podstawie rozważań teoretycznych, uwzględniając dużą gęstość właściwą kwasów nukleiniowych oraz wymiary atomowe, *Astbury* dochodzi do wniosku, że odległości między kolejnymi nukleotydami muszą być niezwykle małe. Gęstość dezoksyrybonukleinianu sodu grasicy równa się $1,63 \text{ g/cm}^3$, przeciętny ciężar cząsteczkowy nukleotydu wynosi około 330, a przeciętna jego powierzchnia, wyliczona ze znanych wymiarów atomowych, około $13,5 \times 8 \text{ \AA}$. Jeśli przyjąć, że nukleotydy leżą jeden nad drugim w odległości T od siebie, to:

$$T \times (13,5 \times 8) \times 1,63 = 1,65 \times 330$$

$$\text{stad } T = 3,1 \text{ \AA}$$

($1,65 \times 10^{-24}$ g jest jednostką ciężaru atomowego tj. jedną szesnastą masy atomu tlenu).

Na podstawie tych wyliczeń Astbury wyraża pogląd, że cząsteczki dezoksyrybonukleinianu sodu i innych polinukleotydów o podobnie dużej gęstości, tworzą sztywne kolumny ściśle nałożonych na siebie nukleotydów, podobnie do monet ułożonych w rulon, jedna na drugiej. Zdjęcia rentgenograficzne, wykonane dla dezoksyrybonukleinianu sodu, potwierdzają zdaniem Astbury'ego, ten pogląd. Zdjęcia wykazują silny refleks południkowy (merydionalny) w odległości 3,4 Å. Astbury odległość tę przyjmuje za przeciętną grubość nukleotydu. Ponieważ ze zdjęć tych wynika, że podstawowy, powtarzający się układ wzdłuż osi włókna leży w odległości 27 Å, więc zasadniczy element budowy kwasów nukleinowych składałby się z 8 nukleotydów. Na podstawie badań rentgenograficznych nie można jednak wysnuć wniosków co do rodzaju połączeń i kolejności nukleotydów. Astbury dodaje, że przytoczone przez niego dane nie wykluczają możliwości śrubowej budowy cząsteczki. Przy budowie śrubowej nukleotydy sąsiednich cząsteczek musiałyby się ściśle przeplatać w bardzo regularny sposób, co wydaje się Astbury'emu mało prawdopodobne.



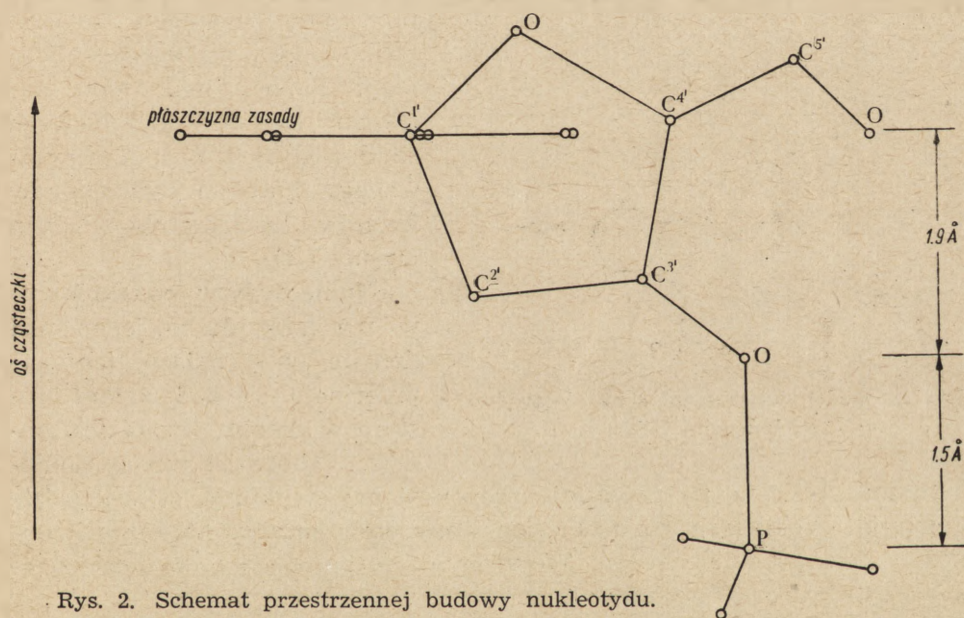
Rys. 1. Schemat budowy polinukleotydu (wg książki Butlera i Randalla „Progress in Biophysics“ 1950. Str. 67).

Dla kwasu rybonukleinowego Astbury otrzymał obrazy dyfrakcyjne, charakterystyczne dla związków bezpostaciowych. Przypuszcza on przez analogię, że i te kwasy zbudowane są z kolumn nukleotydów i sądzi, że nie może być zasadniczych różnic w budowie obu typów kwasów nukleinowych. Schemat budowy polinukleotydu, zgodnie z koncepcją Astbury'ego, przedstawiony jest na rysunku 1.

Astbury silnie podkreśla podobieństwo budowy łańcucha KN do białka, gdyż nukleotydy wzdłuż łańcuchów polinukleotydowych umieszczone są w tych samych odległościach (3,4 Å) co aminokwasy w łańcuchu β -proteinowym. W ten sposób, gdy kwas nukleinowy i białko są

z sobą połączone, różne grupy np. fosforanowe nukleotydów i zasadowe aminokwasów mogą ze sobą reagować bez naruszenia głównego łańcucha.

Pewne korekty do schematu Astbury'ego wprowadza Furberg (20—23). Przy użyciu promieni rentgenowskich bada on strukturę krystalicznej cytydyny (20), a następnie badania te rozszerza na urydnę, adenozyne i guanozyne (22). Furberg potwierdza przede wszystkim β -konfigurację wiązania glikozydowego pomiędzy cukrem a zasadą. Konfigurację taką udowodniono przedtem metodami chemicznymi (9). Potwierdza również furanozową budowę cukrów występujących w tych związkach, co było już przedtem poparte syntezą wykonaną w pracowni Todda (37). Furberg stwierdza również, że płaszczyzny pierścieni pirymidynowego i rybofuranozy w nukleotydzie lub nukleozydzie nachylenie są wzajemnie pod kątem około 90° , jak to podano na rysunku 2.



Rys. 2. Schemat przestrzennej budowy nukleotydu.

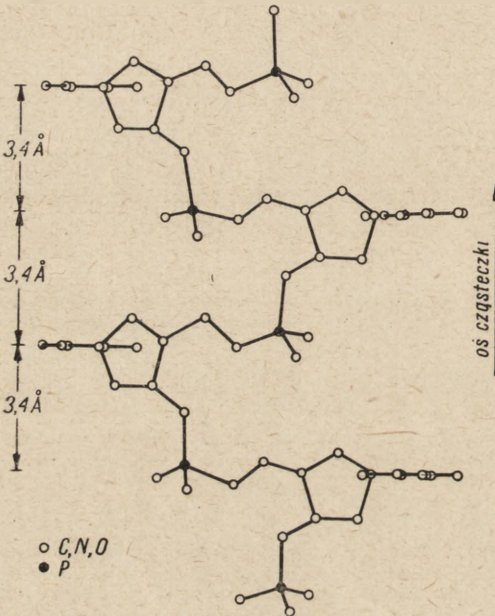
Zdaniem Furberga, w podanym ugrupowaniu pierścieni zasady jest płaski, gdy węgle i tlen, wchodzące w skład pierścienia cukrowego nie leżą w jednej płaszczyźnie.

Według wcześniejszych poglądów Hendricksa (26) i Astbury'ego (2), pierścienie zasad i pierścienie cukrów ułożone są w kwasach nukleinowych równolegle.

Na podstawie swoich spostrzeżeń Furberg dowodzi, że w łańcuchu kwasu nukleinowego trzon związku, zbudowany z kwasu fosforowego i cukru, tworzy bądź linię śrubową, opasującą zasady umieszczone we-

wnątrz, bądź też tworzy linię łamaną, zygzakowatą, z zasadami umieszczonymi na zewnątrz. Jeden z takich modeli, zaproponowanych przez Furberga, podany jest na rysunku 3.

Jak widać z powyższego modelu, nukleotydy rozmieszczone są wzdłuż osi łańcucha co 3,4 Å, podobnie jak w modelu zaproponowanym przez Astbury'ego. Sugestie Furberga zostały później poparte badaniami w podczerwieni, przeprowadzonymi przez Fraser i Fräsera (19).



Rys. 3. Model rozmieszczenia nukleotydów w łańcuchu KDN.

otydam, obliczone na podstawie proponowanej struktury, są w zgodzie z danymi Astbury'ego. Proponowany wzór pozwala na każdą kolejność i stosunek nukleotydów. We wzorze tym przypada tylko jedno wiązanie estrowe na każdy nukleotyd.

Praca Ronwina spotkała się z krytycznym przyjęciem; broni jej jeszcze w roku 1953 (36), lecz bez większego rezultatu.

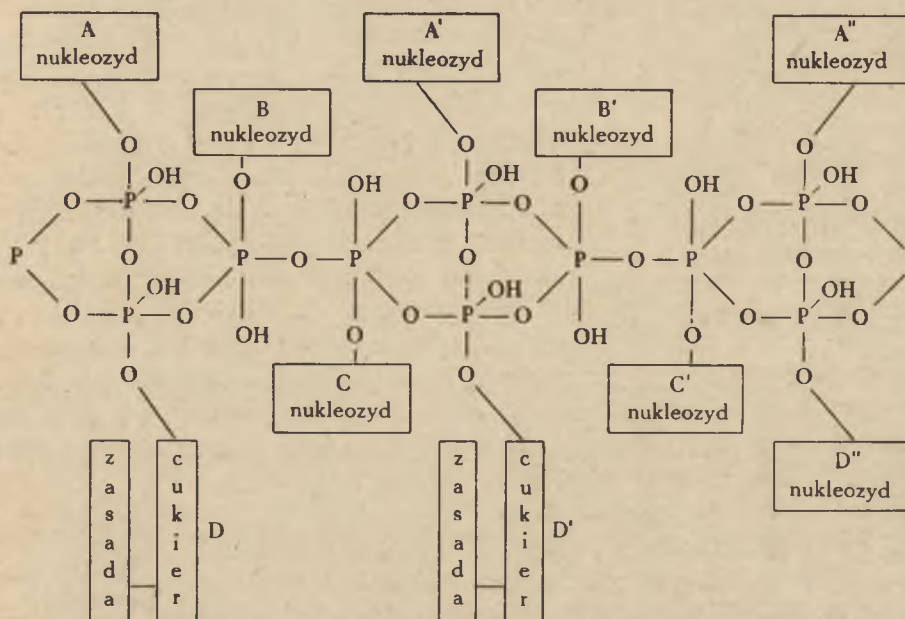
Natomiast koncepcje o śrubowej budowie KN zyskują coraz więcej zwolenników. Opierają się one na teorii wysuniętej przez uczonych radzieckich — Orechowicza i Breslera (29), o śrubowym związaniu się łańcucha peptydowego kolagenu.

Podobną budowę dla innych białek proponuje Pauling, który za tę koncepcję otrzymał w roku zeszłym nagrodę Nobla. Pauling i Corey, w oparciu o dotychczasowe wiadomości o kwasie dezoksyrybonukleinowym (KDN), sformułowali również teorię o śrubowej budowie

W tymże czasie ogłasza swoją pracę Ronwin (35) (1951). Jest to praca, która ma dziś raczej znaczenie historyczne, o której należy jednakże wspomnieć z racji oryginalnej koncepcji budowy łańcucha KN. Zdaniem Ronwina, trzon cząsteczki kwasu nukleinowego zbudowany jest ze spolimeryzowanego łańcucha bezwodników kwasów fosforowych (P_2O_5)_n (rysunek 4).

Nukleotydy w modelu Ronwina leżą płasko jeden nad drugim w 4 rzędach, ich osie przecinają się pod kątem prostym w środku trzona fosforowego. Odległości między nukle-

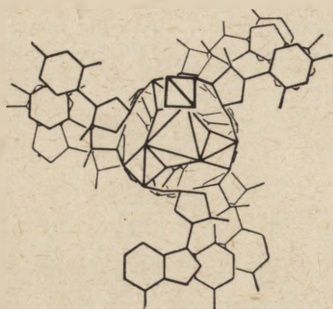
tych związków (30—32). Autorzy ci przyjmują, że olbrzymia cząsteczka kwasów nukleinowych posiada budowę cylindryczną o przekroju w przybliżeniu kołowym i średnicy 15—20 Å. Analizując zdjęcia rentgenograficzne soli sodowej KDN, stwierdzają występowanie szeregu refleksów równikowych, odpowiadających średnicy cząsteczki 18,7 Å. Na podstawie analogicznych rozważań, jakie przeprowadził Astbury,



Rys. 4. Model Ronwina. Widok z góry łańcucha kwasu nukleinowego.

wyliczają, że odległości między nukleotydami wynoszą około 1,12 Å. Różnica w wynikach wyliczeń powstaje dzięki temu, że Astbury przyjmował, iż przekrój cząsteczki posiada wymiary $8 \times 13,5$ Å, gdy wg Paulinga cząsteczka posiada przekrój kołowy o średnicy 18,7 Å. Zdjęcia rentgenograficzne, jak wiadomo, wykazują jednakże silne refleksy południkowe w odległościach 3,4 Å. Wg Paulinga i Coreya, refleksy te odpowiadają trzykrotnym odległościom pomiędzy nukleotydami i należy przyjąć, że cylindryczna cząsteczka KDN zbudowana jest z trzech śrubowych, splecionych ze sobą łańcuchów. Rdzeń (oś) cząsteczki zbudowany jest z reszt fosforanowych. Na każdym poziomie wzdłuż osi cząsteczki znajdują się trzy grupy fosforanowe, każda pochodząca z innego łańcucha polinukleotydowego, przy czym 6 atomów tlenu (po dwa z każdego tetraedru fosforanowego) tworzą oktaedr, jak to widać na ryrunku 5.

Linia śrubowa tworzy się przez przesunięcie w górę kolejnego nukleotydu łańcucha i przez jego obrót o 105 stopni, dzięki czemu powstaje potrójna śruba o skoku 3,88 Å, a co ósma warstwa powtarza się taki sam układ przestrzenny. W modelu tym płaszczyzny puryn i pirymidyn są prawie prostopadłe do osi cząsteczki i znajdują się w zewnętrznej warstwie cząsteczki.



Rys. 5. Model Paulinga i Coreya, obrazujący ułożenie nukleotydów w łańcuchu kwasu nukleinowego.

Pauling i Corey sądzą, że połączenia kwasów nukleinowych z białkami powstają w ten sposób, że reszty aminokwasów tworzą wiązania z zasadami, ja kto przyjmował Astbury. wiązania z zasadami, a nie z grupami fosfo-

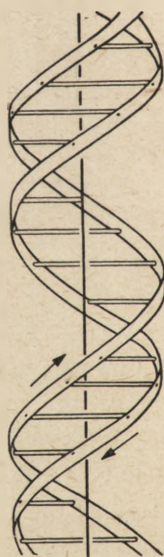
Zgodnie z tym poglądem, reszty aminokwasów mogłyby znajdować się w środku równoległoboku, którego wierzchołki zajęte są przez cztery zasady purynowe lub pirymidynowe.

Należałoby tu nadmienić, że jeżeli przyjmie się cylindryczną postać kwasów nukleinowych, o przekroju w przybliżeniu kołowym oraz ich śrubową budowę, to pozostaje do wyboru jedynie potrójna lub podwójna śruba. Pojedyncza linia śrubowa, wobec dużej gęstości tych związków, dawałaby zbyt rzadkie upakowanie nukleotydów, więcej niż potrójna — zbyt gęste ich ułożenie w przestrzeni.

Pauling i Corey przyjęli budowę kwasów nukleinowych odpowiadającą potrójnej śrubie, opierając się na gęstości właściwej suchego dezoksyrybonukleinianu sodu. Poglądy Paulinga skrytykowali Watson i Crick (39—41) i zaproponowali nowy model cząsteczki kwasu dezoksyrybonukleinowego, zbudowany z dwóch łańcuchów śrubowych (rysunek 6).

Watson i Crick podkreślają, że zdjęcia rentgenograficzne były wykonywane dla uwodnionych postaci kwasu nukleinowego o prawdopodobnie mniejszej gęstości właściwej, przy której proponowana przez nich struktura podwójnej śruby może dawać wystarczająco ściśle rozmie-

Rys. 6. Model Watsona i Cricka. Dwie wstążki symbolizują łańcuchy fosforanów-cukrów; poziome pręty — pary zasad przytrzymujących oba łańcuchy.



szczenie nukleotydów. Autorzy ci zaznaczają, że kwas dezoksyrybonukleinowy może istnieć w dwóch różnych postaciach:

A — postać krystaliczna, zawierająca około 30% wody, dająca zdję-

cia rentgenograficzne, które wykazują powtarzającą się odległość wzdłuż osi włókna równą 28 Å.

B — postać parakrystaliczna, powstająca odwracalnie z postaci A przy dalszym pobieraniu wody, przy czym długość jej wzrasta o około 30% w porównaniu z postacią krystaliczną. Forma B wykazuje bardzo silne refleksy południkowe w odległościach 3,4 Å.

Refleksy równikowe są dla obu form takie same, a więc można przyjąć, że ich średnice są również jednakowe.

Struktura proponowana przez Watsona i Cricka odnosi się przede wszystkim do formy B — parakrystalicznej, przy czym przyjmują oni, że 3,4 Å odpowiada odległości między nukleotydami. Z wartości gęstości można wyliczyć, tak jak to zrobili Pauling i Corey, że odległości między nukleotydami powinny wynosić 1,12 Å, jednak pomiary gęstości wykonywano dla suchego kwasu dezoksyrybonukleinowego, nieznaną jest natomiast gęstość formy B.

Ostatnio Franklin i Gosling (16) zmierzili gęstość formy A, wyniki ich pomiarów wskazują na obecność 24 nukleotydów na jednostkę siatki krystalograficznej. Jeżeli uwzględnimy, że przy przejściu $B \rightarrow A$ następuje skrócenie włókna o 30%, wówczas zamiast odległości 3,4 Å między nukleotydami otrzyma się $3,4 \times 0,7 \sim 2,4$ Å. Można więc przyjąć, że struktura A zbudowana jest tak jak i B — z dwóch łańcuchów polinukleotydowych, przy czym jednostkowy element budowy każdego łańcucha zawiera 12 nukleotydów, a więc odpowiada odległości $12 \times 2,4 = 28$ Å, obserwowanej na zdjęciach rentgenograficznych formy krystalicznej.

Watson i Crick uważają, że w obu formach kwasu dezoksyrybonukleinowego podstawowym układem są dwie linie śrubowe, utworzone przez owinięte wokół siebie łańcuchy polinukleotydów. Każda z tych linii śrubowych przypomina nieco model Furberga (20) tj. zasady są wewnątrz cząsteczki, fosforany — na zewnątrz, a reszty cukrów — mniej więcej prostopadle do płaszczyzny zasad. Nowym rysem tej struktury jest sposób powiązania obu łańcuchów przez zasady purynowe i pirymidynowe. Płaszczyzny zasad są prostopadle do osi włókna, przy czym połączone są one parami: jedna zasada z jednego łańcucha łączy się wiązaniami wodorowymi z drugą zasadą drugiego łańcucha (rys. 7).

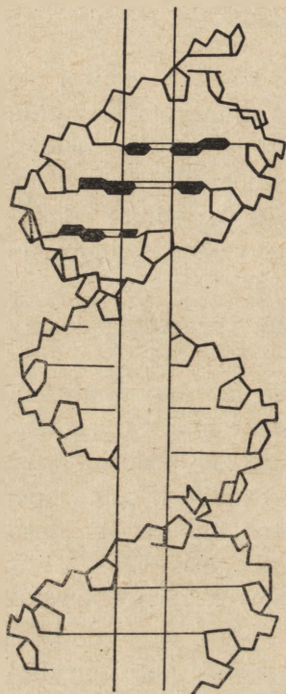
Wiązania takie mogą występować w sposób regularny tylko wtedy, jeżeli łączy się zawsze puryna z pirymidyną. Gdyby połączyć purynę z puryną, a następnie pirymidynę z pirymidyną, to wobec różnych wymiarów zasad purynowych i pirymidynowych, odległości między łańcuchami musiałyby się zmieniać, podczas gdy Watson i Crick zakładają, że są one stałe.

Wiązania wodorowe mogą występować między N_1 puryny i N_1 pirymidyny oraz między podstawnikami C_2 puryny i podstawnikami C_2 pirymidyny; wobec tego adenina może się łączyć tylko z tyminą (rysunek 8), a guanina z cytozyną (rysunek 9).

Gdyby np. adenina była w sąsiedztwie cytozyny, wówczas między azotami grup aminowych znajdowałyby się dwa wodory, podczas gdy między azotami pierścieni nie występowałyby żaden wodór.

Kolejność zasad w jednym łańcuchu jest dowolna, jeśli jednak zostanie ustalona w jakiś sposób, to w drugim łańcuchu kolejność jest już automatycznie określona.

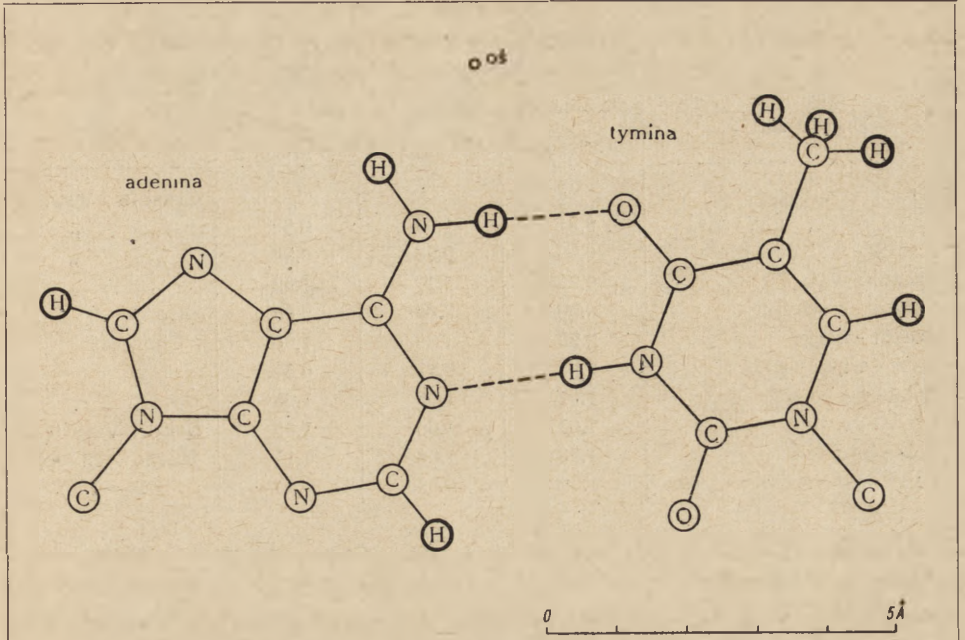
Za takim sposobem wiązania się dwóch łańcuchów polinukleotydowych w cząsteczce KDN przemawiają dane analityczne otrzymane przez wielu autorów i zebrane przez Ch a r g a f f a (5, 6). Dane te wykazują, że stosunki moralne puryn i pirymidyn, a także stosunki adeniny do tyminy i guaniny do cytozyny są bliskie jedności. Ostatnio zwrócono uwagę, że w KRN, izolowanych prze-



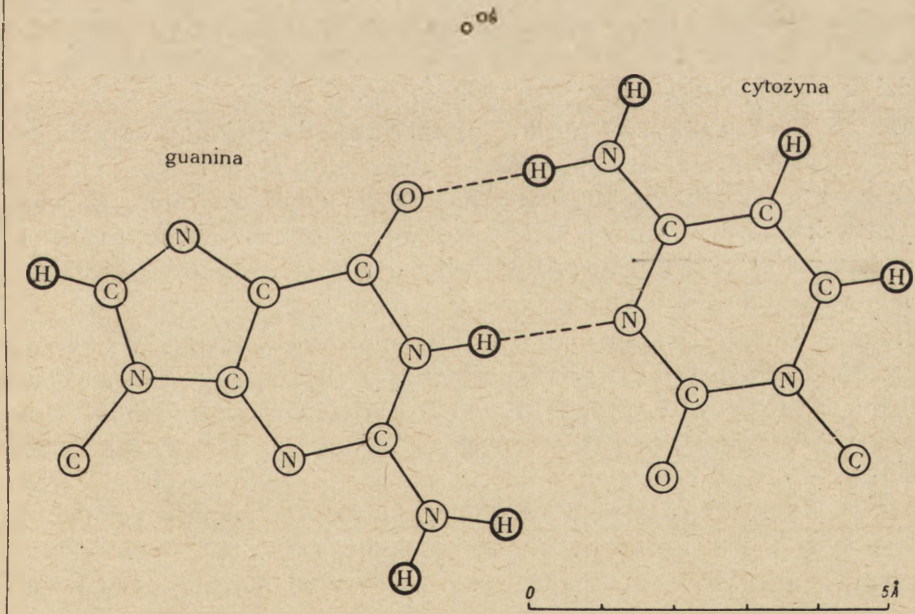
Rys. 7. Model Watsona i Cricka. Wiązania chemiczne w rdzeniu — fosforany-cukry przedstawione są za pomocą drutu. (Opuszczono wszystkie atomy tlenu grupy fosforanowej, nie biorące udziału w wiązaniu estrowym). Czarne płytki metalowe symbolizuje pary zasad, jasne płytki — powierzchnie między zasadami, gdzie mogą się tworzyć wiązania wodorowe.

ważnie z materiału zwierzęcego, spotyka się podobne, bliskie jedności stosunki puryn do pirymidyn, adeniny do uracylu i guaniny do cytozyny. Takie dane analityczne podają ostatnio Elson i Ch a r g a f f (13), Crosbie (8), Cohn i Volkin (7). Podobne wyniki otrzymaliśmy również w naszej pracowni, analizując KRN trzustki bydłowej i ludzkiej (14, 15).

Na tej zasadzie w roku zeszłym Rich i Watson (33, 34) wysunęli przypuszczenie, że i cząsteczka KRN może być zbudowana z dwu splecionych łańcuchów polinukleotydowych. Badania rentgenowskie w pewnej tylko mierze potwierdzają te przypuszczenia, gdyż otrzymane przez wymienionych wyżej autorów zdjęcia nie są idealne, pozwalają jednak na przypuszczenie, że struktura łańcucha KRN jest podobna do KDN. Autorzy spodziewają się jednakże, że uda im się wkrótce otrzymać dobre rentgenogramy KRN.



Rys. 8. Połączenie adeniny z tyminą.



Rys. 9. Połączenie guaniny z cytozyną.

T a b e l a I.

Stosunki adeniny do uracylu, guaniny do cytozyny i puryny do pirymidyn, znalezione w kwasach rybonukleinowych różnego pochodzenia.

Źródło KRN	Adenina	Guanina	Puryny	Autor
	Uracyl	Cytozyna	Pirymid.	
Królik - wątroba samicy				Crosbie i wsp. 8
ciążarnej	0.91	1.04	0.98	„ „ „
Królik - wątroba płodu	0.98	0.98	0.98	„ „ „
Szczur - wątroba	0.98	1.17	1.09	„ „ „
Szczur - wątroba	0.90	1.05	0.98	Elson 13
Szczur - nerka	0.90	1.06	1.00	i Chargaff
Żaba - wątroba	0.98	0.81	0.87	„ „
Żaba - nerka	1.02	1.06	1.05	„ „
Ciełę - grasicca	1.03	1.06	1.05	Cohn i Volkin „
Wół - trzustka	1.23	1.06	1.11	Filipowicz wsp.
Człowiek - trzustka	1.09	0.93	0.97	14—15

Można również wspomnieć, że w oparciu o badania promieniami rentgenowskimi, Watson (38) sugeruje, że wirus mozaiki tytoniowej posiada budowę śrubową. Przez analogię do lepiej poznanej budowy cząsteczki wirusa żółtej rzepy i bakteriofaga T₂, w których jakoby KN zajmuje miejsce centralne, a otoczony jest skorupą białkową (25, 29), Watson dowodzi, że podobnie i w wirusie mozaiki tytoniowej kwas nukleinowy tworzy rdzeń, wokół którego linią śrubową wiją się cząsteczki globularnego białka. W roku bieżącym do podobnych wniosków dochodzi Franklin (17).

Model Watsona i Cricka potwierdzają do pewnego stopnia badania Wilkinsa i współpr. (42, 43), a także Franklin i Goslinga (18). Ci ostatni autorzy zaznaczają jednak, że mimo iż wiele danych wskazuje na śrubową strukturę kwasów nukleinowych, to jednak na podstawie zdjęć rentgenograficznych nie można uważać tej struktury za całkowicie udowodnioną.

Należałoby tu podkreślić, że proponowany przez Watsona i Cricka schemat budowy kwasu dezoksyrybonukleinowego sugeruje mechanizm samopowielania (40). Zdaniem tych autorów, kolejność zasad decyduje o własnościach genetycznych, a model ich stanowi jak gdyby 2 „matryce“. Przed podziałem komórki wiązanie wodorowe pęka i wtedy oba łańcuchy rozkręcają się i rozdzielają. Każdy z uwolnionych łańcuchów przyłącza drugi o odpowiedniej kolejności zasad tak, że w rezultacie, zamiast pierwotnego układu, powstają dwie identyczne pary łańcuchów. Należałoby tu, według tych autorów, wyobrazić sobie, że w tym okresie życia komórki znajdują się w niej znaczne ilości wolnych nukleotydów. Nukleotydy te mogą przyłączać się poprzez wiązania wodorowe

do zasad pojedynczego, uprzednio uwolnionego łańcucha, a następnie ulegają polimeryzacji. Dla dokonania polimeryzacji potrzebny byłby albo specjalny enzym, albo też jako enzym mógłby działać powstały po rozdzieleniu pojedynczy łańcuch KDN.

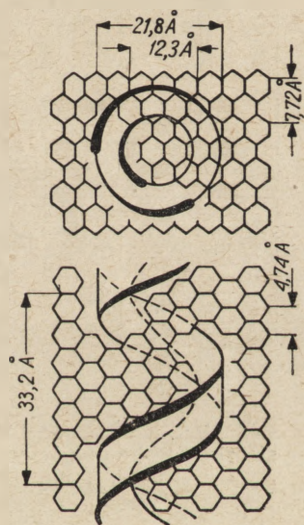
W oparciu o koncepcję Watsona i Cricka, Delbrück (11) (1945) podaje następnie dalsze szczegóły proponowanego mechanizmu samopowielania. Delbrück przyjmuje, że:

1. synteza nowych uzupełniających łańcuchów polinukleotydów postępuje naprzód synchronicznie wzdłuż dwóch pierwotnych łańcuchów;

2. w miarę postępu syntezy łańcuchy ulegają rozerwaniu w punktach wzrostu w odległościach równych połowie skoku linii śrubowej. Dolne końcówki rozerwanych łańcuchów natychmiast łączą się z wolnymi końcami nowych łańcuchów. Powstałe w ten sposób nowe łańcuchy zbudowane są na zmianę z odcinków pochodzących z pierwotnych łańcuchów oraz z przyłączonych nukleotydów. Z punktu widzenia chemicznego te rozerwania odpowiadają wymianie wiązań nukleotydowych tj. transnukleotydacjom.

Dalsze badania nad budową kwasu dezoksyrybonukleinowego np. badania Jacobsona (27), i badania Wilkinsa (44) i współpr., Arndta i Rileya (1), Watsona (38) pozostają zasadniczo w zgodzie z koncepcją Watsona i Cricka.

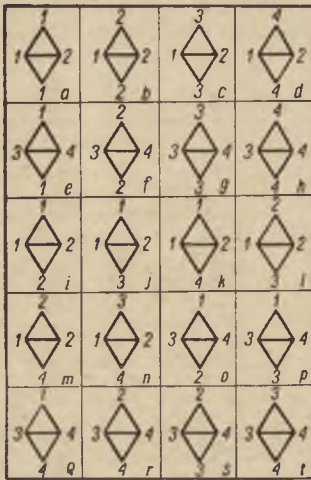
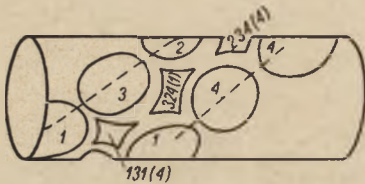
Rys. 10. Krystaliczna siatka wody. Linie proste symbolizują wiązania wodorowe między atomami tlenu, przedstawionymi jako punkty przecięcia tych prostych. Struktura śrubowa odpowiada modelowi Watsona i Cricka.



Szczególnie interesująca jest praca Jacobsona (27) (1953). Autor ten uważa, że struktura proponowana przez Watsona i Cricka wykazuje znaczne podobieństwo do struktury krystalicznej siatki wody. Przy badaniu szczegółów siatki wody, Jacobson stwierdził, że wolna przestrzeń między atomami ma przestrzenny układ linii śrubowej. Jeśli uzna się za słuszny model Watsona i Cricka, to cząsteczka kwasu dezoksyrybonukleinowego posiada strukturę powierzchni, która doskonale pasuje do siatki wody (rysunek 10) i wobec tego, zdaniem Jacobsona, porządkuje jak gdyby znaczną objętość otaczającej wody, doprowadzając ją do bardziej regularnej, podobnej do lodu, struktury. Koncepcja

ta pozwala wyjaśnić znaczny wpływ kwasu dezoksyrybonukleinowego na właściwości otaczającego go środowiska wodnego.

Ciekawą hipotezę związku między budową kwasu dezoksyrybonukleinowego a strukturą białek wysuwa G a m o w (24) (1954). Autor ten, opierając się na modelu W a t s o n a i C r i c k a, rozważa związki między różnymi aminokwasami a „otworami” o kształcie romboidalnym, utworzonym przez nukleotydy w łańcuchu kwasu dezoksyrybonukleinowego. Można wyliczyć (rysunek 11), że istnieje 20 typów takich „otworów”, zależnie od otaczających je zasad. G a m o w uważa, że nasuwa się tu skojarzenie liczby „otworów” z 20 różnymi aminokwasami, zasadniczymi dla żywych organizmów i że można przypuścić, że wolne aminokwasy z otaczającego środowiska zostają jakby „łapane” w odpowiednie otwory kwasu dezoksyrybonukleinowego i łączą się w odpowiednie łańcuchy peptydowe. Jeżeli pogląd ten jest słuszny, to powinna istnieć korelacja między np. stosunkiem adeniny do guaniny w różnych organizmach a stosunkami ilościowymi pewnych aminokwasów w odpowiednich białkach.



Rys. 11. A — model cząsteczki KDN z oplatającymi go łańcuchami polinukleotydowymi. Cyfry 1, 2, 3, 4 symbolizują cztery rodzaje zasad. B. — dwadzieścia różnych „otworów” romboidalnych, utworzonych przez cztery rodzaje zasad.

Wracając do budowy łańcucha KDN, to ostatnio D e k k e r i S c h a c h m a n (10) (1954) wyrażają pogląd, że poszczególne łańcuchy KDN nie posiadają budowy ciągłej, lecz że cząsteczka zbudowana jest z szeregu jak gdyby odcinków, składających się z 30—50 nukleotydów. Stwierdzono to metodą miareczkowania, przyjmując ciężar cząsteczkowy za równy około 5 milionom; na jedną cząsteczkę wypadłoby około 300—500 takich odcinków. Istnieje jednak pewna ciągłość w cząsteczce, gdy odcinki te powiązane są między sobą wiązaniami wodorowymi, tak jak to podano na rysunku 12.

Na zakończenie należy wspomnieć o pracy D u n n a i S m i t h a (12), która ukazała się w „Nature” w roku bieżącym (1955), a która w pewnej mierze podważa teorię wysuniętą przez W a t s o n a i C r i c k a. Wymienieni autorzy stwierdzili, że szczep *Bacterium coli* 15 T⁻, hodowanej na

pożywcze z niedoborem tyminy, syntetyzuje KDN zawierający w swoim składzie o 20—30% mniej tyminy w porównaniu z przeciętnym składem KDN. Tymina ta prawie ilościowo jest zastąpiona przez nowoodkrytą purynę — 6-metylo-aminopurynę. Wprowadzenie do cząsteczki KDN zasady purynowej, zamiast pirymidynowej, podwyższa znacznie stosunek puryn do pirymidyn, który, w myśl koncepcji Watsona i Cricka, powinien być bliski jedności. Podobnie wprowadzenie 6-metyloaminopuryny



Rys. 12. Schemat wiązań wodorowych w poprzerywanej wstążce zbudowanej z dwóch łańcuchów KDN.

zamiast tyminy i powiązanie jej z adeniną drugiego łańcucha, tak jak to podano na rysunku 8, może spowodować, zdaniem Dunna i Smitha, zniekształcenie łańcucha KDN. Ponieważ omawiane spostrzeżenia są świeżej daty, wymagają przeto przejścia przez ogień dyskusji.

Podsumowując, obecne poglądy na temat przestrzennej budowy kwasów nukleinowych można by ująć w następujące punkty:

- a) cząsteczki KN mają postać cylindryczną o średnicy około 18 Å;
- b) Na temat ułożenia nukleotydów w takim cylindrze zdania są podzielone: Pauling reprezentuje pogląd, że trzon cząsteczki zbudowany jest z reszt fosforanowych, Watson i Crick przyjmują, że wewnątrz cylindra znajdują się zasady purynowe i pirymidynowe, a reszty fosforanowe umieszczone są po zewnętrznej stronie cząsteczki. Ostatni pogląd wydaje się być bardziej uzasadniony.

c) Wiele przemawia również za modelem śrubowym cząsteczki, zbudowanym z dwu łańcuchów polinukleotydowych spleających się wzajemnie, tak jak to proponują Watson i Crick. Wydaje się możliwe, że przynajmniej niektóre rodzaje KRN mają podobną budowę do KDN.

Trzeba zaznaczyć, że koncepcje wielu autorów opierają się przeważnie na tego samego typu zdjęciach rentgenowskich, a proponowane struktury przypominają w pewnym stopniu jakby wyniki rozwiązywania skomplikowanych łamigłówek matematycznych. Toteż niewątpliwie wiele z podanych schematów ulegnie jeszcze dalszym modyfikacjom. Niezależnie jednak od różnic w szczegółach budowy KN, wydaje się, że w chwili obecnej można przyjąć śrubową budowę cząsteczki za najbardziej zbliżoną do rzeczywistej struktury tych związków.

L I T E R A T U R A

1. Arndt U. W., Riley D. P., *Nature*, **172**, 803 (1953).
2. Astbury W. T., *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1, *Nucleic Acids* 66, (Cambridge Univ. Press, 1947).
3. Astbury W. T., Bell F. O., *Nature*, **141**, 747 (1938).
4. Astbury W. T., Bell F. O., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **6**, 109 (1938).
6. Chargaff E. i współpr., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 3825 (1950).
7. Cohn W. E., Volkin E., *J. Biol. Chem.*, **203**, 319 (1953).
8. Crosbie G. W., Smellie R. M. S., Davidson J. N., *Biochem. J.*, **54**, 287 (1954).
9. Davoll J., Lythgoe B., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 833 (1946).
10. Dekker C. A., Schachman H. K., *Proc. U. S. Nat. Acad. Sci.*, **40**, 894 (1954).
11. Delbrück M., *Proc. U. S. Nat. Acad. Sci.*, **40**, 783 (1954).
12. Dunn D. B., Smith J. D., *Nature*, **175**, 336 (1955).
13. Elson D., Chargaff E., *Nature*, **173**, 1037 (1954).
14. Filipowicz B., Golewski S., Pilek K., *Acta Physiol. Pol.*, **5**, 629 (1954).
15. Filipowicz B., Golewski S., Pilek K., *Bull. Acad. Pol. Sciences, Cl., II*, **3**, 7 (1955).
16. Franklin R. E., Gosling R. G., *Acta Cryst.* **6**, 673, 678 (1953).
17. Franklin R. E., *Nature*, **175**, 379 (1955).
18. Franklin R. E., Gosling R. G., *Nature*, **171**, 740 (1953).
19. Fraser J. M., Fraser R. D. B., *Nature*, **167**, 761 (1951).
20. Furberg S., *Nature*, **164**, 22 (1949).
21. Furberg S., Ph. D. thesis., University of London, (1949).
22. Furberg S., *Acta Chem. Scand.*, **4**, 751 (1950).
23. Furberg S., *Trans. Far. Soc.*, **46**, 791 (1950).
24. Gamow G., *Nature*, **173**, 318 (1954).
25. Hershey A. D., Chase M., *J. Gen. Physiol.*, **36**, 39 (1952).
26. Hendricks S. B., *J. physiol. Chem.*, **45**, 65 (1941).
27. Jacobson B., *Nature*, **172**, 666 (1953).
28. Markham R., *Discuss. Faraday Soc.*, **11**, 221 (1951).
29. Orechowicz W. N., Bressler S. E., *Prace cytowane w artykule Baranowskiego w Acta Physiologica Polonica. Prace III Zjazdu* — 108 (1951).
30. Pauling L., Corey R. B., *Proc. U. S. Nat. Acad. Sci.*, **37**, 325 (1951).
31. Pauling L., Corey R. B., *Proc. U. S. Nat. Acad. Sci.*, **39**, 84 (1953).
32. Pauling L., Corey R. B., *Nature*, **171**, 346 (1953).
33. Rich A., Watson J. D., *Nature*, **173**, 995 (1954).
34. Rich A., Watson J. D., *Proc. N. A. S.*, **40**, 759 (1954).
35. Ronwin E., *Journ. Am. Chem.*, **73**, 5141 (1951).
36. Ronwin E., *Science*, **118**, 560 (1953).
37. Todd A. R., *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **1**, 66 (1947).
38. Watson J. D., *Biochim. Biophys. Acta*, **13**, 10 (1954).
39. Watson J. D., Crick F. H. C., *Nature*, **171**, 737 (1953).
40. Watson J. D., Crick F. H. C., *Nature*, **171**, 964 (1953).
41. Watson J. D., Crick F. H. C., *Proc. Royal. Soc. A.*, **223**, 80 (1954).

42. Wilkins M. H. F., Randall J. T., *Biochim. et Biophys. Acta*, **10**, 192 (1953).
 43. Wilkins M. F., Stokes A. R., Wilson H. R., *Nature*, **171**, 738 (1953).
 44. Wilkins M. H. F., Seeds W. E., Stokes A. R., Wilson H. R., *Nature*, **172**, 759 (1953).
 45. Williams R. C., *Biochim. et Biophys. Acta*, **9**, 237 (1952).
-

H. PANUSZ

Budowa nukleoproteidów

Badania nad budową kompleksów nukleoproteidowych zajmują szczególne miejsce w chemii kwasów nukleinowych. Dotyczą one bowiem tych związków chemicznych, które istnieją w warunkach fizjologicznych i w których strukturze kryje się — jak dziś przypuszczamy — wyjaśnienie szeregu podstawowych zjawisk życiowych. Wypadki, w których spotykamy w tkance kwas nukleinowy przy jednoczesnej bardzo niskiej zawartości białka są niezwykle rzadkie (bakteriofagi). Zazwyczaj kwas nukleinowy stanowi w protoplazmie drobny ułamek białka, wzrastający w niektórych czystych nukleoproteidach do około 40% (wirusy).

Jak wynika z innych referatów (37, 30) i kwasy nukleinowe i białka są wielkocząsteczkowymi amfolitami. Kwasy nukleinowe dlatego, że posiadają wolne kwaśne grupy OH w resztach fosforanowych, a równocześnie zasadowe grupy aminowe w pierścieniach zasad azotowych, białka zaś na skutek obecności kwaśnych i zasadowych aminokwasów w cząsteczce.

Zdefiniujmy nukleoproteid jako połączenie dowolnego kwasu nukleinowego z dowolnym białkiem przy pomocy dowolnych wiązań. W świetle tej definicji staje się wysoce nieprawdopodobne, by znajdujące się obok siebie w protoplazmie cząsteczki takich amfolitów nie połączyły się ze sobą w jakikolwiek, często bardzo nietrwały, kompleks nukleoproteidowy.

Kwasom nukleinowym przypisuje się obecnie, słusznie czy nie słusznie dwojaką rolę: kwasowi rybonukleinowemu — głównego czynnika w syntezie białek, kwasowi dezoksyrybonukleinowemu — materialnego podłoża do przenoszenia cech dziedzicznych.

Strukturalnego wyjaśnienia wymienionych funkcji trzeba by przeto szukać nie tylko w budowie wolnych kwasów nukleinowych, lecz w strukturze fizjologicznie czynnych nukleoproteidów.

Za składnik kompleksu, spełniający naczelną rolę we wspomnianych procesach, uważa się zazwyczaj kwas nukleinowy. Coraz częściej jednak podkreśla się rolę białka w zjawiskach dziedziczności. I choć nie znamy dzisiaj fizjologicznego znaczenia różnych szczegółów strukturalnych czą-

steczki wolnego kwasu dezoksyrybonukleinowego, za czynnik biorący udział w przenoszeniu cech dziedzicznych uważa się coraz częściej kompleks nukleoproteidowy. O ile ten problem z braku danych doświadczalnych — pozostaje w sferze rozważań hipotetycznych, o tyle dowodów funkcji fizjologicznych kwasu rybonukleinowego mamy dzisiaj znacznie więcej. Wskazują one na znaczną korelację zawartości kwasu rybonukleinowego z procesami syntezy białka (62). Jednakże, jak podaje K u t s k y (43), dodatek rybonukleoproteidu, izolowanego z mięśnia sercowego kurczęcia, tylko wtedy powoduje przyspieszenie wzrostu hodowli tkanki tegoż mięśnia, jeżeli metody, służące do izolowania stosowanego nukleoproteidu są wystarczająco delikatne, by nie naruszyć delikatnej struktury izolowanego kompleksu. Ani wysoko spolimeryzowany kwas nukleinowy, izolowany z tego nukleoproteidu (43), ani ten sam nukleoproteid, izolowany mniej delikatnymi metodami (34), nie wykazują funkcji fizjologicznych. Za współudziałem składnika białkowego kompleksu rybonukleoproteidowego w procesach syntezy białka przemawiają również wyniki doświadczeń Alfreya, Daly i Mirsky'ego (4) nad syntezą białka w trzustce. A więc i dla pierwszej z wymienionych poprzednio funkcji kwasów nukleinowych zaczynają się pojawiać dowody, wskazujące na współudział cząsteczki białkowej w tym procesie. Wydaje się, że można by tu przeprowadzić porównanie funkcji kwasów nukleinowych z funkcjami enzymów. Mechanizmem umożliwiającym przebieg reakcji jest cząsteczka koenzymu, jednak zdolności działania i swoistości nabiera dopiero po połączeniu się z białkowym apoenzymem. Swego rodzaju „koenzymem“ jest w naszym przypadku kwas nukleinowy, lecz dopiero cząsteczka nukleoproteidu stanowi fizjologicznie czynny „holoenzym“. Główna różnica między porównywanymi typami związków leży w tym, że budowa kwasu nukleinowego jest — w odróżnieniu od innych koenzymów — niezwykle złożona. Stąd — z jednej strony — swoistość nukleoproteidu pochodzi nie tylko od składnika białkowego, lecz — może w jeszcze większym stopniu — od składnika niebiałkowego. Z drugiej strony izolowanie „koenzymu“ w postaci niezmienionej, zdolnej do wytworzenia czynnego „holoenzymu“ jest niezwykle trudne i główna przyczyna naszej niezajomości funkcji fizjologicznych kwasów nukleinowych leży zapewne w nieodwracalnych zmianach struktury, jakim ulegają ich cząsteczki w czasie izolowania.

Mimo istniejących trudności ostatecznym celem wszystkich badań nad strukturą nukleoproteidów jest udowodnienie różnic między cząsteczkami, które by warunkowały różnorodność funkcji. Różnice te mogą tkwić w budowie cząsteczek kwasów nukleinowych lub białek, składających się na kompleks, a mogą leżeć w naturze i labilności wiązań, którymi kwasy nukleinowe i białka są złączone.

Aby jednak wyniki badań strukturalnych pozwalały na wyciąganie wniosków o wpływie struktury na funkcje fizjologiczne, trzeba mieć pewność, że izolowany nukleoproteid nie uległ zmianom strukturalnym, niweczącym jego własności. Tego warunku nie spełnia ogromna większość uzyskanych dotychczas preparatów nukleoproteidowych. Również analiza tak złożonych struktur przerasta częstokroć dzisiejsze możliwości techniczne. Z tych przyczyn począwszy od badań Mieschera aż do roku 1953 wyniki badań doświadczalnych nie pozwalały na wytworzenie jakiegoś jaśniejszego obrazu cząsteczki. Pionierzy tych badań — Miescher, Steudel i in. ograniczali się przeważnie do oznaczania stosunku kwasu nukleinowego do białka (71, 72, 47) w preparatach różnego pochodzenia i do opracowywania coraz lepszych metod izolowania. Stosowane przez nich ekstrakcje tkanki przy pomocy kwasów i zasad (32) zostały w późniejszych latach zdyskwalifikowane, gdyż powodowały trwale zmiany w strukturze cząsteczek nukleoproteidów. Również produkty ekstrakcji, prowadzonej w podwyższonej temperaturze były niewątpliwymi artefaktami. Wieloletnie żmudne badania analityczne izolowanych tymi metodami preparatów pozwoliły jedynie na wytworzenie ogólnego schematu ich budowy, prowadząc częstokroć do mylnych wniosków. W latach trzydziestych poważny wkład w tej dziedzinie wniosł Przyłęcki (55, 56, 58), którego badania nad naturalnymi i syntetycznymi nukleoproteidami wykazały, jak bardzo złożone i trudne zagadnienia stoją tu przed biochemią. W latach czterdziestych szybki rozwój nowoczesnych metod badawczych umożliwił dokładniejsze poznanie budowy składników nukleoproteidów. Upadła teoria tetranukleotydoma. Badania szkoły Gullanda a przede wszystkim nowoczesne metody chromatograficzne, zastosowane przez Chargaffa, Wyatta i in. udowodniły, że kwasy nukleinowe izolowane z różnych gatunków, osobników, tkanek, mają różny skład purynowo-pirymidynowy. Skład i kolejność nukleotydów w kwasach nukleinowych stały się główną podstawą do wyjaśniania różnic między nimi. Równolegle uzyskano podobne wiadomości o budowie składników białkowych.

Poświęcono również wiele uwagi opracowaniu warunków w jakich procesy preparatywne w możliwie najmniejszym stopniu naruszają strukturę nukleoproteidów. Obecnie stosuje się jedynie ekstrakcje tkanki bądź zimną wodą, bądź rozcieńczonymi roztworami soli, bądź w niektórych wypadkach (53) rozcieńczonymi roztworami buforowymi. Stosowana do niedawna szeroko metoda Mirsky'ego i Pollistera (52) polegająca na ekstrakcji nukleoproteidu z tkanki bardziej stężonymi roztworami soli kuchennej na zimno została ostatnio poddana krytyce (31), okazało się bowiem, że wyższe stężenia soli powodują dysocjację kompleksów

nukleoproteidowych i preparaty, otrzymane przez rekonstrukcję wiązań po rozcieńczeniu, różnią się własnościami od produktów wyjściowych.

Poważne trudności w preparatyce wyszły na jaw z chwilą wykrycia w tkankach enzymów, powodujących rozkład bądź kwasów nukleinowych bądź białek, wchodzących w skład kompleksu. Wykryto tak rybonukleazy (65, 9, 50, 73, 63, 64) jak i dezoksyrybonukleazy wewnątrzkomórkowe i to zarówno w cytoplazmie (79, 5, 66) jak i w jądrach komórkowych (15). Poza tym powszechnie znana jest obecność proteolitycznych enzymów tkankowych, katepsyn, zarówno w cytoplazmie jak i w jądrach komórkowych (49, 51, 40). Działania tych enzymów tym trudniej uniknąć w czasie preparatyki, że posiadają one bardzo różne warunki optymalnej aktywności i w różny sposób reagują na dodatek inhibitorów. Aby uniknąć działania tych enzymów prowadzi się obecnie preparatykę w niskich temperaturach (7, 29, 64). Okazało się jednak, że pociąga to za sobą drobne zmiany strukturalne izolowanych nukleoproteidów (80, 44).

Niejednorodność nukleoproteidów

Aby udowodnić poczynione na wstępie założenia zależności między budową i funkcjami nukleoproteidów, musimy poszukiwać dowodów, że preparaty izolowane naszymi grubymi — jak dotąd — metodami z tej samej tkanki nie są czymś jednorodnym, lecz stanowią mieszaninę ogromnej ilości cząsteczek, różniących się od siebie czy to składem komponent, czy ich budową przestrzenną, czy wreszcie drobnymi szczegółami struktury kompleksu.

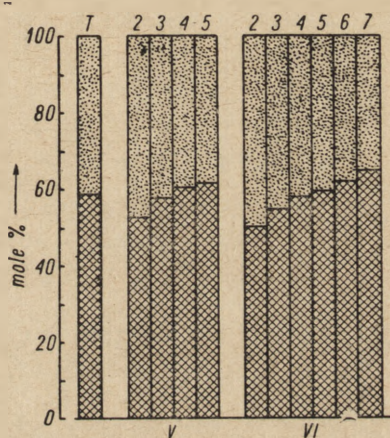
Wcześniej udało się udowodnić, że składnik białkowy nukleoproteidu, izolowanego z określonego materiału, nie jest tworem jednolitym. Omówione poprzednio (30) prace Khouvine, Gregoire, Butlera, Fautrez-Firlefyna i innych z lat pięćdziesiątych udowodniły, że izolowane protaminy i histony, a także niezdefiniowane jeszcze białka globularne rybonukleoproteidów, stanowią zwykle mieszaninę 2—3—4 frakcji, dających się oddzielić przez elektroforezę, ultrawierowanie lub frakcjonowanie strącanie. W świetle tych spostrzeżeń szczególnego znaczenia nabierają prace Eulera, Hahna i Skarżyńskiego z lat 1943-46 (32, 33, 35, 36), w których stwierdzono, że cząsteczka kwasu nukleinowego w nukleoproteidzie jest związana z kilkoma drobinami białkowymi. Powstaje w ten sposób dodatkowa możliwość różnic między cząsteczkami nukleoproteidów.

Na znacznie większe trudności natknięto się w próbach rozfrakcjonowania kwasów nukleinowych. Usiłowania Chargaffa, Vischera, Wytta i in. (20, 24, 84) długo nie doprowadzały do zamierzonego rozdzielenia kwasu nukleinowego lub nukleoproteidu z określonej tkanki na

kilka frakcji różniących się budową kwasów nukleinowych. Ani frakcjonowanie ultrawierowanie, stosowane przez Wyatt (82, 83), ani próby selektywnej absorpcji na węglu (85) nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Do roku 1953 ideałem definicji kwasu nukleinowego lub nukleoproteidu pod względem chemicznym było podanie gatunku zwierzęcia czy rośliny, tkanki, z której go izolowano oraz dokładnej metody izolowania. Tak np., „dezoksyrybonukleoproteid izolowany z grasicy cielęcej metodą Mirsky'ego i Pollistera“ był uważany za produkt dobrze zdefiniowany, nadający się do badań porównawczych.

W połowie 1953 roku ukazały się w „Nature“, jedna po drugiej dwie prace, stanowiące, jak się dziś wydaje, przełom w badaniach nukleoproteidów: Chargauff z współpracownikami (23), a zaraz po nim Brown i Watson (16) donieśli o udanym rozdzielaniu nukleoproteidów dezoksyrybozowych z określonego źródła na szereg frakcji. Przygotowaniem do tych prac było udoskonalenie techniki chromatograficznej. Ostatnie badania Chargauffa, Wyatt i innych (20, 21, 22, 84) pozwoliły wykryć pewną regularność we wzajemnych stosunkach zasad purynowych i pirymidynowych i wyróżnić kwasy typu AT — o przewadze adeniny i tyminy oraz kwasy typu GC — o przewadze guaniny i cytozyny (22). Stosunek A/G lub T/C stał się więc nowym miernikiem składu chemicznego kwasów nukleinowych.

W pierwszej z wymienionych prac Chargauff i współpr. ekstrahowali wodą na zimno nukleoproteid grasicy cielęcej, który następnie denaturowali według Sevaga (67) przez energiczne mieszanie z chloroformem i oktanołem. Odwirowany żel nukleoproteidu poddawali tzw. frakcjonowanej dysocjacji, działając nań na zimno (w 4°C) roztworami chlorku sodu o wzrastających stężeniach. Z uzyskanych ekstraktów izolowali kwasy nukleinowe po wytrąceniu nukleoproteidów alkoholem i odbienczeniu mieszaniną chloroformu z oktanołem. W kwasie tym, po odpowiednim oczyszczeniu, oznaczali zawartość poszczególnych puryn i pirymidyn. W wyniku takiego postępowania stwierdzili, że im wyższe było stężenie chlorku sodu, użytego



Rys. 1. Zależność składu puryno-pirymidynowego frakcji kwasów nukleinowych od stężenia chlorku sodu (w/g (23)).

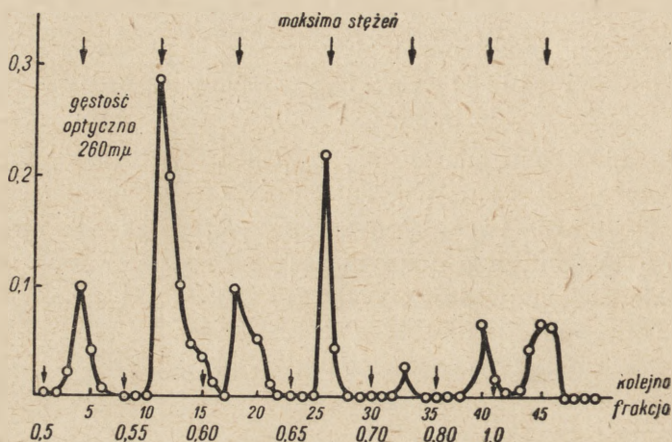
Dośw. 1 (T) — kwas nukleinowy izolowany z pierwotnego nukleoproteidu.

Dośw. 2 (V) — użyte stężenia mol NaCl: 2—0,52; 3—0,60; 4—0,76; 5—1,7;

Dośw. 3 (VI) — użyte stężenia mol. NaCl: 2—0,45; 3—0,50; 4—0,55; 5—0,60; 6—0,75; 7—0,90;

do ekstrakcji żelu nukleoproteidowego, tym bogatszy w adeninę i tyminę był izolowany zeń kwas nukleinowy (rys. 1).

Jeszcze bardziej przekonująca była praca Brown a i Watson a. Na kolumnie krzemionkowej utrwalali oni w nieopublikowany dotych-



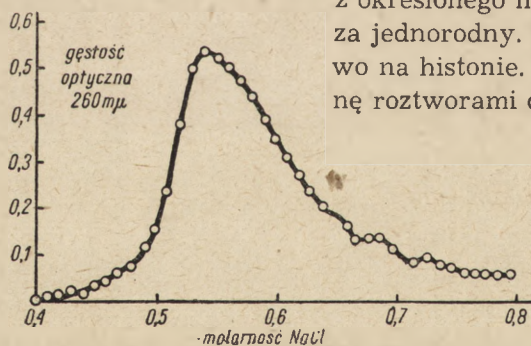
Rys. 2. Absorpcja eluatów otrzymanych przez ekstrakcję nukleohistonu stopniowo wzrastającymi stężeniami NaCl (w/g (16)).

czas sposób czysty preparat histonu. Do tak przygotowanej kolumny wlewali od góry roztwór kwasu dezoksyrybonukleinowego izolowanego

z określonego materiału i uważanego dotychczas za jednorodny. Kwas ten adsorbował się ilościowo na histonie. Następnie przepłukiwali kolumnę roztworami chlorku sodu o stężeniu wzrastającym

w sposób ciągły lub stopniowy. Wyciekające u spodu kolumny ekstrakty badali spektrofotometrycznie, mierząc ich absorpcję w nadfiolecie. Otrzymywali charakterystyczne krzywe zależności absorpcji od stężenia chlorku sodu w eluacie. Wielkość absorpcji, będąca miarą

zawartość kwasu nukleinowego w eluacie, zmieniała się w charakterystyczny sposób, zależnie od rodzaju zmian stężenia chlorku sodu (rys. 2 i rys. 3). Szczególnie ciekawych wniosków dostarczało eluowanie roztworami NaCl o stężeniach wzrastających w sposób stopniowy (rys. 2). Uży-



Rys. 3. Absorpcja eluatów otrzymanych przez ekstrakcję nukleohistonu stężeniami NaCl wzrastającymi w sposób ciągły (w/g (16)).

skane wyniki podobne były do wyników Chargaffa. Kwasy, eluowane wyższymi stężeniami chlorku sodu, a więc zdolne do wytworzenia bardziej trwałych wiązań z histonem, zawierały więcej adeniny i tyminy, a mniej guaniny i cytozyny. Ta regularność nasunęła autorom dość rewelacyjną koncepcję charakteru wiązań kwasu nukleinowego z białkiem.

Wiązania kwasów nukleinowych z białkami

Istota wiązania kwasu nukleinowego z białkiem pozostaje do dziś właściwie nieznaną. Istnieje szereg hipotez, opartych na znajomości budowy składników i wynikających stąd możliwościach wiązań (rys. 4).

1) Wiązanie kwasu nukleinowego z białkiem jest wiązaniem heteropolarnym typu soli, gdzie rolę kwasu spełniają wolne grupy OH reszt fosforanowych kwasu nukleinowego a rolę zasady — grupy aminowe zasadowych aminokwasów, szczególnie argininy.

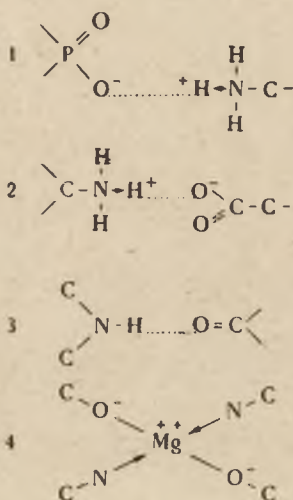
2) Wiązanie kwasu nukleinowego z białkiem ma charakter podobny do poprzedniego, lecz czynnikiem zasadowym są grupy aminowe zasad azotowych kwasu nukleinowego a czynnikiem kwaśnym — grupy karboksylowe aminokwasów kwaśnych.

3) Czynnikiem wiążącym są wiązania wodorowe między odpowiednimi atomami azotu i tlenu zasad azotowych i aminokwasów.

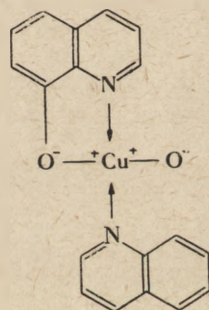
4) Czynnikiem wiążącym są jony dwuwartościowych metali, a wiązanie ma charakter wiązania chelatowego.

Istotę wiązania chelatowego dobrze tłumaczy klasyczny przykład połączenia oksychinoliny z miedzią (rys. 5). Jon metalu łączy się ze związkiem organicznym dwoma wiązaniami — jednym jonowym, w którym zastępuje np. jon wodoru i drugim koordynacyjnym — z inną grupą związku organicznego.

Najwięcej zwolenników zyskała dotychczas pierwsza z wymienionych teorii. Za jej słusznością przemawia dominujący kwaśny charakter kwasów nukleinowych i silnie zasadowy charakter takich białek jak prota-



Rys. 4. Możliwe rodzaje wiązań kwasów nukleinowych z białkami.



Rys. 5. Kompleks chelatuowy oksychinoliny z miedzią.

miny i histony. Propagatorami tej teorii wiązań są np. von Euler i Stern (32, 70). Dodatkowe poparcie uzyskała ona w modelu przestżennym podanym dla kwasu dezoksyrybonukleinowego przez Watsona i Cricka (78), w którym reszty fosforanowe zajmują zewnętrzne położenie, dogodne do wytwarzania wiązań. Dalszego poparcia dostarczyły wyniki doświadczeń Vendrelych z 1954 roku (76), którzy w większości przebadanych przypadków stwierdzili ścisłą korelację pomiędzy zawartością kwasu dezoksyrybonukleinowego i argininy w jądrach erytrocytów i spermy ryb. Arginina jest tu tym czynnikiem zasadowym, z którym mógłby się wiązać kwas nukleinowy.

Druga teoria, wiązań między zasadami azotowymi a białkami, miała od dawna swych zwolenników. Pewien dowód doświadczalny uzyskał Manoiłow w 1948 r. (48). Izolował on tzw. „istotny nukleoproteid“ metodą Bielőzierskiego. Tym terminem określał szczególnie trwałe połączenie kwasu nukleinowego z białkiem, przetrzymujące szereg zabiegów, jakim został poddany pierwotnie izolowany nukleoproteid. Ten trwały kompleks posiadał maksimum absorpcji w nadfiolecie w 254 m μ , podczas gdy maksimum czystego KDN przypada w 263 m μ . Maksimum w 263 m μ pochodzi przede wszystkim od zawartej w kwasie nukleinowym adeniny, a przesunięcie w kierunku fal krótszych dowodzi zablokowania grupy aminowej adeniny. Nukleoproteid, poddany hydrolizie ługiem, odzyskiwał maksimum w 263 m μ . Ponieważ hydroliza alkaliczna prowadziła tu do odszczepienia białka, Manoiłow wysunął koncepcję wiązania grupy aminowej adeniny z, jak przypuszczał, grupą karboksylową cząsteczki białkowej.

Istnienie wiązań wodorowych między kwasem nukleinowym a białkiem nie zdaje się budzić wątpliwości (28,8). Przemawia za tym obecność licznych grup zdolnych do tworzenia tego rodzaju wiązań tak w kwasach nukleinowych, jak i w białkach. Wiązania te jednak, jako słabsze — mogą odgrywać raczej drugorzędną rolę jako czynnik wiążący.

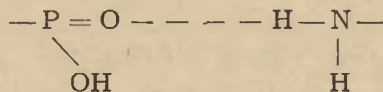
Kwestia wiązań chelatowych wypłynęła z chwilą stwierdzenia przez Alberta (2,3) silnej zdolności niektórych puryn do tworzenia kompleksów chelatowych. Obecność w tkankach znacznych ilości jonów, uznanych za czynniki chelujące, np. Mg, Ca, Zn, dalej — duży wpływ tych jonów na własności wiązań kwasów nukleinowych z białkiem (74,75,17), czyni tę hipotezę coraz bardziej popularną, choć brak na nią dotychczas przekonywających dowodów.

Zdaje się dzisiaj nie ulegać wątpliwości, że w nukleoprotaminach i nukleohistonach głównym typem wiązania jest połączenie grup fosforanowych z grupami aminowymi białek. O typie wiązań, występującym w nukleoproteidach rybozowych nie wiemy właściwie nic. Abstrahując od istoty wiązań, nawet na temat ich trwałości panują sprzeczne poglądy.

Biełozierskij w licznych pracach nad kwasami nukleinowymi bakterii (10, 11, 12, 13, 14) doszedł do wniosku, że wiązania w rybonukleoproteidach są mniej trwałe od wiązań w nukleoproteidach dezoksyrybozowych. Chargaff natomiast wspomina o tym, że typ wiązania w rybonukleoproteidach ma odmienny charakter niż w nukleohistonach i jest od nich trwalszy (19).

Nie można zakończyć omawiania kwestii wiązań, nie podkreślając ich najistotniejszej cechy — wielkiej labilności. Aktualny stan cząsteczki nukleoproteidu w protoplazmie jest uwarunkowany nie tylko strukturą cząsteczek kwasu nukleinowego i białka. Zależy on w kolosalnym stopniu od obecnych w środowisku jonów wodorowych, kationów i anionów mineralnych i pozostałych związków organicznych. Obecność jonów wodorowych, wysokie stężenie elektrolitów — powodują dysocjację kompleksów nukleoproteinowych, co wykorzystano w preparatyce kwasów nukleinowych. Szczególną rolę — w nawiązaniu do teorii wiązań chelatowych — mogą spełniać dwuwartościowe kationy — szczególnie Mg. Cavaliéri, badając połączenia kwasu dezoksyrybonukleinowego z zasadowymi barwnikami, spełniającymi rolę zasadowych białek, zaobserwował w 1951 r. fakt (18), że im więcej w roztworze znajduje się jonów Mg, tym mniej cząsteczek barwnika łączy się z jedną cząsteczką kwasu nukleinowego. Ponadto wykazał on na drodze spektrofotometrycznej, że jony magnezu wywierają znaczny wpływ na własności zarówno grup fosforanowych jak i aminowych w cząsteczce kwasu nukleinowego, a także wykazał możliwość istnienia wiązań międzycząsteczkowych między zasadami azotowymi i resztami fosforanowymi (17).

Brown i Watson (16) tak tłumaczą zjawisko wzrostu adeniny i tyminy we frakcjach kwasów nukleinowych, uzyskiwanych w eluatach ze wzrostem stężenia chlorku sodu. Dane o odległościach wewnątrzcząsteczkowych w łańcuchu kwasu nukleinowego, uzyskane z badań rentgenograficznych (78,81,38), wykazują, że w cząsteczce kwasu o budowie śrubowej istnieje możliwość takiego zbliżenia grupy aminowej guaniny (przy C₂) do reszty fosforanowej, iż może powstać wiązanie wodorowe typu



co potwierdza obecność odpowiadającego takiemu wiązaniu pasma absorpcyjnego w podczerwieni, stwierdzoną przez Fräsera i Fräser (39).

Obecność takiego wiązania wodorowego wpływałaby obniżająco na kwasowy charakter wodoru reszty fosforanowej, to zaś z kolei osłabiałoby siłę wiązania kwasu nukleinowego z białkiem (rys. 4a), i tym możnaby

tłumaczyć mniejsze stężenie soli potrzebne do eluowania z nukleohistonu kwasów nukleinowych, bogatszych w guaninę i cytozynę (23, 16).

Brown i Watson sugerują ponadto możliwość tworzenia w obecności jonów magnezowych mostków chelatowych między grupą 2-aminową guaniny i sąsiednią resztą fosforanową, z jednoczesnym przerwaniem wspomnianego wyżej wiązania wodorowego. Potwierdzenie istnienia tego rodzaju wiązań pozwoliłoby na strukturalne wytłumaczenie wpływu sekwencji nukleotydów, w szczególności kwasu guanilowego, na charakter wiązań kwasu nukleinowego z zasadowymi białkami w cząsteczce nukleoproteidu, a także na strukturalne wytłumaczenie wpływu jonów metali dwuwartościowych na budowę nukleoproteidów.

W 1954 r. Ch a r g a f f i i współpr. opublikowali bardzo szerokie materiały, potwierdzające pierwotne ich doniesienie (26,27). Podobne rezultaty otrzymywali oni przy frakcjonowaniu nukleoproteidów z różnych tkanek, a także sztucznych nukleoproteidów, wytworzonych z jednej z izolowanych przez nich frakcji kwasu dezoksyrybonukleinowego i czystego histonu. Uzyskali oni w ten sposób jeszcze dalszy rozdział KDN. Ciekawy jest jednak fakt, że jak wynika z pracy Lucy i Butlera z 1954 r. (46), pierwotny nukleoproteid tkankowy nie jest podatny na frakcjonowanie, stosowane przez Ch a r g a f f a. Dopiero denaturacja chloroformem umożliwia dalsze frakcjonowanie chlorkiem sodu. A zatem niezdenaturowane nukleoproteidy tkankowe zawierają jakieś elementy struktury, zacierające różnice ich własności chemicznych, wynikających z różnic składu. Te elementy zatracają się przy denaturacji. Lucy i Butler stosowali ponadto odmienny sposób ekstrakcji żelu nukleoproteidowego. Zamiast stosowanych przez Ch a r g a f f a i B r o w n a wzrastających stężeń chlorku sodowego zastosowali oni stałe stężenie, powtarzając jedynie wielokrotnie ekstrakcję tego samego nukleoproteidu świeżymi porcjami chlorku sodowego. Uzyskali oni w kolejnych frakcjach podobne zmiany składu kwasów nukleinowych jak Ch a r g a f f i B r o w n. Na podstawie wyników tych badań uważają więc, że przy frakcjonowaniu nukleoproteidów istotną rolę odgrywa czas działania roztworu chlorku sodowego, a nie jego stężenie.

Mimo pewnych braków omówione wyżej prace dały nam po raz pierwszy możliwość izolowania z pozornie jednolitego preparatu wielu frakcji nukleoproteidowych, różniących się od siebie składem zawartych w nich kwasów nukleinowych, przy czym każda z tych frakcji może się jeszcze składać z wielu odmian cząsteczek, różniących się między sobą drobnymi szczegółami budowy. Powstały nowe możliwości dla badań rentgenograficznych bardziej już jednorodnych preparatów. Uzyskano doświadczalne dowody różnorodności nukleoproteidów w tkance, potrzebne, jak wspomniano na początku — do wytłumaczenia różnorodności ich funkcji. Po-

wstały też nowe koncepcje rodzaju i zmienności wiązań między kwasem i białkiem w nukleoproteidzie.

Jasne jest, że skład purynowo-pirymidynowy i stosunek AT/GC ani skład aminokwasowy nie są jedynymi i wystarczającymi kryteriami różnorodności nukleoproteidów. Cząsteczki ich mogą się — przy jednakowym składzie chemicznym — różnić sekwencją ogniów w łańcuchach i konfiguracją przestrzenną zarówno składników, jak i całych kompleksów.

Sekwencja nukleotydów i aminokwasów w łańcuchach stała się dopiero w ostatnich 2 — 3 latach przedmiotem wstępnych badań i dyskusowanie tego zagadnienia jest dzisiaj zdecydowanie przedwczesne. Struktura przestrzenna nukleoproteidów jest jeszcze nie znana. Rentgenogramy są trudne do interpretacji. Jednym z powodów tego jest zapewne niejednorodność badanego materiału. W kilku wypadkach uzyskano dane, przemawiające za śrubową budową całej cząsteczki nukleoproteidu (77), a także cząsteczek samego histonu (59,60). Riley i Arndt donieśli ponadto (61), że przeprowadzili badania nad rozpraszaniem promieni rentgenowskich przez nukleoproteidy izolowane ze źródeł naturalnych w porównaniu do rozpraszania przez preparaty, otrzymane przez zmieszanie w odpowiednim stosunku roztworów kwasu nukleinowego i czystej komponenty białkowej. Porównanie krzywych rozproszenia zdaje się wskazywać na to, że cząsteczki białek i kwasów nukleinowych w nukleoproteidzie nie ulegają na skutek połączenia żadnym istotnym odkształceniom i zachowują zasadniczą śrubową strukturę łańcucha nienaruszoną. Możliwa jest jedynie lokalna deformacja grup wchodzących w połączenia międzyłańcuchowe. Za śrubową budową nukleoproteidów przemawiają również niektóre zdjęcia, uzyskane w mikroskopie elektronowym (28).

Własności fizyczne preparatów nukleoproteidowych różnią się znacznie między sobą, zależnie od pochodzenia i metody izolowania. Większość izolowanych dezoksyrybonukleoproteidów ma charakter silnie włóknisty. Uzyskano jednak również preparaty o odmiennym, niewłóknistym charakterze (45). Rybonukleoproteidy nie posiadają na ogół własności włóknistych.

W badaniach struktury wysokopolimeryzowanych nukleoproteidów i kwasów nukleinowych duże usługi oddają pomiary lepkości, jeden z mierników stopnia polimeryzacji i kształtu przestrzennego cząsteczek. Ostatnio, posługując się tą metodą, uzyskano ciekawe wnioski na temat zależności kompleksu nukleoproteidowego od pH i roli składnika białkowego w kompleksie (69,42).

Omówiona budowa nukleoproteidów jest niezwykle złożona. Nie wyklucza to jednak faktu, że z szeregu tkanek izolowano sympleksy liponukleoproteidowe o jeszcze bardziej złożonej budowie (41,25,54,68,25a). Jest wysoce prawdopodobne, że wiele cząsteczek nukleoproteidowych znajdu-

je się w tkankach pod postacią takich właśnie sympleksów jeszcze wyższego rzędu.

Na zakończenie raz jeszcze należy podkreślić, że w dążeniu do poznania rzeczywistej struktury fizjologicznie czynnych nukleoproteidów — nie można się ograniczać do poznania budowy i składu sztucznie izolowanych części składowych, tj. kwasów nukleinowych i białek, lecz trzeba w pełni uwzględnić wpływ wszystkich czynników towarzyszących w środowisku, które na tak labilną strukturę, jak struktura nukleoproteidów, muszą mieć kolosalny wpływ.

L I T E R A T U R A

1. Albert A., *Selective Toxicity*, Methuen a. Co., London (1951).
2. Albert A., *Biochem. J.*, **54**, 646 (1953).
3. Albert A., Brown D. J., *J. Chem. Soc.* 2060, (1954).
4. Alfrey V. G., Daly M. M., Mirsky A. E., *J. Gen. Physiol.*, **37**, 157 (1953).
5. Alfrey V. G., Mirsky A. E., *J. Gen. Physiol.* **36**, 227 (1952).
6. Alfrey V. G., Stern M., Mirsky A. E., *J. Gen. Physiol.*, **35**, 529 (1952).
7. Behrens M., *Z. Physiol. Chem.*, **209**, 59 (1932).
8. Behrens M., Taubert M., *Z. Physiol. Chem.*, **291**, 210 (1953).
9. Bernstein M. H., *Biol. Bull.*, **97**, 255 (1949).
10. Biełozierskij A., *Cold Spr. Harb. Symp.*, **12**, 1 (1947).
11. Biełozierskij A., Bazilina, *Biochimia*, **9**, 134 (1944).
12. Biełozierskij A., Czerbukina, *Biochimia*, **2**, 752 (1937).
13. Biełozierskij A., Czernomordikowa, *Biochimia*, **5**, 134 (1940).
14. Biełozierskij A., Dubrowskaja, *Biochimia*, **1**, 665 (1936).
15. Brown K. D., Jacobs G., Laskowski M., *J. biol. Chem.*, **194**, 445 (1952).
16. Brown G. L., Watson M., *Nature*, **172**, 339 (1953).
17. Cavaliere L. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1242 (1952).
18. Cavaliere L. F., Angelos A., Balis M. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 4902 (1951).
19. Chargaff E., Vischer E., *Ann. Rev. Biochem.*, **17**, 201 (1948).
20. Chargaff E., *Experientia*, **6**, 201 (1950).
21. Chargaff E., *J. Cell a. Comp. Physiol.* **38**, suppl. **1**, 41 (1951).
22. Chargaff E., *Fed. Proc.*, **10**, 654 (1951).
23. Chargaff E., Crampton Ch., Lipschitz R., *Nature*, **172**, 289 (1953).
24. Chargaff E., Vischer E., Doniger R., Green C., Misani F., *J. biol. Chem.*, **177**, 405 (1949).
25. Claude A., *Science*, **91**, 77 (1940).
- 25a. Claude A., *J. Exp. Med.*, **84**, 51, 61 (1946).
26. Crampton C. F., Lipschitz R., Chargaff E., *J. biol. Chem.* **206**, 499 (1954).
27. Crampton C. F., Lipschitz R., Chargaff E., *J. biol. Chem.*, **211**, 125, (1954).
28. Davison P. F., Conway B. E., Butler J. A. V., *Progr. of Biochem. Biophys.*, **4**, 149 (1954).

29. Dounce A. L., Tishkoff G. H., Garson M., Barnett S. R., Freer R. M., *J. Gen. Physiol.*, **33**, 629 (1950).
30. Drabikowski W., *Postępy Biochemii*, (nr 1/56).
31. Drabikowski W., Wiśniewska B., *Postępy Biochemii*, (nr 1/56).
32. Euler H. von, Hahn L., *Svensk Kem. Tid.*, **57**, 169 (1945).
33. Euler H. von, Hahn L., *Arkiv Kemi* 22A (17), 14 (1946).
34. Euler H. von, Heller L., *Arkiv Kemi* 26A (10), 1 (1948).
35. Euler H. von, Hoeberg B., *Arkiv Kemi* 22A (9), 13 (1946).
36. Euler H. von, Skarżyński B., Ahlstrom L., *Arkiv Kemi* 19A (12), 17 (1944).
37. Filipowicz B., *Postępy Biochemii*, (nr 1/56).
38. Franklin R. E., Gosling R. G., *Nature*, **171**, 740 (1953).
39. Fraser M. J., Fraser R. D. B., *Nature*, **167**, 762 (1951).
40. Fruton J. S., Irving G. W., Bergmann M., *J. biol. Chem.*, **141**, 763 (1941).
41. Greenstein J. P., Jenrette W. V., *J. Natl. Canc. Inst.*, **1**, 91 (1940).
42. Henstell H. H., Freedman R. J., Cooper J., *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 211 (1955).
43. Kutsky R. J., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **83**, 390 (1953).
44. Luck J. M., Kupke D. W., Rhein A., Griffin A. C., *Feder. Proceed.*, **9**, 197 (1950).
45. Luck J. M., Kupke D. W., Rhein A., Hurd M., *J. Biol. Chem.*, **205**, 235 (1953).
46. Lucy J. A., Butler J. A., *Nature*, **174**, 32 (1954).
47. Lynch V., *J. Biol. Chem.*, **44**, (1920).
48. Manoiłow S. E., Orłow B. A., Setkina O. N., *Biochimia*, **13**, 337 (1948).
49. Maver M. E., Graeco A. E., *J. Biol. Chem.*, **181**, 8 (1949).
50. Maver M. E., Graeco A. E., *J. Biol. Chem.*, **181**, 861 (1949).
51. Maver M. E., Graeco A. E., Iovtrup E., Dalton A. J., *J. Natl. Canc. Inst.*, **13**, 687 (1952).
52. Mirsky A. E., Pollister A. W., *Biol. Symp.*, **10**, 247 (1943), cyt. w/g Davisona i wsp. (28).
53. Orgel G., Stern G. K., *Feder. Proceed.*, **9**, 211 (1950).
54. Pollard A., *Brit. J. Exp. Path.*, **20**, 429 (1939).
55. Przyłęcki St. J., *Biochem. Z.*, **258**, 264 (1933).
56. Przyłęcki St. J., *Roczniki Chemii*, **13**, 681 (1933).
57. Przyłęcki St. J., Frajberg S., Giedroyć W. B., **3**, 262 (1933).
58. Przyłęcki St. J., Grynberg M., *Biochem. Z.*, **251**, 255 (1932).
59. Riley D. P., Arndt U. W., *Nature*, **171**, 144 (1953).
60. Riley D. P., Arndt U. W., *Proc. Roy. Soc. B.*, **141**, 93 (1953).
61. Riley D. P., Arndt U. W., *Nature*, **172**, 294 (1954).
62. Rodkiewicz B., Poznańska H., Przełęcka J., *Postępy Biochemii*, (nr 1/56).
63. Roth J. S., *Nature*, **174**, 129 (1954).
64. Roth J. S., *J. Biol. Chem.*, **208**, 181 (1954).
65. Roth J. S., Milstein S. W., *J. Biol. Chem.*, **196**, 489 (1952).
66. Schneider W. C., Hogeboom G. H., *J. Biol. Chem.*, **198**, 155 (1952).
67. Sevag M. G., *Biochem. Z.*, **273**, 419 (1934).
68. Shemin D., Sproul E. E., *Cancer Res.*, **2**, 514 (1492).
69. Shooter K. V., *Nature*, **173**, 824 (1954).

70. Stern G. K., *Exp. Cell. Res. suppl.*, **2**, 1 (1952).
71. Steudel H., *Z. Physiol. Chem.*, **90**, (1914).
72. Steudel H., Peiser., *Z. Physiol. Chem.*, **122**, (1922).
73. Taborda A. R., Taborda L. C., Williams J. N. JR., Elvehjem C. O., *J. Biol. Chem.*, **194**, 227 (1952).
74. Tamm C., Chargaff E., *Nature*, **168**, 916 (1951).
75. Tamm C., Shapiro H. S., Chargaff E., *J. Biol. Chem.*, **199**, 313 (1952).
76. Vendrely R., Vendrely C., *Nature*, **172**, 30 (1953).
77. Watson J. D., *Biochim. Biophys. Acta*, **13**, 10 (1954).
78. Watson J. D., Crick F. H. C., *Nature*, **171**, 737 (1953).
79. Webb M., *Nature*, **169**, 417 (1952).
80. White J. C., Elmes P. C., *Nature*, **169**, 151 (1952).
81. Wilkins M. H. F., Stokes A. R., Wilson H. R., *Nature*, **171**, 738 (1953).
82. Wyatt G. R., *Nature*, **166**, 237 (1950).
83. Wyatt G. R., *Biochem. J.*, **48**, 581 (1951).
84. Wyatt G. R., *Exp. Cell Res. Suppl.*, **2**, 201 (1952).
85. Zamenhof S., Chargaff E., *Nature*, **168**, 604 (1951).

WŁADYSŁAW WIĘCKOWSKI, SŁAWOMIR WITKOWSKI

Chemiczne metody analityczne kwasów nukleinowych

Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Łodzi

Kierownik: prof. dr B. Filipowicz

Od czasu, kiedy coraz dokładniejsze badania struktury kwasów nukleinowych (KN) podważyły tetranukleotydową koncepcję budowy tych związków, nie można właściwie mówić o KN jako o substancjach chemicznie specyficznych. W chwili obecnej w dalszym ciągu gromadzone są spostrzeżenia, które pozwolą — w niedalekiej zapewne przyszłości — na urobienie niedwuznacznego poglądu na stosunki stechiometryczne między poszczególnymi składnikami strukturalnymi KN, i rozstrzygną, czy mamy do czynienia z ograniczoną liczbą typów tych związków, czy z całym szeregiem najróżnorodniejszych połączeń chemicznych, których skład może wyczerpywać wszystkie prawdopodobne kombinacje ułożenia nukleotydów w długich łańcuchach KN. Dlatego, mówiąc o chemicznych metodach analitycznych KN należałoby używać wyrażenia „ pewne frakcje analityczne występujące w ściśle określonych warunkach i zawierające bliżej niezdefiniowane nukleoproteidy dające rozłożyć się na prostsze połączenia typowe dla KN, jak nukleotydy, nukleozydy, zasady purynowe i pirymidynowe, pentozy oraz kwas fosforowy“. Takie ujęcie zagadnienia ma tym bardziej rację bytu, że działanie rozmaitymi odczynnikami na materiał badany, konieczne dla otrzymania frakcji objętych nazwą „kwasy nukleinowe“, może mieć wpływ na wyniki pomiaru (53). W dalszym ciągu niniejszego referatu przez nazwę „kwasy nukleinowe (KN)“ rozumieć będziemy frakcję analityczną określoną zgodnie z wyżej podaną definicją.

W celu chemicznego oznaczania KN wykorzystuje się mniej lub więcej specyficzne własności analityczne podstawowych składników tych związków, tj. kwasu fosforowego, pentoz, zasad purynowych i pirymidynowych. Czynnością wstępną jest oczywiście oddzielenie KN od reszty badanego materiału. Zazwyczaj po zhomogenizowaniu tkanka badana zostaje traktowana oziębionym do 0° kwasem trójchlorooctowym w celu

usunięcia związków fosforowych rozpuszczalnych w kwasach. W przypadku dobrze zhomogenizowanej tkanki wystarcza trzykrotne powtórzenie ekstrakcji. Zabieg ten nie powoduje strat kwasu fosforowego związanego z podstawowym łańcuchem KN, gdyż ulega on bardzo powoli hydrolizie w zimnym kwasie trójchlorooctowym (42). Następnie usuwane zostają związki tłuszczowcowe. Stosuje się najrozmaitsze rozpuszczalniki tłuszczowe: chloroform, aceton, metanol, eter, etanol. Najwłaściwszym okazało się stosowanie mieszaniny etanolu i eteru (3 : 1) na gorąco. Używanie etanolu do ekstrakcji fosforotłuszczowców jest o tyle konieczne, że działa on rozkładająco na połączenia tych związków z białkiem, czego np. nie jest w stanie spowodować aceton. Dokładne omówienie metod ekstrahowania fosforotłuszczowców podane zostało przez W. Niemierkę w referacie wygłoszonym na I Sympozjum Biochemicznym (70). Kolejność odtłuszczania i ekstrahowania związków fosforowych rozpuszczalnych w kwasach nie musi być koniecznie taka jak tu podano. Czasami korzystniej jest najpierw odvodnić tkankę badaną acetonem i po wysuszeniu w próżni nad parafiną poddać ją dalszym zabiegom (70, 72, 27, 38). Takie postępowanie jest celowe zwłaszcza w takich przypadkach, kiedy nie ma pewności, czy tkanka została dokładnie zhomogenizowana oraz wtedy, kiedy badany materiał należy przechowywać przez czas dłuższy. Po wstępnych czynnościach otrzymujemy materiał zawierający nukleoproteid. Występujący w nim kwas fosforowy może w zasadzie pochodzić tylko z białek i KN, zaś pentozy i zasady azotowe wyłącznie z tych ostatnich.

Analiza tak otrzymanego nukleoproteidu może iść w dwu kierunkach. Pierwsza droga to ekstrakcja KN roztworami NaCl, mocznika itp., dająca produkt, który po hydrolizie poddany zostaje zabiegom chromatograficznym czy jonoforetycznym. Izolacja czystych KN nie jest na ogół procesem ilościowym i powyższy sposób prowadzi nie tyle do oznaczania zawartości KN w badanym materiale, ile do zbadania zawartości poszczególnych składników tych związków. Druga droga to analiza nukleoproteidu jako takiego, dostarczająca informacji o zawartości kwasu rybonukleinowego (KRN) i dozoksyrybonukleinowego (KDN) w badanej próbce. Należy zwrócić uwagę, że w obydwu sposobach postępowania metody rozfrakcjonowania obu KN są identyczne. Najwłaściwszą podstawą pomiaru w bezpośredniej analizie nukleoproteidu okazał się fosfor, pentozy — raczej gorszą. W przypadku ilościowego ujmowania wyników chromatografii czy jonoforezy zasady azotowe stanowią stosunkowo najpewniejsze źródło informacji.

Istnieją trzy różne metody analityczne oznaczania ilościowego KN. Są to metody Schmidta i Thannhausera (84), Schneidera (85, 86) oraz Ogura i Rosen (72). Stanowią one zasadniczą podstawę oznaczania KN, czy to w oparciu o metody czysto chemiczne, czy też

w oparciu o metody czysto chemiczne, czy też w oparciu o metody rozdziału chromatograficznego czy jonoforetycznego.

Metoda Schmidta i Thannhausera ogłoszona została w roku 1945 i w szybkim czasie zyskała sobie niezwykłą popularność. Podstawą jej jest już dawniej zaobserwowana własność rozkładania się KRN w rozcieżczonych zasadach. W tych samych warunkach KDN nie ulega hydrolizie. Ta różnica własności obu KN stanowi o zasadniczo ilościowym ich rozdziale. Schematycznie ujmując, nukleoproteid, otrzymany po zabiegach wstępnych, poddaje się kilkunastogodzinnej hydrolizie w 1 N KOH w temperaturze pokojowej lub 37°. Przez zakwaszenie wytrąca się z hydrolizatu nierozłożony KDN i białko. W roztworze pozostają nukleotydy KRN i fosforany odszczepione od fosforoproteidów. Oznaczając całkowity fosfor w hydrolizacie, zawartość fosforu w osadzie otrzymanym przez zakwaszenie hydrolizatu (82), całkowitą zawartość fosforu w roztworze pozostałym po odsączeniu osadu i ilość fosforanów nieorganicznych (pochodzących ze zhydrolizowanych fosforoproteidów!), można wyliczyć z odpowiednich różnic zawartość fosforu związanego z KRN i z KDN.

Metoda powyższa jest prosta i wygodna, jednakże brak pewności, czy zawsze daje słuszne wyniki. Od roku 1950 pojawił się szereg doniesień kwestionujących jej poprawność. Zarzuty te sprowadzają się do stwierdzenia, że rozdzielanie KRN i KDN wydaje się być nieilościowe, a oznaczany fosfor może pochodzić nie tylko od KN i białek. W roku 1953 Drasher (26) zakwestionowała użycie fosforu jako czynnika określającego zawartość KN w tkankach, podnosząc trzy zastrzeżenia: 1° Frakcje KN mogą wymieniać wzajemnie swój fosfor (93), 2° może zachodzić niedokładność wytrącania lub ekstrakcji związków fosforowych, 3° istnieje niepewność w przyjmowaniu stałej zawartości fosforu w KN. Ten ostatni zarzut ma zresztą charakter ogólny i dotyczy trudności obiektywnej. Cały szereg prac innych autorów, posługujących się metodą Schmidta i Thannhausera, popiera powyższe zastrzeżenia. Davidson jeszcze w roku 1947 wykazał, że stosunek fosforu KRN do fosforu KDN jest wyższy dla wyników uzyskiwanych tą metodą, niż wynikałoby to z pomiarów innymi metodami (16,12). Ten sam autor wspólnie z wieloma współpracownikami w latach 1951—1952 wykazał, posługując się fosforem radioaktywnym i subtelną techniką chromatograficzną, że zawartość fosforu nienukleinowego oznaczana metodą Schmidta i Thannhausera może być niższa, niż w rzeczywistości być powinna (14,66,15). Pozostaje to w związku z tym, że tylko 75% tego fosforu, który Schmidt i Thannhauser uważali za fosfor KN, rzeczywiście należy do tej frakcji. Około 85% tej nadwyżki fosforowej jest związane organicznie, ale nie zawiera rybozy. Dalej okazało się, że 25% fosforu, oznaczanego w omawianej metodzie jako frakcja KRN, składa się wprawdzie z orga-

nicznych połączeń fosforanów, ale nie zawiera zasad azotowych. W niektórych przypadkach nawet więcej niż 80% fosforu frakcji KRN może nie pochodzić od KN, jak o wykazali Logan i współpracownicy (54) na przykładzie tkanki nerwowej. Stwierdzenie przez Zamenhofa, Chargaffa i innych istnienia tzw. polirybofosforanów wydaje się potwierdzać te spostrzeżenia (100). Ostatecznie zgodnie z Davidsonem (13) należałoby zakwestionować dokładność oznaczania KRN wg metody Schmidta i Thannhausera, uważając natomiast, że wyniki otrzymywane dla KDN są zgodne z rzeczywistością.

Ostatnio, w roku 1954, Dawidowa (17) potwierdziła dawniejsze obserwacje Mauritzena i współpracowników (65) i zakwestionowała podstawę metody Schmidta i Thannhausera, tj. założenie Steudela i Peiser o nierozpuszczalności KDN w rozcieńczonych zasadach. Ponadto stwierdziła ona niecałkowite wytrącanie KDN przez zakwaszanie hydrolizatu, przypisując to częściowemu rozkładowi tej substancji w zbyt silnie kwaśnym środowisku, jakie powstaje przy otrzymaniu osadu KDN wg omawianej metody. W ostatnim miesiącu tegoż roku ukazała się praca Coopera i Loringa (11), którzy badając KN wirusów metodą Schmidta i Thannhausera przekonali się, że niezbędne jest rozpuszczenie ponowne osadu KDN i białka w KOH zanim ostatecznie rozdzieli się frakcja obu KN. Wg cytowanych autorów dwukrotne wytrącanie frakcji KDN z hydrolizatu jest konieczne ze względu na absorbowanie przez osad białka znacznych ilości rybonukleotydów. Jak widać, obserwacje i wnioski Dawidowej oraz Coopera i Loringa nie są zgodne. W tej chwili trudno jest powiedzieć, która ze stron posiada słuszność. Dopiero dalsza rewizja metody Schmidta i Thannhausera będzie mogła wyjaśnić przyczynę zaistniałych sprzeczności.

Metoda oznaczania KN Schneidera (85, 86) podana została również w roku 1945. Opiera się ona na występowaniu dwu różnych pentoz w KRN i KDN. Otrzymany po wstępnym postępowaniu nukleoproteid poddaje się gorącej hydrolizie kwasem trójchlorooctowym. W mieszaninie produktów rozkładu KN oznacza się KDN na podstawie reakcji dwufenyloaminowej, a KRN na podstawie reakcji orcykowej. Specyficzność pierwszej z nich pozwala na oznaczenie dezoksyrybozy występującej w KDN w sposób jednoznaczny. Rybozę KRN wylicza się z różnic pomiarów wykonywanych obu reakcjami. Osad pozostały po hydrolizie zawiera fosforoproteidy. Zawartość fosforu w tych ostatnich jest większa niż w analogicznej frakcji otrzymywanej wg metody Schmidta i Thannhausera (26). Metoda Schneidera jest prosta, ale zasadniczą trudność stanowią w niej reakcje analityczne węglowodanów stosunkowo niewygodne i kryjące w sobie możliwości po-

pełnienia błędów. Omówione to zostanie bliżej przy opisie reakcji kolorymetrycznych rybozy i dezoksyrybozy. Należy podkreślić, że metoda Schneidera nie nadaje się do analizy tkanek roślinnych ze względu na występowanie w nich pentozanów i poliuronidów (72). Steele i współpracownicy (89) opracowali mikromodyfikację omawianej metody pozwalającą oznaczyć 2 μg KDN i 20 μg KRN. Bardzo staranne opracowanie metody Schneidera podali ostatnio Hirtz i Fayet (35).

W roku 1950 Ogur i Rosen (72) opisali metodę frakcjonowania i hydrolizy KN za pomocą kwasu nadchlorowego. KRN w tych warunkach ulega hydrolizie już w temperaturze obniżonej, natomiast KDN dopiero po ogrzaniu. W odpowiednich wyciągach można oznaczać KRN lub KDN na podstawie zawartości fosforu lub pentoz względnie stosując pomiary spektrofotometryczne w nadfiolecie. Bliższe zbadanie tej metody wykazało jednak, że również i KDN ulega wyraźnej hydrolizie w zimnym kwasie nadchlorowym (71).

Z trzech omówionych metod zasługuje na uwagę a zarazem na zalecenie metoda Schmidta i Thannhausera. Decyduje o tym przede wszystkim możliwość prostego i wygodnego rozfrakcjonowywania KRN i KDN. Należy jednak zachowywać ostrożność w posługiwaniu się nią, zwłaszcza w badaniach KN nieznanymi jeszcze zupełnie co do składu, pamiętając o wymienionych poprzednio zastrzeżeniach. Zgodnie z krytycznymi omówieniami Dawidowej i Drasher (17, 26) wydaje się, że powinno się dążyć do stosowania możliwie najkrótszego czasu hydrolizy w stosunkowo niezbyt dużych stężeniach KOH oraz do nie przekraczania $\text{pH} = 5,5$ przy przemywaniu i wytrącaniu osadu białka i KDN. Wydaje się nam, że porównywanie zawartości fosforu KN zmierzonej na podstawie analizy wg metody Schmidta i Thannhausera z zawartością tegoż fosforu, znalezionej w kwaśnym wyciągu otrzymanym wg metody Schneidera, stanowić może kontrolę, zapobiegającą popełnieniu błędu wskutek przyjęcia za fosfor KRN jakichś domieszek pochodzących z innych połączeń organicznych niż KN. Kończąc omawianie metod wyosobniania i frakcjonowania KN należy jeszcze wspomnieć o obserwacjach Hirtza i Fayeta (35), odnoszących się do zachowywania się KN w czasie homogenizacji i ekstrakcji kwasem trójchlorooctowym związków rozpuszczalnych w kwasach. Okazało się, że w wypadku badanej przez nich tkanki nabłonkowej najwłaściwszym jest homogenizowanie tkanki w oziębionym etanolu, który nie powodując hydrolizy blokuje działanie enzymów i zapobiega degradacji KN.

W związku z omówioną metodyką nasuwa się konieczność poruszenia ważnego zagadnienia, jakim jest wybór właściwego sposobu oznaczania fosforu i pentoz. I w jednym i w drugim wypadku posługujemy się techniką kolorymetryczną, zapewniającą możliwość operowania małymi ilości-

ciami badanej substancji, dającą wyniki pewne oraz nie wymagającą zbyt precyzyjnych czy trudno dostępnych urządzeń.

Kolorymetryczne oznaczanie fosforu oparte jest na dawno poczynionych obserwacjach, pochodzących jeszcze z końca ubiegłego wieku (73, 77). Dotyczą one redukcji kwasu fosfomolibdenowego na błękit molibdenowy, będący mieszaniną tlenków molibdenu o różnorodnym składzie. Pierwsze próby ilościowego wykorzystania reakcji powstawania błękitu molibdenowego do oznaczania związków fosforowych pochodzą od Bella i Doisy'ego (2) oraz Briggisa (6), którzy stosowali hydrochinon jako czynnik redukujący. Dalsze modyfikacje tej metody szły w kierunku znalezienia odpowiednio czułych reduktorów, opracowania warunków zapewniających trwałość uzyskiwanej barwy oraz uspecyficzenia reakcji, która w identyczny sposób przebiega z arsenem i krzemem. Zwłaszcza ten ostatni może być niebezpieczny dla pomiarów ze względu na obecność stałych lub przypadkowych (szkło naczyń laboratoryjnych) domieszek krzemowych w badanym materiale.

Dużym krokiem naprzód była modyfikacja Fiske'go i Subbarowa (28) z roku 1925, znana powszechnie i znajdująca szerokie zastosowanie do dnia dzisiejszego. Zastosowany tu został jako reduktor kwas 1-amino-2-naftolo-4-sulfonowy względnie jego izomer podstawiony w pozycjach 1, 2, 6. Do oznaczeń KN wprowadzili tę metodę Schmidt i Thannhauser. Wadą jej jest przede wszystkim nietrwałość roztworów kwasu 1-amino-2-naftolo-4-sulfonowego, który mimo przechowywania w ciemnym szkłe i w niskiej temperaturze obniża już po 14 dniach swoją zdolność redukcyjną o 10—15%. Obok tego często bez wyraźnej przyczyny powstają w badanym roztworze barwny osady i zmętnienia uniemożliwiające pomiar kolorymetryczny bez uprzedniego sączenia. Można temu zapobiec wg Dornera i Knighta (25) używając mniejszych ilości kwasu aminonaftolosulfonowego. Wszystkie późniejsze metody kolorymetrycznego oznaczania fosforu używane w pracach nad KN są w większości przypadków właściwie odmianami metody Fiske'go i Subbarowa, wprowadzającymi mniej lub więcej istotne poprawki. I tak użycie chlorku cynawego (52, 31) jako reduktora zapewnia wprawdzie uzyskanie bardzo trwałej barwy, ale związane jest z szeregiem niedogodności, takich jak nadmierna wrażliwość na substancje interferujące, bardzo ścisłe przestrzeganie właściwego zakresu pH, duża czułość na wpływ krzemianów. Przy pracy z materiałem roślinnym metoda Fiske'go i Subbarowa nastęrcza pewną niedogodność wskutek obecności w nim jonów baru i wapnia, tworzących nierozpuszczalne sole z H_2SO_4 . Dlatego King (49) zaproponował zastąpienie tego ostatniego kwasem nadchlorowym jako czynnikiem mineralizującym. Allen (1) wprowadził dalszą poprawkę do modyfikacji Kinga, stosu-

jąc amidol jako reduktor, zapewniając tym samym większą niezależność barwy od zmian temperatury pomiaru. Czułość oznaczenia przy użyciu amidolu jest jednak mniejsza niż we właściwej metodzie Fiske'go i Subbarowa.

Stosunkowo niedawno Gomori (31) ulepszył metodę Fiske'go i Subbarowa zastępując kwas aminonaftolosulfonowy metolem, tj. *N*-metylo-*p*-aminofenolem stosowanym w 3% roztworze kwaśnego siarczynu sodowego. Odczynnik ten odznacza się wielką trwałością tak w postaci krystalicznej jak i w roztworach. Ogromną zaletą tego odczynnika jest mała czułość na substancje interferujące, zwłaszcza na krzemiany. Sole sodowe kwasów fluorowodorowego, szczawowego, cytrynowego, azotawego i azotowego oraz chlorki sodu i żelaza praktycznie rzecz biorąc nie wywierają żadnego wpływu. Ponadto wytworzona barwa jest zupełnie stała w ciągu paru godzin i stosunkowo tylko nieznacznie zależy od pH roztworu.

Każdy ze wspomnianych sposobów ma swoje zalety i trudno jest orzec z całą pewnością, który z nich należałoby bezapelacyjnie uznać za najlepszy. Niewątpliwie metoda Gomori'ego (31) nadaje się najbardziej tam, gdzie grozi niebezpieczeństwo obecności dużych — w porównaniu z zawartością fosforu — ilości krzemianów (43). Ma ona tę przewagę nad pozostałymi, że 1° natężenie barwy badanego roztworu jest stałe w ciągu długiego czasu, 2° wpływ substancji interferujących jest znikomy, 3° używane odczynniki są trwałe. Wadą jej jest stosunkowo mała czułość, zwiększająca znacznie rząd wielkości dokonywanego oznaczenia. W przypadku wykonywania oznaczenia wg Fiske'go i Subbarowa rząd ten wynosi około 10—20 µg na 50 ml cieczy badanej przy użyciu fotometru Pulfricha.

Należy jeszcze wspomnieć o metodzie Delory'ego (20) oznaczania fosforanów nieorganicznych w obecności substancji interferujących. Metoda ta pozwala na ilościowe wyosobnienie jonów PO_4^{-3} ze środowiska badanego przez adsorpcję ich na zawieszynie węgla magnezowego w postaci soli wapniowej. Tok dalszego postępowania oparty jest na metodzie Kinga. Możliwość wykonywania takiego oznaczenia jest bardzo ważna ze względu na konieczność określania zawartości fosforanów nieorganicznych w obecności nukleotydów, co ma zasadnicze znaczenie przy oznaczaniu KN wg Schmidta i Thannhausera. Z mniej znanych metod warto wspomnieć o stosowanych do oznaczeń KN metodach Berenbluma i Chaina (4), Pereiry (75) i Loringa (56).

Drugim prostym składnikiem KN mogącym stanowić podstawę ich oznaczania są węglowodany, ściślej mówiąc — ryboza i dezoksyryboza. Zasada oznaczania tych związków polega na tworzeniu przez nie w silnie kwaśnym środowisku barwników z pewnymi połączeniami organicznymi.

Podstawą oznaczania rybozy jest próba jakościowa podana przez Białą jeszcze w roku 1902. Początkowo stosowana była do wykrywania jakościowego KN, a od czasu przystosowania jej przez Mejbau (67) do oznaczeń ilościowych, stanowi jeden z zasadniczych testów ilościowej analizy tych substancji. Próba Białą, zwana inaczej reakcją orcynową, wypada dodatnio również z cukrami związanymi. W produktach hydrolyzy KN dają ją pentozy związane z purynami, nie dają, względnie nieznacznie tylko reagują, pentozy związane z pirymidynami. Jak już wspomniano, w pracy z tkankami roślinnymi reakcja orcynowa nie daje solidnych wyników. W warunkach ilościowego oznaczania pentoz wg Mejbau obok aldopentoz reagują również i ketopentozy oraz kwasy ketoglikonowe i ketoheptozy, natomiast heksozy nie tworzą barwnika. Ważną jest rzeczą, że wpływ białek na oznaczenia jest stosunkowo niewielki. Niestety dezoksyrentozy tworzą również barwniki z orcyną, wprawdzie w stopniu znacznie mniejszym, jednakże zmuszającym do wprowadzenia poprawki w przypadku obecności dezoksyrybozy obok rybozy. Pochłanianie światła przez barwny roztwór połączenia dezoksyrybozy z orcyną jest około 10 razy słabsze, niż pochłanianie roztworu analogicznego związku rybozowego. Wartość wyników otrzymanych w oznaczaniu pentoz reakcją orcynową zależy bardzo silnie od pH. Stąd kwasowość próby kontrolnej i badanej winna być możliwie identyczna (81).

Dezoksyrybozę oznacza się na podstawie reakcji dwufenyloaminowej, wprowadzonej przez Dische'go w roku 1930 (21). Jest to reakcja specyficzna dla 2- i 3-dezoksyrentoz. I tu, podobnie jak w reakcji orcynowej, dezoksyryboza związana z pirymidynami nie tworzy barwnika (59, 81). Oprócz wymienionej reakcji używane są w celu oznaczania dezoksyrybozy następujące reakcje: tryptofanowa Cohena (10), cysteino-wa Stumpfa (90, 22) i indolowa Ceriotti'ego (9). Holden wykonała porównanie trzech pierwszych ze wspomnianych metod i wykazała zadowalającą zgodność wyników otrzymywanych wg Dische'go i Cohena przy zbyt niskich wynikach otrzymywanych wg Stumpfa (37). Omówienie metody Dische'go podane zostało również przez Stacey'a w *Advances in Carbohydrates Chemistry* (83).

Użycie węglowodanów jako podstawy oznaczenia KN nastęrcza okoliczność mogącą stanowić poważne źródło błędów. Okolicznością tą jest trudność dysponowania odpowiednim wzorcem. Siłą rzeczy stosowane być muszą jako wzorce odpowiednie preparaty KN, co uzależnia wyniki pomiarów od metody preparatywnej i od stopnia czystości otrzymanego związku. Nadto wg Schneidera (85) natężenie barw wytwarzanych przez cukry związane i wolne nie są te same dla jednakowych stężeń mowych. Wreszcie przyjmuje się, że oznaczane kolorymetrycznie cukry stanowią połowę rzeczywiście ich zawartości w KN (założenie, że stosunek

puryny: pirymidyny = 1!), co ze stanowiska analitycznego nie jest w tej chwili rzeczą absolutnie pewną. Istnieją jednakże dwie metody pozwalające ilościowo oznaczyć również i cukry związane z zasadami pirymidynowymi. Starsza z nich podana została w 1947 roku przez *Massarta* i *Hoste'a* (64) i odnosi się do oznaczania rybozy. Związki pirymidynowe tej pentozy reagują z orcyną po uprzednim traktowaniu bromem w podniesionej temperaturze. Stosunkowo niedawno *Brody* (7, 8) podał modyfikację metody cysteinowej, zwiększającą dokładność samego oznaczania i pozwalającą oznaczać również dezoksyrybozydy pirymidynowe. Brak narazie dalszych danych, które by pozwoliły na bliższą ocenę obu cytowanych metod. Wydaje się więc, że fosfor stanowi o wiele pewniejszą podstawę oznaczania KN, a to ze względu na możliwość posługiwania się pewnym w granicach możliwości standartem oraz ze względu na fakt, że jesteśmy zawsze w możności oznaczyć cały fosfor występujący w KN.

Trzeci składnik KN, zasady purynowe i pirymidynowe, stosowane są przede wszystkim jako podstawa analizy chromatograficznej. I tu punktem wyjścia jest oczywiście wyosobnienie nukleoproteidu odbywające się zupełnie analogicznie jak w uprzednio opisywanych metodach. Otrzymane nukleoproteidy można rozfrakcjonowywać stosując metodę *Schmidta* i *Thannhausera*. Można też rozfrakcjonowywanie poprzedzić ekstrakcją roztworami NaCl, co pozwala na otrzymywanie czystego KRN, który po hydrolizie nadaje się do oznaczeń chromatograficznych lub jonoforetycznych. Jeżeli jednak badany materiał ma być zanalizowany chemicznymi metodami, wówczas wyizolowany nukleoproteid poddaje się od razu hydrolizie, w trakcie której następuje rozkład uwalniający zasady purynowe. Dla wydzielenia ich z hydrolizatu wykorzystuje się trudną rozpuszczalność kompleksów miedziowych lub srebrnych. Czynniki hydrolizujące mogą być różne. Stosuje się kwas mrówkowy, solny, siarkowy, rozcieńczone zasady. Hydrolizaty traktowane są solami miedzi lub srebra w zależności od wybranego sposobu postępowania.

Metodą, która zdobyła sobie dużą popularność jest metoda miedziowa. Twórcami jej są *Krüger* i *Schmidt* (51), którzy w 1905 roku wykorzystali do celów analizy ilościowej zasad purynowych spostrzeżenie *Krügera* (50) o możliwości wytrącania puryn przy użyciu CuSO_4 i NaHSO_3 . Działanie powyższymi odczynnikami powoduje wypadanie z roztworu kompleksowych połączeń purynowo-miedziowych. W latach trzydziestych zastosowali z powodzeniem metodę miedziową do analizy KN *Levene*, *Dmochowski*, *Kerr* (53a, 24, 44, 45).

Na marginesie metody *Krügera* należy wspomnieć o błędach doświadczalnych, kryjących się w poszczególnych operacjach analitycznych. Istotne znaczenie ma tu kwestia właściwych warunków hydrolizy. Hy-

droliza zbyt energiczna prowadzi do straty puryn, zbyt łagodna natomiast pociąga za sobą możliwość wytrącania się z osadem miedziowym apurynowych związków azotowych (peptydy), co w konsekwencji wpływa na podwyższenie wyników na azot purynowy. Usunięcie niepożądanych zanieczyszczeń wymaga niekiedy kilkakrotnego wytrącania kompleksów purynowych (24).

W roku 1935 Graff i Maculla (32) wprowadzili modyfikację wspomnianej metody, zastępując siarczan miedzi tlenkiem miedziowym, użytym w słabo kwaśnym środowisku. Metoda miedziowa pozwala na oznaczenie w połączonych osadach gwaniny i adeniny tylko tzw. azotu purynowego, po uprzednim rozpuszczeniu osadu w HCl i usunięciu miedzi siarkowodorem. W ekstraktach HCl można było oznaczyć gwaninę jodometrycznie metodą Grynb erga (33) lub też wykorzystując większą podatność tej puryny na utlenianie KMnO_4 , wyliczyć jej ilość z różnicy azotu purynowego i adeninowego, otrzymanego po całkowitym rozłożeniu gwaniny (41). Dokładną mikromodyfikację metody Grynb erga opisali w roku 1954 Dmochowski i Panusz (23).

Do wytrącania zasad purynowych można również stosować związki srebra. Początkowe sposoby wydzielania puryn oparte były na reakcji z tlenkiem srebra w środowisku amoniakalnym (78, 68, 80), ustąpiły one jednak miejsca bardziej dokładnemu strącaniu srebrowemu w środowisku zakwaszonym H_2SO_4 . Kompleksy purynowo-srebrowe otrzymywano przez działanie Ag_2SO_4 (83), lub Ag_2O (24, 46, 47), czy też AgNO_3 w środowisku kwaśnym (57, 58).

Stosunkowo niedawno, bo w roku 1949, Kerr i Seraidarian (46) opracowali dokładną metodę analizy KRN, opartą głównie na oznaczeniu składników azotowych. KRN poddawany jest półgodzinnej hydrolizie we wrzącej łaźni wodnej. W tych warunkach ulega on rozpadowi do puryn i nukleotydów pirymidynowych. Po doprowadzeniu kwasoty roztworu do 0,5 n przy pomocy 2n H_2SO_4 wytrąca się zasady purynowe przez dodanie zawiesiny Ag_2O . Z przesączu, zawierającego jony Ag, można wydzielić nukleotydy pirymidynowe dodatkiem 3 objętości alkoholu izopropylowego. Po ekstrakcji gorącym HCl obu osadów srebrowych, analizuje się poszczególne składniki spektrofotometrycznie oraz oznacza N purynowy i azot związany z nukleotydami pirymidynowymi mikromodyfikacją metody Kjeldahla (44).

Zupełnie nową metodę podali w roku 1951 Marshak i Vogel (63, 61), opierając się na własnościach hydrolizowania KN przez kwas nadchlorowy. Kwas nadchlorowy, wg autorów, rozszczepia ilościowo kwasy nukleinowe, umożliwiając oznaczenie zasad purynowych i pirymidynowych w różnorodnym materiale biologicznym bez uprzedniego izolowania z tkanki KN (62). W ten sposób unika się błędów związanych z niecałko-

witą ekstrakcją, ze zmianą zasad w czasie ekstrakcji itp. Zastosowanie metody *Marshaka* do oznaczenia puryn i pirymidyn KN tkanki zwierzęcej (bakterie, jaja i plemniki *Arbacia* i *Asterias*) obejmuje następujące czynności:

- a) odlipidowanie tkanki mieszaniną acetonu i etanolu (2 : 1),
- b) ekstrakcję związków kwasorozpuszczalnych 70%, lodowato zimnym CCl_3COOH ,
- c) jednogodzinną hydrolizę 12 N HClO_4 we wrzącej łaźni wodnej,
- d) rozdział chromatograficzny otrzymanych zasad i oznaczenie ich spektrofotometrycznie.

Ogromną zaletą tej metody ma być jej czułość. Wymaga ona zaledwie 10 mg badanego materiału. Połączenie metody *Marshaka* z metodą *Schmidta* i *Thannhausera* umożliwia bezpośrednio oznaczanie zasad azotowych zarówno w KRN jak i w KDN (61).

Uzyskiwane omówionymi sposobami produkty hydrolizy KN można oznaczać chemicznymi metodami analitycznymi. Ustępują one oczywiście pod względem dokładności metodzie spektrofotometrycznej lub polarograficznej, jednakże w warunkach, w których brak jest kosztownej i na ogół trudno dostępnej aparatury, jakiej one wymagają, oznaczanie oparte na pewnych charakterystycznych reakcjach zasad azotowych, występujących w kwasach nukleinowych, są niezastąpione jako ważne uzupełnienie metod chromatograficznych i jonoforetycznych.

Reakcje kolorymetryczne zasad pirymidynowych znane są od dawna. W 1936 r. *Hunter* (39), opierając się na badaniach *Johnsona* i *Clappa* (40) nad reakcją sprzęgania pirymidyn ze związkami dwuazoniowymi, opisał barwną próbę, jaką daje tymina ze zdwuazowanym kwasem sulfanilowym w obecności NaOH i hydroksylaminy. Powstające na tej drodze intensywnie czerwone zabarwienie pozwala odróżnić tyminę od uracylu i cytozyny, dla których reakcja ta wypada negatywnie. Powyższa próba została później wykorzystana przez *Pircio* i *Cerecedo* (76) do ilościowego oznaczania tyminy w hydrolizatach KDN po usunięciu puryn i kwasu lewulinowego, pochodzącego z rozkładu dezoksyrybozy. Jako środka wytrącającego puryny użyto PdCl_2 (34). Kwas lewulinowy usuwa się przy pomocy ekstrakcji eterowej. Hydrolizę KDN przeprowadza się ogrzewając badaną substancję wobec stężonego kwasu mrówkowego w zatopionych rurach szklanych lub wobec 24% H_2SO_4 . Pierwsza metoda pozwala na kolorymetryczne oznaczanie obok tyminy również i cytozyny, druga natomiast służy tylko do oznaczania tyminy, gdyż cytozyna w tych warunkach przez nią podanych ulega dezaminacji. *Day* i *Mosher* (18, 19) wprowadzili pewne modyfikacje do próby *Huntera*. Polegały one na zastąpieniu hydroksylaminy gliceryną i przeprowadzaniu reakcji sprzęgania w atmosferze tlenu w 30°C, co zwiększało znacznie szybkość

reakcji i wpłynęło dodatnio na trwałość zabarwienia. Analiza tyminy KDN obejmowała hydrolizę w 9 N H_2SO_4 w temp. około 130° w ciągu 22 godzin, usunięcie puryn z rozcieńczonego hydrolizatu przy pomocy Ag_2SO_4 i kolorymetryczne oznaczenie tyminy.

Metodę oznaczania uracylu i cytozyny na drodze kolorymetrycznej opracowali Soodak, Púrció i Cerecedo w roku 1949 (87). Metoda ta oparta jest na jakościowej próbie Wheelera i Johnsona (96) polegająca na tworzeniu się purpurowego osadu po działaniu $Ba(OH)_2$ na roztwór uracylu i cytozyny, uprzednio poddany działaniu wody bromowej. Dostosowanie tej próby do oznaczeń ilościowych polega na redukowaniu odczynnika Newtona na kwas moczowy przez uracyl i cytozynę (69). Ilości uracylu i cytozyny dające się oznaczyć tą drogą zawierają się w granicach 6—33 μg . Kolorymetryczne oznaczenie obu pirymidyn musi poprzedzić ich rozdział przez adsorpcję na syntetycznych żywicach. Obecność tyminy nie przeszkadza w oznaczeniach.

Również i zasady purynowe można oznaczać kolorymetrycznie. Hitchings (36) podał w roku 1941 metodę kolorymetrycznego pomiaru gwaniny wykorzystując wcześniejsze obserwacje Funka i Macalluma (30). Podstawą wykonywania tego pomiaru jest zabarwienie, jakie daje gwanina z odczynnikiem fenolowym. Adenina i hypoksantyna nie reagują z tym odczynnikiem, natomiast ksantyna daje takie samo zabarwienie jak gwanina. Ilość tej ostatniej niezbędna dla wykonania oznaczenia wynosi 0,001 mM. Zastosowanie tej metody do oznaczania gwaniny KN wymaga izolowania zasad purynowych. Metoda kolorymetrycznego oznaczania adeniny opisana została przez Woodhouse'a w roku 1950 (99). Polega ona na redukcji adeniny pyłkiem cynkowym wobec 1 N HCl lub H_2SO_4 w podwyższonej temperaturze, dwuazoniowaniu i sprzęganiu z odczynnikiem Bratton-Marshalla (5). Powstałe zabarwienie mierzy się kolorymetrycznie.

Ciągły postęp w wysubtelnianiu metod analizy składników KN nie ominął również i tak podstawowego oznaczania, jakim jest oznaczenie azotu zasad purynowych czy pirymidynowych. Należy tu zaliczyć metodę Markhama (60), będącą mikromodyfikacją metody Kjeldahla, metodę kolorymetrycznego oznaczania azotu Weeda i Courtenaya'a (94) opartą na udoskonalonym sposobie spalania substancji organicznych wg White'a i Longa (97) oraz ostatnio podaną metodę Lubochinsky'ego i Zalty (48).

Na zakończenie tego szkicowego referatu pragniemy podkreślić konieczność stosowania w analizie KN zawsze co najmniej dwu metod pomiaru w celu uniknięcia ewentualnych niedokładności i pomyłek. Dotyczy to zwłaszcza przypadków badań tkanek o zupełnie jeszcze nieznanym składzie KN.

L I T E R A T U R A

1. Allen R. J. L., *Biochem. J.*, **34**, 858 (1940).
2. Bell, Doisy, *J. Biol. Chem.*, **44**, 45 (1920).
3. Bendich A., Russel P. J., Brown G. B., *J. Biol. Chem.*, **203**, 307 (1953).
4. Berrenblum J., Chain E., *Biochem. J.*, **32**, 286 (1938).
5. Bratton A. C., Marshall E. K., *J. Biol. Chem.*, **128**, 537 (1937).
6. Briggs, *J. Biol. Chem.*, **53**, 13 (1922); **59**, 255 (1924).
7. Brody A., *Acta Chem. Scand.*, **7**, 502 (1953).
8. Brody A., *Nature*, **174**, (1954).
9. Ceriotti G., *J. Biol. Chem.*, **198**, 297 (1952).
10. Cohen S. S., *J. Biol. Chem.*, **156**, 691 (1944).
11. Cooper W. D., Loring H. S., *J. Biol. Chem.*, **211**, 505 (1954).
12. Davidson J. N., *Cold Spring Harbour Symp.*, **12**, 50 (1947).
13. Davidson J. N., *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, London, 1953.
14. Davidson J. N., Fraser S. C., Hutchinson W. C., *Biochem. J.*, **49**, 311 (1951).
15. Davidson J. N., Smellie R. M. S., *Biochem. J.*, **52**, 594 (1952).
16. Davidson J. N., Waymouth C., *Biochem. J.*, **38**, 379 (1944).
17. Dawidowa S., *Biochimia*, **19**, 178 (1954).
18. Day E. D., *Dissertation University of Delaware*, 1952.
19. Day E. D., Mosher W. A., *J. Biol. Chem.*, **197**, 227 (1952).
20. Delory G. E., *Biochem. J.*, **32**, 1161 (1938).
21. Dische Z., *Mikrochemie*, **8**, 4 (1930).
22. Dische Z., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **55**, 217 (1944).
23. Dmochowski A., Panusz H., *Acta Biochimica Polonica*, **1**, (1954).
24. Dmochowski A., Zajdenman A., Rabanowska A., *Biochem. Z.*, **279**, 289 (1935).
25. Dorner R. W., Knight C. A., *J. Biol. Chem.*, **205**, 959 (1933).
26. Drasher M. R., *Science*, **118**, 181 (1953).
27. Filipowicz B., Leyko W., Więckowski W., *Acta Physiol. Polonica* suppl., **3**, 261 (1952).
28. Fiske C., Subbarow Y., *J. Biol. Chem.*, **81**, 629 (1929).
29. Folin O., Denis W., *J. Biol. Chem.*, **12**, 239 (1912).
30. Funk, Macallum, *Biochem. J.*, **7**, 356 (1913).
31. Gomori G., *J. Lab. Clinic. Med.*, **27**, 955 (1942).
32. Graff S., Maculla A., *J. Biol. Chem.*, **110**, 71 (1935).
33. Grynberg M., *Biochem. Z.*, **253**, 143 (1932).
34. Gulland J., Macrae T., *J. Chem. Soc.*, 2231 (1932).
35. Hirtz J., Fayet N. T., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **36**, 1449 (1954).
36. Hitchings G., *J. Biol. Chem.*, **139**, 843 (1941).
37. Holden M., *Analyst*, **78**, 542 (1953).
38. Holloway B. W., Ripley S. H., *J. Biol. Chem.*, **196**, 695 (1952).
39. Hunter G., *Biochem. J.*, **30**, 745 (1936).
40. Johnson, Clapp, *J. Biol. Chem.*, **5**, 163 (1908—9).
41. Jorpes E., *Biochem. J.*, **28**, 2097 (1934).
42. Kaplan N. O., Greenberg D. M., *J. Biol. Chem.*, **156**, 511 (1944).
43. Karpiak S. E., *Postępy Biochemii*, **1**, 59 (1953).
44. Kerr S. E., *J. Biol. Chem.*, **132**, 147 (1940).
45. Kerr S. E., Blish M. E., *J. Biol. Chem.*, **98**, 193 (1932).

46. Kerr S. E., Seraidarian K., Wargon M., *J. Biol. Chem.*, **181**, 761 (1949).
47. Kerr S. E., Seraidarian K., *J. Biol. Chem.*, **159**, 211 (1945).
48. Khouvine Y., Baron F., Gregoire J., Hirsch M. L., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **36**, 31 (1954).
49. King E. J., *Biochem. J.*, **26**, 292 (1932).
50. Krüger M., *Z. physiol. Chemie*, **18**, 351 (1894).
51. Krüger M., Schmidt J., *Z. f. physiol. Chemie*, **45**, 1 (1905).
52. Kuttner, Cohen, *J. Biol. Chem.*, **75**, 517 (1927), **86**, 671 (1930).
53. Leuthard F., Exer B., *Helv. Chim. Acta*, **36**, 501 (1953).
- 53a. Levene P. A., Bass L. W., *Nucleic Acids*, New York, 1931.
54. Logan J. E., Maunell W. A., Rossiter R. J., *Biochem. J.*, **51**, 470 (1952).
55. Lombardo H. E., Cerecedo L. R., Reddy D. N., *J. Biol. Chem.*, **203**, 97 (1953).
56. Loring H. S., Bortner H. W., Levy L. W., Hammel M. L., *J. Biol. Chem.*, **196**, 807 (1952).
57. Loring H. S., Fairley J. L., Bertner H. W., Seagran H. L., *J. Biol. Chem.*, **197**, 809 (1952).
58. Loring H. S., Piece K., *J. Biol. Chem.*, **197**, 809 (1952).
59. Manson L. A., Lampen J. O., *J. Biol. Chem.*, **191**, 87 (1951).
60. Markham R., *Biochem. J.*, **36**, 790 (1942).
61. Marshak A., *J. Biol. Chem.*, **189**, 607 (1951).
62. Marshak A., Vogel H., *Federation Proc.*, **9**, 85 (1950).
63. Marshak A., Vogel H., *J. Biol. Chem.*, **189**, 597 (1951).
64. Massart L., Hoste J., *Biochim. Biophys. Acta*, **1**, 83 (1947).
65. Mauritzen C. M., Roy A. B., Stedman E., *Proc. Roy. Soc.*, **140**, 18 (1952).
66. Mc Indoe W. M., Davidson J. N., *Brit. J. Cancer*, **6**, 200 (1952).
67. Mejbaum W., *Ztschr. f. phys. Chem.*, **258**, 117 (1939).
68. Neubauer, *Z. anal. Chem.*, **6**, 33 (1867).
69. Newton E., *J. Biol. Chem.*, **120**, 315 (1937).
70. Niemierko W., *Postępy Biochemii*, **1**, 34 (1953).
71. Ogur M., Minkler S., Lindegren G., Lindegren C. C., *Arch. Biochem. Biophys.*, **40**, 175 (1952).
72. Ogur M., Rosen G., *Arch. Biochem.*, **25**, 264 (1950).
73. Osmond J., *Bull. Soc. Chim.*, **47**, 745 (1887).
74. Parker G., *Biochem. J.*, **52**, 389 (1952).
75. Pereira R. S., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **21**, 827 (1939).
76. Pircio A., Cerecedo L., *Arch. Biochem.*, **26**, 209 (1950).
77. Pregl-Roth, *Quantitative organische Mikroanalyse*, Wien, 1947.
78. Salkowski E., *Arch. Ges. Physiol.*, **69**, 280 (1896).
79. Saz A. K., *Arch. Biochem.*, **35**, 469 (1952).
80. Schindler S., *Z. physiol. Chem.*, **13**, 432 (1889).
81. Schlenk F., *Adv. Enzym.*, **9**, 455 (1949).
82. Schmidt G., Hecht J., Thannhauser S. J., *J. Gen. Physiol.*, **31**, 203 (1948).
83. Schmidt G., Levene P. A., *J. Biol. Chem.*, **126**, 423 (1938).
84. Schmidt G., Thannhauser S. J., *J. Biol. Chem.*, **161**, 83 (1945).
85. Schneider W. C., *J. Biol. Chem.*, **161**, 293 (1945).
86. Schneider W. C., *J. Biol. Chem.*, **164**, 747 (1946).

87. Soodak M., Pircio A., Cerecedo L., *J. Biol. Chem.*, **181**, 713 (1949)
88. Stacey O., *Adv. Carb. Chem.*, **8**, 45 (1953).
89. Steele R., Sfortunato T., Ottolenglu L., *J. Biol. Chem.*, **177**, 231 (1949).
90. Stumpf P. K., *J. Biol. Chem.*, **169**, 367 (1947).
91. Vendrely R., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1**, 95 (1947).
92. Vendrely R., Sarciron R., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **26**, 214 (1944).
93. Weed L. L., Cohen S. S., *J. Biol. Chem.*, **192**, 693 (1951).
94. Weed L. L., Courtenay T. A., *J. Biol. Chem.*, **206**, 735 (1954).
95. Weed L. L., Wilson D. W., *J. Biol. Chem.*, **189**, 435 (1951).
96. Wheeler H., Johnson T., *J. Biol. Chem.*, **3**, 183 (1907).
97. White L. M., Long M. C., *Anal. Chem.*, **23**, 363 (1951).
98. Woodhouse B., *Biochem. J.*, **44**, 185 (1949).
99. Woodhouse D. L., *Arch. Biochem.*, **25**, 347 (1950).
100. Zamenhof S., Leidy G., Fitzgerald P. L., Alexander H. E. Chargaff E., *J. Biol. Chem.*, **203**, 695 (1953).

że być przesunięte nawet do długich fal zakresu widzialnego (barwniki). Pochłanianie promieniowania przez substancje jest przedstawiane zwykle w postaci wykresów we współrzędnych: wielkość pochłaniania i długość fali. Miarą pochłaniania jest logarytm stosunku natężenia promieniowania padającego (J_0) na substancję badaną do przechodzącego (J) przez nią. Stosunek ten wyrażany jest w jednostkach absorpcji (A), zwanej dawniej ekstynkcją, gęstością optyczną itp. (4, 12, 28).

Jak wynika z prawa Lamberta-Beera
$$A = \lg \frac{J_0}{J} = k c l$$

absorpcja w danej długości fali (λ) jest wprost proporcjonalna do stężenia (c) i grubości warstwy substancji badanej (l).

Współczynnik absorpcji k jest wielkością stałą dla danej substancji w stałych warunkach pomiaru i liczbowo jest on zależny od jednostek w jakich wyrażane jest stężenie (w molach na litr (ϵ) w gramach (k) lub też w procentach).

Absorpcję zwykle odkłada się na osi rzędnych. Często zamiast absorpcji odkłada się na osi rzędnych także współczynnik absorpcji (k , ϵ) lub też logarytmy tych wielkości. Rzadziej i to raczej w zakresie podczerwieni (w aparaturze samorejestrującej) odkłada się na osi rzędnych transmisję ($T \%$ = $\frac{J}{J_0} \cdot 100$) podającą w procentach przepuszczalność promieniowania przez substancję badaną.

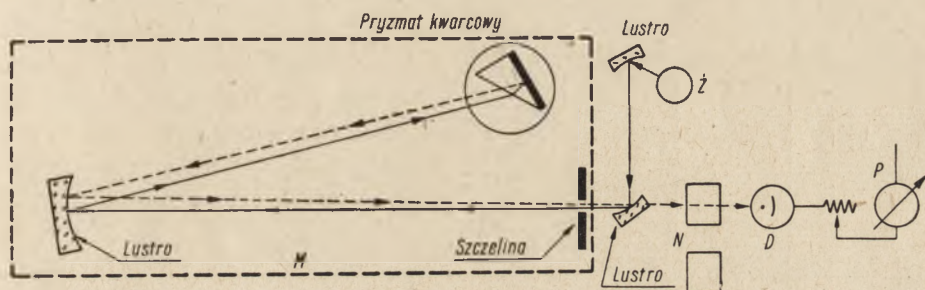
Na osi rzędnych odkłada się zwykle długość fali w mikronach (μ), milimikronach ($m\mu$), chociaż stosuje się także jednostki częstości drgań (ν_{sek}^{-1}) lub liczbę falową (ν_{cm}^{-1}) wprost proporcjonalne do energii niesionej przez dane promieniowanie.

Pomiary absorpcji przeprowadzane są obecnie prawie wyłącznie przy pomocy fotoelektrycznych spektrofotometrów, których przykładem mogą być spektrofotometry Beckmana, Unicam-Cambridge, Perkin-Elmer i wiele innych. Z metod fotograficznych korzysta się tylko w wyjątkowych przypadkach. W najogólniejszym przypadku spektrometr do badań absorpcyjnych składa się z pięciu zasadniczych części: źródła promieniowania (Z), monochromatora (M), pomieszczenia dla substancji badanej (N) detektora promieniowania przechodzącego przez tę substancję (D) oraz z urządzenia pomiarowego pozwalającego na odczytanie wyniku pomiaru (P) (rys. 1).

Pomiary absorpcji pozwalają na wyciąganie wniosków odnośnie jakościowego i ilościowego składu substancji badanej składającej się z mieszaniny różnych związków. Badania jakościowe dotyczą najczęściej identyfikacji substancji zawierających charakterystyczne maksima absorpcji. Badania ilościowe możliwe są do przeprowadzenia tylko przy znajomości jakościowego składu mieszaniny i dokładnej znajomości pochłaniania

wszystkich składników w stanie czystym. Badania ilościowe w niektórych przypadkach możliwe są do przeprowadzenia z bardzo małymi ilościami substancji rzędu mikrogramów (μg).

Podstawą analizy ilościowej przy wykrywaniu jednego składnika może być porównanie pochłaniania z roztworem standartowym o znanym stężeniu lub też znajomość współczynnika pochłaniania ustalonego raz na zawsze dla danych warunków pomiaru.



Rys. 1. Spektrofotometr Beckmana.

Podstawą analizy ilościowej przy wykrywaniu dwóch składników jest 1. dokładna znajomość współczynników obydwu składników w dwóch długościach fal przyjętych za analityczne (dobrych w sposób zapewniający najlepsze wyniki pomiaru) oraz

2. rozwiązanie układu dwóch równań z dwiema niewiadomymi:

$$A_{(\lambda_1)} = k_{(\lambda_1)} c_1 l + k_{(\lambda_1)} c_2 l$$

$$A_{(\lambda_2)} = k_{(\lambda_2)} c_1 l + k_{(\lambda_2)} c_2 l$$

Mieszanki więcej składnikowe badane są rzadziej i wyniki obarczone są dużymi błędami. Podstawą analizy jest rozwiązywanie układu tylu równań, ile składników znajduje się w mieszaninie.

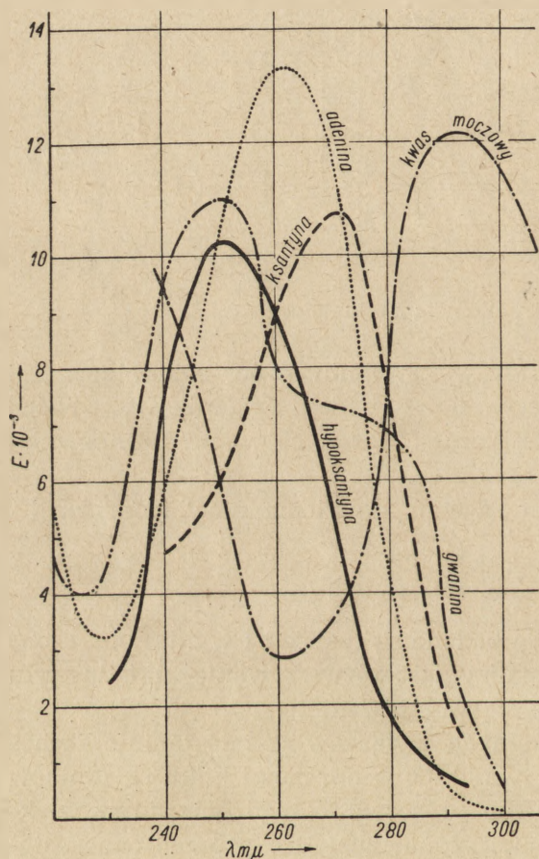
Widma pochłaniania poszczególnych związków w mieszaninie zachodzą na siebie (częściowo się pokrywają), co w obecności kilku składników mieszaniny uniemożliwia wykonanie oznaczeń. Z tego powodu w większości mieszanin analiza spektrometryczna musi być poprzedzona systematycznym rozdzielaniem na składniki.

Możliwości analizy i wyniki oznaczenia są uzależnione od sposobu rozdzielania mieszaniny.

Związki nukleinowe

Szczególnie ciekawe możliwości istnieją w dziedzinie badania widm pochłaniania związków zawierających w swej cząsteczce układ purynowy lub pirymidynowy (20).

W pierścieniach tych znajduje się kilka wiązań podwójnych w pozycji sprzężonej oraz wiązania pojedyncze między atomami węglowymi, a także są tam heteroatomy, a więc w związkach tych występują elektrony σ , π , n , decydujące o pochłanianiu w zakresie nadfioletu. Najważniejszymi spośród tych związków są związki nukleinowe (rozumiane jako kwasy nukleinowe, produkty ich rozkładu oraz produkty ich metabolizmu). We wszystkich związkach nukleinowych pochłanianie promieniowania w zakresie nadfioletu



Rys. 2. Widma absorpcji puryn w 0,1 n HCl.

uzależnione jest prawie wyłącznie od układu purynowego lub pirymidynowego wchodzącego w skład cząsteczki. Stąd pochodzi duże podobieństwo widm różnych związków nukleinowych zawierających ten sam układ chłomoforowy. Związki purynowe i pirymidynowe występują w wielu odmianach tautomerycznych, co znacznie rozszerza możliwości badań absorpcyjnych, ponieważ odmiany tautomeryczne różnią się swym widmem pochłaniania. Omówienie metody stosowanej przy spektrometrycznym badaniu związków nukleinowych musi być poprzedzone przeglądem widm pochłaniania poszczególnych związków nukleinowych. Z wchodzących w grę biologicznie ważnych związków będą omówione:

zasady azotowe — puryny i pirymidyny,

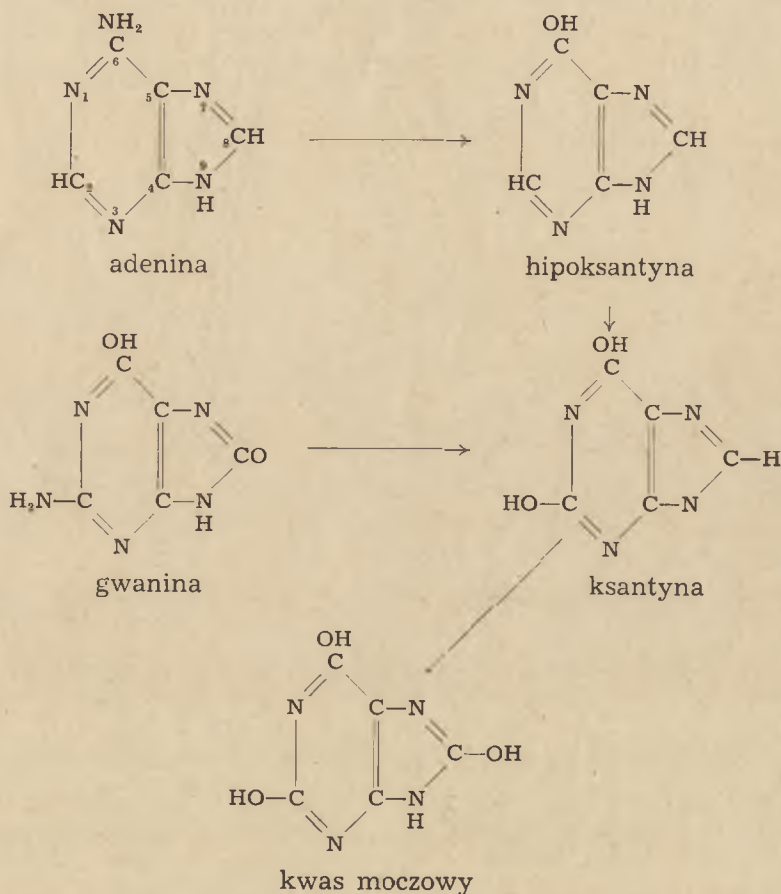
nukleozydy — będące połączeniem w/w zasad z cukrami (rybozą lub dezoksyrybozą),

nukleotydy — będące połączeniem nukleozydów z kwasem fosforowym,

kwasy nukleinowe — będące połączeniem wielu zwykle różnych nukleotydomów.

Interesujące jest także pochłanianie produktów metabolizmu związków nukleinowych, jednak danych na ten temat jest jeszcze bardzo mało (8).

Najważniejszymi zasadami purynowymi wchodzącymi w skład kwasów nukleinowych są adenina i gwanina, zaś ich metabolitami występującymi w ustroju żywym są hipoksantyna, ksantyna i kwas moczowy, będący ostatecznym produktem przemiany związków purynowych u człowieka

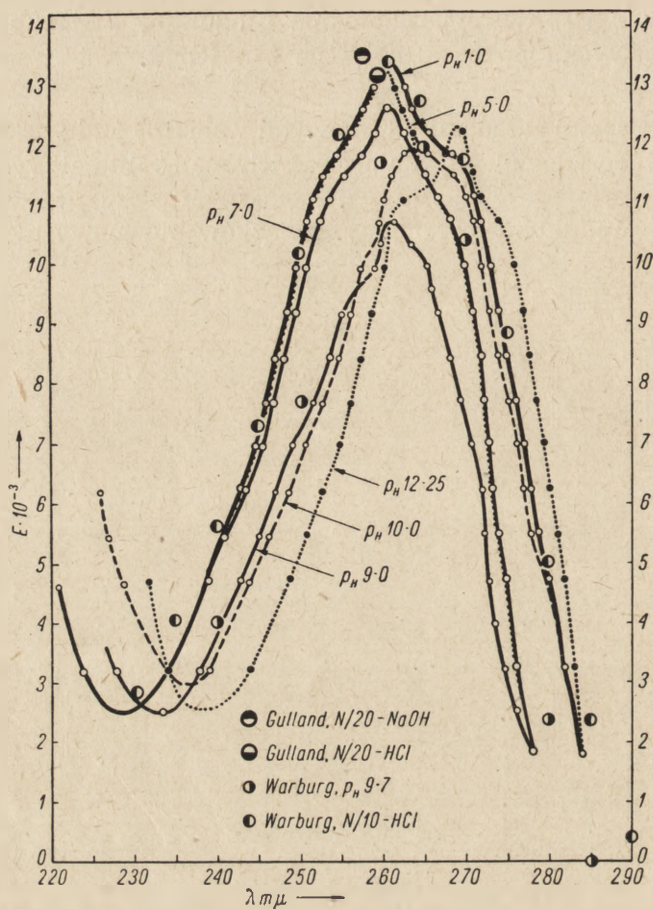


Ich widma absorpcji zostały zebrane na rys. 2 (14, 16) dla roztworów w 0,1 n HCl.

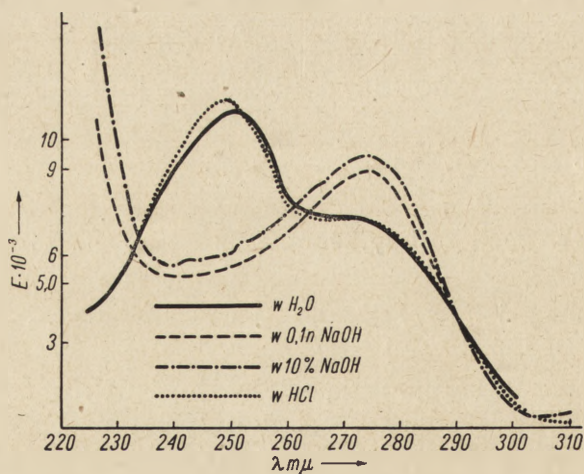
Dla roztworów o innych stężeniach jonów wodorowych wygląd krzywych absorpcji jest inny.

Widmo adeniny wykazuje małą zależność od pH roztworu (rys. 3).

Widmo gwaniny natomiast ulega znacznym zmianom pod wpływem zmian pH (rys. 4).

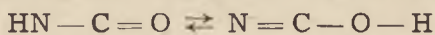


Rys. 3. Zależność widma absorpcji adeniny od pH (19).

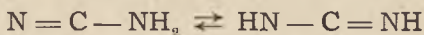


Rys. 4. Zależność widma absorpcji gwaniny od pH (10).

Zmiany widma gwaniny związane są z tautomerią (keto-enolową) typu

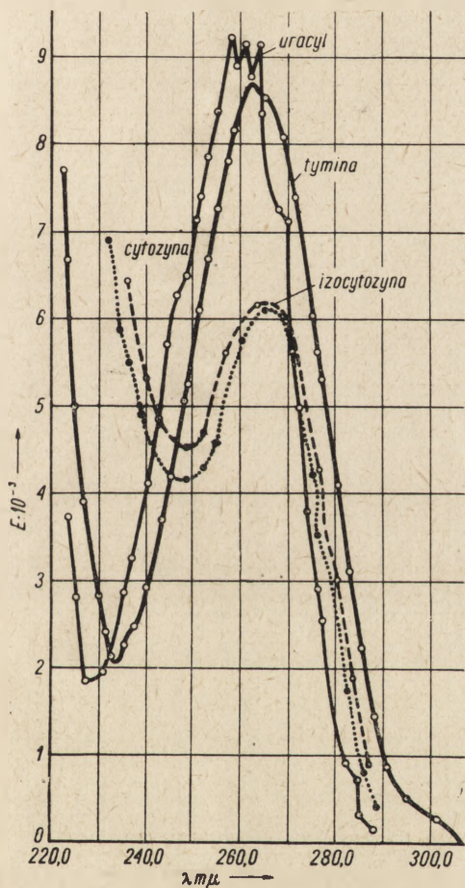


zaś zmiany widma adeniny są wynikiem tautomerii (amino-iminowej) typu

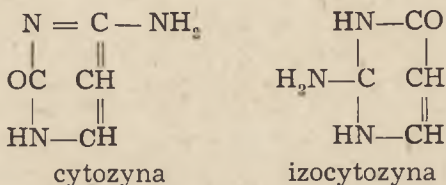
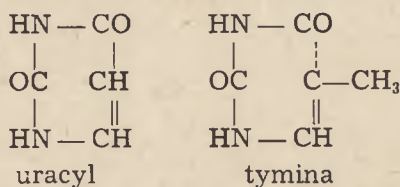


Najważniejszymi zasadami pirymidynowymi są uracyl, cytozyna i tymina, a także izocytozyna i 5-metylocytozyna.

Drogi ich rozkładu w organizmie prowadzące do powstania amoniaku i dwutlenku węgla nie są jeszcze dostatecznie znane.



Rys. 5. Widma absorpcji pirymidyn.



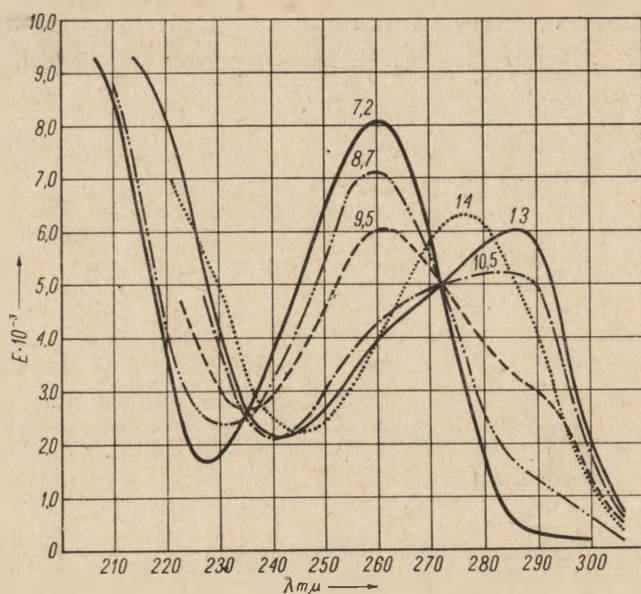
Ich widma absorpcji zostały zebrane na rys. 5 (13).

Wszystkie te związki odznaczają się dużą zależnością widma od pH na skutek istnienia wielu odmian izometrycznych, co szczególnie jaskrawo jest widoczne na przykładzie uracylu (25) rys. 6 oraz cytozyny (23) rys. 7.

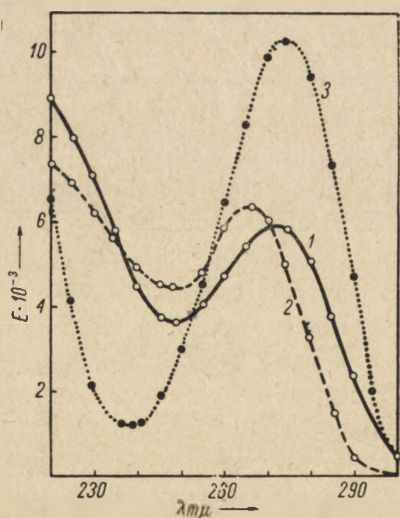
Połączenie zasady azotowej z cząsteczką cukru, który wykazuje tylko nieznaczną absorpcję w nadfiolecie, wpływa tylko w nieznacznym stopniu na wygląd widma. Na skutek obciążenia cząsteczki,

jak to ma miejsce k nukleozydach, położenie maksimum pochłaniania przesuwa się nieznacznie bathochromowo (w kierunku fal dłuższych).

Jeszcze mniejszy wpływ ma dodanie w cząsteczce grupy fosforanowej

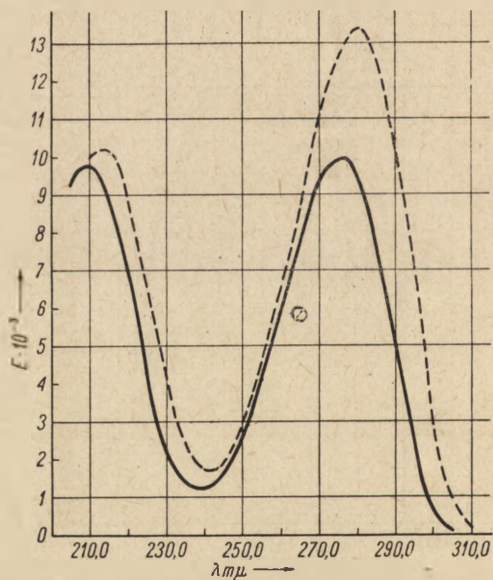


Rys. 6. Zależność widma absorpcji uracylu od pH.



- 1 —○—○— w 0,01 n NaOH
 2 —○—○— w 0,05 M buforze fosforowym pH 7,—
 3 —●—●— w 0,01 n HCl

Rys. 7. Zależność widma absorpcji cytozyny od pH.



- cytydyna i kwas cytydylowy
 - - - cytozyna

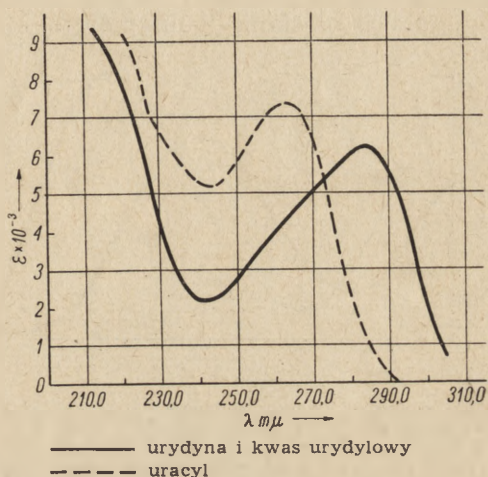
Rys. 8. Widmo absorpcji cytozyny, cytydyny i kwasu cytydylowego w 0,01 n HCl.

jak to widać na przykładzie zestawionych widm cytozyny, cytydyny i kwasu cytydylowego (rys. 8) (9, 23, 25), oraz uracylu, urydyny i kwasu urydylowego (rys. 9) (23, 25). Wymienione związki zawierają w swej cząsteczce rybozę.

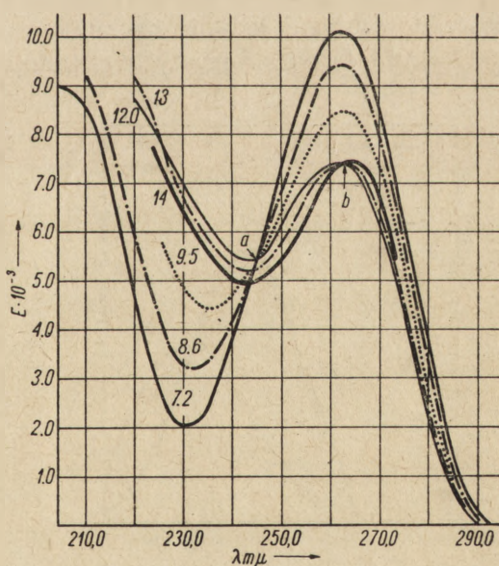
Wymienione pochodne cytozyny najwygodniej jest badać spektrometrycznie w środowisku 0,01 n HCl, ponieważ występują wtedy największe różnice w położeniu maksimów absorpcji. Pochodne uracylu przeciwnie wykazują największe różnice w środowisku 0,01 n NaOH, ponieważ w tych warunkach widmo uracylu jest silnie zależne od pH na skutek labilności wodoru przy azocie 3, zaś jego pochodna urydyna i kw urydylowy mają wodór ten zastąpiony wiązaniem rybozydowym, eliminującym aromatyczny charakter pierścienia pirydynowego.

Pochodne tyminy zawierającej grupę metylową w pozycji 5 wykazują małe przesunięcia bathochromowe widma w stosunku do pochodnych uracylu. Do bardzo ciekawych wniosków doprowadziło badanie zależności widma absorpcji nukleozydów od pH w środowisku silnie alkalicznym (9, 25). Okazało się, że w tych warunkach pojawia się dysocjacja cząsteczki cukru, co prowadzi do zmian w widmie absorpcji, jak to jest widoczne na rys. 10 dla przykładu urydyny.

Spektrometryczne oznaczanie różnych nukleotydydów obok siebie jest możliwe w prostych mieszaninach o ile nukleotydy różnią się położeniem maksimów. W przypadku kwasu cytydy-



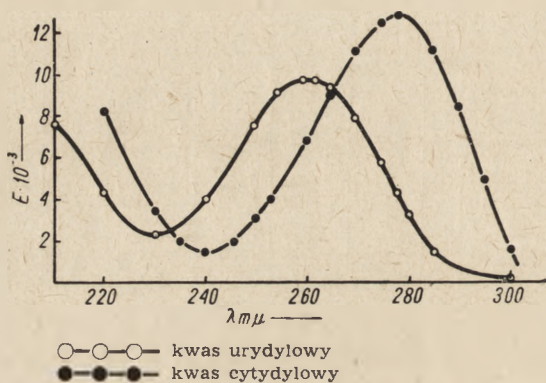
Rys. 9. Widma absorpcji uracylu, urydyny i kw. urydylowego w 0,01 n NaOH.



Rys. 10. Krzywa absorpcji urydyny w różnych pH.

lowego i urydylowego zostało to wykorzystane przez prowadzenie pomiarów w 262, 278 i 265 m μ (16). Z dwóch pierwszych punktów oznacza się stężenia i wzajemny stosunek obu pochodnych, zaś w 265m μ możliwe jest sprawdzające oznaczenie sumaryczne obydwu związków, ponieważ w tym punkcie molowe współczynniki absorpcji dla obydwu związków są jednokowe (rys. 11).

Na specjalną uwagę zasługują widma pochłaniania nukleotydów, występujących w stanie wolnym w organizmach żywych. Najważniejszymi



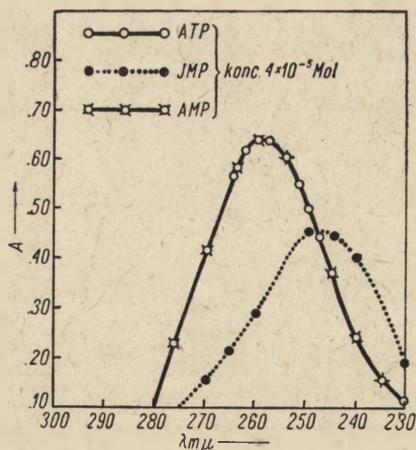
Rys. 11. Krzywa absorpcji kwasów cytydylowego i urydylowego w 0,01 n HCl.

z nich są kwasy adenozyno-5-trójfosforowy (ATP), adenozyno-5-dwufosforowy (ADP), adenozyno-5-monofosforowy (AMP), kwas adeniłowy mięśniowy oraz inozynomonofosforowy (IMP) będący pochodną hipoksantyny (15).

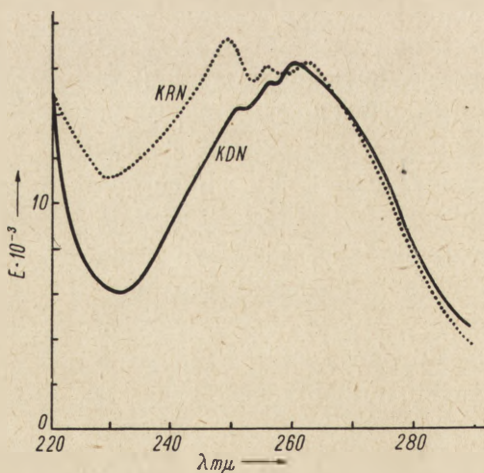
Ich widma pochłaniania (rys. 12) są podobne do widm wolnych zasad azotowych, wchodzących w skład ich cząsteczek. Ani reszta cukrowa

ani też fosforanowa nie wpływają na położenie maksimum absorpcji. Ich obecność wpływa jedynie na zmianę współczynnika absorpcji.

Najmniej charakterystyczne widma posiadają kwasy nukleinowe, po-



Rys. 12. Widma absorpcji ATP, AMP i IMP.



Rys. 13. Widma absorpcji kwasu KRN i KDN.

nieważ ich widmo jest zbliżone do sumy pochłaniania poszczególnych składników cząsteczki danego kwasu nukleinowego.

Przykładem niewielkich różnic w wyglądzie widma kwasów rybo- i dezoksyrybonukleinowych (różniących się nie tylko składnikami cukrowymi ale i azotowymi) jest rys. 13 (18).

Przytoczone poprzednio widma absorpcji związków nukleinowych wskazują, że prawie wszystkie omówione związki posiadają charakterystyczne maksima w zakresie 240 — 300 m μ . Z tego też powodu bezpośrednia analiza widmowa mieszaniny tych związków nie może prowadzić do oznaczenia poszczególnych składników.

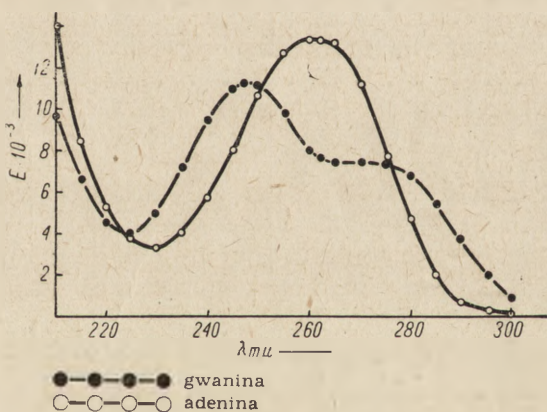
Oznaczanie to jest możliwe tylko przy zastosowaniu specjalnych chwytów pozwalających na różnicowanie poszczególnych składników. Najlepsze wyniki można osiągnąć wykonując oznaczenia spektrometryczne frakcji rozdzielonych innymi metodami.

Najczęściej związki nukleinowe poddaje się hydrolizie na najprostsze składniki. Z otrzymanej mieszaniny produktów rozpadu związku purynowe wydziela się przez wytrącenie srebrem, co prowadzi do oddzielenia od pirymidyn. Jeżeli otrzymane mieszaniny nie zawierają większej ilości składników niż dwa można je oznaczyć spektrofotometrycznie. I tak np. mieszaninę adeniny i gwaniny (16) oznacza się przeprowadzając pomiar absorpcji przy 245 i 262 m μ . Obliczenie z układu dwóch równań z 2 niewiadomymi prowadzi do oznaczenia stężenia składników (rys. 14).

Sumaryczne stężenie molowe można w tym przypadku obliczyć przeprowadzając dodatkowo pomiar w 276 m μ , a więc w punkcie, w którym współczynnik molowy absorpcji obydwu składników jest jednakowy, podobnie jak to miało miejsce w przypadku mieszaniny kwasu cytydylowego i urydylowego.

Często dobór analitycznych długości fal może być znacznie ułatwiony przez dobór takiego pH środowiska, przy którym różnice w absorpcji składników są największe, jak to było widoczne w przypadku pochodnych uracylu lub też reszty cukrowej nukleozydu.

Bardzo trudną, jednak najbardziej specyficzną metodą selektywnego



Rys. 14. Widma absorpcji adeniny i gwaniny w 0,1 n HCl.

oznaczania poszczególnych składników jest wykorzystanie reakcji enzymatycznych.

Kalckar z Kopenhagi (14, 15) doprowadził technikę stosowania enzymów w oznaczeniach spektrometrycznych do perfekcji, co pozwoliło na wykrywanie różnych nukleozydów, nukleotydów i zasad azotowych w mieszaninach. I tak np. hipoksantyna i ksantyna mogą być usuwane z mieszaniny działaniem oksydazy ksantynowej, zamieniającej je na kwas moczowy. Wynikiem tego jest zmniejszenie się wartości absorpcji w maksimum pochłaniania ksantyny (27 m μ) lub hipoksantyny (248 m μ) a zwiększenie się pochłaniania w 290 m μ charakterystycznego dla kwasu moczowego. Kwas moczowy może być oznaczany przez zmianę enzymatyczną pod wpływem urykazy na allantoinę nie pochłaniającą promieniowania nadfioletowego.

Przykładem zmian zachodzących przy enzymatycznym usuwaniu składników mieszaniny w przeliczeniu na stężenie 1 mikrograma w mili-litrze i na grubość warstwy 1 centymetra może służyć tablica 1 (14).

Tablica 1
Optyczne stałe reakcji hydroksypuryn

hydroksypuryna	enzym	ΔA_{290}	ΔA_{270}	ΔA_{260}	ΔA_{248}
hipoksantyna \longrightarrow \longrightarrow kwas moczowy	oksydaza ksantynowa	+ 0,080	- 0,007		- 0,030
ksantyna \longrightarrow „	„	+ 0,066	- 0,053		0
gwanina \longrightarrow „	„ + gwanaza	+ 0,048	- 0,025		
kwas moczowy \longrightarrow \longrightarrow allantoina	urykaza	- 0,072		- 0,023	

Nukleozydy i nukleotydy hydroksypurynowe nie ulegają działaniu oksydazy ksantynowej. W celu ich oznaczenia należy poddać je uprzednio działaniu nukleozydazy, ewentualnie w przypadku nukleotydów: nukleotydzazy lub niespecyficznej fosfatazy.

W przypadku oznaczania gwaniny dodatkowym enzymem potrzebnym do analizy jest gwanaza działająca dezaminująco z wytworzeniem ksantyny, która już dalej może być oznaczana przy pomocy oksydazy. Stosowanie enzymów wymaga znajomości szybkości reakcji enzymatycznych oraz wpływu substancji, z której zbudowany jest enzym, na wygląd widma pochłaniania. Wymaga także posiadania odpowiednio czystych enzymów.

Wykorzystanie oznaczeń spektrometrycznych w nadfiolecie przyczyniło się m. in.:

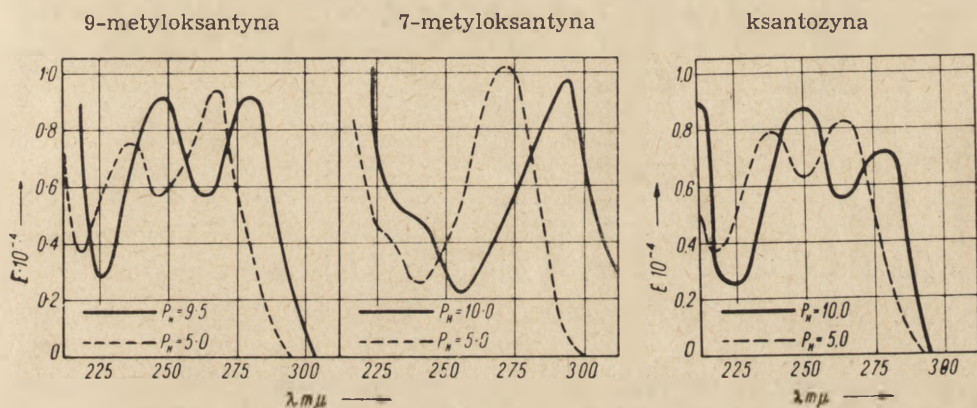
1. do ustalenia składu nukleotydowego kwasów nukleinowych wyodrębnionych z różnych tkanek,

2. do ustalenia zawartości poszczególnych związków nukleinowych w różnych tkankach,

3. pozwoliło na oznaczenia stałych dysocjacji różnych związków nukleinowych,

4. było decydującym czynnikiem w ustalaniu struktury związków nukleinowych. I tak np. szereg prac z tej dziedziny było poświęconych ustaleniu miejsca przyłączenia cząsteczki cukru do pierścienia purynowego.

Okazało się to możliwe przez porównanie widm absorpcji naturalnych produktów z syntetycznie otrzymanymi metylopo pochodnymi (11) zawierającymi grupę metylową przy azocie 9 pierścienia purynowego a nie 7, jak to poprzednio przypuszczano.



Rys. 15. Porównanie widm absorpcji różnych pochodnych ksantyny.

Podobnie zostało rozstrzygnięte przyłączenie cukru do azotu 3 pierścienia pirymidynowego.

Nowsze prace związane z badaniem widm absorpcji puryn i pirymidyn idą w kierunku ustalenia dokładnej zależności wyglądu widma od budowy cząsteczek związków zawierających w różnych położeniach podstawniki w pierścieniach zasad azotowych (21), (7).

Mikrospektrometria

Badania absorpcji promieniowania elektromagnetycznego przy pomocy mikroskopu noszą nazwę mikrospektrometrii.

Celem tych badań może być, albo:

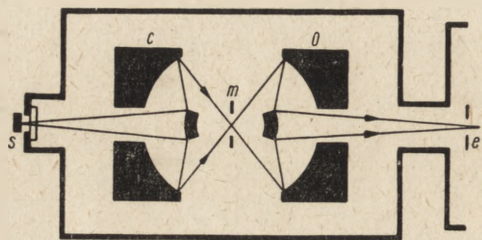
1. pomiar widma absorpcyjnego substancji dostępnej tylko w bardzo małych ilościach, albo

2. pomiar pochłaniania w różnych miejscach preparatu, co ma szczególne znaczenie w histologii i to przede wszystkim w odniesieniu do ustalenia rozmieszczenia kwasów nukleinowych w komórce.

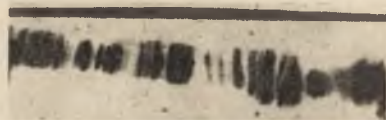
W drugim przypadku miejsca preparatu, w których występują badane wiązki wykazują silną absorpcję promieniowania o odpowiednio dobrej długości fali.

Zjawisko to od dawna wykorzystano w fotografii barwionych preparatów w świetle widzialnym.

W przypadku badania rozmieszczenia kwasów nukleinowych, na preparat rzuca się wiązkę promieniowania o długości fali $260 \text{ m}\mu$, w której znajduje się maksimum pochłaniania związków nukleinowych w nadfiolecie. Optyka mikroskopu



Rys. 16. Obiektyw bezsoczewkowy



Rys. 17. Odcinek chromozomu Chironomusa (pozytyw)

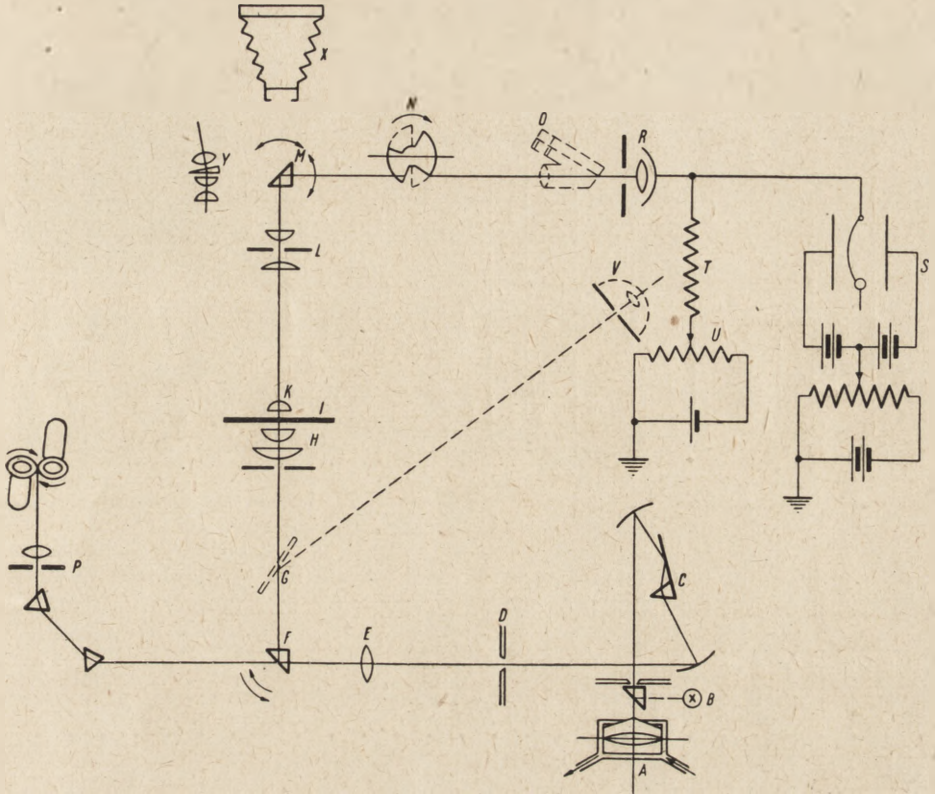
musi być wykonana z kwarcu lub też układ soczewek musi być zastąpiony układem zwierciadeł sferycznych (3) (rys. 16).

W wprowadzonej w 1935 r. przez Casperssona (5) technice fotograficznej preparat jest pod mikroskopem fotografowany. W miejscach kliszy o minimalnym zaczerwienieniu występują w preparacie największe skupienia kwasów nukleinowych. Stopień przezroczystości kliszy fotograficznej jest miarą stężenia związków nukleinowych.

Technika fotograficzna jest bardzo żmudna i wymaga uwzględnienia bardzo wielu czynników zakłócających pomiar. Większość z tych czynników wiąże się z własnościami kliszy fotograficznej. Technika fotograficzna wychodzi ostatecznie z użycia. W okresie powojennym, a szczególnie w ostatnich pięciu latach rozpowszechnia się fotoelektryczna technika mikrospektrometryczna (6). Jej podstawą jest zastosowanie fotokomórek i elektrycznych urządzeń wzmacniających, pozwalających na bezpośredni pomiar absorpcji poszczególnych punktów preparatu (rys. 18). Wynik pomiaru rejestrowany jest w postaci wykresów dla poszczególnych miejsc preparatów badanych przy użyciu kilku różnych długości fal promieniowania (rys. 19).

Przygotowanie preparatu do badania mikrospektrometrycznego wymaga stosowania specjalnych chwytów, z których najważniejszymi są dwa:

1. pierwszym jest usuwanie z preparatu substancji także pochłaniających promieniowanie w badanym zakresie długości fal. Usuwanie to musi być wykonane w taki sposób, aby struktura preparatu nie uległa



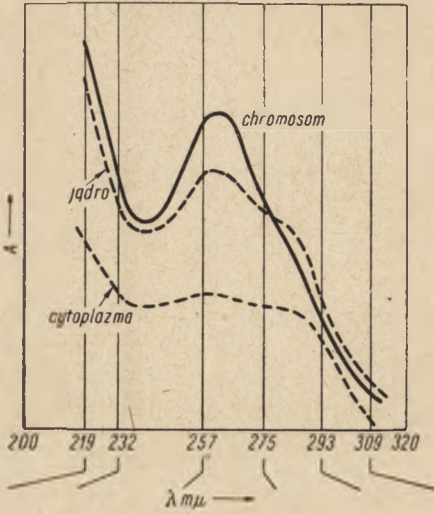
Rys. 18. Fotoelektryczne urządzenie mikrospektrometru

- | | |
|--|---|
| A -- lampa rtęciowa | L -- okular z przesłoną |
| B -- lampa wolframowa | M -- ruchomy pryzmat |
| C -- monochromator | N -- wirujący sektor |
| D -- szczelina wyjściowa monochromatora | O -- urządzenie do centrowania |
| E -- soczewka | P -- źródło widma porównawczego |
| F -- ruchomy pryzmat 90° | R -- fotokomórka |
| G -- kwarcowa płytka (kierująca część promieniowania na odnośnikową fotokomórkę) | S -- elektrometr |
| H -- kondensator | T -- opór |
| I -- preparat | U -- potencjometr |
| K -- obiektyw | X -- kamera fotograficzna |
| | Y -- układ soczewek wymieniany na pryzmat M |

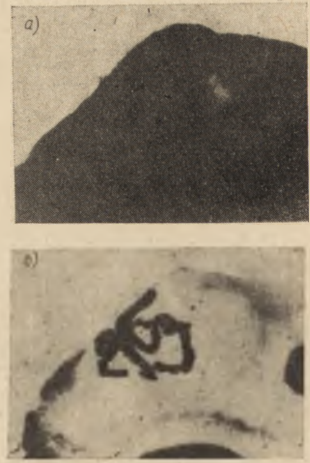
zmianie. Przykładem może być trawienie preparatu trypsyną w celu usunięcia białka. Różnicę pochłaniania preparatu trawionego i nietrawionego widać z rys. 20, przedstawiającego rozmieszczenie chromozomów w preparacie tkanki chironomuse.

Z substancji występujących w komórkach żywych najbardziej zbliżoną absorpcję do kwasów nukleinowych mają białka zawierające aminokwasy: tryptofon i fenyloalaninę rys. 21.

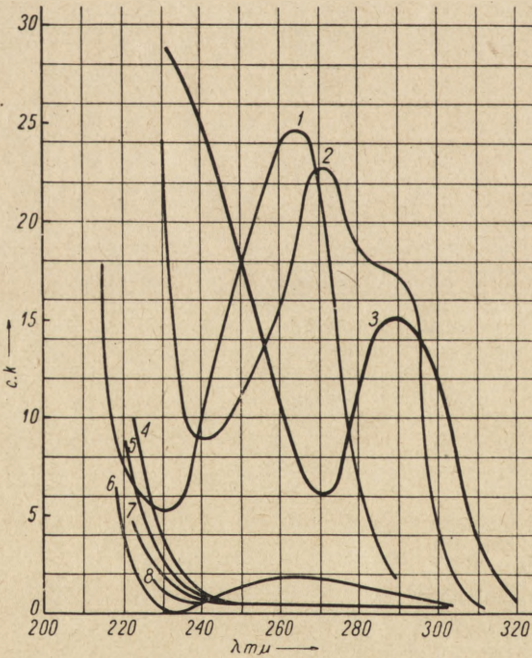
2. Drugim czynnikiem jest konieczność uwzględnienia zmian zach-



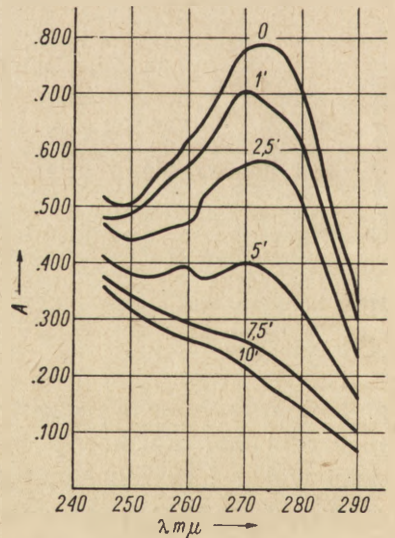
Rys. 20. Preparat tkanki Chironomusa
 a) preparat nietrawiony
 b) preparat trawiony trypsyną



Rys 19. Wykres pochłaniania dla kilku punktów preparatu (jądro, cytoplazma, chromosom)



Rys. 21. Widma absorpcji niektórych aminokwasów: 1. adenina, 2. tryptofan, 3. tyrozyna, 4. histydyna, 5. arginina, 6. feny-lalanina, 7. leucylglicyna, 8. prolina

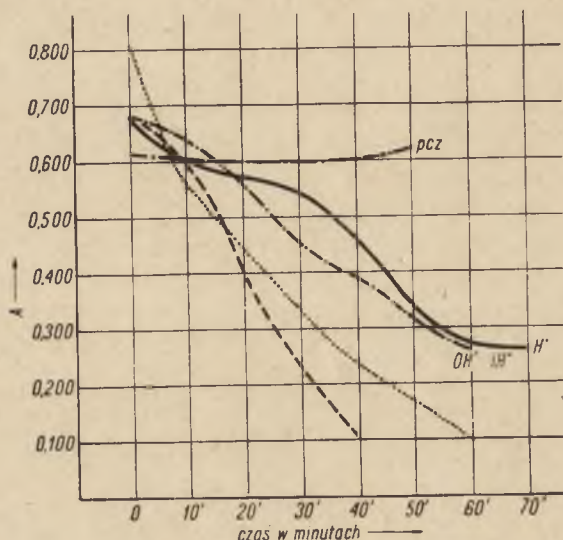


Rys. 22. Rozkład gwaniny w 0,1 n NaOH pod wpływem promieniowania nadfioletowego

dzających w preparacie w czasie naświetlania go promieniowaniem nadfioletowym. Wprawdzie rozkład związków purynowych i pirymidynowych zachodzi dopiero po kilkudziesięciu minutach lub nawet godzinach naświetlania promieniowaniem nadfioletowym o dużym natężeniu (10) (19), rys. 22 i 23 i 24., jeżeli w żywej komórce już po kilku sekundach naświetlania następują strukturalne zmiany postaci, w jakiej występują związki nukleinowe (denaturacja, zjawianie się ziarnistości itp.) Zagadnienie to szczególnie wnikliwie jest ujmowane w ostatnich pracach radzieckich autorów (17).

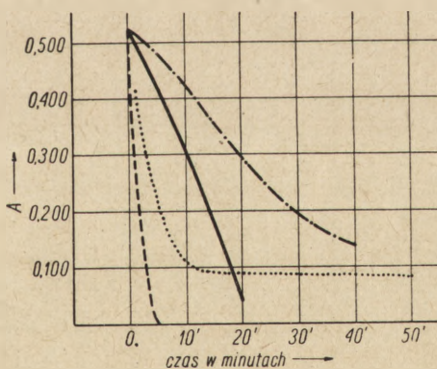
Wyniki uzyskane w mikrospektrometrii i to szczególnie przy stosowaniu techniki fotograficznej są odzwierciedleniem stosunków panujących w preparacie tylko dla cząsteczek większych od czterokrotnej długości fali promieniowania, a więc większych od 1μ . Przy cząstkach komórki mniejszych od 1μ zjawiają się zakłócenia w wiernym odtwarzaniu obiektu.

Wyniki uzyskane dotychczas przy stosowaniu mikrospektrometrii pozwoliły wejść w stosunki panujące w rozkładzie związków nukleinowych w komórce oraz skierowały hipotezy związane z rolą kwasów nukleinowych w komórce na nowe tory.



Rys. 23. Porównanie szybkości rozkładu różnych pochodnych adeninowych w różnych warunkach naświetlania promieniowaniem nadfioletowym

- adenina
- kwas nukleinowy
- - - - - kwas adenilowy
- odenozyna



Rys. 24. Porównanie szybkości rozpadu gwaniny i kwasu moczowego pod wpływem promieniowania nadfioletowego w zależności od środowiska

- kwas moczowy w 0,1 n HCl
- - - - - kwas moczowy w 0,1 n NaOH
- - - - - gwanina w 0,1 n HCl
- gwanina w 0,1 n NaOH

Większość prac dotyczących mikrospektrometrii kwasów nukleinowych pochodzi z pracowni Casperssona (5, 6) i z kilku pracowni radzieckich (17).

Pochłanianie w podczerwieni

Pochłanianie w podczerwieni związane jest z mechanicznymi własnościami cząsteczki. Zależy od jej ruchów rotacyjnych, oscylacyjnych oraz od ruchów atomów względem siebie. Zależy także od siły wiązania definiowanej stałą siłową. Każdy rodzaj drgań atomów w cząsteczce charakteryzuje się pochłanianiem promieniowania o odpowiedniej długości fali; o ile na drganie atomów tworzących wiązanie chemiczne w małym stopniu wpływa pozostała część cząsteczki, wtedy odpowiednie pasmo absorpcyjne jest charakterystyczne dla danego rodzaju wiązań i jego położenie może być ujęte wzorem

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{f}{\eta}}$$

ν — częstość drgań

f — stała siłowa

η — masa zredukowana

m_1 — masy atomów

$$\frac{1}{\eta} = \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2}$$

Zwykle położenie maksimum absorpcji przesuwają się w zależności od budowy reszty cząsteczki.

Amplituda drgań atomów w cząsteczce zależna jest od temperatury substancji. Wzmocniony ruch atomów oddziałuje na ruch sąsiednich atomów.

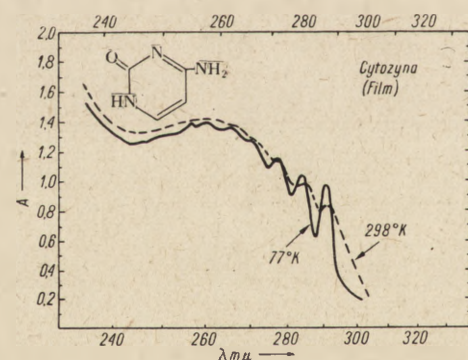
Stąd też, im temperatura jest wyższa, tym pasma pochłaniania są bardziej rozsmarowane i szersze.

Dla odkładnej analizy jakościowej jest badać widma absorpcji w temperaturach niskich (26) (rys. 25).

Sz szczególnie ostatnio często prowadzi się badania w temperaturze ciekłego powietrza (26).

Najczęściej przeprowadza się pomiary widm absorpcji w zakresie od 2 do 15 μ , najłatwiej dostępnym ze względów aparaturowych.

Optyka aparatury w tym zakresie

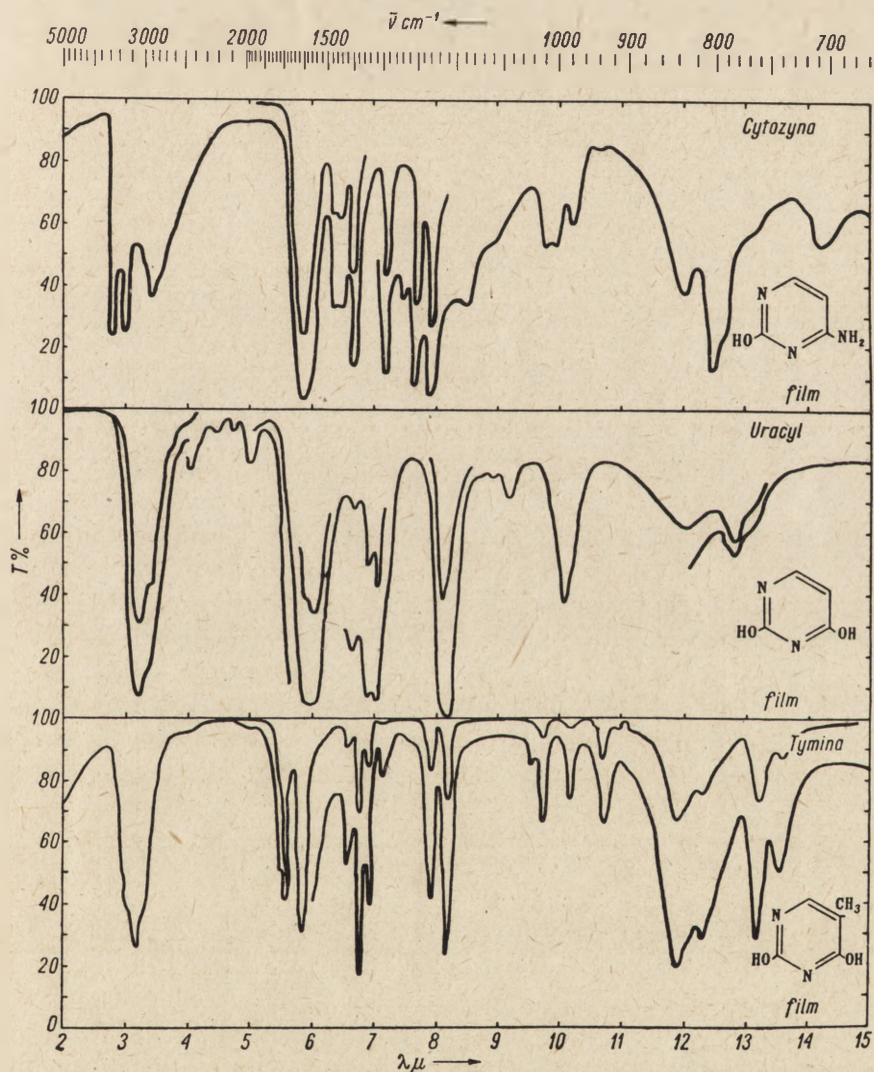


Rys. 25. Zależność widma absorpcji cytozyny od temperatury

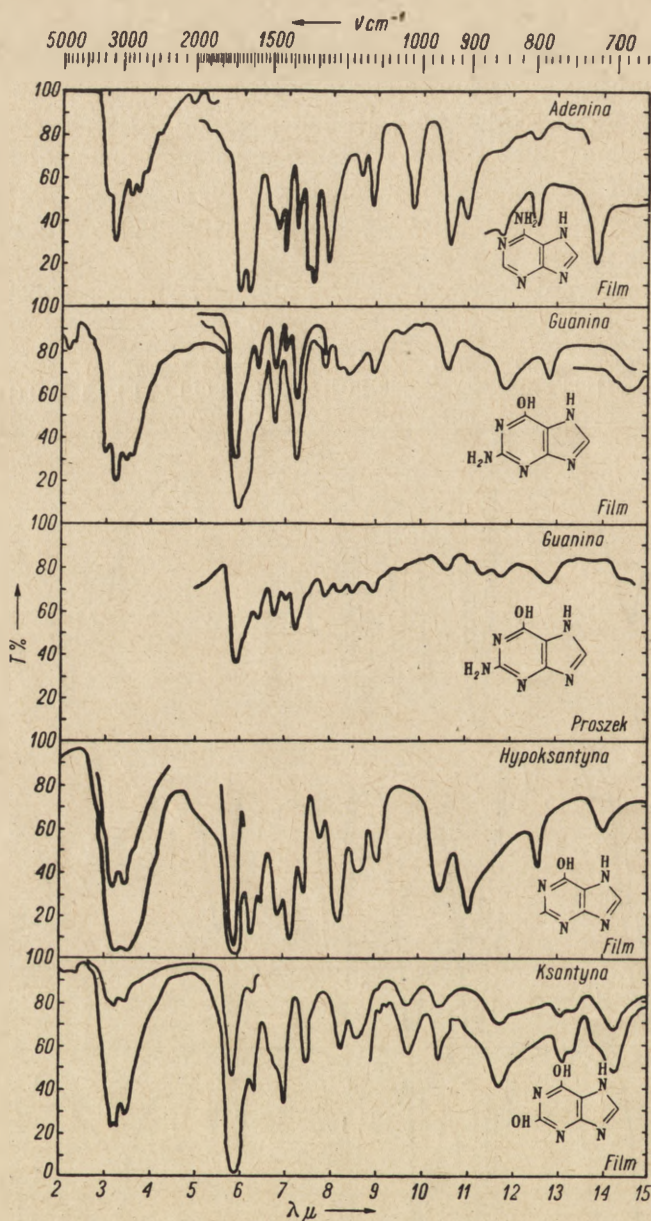
wykonana musi być z soli kuchennej, zaś w konstrukcji układu optycznego chętniej korzysta się z wklęsłych zwierciadeł niż z soczewek. Promieniowanie przechodzące przez substancję badaną wykrywane jest przy pomocy termoelementów (bolometr, termopara itp.).

Specjalne trudności nasuwa przygotowanie próbek. Używanie rozpuszczalników jest bardzo ograniczone ich własną absorpcją w zakresie podczerwieni. Stosuje się czasami oleje mineralne, cynkloheksanol i nieliczne inne rozpuszczalniki. Najczęściej jednak przygotowuje się cienkie błonki (filmy) otrzymane przez nedestylowanie substancji badanej w wysokiej próżni (10^{-5} mm Hg) na płytkę z soli kuchennej. Rzadziej substancję badaną w postaci proszku miesza się z solą kuchenną w moździerzu i następnie prasuje na cieką płytkę.

Takie postępowanie pociąga za sobą niekiedy zmiany substancji bada-



Rys. 26. Widmo transmisji w podczerwieni dla tyminy, uracylu, cytozyny

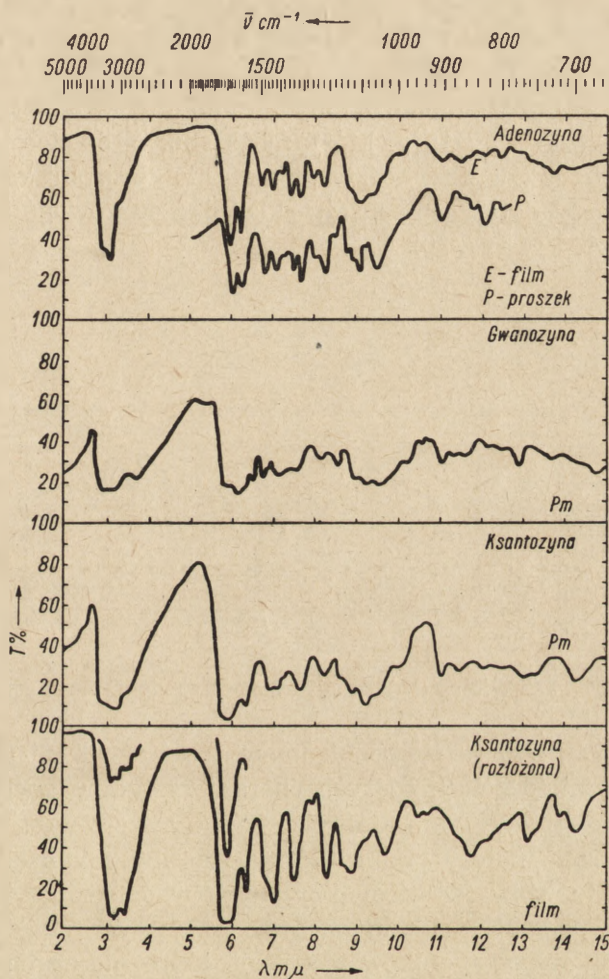


Rys. 27. Widmo transmisji w podczerwieni dla adeniny, gwaniny (w postaci błonki i proszku), hipoksantyny i ksantyny

nej, spowodowane destylacją lub też naciąganiem wilgoci przez przygotowaną do badania próbkę. By móc sprawdzić wpływ tych czynników zwykle badanie w podczerwieni poprzedzane jest porównaniem widma

absorpcji w nadfiolecie dla badanej substancji przed i po przygotowaniu preparatu.

Większość prac dotyczących widm absorpcji związków nukleinowych w podczerwieni została wykonana w ostatnich 10 latach. Prace te prowadzone przede wszystkim przez Blouta i Fieldsa (1, 2, 27) dotyczyły



Rys. 28. Widmo transmisji w podczerwieni dla adenozyny, (w postaci błonki i proszku), hipoesentyny i lesentyny

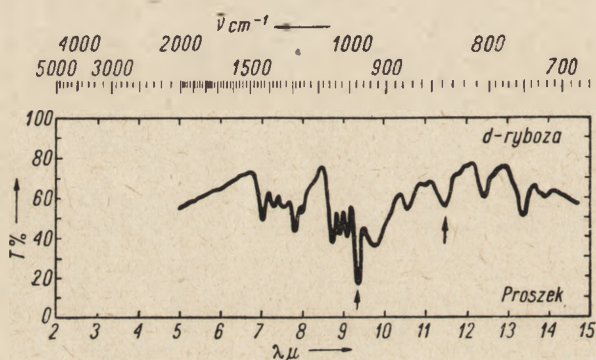
widm pochłaniania wszystkich poprzednio wymienionych związków nukleinowych, a więc zasad azotowych, nukleozydów, nukleotydów i kwasów nukleinowych, jak to obrazują przytoczone rysunki (rys. 26, 27, 28, 30).

Z przytoczonych wykresów widać, że widma proszkowe są dużo mniej wyraźne niż widma błonek. Poza tym rozpraszanie proszków uniemożli-

wia uzyskanie miarodajnych widm w zakresie fal krótszych niż 5μ . Wszystkie widma posiadają charakterystyczne podobne pasma w $\lambda = 3 \mu$, 6μ , 7μ , 8μ , które przypisuje się obecności w cząsteczce wiązań OH, NH (3μ); C = O, C = C, C = N, (ok. 6μ) CH ($6, 85 \mu$), CCH₃ ($7, 24 \mu$), C—,C—O (ok. 8μ).

Dla grupy aminowej NH₂ charakterystyczne jest pasmo przy trzech (3μ) mikronach, występujące w widmie adeniny i gwaniny, zaś nie występujące w widmie ksantyny.

Zasadnicze różnice pomiędzy indywidualnymi związkami występują dopiero w zakresie $9 - 15 \mu$, który może służyć do ich identyfikacji. Szczególnym przykładem wykorzystania różnic absorpcji w tym zakresie mogą być wnioski dotyczące rodzaju składnika cukrowego związków nukleinowych (rys. 29 i rys. 30).

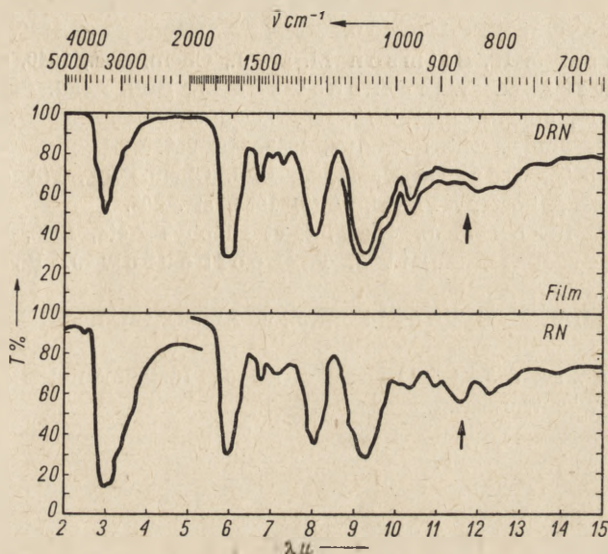


Rys. 29. Widmo transmisji w podczerwieni d-rybozy

Ryboza charakteryzuje się pochłanianiem w $\lambda = 9,2 \mu$ i $11,7 \mu$, którego brak w związkach dezoksy, których charakterystyczne pochłanianie występuje w $\lambda = 9,8 \mu$.

Na zakończenie należy podkreślić, że zebrany materiał nie wyczerpuje całokształtu badań spektrometrycznych w dziedzinie związków nukleinowych. U podstaw dokładnych prac ilościowych stoi zawsze znajomość molowych współczynników absorpcji, które nie zostały tutaj przytoczone. Dla dużej ilości związków nukleinowych, a przede wszystkim dla kwasów nukleinowych współczynnik absorpcji odnosi się do jednego atomu fosforu (ϵ_P) ze względu na brak danych odnośnie ciężaru cząsteczkowego. W ostatnich latach prowadzone są badania spektrometryczne z użyciem światła spolaryzowanego. W układach zorientowanych (o cząsteczkach ustawionych równolegle) pozwala to na powiązanie wielkości współczynnika absorpcji z wielkością cząsteczki. Może to mieć znaczenie dla ustalenia ciężarów cząsteczkowych kwasów nukleinowych. Najbliższe lata

przyniosą niewątpliwie zastosowanie do badania związków nukleinowych coraz bardziej rozwijającej się techniki pomiarów widm absorpcji w próżniowym nadfiolecie (100 — 200 μ) oraz w zakresie mikrofal (fale rzędu milimetrów).



Rys. 30. Widmo transmisji w pod-czerwieni dla kwasu dezoksyrybo-nukleinowego (DRN) i kwasu rybo-nukleinowego (RN)

Badania spektrometryczne związków nukleinowych ograniczają się u nas ze względów aparaturowych do sporadycznych pomiarów w zakresie bliskiego nadfioletu.

LITERATURA

1. Blout E. R. i Fields M. (VIII), J. Am. Ch. Soc., 1950, vol. 72, str. 479.
2. Blout E. R. i Fields M. (VII), J. Am. Ch. Soc., vol. 178, str. 335, 1949.
3. Blout E. R., Bird G. R. i Grey D. S., Journ. Opt. Soc. Am. 1950, str. 304.
4. Brode W. R., Chemical Spectroscopy 1943, J. Willey & Sons Inc. N. Y.
5. Caspersson T., Skand. Archiv für Physiol., 1936, Bd. 73.
6. Caspersson T., Cell Growth and Cell function, 1950.
7. Cavalieri L. F. Fox J. J. Stone, A. Chang, N. Journ. Chem. Soc., 1954, str. 1119.
8. Filipowicz Br., Wiadom. Chem., 1953, str. 251.
9. Fox J. J., Shugar D., Biochim. et Biophys. Acta, 1952, str. 369.
10. Gross S. w druku.
11. Gulland J., Holiday E. R., Macrae P. F., Journ. Chem. Soc., 1934, str. 1641.
12. Hughes H. K., Anal. Chem., 1952, str. 1349.

13. Heyroth F. F., Loofbourow J. R., Jour. Am. Chem. Soc., 1934, str. 1730.
14. Kalckar H. M., J. Biol. Chem. Vol., 167, 1947, str. 429.
15. Kalckar H. M., J. Biol. Chem., Vol., 167, 1947, str. 445.
16. Kerr S. E., Wargon M. i Seraidarian K., J. Biol. Chem., 1949, Vol. 181, str. 761.
17. Limarenko I. M., Usp. sow. biol., 2 (5) str. 227, 1954.
18. Loofbourow J. R., Stimson, M. M., J., Chem. Soc., 1940, str. 1275.
19. Loofbourow J. R., Stimson M. M., J., Chem. Soc., 1940, str. 846.
20. Marchlewski L., Wierzuchowska J., Bull. Acad. Polon., 1929, 1, 65.
21. Mason S. F., Journ. Chem. Soc., 1954, str. 2071.
22. Platt J. R., Journ. Opt. Soc. Am., 1953, str. 253.
23. Ploeser J. T., Loring H. S., J. Biol. Chem. Vol., 178, str. 433, 1948.
24. Rosiński K., Postępy Fizyki, V (3) 1954, str. 305.
25. Shugar D. i Fox J. J., Biochim. et Biophys Acta, 1952, Vol. 9, str. 200.
26. Sinsheimer R. L., Scott J. F., Loofbourow J. R., J. Biol. Chem. 1950, str. 313.
27. Stimson M.M. a O'Donnell M. J., J. Am. Chem. Soc. 1952, str. 1805, Vol. 74, Nr 7.
28. Świętosławska J. i Minczewski J., Instrumentalne metody w analizie, 1954, PWT. Warszawa.

ELŻBIETA SEMPIŃSKA

Metody chromatograficzne w dziedzinie kwasów nukleinowych

Zakład Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, ul. Lindleya 6.

Chromatografia bibułowa

Wprowadzenie metod chromatograficznych stało się do pewnego stopnia punktem przełomowym w dziedzinie badań nad kwasami nukleinowymi. Pozwoliło ono na dokonanie szybkiego i precyzyjnego wglądu w ich skład oraz budowę, czego nie można było osiągnąć przy użyciu uciążliwych, mało dokładnych metod chemicznych, wymagających dużych ilości materiału wyjściowego. Prace z zakresu chromatografii kwasów nukleinowych oparte są na metodyce chromatografii bibułowej, rozdziału na jonitach i kolumnach skrobiowych. Kolumny skrobiowe nie znalazły szerszego zastosowania, tak że dzisiaj stosujemy przeważnie albo rozdział na bibule, który ma tę zaletę, że jest szybki, prosty i pozwala wykonać oznaczenia z bardzo małych ilości materiału wyjściowego, lub rozdział na jonitach, gdy chcemy wyizolować większe ilości poszczególnych składników.

Rozdziałowi chromatograficznemu poddajemy zwykle hydrolizaty kwasów nukleinowych, zawierające zależnie od sposobu hydrolizy: wolne zasady purynowe i pirymidynowe, wolne puryny obok nukleotydów pirymidynowych, mieszaniny rybo- lub dezoksynukleozydów, mieszaniny rybo- lub dezoksynukleotydów, a wreszcie i większe ułamki kwasów, powstające przeważnie w procesach enzymatycznych.

Pierwsze prace chromatograficzne w dziedzinie kwasów nukleinowych oparte były na zastosowaniu metod chromatografii bibułowej, która jest dotychczas najbardziej rozpowszechnionym sposobem rozdziału. Ogólna procedura nie różni się od zwykłej procedury chromatograficznej. Bibułą zwykle stosowaną jest Whatman Nr 1, niekiedy bibuła Schleichera i Schüllla Nr 597. Puryny i pirymidyny, względnie ich związki, nakrapla się do oznaczeń ilościowych w ilościach 20—50 µg poszczególnych zasad.

Po rozwinięciu chromatogramu i odpędzeniu rozpuszczalnika w prądzie ciepłego powietrza, ustala się rozmieszczenie rozdzielonych związków, a następnie wycina się z bibuły miejsca odpowiadające położeniu poszczególnych składników i eluuje je roztworami kwasu solnego (najczęściej 1N lub 0,1N). Zawartości związków w ekstraktach określa się na drodze spektrofotometrycznej w ultrafiolecie (oznaczeń puryn i pirymidyn dokonuje się najczęściej w roztworze 0,1N HCl, nukleotydów w 0,01N HCl). Odnośnik (blank) sporządza się, ekstrahując w analogiczny sposób skrawki czystej bibuły, wycięte z pasków zanurzonych i rozwijanych w rozpuszczalniku równolegle do właściwego chromatogramu.

Pierwsze prace nad rozdziałem puryn, pirymidyn i nukleozydów Vischera i Chargaffa oraz Hotchkissa ukazały się w latach 1947-48. Stosowanymi wówczas rozpuszczalnikami były mieszanki kolidyny i chinoliny z wodą (Vischer i Chargaff (63), butanol nasycony wodą (Hotchkiss (28)) oraz mieszaniny: morfoliny, dwuetylenoglikolu, butanolu i wody o różnych składach i różnych proporcjach (Vischer i Chargaff (64)) Tabl. 1.

Niektóre z przytoczonych wyżej rozpuszczalników wyszły już całkowicie z użycia, jak np. chinolina i kolidyna, które stwarzają tę niedogodność, że z powodu pochłaniania w nadfiolecie trzeba je bardzo dokładnie usunąć przed oznaczeniami spektrofotometrycznymi. Obecnie najczęściej używanymi rozpuszczalnikami są różne mieszanki alkoholi alifatycznych z wodą, kwasami, ewentualnie amoniakiem. Alkohole źle mieszające się z wodą służą do rozdzielania zasad purynowych i pirymidynowych oraz nukleozydów; nukleotydy w takich warunkach nie ruszają się z miejsca startu. Alkohole łatwiej mieszające się z wodą rozdzielają zarówno zasady i nukleozydy, jak i nukleotydy. Dodatek kwasów wpływa na lepszy rozdział mieszanin z większą zawartością guaniny, która jest źle rozpuszczalna w roztworach obojętnych, szczególnie w obecności amoniaku.

Dla zorientowania się podaję krótki przegląd najważniejszych spośród stosowanych układów rozpuszczalników.

Układy z alkoholem butylowym normalnym — służące jedynie do rozdziału zasad i nukleozydów (rybo- i dezoksy).

Stosuje się: butanol nasycony wodą, prowadząc niekiedy rozdział w atmosferze gazowego amoniaku (Hotchkiss (28), Vischer i Chargaff (64), Markham i Smith (36), Buchanan (5), Die-mianowska i Biełozierskij (19), mieszanki alkoholu butylowego z kwasem solnym (Vischer i Chargaff (64), lub mrówkowym (90% *n*-butanol nasycony wodą, 10% kwas mrówkowy lodowaty) (Markham i Smith (36), Kritskij (34)) — te ostatnie nadają się specjalnie do rozdziału nukleozydów. Można stosować także mie-

Tablica I.

Rozdział puryn i pirymidyn w różnych systemach rozpuszczalników wg
Vischera i Chargaffa

Nr do- świad- czenia	Mie- szani- na do roz- działu	Układ rozpuszczalników	Wartości Rf						
			Ade- nina	Gua- nina	Hipo- ksan- tyna	Ksan- tyna	Ura- cyl	Cyto- zyna	Ty- mina
1.	n	<i>n</i> -Butanol (nasycony wodą)	0,28	0,074	0,17	0,071	0,32	0,19	0,47
2.	a	<i>n</i> -Butanol (3), morfolina (1), woda (4)	0,53	0,29	0,35	0,13	0,56	0,47	0,71
3.	n		0,53	0,29	0,35	0,14	0,55	0,46	0,73
4.	a	<i>n</i> -Butanol (4,5), morfolina (1,5), dwuetylenoglikol (1), woda (2)	0,60	0,40	0,48	0,35	0,66	0,54	0,82
5.	n		0,72	0,46	0,58	0,41	0,66	0,61	0,78
6.	a	Kolidyna (nasycona wodą)	0,67	0,57	0,68	0,70	0,80	0,47	0,85
7.	n		0,62	0,56	0,63	0,63	0,77	0,42	0,84
8.	a	Kolidyna (1), chinolina (2) mieszanina nasycona 1,5 częściami wody,	0,55	0,41	0,58	0,63	0,73	0,17	0,80
9.	n		0,34	0,22	0,44	0,62	0,74	0,21	0,84
10.	n	<i>n</i> -Butanol (4), dwuetylenoglikol (1), woda (1)	0,53	0,27	0,42	0,27	0,60	0,45	0,77
11.	n		0,52	0,23	0,31	0,15	0,50	0,50	0,70
12.		<i>n</i> -Butanol (4), dwuetylenoglikol (1), 0,1N HCl (1)	0,20	0,08	0,29	0,31	0,60	0,34	0,74
13.		<i>n</i> -Butanol (nasycony 0,1N HCl)	0,032	0,006	0,054	0,09	0,30	0,035	0,44

szanki butanolu z amoniakiem (6 objętości butanolu, 1 objętość 0,6 N amoniaku, atmosfera amoniakalna) (Chargaff, Lipshitz i współpr. (11)) oraz *n*-butanol nasycony 10%-owym roztworem mocznika (Carter (10)). Rozdział prowadzony w atmosferze amoniakalnej lub z dodatkiem amoniaku do rozpuszczalnika nie jest odpowiedni do ilościowych prac z guaniną.

Alkohole butylowy II i III-cio rzędowy (mieszające się z wodą w większych proporcjach) znalazły również zastosowanie w chromatografii kwasów nukleinowych. Szczególnie ważnym jest układ Smitha i Markhama (50), w skład którego wchodzi alkohol butylowy III-cio rzędowy (70% obj./obj.), kwas solny i woda w takich proporcjach, aby cały roztwór był 0,8N względem HCl. Metoda ta daje dobry rozdział na stosunkowo krótkim odcinku guaniny, adeniny, kwasu cytydylowego i urydylowego, nadaje się więc dobrze do rozdziału produktów hydrolizy kwasów nukleinowych w słabych kwasach mineralnych w temp. 100°. Nie daje ona tzw. „ogonów“ nawet przy guaninie i z powodu kwaśnego środowiska nie wymaga neutralizowania hydrolizatów nakraplanych na bibułę. Smith i Markham przy użyciu tej metody analizowali kwas rybonukleinowy drożdżowy oraz kwasy nukleinowe różnych wirusów roślinnych. Metodą tą posługiwało się również szereg innych autorów (Knight (31), Hamoir (24), Whitfelt (58) itd.).

Wartości Rf w rozpuszczalniku: alkohol butyl.-woda-kwas solny są następujące:

guanina —	0,21	kwas cytydylowy —	0,48
adenina —	0,32	kwas urydylowy —	0,79

Rozdział podobny do tego, jaki otrzymujemy w układzie Smitha - Markhama daje nam rozpuszczalnik wprowadzony przez Wyattta (61), oparty na bazie alkoholu izopropylowego. W skład jego wchodzi: alkohol izopropylowy (65% obj./obj., absolutnego, 68% obj./obj. — 95%-owego), woda i kwas solny w takich proporcjach, by cały końcowy roztwór był 2N względem HCl. Układ ten nadaje się również przede wszystkim do rozdziału hydrolizatów, w których obecne są puryny obok wolnych nukleotydów pirymidynowych. Rf poszczególnych związków w tym układzie podane są w tablicy Nr 2.

Rozpuszczalnik Wyattta jest jeszcze bardziej rozpowszechniony niż Smitha-Markhama. Wyatt zanalizował tą metodą różne kwasy dezoksynukleinowe zwierzęce, niektóre roślinne oraz szereg kwasów dezoksynukleinowych bakterii i wirusów. Stwierdził on przy tym występowanie 5-metylocytozyny w kwasach DN zwierzęcych i roślinnych, a jej brak w kwasach DN bakterii i wirusów oraz kwasach rybonukleinowych; w 1953 r. wykrył obecność 5-hydroksymetylocytozyny w bakteriofagach *Bacterium coli*. Szereg innych autorów stosowało także tę metodę do analizy kwasów dezoksynukleinowych, rozdziału mononukleotydów oraz małych polinukleotydów (Smith, Stoker (53), Smith, Wyatt (54), Markham, Smith (40), Brown, Dekker, Todd (4) Wyatt, Cohen (62), Schram, Kerekjarto (48)).

Na bazie alkoholu izopropylowego oparty jest również rozpuszczalnik wprowadzony przez Markhama i Smitha w roku 1952 (39). Skła-

Tablica 2.

Wartość R_f składników kwasów nukleinowych w rozpuszczalniku Wyatta

Puryny:	R_f
	(Whatman Nr 1)
Guanina	0,25
Ksantyna	0,25
Hipoksantyna	0,31
Adenina	0,36
Pirymidyny:	
Cytozyna	0,47
5-Metylocytozyna	0,55
Uracyl	0,68
Tymina	0,77
Nukleozydy i nukleotydy	
Cytydyna	0,50
Dezoksycytydyna	0,63
Kwas cytydylowy	0,61
Kwas urydylowy	0,79

da się on z alkoholu izopropylowego (70% obj./obj.) i wody (30% obj./obj.) z dodatkiem roztworu NH_3 , na dno komory chromatograficznej (0,35 ml roztw. NH_3 o gęst. 0,880 g/cm³ na każdy 1 liter przestrzeni gazowej komory). Mieszanina ta rozdziela rybonukleotydy i małe rybopolinukleotydy, a także takie ułamki kwasów nukleinowych, jak: dezoksydwunukleotydy i fosfodwunukleozydy (Smith, Markham (51), (52), cykliczne nukleotydy (Brown, Magrath, Todd (8)) i estry fosforowe nukleotydów (Brown, Heppel, Hilmoe (7)). Okazała się wygodna przy badaniu produktów trawienia kwasu RN rybonukleazą.

Innym, względnie ważnym układem rozpuszczalników wprowadzonym przez Markhama i Smitha jest układ, którym izopropanol jest jedynie drobnym dodatkiem, a podstawę stanowi nasycony roztwór siarczanu amonu (37). Skład jego jest następujący: nasycony roztwór siarczanu amonu — 79% obj./obj., 1M octan sodu — 19% obj./obj., izopropanol — 2% obj./obj. Mieszanina ta rozdziela między innymi izomery 2' i 3' kwasów: adenyłowego, guanyłowego i cytydylowego oraz estry tych izomerów, a także cykliczne fosfonukleozydy od zwykłych fosfonukleozydów (Whitfield, Markham (59), Heppel, Markham, Hilmoe (27), Markham, Smith (39), (40), (41). Można ją również stosować do rozdziału adenozyiny, 5-fosfoadenozyiny, dwufosfoadenozyiny i trójfosfoadenozyiny.

Alkohol propylowy normalny był również wypróbowany jako rozpuszczalnik przede wszystkim w mieszaninach z wodą, kwasem mrówkowym i solnym. Mieszanki te jednakże nie odegrały większej roli w ba-

daniach nad kwasami nukleinowymi. Stosował go również w roztworach z alkoholem tetrahydrofurfurylowym oraz buforami o różnych pH Carpenter (9) do rozdzielu puryn, nukleozydów i nukleotydów (obok alkoholu izoamyłowego). Specjalną pozycję stanowią w dziedzinie chromatografii kwasów nukleinowych prace Cartera (10). Carter przy pomocy wprowadzonych przez siebie układów rozdzielił po raz pierwszy kwas adenylowy z kwasu drożdżowego na dwa izomery 2' i 3'.

Rozpuszczalnikami Cartera są układy dwufazowe, składające się z buforów cytrynianowych lub fosforanowych, nasyconych alkoholem izoamyłowym, pokrytych warstewką pozostającego w nadmiarze alkoholu (tabl. 3). Koniec paska bibuły wprowadzony do roztworu przechodzi jed-

Tablica 3.

Rozpuszczalniki oraz wartości Rf składników kwasów nukleinowych wg metody Cartera

Związek	5% cytrynian amonu pH 3,6 — alkohol izoamyłowy	5% cytrynian amonu pH 9,6 — alkohol izoamyłowy	5% KH_2PO_4 alkohol izoamyłowy	5% Na_2HPO_4 — alkohol izoamyłowy	5% KH_2PO_4 pH 7,0 — alkohol izoamyłowy
Adenina	0,69	0,37	0,53	0,44	0,42
Guanina	0,50	0,37	0,00	0,02	0,02
Uracyl	0,72	0,72	0,78	0,73	0,74
Cytozyna	0,83	0,72	0,79	0,73	0,74
Tymina	0,72	0,72	0,77	0,73	0,74
Adenozyna	0,68	0,52	0,58	0,54	0,53
Guanozyna	0,66	0,59	0,68	0,62	0,64
Urydyna	0,80	0,80	0,88	0,79	0,80
Cytydyna	0,86	0,77	0,88	0,76	0,80
Kwas adenylowy a	0,74	0,65	0,72	0,74	0,74
Kwas adenylowy b	0,74	0,60	0,81	0,67	0,63
Kwas guanyłowy	0,80	0,73	0,87	0,79	0,78
Kwas cytydylowy	0,89	0,82	0,93	0,85	0,86
Kwas urydylowy	0,89	0,82	0,93	0,85	0,86
Hipoksantyna	0,63	0,49	0,52	0,57	0,59
Ksantyna	0,52	0,45	0,56	0,49	0,42

nocześnie przez dwie fazy: wodną i alkoholową. Układy Cartera mogą służyć do rozdzielu puryn, pirymidyn, nukleozydów i nukleotydów, z tym ograniczeniem, że nie rozdzielają kwasu cytydylowego i urydylowego. Oznaczenia poszczególnych nukleotydów pirymidynowych można jednakże dokonać eluując je w postaci mieszaniny, a następnie przeprowadzając oznaczenia spektrofotometryczne w dwóch długościach fal.

W tym krótkim przeglądzie należy wspomnieć o rozpuszczalnikach wprowadzonych przez Magasanika i współprac. (42), oraz Boulanger i Montreuil (3) w ich pracach nad rozdziałem rybonukleotydów. Są one dość specyficzne, gdyż nie opierają się na bazie alkoholowej. Rozpuszczalnikiem Magasanika, Vischera i współpr. jest kwas izomasłowy, zobojętniony wodą amoniakalną do pH 3,6—3,7. W układzie tym jednak kwas guanylowy i urydylowy pozostają nierozdzielone. Dostatecznie dobry rozdział 4 nukleotydów otrzymują Boulanger i Montreuil. Podstawą ich układów jest fenol (tabl. 4).

Tablica 4.

Wartości Rf nukleotydów w układach Boulanger i Montreuil

Układ rozpuszczalników	Rf (20 — 22°C)				
	H ₂ PO ₄	U ⁺	G ⁺	C	A
Fenol (80) — Izopropanol (10)	0,17	0,33	0,44	0,50	0,64
— kwas mrówkowy (10) — woda (100)	do 0,18	do 0,34	do 0,45	do 0,54	do 0,65
Fenol (85) — Izopropanol (5)	0,22	0,37	0,49	0,58	0,70
— kwas mrówkowy (10) — woda (100)	do 0,23	do 0,38	do 0,50	do 0,59	do 0,71
Fenol (84) — butanol III-ciorzędowy (6) — kwas mrówkowy (10) — woda (100)	0,22	0,35	0,46	0,57	0,70
Fenol (90) — kwas mrówkowy (10) — woda (100)	0,28	0,41	0,52	0,60	0,70
	do 0,31	do 0,44	do 0,54	do 0,63	do 0,75

U — kwas urydylowy, G — kwas guanylowy, C — kwas cytydylowy, A — kwas nylowy. + Kwas urydylowy i guanylowy dają często podwójne plamy.

Odczynniki zmieszane w podanych w tablicy proporcjach rozdzielają się na dwie fazy. Faza fenolowa używana jest do rozdziału chromatograficznego, fazę wodną nalewa się na dno komory chromatograficznej w celu wytworzenia odpowiednio nasyconej rozpuszczalnikiem atmosfery. Powyższy rozdział chromatograficzny łączy się w celu otrzymania wyników ilościowych z oznaczeniami fosforu nukleotydowego w odpowiednich wycinkach chromatogramu. Pochłanianie fenolu w ultrafiolecie uniemożliwia, niestety, przeprowadzenie oznaczeń spektrofotometrycznych. Przy użyciu opisanej metody Boulanger i Montreuil zanalizowali kwas rybonukleinowy wątroby i trzustki bydłowej. Rozdziałem dezoksynukleotydów zajmowali się między innymi Shive, Sibley i Rogers (49), stosując jako rozpuszczalnik 65% 2,6-lutydynę. We wszystkich wypadkach, gdzie analiza chromatograficzna jednokierunkowa nie daje wystarczająco dobrych rezultatów, możemy stosować rozwi-

nięcie chromatogramów w dwóch kierunkach. Chromatografię dwukierunkową stosowało szereg autorów, posługując się różnymi kombinacjami z omówionych rozpuszczalników. Dla przykładu podaję kilka układów:

Carter (10): 1. butanol nasycony 10%-owym roztworem mocznika, 2. 5%-owy roztwór Na_2HPO_4 z warstwą alkoholu izoamyłowego. System ten służy do rozdziału puryn, pirymidyn, nukleozydów i nukleotydydów.

Bou langer (3): 1. alkohol izopropylowy (lub butylowy III-cio rzędowy) - woda - HCl . 2. jeden z rozpuszczalników fenolowych. System służy do rozdziału rybonukleotydydów.

Markham i Smith (36): 1. Butanol nasycony wodą 90%, lodowaty kwas mrówkowy (10%). 2. Butanol nasycony wodą (atmosfera amoniakalna). System służy do rozdziału puryn, pirymidyn i nukleozydów. Chromatografia dwukierunkowa znalazła między innymi zastosowanie przy rozdziale wszystkich estrów fosforowych adenozyiny i inozyiny (Deutsch, Nilson (18). Analiza jednokierunkowa nie daje w tym wypadku wystarczająco dobrych rezultatów.

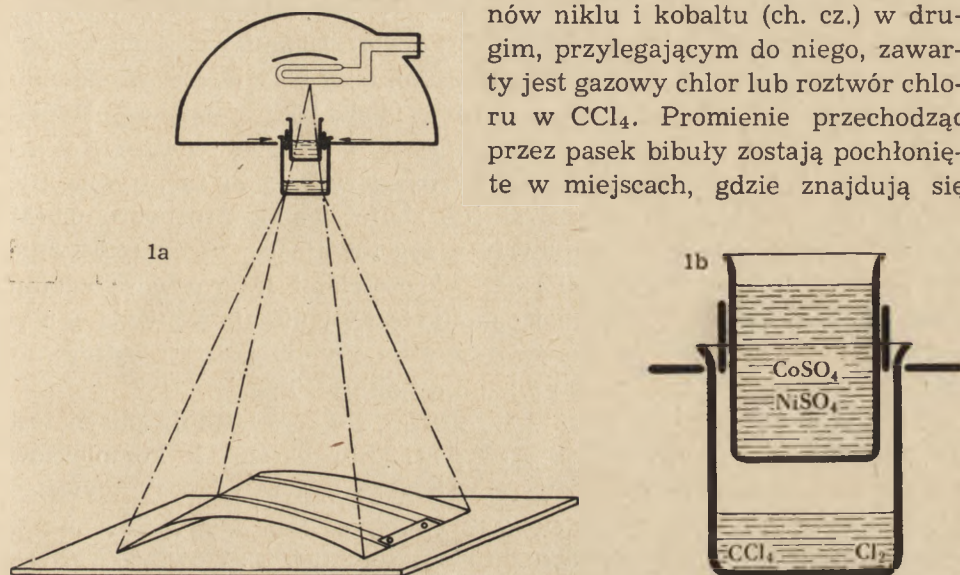
W Zakładzie Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego wypróbowano z dobrym skutkiem: metody Cartera oraz Wyatta do rozdziału puryn (adeniny, guaniny, hipoksantyny i ksantyny), metodę Boulangera-Montreuil'a do rozdziału nukleotydydów. Należy zaznaczyć, że w wypadku jednoczesnego rozdziału adeniny, guaniny, hipoksantyny i ksantyny metoda Wyatta nie daje zupełnie dobrych wyników ze względu na zbyt gęste nagromadzenie plam na zbyt krótkim odcinku. Doskonale natomiast rozdziela guaninę od adeniny w nieobecności hipoksantyny i ksantyny. Metoda Cartera w układach bufor fosforanowy - alkohol izoamyłowy daje dobry rozdział 4 puryn, z tym że guanina jest zanieczyszczona, gdyż pozostaje ona w miejscu startu. Rozpuszczalniki Boulangera w zastosowaniu do nukleotydydów dały rezultaty bez zarzutu.

Kończąc ten krótki przegląd najważniejszych rozpuszczalników należy zaznaczyć, że pominięto tutaj szczegółowe omówienie metod poświęconych specjalnie rozdziałowi estrów wielofosforowych nukleozydów, gdyż nie są one składnikami kwasów nukleinowych.

Wywoływanie chromatogramów

Położenie rozdzielonych na chromatogramie związków określa się przy użyciu metod optycznych lub testów chemicznych. Obecnie najbardziej rozpowszechniona jest metoda optyczna Markhama-Smitha (36), (38). Podstawą metody jest wykorzystanie zjawiska pochłaniania przez związki purynowe i pirymidynowe promieni nadfioletowych o długości

około 250 m μ . Pasek bibuły po rozdiale chromatograficznym rozpina się na papierze światłoczułym i prześwietla lampą kwarcową zaopatrzoną w filtr przepuszczający promienie o długości fali 254 i 265 m μ . Filtr taki można łatwo zmontować w każdym laboratorium. Składa się on z dwóch naczynek kwarcowych. W jednym, ustawionym tuż za otworem w przesłonie, znajduje się roztwór siarczanów niklu i kobaltu (ch. cz.) w drugim, przylegającym do niego, zawarty jest gazowy chlor lub roztwór chloru w CCl₄. Promienie przechodząc przez pasek bibuły zostają pochłonięte w miejscach, gdzie znajdują się



Rys. 1 a. Schemat urządzenia do oznaczania położenia na chromatogramach związków purynowych i pirymidynowych metodą optyczną w ultrafiolecie. Rys. 1 b. Filtr optyczny na zakres ca 2500 Å.

rozdzielone zasady lub ich związki. Po wywołaniu otrzymujemy na papierze światłoczułym obraz chromatogramu. Na ciemnym tle widać białe plamy, odpowiadające położeniu rozdzielonych składników. Schemat urządzenia podano na rysunku.

Opisana metoda posiada następujące zalety: 1° nie niszczy rozdzielonych na chromatogramie związków. 2° pozwala na jednoczesne wykrycie zasad, nukleozydów i nukleotydów. 3° jest bardzo czuła. W wypadku, gdy nie zależy nam na oznaczeniach ilościowych, a chcemy jedynie ustalić położenie rozdzielonych substancji, wówczas zamiast sporządzać zdjęcie chromatogramu na papierze światłoczułym, można pasek bibuły spryskać roztworem fluoresceiny. Światło z lampy po przejściu przez filtr wywołuje silną fluorescencję paska. W miejscach gdzie znajdują się rozdzielone związki purynowe i pirymidynowe powstają ciemne plamy na skutek pochłaniania padających promieni. Obok metod optycznych zna-

ny jest cały szereg testów chemicznych służących do wywoływania chromatogramów.

Dla puryn i pirymidyn mamy dawny test rtęciowy podany przez Vischera i Chargaffa (64). Polega on na przeprowadzeniu rozdzielonych związków w nierozpuszczalne sole rtęciowe i następnie rozłożeniu powstałych kompleksów rtęciowych siarczkiem amonu. W wypadku, gdy rozdzielanymi związkami są puryny, chromatogram zanurza się do 0,25 M roztworu azotanu rtęci w 0,5N HNO₃. Nadmiar azotanu wypłukuje się w 0,5N kwasie azotowym, a następnie w wodzie. Po wypłukaniu przeciąga się bibułę przez nasycony roztwór siarczku amonowego. Wówczas w miejscach, gdzie znajdowały się zasady purynowe tworzą się ciemne plamy siarczku rtęci. Jeśli rozdzielanymi związkami są pirymidyny, wówczas chromatogram zanurza się do zbuforowanego roztworu 0,01M octanu rtęci o pH 6,2. Taki roztwór przygotowuje się przez zmieszanie 1 części 0,1M roztworu octanu rtęci z 3 częściami 1M roztworu octanu sodu i 6 częściami wody. Nadmiar octanu rtęci wypłukuje się wodą w ciągu 20 sek. i przeciąga przez roztwór siarczku amonu. Granica wykrywalności puryn i pirymidyn wynosi 5 µg, dla tyminy 10 µg.

Obok testu rtęciowego stosuje się dzisiaj dla wykrywania puryn test dwuchromianowy (45), polegający na powstaniu barwnych kompleksów między purynami i chromianem srebra wytwarzanym w czasie wywoływania. Chromatogram zanurza się w roztworze azotanu srebra (2⁰/o), a następnie w kąpeli zawierającej dwuchromian sodu (0,5⁰/o). Wówczas AgNO₃, daje z dwuchromianem chromian srebra, a puryny łączą się z nim na nierozpuszczalny brązowy kompleks. Nadmiar chromianu srebra wymywa się 0,5N HNO₃. Kompleks purynowy pozostaje nierozpuszczalny w postaci brązowej plamy. Metoda jest czulsza od metody Vischera - Chargaffa. Ostatnio Wood (60) opracował metodę wykrywania na chromatogramach związków purynowych i pirymidynowych, które posiadają wolny pierścień imidazolowy lub grupę aminową w pierścieniu pirymidynowym. Metoda ta jest przede wszystkim użyteczna w zastosowaniu do wykrywania zasad purynowych, które dają wyraźne plamy już w ilościach 0,5 µg. Metoda polega na zastosowaniu odczynnika zawierającego roztwór azotanu srebra oraz błękit bromofenolowy (0,2 g błękitu bromofenolowego w 50 ml acetonu + 50 ml 2⁰/o roztworu wodnego AgNO₃). Związki kompleksowe srebra z zasadami purynowymi lub pirymidynowymi adsorbują silnie barwnik dając niebieskie plamy po zanurzeniu chromatogramu do odczynnika, wysuszeniu w temp. pokojowej oraz wypłukaniu w wodzie destylowanej. Odczynnik ten służy również do wykrywania chlorków w mieszaninie poddawanej rozdziałowi chromatograficznemu. Powstający podczas wywoływania chlorek srebra daje z błękitem bromofenolowym plamy o zabarwieniu fioletowym. Rybonukleozydy i ich 5-fosfo-

rany mogą być wykrywane przy użyciu testu nadjodanowego (Buchanan, Dekker, Long (6)). Chromatogram spryskuje się kolejno 2% -owym roztworem nadjodanu, oraz odczynnikiem Schiffa (roztwór wodny rozaniliny odbarwiony SO_2), a następnie ogrzewa się w 90° przez 10 min. Po pewnym czasie pojawiają się na chromatogramie czerwone plamy. Do wywołania tej reakcji konieczna jest obecność dwóch wolnych grup OH przy węglu 2 i 3 rybozy, które zostają utlenione przez nadjodan do grup aldehydowych. Te ostatnie reagują z odczynnikiem Schiffa.

Rybozydy i dezoksyrybozydy mogą być również wykrywane przy zastosowaniu reakcji Biala na rybozę i cysteinowej na dezoksyrybozę (Stumpf (56), Buchanan, Dekker, Long (6)).

Oznaczenia położenia nukleotydów dokonuje się przy użyciu testu molibdenowego lub testu opartego na zastosowaniu chlorku żelazowego i kwasu sulfosalicylowego. Test molibdenowy jest metodą wywoływania wprowadzoną przez Hanesa i Isherwooda dla fosforylowanych cukrów, a zastosowaną jako test na nukleotydy przez Boulangera i Montreuil (3). Chromatogram spryskuje się odczynnikiem, w skład którego wchodzi: kwas nadchlorowy ch. cz. ($d = 1,61$) : 5 ml; kwas solny 1N : 10 ml.; roztwór molibdenianu amonu 4% : 25 ml; woda destylowana : 60 ml. Estry fosforowe hydrolizuje się następnie przez ogrzewanie w 85° lub wystawienie paska bibuły na działanie promieni słonecznych. Uwolniony w ten sposób kwas fosforowy daje z molibdenianem kompleks nabierający zabarwienia niebieskiego. Intensywność zabarwienia można zwiększyć przez działanie gazowego H_2S .

Test oparty na zastosowaniu roztworów chlorku żelazowego i kwasu sulfosalicylowego (Wade, Morgan (57)) polega na wytworzeniu związków między jonami Fe^{+++} i grupami fosforanowymi (przez zanurzenie paska w roztworze FeCl_3). Nadmiar jonów żelazowych daje barwne zabarwienie z kwasem sulfosalicylowym (po zanurzeniu w roztworze kwasu). Nukleotydy uwidoczniają się w postaci białych plam na blado fioletowym tle bibuły. Zabarwienie powstaje tylko w zakresie pH 1,5 — 2,5. Czulość: 1,2 mg fosforu na pow. 1 cm^2 .

W wypadku, gdy związki rozdzielane zawierają izotopy promieniotwórcze położenie ich określa się przy pomocy licznika Geigera - Mullera lub też metodą autoradiografii. Zasada autoradiografii polega na wywoływaniu błony przez pierwiastki promieniotwórcze z bibuły. Miejsca zetknięcia błony z pierwiastkami promieniotwórczymi zaznaczają się jako ciemne plamy.

Niekiedy zachodzi konieczność zidentyfikowania na chromatogramie związków adeniny. Posługujemy się wówczas nową metodą Gerlacha i Döringa (22), polegającą na reakcji utlenienia adeniny do barwnych pochodnych. Chromatogram spryskuje się roztworem KMnO_4 (70 mg na

100 ml wody), umieszcza się na 15 sek. w czystym Cl_2 i ogrzewa w 100° . Związki adeniny barwią się żółto lub pomarańczowo. Kolejne spryskanie roztworem KOH daje zabarwienie czerwone. W Zakładzie Biochemii UŁ zostały wypróbowane: metoda rtęciowa w zastosowaniu do puryn i pirymidyn, test molibdenowy w zastosowaniu do nukleotydów oraz metoda optyczna Markhama - Smitha.

Chromatografia na jonitach

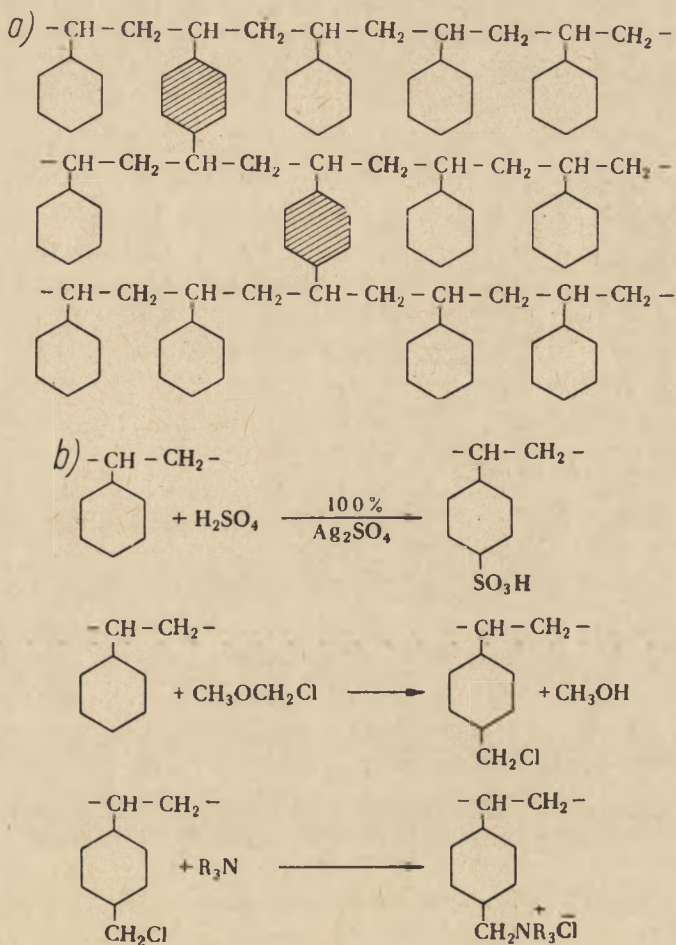
Metody chromatografii jono-wymiennej znalazły zastosowanie w dziedzinie kwasów nukleinowych po roku 1948. Rozpowszechniły się one przede wszystkim w Ameryce. Głównym przedstawicielem szkoły amerykańskiej stał się Cohn, który wniósł do dziedziny kwasów nukleinowych swoje szerokie doświadczenie nabyte przy rozdziale pierwiastków ziem rzadkich oraz radioaktywnych izotopów. Metoda rozdziału na wymienniczych okazała się wkrótce niemal niezastąpiona wszędzie tam, gdzie chodziło o otrzymywanie w większych ilościach czystych preparatów, trudnych do otrzymywania na drodze chemicznej. Chromatografia na jonitach jest mniej znana dla przeciętnego biochemika niż chromatografia bibułowa. Stwarza to konieczność nieco szerszego omówienia zarówno stosowanych żywic, jak i techniki pracy. Żywicami najczęściej stosowanymi do rozdziału składników kwasów nukleinowych są żywice o własnościach silnie kwaśnych lub silnie zasadowych, wytwarzane zwykle przez kopolimeryzację styrenu z dwuwinylobenzenem i doczepienie do powstałej w ten sposób nieaktywnej trójwymiarowej siatki czynnych grup o własnościach jono-wymiennych. Rys. 2. (a i b).

Takimi grupami czynnymi są w wypadku silnie kwaśnego wymiennicza kationowego grupy sulfonowe, w wypadku silnie zasadowego wymiennicza anionowego najczęściej grupy czwartorzędowych soli amoniowych. Ilości dwuwinylobenzenu używane do syntezy mogą być różne. W wypadku gdy rozdzielamy substancje o większych cząsteczkach, np.: dwu-, trójnukleotydy itp., wskazane jest używać żywicy o mniejszej zawartości dwuwinylobenzenu (2 — 3%), gdyż wówczas siatka polimeru jest rzadsza i większe cząsteczki łatwiej mogą przenikać do wewnątrz i tam podlegać wymianie.

Do wymienniczy typu kationitów o podanej wyżej budowie należą stosowany często przy rozdziale puryn i nukleozydów Dowex 50'; do anionitów: Dowex 1, Dowex 2 oraz Amberlit IRA-400, używane głównie przy rozdziale nukleotydów.

Anionity, jak Dowex 1, Dowex 2, używane są zarówno w formie chlorków (rys. 2), jak i w formie mrówczanów i octanów. Wówczas miejsce jonu Cl' zastępuje jon HCOO' , ewent. $\text{CH}_3\text{COO}'$. Jony wodorowe z grup

SO₃H kationitów oraz jony Cl⁻, HCOO⁻ itp. anionitów mogą być wymieniane w trakcie analizy na jony posiadające ładunek tego samego znaku, znajdujące się w roztworze nalany na kolumnę. Procesy wymiany



Rys. 2 a. Siatka polimeru wytworzonego przez kopolimeryzację styrenu z dwuwinylobenzenem. Rys. 2 b. Reakcje prowadzące do przyłączenia czynnych grup sulfonowych oraz czwartorzędowych soli anionowych do siatki polimeru.

mają ten sam charakter co procesy zachodzące między zwykłymi elektrolitami i można je przedstawić w postaci równań, np. dla kationitu:



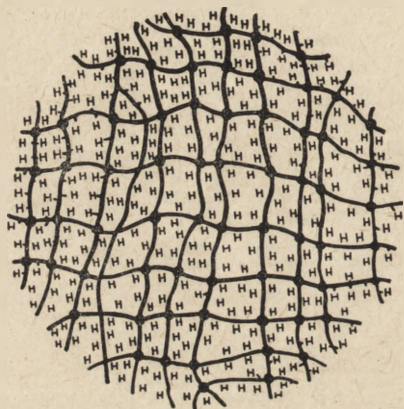
Kt' — reszta kationitu

Me' — jon dodatni

X' — jon ujemny

Wymieniacz w postaci uwodnionej stanowi żel wypełniony elektrolitem, gdyż w środowisku wodnym grupy czynne podlegają dysocjacji. Część jonów jest unieruchomiona i na stałe przytwierdzona do siatki polimeru. Struktura wymieniacza — kationowego uwidoczniona jest na rys. 3.

W reakcjach wymiany istnieje ścisła selektywność, która stanowi podstawę chromatograficznego rozdzielania. Niektóre z jonów są łatwiej wychwytywane przez wymieniacz, mają większe do niego powinowactwo, niż jony pozostałe. W pierwszym przybliżeniu można powiedzieć, że w roztworze żelu wymieniacza nagromadzają się chętniej jony obdarzone większym ładunkiem, a w wypadku tego samego ładunku, jony o mniejszym promieniu w stanie uwodnienia. Decydującą rolę odgrywają jednakże niejednokrotnie i inne czynniki, jak struktura, rozpuszczalność itp.



Rys. 3. Struktura wymieniacza kationowego (Dowex 50).

równy wymieniaczy kationowych jak i anionowych. Decydującym czynnikiem jest pH środowiska określające stopień dysocjacji grup, a tym samym i ładunek cząstki. Wielkość tego ładunku będzie z kolei decydowała o powinowactwie poszczególnych związków do jonitu.

Przy rozdzielaniu na kolumnie należy wybrać taki układ warunków, w których każdy ze składników (zasad, nukleozydów lub nukleotydów) będzie miał inną zdolność wymienną w stosunku do jonów wymieniacza. Technika pracy na kolumnie jest względnie prosta. Żywiec stosuje się w postaci drobnych ziarenek o mniej więcej jednakowej średnicy (niekiedy setne części mm), uzyskanych dzięki przesianiu przez odpowiednie sito.

Żywiec bezpośrednio przed użyciem należy przeprowadzić w odpowiednią formę np. kationit w formę wodorową, anionit w formę chlorku, mrówczanu lub octanu. Osiąga się to przemywając kolumnę roztworami kwasów: solnym, mrówkowym lub octowym, niekiedy roztworami odpowiednich soli. Roztwory te muszą być bardziej stężone od jakichkolwiek użytych następnie w doświadczeniu. Absorpcji związków podlegających rozdzielaniu dokonuje się z roztworów o możliwie niskiej sile elucji. Przy wymywaniu składników z kolumny siłą elucji roztworu wymywającego

zwiększa się stopniowo. Można przy tym zmieniać wartości pH, lub też zwiększać stężenie jonu wymywającego przez dodatek soli.

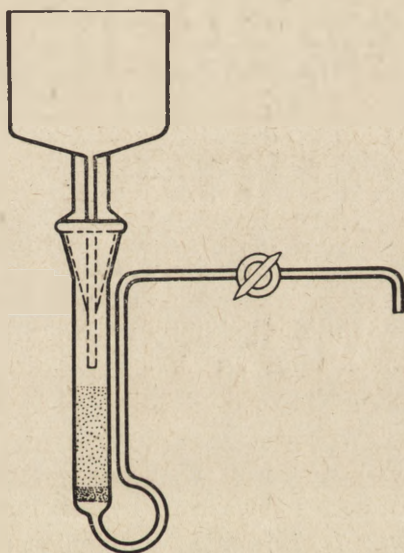
Anionit w formie chlorku przemywa się roztworami zawierającymi jon Cl' , mrówczanu — jon HCOO' , octanu — jon octanowy. Kationit w formie wodorowej kwasami, najczęściej kwasem solnym.

Fracje wychodzące z kolumny, w skład których wchodzi rozdzielone produkty hydrolizy kwasów nukleinowych, analizuje się przy pomocy spektrofotometru, mierząc gęstość optyczną w jednej lub więcej długości fali, w zakresie 240 — 280 m μ .

Zasadniczy schemat kolumny wygląda jak na rys. 4.

Poszczególne części układu mogą być oczywiście odpowiednio skomplikowane. Górny zbiornik jest często przystosowany do automatycznej zmiany rozpuszczalnika oraz regulacji dopływu. Odbieralniki z automatyczną zmianą naczynek pozwalają obecnie na kolejne pobranie do 400 próbek roztworu wychodzącego z kolumny. Regulacji szybkości wypływu dokonuje się często przy użyciu ciśnienia. Pierwsze prace dotyczące zastosowania wymienniczy w dziedzinie badań nad kwasami nukleinowymi ukazały się w 1948 r. Elmore (21), a niezależnie Harris i Thomas (25) zastosowali jonity do otrzymywania nukleozydów pirymidynowych na skalę preparatywną. Stosowanym jonitem był Zeo Karb 215. Absorpcji dokonuje się z roztworu wodnego — wówczas cytydyna, zawierająca grupy zasadowe, zostaje zatrzymana przez wymienniczy, a urydyna, której grupa hydroksylowa jest kwaśna, przechodzi przez kolumnę i można ją wydzielić z wodnego roztworu. Cytydynę Elmore usuwa z kolumny przy pomocy rozcieńzonego amoniaku a Harris i Thomas roztworu wodnego pirydyny. W tym samym roku Smith i Wender (55) rozdzielili na wymienniczu ksantynę od guaniny. Jonity wówczas stosowane nie były żywicami polistyrenowymi. Wymienniczy Elmore'a, a także Harris'a Zeo Karb 215 był sulfonowanym węglem, a wymienniczy Smith'a i Wender'a Amberlit IR-100 żywicą fenolową z grupami SO_3H .

Zasadniczy rozwój metodyki rozpoczyna się po roku 1949, kiedy Cohn



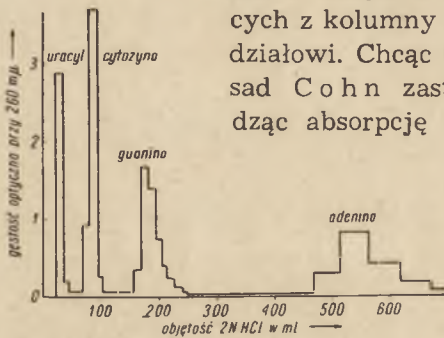
Rys. 4. Zasadniczy schemat wymiennika.

ogłasza swoją pracę zawierającą opis rozdzielania puryn, pirymidyn oraz rybonukleotydów (12).

Z 5-ciu zasad: cytozyna, guanina i adenina, posiadające grupy aminowe, istnieją w roztworach o $\text{pH} < 4$ jako kationy, mogą więc być wychwytywane w tych warunkach przez wymienniacz typu kationitu. Po raz pierwszy Cohn rozdzielił zasady na Dowexie 50, używając do wymywania 2N kwas solny. Wykres przedstawiający przebieg analizy podano na rys. 5.

Na osi rzędnych odmierzone wartości gęstości optycznych wymywającego roztworu przy 260 m μ , na osi odciętych objętości HCl w ml. przepuszczone przez wymienniacz. Tymina i uracyl, cząsteczki niezjonizowane niżej

pH 4, znajdują się w pierwszych frakcjach wychodzących z kolumny i nie podlegają w tych warunkach rozdzielaniu. Chcąc rozdzielić jednocześnie wszystkie 5 zasad Cohn zastosował wymienniacz anionowy, prowadząc absorpcję i elucję przy $\text{pH} \sim 10$, wymywając



Rys. 5. Rozdział puryn i pirymidyn na Dowexie 50 (forma H₂), Wymiennik: 8,1 cm × 0,74 cm². Szybkość wypływu 0,6 ml/min. Materiał próbny: 0,5 mg uracylu, po 1,0 mg adeniny, guaniny, cytozyny w 7,5 ml, 2NHCl. [Cohn (12)].

składniki z kolumny roztworami buforowymi mieszanin amoniaku i chloru amonu. Przy tak wysokim pH zasady stają się anionami. (W analogicznych warunkach można również rozdzielać nukleozydy).

Wprowadzone przez Cohna metody rozdzielania puryn i pirymidyn znalazły zastosowanie w szeregu późniejszych prac różnych autorów. Żywicami używanymi był zarówno kationit Dowex 50, jak i anionity Dowex 1 i Dowex 2. Wymienniacze anionowe stosowano w tych przypadkach, gdy należało rozdzielić jednocześnie puryny oraz pirymidyny. Tak np.: Koch, Putnam i Evans (33) badając metabolizm purynowy *Escherichia coli* rozdzielał puryny metodą Cohna na Dowexie 50, mieszaninę zaś puryn i pirymidyn po kwaśnej hydrolizie na Dowexie 2.

Heinrich, Dewey i współpracownicy (26) badając włączanie się 8-azaguaniny w kwasy nukleinowe *Tetrahymena gelei* stosowali do rozdzielania puryn Dowex 50 posługując się metodą podobną do Cohna. — Absorpcji puryn dokonywano z roztworu 0,5N HCl, a elucję przeprowadzano roztworami HCl o wzrastających stężeniach (0,5N, 1,5N, 5N). Na Dowexie 50 rozdzielał również zasady Koch (32) w pracy nad odnawianiem się wirusów. Goldthwait i Bendich (23) badając wpływ antagonistów kwasu foliowego na metabolizm kwasu nukleinowego rozdzielał za-

sady na Dowexie 1 stosując roztwory NaCl i NaOH, o zmieniających się stężeniach. Rozdział puryn i pirymidyn przy pomocy roztworów NaCl i NaOH na Dowexie 1 (w formie OH⁻) stosowali również Roll i Weliky (97) (1955).

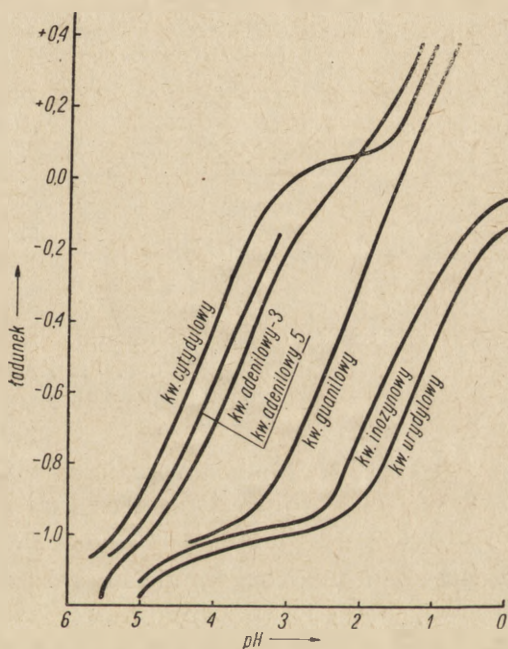
Rozdział nukleotydów można przeprowadzić także zarówno na kationitach jak i anionitach, zależnie od doboru pH, które decyduje o dysocjacji grup aminowych i fosforanowych. Zależność ładunku cząsteczki od pH przedstawiono na wykresie (rys. 6).

Ładunek ujemny wzrasta w kolejności: kwas cytydylowy, adenylowy, guanylowy, urydylowy. Poniżej pH 2,5 kwas adenylowy i cytydylowy posiadają ładunek dodatni, a poniżej 1,5 trzy nukleotydy: adenylowy, cytydylowy i guanylowy są już kationami.

Pierwsze próby rozdziału rybonukleotydów przeprowadził Cohn na kationicie — Dowexie 50 przy niskim pH (12) przemywając kolumnę 0,1M kwasem octowym (kwas solny jest w tym wypadku eluentem zbyt silnym ze względu na słabe wiązanie między nukleotydami i wymienniczem). Obecnie powszechnie stosowana jest jednakże metoda rozdziału nukleotydów na anionitach. Dokładny jej opis został podany przez Cohna w 1950 r. (13).

Zgodnie z przytoczonymi wyżej danymi najwygodniej jest w tym wypadku absorbować mieszaninę na kolumnie przy pH 6 lub większym i następnie wymywać nukleotydy w kolejności: kwas cytydylowy, adenylowy, guanylowy, urydylowy przez stopniowe obniżanie pH. Kwas urydylowy jako posiadający największy ładunek jest najsilniej związany z wymienniczem. Przy zbyt dużym zwiększaniu pH może nastąpić hydroliza składników na kolumnie, wówczas zwiększamy stężenie anionu przy pomocy soli.

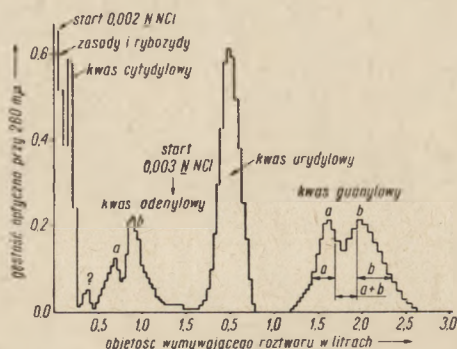
Wymienniczymi stosowanymi przez Cohna były: Dowex 1, Dowex 2 i Amberlit IRA-400. Dawały one podobne rezultaty. Żywyce stosowane były w postaci chlorku i mrówczanu z równie dobrymi wynikami. Na



Rys. 6. Ładunek cząsteczki rybonukleotydu jako funkcja pH.

rys. 7 podano wykres rozdziału nukleotydów na Dowexie 2 w formie chlorku.

Wymywanie rozpoczyna się kwasem solnym 0,002N i zmienia się koncentrację na 0,003N po usunięciu z kolumny kwasu adenylowego. Uzupełnimy rozdział na kwas adenylowy *a* i *b* oraz guanylowy *a* i *b*. Zasady oraz rybozydy nie wykazujące przy pH niżej 8 prawie żadnego powinowactwa do wymiennicza zostają wymyte przed kwasem cytydylowym.



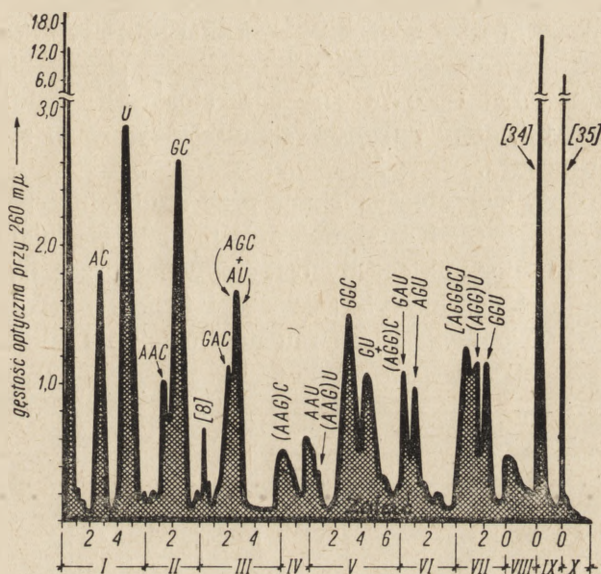
Rys. 7. Rozdział mononukleotydów kwasu rybonukleinowego wątroby szczura na Dowexie 1. Wymiennik: 125 cm × 0,74 cm², eluent: HCl, 0,5 ml/min. Materiał próbny 14 mg mieszaniny nukleotydów w 10 ml wody. [Cohn 13].

zszym od 2 (13). Metoda rozdzielania rybonukleotydów przy użyciu Dowexu 1 w formie mrówczanu oraz kwasu mrówkowego jako eluentu daje również dobre wyniki i jest wygodna w użyciu.

Zasady i nukleozydy można rozdzielić na tej samej kolumnie, jeśli stosować początkowo przemywanie buforami o różnych pH powyżej 8. Otrzymane roztwory nukleotydów są bardzo rozcieńczone. Możemy je zażyć w celu otrzymania krystalicznych związków, przepuszczając rozcieńczone roztwory (po zobojętnieniu) przez krótką, parocentymetrową kolumnkę i przeprowadzając szybką elucję bardziej stężonym kwasem (np. 0,1N HCl). Szybkości przepływu rozpuszczalnika we wszystkich przypadkach nie powinny przekraczać 1 ml/cm²/min. Takie szybkości pozwalają na osiągnięcie równowagi i dają symetryczne krzywe elucji. Swoją metodę rozdzielania rybonukleotydów zastosował C o h n w serii prac prowadzonych razem z V o l k i n e m nad budową kwasu rybonukleinowego (16), (65), (15). Autorzy rozfrakcjonowali produkty hydrolizy kwasu rybonukleinowego wątroby cielęcej oraz kwasu drożdżowego przeprowadzonej: ługiem, jadem żmii, rybonukleazą oraz kolejno rybonukleazą i fosfatazą alkaliczną. Technika pracy została ogólnie ulepszona w kierunku

częstszej, a bardziej stopniowej zmiany siły elucji roztworu wymywiającego, co pozwoliło na lepsze rozsegregowanie skomplikowanych mieszanin. Stosowano przy tym do elucji w pierwszej fazie rozcieńczone kwasy, w dalszych mieszaniny kwasów z odpowiednimi solami o wzrastających stężeniach soli.

Dla przykładu podano wykres rozdziłu produktów trawienia kwasu rybonukleinowego wątroby cielęcej rybonukleazą (rys. 8).



Rys. 8. Rozdział na wymienniaczu produktów trawienia rybonukleazą kwasu RN wątroby cielęcej. Nawiasy zwykłe wskazują na nieznaną sekwencję nukleotydów; klamry na empiryczny skład. Roztwory do elucji: 0,005 N (I), 0,01 N HCl (II), 0,01 N HCl + 0,0125 N NaCl (III), 0,01 N HCl + 0,025 N NaCl (IV), 0,01 N HCl + 0,05 N NaCl (V), 0,01 N HCl + 0,1 N NaCl (VI); 0,01 N HCl + 0,2 N NaCl (VII), 0,01 N HCl + 0,3 N NaCl (VIII), 0,01 N HCl + 1 N NaCl (IX), 2nHCl (X). [Volkin, Cohn (65)].

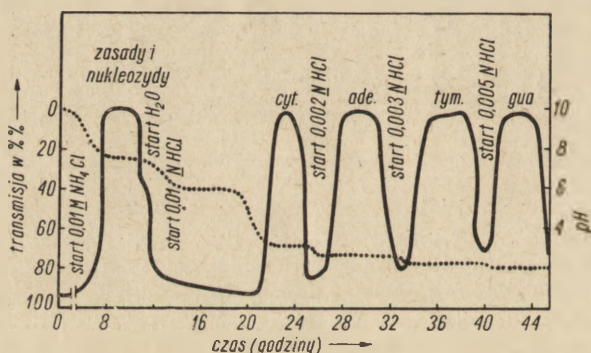
Rozdział przeprowadzono na Dowexie 1 w formie chlorku o niskiej zawartości dwuwinylobenzenu ze względu na dużą wielkość rozdzielanych cząstek. Składniki wymywano kwasem solnym oraz mieszaninami kwasu solnego z chlorkiem sodu.

Trawienie rybonukleazą dało w wyniku prawie wyłącznie nukleotydy pirymidynowe b, oraz małe polinukleotydy, w skład których wchodził jeden nukleotyd pirymidynowy, a pozostałość stanowiła nukleotydy puryno-

we. Wyniki prac Cohna i Volkina doprowadziły do potwierdzenia koncepcji Smitha o budowie kwasu rybonukleinowego, wg której składa się on z krótkich łańcuchów nukleotydów purynowych i pirymidynowych. Wyżej opisane metody rozdzielania rybonukleotydów znalazły zastosowanie w licznych pracach innych autorów. Wymienić tu można np. pracę Merrifielda i Wooleya (43), którzy przy zastosowaniu techniki Cohna otrzymali kilka analitycznie czystych dwunukleotydów, wyizolowanych z kwasu drożdżowego, potraktowanego stęż. HCl w temp. pokojowej. Czyste związki otrzymywano przez kilkakrotne refrakcjonowanie na kolumnach.

Lowy, Davoll i Brown (35) stosowali technikę Cohna w badaniach nad udziałem purynowych nukleozydów w syntezie kwasu nukleinowego u szczura.

W oparciu o doświadczenia uzyskane przy rozdzielaniu rybonukleotydów, Volkin, Khym i Cohn opracowali metodę rozdzielania dezoksynukleotydów (66). Dezoksynukleotydy otrzymywane przez hydrolizę enzymatyczną kwasu DN dezoksyrybonukleazą i fosfatazą alkaliczną poddawano rozdzielaniu chromatograficznemu na Dowexie 1 w formie chlorku (rys. 9).

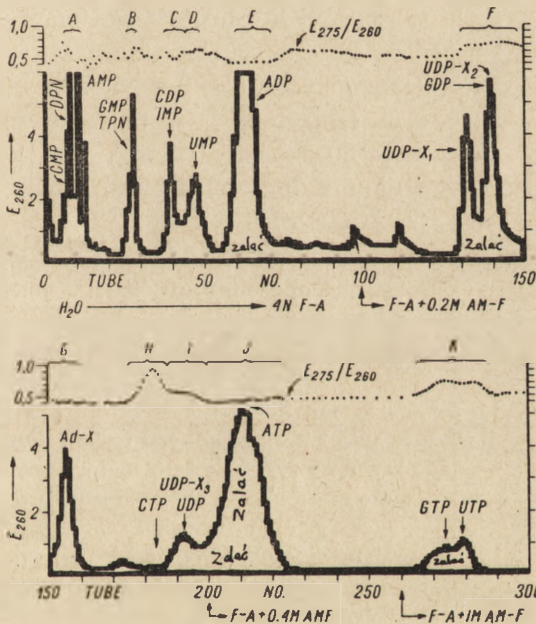


Rys. 9. Rozdział na jonice nukleotydów otrzymanych po strawieniu enzymatycznym 10 g kwasu DN. Wymiennik: 12 cm × 33 cm². Dowex 1, eluent: HCl, 1 ml/cm²min. [Volkin, Khym, Cohn (66)].

Absorpcji dokonuje się ze środowiska alkalicznego (pH 10) podobnie, jak w wypadku rybonukleotydów. Na wstępie usuwa się zasady i nukleozydy chlorkiem amonu, a następnie rozdziela się dezoksynukleozydy roztworami kwasu solnego o wzrastających stężeniach. Kolejność wymywania jest taka jak dla rybonukleotydów. (Rozdział dezoksynukleotydów można także przeprowadzić po oddzieleniu zasad, nukleozydów i zanieczyszczeń polinukleotydowych na innej wstępnej kolumnie). Poszczególne

frakcje zagęszcza się przez readsorpcję na małej kolumnie i wymyć małą ilością bardziej stężonego HCl (0,01N). W ten sposób można rozdzielić nukleotydy z 10 g kwasu dezoksynukleinowego. Dzięki powyższej metodzie wykazano, że wszystkie dezoksynukleotydy po trawieniu dezoksyrybonukleazą i fosfatazą alkaliczną posiadają budowę 5-fosforanową.

Cohn przy użyciu wyżej opisanej metody wykrył obecność kwasu 5-metylodezokscytydylowego w hydrolizatach enzymatycznych kwasu DN grasicowego (14). Należało w tym celu frakcję kwasu dezokscytydylowego, otrzymaną metodą Volkina, Khyma i Cohna przepuścić ponownie przez kolumnę z anionitem w formie mrówczanu, stosując do przemycania 0,003M kwas mrówkowy. Następuje wówczas rozdzielenie kwasu dezokscytydylowego i 5-metylodezokscytydylowego. Dokładne oczyszczenie przeprowadzić można przez refrakcjonowanie roztworu zawierającego kwas 5-metylodezokscytydylowy na mniejszej kolumnie.



Rys. 10. Rozdział na Dowexie 1 kwasorozpuszczalnej frakcji z 75 g wątroby szczura „Oznaczenia: F-A — kwas mrówkowy, AM-F — mrówczan amonu; DPN i TPN — nukleotydy dwu- i -trójfosfopirydynowe; UDP-x — pochodne cukrowe UDP; Ad-x — niezidentyfikowana mieszanina polifosforanów adenozyne. Odczyty gęstości optycznych nie zaznaczone na wykresie z powodu zbyt dużych wartości są dla: DPN — 27; AMP — 31, 33; ADP — 6, 9, 12, 15; 13, 9. Rechromatografia poszczególnych frakcji od A do K na rys. 11. [Hurlbert, Schmitz, Bruna, Potter (29)].

Nieco inny sposób rozdzielania dezoksynukleotydów podają Hurst, Marko i Butler (30). Autorzy stosują Dowex 1 w formie octanu. Dezoksynukleinian sodu różnego pochodzenia hydrolizują enzymatycznie na mononukleotydy kolejno przy użyciu dezoksyrybonukleazy oraz fosfodiesterazy z jadu żmii pozbawionej 5-nukleotydyazy. Mononukleotydy rozdzielają przez stopniowe wymywanie kwasem octowym (0,5M), a następnie mieszaninami kwasu octowego (1M) z roztworami octanu sodu o wzrastających stężeniach (0,01M, 0,1M, 0,5M). Dla otrzymania kwasu

5-metylodezoksytydylowego w osobnej frakcji należy zastosować na początku wymywania słabszy kwas octowy (0,05M), dłuższą kolumnę i wolniejszy wpływ eluentu. Kolejność wymywania poszczególnych kwasów jest taka, jak u Volkina, Khyrna i Cohna.

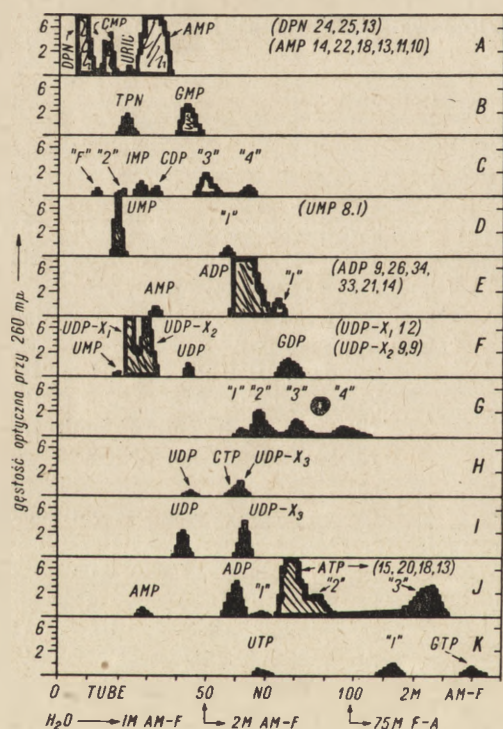
Andersen, Dekker i Todd (1) zastosowali jonity do otrzymywania preparatów dezoksyrybonukleozydów na szeroką skalę. Po strawieniu enzymatycznym kwasu DN wyciąga się dezoksynukleozydy z hydrolizatu alkoholem i rozdziela na Dowexie 2 w formie mrówczanu, używając do elucji buforów mrówczanowych o pH powyżej 7 (podobnie jak przy rozdziale rybonukleozydów metodą Cohna). Dezoksyadenozyna i dezoksytydyna przechodzą nierozdzielone do pierwszych frakcji. Dezoksyadenozynę można wydzielić z roztworu przez krystalizację w niskiej temperaturze. Ług pokry-

staliczny przepuszcza się przez żywicę IRC-50 (kationit słabo kwaśny) i eluuje dezoksytydynę wodą. Resztki dezoksyadenozyny zostają zatrzymane na kolumnie. Dwa dalsze dezoksynukleozydy zostają wydzielone z dalszych frakcji na kolumnie z Dowexem 2.

Kończąc ten krótki przegląd metod chromatografii na jonitach należałoby wspomnieć o pracy, która chociaż nie dotyczy

Rys. 11. Rechromatografia na Dowexie 1 poszczególnych frakcji z wykresu na rys. 10. AM-F — mrówczan amonu, F-A — kwas mrówkowy. Odczyty zbyt wysokie są podane w nawiasach. Niezidentyfikowane związki oznaczono: 1, 2, 3 itd.

[Hurlbert, Schmitz, Brumm, Potter (29)].



składników kwasów nukleinowych lecz frakcji kwasorozpuszczalnych, jest jednakże najja-skrawszymi przykładami, jakie daje nowoczesna technika jonowymienna. Jest to praca Hurlberta, Schmitza i współpr. (29) nad składem nukleotydowym kwasorozpuszczalnych frakcji różnych tkanek.

Zmiany i ulepszenia metody Cohna pozwoliły na wyizolowanie z tych frakcji obok zwykłych nukleotydów, takich związków jak: kwasy

guanozyno- dwu i trójfosforowy, cytydino- dwu- i trójfosforowy, urydino- oraz inozyno- dwu- i trójfosforowy, połączeń dwufosfourydyny z cukrowcami: acetyloglukozaminą i kwasem uronowym oraz kilku jeszcze innych związków, w ilościach nadających się do analizy. Niektóre z tych składników nie były dotąd wykryte w materiale biologicznym. Autorzy stosują system dwóch kolumn, pracujących przy różnych pH. Całkowity ekstrakt z tkanki po zobojętnieniu rozdziela się najpierw na kolumnie wypełnionej Dowexem 1, eluując składniki kwasem mrówkowym oraz mieszaninami kwasu mrówkowego z mrówczanem amonu.

Poszczególne frakcje z pierwszej kolumny przechodzą następnie przez kolumnę drugą, wypełnioną tym samym jonitem, gdzie są rozdzielane buforami mrówczanu amonu.

Zasadniczą modyfikacją wprowadzoną przez H u r l b e r t a i współprac. było zastosowanie urządzeń mechanicznych, pozwalających na ciągłą, łagodną zmianę siły elucji wymywającego roztworu. Stężenia roztworów nie zmieniają się skokowo, ale wzrastają w sposób ciągły do pożądanej granicy. Modyfikacja ta okazała się nieocenioną przy pracy z nieznanymi związkami, dla których warunków elucji nie można przewidzieć.

Rozdział na kolumnach skrobiowych nie znalazł szerszego zastosowania. Brak tutaj tych możliwości doboru i zmian rozpuszczalników jak w chromatografii jono-wymiennej, która stosuje do rozdziału elektrolity. Używa się przeważnie mieszanek alkoholi z wodą lub kwasami, np. butanol nasycony wodą do rozdziału nukleozydów (R e i c h a r d (46), B e a l e, H a r r i s, R o e (2)) do rozdziału zasad — mieszaninę propanolu z kwasem solnym (M i r s k y, D a l y (44), D a l y, A l f r e y, M i r s k y (17)), lub butanol nasycony wodą z dodatkiem eteru metylowego glikolu (E d m a n, H a m m a r s t e n i w s p. (20).

Autorzy wzorowali się na pracach S t e i n a i M o o r a dotyczących rozdziału aminokwasów.

LITERATURA

1. Andersen W., Dekker C. A., Todd A. R., J. Chem. Soc., 2721, 1952.
2. Beale R. N., Harris R. J., Roe E. M., J. Chem. Soc., 1397, 1950.
3. Boulanger P., Montreuil J., Bull. soc. chim. biol., 33, 784, 1951.
4. Brown D. M., Dekker C. A., Todd A. R., J. Chem. Soc., 2715, 1952.
5. Buchanan J. G., Nature, 168, 1091, 1951.
6. Buchanan J. G., Dekker C. A., Long A. G., J. Chem. Soc., 3162, 1950.
7. Brown D. M., Heppel L. A., Hilmoe R. J., J. Chem. Soc., 40, 1954.
8. Brown D. M., Magrath D. I., Todd A. R., J. Chem. Soc., 2708, 1952.
9. Carpenter D. C., Anal. Chem., 24, 1203, 1952.
10. Carter C. E., J. Amer. Chem. Soc., 72, 1466, 1950.
11. Chargaff E., Lipshitz R., Green Ch., Hodes M. E., J. Biol. Chem. 192, 223, 1951.

12. Cohn W. E., *Science*, **109**, 377, 1949.
13. Cohn W. E., *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 1471, 1950.
14. Cohn W. E., *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 1539, 1951.
15. Cohn W. E., Volkin E., *Nature*, **167**, 483, 1951.
16. Cohn W. E., Volkin E., *J. Biol. Chem.*, **203**, 319, 1953.
17. Daly M. M., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *J. Gen. Physiol.*, **33**, 497, 1950.
18. Deutsch A., Nilsson R., *Acta Chem. Scand.*, **7**, 858, 1953.
19. Diemianowskaja N. S., Biełozierskij A. N., *Biochimia*, **19**, 688, 1954.
20. Edman P., Hammarsten E., Low B., Reichard P., *J. Biol. Chem.*, **78**, 395, 1949.
21. Elmore D. T., *Nature*, **161**, 931, 1948.
22. Gerlach E., Döring H. J., *Naturw.*, **42**, 344, 1955.
23. Goldthwait D. A., Bendich A., *J. Biol. Chem.*, **196**, 841, 1952.
24. Hamoir C., *Biochem. J.*, **50**, 140, 1952.
25. Harris R. J., Thomas J. F., *Nature*, **161**, 931, 1948.
26. Heinrich M. R., Dewey V. C., Parks R. E., Kidder G. W., *J. Biol. Chem.*, **197**, 199, 1952.
27. Heppel L. A., Markham R., Hilmoie R. J., *Nature*, **171**, 1151, 1953.
28. Hotchkiss R. D., *J. Biol. Chem.*, **175**, 315, 1948.
29. Hurlbert R. B., Schmitz H., Brumm A. F., Potter R., *J. Biol. Chem.*, **209**, 23, 1954.
30. Hurst R. O., Marko A. M., Butler G. C., *J. Biol. Chem.*, **204**, 847, 1953.
31. Knight C. A., *J. Biol. Chem.*, **197**, 241, 1952.
32. Koch A. L., *J. Biol. Chem.*, **203**, 227, 1953.
33. Koch A. L., Putnam F. W., Evans E. A., *J. Biol. Chem.*, **197**, 105, 1952.
34. Kritskij G. A., *Biochimia*, **18**, 709, 1953.
35. Lowy B. A., Davoll J., Brown G. B., *J. Biol. Chem.*, **197**, 591, 1952.
36. Markham R., Smith J. D., *Biochem. J.*, **45**, 294, 1949.
37. Markham R., Smith J. D., *Biochem. J.*, **49**, 401, 1951.
38. Markham R., Smith J. D., *Nature* **163**, 250, 1949.
39. Markham R., Smith J. D., *Biochem. J.*, **52**, 552, 1952.
40. Markham R., Smith J. D., *Biochem. J.*, **52**, 558, 1952.
41. Markham R., Smith J. D., *Biochem. J.*, **52**, 565, 1952.
42. Magasanik B., Vischer E., Doniger R., Elson D., Chargaff E., *J. Biol. Chem.*, **186**, 37, 1950.
43. Merrifield R. B., Wooley D. W., *J. Biol. Chem.*, **197**, 521, 1952.
44. Mirsky A. E., Daly M. M., *J. Biol. Chem.*, **179**, 981, 1949.
45. Reguera R. M., Asimow I. A., *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 5781, 1950.
46. Reichard P., *Nature*, **162**, 662, 1948.
47. Roll P. M., Weliky I., *J. Biol. Chem.*, **213**, 509, 1955.
48. Schram G., Kerekjarto B., *Z. Naturf.*, **7b**, 589, 1952.
49. Shive W., Sibley M. E., Rogers L. L., *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 867, 1951.
50. Smith J. D., Markham R., *Biochem. J.*, **46**, 509, 1950.
51. Smith J. D., Markham R., *Biochim. Biophys. Acta*, **8**, 350, 1952.
52. Smith J. D., Markham R., *Nature*, **170**, 120, 1952.
53. Smith J. D., Stoker M., *Brit. J. Exp. Path.*, **32**, 433, 1951.
54. Smith J. D., Wyatt G. R., *Biochem. J.*, **49**, 144, 1951.

55. Smith S., Wender S., J. Amer. Chem. Soc., **70**, 3719, 1948.
56. Stumpf P. K., J. Biol. Chem., **169**, 367, 1947.
57. Wade H. E., Morgan D. M., Nature, **171**, 529, 1953.
58. Whitfeld P. R., Aust. J. Biol. Sci., **6**, 234, 1953.
59. Whitfeld P. R., Markham R., Nature, **171**, 1151, 1953.
60. Wood T., Nature, **176**, 175, 1955.
61. Wyatt G. R., Biochem. J., **48**, 584, 1951.
62. Wyatt G. R., Cohen S. S., Nature, **170**, 846, 1952.
63. Vischer E., Chargaff E., J. Biol. Chem., **168**, 781, 1947.
64. Vischer E., Chargaff E., J. Biol. Chem., **176**, 703, 1948.
65. Volkin E., Cohn W. E., J. Biol. Chem., **205**, 767, 1953.
66. Volkin E., Khym J. X., Cohn W. E., J. Amer. Chem. Soc., **73**, 1533, 1951.

Główne zalety elektroforezy bibułowej to stosunkowo prosta aparatura, bardzo mała ilość materiału potrzebnego do analizy oraz możliwość wykonywania seryjnych oznaczeń. Poza tym jedną z cennych zalet jakie daje elektroforeza bibułowa jest stosunkowo łatwa możliwość śledzenia wielu różnych substancji przenoszonych przez poszczególne frakcje białkowe. Stosując odpowiednie metody oznaczania tych drobnych ilości substancji związanych z białkiem i posiadających często duże znaczenie biologiczne mamy możliwość poznania ich zmian ilościowych w zależności od najróżnorodniejszych czynników.

Do wad metody rozdziału na bibule w porównaniu z metodą analizy białek za pomocą elektroforezy klasycznej można zaliczyć stosunkowo mniejszą jej dokładność oraz trudność wykonania bezwzględnych pomiarów ruchliwości cząsteczek w polu elektrycznym.

Chociaż elektroforeza bibułowa staje się dziś metodą coraz to szerzej rozpowszechniającą się, to niemniej pozostaje faktem, że różni autorzy uzyskują mniej lub więcej wyraźnie rozdzielone frakcje białkowe oraz stosują różne metody do ich ilościowego określania. Na temat metodyki elektroforezy bibułowej pojawiła się w ciągu ostatnich lat duża liczba publikacji (48, 7, 11, 15, 24, 49, 28, 37, 44, 19, 6, 33, 32, 3, 8, 9, 21, 25, 43, 29, 30), co z jednej strony przyczynia się do zwrócenia uwagi na wiele różnych istotnych szczegółów technicznych, z drugiej strony jednak wpływa na trudności w porównywaniu wyników uzyskiwanych przy pomocy zbyt wielu różnorodnych metod.

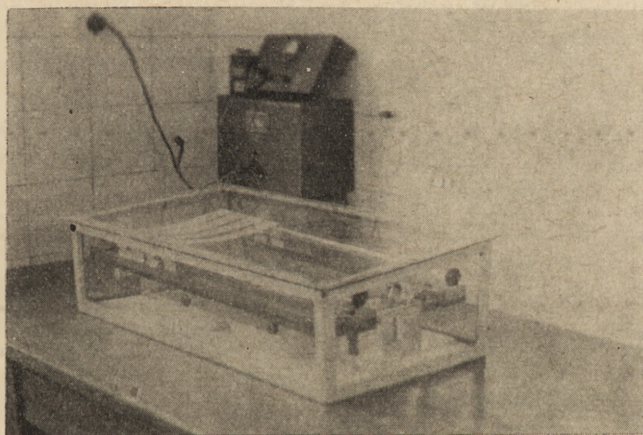
Celem niniejszej pracy było systematyczne przesledzenie szczegółowych warunków określających uzyskiwanie powtarzalnych wyników oraz wskazanie źródeł możliwych błędów w oparciu o własne spostrzeżenia i dane z piśmiennictwa. Warunki te omówiono kolejno poniżej poruszając modyfikacje stosowane przez różnych autorów i bardziej szczegółowo naświetlając stosowaną metodykę.

Zasada metody elektroforezy bibułowej jest prosta: na pasku bibuły zwilżonym roztworem buforowym umieszcza się kroplę roztworu białkowego i przepuszcza się przez bibułę stały prąd elektryczny. Wówczas cząsteczki białka posiadające przy danym pH roztworu buforowego określony ładunek elektryczny poruszają się w polu elektrycznym z różną szybkością zależną od wielkości tego ładunku i od wielkości cząsteczki. Ta różna szybkość wędrówki warunkuje po pewnym czasie przestrzenny rozdział poszczególnych frakcji białkowych. Rozdzielone w ten sposób frakcje białkowe zabarwia się na bibule uzyskując, w przypadku badania surowicy, obraz zazwyczaj pięciu plamek, z których jedna odpowiada albuminom, a cztery pozostałe globulinom α_1 , α_2 , β , γ . Czasem udaje się też rozdzielić frakcję β na β_1 i β_2 (47) oraz frakcję γ na γ_1 - i γ_2 -globuliny (5).

Tak uzyskany obraz rozdzielonych i zabarwionych frakcji białkowych (elektroforogram) może służyć do przybliżonego oszacowania zawartości poszczególnych frakcji. W celu ściślejszej oceny są w użyciu metody polegające albo na pomiarze stężenia barwnika po uprzednim wyeluowaniu go z poszczególnych skrawków bibuły, albo też na bezpośrednim fotometrowaniu poszczególnych odcinków zabarwionego paska bibuły. Obydwa sposoby rozwinięto praktycznie w kilku modyfikacjach.

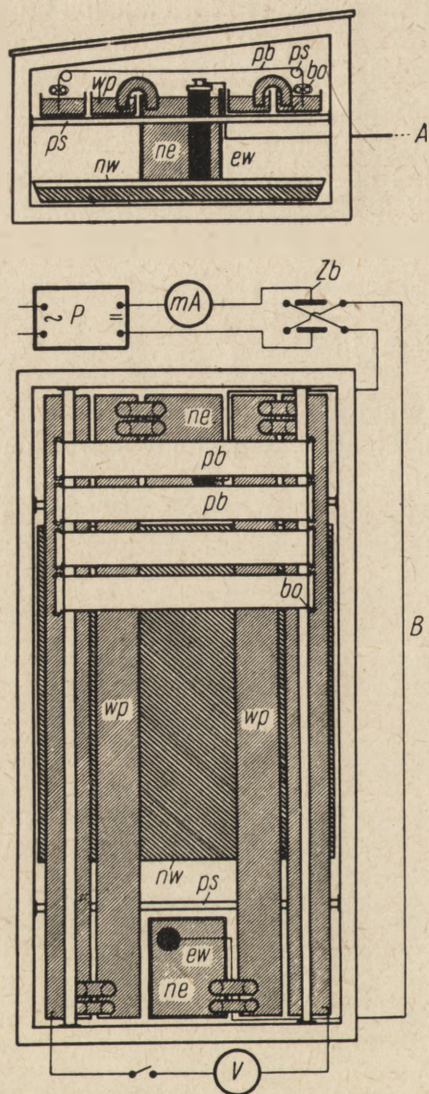
Część doświadczalna

K o m o r a w i l g o t n a. Zamkniętą przestrzeń, w której przeprowadzamy rozdział elektroforetyczny, stanowi oszklone akwarium o wymiarach 68×34 cm nakrywane płytą szklaną nachyloną o kilka stopni względem poziomu (rys. 1 i 2). W celu nasycenia komory parą wodną umieszczono w niej płaskie naczynie z wodą.



Rys. 1. Ogólny widok aparatury.

Do dwóch naczyń elektrodowych zawierających po 0,5 l roztworu buforowego dopływa prąd elektryczny przez elektrody węglowe posiadające dużą powierzchnię (80 cm^2). Naczynia elektrodowe są połączone z wanienkami pośrednimi, a te dopiero z wanienkami, do których są zanurzone końce pasków bibuły. Połączenia między tymi naczyniami stanowią rurki szklane w kształcie litery U wypełnione buforem. Końce tych rurek są zaopatrzone w błony z celofanu, co utrudnia konwekcję roztworu moderatorowego między naczyniami.



Rys. 2. Komora wilgotna, A: w przekroju, B: widok z góry i schemat połączeń, P — prostownik, mA — miliamperomierz, Zb — zmieniacz biegunów, V — woltomierz, ew — elektrody węglowe, ne — naczynia elektrodowe, wp — wanienki pośrednie, pb — paski bibuły, nw — naczynie z wodą, ps — pręty szklane, bo — bagietki obciążające paski bibuły.

Stwierdziliśmy, że stosowanie elektrolitycznych kluczy agarowych zawierających 1,5 M chlorek potasowy wpływa zakłócająco na przebieg rozdziału frakcji.

Cztery podłużne wanienki są wykonane z 1,5 mm płyty celuloidowej i posiadają wymiar $63 \times 4,5 \times 2,5$ cm. W połowie swojej wysokości są one wypełnione buforem, tak że cały układ mieści 2,5 — 3 l roztworu buforowego. Wanienki są ułożone w komorze na prętach szklanych. Doprowadzenie prądu do skrajnych wanienek odbywa się z dwóch przeciwległych końców, tak że różnica potencjałów dla każdego z 12 równolegle zawieszonych pasków bibuły jest jednakoowa. Pomiar napięcia przyłożonego do pasków odbywa się przy pomocy dwóch małych elektrod platynowych zanurzonych w skrajnych wanienkach i połączonych przez wyłącznik przyciskowy z woltomierzem.

Elektrody węglowe łączą się przez zmieniacz biegunów i miliamperomierz ze źródłem prądu stałego o napięciu około 300 V. Po każdej serii rozdziału elektroforetycznego zmienia się bieguny doprowadzające prąd elektryczny. Ważne jest również uprzednie każdorazowe wyrównanie poziomów roztworu buforowego we wszystkich naczyniach przy pomocy połączenia ich lewarkami.

Paski bibuły są zawieszane poziomo na grubych prętach szklanych przy czym ich końce, które za-

nurzają się do skrajnych wanienek z roztworem moderatorowym, obciąża się przy pomocy dwóch bagietek szklanych nieco dłuższych od szerokości paska. Końce tych bagietek łączy się gumkami.

Rozdział elektroforetyczny przeprowadzamy w temperaturze pokojowej. Stwierdziliśmy, że niższa temperatura otoczenia ($10 - 12^{\circ}$) nie wpływa w dostrzegalny sposób na uzyskiwanie lepszego rozdziału frakcji białkowych.

R o z t w ó r b u f o r o w y. W badaniach naszych stosujemy roztwór moderatorowy weronalowy o $\text{pH} = 8,60$ i mocy jonowej ($52 \mu = 0,10$, który sporządzamy następująco: 0,1 mola przekrystalizowanego weronalu (18,419 g) oraz 85,2 ml 1 N NaOH rozpuszczamy w gorącej wodzie i po ostygnięciu dopełniamy do 1000 ml.

W badaniach porównawczych stwierdziliśmy, że stosowanie buforu o mniejszej mocy jonowej ($\mu = 0,05$) jest powodem powstawania bardziej intensywnie zabarwionej smugi między rozdzielonymi frakcjami (ang. „trailing”). Smuga ta utrudnia następnie ilościową ocenę zawartości poszczególnych frakcji.

Ponieważ podczas elektroforezy ulega zmianie pH w naczyniach elektrodowych, dlatego uważamy za celowe takie początkowe dobranie odczynu buforu w tych naczyniach, aby w połowie czasu elektroforezy pH tych roztworów na skutek wtórnych reakcji elektrolizy zrównało się z wartością pH roztworu w wanienkach ($= 8,60$). Najprościej osiąga się to przepuszczając prąd elektryczny przez paski bibuły (bez surowicy) w czasie o połowę krótszym niż w przebiegu normalnego rozdziału.

Stosując zmianę biegunów prądu i wymieszanie buforów w wanienkach po każdej serii rozdziału białek można ten sam roztwór moderatorowy używać 15 — 20-krotnie.

Ze względu na wysoką cenę weronalu oplaca się odzyskiwanie go ze zużytego buforu: po silnym zakwaszeniu HCl i oziębieniu w lodówce można odsączyć wydzielony kwas dwuetylobarbiturowy i po przekrystalizowaniu ponownie używać. Odzyskuje się w ten sposób do 70% weronalu.

B i b u ł a. Przebadaliśmy przydatność do celów elektroforezy kilku gatunków bibuły, a mianowicie: Whatman nr 1, 4, 41, wszystkie gatunki Macherey-Nagel: nr 60, 61, 62, 63, 64, 214, 219, 819 e. h., Schleicher-Schüll nr 2043 b, Munktell nr 20 oraz niektóre bibuły produkcji krajowej. Najostrzej rozdzielone frakcje białek uzyskuje się na bibule Macherey-Nagel nr 61 oraz Whatman nr 1. Dobre wyniki można też uzyskać na bibułach Whatman nr 4, Schleicher-Schüll nr 2043 b oraz Macherey-Nagel nr 214, natomiast przy stosowanej przez nas metodyce nieodpowiednie są gatunki bibuły Macherey-Nagel nr 60, 62, 63, 819 e. h. jak również zbadane gatunki bibuły produkowane w kraju.

Szwedzka bibuła Munktell nr 20 ze względu na swoją grubość daje zbyt duże natężenie przepływającego prądu, co w następstwie wpływa na znaczne przesunięcia pH roztworu buforowego.

W opisywanych badaniach stosowaliśmy bibułę Macherey-Nagel nr 61 uznaną przez nas za najlepiej nadającą się do elektroforetycznego rozdzielania ciał białkowych. Stosujemy paski bibuły o wymiarach $32 \times 3,5$ cm.

Zwilżanie pasków bibuły roztworem buforowym. W szeregu różnych poczynionych prób doszliśmy do wniosku, że najlepszym, nie opisanym przez innych autorów sposobem zwilżania pasków bibuły jest zawieszanie w komorze wilgotnej suchych obciążonych bagietkami pasków, których końce zanurzają się do wanierek z buforem. Czas całkowitego zwilżenia jest zależny od gatunku bibuły. Dla bibuły Macherey-Nagel nr 61 wynosi on w wyżej opisanych warunkach około 60 minut.

Przy takim sposobie zwilżania może dochodzić, na skutek efektu chromatograficznego, do nagromadzenia się drobnych zanieczyszczeń na środku paska czyli w miejscu zetknięcia się frontów wessanej przez bibułę cieczy. Aby uniknąć tego, można stosować zwilżanie paska bibuły przez zanurzenie tylko jednego jego końca w buforze, a dopiero po jego całkowitym nawilżeniu, zanurzać drugi koniec. Przy postępowaniu takim nie stwierdziliśmy różnic w rozdziale frakcji białkowych w porównaniu z wyżej opisanym sposobem.

Optyczny efekt całkowitego zwilżenia paska bibuły (zetknięcie się frontów cieczy wessanej przez pasek) nie jest równoznaczny z zakończeniem wciągania roztworu buforowego przez pasek. Bibuła chłonie jeszcze przez dłuższy czas roztwór moderatorowy nasycając się nim w większym stopniu, a ponadto część roztworu paruje z powierzchni paska wzmagając ten efekt. Tę wędrówkę buforu skierowaną od końców paska bibuły ku środkowi łatwo jest wykazać umieszczając w różnych miejscach na pasku kroplę zabarwionej cieczy. Zjawisko to opisyują niektórzy autorzy jako „prąd wodny” (25) (niem. „Sog” (43)).

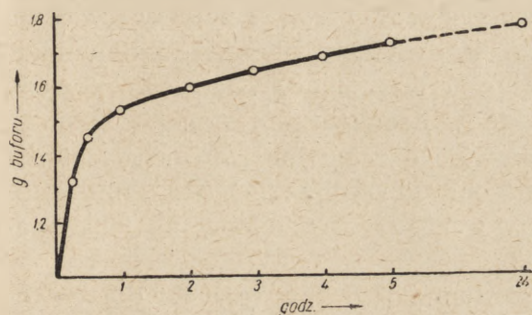
Ilościowo zbadaliśmy to zjawisko dla bibuły Macherey-Nagel nr 61 ważąc szereg zawieszonych w komorze wilgotnej pasków bibuły w różnych odstępach czasu (rys. 3).

Z rys. 3 widzimy, że w ciągu pierwszych kilkunastu minut bibuła mimo całkowitego zwilżenia wciąga jeszcze znaczne ilości buforu powodując tym samym ruch cieczy ku środkowi paska.

Przygotowanie roztworu badanego. W pracy niniejszej rozpatrujemy analizę elektroforetyczną płynów białkowych, których stężenie nie jest niższe od 1 — 2%. Do badania stosujemy płyny białkowe nie poddawane uprzednio dializie.

W celu wykazania, jakie zmiany obrazu elektroforetycznego zachodzą w normalnej surowicy podczas przechowywania jej w lodówce wykonywaliśmy odpowiednie oznaczenia codziennie przez okres 7 dni. W czasie tym nie stwierdziliśmy zmian w składzie frakcji elektroforetycznych białka surowicy.

W celu stwierdzenia, jakie jest optymalne stężenie roztworu białka poddanego rozdzielowi elektroforetycznemu wykonaliśmy po 4 równo-



Rys. 3. Ilość gramów roztworu buforowego wchłaniana przez pasek bibuły Macherey-Nagel nr 61 ($32 \times 3,5$ cm) w zależności od czasu t (licząc od $t = 0$ w chwili całkowitego zwilżenia)

ległe oznaczenia odsetkowej zawartości frakcji białkowych w surowicy nierozcieńczonej i w surowicy rozcieńczonej 3-krotnie roztworem buforowym. Podobne oznaczenia wykonaliśmy z mieszaniną elektroforetycznie czystych albumin (75%) i γ -globulin (25%) w różnych rozcieńczeniach. Bez względu na ilość białka wprowadzonego na pasek bibuły była we wszystkich przypadkach taka sama (około 0,15 mg). Średnie z uzyskanych wyników zawiera tablica 1.

Mniejsza odsetkowa ilość albumin otrzymywana dla wyższych stężeń białka jest spowodowana niedobarwieniem tej frakcji (Hardwicke, 21). Na podstawie tych wyników stosujemy do badania roztwo-

Tablica 1

Wpływ stężenia roztworu białka na efekt niedobarwienia frakcji albuminowej

Materiał	% białka	Objętość μ l	Zawartość frakcji w % względnych (białko całkowite = 100 %)				
			Albuminy	Globuliny			
				α_1	α_2	β	γ
Surowica nierozcieńczona	7,2	2,0	41,1	4,7	10,9	12,3	25,0
Surowica rozcieńczona 3x buforem	2,4	6,0	51,8	4,8	11,2	11,9	21,7
Mieszanina albumin (75 %) i γ -globulin (25 %)	10,0	1,5	68,0	—	—	—	32,0
	5,0	3,0	72,2	—	—	—	27,8
	3,0	5,0	74,0	—	—	—	26,0
	1,0	15,0	74,3	—	—	—	25,7

ry, które nie zawierają więcej niż 2% albumin. Bardziej stężone roztwory (surowice) rozcieńczamy odpowiednio tym samym roztworem buforowym, który jest używany przy rozdziale elektroforetycznym.

Bufor stosowany do rozcieńczania surowicy zawiera małą ilość błękitu bromofenolowego. Nakładanie zabarwionego roztworu białka na bibułę w znacznym stopniu ułatwia równomierne rozprowadzenie go w postaci wąskiego paska. Stosowany przez nas w tych warunkach barwnik wiąże się z albuminami uwidoczniając w ten sposób ich wędrówkę. Nadmiar barwnika niezwiązanego przez albuminy wędruje również do anody z szybkością około dwa razy większą od albumin.

Stwierdziliśmy, że dodatek błękitu bromofenolowego nie posiada żadnego wpływu na wartości wyników ilościowych.

W praktyce rozcieńczamy surowice o normalnej zawartości białka w stosunku 0,1 ml surowicy i 0,2 ml zabarwionego buforu weronalo-wego. Z tak rozcieńczonego roztworu białka nakładamy na jeden pasek 6 μ l.

W każdej surowicy oznaczamy uprzednio zawartość białka całkowitego fotometrycznie stosując reakcję biurętową (51).

Wy b ó r l i n i i s t a r t o w e j. W oparciu o wyniki zawarte na rys. 3 oraz o próby doświadczalne wybraliśmy czas nakraplania roztworu białka około 1 godziny licząc od chwili całkowitego zwilżenia pasków bibuły.

Podobnie doświadczalnie przekonaliśmy się, że najlepszy rozdział uzyskuje się wtedy, gdy γ -globuliny pozostają w miejscu makroplenia. Dzieje się tak wówczas, gdy punkt startowy znajduje się w odległości kilku cm od środka paska w kierunku katody. W naszych warunkach uzyskujemy optymalny rozdział obierając linię startową w odległości 3 cm od środka paska w kierunku katodowym.

S p o s ó b n a k ł a d a n i a r o z t w o r u b i a ł k a. Do nakładania badanego roztworu na pasek bibuły używamy rurki włoskowej stosowanej do oznaczania temperatury topnienia. Kapilarę długości około 10 cm i średnicy około 0,4 — 0,7 mm kalibrujemy uprzednio przy pomocy wody na wadze analitycznej zaznaczając następnie objętość odpowiadającą 6 μ l (co powinno odpowiadać 3 — 5 cm długości kapilary). Kapilara powinno być na końcu nieco wyciągnięta i obtopiona.

Po naciągnięciu do kapilary roztworu białka rozcieńczonego zabarwionym buforem nakłada się go na zawieszony w komorze wilgotnej paski bibuły przez szczelinę między dwiema nakrywającymi płytami szklanymi na uprzednio zaznaczone ołówkiem (na brzegach paska) miejsce. Przez kilkakrotne równomierne przesuwanie końcem kapilarki po linii startowej wprowadzamy odmierzoną ilość cieczy na pasek bibuły.

Pasemko nakładanego roztworu powinno być odległe od brzegów bibuły co najmniej 6 — 7 mm. Szerokość plamki nie powinna przekraczać 3 — 4 mm.

W celu ustalenia równowagi w nasyceniu parą wodną zamykamy obwód prądu elektrycznego nie prędzej niż po upływie 1 godziny od chwili szczelnego zamknięcia komory wilgotnej.

N a p i ę c i e i c z a s e l e k t r o f o r e z y. W badaniach porównawczych stwierdziliśmy, że zbyt wysokie jak również zbyt niskie natężenie prądu elektrycznego nie sprzyja ostrości uzyskanego obrazu elektroforetycznego. W naszych warunkach rozdział elektroforetyczny trwa 13 godzin przy różnicy potencjałów między końcami pasków około 140 V, co odpowiada spadkowi napięcia na paskach około 4,5 V na 1 cm długości. Natężenie prądu elektrycznego przepływającego przez 12 równoległych pasków bibuły wynosi 6 — 8 mA, co odpowiada około 0,17 mA na 1 cm szerokości paska bibuły. Frakcje białkowe są rozdzielone na odcinku około 8 cm.

S u s z e n i e p a s k ó w b i b u ł y. Po wyłączeniu prądu wszystkie 12 pasków wyjmujemy z komory wilgotnej równocześnie za pomocą uprzednio założonej ramki z prętów szklanych. Całość umieszczamy na specjalnym statywie w ten sposób, aby więcej nawilżone końce pasków bibuły dotykały suchej bibuły. Ponadto końce te osuszamy suchymi skrawkami bibuły. Czynność ta ma na celu niedopuszczenie do szybszego wyschnięcia części środkowej paska bibuły, co pociągałoby za sobą wędrówkę buforu z końców pasków i przesuwanie tym samym skrajnych frakcji ku środkowi. Stwierdziliśmy, że postępowanie to warunkuje dobry przestrzenny rozdział albumin od α_1 -globulin. Ostatecznie suszymy paski przez pozostawienie ich na 3 — 4 godziny w temperaturze pokojowej.

Stwierdziliśmy, że suszenie wilgotnych pasków w 105° wpływa ujemnie na powtarzalność wyników.

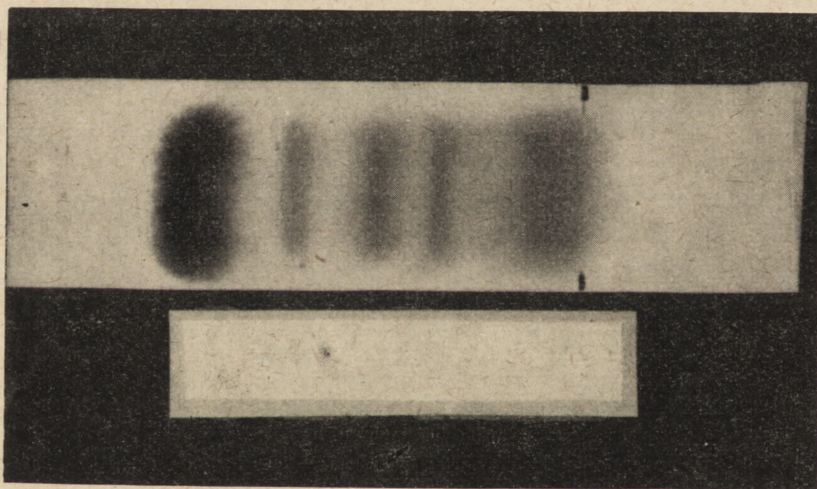
B a r w i ę n i e. Wysuszone paski bibuły z rozdzielonymi frakcjami białkowymi barwimy przez 30 minut 0,1% roztworem błękitu bromofenolowego w etanolu zawierającym 10% chlorku rtęciowego. Odbarwianie miejsc bibuły wolnych od białka odbywa się przez 5 — 7-krotne wymywanie 0,5% roztworem kwasu octowego w czasie 40 — 60 minut w płaskiej waniencie fotograficznej. Poza odcinkiem drogi przebyłym przez białko pasek bibuły jest zupełnie biały bez śladów barwnika.

Wykazaliśmy, że na wyniki ilościowe nie wywierają wpływu nawet dość znaczne odchylenia od tych standartowych warunków bar-

wienia, jak np. przedłużenie czasu barwienia do 24 godzin, niewielkie zmiany stężenia barwnika (0,05 — 0,2%), przedłużenie czasu odbarwiania do kilku godzin. Poza tym również przy stosowaniu błękitu brofenołowego pochodzącego z różnych wytwórni (radz. „Irjea“, niem. „Merck“ oraz „Bayer“) nie wykazaliśmy różnic w stosunku odsetkowym frakcji.

W miarę wielokrotnego stosowania tego samego roztworu do barwienia pasków bibuły ulega on stopniowej alkalizacji pod wpływem weronalanu sodowego pozostałego po wysuszeniu buforu w bibule. Uwidacznia się to ściemnieniem roztworu. Barwienie takim roztworem również nie powoduje niepożądanych zmian wyników odsetkowych. Niemniej roztwór ten należy co pewien czas zakwaszać kwasem solnym, aby nie dopuścić do wytrącania się zasadowych soli rtęciowych.

Mokre paski bibuły rozkładamy w celu wysuszenia na płycie szklanej w miejscu ciepłym i przewiewnym. Po wysuszeniu wprowadzamy paski na chwilę do atmosfery gazowego amoniaku; poszczególne frakcje białkowe przedstawiają się wówczas jako błękitne pasemka na białym tle bibuły (rys. 4).



Rys. 4. Frakcje białka surowicy krwi człowieka zdrowego rozdzielone elektroforetycznie na bibule i zabarwione.

Ilościowa interpretacja elektrofogramów. Do celów ilościowego oznaczania zabarwionych frakcji białkowych rozdzielonych elektroforetycznie na bibule zastosowaliśmy elucję barwnika związanego z białkiem w poszczególnych rozdzielonych frakcjach. Na pasku bibuły z zaznaczonymi wyraźnie poszczególnymi zabarwionymi frakcjami białka kreślimy lekko ołówkiem granicę rozdzia-

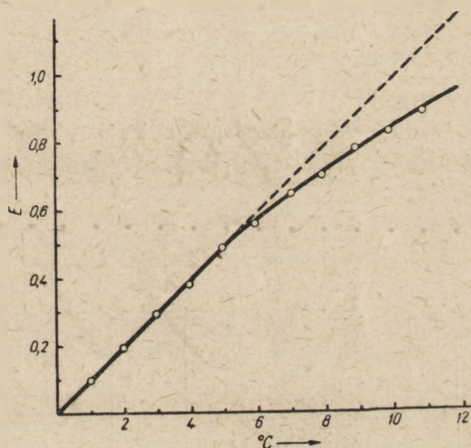
łu i odcinamy odpowiednie skrawki. Błękit bromofenolowy związany z białkiem w tych skrawkach poddajemy następnie elucji przy pomocy 12 ml 2% roztworu węgla sodowego w 50% metanolu bezpośrednio w probówkach do fotometrowania. Po upływie 2 godzin przy kilkakrotnym mieszaniu roztworu usuwamy uwolnione od barwnika skrawki bibuły i wykonujemy pomiar ekstynkcji niebieskiego roztworu dla długości fali światła $\lambda = 595 \text{ m}\mu$ (maksimum absorpcji). Próbę ślepą (ekstynkcja = 0) stanowi analogiczny eluat z niezabarwionego skrawka bibuły. Wartości ekstynkcji dla próby ślepej nie różniły się od ekstynkcji dla czystego roztworu stosowanego do desorpcji barwnika. Pomiar ekstynkcji wykonujemy przy pomocy spektrofotometru Colemana w probówkach średnicy 2,2 cm sprawdzonych pod względem optycznej jednorodności.

Stwierdziliśmy, że ekstynkcja roztworu, do którego wprowadzono na pewien czas skrawki czystej stosowanej przez nas bibuły, nie ulega zmianie. Świadczy to, że w danych warunkach nie zachodzi adsorpcja barwnika przez włókna bibuły.

W celu przekonania się, czy mierzona ekstynkcja roztworu jest proporcjonalna do stężenia barwnika wykonaliśmy odpowiednie pomiary, których wyniki przedstawia rys. 5.

Z rys. 5 widzimy, że do roztworu błękitu bromofenolowego w płynie służącym do elucji (2% Na_2CO_3 w 50% CH_3OH) prawo Beer'a stosuje się jedynie w niskich stężeniach. W opisanych warunkach pomiaru fotometrycznego powyżej wartości ekstynkcji $E = 0,5$ nie zachodzi już prosta proporcjonalność między stężeniem a ekstynkcją roztworu. Okoliczność ta zmusza do wprowadzania poprawek dla wartości ekstynkcji przekraczających 0,5, których można dokonać łatwo w oparciu o rys. 5, albo też bardziej stężone roztwory należy rozcieńczać w ten sposób, aby ich ekstynkcja była niższa od $E = 0,5$, uwzględniając w obliczeniach stopień rozcieńczenia.

Należy podkreślić, że przy ilościach białka podanych w wyżej opisanej metodyce rzadko otrzymujemy przy fotometrowaniu eluatów wartości ekstynkcji wyższe od $E = 0,5$.



Rys. 5. Zależność ekstynkcji E od stężenia błękitu brofopenolowego c (w jednostkach względnych).

Następne zagadnienie stanowiła proporcjonalność między stężeniem barwnika, a ilością białka. Już z tablicy 1 wynika, że przy wyższych stężeniach albumin zachodzi ich niedobarwienie.

Badania te (tabl. 2) wykonaliśmy posługując się roztworem elektroforetycznie czystych albumin w różnych dokładnie oznaczonych stężeniach. Ilości poszczególnych roztworów nakraplanych na paski bibuły były dokładnie określone z różnicy ciężaru kapilary przed i po nałożeniu roztworu albumin. Każdy roztwór nakładano raz w jednej wąskiej linii startowej (tabl. 2, nr 7 — 12), drugi raz na dużo większej powierzchni paska bibuły (tabl. 2, nr 1 — 6). Zachowaliśmy takie same warunki badania jak w rozdziale elektroforetycznym, jednakże bez przepływu prądu elektrycznego.

Po wysuszeniu paski bibuły normalnie zabarwiliśmy mierząc następnie powierzchnie zajęte na paskach bibuły przez poszczególne barwne plamki albumin. Elucji barwnika dokonano przy pomocy różnych objętości 2% Na_2CO_3 w 50% CH_3OH dostosowanych do ilości wprowadzonego białka. Miało to na celu uniknięcie odchyień od prawa Beer'a zachodzących przy większych stężeniach błękitu bromofenolowego. Zmierzoną wartość ekstynkcji przeliczyliśmy następnie na ekstynkcję $E_{(12)}$ odniesioną do objętości 12 ml eluatu uwzględniając stopień rozcieńczenia. Wyniki tych badań przedstawia tablica 2.

Tablica 2

Zależność ekstynkcji od ilości albumin oraz od powierzchni zajmowanej przez nie na bibule

Nr	Stężenie albumin %	Ilość nałożonego roztworu mg	Q Ilość albumin na pasku μg	P Pole plamki albumin mm^2	Q/P Stopień zagęszczenia $\frac{\mu\text{g}}{\text{mm}^2}$	V Objętość eluatu ml	E Zmierzona ekstynkcja	$R_{(12)}$ Ekstynkcja w przeliczeniu na 12 ml eluatu	Stosunek $\frac{E_{(12)}}{Q}$
1	0,50	6,67	33,3	906	0,037	12	0,113	0,113	0,00340
2	0,99	6,68	66,1	806	0,082	12	0,233	0,233	0,00353
3	1,41	6,78	95,7	770	0,124	24	0,164	0,328	0,00343
4	1,89	6,87	180	1045	0,124	36	0,155	0,465	0,00358
5	2,95	6,56	194	792	0,211	48	0,179	0,716	0,00369
6	4,53	7,22	327	1188	0,275	60	0,250	1,250	0,00383
7	0,50	10,27	51,3	247	0,208	12	0,178	0,178	0,00347
8	0,99	6,70	66,3	323	0,205	12	0,242	0,242	0,00365
9	1,41	6,60	93,2	303	0,307	24	0,163	0,326	0,00350
10	1,89	6,69	127	392	0,325	36	0,142	0,426	0,00335
11	2,95	6,92	204	336	0,608	48	0,161	0,644	0,00315
12	4,53	6,92	314	372	0,845	60	0,152	0,760	0,00242

Z tablicy 2 można odczytać, że albuminy ulokowane na bibule wiążą proporcjonalną ilość błękitu bromofenolowego, o ile nie jest za wysoki ich stopień zagęszczenia przypadający na jednostkę powierzchni bibuły. Proporcjonalność ta jest zachowana, gdy na 1 mm² powierzchni bibuły nie przypada więcej niż 0,3 µg albumin.

Analogiczne pomiary wykonaliśmy również stosując odpowiednio rozcieńczoną surowicę. Wykazaliśmy, że proporcjonalność między ilością całkowitego białka a ilością związanego przez nie barwnika jest prosta, o ile na 1 mm² powierzchni bibuły (Macherey-Nagel nr 61) nie przypada więcej niż 0,3 µg białka.

Różnica ilości błękitu bromofenolowego związanego przez albuminy i γ -globuliny. Doświadczalnie sprawdziliśmy stopień wiązania barwnika przez poszczególne frakcje białkowe na przykładzie albumin i γ -globulin.

Na paski bibuły nałożyliśmy zważone ilości roztworów albumin i γ -globulin o dokładnie znanym stężeniu. Stopień zagęszczenia nie przekraczał w obu przypadkach 0,3 µg białka na 1 mm² powierzchni bibuły. Po normalnym zabarwieniu i elucji obliczono (tabl. 3), że średnio γ -globuliny w tych samych warunkach wiążą około 5% mniej błękitu bromofenolowego aniżeli albuminy.

Tablica 3

Wiązanie błękitu bromofenolowego przez albuminy i γ -globuliny

Roztwór	Ilość nakrop- lonego roz- tworu mg	Q Ilość białka na pasku µg	E Zmierzona ekstynkcja	Stosunek $\frac{E}{Q}$	Średnio $\frac{E}{Q}$
1,02 % albu- min	7,63	78,0	0,275	0,00353	0,00353
	7,97	81,3	0,283	0,00348	
	7,35	75,0	0,270	0,00360	
	7,22	73,7	0,260	0,00353	
1,28 % γ -glo- bulin	7,26	93,1	0,315	0,00338	0,00335
	7,42	95,2	0,318	0,00334	
	7,28	93,4	0,315	0,00337	
	7,11	91,2	0,300	0,00329	

różnica: 0,00018

czyli γ -globuliny wiążą około 5% mniej błękitu bromofenolowego niż albuminy.

O b l i c z a n i e. Przy założeniu, że są spełnione wyżej omawiane proporcjonalności obliczenie procentowego składu poszczególnych

frakcji białkowych jest proste: przyjmując sumę ekstynkcji dla wszystkich frakcji za 100% oblicza się procentowy udział poszczególnych frakcji na podstawie wielkości odpowiednich ekstynkcji.

Możliwość pomiarów przy użyciu zwykłego kolorymetru. W toku badań wykazaliśmy, że w przypadku nieposiadania fotometru można również uzyskać zadawalające rezultaty posługując się zwykłym kolorymetrem typu Dubosq'a bez użycia specjalnych roztworów wzorcowych. Poszczególne eluaty porównuje się wówczas kolejno w kolorymetrze z odpowiednim roztworem tegoż barwnika o dowolnym nieznanym stężeniu. Dokładność pomiaru jest większa, gdy wartość stężenia roztworu porównawczego będzie pośrednia między minimalną i maksymalną odpowiednią wartością dla eluatów.

Jeżeli oznaczymy grubość warstwy roztworu porównawczego przez w , a eluatów przez e przy zrównaniu barw w kolorymetrze, to odpowiednie ilorazy w/e mają się tak do siebie, jak procentowy skład poszczególnych frakcji białkowych. Dla ilustracji przytaczamy w tablicy 4 przykład obliczenia na podstawie subiektywnego pomiaru kolorymetrycznego oraz porównanie z obiektywnym pomiarem fotometrycznym. Ilorazy w/e oznaczają stosunek wysokości warstwy roztworu porównawczego do grubości warstwy poszczególnych eluatów.

Tablica 4

Przykład kolorymetrycznego oznaczania eluatów oraz porównanie z pomiarem fotometrycznym

	Albuminy	Globuliny			
		α_1	α_2	β	γ
Stosunek grubości warstw $w:e$	$\frac{40}{19,3} = 2,07$	$\frac{5}{34,2} = 0,146$	$\frac{10}{32,0} = 0,312$	$\frac{10}{47,5} = 0,210$	$\frac{25}{17,2} = 1,452$
Suma		4,190			
% (kolorym.)	49,3	3,5	7,4	5,0	34,8
% (fotometr.)	49,8	2,5	7,3	4,0	36,4

Odczynnik stosowany do elucji błękitu bromofenolowego można łatwo regenerować przez adsorpcję barwnika na węglu drzewnym; przesącz po oddzieleniu węgla jest zupełnie bezbarwny.

Powtarzalność wyników. W celu ustalenia powtarzalności wyników stosowanej metody wykonaliśmy elektroforetyczny rozdział białek na 25 paskach bibuły dla tej samej surowicy patologicznej. Tablica 5 przedstawia statystyczne ujęcie uzyskanych wartości.

Średnie odchylenie wynosi od 0,5 do 1,5, dlatego też uważamy, że

wyrażanie odsetkowego składu frakcji wydaje się słuszne z dokładnością nie większą niż 0,5%, gdy wykonano tylko pojedyncze oznaczenie.

Tablica 5
Oznaczenie powtarzalności wyników

	Albu- miny	Globuliny			
		α_1	α_2	β	γ
Średnia arytmetyczna z 25 oznaczeń	32,7	4,2	8,0	12,4	42,7
Średnie odchylenie	0,9	0,5	1,0	0,9	1,5
Średnie odchylenie średniej arytmetycznej	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3
Względny % błędu dla pojed. oznacz.	2,8	11,9	12,5	7,3	3,5

S p r a w d z e n i e m e t o d y. Dokładność stosowanej metody sprawdziliśmy dla frakcji albuminowej dodając do analizowanej równolegle surowicy znaną ilość krystalicznej, elektroforetycznie czystej albuminy. Preparat krystalicznej albuminy uprzednio zanalizowany wykazał zawartość 89,0% albuminy i 11% wody. W tablicy 6 zawarte są średnie wyniki sprawdzenia metody z 4 równoległych oznaczeń. Białko całkowite oznaczyliśmy na podstawie reakcji biuretowej (51).

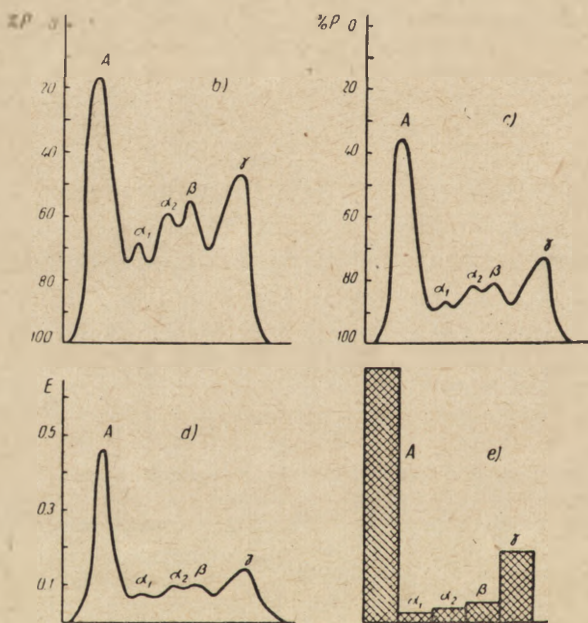
Tablica 6
Sprawdzenie dokładności stosowanej metody

	Białko całkowite % wag.-obj.	Zawartość albumin znaleziona przy pomocy elektroforezy na bibule	
		% względ.	% wag.-obj.
4,50 ml surowicy + 100,0 mg 89,0 % albuminy ad 5,00 ml 0,9 % NaCl	7,75	47,8	3,70
4,50 ml surowicy + 0,50 ml 0,9 % NaCl	5,97	32,7	1,95
Dodano % albumin:	1,78	—	—
Znaleziono % albumin:	—	—	1,75

Błąd w odnalezieniu dodanej ilości albumin: 0,03 czyli w % względnych: 1,7%.

Porównanie z innymi sposobami ilościowej oceny elektroforogramów oraz z metodą Tiseliusa. Ze względu na stosowany przez wielu autorów sposób oceniania elektroforogramów na drodze bezpośredniego ich fotometrowania podjęliśmy badania mające na celu porównanie wyników otrzymywanych różnymi sposobami dla równoległych prób. Ograniczyliśmy się w tym przypadku do porównania trzech surowic ludzi zdrowych *).

W tym celu zbudowaliśmy automatycznie działające urządzenie do fotometrowania elektroforogramów w sposób ciągły. Wykorzystaliśmy do tego układ rejestrujący polarografu Heyrowsky'ego przystosowując go jednocześnie do synchronicznego przesuwania elektroforogramu na



Rys. 6. Krzywe elektroforetyczne dla białka surowicy I uzyskane: a) przy pomocy elektroforezy swobodnej, b) przez bezpośrednie fotometrowanie elektroforogramu na bibule, c) przez fotometrowanie tego samego paska po kąpieli w mieszaninie parafiny i α -bromonaftalenu, d) po przeliczeniu wartości przezroczystości P krzywej c na ekstynkcję E oraz e) diagram narysowany na podstawie wyników metody elucji barwnika (wartości liczbowe w tabl. 7).

*) Badania na większym materiale mające na celu porównanie stosowanej przez nas metody z elektroforezą swobodną u ludzi zdrowych i chorych będą tematem następnego doniesienia.

bibule między źródłem światła monochromatycznego ($\lambda = 590$ m) zasilanym z akumulatora, a fotoogniwem (L a n g e S 28). Oświetlona szczelina, przed którą przesuwa się pasek bibuły, posiada wymiar 25×1 mm.

Prąd fotoelektryczny zależny od przezroczystości paska jest automatycznie rejestrowany na papierze fotograficznym przy pomocy galwanometru lusterkowego polarografu. Krzywe uzyskane w ten sposób przedstawiają absorpcję światła w zależności od odcinka drogi przebytej przez poszczególne frakcje białek.

Według Grassmanna i Hanniga (19) przy fotometrowaniu elektroforogramów należy poddać je uprzednio kąpeli w mieszaninie parafiny

Tablica 7

Porównanie różnych metod interpretacji ilościowej elektroforogramów białka na bibule z elektroforezą klasyczną Tiseliusa dla 3 surowic ludzi zdrowych

	Ilość po- mia- rów	Frak- cje	Surowica		
			I	II	III
% białka całkowitego			6,9	7,3	6,4
Elektroforeza swobodna, aparat Fokal F, krzywa zstępująca	1	A	64,7	58,6	58,7
		a_1	4,2	6,2	5,3
		a_2	9,3	9,6	10,3
		β	9,9	15,0	11,0
		γ	11,9	10,6	14,7
Obliczono z krzywej absorpcji światła uzyskanej przez bez- pośrednie fotometrowanie elek- troforogramu	2	A	34,1	33,5	32,4
		a_1	8,0	7,9	8,9
		a_2	15,0	11,6	12,4
		β	16,0	18,1	16,8
		γ	26,9	28,9	29,5
Obliczono z krzywej absorpcji światła uzyskanej przez foto- metrowanie elektroforogramu po kąpeli w parafinie i α -bro- monaftalenie	2	A	43,6	37,8	42,8
		a_1	7,4	6,9	7,0
		a_2	12,7	10,6	11,7
		β	11,6	17,8	17,1
		γ	24,7	26,9	21,4
Obliczono z krzywej ekstynk- cji uzyskanej przez fotometro- wanie elektroforogramu po ką- peli w parafinie i α -bromonaf- talenie	2	A	49,0	40,7	47,1
		a_1	6,2	7,0	6,2
		a_2	11,4	10,5	11,2
		β	10,1	17,6	16,2
		γ	23,3	24,2	19,3
Obliczono na drodze fotome- trycznych pomiarów stężenia barwnika wyeluowanego z po- szczególnych frakcji białko- wych	6	A	69,2	63,0	62,0
		a_1	2,9	3,0	3,7
		a_2	4,0	6,1	6,3
		β	5,0	7,7	6,5
		γ	18,9	20,2	21,5

i α -bromonaftalenu o współczynniku załamania światła $n = 1,51$, aby uzyskać maksymalną przezroczystość bibuły. W celu wykazania różnic między wynikami uzyskanymi przez fotometrowanie elektroforogramów suchych oraz zwilżonych wymienioną mieszaniną wykonaliśmy odpowiednie pomiary dla tych samych pasków bibuły. Uzyskane krzywe przedstawia rys. 6 *bc*, a wyniki liczbowe zawiera tablica 7.

Ponieważ opisana wyżej aparatura rejestruje krzywe przezroczystości elektroforogramów, dlatego też przeliczyliśmy je ponadto na odpowiednie krzywe ekstynkcji (rys. 6 *d*), które (pod warunkiem zachowania prawa Beer'a) są proporcjonalne do stężenia barwnika.

Dla badanych surowic wykonano również oznaczenia przy pomocy elektroforezy swobodnej na aparacie Fokal F**). Pomiary te wykonaliśmy przy użyciu tego samego roztworu buforowego, który stosowano przy metodzie bibułowej, jednakże w temperaturze 8°. Wyniki tych badań porównawczych zawiera tablica 7.

Zawartość frakcji białkowych w surowicy zdrowych ludzi. W celu wykazania, jakie odsetkowe wartości poszczególnych frakcji białkowych uzyskuje się przy pomocy stosowanej przez nas metody w surowicy krwi ludzi zdrowych zanalizowaliśmy 27 surowic normalnych. Pochodziły one od mężczyzn i kobiet w wieku 20 — 35 lat. Wyniki są statystycznie ujęte w tablicy 8.

Tablica 8

Zawartość frakcji białkowych w surowicy zdrowych ludzi

	Albu- miny	Globuliny			
		α_1	α_2	β	γ
Średnio	61	4	7,5	8	19,5
Średnie odchylenie	6	1	2	2	2,5

Ilość zbadanych zdrowych ludzi: 27.

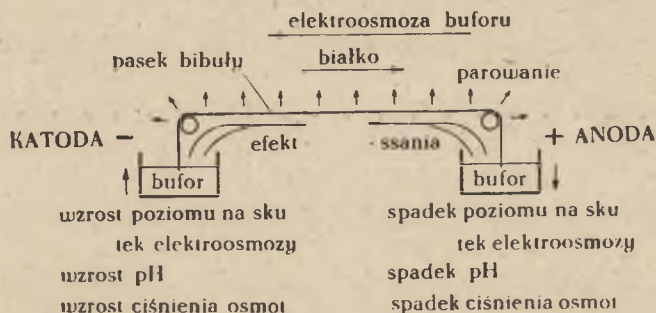
Omówienie wyników

Ilościowe oznaczanie frakcji białkowych za pomocą elektroforezy na bibule można podzielić na dwa etapy: dokonanie przestrzennego rozdziału frakcji oraz ilościowe ich określenie. Warunkiem przystąpienia do ilościowej interpretacji jest uzyskanie wyraźnego rozdziału poszczególnych frakcji, co jest zależne od wielu czynników.

**) Oznaczenia te wykonała doc. dr A. Smoczkiwiczowa w II Klinice Chorób Wewnętrznych AM w Poznaniu, za co składam jej również na tym miejscu serdeczne podziękowanie.

Proces elektroforetycznego rozdziału ciał białkowych na bibule powinien przebiegać w warunkach uniemożliwiających znaczniejsze parowanie wody z paska bibuły zwilżonego roztworem buforowym. W praktyce spotykamy dwa sposoby zachowania tego warunku. Pierwszy polega na umieszczeniu paska bibuły między płytkami szkła i zanurzeniu całości w cieczy nie mieszającej się z wodą, najczęściej w chlorobenzenie (C r e m e r i T i s e l i u s, 7) względnie też na bezpośrednim zanurzeniu bibuły w chlorobenzynie (C o n s d e n i S t a n i e r, 6), który jest w tych przypadkach czynnikiem chłodzącym. Inny sposób prostszy i dlatego częściej stosowany polega na umieszczeniu paska bibuły w tzw. „komorze wilgotnej” (W i e l a n d i F i s c h e r, 48), czyli w przestrzeni nasyconej parą wodną.

Pierwszy sposób ze względu na dobry efekt chłodzenia pozwala na stosowanie wyższego napięcia, a tym samym krótszego czasu elektroforezy, jednakże zetknięcie się białka ze szkłem lub bezpośrednio z chlorobenzynem jest w tym przypadku powodem nieco mniej wyraźnego rozdziału frakcji. Z tych głównie względów większość autorów stosuje modyfikację z komorą wilgotną.



Rys. 7. Schemat zjawisk zachodzących w czasie elektroforezy bibułowej.

Przy stosowaniu tej modyfikacji zachodzi równolegle szereg procesów obok zasadniczego dla rozdziału elektroforetycznego zjawiska wędrówki elektrycznie naładowanych cząstek koloidowych. Najistotniejsze są tu przesunięcia roztworu buforowego w pasku bibuły będące wynikiem nasiąkania bibuły, elektroosmozy jak również częściowego parowania. Niektóre z ubocznych zjawisk stale towarzyszące elektroforezie bibułowej są wynikiem elektrolizy roztworu moderatorowego zachodzącej pod wpływem przepływającego prądu elektrycznego.

Zjawiska te ilustruje schematycznie rys. 7.

Należy oczywiście podkreślić, że nasilenie tych zjawisk ulega zmianom w toku trwania elektroforezy.

Środkowa część paska bibuły jest obszarem, gdzie nie zachodzą większe zmienne przesunięcia cieczy. Frakcje białek na tym odcinku są najmniej narażone na zakłócenia pochodzące głównie z tzw. efektu ssania. Z tego więc względu jest pożądane, aby rozdział zachodził w środkowej części paska.

Biorąc pod uwagę nierównomierne przesunięcia roztworu buforowego w różnych odcinkach paska bibuły należy sądzić, że bezpośrednie oznaczenia ruchliwości cząsteczek w polu elektrycznym mogą być obarczone błędem, gdy nie są uwzględnione opisane wyżej zjawiska (42).

Komora wilgotna powinna zapewniać jednostajne nasycenie zamkniętej przestrzeni parą wodną. Z tego też względu niepożądane są większe zmiany temperatury otoczenia przekraczające 2 — 3°. Drobne nieszczelności komory powodują miejscowe niedosycenia wewnętrznej atmosfery parą wodną wyrównywane z kolei przez wzmożone parowanie roztworu buforowego z najbliższych pasków bibuły. W następstwie prowadzi to do przesunięć cieczy w pasku bibuły a tym samym do rozmazania rozdzielanych frakcji.

Aby nie powodować większych zakłóceń w nasyceniu parą wodną uznaliśmy za stosowne nakładanie surowicy na zwilżone paski bibuły zawieszony w komorze wilgotnej przez wąską szczelinę między dwiema płytkami szklanymi nakrywającymi w tym czasie komorę.

Pasek bibuły może być zawieszony na jednym pręcie w sposób „daszkowy” (D u r r u m, 11, F l y n n i d e M a y o, 15), albo na dwóch prętach w ten sposób, aby środkowa jego część była pozioma (G r a s s m a n n i H a n n i n g, 19). Drugi sposób posiada tę zaletę, że wówczas białko w swojej wędrówce na bibule nie styka się ze szkłem, co na skutek adhezji roztworu może dawać mniej ostre rozdziały frakcji.

Najdogodniej jest stosować elektrody platynowe. Elektrody węglowe ulegają stopniowemu rozpylaniu w roztworze. Zastosowane przez nas błony celofanowe oddzielają roztwór w naczyniu elektrodowym od reszty układu zabezpieczając bufor w wanienkach przed zanieczyszczeniem go węglem rozpylanym z elektrod węglowych.

Przy zbyt małej powierzchni elektrod dochodzi w trakcie elektrolizy buforu do tak znacznego wydzielania się na anodzie kwasu dwuetylobarbiturowego, że zajmuje on znaczną powierzchnię elektrody utrudniając przepływ prądu elektrycznego. Obserwuje się wówczas znaczny spadek napięcia i natężenia prądu. Odpowiednio duża powierzchnia elektrod zapobiega tym niepożądanym zjawiskom. W przybliżeniu można określić, że na każdy 1 mA natężenia prądu przepływającego przez układ wystarczy w tym celu około 10 cm² powierzchni elektrody.

Podobnie w świetle przeprowadzonych badań porównawczych, rozdzielanie frakcji elektroforetycznych w niższej temperaturze (8 — 12°) (19) nie wydaje się konieczne. Wniosek ten potwierdzają również inni autorzy (43).

Z wielu stosowanych przez różnych badaczy buforów najbardziej przydatnym do celów elektroforezy białek krwi okazał się bufor weronalowy (17, 29). Według *Antweiler*a (1) powinien on zawierać jak najmniejszą różnorodność jonów wykluczając w zasadzie jony wyżej wartościowe. Sporządzanie roztworu moderatorowego z weronalanu sodowego i kwasu solnego wprowadza niepotrzebnie do układu znaczną ilość jonów Cl^- i dlatego uważamy, że słuszniej jest wychodzić z kwasu dwuetylobarbiturowego zobojętnionego w odpowiednim stopniu ługiem sodowym. Ponadto weronal w przeciwieństwie do jego soli sodowej daje się łatwo oczyścić przez krystalizację z wody.

Optymalne pH dla elektroforetycznego rozdziału białek surowicy krwi podają różni autorzy na 8 — 9 (*Dittmer*, 9), przyczem najczęściej stosowany jest bufor o $\text{pH} = 8,6$ (2).

Większa rozbieżność zdań zachodzi w stosowaniu wartości mocy jonowej μ roztworu buforowego (52). Najczęściej spotykamy tu wartości $\mu = 0,05$ oraz 0,1. Przy mniejszej mocy jonowej cząsteczki białka wędrują szybciej w polu elektrycznym (29), natomiast przy większej mocy jonowej jest mniejszy efekt adsorpcji białka przez włókna bibuły. Efekt ten polegający na zostawianiu śladu w postaci smugi (ang. „trailing”, 21, 29) ciągnącej się za wędrującą frakcją dotyczy głównie albumin i, jak stwierdziliśmy, jest dużo mniejszy przy wyższych stężeniach jonowych roztworu moderatorowego, co pozostaje w zgodzie ze spostrzeżeniami innych autorów (*MacKay* i in., 29).

Podobnie stosowanie zbyt wysokich stężeń jonowych $\mu = 0,2 — 0,3$) może powodować wytrącanie się białka (*Martin* i *Franklen*, 30).

Z tych względów stosowanie roztworu buforowego o mocy jonowej $\mu = 0,1$ wydaje się nam najbardziej celowe.

Na intensywność zabarwienia smugi ciągnącej się za wędrującymi frakcjami białek posiada duży wpływ gatunek bibuły stosowanej do elektroforezy. Adsorpcja białka przez bibułę powinna zachodzić w jak najmniejszym stopniu. Warunek ten dostatecznie spełnia bibuła *Marcherey-Nagel* nr 61. *Hardwick*e (21) uważa, że smuga ta powstaje kosztem albumin i wprowadza w tym celu specjalną poprawkę. W opisanych przez nas warunkach uzyskujemy elektroforogramy, dla których tego rodzaju poprawka miałaby dużo mniejszą wartość, pozostając poniżej wartości błędu oznaczenia.

Nakładanie roztworu białkowego na suchy pasek bibuły i następne zwilżanie roztworem moderatorowym prowadzi do zbyt silnego wiązania się niektórych białek surowicy z włóknami celulozy (30). Dlatego należy nakładać surowicę na uprzednio zwilżony roztworem buforowym pasek bibuły.

Zwilżanie bibuły przez zanurzenie w roztworze buforowym i ewentualne następne osuszenie jej przy pomocy suchej bibuły nie gwarantuje zawsze jednakowego stopnia zwilżenia paska. W następstwie pociąga to za sobą różnice w działaniu tzw. „prądu wodnego” (K e m u l a i B a r t o s i e w i c z, 25, S l o t t a i in. 43), który objawia się w przesunięciach roztworu buforowego wzdłuż paska bibuły.

Z tych względów najbardziej celowy wydaje się zastosowany przez nas samoistny sposób zwilżania pasków bibuły, który gwarantuje równomierny i zawsze jednakowy stopień jej nawilżenia.

Niektórzy autorzy upatrują główną przyczynę tzw. „prądu wodnego” w parowaniu cieczy z powierzchni bibuły. Czynnikiem parowania (bez przepływu prądu elektrycznego) jest w tym przypadku bardzo mały i według badań S l o t t y i in. (43) wynosi w 20° około 0,12 mg wody z 1 cm² na 1 godzinę, co dla 1 paska odpowiada około 0,02 — 0,03 ml buforu. Większe znaczenie w tej wędrówce roztworu buforowego do środka paska posiada, jak wykazaliśmy, stopniowe nasiąkanie już wilgotnego paska bibuły (rys. 3): w tym samym czasie wchłania on ilość cieczy rzędu 0,5 g.

A zatem główną przyczyną początkowej wędrówki cieczy ku środkowi paska bibuły jest dodatkowe nasiąkanie już zwilżonej bibuły. Natomiast w czasie przepływu prądu elektrycznego wzmacnia się parowanie cieczy z pasków bibuły i wówczas ono staje się zasadniczą przyczyną przesuwania się cieczy ku środkowi pasków.

Badania E w e r b e c k a i L o h m a n n a (14) stwierdziły, że pożywienie i rytmika dobową nie posiadają wpływu na skład białek surowicy. Surowica przechowywana w lodówce nie zmienia swojego składu do 7 dni, co stwierdzają również inni autorzy (29, 34).

Znacznym uproszczeniem w porównaniu z elektroforezą klasyczną jest możliwość bezpośredniego badania płynów białkowych za pomocą elektroforezy bibułowej bez uprzedniej dializy substancji niskocząsteczkowych. Podkreślają to wszyscy badacze z jednym wyjątkiem (18), którego przyczynę stanowi prawdopodobnie błędna interpretacja wyników: nieuwzględnianie przesuwania się frakcji wraz z buforem przy wysychaniu końców pasków bibuły.

Ważne zagadnienie stanowi również optymalne stężenie badanego roztworu białka. Większość autorów stosuje nakładanie nierozcieńczo-

nej surowicy uważając nawet, że zawartość białka 6 — 8% jest optymalna (41). Bliższe badania niektórych autorów (21, 30) jak i własne wskazują na to, że zbyt duże stężenie białka powoduje nadmierne nagromadzenie i następnie niedobarwienie najobfitszej frakcji, najczęściej albumin (ang. „packing effect” i „understaining effect”) (21). Przy dużych stężeniach albumin przypadających na jednostkę powierzchni bibuły nie zachodzi prosta proporcjonalność między ilością białka a ilością związanego z nim barwnika (tabl. 2). Ten efekt niedobarwienia przy dużych stężeniach albumin staje się przyczyną uzyskiwania zbyt małych odsetkowych wartości dla tej najobfitszej i najszybciej wędrującej frakcji białkowej (tabl. 1 i 2).

Natomiast przy małym stężeniu albumin, dla których ten efekt niedobarwienia przy wyższych stężeniach jest najbardziej charakterystyczny, można uzyskać poprawne wartości ilościowe nawet przy stosowaniu nierozcieńczonej surowicy. Faktem tym można wyjaśnić wyniki *Capsani* i *Bernasconi* (cyt. wg 41), którzy otrzymywali wartości zgodne z elektroforezą klasyczną tylko w przypadkach dużej dysproteinemii.

Oczywiście przy nakładaniu roztworu białkowego na zwilżony pasek bibuły zachodzi zawsze rozcieńczanie roztworu białkowego roztworem moderatorowym. Istotne w ilościowej elektroforezie bibułowej jest końcowe stężenie białka przypadające na jednostkę powierzchni bibuły, czyli tzw. stopień zagęszczenia. Jest on uwarunkowany kilkoma czynnikami, które można przyjąć za stałe, jak np. gatunek bibuły, temperatura, czas elektroforezy, objętość nakładanego roztworu białkowego, sposób nakładania i sposób suszenia. Stopień zagęszczenia jest oczywiście zależny od stężenia nakładanego roztworu białkowego. Z tabl. 2 wynika, że aby zapobiec efektowi niedobarwienia albumin nie należy dopuścić do zagęszczenia przekraczającego 0,3 μg albumin na 1 mm^2 powierzchni bibuły. W opisanych wyżej warunkach nakładany na bibułę roztwór nie powinien zawierać więcej niż 1,5 — 2% albumin.

Zakładając, że w normalnych warunkach 2/3 białka surowicy stanowią albuminy, przy całkowitej zawartości białka 6 — 8%, należy do badań elektroforetycznych rozcieńczać surowicę 3 — 4-krotnie. Wówczas stężenie albumin będzie wynosić około 1 — 1,5%, czyniąc zadość wymienionym wyżej wymaganiom. Najlepiej jest oznaczać w badanej surowicy stężenie białka całkowitego i następnie rozcieńczać ją do zawartości 2% białka.

Hardwick (21) poleca nawet rozcieńczać surowicę do zawartości 1% białka, stosując jednakże znacznie większą objętość roztworu.

Stosowanie do rozcieńczenia surowicy zabarwionego roztworu bu-

forowego wydaje się nam słuszne tym więcej, że ułatwia ono kontrolę przy nakładaniu roztworu na bibułę jak również uwidocznia elektroforetyczną wędrówkę albumin.

Dla uzyskania jak najbardziej doskonałego rozdziału frakcji białek nie jest obojętny wybór miejsca nakroplenia jak również czasu liczonego od chwili zwilżenia pasków. Powodem tego jest zjawisko „prądu wodnego”, który może wpływać korzystnie lub niekorzystnie na rozdział elektroforetyczny (43).

Z rys. 3 wynika, że zjawisko to zachodzi najintensywniej zaraz po zwilżeniu bibuły, należałoby zatem wybrać późniejszy czas nakładania roztworu białkowego. Jednakże po zbyt długim czasie nawilżania (kilka godzin) bibuła jest już tak znacznie nasycona cieczą, że jedynie z trudem wchłania ona nakraplany roztwór powodując rozlewanie go w plamkę o zbyt dużej powierzchni. Rys. 3 jak również wykonane próby wskazują, że optymalny czas nakładania roztworu białka wynosi w opisanych warunkach około 1 godziny licząc od chwili całkowitego zwilżenia pasków bibuły.

Wydaje się nam, że celem uniknięcia smugi, jaką zostawiają na bibule przesuujące się γ -globuliny, najbardziej wskazany jest taki wybór linii startowej, aby po zakończeniu elektroforezy γ -globuliny pozostały w miejscu nakroplenia. W opisanej metodyce warunek ten jest spełniony, gdy linia startowa leży w odległości 3 cm od środka paska bibuły w kierunku katody.

Dla celów analizy ilościowej badany roztwór białkowy powinien być nakładany na pasek bibuły w postaci wąskiego poprzecznego paska. Nakraplanie za pomocą pipety lub pędzelka daje w większości przypadków nierównomierne ukształtowanie paska.

Według Martina i Franglena (30) nakładanie badanego roztworu pędzelkiem może powodować częściową denaturację białka przez zetknięcie się z włosiem. Autorzy ci, stosują wąski skrawek bibuły napojony surowicą, który na krótki czas umieszczają w odpowiednim miejscu na pasku bibuły. Jednakże sposób powyższy, jak również nakładanie przy pomocy krawędzi szkiełka podstawowego nie pozwala na ściślejsze odmierzenie ilości roztworu białka wprowadzonego na pasek bibuły. Stosowanie kapilarnej rurki szklanej do nakładania roztworu białkowego na pasek bibuły wydaje się stanowić najlepszy sposób postępowania. Posiadamy wówczas możliwość nakładania analizowanego roztworu w jednakowej znanej objętości.

Dla poprawnej ilościowej interpretacji rozdzielonych frakcji białkowych odległość albumin od γ -globulin powinna wynosić co najmniej kilka centymetrów (Dittmer, 9). Odległość ta jest zależna mię-

dzy innymi od napięcia przyłożonego do końców paska oraz od czasu trwania elektroforezy.

Zbyt wysokie natężenie prądu przepływającego przez paski bibuły powoduje za obfite parowanie cieczy, co jest z kolei powodem zakłóceń w rozdziale frakcji. Np. przy natężeniu prądu 0,85 mA na 1 cm szerokości paska otrzymano rozdział białek surowicy na tylko dwie frakcje (43). Dla celów praktycznych poleca S l o t t a i in. (43) natężenie 0,25 mA/cm, a Martin i Franglen (30) podają wartości 0,15 — 0,20 mA/cm.

Natężenie prądu przy stałych warunkach wykonywania elektroforezy jest regulowane wielkością napięcia przyłożonego do końców pasków bibuły. Zgodnie z większością autorów (9, 19, 30) nie powinno ono wynosić więcej niż 150 V czyli około 5 V na 1 cm długości paska (dla modyfikacji z komorą wilgotną).

Zbyt niskie napięcia wymagają długiego czasu rozdziału, co nie sprzyja ostrości uzyskanego obrazu ze względu na procesy dyfuzji.

Według naszych doświadczeń stosowanie stabilizatora napięcia nie jest konieczne do uzyskiwania rozdziału elektroforetycznego na bibule, gdyż najczęściej nie określamy tu szybkości wędrówki cząsteczek białka w polu elektrycznym, a różnica potencjałów służy jedynie do przestrzennego rozdzielania poszczególnych frakcji. Drobne wahania napięcia wpływają w jednakowym stopniu na przesuwanie się wszystkich składników wędrujących w polu elektrycznym.

Sposób suszenia pasków bibuły posiada bardzo doniosły wpływ na zachowanie ostrych granic między poszczególnymi frakcjami białkowymi. Przy braku zachowania odpowiednich ostrożności część środkowa pasków wysycha szybciej, co powoduje przesuwanie się buforu z obficie zwilżonych końców paska ku środkowi. Powoduje to z kolei zbliżanie się skrajnych rozdzielonych frakcji (albumin i γ -globulin) ku środkowi, zachodzenie frakcji na siebie oraz skrócenie odcinka, na jakim dokonano rozdziału.

Można zapobiec temu niepożądanemu zjawisku przez odcięcie lub osuszenie obficie nawilżonych końców pasków przy pomocy suchej bibuły bezpośrednio po wyjęciu ich z komory wilgotnej. Efektem tej prostej czynności polecanej również przez M a c k a y a (29) jest uzyskanie bardzo dobrego rozdziału albumin od α_1 -globulin.

Suszenie wilgotnych pasków w wyższej temperaturze (105°) obniża, jak stwierdziliśmy, stopień powtarzalności wyników i z tego powodu nie jest godne polecenia.

Warunek denaturacji barwionego białka jest w dostatecznym stopniu spełniony w procesie samego barwienia, gdzie czynnikami denaturującymi jest etanol oraz wysokie stężenie chlorku rtęciowego.

Różni badacze stosowali w celu uwidocznienia frakcji białkowych rozdzielonych elektroforetycznie na bibule cały szereg barwników, jak np. azokarmin B (37, 44), czerń naftalenowa 12B (15), czerń amidowa 10B (19, 9, 38, 50), błękit bromofenolowy (7, 24, 11, 28, 4), zieleń bromokrezolowa (16) itp. Istnieją również doniesienia o innych sposobach barwienia, jak np. reakcja z benzydynam po uprzednim chlorowaniu (39), lub też określanie umiejscowienia frakcji przy pomocy promieni ultrafioletowych (27, 12).

W piśmiennictwie istnieją dosyć rozbieżne zdania na temat największej przydatności jednego ze sposobów barwienia. W pracy niniejszej nie przebadaliśmy przydatności różnych barwników do tego celu wychodząc z założenia, że w najbliższym czasie specjalnie podjęte badania powinny wskazać, który z barwników wykaże optymalne własności w tym kierunku. Niemniej wybór nasz padł na błękit bromofenolowy, który w oparciu o dotychczasową krytykę (24, 21) wydaje się najbardziej odpowiedni, szczególnie wówczas, gdy ilościowa interpretacja odbywa się przy pomocy elucji barwnika związanego przez białko. Przy stosowaniu azokarminu lub czerni amidowej istnieją pewne trudności w całkowitym odbarwieniu części bibuły wolnej od białka (38, 9, 10).

Szerokim zagadnieniem o zasadniczym znaczeniu jest proporcjonalność ilościowego wiązania barwnika przez poszczególne frakcje białek. Prace na ten temat są jeszcze nieliczne, niemniej na ich podstawie można sądzić (15, 19, 21, 16), że z dotychczas stosowanych barwników żaden nie posiada własności ściśle jednakowego barwienia wszystkich frakcji białka.

Jeżeli weźmiemy pod uwagę, że przy wysokich stężeniach białka przypadających na jednostkę powierzchni bibuły zachodzą dysproporcje między ilością białka a ilością związanego przez nie barwnika, to dochodzimy do wniosku, że sprawa ustalenia dla poszczególnych frakcji białkowych ewentualnych czynników korekcyjnych proponowanych przez nielicznych autorów okazuje się bardziej zawiłym problemem zależnym od wielu parametrów. Ponadto dotychczas brak jeszcze ścisłych danych dotyczących zmian w barwieniu się poszczególnych elektroforetycznych frakcji białkowych patologicznie zmienionych.

W oparciu o materiał doświadczalny stwierdzamy, że nawet dość znaczne odchylenia od standartowych warunków barwienia nie wykazują wpływu na wyniki ilościowe.

Uzyskany obraz przestrzennie rozdzielonych poszczególnych frakcji białkowych (elektroforogram) powinien przedstawiać dobrze zróżnicowane plamki przy czym nakreślenie linii rozgraniczającej frakcje nie po-

Tablica 9

Przyczyny błędów rozdziału frakcji białkowych

Wygląd elektroforogramu	Możliwe przyczyny
Niejednakowe odcinki drogi przebyte przez albuminy na różnych paskach z jednej serii	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nieszczelna komora wilgotna 2. Niejednakowy sposób osuszania pasków 3. Niejednakowy „kierunek biegu” dla pasków wycinanych z arkusza bibuły w kierunkach wzajemnie prostopadłych
Paski ze środka komory posiadają dłuższy odcinek rozdziału frakcji aniżeli skrajne	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kwaśne i zasadowe produkty wtórnych reakcji na elektrodach dochodzą do pasków bibuły 2. Zbyt stary lub niewymieszany roztwór buforowy
Frakcje białek na brzegach pasków są intensywniej zabarwione (efekt brzeżny) (31)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nakładano roztwór białka na linii startu zbyt blisko brzegów paska 2. Jeden brzeg paska bibuły w czasie rozdziału był zawieszony niżej od drugiego (nie poziomo)
γ -globuliny oddaliły się znacznie od linii startowej	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nieodpowiednio wybrana linia startu 2. Za wcześnie nałożono roztwór białkowy 3. Nie wyrównano poziomów roztworów buforowych w wanienkach
Albuminy słabo rozdzielone od α_1 -globulin	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nieodpowiednia linia startu 2. Nieodpowiednie suszenie pasków po elektroforezie
Zakrzywione powierzchnie rozdzielonych frakcji	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nakładano roztwór białka zbyt blisko brzegów paska 2. Zbyt wcześnie po nawilżeniu pasków bibuły nakładano białko
Nieostry, rozmazany obraz frakcji	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nieodpowiedni bufor lub bibuła 2. Zbyt wysokie natężenie prądu 3. Zbyt długi czas rozdziału 4. Spadanie kropeł wody z górnej płyty komory wilgotnej 5. Nakładano surowicę zbyt późno po zwilżeniu pasków bibuły 6. Zmieniony roztwór białka pod wpływem nieodpowiedniego przechowywania w temp., enzymów itp. 7. Niektóre patologiczne surowice

c. d. tablicy 9

Wygląd elektroforogramu	Możliwe przyczyny
Brak rozdziału β - i γ -globulin	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obecność fibrygeny 2. Zbyt długi czas między wyłączeniem prądu a wyjęciem pasków 3. Niektóre patologiczne surowice
Zbyt intensywna barwna smuga między frakcjami (ang. „trailing”)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nieodpowiedni gatunek bibuły 2. Zbyt niskie stężenie jonowe buforu

winno nasuwać wątpliwości. Odchylenia od tego obrazu świadczą o występowaniu zakłóceń. Stwierdziliśmy, że przyczynę ich często można określić z wyglądu elektroforogramu. W tym celu w tablicy 9 zestawiono najczęściej spotykane nieprawidłowości rozdziału frakcji białkowych oraz przytoczono ich przyczyny.

Ilościowa interpretacja elektroforogramów na bibule. Ilościowe oznaczanie zabarwionych frakcji białkowych rozdzielonych elektroforetycznie na bibule, stanowiące drugi etap tego badania, opiera się na oznaczeniu ilości barwnika związanego z białkiem. W praktyce znajdują szersze zastosowanie dwie metody: pierwsza polega na elucji barwnika związanego z białkiem i następnym pomiarze jego stężenia, druga opiera się na bezpośrednim fotometrowaniu elektroforogramów na bibule.

Obie metody zostały w praktyce opracowane w szeregu modyfikacji i tak elucja barwnika może się odbywać według C r e m e r a i T i s e l i u s a (7) z dużej ilości wąskich skrawków zabarwionej bibuły odcinanych poprzecznie do kierunku wędrówki frakcji lub też z kilku frakcji uwidocznionych przez rozdział (15, 11, 29, 21; 9).

Pierwsza z tych modyfikacji daje możliwość wykreślenia krzywej elektroforetycznej charakterystycznej dla metody klasycznej T i s e l i u s a, jednakże sposób ten jest uciążliwy i budzi zastrzeżenia natury teoretycznej (28).

Metoda elucji barwnika związanego z całymi rozdzielonymi frakcjami białka w celu oznaczenia ich względnego stężenia wydaje się stanowić metodę podstawową i właściwą (D i t t m e r 9). Przy stosowaniu tego sposobu rezygnujemy z otrzymania krzywej elektroforetycznej uzyskując bezpośrednio procentową zawartość poszczególnych frakcji białkowych.

Niezależnie od sposobu ilościowej oceny elektroforogramu warunkiem przystąpienia do niej jest uzyskanie dobrego przestrzennego roz-

działu frakcji białkowych na bibule. Rozpatrując dalsze warunki, jakie powinny być spełnione przy stosowaniu metody elucji barwnika z poszczególnych frakcji elektroforetycznych, należy wymienić:

- 1) jednakowy stopień wiązania barwnika przez wszystkie frakcje białkowe,
- 2) prostą proporcjonalność między ilością danej frakcji a ilością związanego przez nią barwnika,
- 3) ilościową desorpcję barwnika,
- 4) prostą proporcjonalność między mierzoną ekstynkcją eluatu a stężeniem barwnika.

Niektóre z powyższych założeń są spełnione tylko w ograniczonym stopniu lub w ściśle określonych warunkach.

Stwierdziliśmy (tabl. 3), że różnica wiązania błękitu bromofenolowego przez albuminy i γ -globuliny jest nieduża: γ -globuliny wiążą około 5% mniej tego barwnika niż albuminy w tych samych warunkach. Zbliżone są wyniki innych autorów (21, 29).

Sprawą nie mniej zasadniczej wagi jest stopień proporcjonalności między ilością danej frakcji a ilością związanego barwnika. Zależność ta jest uwarunkowana stopniem zagęszczenia białka na bibule (tabl. 2). Jeżeli na 1 mm² powierzchni bibuły przypada więcej jak 0,3 μ g białka w warunkach opisanych w części doświadczalnej, to ilość barwnika związanego przez białko jest mniejsza: na skutek zbyt wielkiego stopnia zagęszczenia ma miejsce efekt niedobarwienia. Na fakt ten pierwszy zwrócił uwagę Hardwicke (21).

Z danych liczbowych zestawionych w tablicy 1 i 2 należy wyciągnąć wniosek, że nakładanie na małej powierzchni linii startowej na pasek bibuły roztworu zawierającego ponad 1,5 — 2% albumin prowadzi do uzyskania zbyt dużego zagęszczenia tej frakcji na bibule, co jest następnie powodem wiązania przez nią zbyt małej ilości barwnika.

Dowodem ilościowej desorpcji barwnika przez roztwór węgłanu sodowego w 50% metanolu jest wygląd skrawków bibuły po elucji: nie dostrzegamy na nich śladów zabarwionego białka. Podobnie stosowana przez nas bibuła nie adsorbuje błękitu bromofenolowego w roztworze służącym do elucji.

Ograniczony zakres, w jakim stosuje się do roztworu błękitu bromofenolowego prawo Beer'a (rys. 5) nakazuje również dobierać odpowiednio niskie stężenie roztworu białka względnie stosować do elucji większą objętość roztworu.

Wyniki zawarte w tablicy 4 świadczą, że zastosowanie zwykłego kolorymetru do pomiarów względnych stężeń wyeluowanego barwni-

ka daje zadowalające wyniki w porównaniu z pomiarem fotometrycznym. Możliwość ta udostępnia zastosowanie ilościowej elektroforezy bibułowej białek wielu pracownikom nie posiadającym fotometru.

Powtarzalność wyników jest zadowalająca dla obfitszych ilościowo frakcji białkowych (tabl. 5): dla albumin i γ -globulin wynosi ona około 3%. Natomiast dla mniejszych ilościowo frakcji dochodzi ona do 12%.

Dokładność metody sprawdzona dla jednej frakcji przez dodanie znanej ilości albuminy do zanalizowanej surowicy (tabl. 6) okazała się zadowalająca (1,7%).

Przechodząc do omówienia badań mających na celu porównanie stosowanej metody elucji z innymi sposobami ilościowej oceny elektroforogramów należy podkreślić dużą rozbieżność wyników ilościowych (rys. 6 i tabl. 7).

Krzywe absorpcji światła uzyskane przez fotometryrowanie elektroforogramów bezpośrednio lub też po kąpeli w mieszaninie parafiny i α -bromonaftalenu wykazują za małe wartości dla albumin. Potwierdzają to również inni autorzy (8, 21, 20, 29, 30). Jedną z przyczyn tego faktu jest to, że zarejestrowane wartości krzywej absorpcji światła nie są wprost proporcjonalne do ilości barwnika na bibule, szczególnie przy większych jego stężeniach. Przy założeniu stosowalności prawa Beer'a należałoby rejestrować nie krzywe przezroczystości (absorpcji światła), a odpowiednie krzywe ekstynkcji. Przy automatycznym zapisie ilości światła przepuszczonego przez pasek bibuły powinno wówczas być wbudowane między fotoogniwo a galwanometr urządzenie logarytmujące prąd fotoelektryczny względnie też odpowiednia krzywa powinna być kreślona na papierze wygiętym w płaszczyźnie logarytmicznej (H a n s o n i W e n z e l, 20).

Opisane w piśmiennictwie niektóre z automatycznych urządzeń (32, 25, 26) nie uwzględniające tych zastrzeżeń mogą z tego powodu dawać poprawne wyniki ilościowe tylko w pewnym wąskim zakresie stężenia białka na bibule.

Porównanie wykresów 6 b i 6 c wykazuje duże znaczenie kąpeli bibuły w mieszaninie parafiny i α -bromonaftalenu, na co zwracają również uwagę P e n z o l d i K o f e s (35).

Należy podkreślić, że zapisywanie wartości ekstynkcji przy fotometryrowaniu elektroforogramów zapoczątkowane przez G r a s s m a n n a i H a n n i g a (19) i innych autorów (13, 12) mimo iż bardziej teoretycznie uzasadnione, daje również za niskie wartości dla albumin (tabl. 7). Jest to spowodowane znacznymi odchyleniami od prawa Beer'a, jakie mają miejsce przy bezpośrednim fotometrycznym oznaczaniu

barwnika na bibule, co wykazali *Crook* i inni (8) oraz *Dittmer* (9). Przeciwnie wyniki otrzymali natomiast *Grassmann* i *Hannig* (19) oraz początkowo *Wenzel* i *Hanson* (45) (por. 20).

Porównując w tablicy 7 zawartości frakcji białkowych dla 3 surowic ludzi zdrowych uzyskane przy pomocy elektroforezy swobodnej oraz bibułowej z zastosowaniem oznaczenia barwnika na drodze elucji należy stwierdzić również brak ścisłej zgodności. Przy zastosowaniu opisanej metody elektroforezy bibułowej uzyskuje się o kilka procent wyższe wartości dla albumin. Wartości uzyskane dla α_1 -, α_2 - i β -globulin są prawie dwukrotnie niższe, natomiast poziom γ -globulin jest blisko dwukrotnie wyższy. Niższy poziom β -globulin, a również α -globulin, uzyskany przy pomocy elektroforezy bibułowej daje się wyjaśnić w oparciu o dużą zawartość lipidów w tych frakcjach, które elektroforeza swobodna zapisuje jako białka (34, 29, 21, 30).

Naszym zdaniem główną zaletą metody elucji w porównaniu z fometrowaniem elektroforogramów stanowi jej dokładność a ponadto szybkość i prostota wykonania. Z drugiej strony za pewną zaletę metody opierającej się na fometrowaniu elektroforogramów można uważać uzyskiwanie jako dokumentu krzywej elektroforetycznej bez niszczenia pasków bibuły. Wydaje się nam jednak, że o ile przy elektroforezie klasycznej otrzymywana krzywa elektroforetyczna stanowi konieczny etap analizy umożliwiający obliczenie ilościowe, to wysiłki zmierzające do uzyskania analogicznej krzywej z elektroforogramów bibułowych często komplikują to zagadnienie przez stosowanie okrężnej pośredniej drogi fometrowania pasków. Wielkość błędów metodycznych w samym zapisie krzywej elektroforetycznej (8, 9) oraz pewna dowolność w ilościowej interpretacji uzyskanej krzywej (23) wydają się stawiać tę metodę na drugim planie.

Podobnie metoda polegająca na rejestracji światła odbitego od paska bibuły (40) jak również analiza retencyjna zaproponowana przez *Wielanda* i *Wirtha* (49) nie przedstawiają z zasadniczych względów możliwości osiągnięcia większej dokładności.

Normalna zawartość frakcji białkowych w surowicy zdrowych ludzi oznaczona przy pomocy stosowanej metodyki nie różni się znacznie od wartości przytaczanych przez niektórych autorów dla metody elektroforezy bibułowej (19, 9) jak i klasycznej (2, 46).

Serdecznie dziękuję prof. dr *Z. Stolzmannowi* za wskazanie potrzeby opracowania tego tematu, doc. dr *K. Zakrzewskiemu* z Instytutu Hematologii w Warszawie za użyczenie preparatów albumin i γ -globulin, jak również dr *K. Wójcickiemu* za wykonanie fotografii ilustrujących niniejszą pracę.

LITERATURA

1. Antweiler H. J., Die quantitative Elektrophorese in der Medizin, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, (1952).
2. Armstrong S. H., Budka M. J. E., Morrison K. C., J. Amer. Chem. Soc., **69**, 416 (1947).
3. Benhamou E., Pugliese J., Chiche J. C., Amouch P., Presse Méd., **62**, 651 (1954).
4. Bruyde L. M., Sachackaja T. S., Seriebriennikowa N. G., Biochimja **19**, 461 (1954).
5. Castagna E., Wewalka F., Wien. Zschr. inn. Med., **35**, 215 (1954).
6. Consden R., Stanier W. M., Nature **170**, 1069 (1952).
7. Cremer H. D., Tiselius A., Biochem. Z., **320**, 273 (1950).
8. Crook E. M., Harris H., Hassan F., Warren F. L., Biochem. J., **56**, 434 (1954).
9. Dittmer A., Z. ges. inn. Med., **9**, 1142 (1954).
10. Drevon B., Bull. Soc. Chim. Biol., XXXVI, 921 (1954).
11. Durrum E. L., J. Amer. Chem. Soc., **72**, 2943 (1950).
12. Eberlé H., Naturwiss., **41**, 479 (1954).
13. Eisenreich F., Eder M., Klin. Wschr., **29**, 60 (1951).
14. Ewerbeck H., Lohmann H., Arztl. Forsch., **8**, 391 (1954).
15. Flynn F. V., de Mayo P., Lancet **11**, 235 (1951).
16. Franglen G. T., Martin N. H., Biochem. J., **57**, 626 (1954).
17. Ghosh A. R., Naturwiss., **41**, 257 (1954).
18. Graf E., List P. H., Naturwiss., **40**, 273 (1953).
19. Grassmann W., Hannig K., Z. physiol. Chem., **290**, 1 (1952).
20. Hanson H., Wenzel M., Z. ges. inn. Med., **9**, 409 (1954).
21. Hardwicke J., Biochem. J., **57**, 166 (1954).
22. Herbst F. S. M., Hurley N. A., J. clin. Invest., XXXIII, 907 (1954).
23. Hermann G., Oberhausen E., Naturwiss., **40**, 412 (1953).
24. Kunkel H. G., Tiselius A., J. gen. Physiol., **35**, 89 (1951).
25. Kemula W., Bartosiewicz W., Roczniki Chemii, **28**, 100 (1954).
26. Krawczyński J., Rycaj M., Pol. Tyg. Lek., **21**, 656 (1954).
27. Kimbel K. H., Naturwiss., **40**, 200 (1953).
28. Levin B., Oberholzer P. G., Nature, **170**, 123 (1952).
29. Mackay J. R., Volwiler W., Goldsworthy P. D., J. clin. Invest., XXXIII, 885 (1954).
30. Martin N. H., Franglen G. T., J. clin. Path., **7**, 87 (1954).
31. Macheboeuf M., Rebeyrotte P., Brunerie M., Bul. Soc. Chim. Biolog., XXXIII, nr 10, 1543 (1951).
32. Ostrowski W., Mikucki A., Pol. Tyg. Lek., **21**, 657 (1952).
33. Ostrowski W., Skarżyński B., Pol. Tyg. Lek., **5/6**, 120 (1952).
34. Ott H., Huber H., Körver G., Klin. Wschr., **30**, 34 (1952).
35. Penzold F. A., Kofes A., Klin Wschr., **32**, 504 (1954).
36. Plückthun H., Z. ges. inn. Med., **9**, 463 (1954).
37. Plückthun H., Götting H., Klin Wschr., **29**, 415 (1951).
38. Pućar Z., Z. physiol. Chem., **269**, 62 (1954).
39. Reindel F., Hoppe W., Naturwiss., **40**, 221 (1953).
40. Röttger H., Klin Wschr., **31**, 85 (1953).

41. Riva G., Martini V., Schweiz. med. Wschr., **83**, 73 (1953).
42. Schwarz V., Nature **167**, 404 (1951).
43. Slotta K., Bril S., Ballester A., Z. physiol. Chem., **296**, 141 (1954).
44. Turba F., Enenkel A., Naturwiss., **37**, 93 (1950).
45. Wenzel M., Hanson H., Z. physiol. Chem., **292**, 137 (1953).
46. Wiedeman E., Schweiz. med. Wschr., **74**, 566 (1944).
47. Wiedermann D., Schweiz. med. Wschr., **84**, 1367 (1954).
48. Wieland T., Fischer E., Naturwiss., **35**, 29 (1948).
49. Wieland T., Wirth L., Angew. Chem., **62**, 433 (1950).
50. Wolff R., Magnin P., Bull. Soc. Chim. Biol., XXXVI, 925 (1954).
51. Wolfson W. Q., Cohn C., Calvary E., Ichiba F., Am. J. clin. Path., **18**, 723 (1948).
52. Wührmann F., Wunderly C., Die Bluteiweisskörper des Menschen, B. Schwabe &, Basel, (1952). 1608

Streszczenie

Zbadano warunki określające uzyskiwanie dobrego rozdziału frakcji i powtarzalnych wyników przy ilościowej elektroforezie bibułowej białek surowicy krwi ze szczególnym uwzględnieniem źródeł możliwych błędów.

Opisano warunki jakim powinna odpowiadać konstrukcja komory wilgotnej, roztwór buforowy, gatunek bibuły i sposób jej zwilżania, stężenie badanego roztworu białkowego. Podkreślono znaczenie wyboru linii startowej, sposobu nakładania roztworu białkowego, napięcia i czasu elektroforezy jak również sposobu suszenia i barwienia pasków bibuły.

Stwierdzono, że przy zbyt dużym zagęszczeniu albumin przypadającym na jednostkę powierzchni bibuły (w opisanych warunkach powyżej $0,3 \mu\text{g}/\text{mm}^2$) frakcja ta wiąże zbyt mało błękitu bromofenolowego. Wykazano możliwość wykonywania pomiarów względnych stężeń wyluowanego barwnika przy pomocy zwykłego kolorymetru.

Stwierdzono, że sposób ilościowej interpretacji elektroforogramów oparty na elucji barwnika z poszczególnych frakcji pozwala na uzyskanie poprawniejszych wyników aniżeli wartości obliczone z krzywych elektroforetycznych otrzymanych na drodze fotometrowania zabarwionych pasków bibuły.

KOMITET BIOCHEMICZNY WYDZIAŁU II PAN

SPRAWOZDANIE Z DZIAŁALNOŚCI ZA ROK 1955

1. DANE OGÓLNE

Komitet Biochemiczny odbył w roku sprawozdawczym 6 zebrań plenarnych w dniach: 27.I, 12.III, 17.V, 24.VI, 23.IX i 29.XI. Ponadto w roku sprawozdawczym odbyło się w dn. 11 i 12 marca sympozjum VI o kwasach nukleinowych i nukleo-proteidach. Charakter sympozjum miała również odbyta w dniach 28. i 29.XI konferencja sprawozdawcza z III Międzynarodowego Kongresu Biochemików w Brukseli. W roku sprawozdawczym również odbyła się w dn. 18.V.1955 r. II sesja sprawozdawcza Komitetu Biochemicznego PAN z prac dotowanych w roku 1954.

2. PLANOWANIE I ORGANIZACJA BADAŃ NAUKOWYCH

2.1. W roku sprawozdawczym Komitet po dokładnej dyskusji i w oparciu o wyniki pierwszej sesji sprawozdawczej zaakceptował dotowanie 24 tematów wykonywanych w 10 ośrodkach badawczych poza ośrodkami należącymi do Polskiej Akademii Nauk. Ogólną sumę dotacji wynoszącą 245.400 zł podzielono pomiędzy 6 problemów szczególnie ważnych tj.: Białka biologicznie czynne (100.800 zł), Fizjologiczne i biochemiczne prawidłowości rozwoju mikroorganizmów, ich eksperymentalna zmienność i selekcja (53.500 zł), Biologia nowotworów (20.000 zł), Biologia wirusów i choroby wirusowe (20.000 zł), Naukowe podstawy żywienia zbiorowego (12.000 zł), Antybiotyki (3.500 zł). Pozostałą sumę 35.600 zł przeznaczono na dotowanie takich prac, które już to ze względu na swe znaczenie metodyczne, już to ze względu na kształcenie młodych kadr zasługiwały na dotowanie.

II sesja sprawozdawcza, zdaniem Komitetu trafna i bardzo przydatna forma sprawozdawczości z prac dotowanych, mająca charakter roboczej dyskusji laboratoryjnej pozwoliła Komitetowi zorientować się w całokształcie prowadzonych badań i osiągniętych wynikach.

A oto kierunki badań poszczególnych ośrodków:

1. Ośrodek kierowany przez prof. dr T. Baranowskiego we Wrocławiu złożył sprawozdanie z następujących 4 prac:

a) Wpływ jednorazowej dawki hydrolizatu ACTH u zdrowego człowieka na aktywność cholinesterazy, pseudocholinesterazy, anhidrazy węglanowej oraz glutationu we krwi. — Pracę tę referowała lek. Barbara Kowal.

b) Badania wpływu ACTH na poziom potasu w osoczu ludzkim. — Pracę tę referowała mgr E. Romanowska.

c) Wpływ hydrolizatu ACTH na poziom azotu aminokwasowego i fosfatazy alkalicznej we krwi ludzi. — Pracę referował dr St. Karpiak.

d) Wpływ hydrolizatu ACTH na poziom białek, cholesterolu i eozynofilów we krwi u ludzi. — Pracę referowała doc. dr W. Mejbaum-Katzenellenbogen.

2. Ośrodek kierowany przez prof. dr J. Opieńską-Blauth (Zakład Chemii Fizjologicznej AM w Lublinie) złożył sprawozdania z następujących 4 prac:

a) Badania nad przemianą aminokwasową u prątków kwasoodpornych. — Pracę referowała Olga Sakławska-Szymonowa.

b) Próby izolowania transaminazy asparginowo-glutaminowej i u *Mycobacterium phlei*. — Pracę referował Z. Gąsior.

c) Badania nad mechanizmem powstawania estrów heksozofosforowych u *Mycobacteriów*. — Referował dr M. Szymona.

d) Chromatografia ilościowa związków redukujących. — Referowała I. Madecka-Borkowska.

3. Ośrodek kierowany przez prof. dr B. Skarżyńskiego (Zakład Chemii Fizjologicznej AM w Krakowie) przedstawił dwie prace:

a) Połączenia witaminu B₁₂ z białkami. — Referował dr W. Ostrowski.

b) Zmiany w obrębie kwasów nukleinowych w okresie kancerogenezy. — Referowała mgr M. Weber.

4. Ośrodek kierowany przez prof. dr W. Mozołowskiego (Zakład Chemii Fizjologicznej AM w Gdańsku) przedstawił dwie prace:

a) Obraz odwracalnej hemolizy w mikroskopie fazowo-kontrastowym. — Referował w imieniu prof. dr St. Hillera i swoim lek. A. Manitius.

b) O odwracalnej hemolizie. — Referował lek. A. Manitius.

5. Ośrodek kierowany przez kand. nauk inż. E. Borowskiego (Oddział Biochemii Inst. Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdańsku) przedstawił: Izolowanie i własności czystej cereiny B₂ — antybiotyku szczepu *B. Cereus*.

6. Ośrodek kierowany przez prof. dr Reginę Ludwiczak (Zakład Chemii Organicznej AM w Poznaniu) przedstawił pracę: Wpływ niektórych surowców roślinnych na mięsaka Crockera u myszy.

7. Ośrodek kierowany przez doc. dr S. Dudę przedstawił pracę z Zakładu Mikrobiologii Rolnej WSR w Poznaniu: Badania nad wytwarzaniem witaminy B₁₂ przez bakterie rodu *Rhizobium*. — Pracę referował w imieniu K. Zdrowa i własnym doc. Duda.

8. Ośrodek kierowany przez prof. dr J. Urbańskiego (Zakład Zoologii Ogólnej UP w Poznaniu) przedstawił plan prac Pracowni Fizjologii Porównawczej kierowanej przez dr J. Michejdę. Problematyka poruszania dotyczyła gospodarki energetycznej zwierząt bezkręgowych a szczególnie skupiała się nad enzymami oddechowymi ślimaków.

9. Ośrodek kierowany przez doc. dr D. Shugara (Zakład Biochemii PZH, Pracownia Biochemii Fizycznej) przedstawił prace:

a) Wpływ środowiska na aktywność rybonukleiny, przedstawił doc. dr D. Shugar.

b) Badania nad strukturą pochodnych kwasu orotowego — przedstawił doc. dr D. Shugar.

c) Badania nad strukturą pochodnych ksantyny — przedstawił doc. dr D. Shugar.

d) Struktura morfologiczna bakterii termofilnych — zreferowała mgr Aksena Jarmolińska.

10. Ośrodek kierowany przez doc. dr J. Meduskiego (Zakład Biochemii PZH, Pracownia Przemiany Pośredniej) przedstawił następujące prace:

a) Zmiany lipoproteinów pdo wpływem fostolipazy C. I. Preparatyka enzymu, substratów i fosfocholin produktu rozkładu substratu przez enzym — referował mgr A. J. Zbrożyna.

b) II Wpływ molibdenianu na hydrolizę fosfocholiny. — Referowała lek. A. Zakrzewska.

c) III Metoda manometryczna oznaczania fosfolipazy C w środowisku wodnym — referował doc. dr J. Meduski.

d) Metabolizm jaja kurzego zakażonego *Rickettsia Prov.* I. Czynności proteolityczne woreczka żółtkowego zarodka kurzego — referowała dr A. Linde.

e) Metabolizm *Penicillium chrysogenum*. O nieznannej frakcji wielocukrowcowej grzybni. — Referowała O. Klahr.

11. Ośrodek kierowany przez prof. dr Br. Filipowicza (Zakład Chemii Fizjologicznej AM w Łodzi) przedstawił prace:

a) Zawartość kwasów rybo- i dezoksyrybonukleinowych w węzłach chłonnych. Referował mgr J. Wiśniewski.

12. Ośrodek kierowany przez prof. dr A. Dmochowskiego (Zakład Biochemii UŁ w Łodzi) przedstawił następujące trzy prace:

a) Nukleoproteiny łusek łuszczycy.

b) Zakażenie doodbytnicze zwierząt doświadczalnych krwią chorych na gościec pierwotnie przewlekły.

c) Badania histopatologiczne tkanek zwierząt zakażonych krwią chorych na gościec pierwotnie przewlekły. Wszystkie prace referowała lek. L. Klyszejko.

Prace referowane przez ośrodek wrocławski były badaniami typu biochemiczno-farmakodynamicznego. Ten kierunek badań ma znaczenie jako niezbędne uzupełnienie prac fizjologiczno-farmakodynamicznych. Jedne i drugie są warunkiem niezbędnym postępu terapii. Ośrodek krakowski, gdański i łódzki wiążą się tematycznie z potrzebami kliniki. Połączenia witaminu B₁₂ z białkami badane w Krakowie stanowią najprawdopodobniej ową „fizjologiczną postać” działania tego witaminu, a zagadnienia nowotworzenia to jeden z odcinków trudnego frontu klinicznego, gdzie współpraca biochemika otwiera największe perspektywy.

Praca z ośrodka łódzkiego wykonana przy użyciu metody zakażenia doodbytniczego zwierząt doświadczalnych jest przykładem — metodycznie biorąc — użycia oryginalnego sposobu Zakładu Biochemii UŁ zakażenia zwierząt przez stosowanie wlewk doodbytniczych zawierających materiał wirusowy. Metoda ta może przyczynić się do poznania etiologii wielu jeszcze do dnia dzisiejszego nieznanych chorób i jest godna uwagi. Badania Pracowni Biochemii Fizycznej PZH nad pochodnymi kwasów nukleinowych są cennym wkładem do poznania biochemii tych związków, a badania nad bakteriami termofilnymi mają prócz znaczenia teoretycznego poważny aspekt praktyczny.

Pracownia Przemiany Pośredniej PZH wykonuje zaplanowane na szerszą skalę badania nad fosfolipazą C, czyli tzw. toksyną alfa *Clostridium perfringens Welchii*, czynnikiem głównie odpowiedzialnym za wytworzenie zespołu objawów klinicznych objętych nazwą zgorzeli gazowej. Badania te zmierzają w trzech kierunkach: biochemii tkanki zakażonej, biochemii drobnoustrojów wytwarzających toksynę, a wreszcie w teoretycznie interesującym kierunku użycia fosfolipazy C jako narzędzia w studiach przemiany fosfolipidów w ogóle. Pracownia ta ponadto wykryła dwa interesujące fakty z zakresu przemiany *Penicillium chrysogenum*: po wykryciu peroksydazy tej grzybni stwierdziła w nim obecność nieznaną biologicznie czynnej frakcji wielocukrowcowej.

Z mikrobiologicznego punktu widzenia interesującymi odkryciami są prace Zakładu Mikrobiologii Rolnej WSR w Poznaniu nad wytwarzaniem witaminu B₁₂ przez bakterie rodzaju *Rhizobium*, oraz badania ośrodka lubelskiego nad przemianą aminokwasową prątków kwasoodpornych. Ośrodek lubelski kontynuował

ponadto studia nad mechanizmem powstawania estrów heksozo-fosforowych u prątków kwasoodpornych.

2.2. W omówieniu realizacji planu badań na r. 1955 i trudności z tym związanymi należy szerzej omówić sprawę metodyki izotopowej w biochemii, a nawet szerzej: w naukach przyrodniczych w Polsce, ponieważ niemożność posługiwania się tą metodyką miała niewątpliwie ujemny wpływ na kierunek i postęp wykonywanych prac. W piśmie swym z dn. 23 września 1955 r. Komitet Biochemiczny wyraził gotowość podjęcia odpowiedzialności za organizację badań izotopowych w zakresie nauk przyrodniczych w ramach Wydziału II PAN. Sytuacja w chwili redagowania tego wniosku oznaczała się zupełnym brakiem przeszkolonych kadr i całkowitym brakiem wyposażenia technicznego z jednej strony, a z drugiej takim poziomem badań w niektórych dyscyplinach nauk przyrodniczych, a zwłaszcza w biochemii, który już w chwili obecnej całkowicie umożliwia wprowadzenie metody izotopowej do tematyki bieżących prac. Po przyjęciu przez Wydział II propozycji Komitetu Biochemicznego, Komitet pomógł w organizacji na terenie Zakładu Biochemii P.Z.H. kursu wprowadzającego w technikę laboratoryjną prac z izotopami, a obecnie przygotowuje wydanie materiałów tego kursu w formie zeszytu metodycznego. Na wniosek Komitetu, Sekretariat Naukowy Wydziału II wystąpił na Sekretariacie Prezydium PAN o szersze szkolenie naszych kadr w zakresie metodyki izotopowej, a mianowicie o wysłanie ok. 30 osób na różne okresy czasu do różnych krajów dla przeskolenia. W planie kształcenia zdecydowano uwzględnić przede wszystkim następujące kierunki badawcze: metabolizm ogólny, chemia kliniczna (w tym weterynaryjna), fotosynteza, fizjologia roślin i chemia rolna, fizjologia i żywienie zwierząt, metabolizm drobnoustrojów, wirusologia. Należy tu jednak stwierdzić, że postęp starań w zakresie zdobycia odpowiedniej aparatury nie idzie w parze z całokształtem prac organizacyjnych zmierzających do wdrożenia metodyki izotopowej.

2.3. Zagadnienie to wiąże się ściśle ze sprawą ogólną aparatury. Rozwój badań biochemicznych w najbliższym pięcioleciu musi liczyć się z dwiema zasadniczymi trudnościami, jakie już w chwili obecnej poważnie ograniczają możliwości badawcze tj. z niedostateczną ilością kadr specjalistycznych i z zupełnym (wyjąwszy Wrocław) brakiem nowoczesnego wyposażenia w przyrządy badawcze. Sprawy kadrowe omówione zostaną w specjalnym punkcie niniejszego sprawozdania. Odnośnie aparatury należy stwierdzić, że już nie raz wysuwano na zebraniach Komitetu konieczność usprawnienia działalności Komisji Aparaturowej oraz ewentualność powołania pełnomocnika do spraw aparatury Wydziału II, który pozostawałby w bezpośrednim kontakcie z zainteresowanymi Komitetami i placówkami PAN a którego działalność byłaby podstawą do stworzenia puli aparaturowej Wydziału II. Z puli tej mogłyby korzystać nie tylko zakłady PAN, ale i placówki dotowane dla wykonania szczególnie ważnych zadań.

2.4. Podstawowym zadaniem wysuniętym przez Komitet Biochemiczny na najbliższe 5-letnie, jest wyszkolenie pracowników, którzy później stanowiąc będą kadrę biochemiczną zakładów biochemii stosowanej przewidywanych w niemal wszystkich planowanych przez PAN instytutach biologicznych oraz przyrodniczych instytutach resortowych. Brak jest u nas w tej chwili biochemików dla zaspokojenia potrzeb służby zdrowia, rolnictwa, hodowli, przemysłu spożywczego, farmaceutycznego, zakładów Min. Szkół Wyższych, gdyż biochemia nie zajmuje dotychczas należytego jej miejsca w kształceniu przyrodników w szerokim rozumieniu tego słowa. Racjonalnym rozwiązaniem wstępnym istniejących trudności jest stworzenie studium biochemicznego w szkole wyższej. Komitet Biochemiczny jako wstęp do zor-

ganizowania studium zapronował, co zostało zaakceptowane i ustanowione zarządzeniem PKPG, uznanie biochemii za oddzielny zawód w kierunku biologicznym.

11.V.1955 r. odbyło się w związku z tym zebranie prezydium Komitetu Biochemicznego z przedstawicielami zainteresowanych resortów i Komitetów PAN. Na zebraniu tym a także na odbytej później konferencji odpowiedniego zespołu Rady Głównej MSW ustalono ramowy program studiów biochemicznych. Projekt ten został przyjęty w dn. 18.VI.55 r. i przewidywał lata pierwszy i drugi studiów — wspólne dla specjalizacji biochemii i mikrobiologii. Na roku trzecim biochemia miałaby program odmienny, na roku 4-tym również odmienny, a rok 5-ty przewidywałby szereg przedmiotów specjalnych do wyboru i pracownię specjalną. Studia kończyły się pracą i egzaminem magisterskim. Sprawa studium biochemicznego jest w chwili obecnej rozpatrywana w MSW.

3. DZIAŁALNOŚĆ WYDAWNICZA

Działalność wydawnicza Komitetu opiera się na 2 kwartalnikach: „Acta Biochimica Polonica“ i „Postępy Biochemii“. „Acta Biochimica Polonica“ są pierwszym i jedynym w historii nauki polskiej czasopismem drukującym wyłącznie eksperymentalne prace biochemiczne. „Acta“ umożliwiają szybką publikację dorobku polskich laboratoriów. Dowodem potrzeby takiego czasopisma jest ilość prenumeratorów (418) o wiele większa od ilości prenumerat innych czasopism naukowych tego typu wydawanych przez PAN. Wymiana zagraniczna „Acta“ (ponad 300 egzempl.) dowodzi uznania z jakim spotkało się pismo w światowych kołach biochemików.

Jedną z bardzo ważnych form szkolenia kadr młodych biochemików są „Postępy Biochemii“ publikujące materiały zjazdów biochemicznych i prace przeglądowe z obszernym udokumentowaniem, źródłową literaturą na temat podstawowych zagadnień teoretycznych i praktycznych. „Postępy Biochemii“ umożliwiają w najszerszym czasie zapoznanie się z podstawowymi osiągnięciami biochemii studentom i asystentom Akademii Medycznych, Wyższych Szkół Rolniczych, odpowiednich wydziałów Uniwersytetów i Politechnik, pracownikom sanitariatu, pracownikom produkcji i kontroli produkcji przemysłu rolnego, spożywczego, farmaceutycznego i pracownikom naukowym zbliżonych gałęzi nauk przyrodniczych. Ilość prenumeratorów tego młodego, bo ukazującego się jako kwartalnik pierwszy rok, czasopisma wynosi jedynie w ramach Ośrodka Rozpowszechniania Wyd. Nauk. PAN — 121 osób, nie licząc prenumeraty przez „Ruch“. Sprawa utrzymania „Postępów Biochemii“ jako kwartalnika Komitetu jest żywotnym interesem biochemików polskich.

Prócz swych wydawnictw Komitet prowadzi akcję opiniującą i redaguje wydawnictwa biochemiczne (poprzez swych przedstawicieli) dla PWN, PZWL czy PWRiL.

4. ZJAZDY I KONFERENCJE

4.1. Odbyte w roku sprawozdawczym VI Sympozjum o kwasach nukleinowych i nukleoproteidach w Łodzi i zorganizowane siłami miejscowego środowiska biochemicznego (prof. A. Dmochowski i prof. Br. Filipowicz) zarówno bogactwem programu jak i liczebnością uczestników (400 osób) przewyższało poprzednie.

Tematyka obrad obejmowała 5 grup zagadnień:

1. Historia kwasów nukleinowych w uwzględnieniu dorobku biochemii polskiej w tej dziedzinie. — Referował prof. B. Skarżyński.

2. Biochemia statyczna kwasów nukleinowych i nukleoproteidów. Ta grupa zagadnień uwzględniała budowę kwasów nukleinowych (prof. Br. Filipowicz),

przestrzenną budowę ich cząsteczek (dr W. Leyko), wreszcie budowę nukleoproteidów (mgr H. Panusz i mgr W. Drabikowski).

3. Biochemia dynamiczna problemu i sprawy lokalizacji to trzecia grupa zagadnień. Mgr B. Rodkiewicz, mgr A. Przełęcka i lek. H. Poznańska przedstawili zagadnienie kwasów nukleinowych w komórce. Doc. dr J. Meduski mówił o nukleoproteidach w genetyce biochemicznej. Prof. A. Dmochowski i lek. L. Kłyszajko opracowali zagadnienia kwasów nukleinowych wirusów i bakterii. Doc. dr D. Shugar przedstawił rozkład enzymatyczny kwasów nukleinowych.

4. Czwartą grupę zagadnień stanowiły zagadnienia metodyczne. Właśnie obrady metodyczne były cenną pomocą wielu młodym polskim biochemikom w ich pierwszych kontaktach doświadczalnych z obszernym terenem badań. Mgr W. Drabikowski i lek. B. Wiśniewska przedstawiły zasady preparatyki nukleoproteidów. Mgr W. Więckowski i mgr S. Witkowski powiedzieli o chemicznych metodach analitycznych kwasów nukleinowych. Mgr E. Sempłowska opracowała chromatografię kwasów nukleinowych. Mgr S. Gross i H. Panusz szczegółowo zebrali metody spektrofotometryczne, a mgr Golewski i mgr Pilek wygłosili referat o jonoforezie, polarografii i nefelometrii. Metody histochemiczne opracowała mgr A. Przełęcka.

5. Piątą, oddzielną częścią Sympozjum były komunikaty własnych prac eksperymentalnych związanych z tematyką Sympozjum. Zdano tu sprawę z 20 prac dotychczasowymi.

Materiały referatowe Sympozjum ukazują się w kolejnych numerach „Potsepów Biochemii“.

4.2. W lecie 1955 roku odbył się w Brukseli trzeci z kolei Kongres Biochemików. Dwa poprzednie: w 1949 roku w Cambridge i w 1952 r. w Paryżu odbywały się z udziałem stosunkowo nielicznych delegacji polskich. W Kongresach tych nie zgłoszono żadnych polskich prac. Rozwój biochemii polskiej i jej postęp organizacyjny umożliwiły w roku 1955 wysłanie do Brukseli 7 biochemików, a mianowicie: prof. dr Józefa Hellera, prof. dr Włodzimierza Niemierki, prof. dr Tadeusza Baranowskiego, prof. dr Bolesława Skarżyńskiego, prof. dr Ignacego Reifera, prof. dr Tadeusza Korzybskiego, dr Andrzeja Morawieckiego. (Kand. nauk Leszek Wojtczak nie wziął udziału w Kongresie z powodu choroby).

Komitet Biochemiczny zaakceptował i wysłał na obrady kongresowe szereg doniesień pracowni polskich.

Ze względu na szczególną wagę omawianych na Kongresie badań oraz na to, że badania te ukażą się w formie publikacji w międzynarodowych czasopismach biochemicznych świata dopiero po upływie około 2-3 lat po wygłoszeniu ich na Kongresie, Komitet Biochemiczny Polskiej Akademii Nauk zdecydował zorganizować jeszcze w tym samym roku, w którym odbył się Kongres Brukselski, konferencję sprawozdawczą z Kongresu.

Konferencja ta mająca postać organizacyjną kolejnego sympozjum biochemicznego odbyła się w dniach 28 i 29 listopada 1955 roku w Warszawie. Zanim zajmemy się sprawozdaniem z Konferencji, należy przedstawić krótko plan i zakres obrad III Kongresu Biochemii. Obrady przebiegały w 17 sekcjach, z których każda zorganizowała zebranie lub zebrania plenarne, na których ogłaszano referaty programowe sekcji. Ponadto wszyscy uczestnicy kongresu wysłuchali dwóch odczytów plennarych: wstępnego odczytu i odczytu końcowego. A oto program zajęć poszczególnych sekcji:

1 Sekcja: obradowała nad zagadnieniami chemii organicznej związków posiadających znacznie biologiczne. Wykłady programowe tej sekcji dotyczyły chemii i biochemii antymetabolitów zbliżonych do puryn (autorzy wykładu: G. H. Hitching i G. B. Elion) oraz chemii mukopolisacharydów (R. W. Jeanloz).

2 Sekcja: obradowała nad chemią i fizykochemią białek i polipeptydów. Wykłady programowe omawiały biosyntezę peptydów i białek (H. Borsook) oraz strukturę polipeptydów i białek (A. Elliott).

3 Sekcja: Przedmiotem obrad była tu chemia i fizykochemia nukleoproteidów i kwasów nukleinowych, a wykłady programowe omawiały postacie natywną i zdenaturowaną kwasu dezoksyrybonukleinowego oraz chemię kwasów rybonukleinowych. Referentami byli tu P. Doty i N. Simmons oraz R. Markham.

4 Sekcja: Obradowała nad problemami ściśle enzymologicznymi, a wykłady programowe dotyczyły rozwoju układu hemoproteidowego indukowanego przez tlen, jako przykład adaptacji oddechowej (referował Piotr Słonimski), a także heksozomonofosforanowej drogi utleniania u drożdży i w tkankach zwierzęcych (F. Dickens).

5 Sekcja: obradowała nad przemianą pośrednią szczególnie zajmując się biosyntezą porfiryn (D. Shemin) i cyklem fotosyntetycznym (M. Calvin). Wykładem programowym ponadto był w ramach tej sekcji wygłoszony referat G. L. Cantoni o mechanizmach enzymatycznych i znaczeniu biologicznym reakcji transmetylacji.

6 Sekcja: utleniania biologiczne i fosforylacje z utlenieniem. Referatem programowym był tu wykład E. C. Slatera o łańcuchach fosforylacji.

7 Sekcja zajęła się regulacjami biochemicznymi szczegółowo omawiając nukleotydy, jako czynniki koordynujące wzrost i czynność (S. V. Perry), strukturę komórkową i przemianę oraz hormonalną kontrolę przemiany.

8 Sekcja. W sekcji tej, omawiającej biochemię komórki, szczegółowiej obradowano nad znaczeniem genetycznym kwasów dezoksyrybonukleinowych wirusów (O. Maaloe) i nad zależnościami wśródkomórkowymi (A. E. Mirsky mówił tu o biochemicznych aspektach jądra komórkowego).

9 Sekcja: biochemia mięśnia i ośrodkowy układ nerwowy. Wykładami programowymi tej Sekcji był referat A. W. Palladina o biochemii mózgu i H. H. Webera o kurczliwym układzie mięśni i komórek.

10 Sekcja omawiała biochemię drobnoustrojów, a zwłaszcza polipeptydy o charakterze antybiotyków (referat programowy L. C. Craiga) i wcielanie aminokwasów przez gronkowce o zniszczonej strukturze komórkowej (E. Gale).

11 Sekcja radziła nad biochemią roślin i biochemią gleby, a wykładem programowym były zagadnienia biologicznego wiązania azotu (A. I. Virtanen).

12 Sekcja — zbiorowy tytuł prac tej Sekcji brzmiał: „Zoologia chemiczna”. Szczególnie omawiano czynniki wpływające na zjawisko czynnego transportu jonów (H. H. Ussing i B. Andersen).

13 Sekcja omawiała sprawy związane z żywieniem, a zwłaszcza efekt antybiotyków na zapotrzebowanie żywieniowe zwierząt (E. L. R. Stokstad) i efekty podawania antybiotyków na mikroflorę jelitową zwierząt (L. Y. Quinn). Sprawy te także podnieśli M. E. Coates i Stanisław Kazimierz Kon, mówiąc o bakteriologicznych następstwach pobudzania wzrostu przez antybiotyki.

14 Sekcja omawiała biochemię ustrojów poddanych działaniu promieniowania jonizującego.

15 Sekcja nosiła nazwę chemicznej farmakologii, a obrady skupiały się głównie wokół zagadnień znieczulania.

16 Sekcja klinicznej chemii szczegółowej omówiła oznaczania steroidów we krwi i moczu. Na ten temat miał wykład programowy G. F. Marrian.

17 Sekcja zajmowała się biochemią przemysłową dokładniej traktując nieazotowe związki w przemianie pleśni.

Z powyższego zestawienia wynika jasno, że dwudniowa konferencja sprawozdawcza Komitetu Biochemicznego mogła jedynie naświetlić podstawowe kierunki obrad Kongresu, zajęć się oryginalniejszymi jego tematami i szczegółowiej omówić tylko takie prace, które wyraźnie odegrały nieprzeciętną rolę w rozwoju biochemii.

Ponadto do obrad konferencji sprawozdawczej włączono wyniki sympozjum w Gandawie, którego obrady zbiegły się czasowo z Kongresem, a dotyczyły przemiany tłuszczowców.

Na Konferencji referowali wszyscy uczestnicy Kongresu Brukselskiego z wyjątkiem chorego prof. Korzybskiego, który jednak swoje materiały przygotuje do publikacji razem z całością materiałów konferencji sprawozdawczej w „Postępach Biochemii”. Oczywiście podział materiału referowanego uwzględniał podstawowe kierunki badawcze referujących. Prof. Niemierko omawiał zagadnienia tłuszczowców i biochemii porównawczej, prof. Baranowski — sprawy związane z białkami i ich biosyntezą, prof. Skarżyński — zagadnienia chemii klinicznej, żywienia, patologii i immunochemii; prof. Reifer referował cykl fotosyntetyczny, dr Morawiecki — enzymologię ogólną i biochemię mięśni, a prof. Heller — fosforylację, utleniania i regulacje biochemiczne.

Konferencja ta była nie tylko pierwszą imprezą tego typu w Komitecie Biochemicznym PAN, lecz także stanowiła novum dla Polskiej Akademii Nauk. Żywa dyskusja w czasie obrad Konferencji Sprawozdawczej i wysoka frekwencja (ponad 400 uczestników z wszystkich ośrodków biochemicznych w Polsce), pozwalają sądzić, że spełniła ona swoje zadanie zaznajomienia ogółu polskich biochemików z podstawowymi problemami biochemii światowej. Uzupełnieniem Konferencji będą materiały, które ukażą się w jednym z zeszytów „Postępów Biochemii” w r. 1956.

Po wyczerpaniu porządku obrad przewodniczący nawiązał doraźną dyskusję z salą nad wyborem formy referowania obrad kongresowych. Ilustracją istniejących możliwości było omawiane zebranie sprawozdawcze Komitetu, na którym zaznaczyły się trzy typy relacjonowania:

- a) reportażowy z szerokim uwzględnieniem kolorytu lokalnego i materiału anegdotycznego Kongresu,
- b) monograficzny przystępnego, a wyczerpującego omówienia pewnego wybranego wykładu,
- c) eklektyczny, gdzie kolejno naświetlano różne wybrane zagadnienia podnosząc momenty nowe i szczególnie ważne.

Zebrani wypowiedzieli się za utrzymaniem w przyszłości wszystkich trzech typów zdawania sprawy. Entuzjastami drugiego typu byli goście z pogranicza biochemii i młodzi biochemicy.

5. KONTAKTY Z ZAGRANICĄ

Rok sprawozdawczy był rokiem przełomowym dla międzynarodowych kontaktów biochemicznych. Na zebraniu organizacyjnym w styczniu 1955 r. przedstawiciele biochemii różnych krajów uchwalili powołanie do życia Międzynarodowej Unii Biochemicznej. Unia jednoczy przedstawicielstwa biochemików poszczególnych państw, w tym Polski, organizuje kongresy biochemiczne, pomaga w wymianie zdobyczy

naukowych. W obradach II plenarnego zgromadzenia Unii odbytych 1.VIII.55 w Brukseli brał udział przewodniczący Komitetu prof. J. Heller.

Ponadto w roku sprawozdawczym prof. I. Reifer obecny był na obradach konferencji dla pokojowego wykorzystania energii atomowej w Genewie, a prof. Niemierko brał udział w Kongresie Biochemicznym w Związku Radzieckim.

Biochemia polska utrzymuje stałe kontakty naukowe ze swymi węgierskimi, czeskimi i niemieckimi (NRD) kolegami.

6. POPULARYZACJA BIOCHEMII

Członkowie Komitetu biorą udział w pracach sekcji przy Zarządzie Głównym TWP oraz w pracach Tow. im. Kopernika.

SPIS TREŚCI

	Str.
B. Skarżyński — Dzieje zagadnienia kwasów nukleinowych . . .	3
Br. Filipowicz — Budowa kwasów nukleinowych	15
Wanda Leyko i Bronisław Filipowicz — Przestrzenna budowa kwasów nukleinowych	61
H. Panusz — Budowa nukleoproteidów	77
Władysław Więckowski, Sławomir Witkowski — Chemiczne metody analityczne kwasów nukleinowych	91
Stanisław Gross — Spektrometria związków nukleinowych . . .	107
Elżbieta Sempńska — Metody chromatograficzne w dziedzinie kwasów nukleinowych	131
Stanisław Magdas — Badania dotyczące metodyki elektroforezy bibułowej białek surowicy krwi	157
Sprawozdanie z działalności Komitetu Biochemicznego w roku 1955 . .	191



Cena zł 15.—



<http://rcin.org.pl>