

Analiza chemiczna i spektrofotometryczna oczyszczonego i wydzielonego RNA z kielków jęczmienia (*Hordeum sativum*) metodą fenolową i chloroformową

J. WIŚNIEWSKA, B. MORAWIECKA, J. PACHA, J. LEMBAS

Zakład Biochemii Molekularnej Instytutu Botaniki i Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego,
Wrocław, Szewska 38/39

Abstract:

J. Wiśniowska B. Morawiecka, J. Pacha, J. Lembas. *Department of Molecular Biochemistry, Institute of Botany and Biochemistry, University of Wrocław, Wrocław, Szewska 38/39, Poland.* (Received: September 14, 1970).

Chemical and spectrophotometric analysis of purified RNA isolated the chloroform and phenol methods from barley germs (Hordeum sativum)

Two different ribonucleic acids were isolated from barley germs by use of the phenol (RNA I) and chloroform method (RNA II). After separation on Sephadex G-200 RNA I was found to be homogenous, whereas RNA II showed 5 components. Furthermore, both preparations differed in chemical composition and spectrophotometric specificity.

WSTĘP

W ostatnich latach szerokie zastosowanie do wydzielania RNA z tkanek roślinnych i zwierzęcych znalazła fenolowa metoda Kirby'ego (1956) w modyfikacji Ralphi i Bellamy (1964) oraz Clicka i Hacketta (1966). Trudności w wydzielaniu z tkanek niezdegradowanego RNA związane są z obecnością rodzimych rybonukleaz oraz w usuwaniu obojętnych i kwaśnych polisacharydów, pektyn i glikoproteidów.

W pracy tej porównano niektóre właściwości fizyczne i chemiczne RNA kielków jęczmienia, wydzielonego za pomocą metody chloroformowej wg Sevaga i wsp. (1938) i fenolowej w modyfikacji Clicka i Hacketta.

MATERIAŁ I METODA

Materiałem do badań były cztero- lub sześciodniowe kielki jęczmienia jarego odmiany browarnianej 'Wisa Breuns' ze zbioru 1969 r. Ziar- niaki jęczmienia kielkowano na nawilżonej wodą destylowaną bibule w kuwetach w temperaturze ok. 22°.

Odczynniki chemiczne stosowane do badań pochodziły z następują- cych firm: orcyna i ryboza — B.D.H., Anglia, dezoksyryboza — Koch- Light Labor., Anglia, albumina surowicy wołu — Sigma, U.S.A., dezoksy- cholan sodu — Polfa — Jelenia Góra, Sephadexs G-200 Phar. Fine Chem., Szwecja. Pozostałe odczynniki były produkcji POCH w Gliwicach.

Azot oznaczano mikrometodą Kjeldahla, do spalań używano mie- szanki katalizującej wg Chibnalla (1943), a do wiązania amoniaku uży- wano 2% kwasu borowego. Białko oznaczano mikrometodą Lowry'ego (1951) wobec standartu albuminy surowicy wołu. Pentozy oznacza- no metodą orcynową wg Mejbaum (1939). Dezoksy-pentozy ozna- czano metodą Dischego (1962). Cukier całkowity oznaczano metodą fenolową wg Dubois (1956). Fosfor oznaczano metodą Horeckera w modyfikacji Filipowicza i wsp. (1960).

Pomiarów absorpcji (E) roztworów RNA w UV dokonywano w spek- trofotometrze typu VSW-1, Carl Zeiss, Jena, wobec roztworu ekstrahu- jącego w metodzie fenolowej i wobec wody destylowanej w metodzie chloroformowej.

Chromatografię preparatów RNA na żelu Sephadexs G-200 przepro- wadzano w kolumnach o wymiarach 20,5 cm × 1,6 cm, objętość całkowi- ta kolumny $V_b = 43 \text{ cm}^3$, pusta objętość $V_0 = 14 \text{ cm}^3$. Szybkość wypływu z kolumny wynosiła 10 ml/godz., lub 12 ml/godz. Zbierano frakcje o obję- tości 3 ml. Sephadexs równoważono oraz eluowano RNA z kolumny bufo- rem octanowo-wersenianowym o pH 5,0, używanym do ekstrakcji w me- todzie fenolowej.

Przygotowanie materiału do ekstrakcji: etiolowane kielki jęczmienia odwadniano alkoholem etylowym i eterem, suszono w tempe- raturze 37° przez 1 godz., po czym zamrażano w stałym CO₂ i rozciera- no w moździerzu.

Metoda fenolowa wydzielania RNA wg Clicka i Hacketta (1966). Roztartą tkankę z sześciodniowych kielków, homogenizowano w 4° przez 25 min. przy 6 tys. obr./min. z trzykrotną objętością ekstrahu- jącego (w/v). Do ekstrakcji stosowano roztwór o następującym składzie: a) bufor octanowo-wersenianowy o pH 5,0 (0,1 M octan sodu, 0,1 M NaCl, 0,1 M wersenian dwusodowy w stosunku objętościowym 1:1:1) z dodatkiem 1% dezoksycholanu sodu i 0,5% bentonitu, b) nasycony roztwór fenolu, przygotowany przez rozpuszczenie 500 g redestylowanego fenolu w 160 ml 0,001 M wersenianu dwusodowego. Roztwór ekstrahujący otrzymano

przez zmieszanie a) i b) w stosunku objętościowym 1:2. Po odwirowaniu przy 2,5 tys. obr./min. w 4° przez 10 min., górną warstwę zawierającą RNA ściągano, następnie usuwano resztki fenolu przez dodanie trzech objętości oziębionego eteru. Po usunięciu eteru, RNA wytrącano dwiema objętościami 96% etanolu w temperaturze -15° przez 30 min. Zawiesinę wirowano 10 min. przy 3 tys. obr./min. w temperaturze -15°. Osad rozpuszczano w oziębionym do 4° buforze octanowo-wersenianowym o pH 5,0. Wytrącony z buforu octanowo-wersenianowego surowy preparat RNA przechowywano w formie zawiesiny w temperaturze 4°. Do analizy spektrofotometrycznej zawiesinę RNA odwirowywano i osad rozpuszczano w buforze octanowo-wersenianowym o pH 5,0. Do analizy chemicznej surowy preparat RNA I przemywano acetonem i suszono, przechowywano w eksykatorze nad P₂O₅.

Metoda chloroformowa wydzielania RNA wg Sevaga i wsp. (1938). Roztartą tkankę czterodniowych kielków jęczmienia ekstrahowano mieszaniną 0,5 M NaCl i 0,015 M cytrynianu sodu (1:5 v/v) przez 10 min. przy 12 tys. obr./min. w temperaturze 4°. Homogenat ogrzewano przez 30 min. w temperaturze 50° z dodatkiem 1/5 objętości chloroformu. Mieszaninę poddawano homogenizacji przez 3 min. W celu oddzielenia warstwy wodnej od pozostałych, mieszaninę wirowano przy 4,5 tys. obr./min. przez 30 min. RNA z wdanej warstwy wytrącano trzema objętościami alkoholu etylowego przez 24 godz. w 4°. Surowe preparaty RNA wirowano w temperaturze 4° przez 10 min. przy 4 tys. obr./min., przemywano zimnym acetonem trzykrotnie, następnie suszono pod pompą próżniową i przechowywano w eksykatorze nad P₂O₅ w temperaturze 4°. Surowe preparaty RNA II poddawano w tych samych warunkach powtórnej ekstrakcji chloroformem.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Preparaty RNA uzyskane metodą fenolową (I) i chloroformową (II) poddano analizie chemicznej, spektrofotometrycznej oraz rozdzielowi na kolumnie z Sephadeksu G-200.

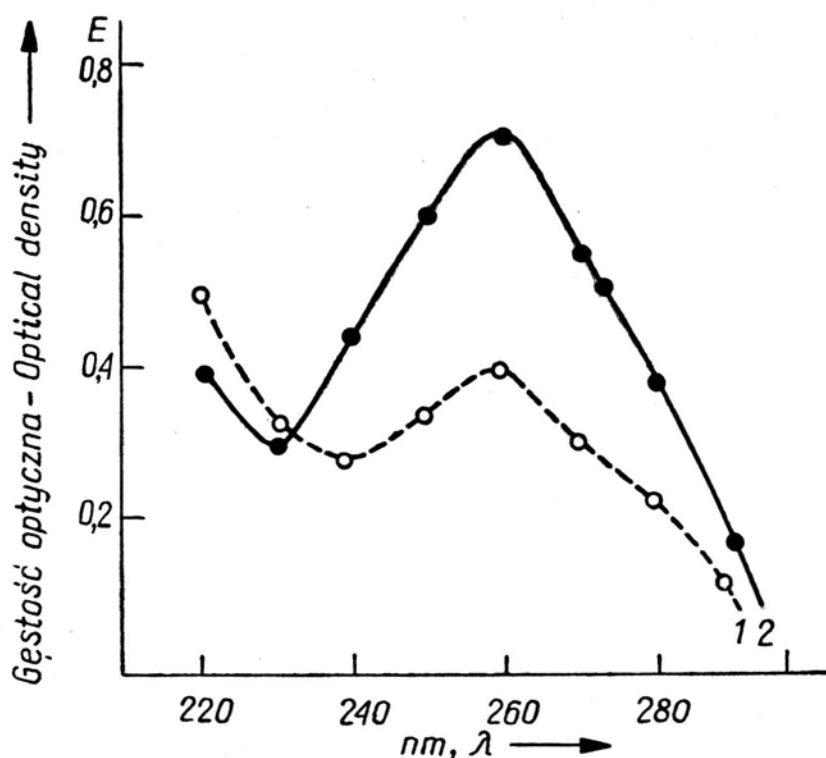
Wyniki analizy chemicznej preparatów RNA uzyskanych metodą fenolową i metodą chloroformową zebrano w tabeli 1. Preparat I charakteryzuje się śladową zawartością białka i DNA. Azot całkowity wynosi 8,25% suchej masy preparatu, a fosfor 5,5%. Współczynnik $\frac{N}{P}$ wynosi 1,50. Cukry całkowite stanowią 37,5% a ryboza 18,5% suchej masy. Analiza chemiczna preparatu RNA, uzyskanego metodą fenolową, wskazuje na jego wysoki stopień oczyszczenia tak od materiału białkowego, jak i od cukrów. Preparat II zawiera 0,4% białka oraz zanieczyszczenia przeszką-

Tabela 1 — Table 1

Skład chemiczny surowych preparatów RNA kielków jęczmienia jarego
otrzymanych metodą fenolową (I) oraz metodą chloroformową (II)

Chemical analysis of crude RNA preparation from barley germs obtained by the
phenol (I) and chloroform (II) method

Pre- parat Pre- para- tion	Cukier całko- wity Total sugar %	Ryboza Ribose %	Dezoksy- ryboza Deoxy- ribose %	Białko Protein %	Azot Nitrogen %	Fosfor Phos- phorus %	N P	Cukier P Sugar P
I	37,5	18,5	śląd trace	śląd trace	8,25	5,50	1,50	6,82
II	40,8	—	0,40	0,40	1,96	1,24	1,58	32,90



Ryc. 1. Widma absorpcyjne surowych preparatów RNA kielków jęczmienia jarego
1 — RNA otrzymany metodą chloroformową; 2 — RNA otrzymany metodą fenolową
Ekstynkcję odczytywano w naczyniach o grubości warstwy 1 cm.

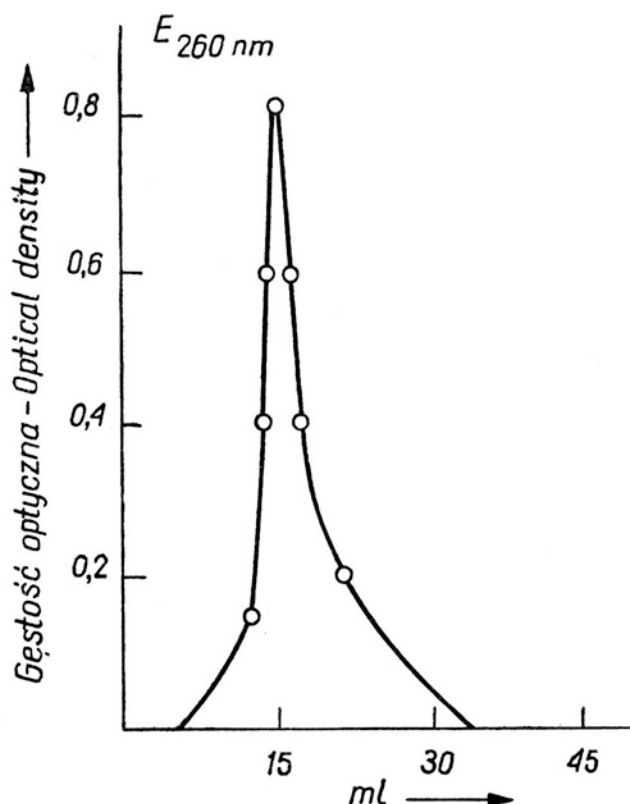
Fig. 1. Absorbance spectrum of crude RNA preparations from spring barley germs
1 — RNA obtained by the chloroform method; 2 — RNA obtained by the phenol method.
Extinction was read in 1 cm cells.

dzające w oznaczeniu rybozy. W stosunku do preparatu I, preparat II zawiera około pięciokrotnie więcej cukru całkowitego na jednostkę wagową fosforu. Współczynnik $\frac{N}{P}$ wynosił 1,58.

Widma absorpcyjne preparatów RNA w UV przedstawiono na ryc. 1. Roztwory obu preparatów RNA posiadają charakterystyczne dla kwasów nukleinowych maksimum absorpcji przy 260 nm, natomiast minimum absorpcji dla preparatu I przypada na 230 nm, a dla preparatu II przypada na 240 nm.

Surowe preparaty RNA poddano rozdzielowi na kolumnie z Sephadeksem G-200. Rozdział preparatu I i II po wypływie z kolumny przedstawiono na ryc. 2 i 3. Maksymalna ilość naniesionego na kolumnę RNA wypływa w 15-tym ml eluatu, a V_0 kolumny wynosi 14 ml. Obraz wypływającego RNA daje symetryczną krzywą. Wyniki uzyskane po rozdziale na kolumnie przemawiają za homogennością makrocząsteczkowego RNA wydzielonego z kielków jęczmienia za pomocą metody fenolowej. Preparat II RNA ulega rozdzielowi na 5 frakcji: frakcja I wypływa z kolumny w 15 ml, a frakcja III wypływa między 24 a 42 ml eluatu. Obie te frakcje stanowią główne składniki badanego preparatu. Wydzielanie RNA z kielków jęczmienia metodą chloroformową daje materiał polidispersyjny, w którym tylko frakcję I można porównać z całym preparatem RNA I uzyskanym metodą fenolową.

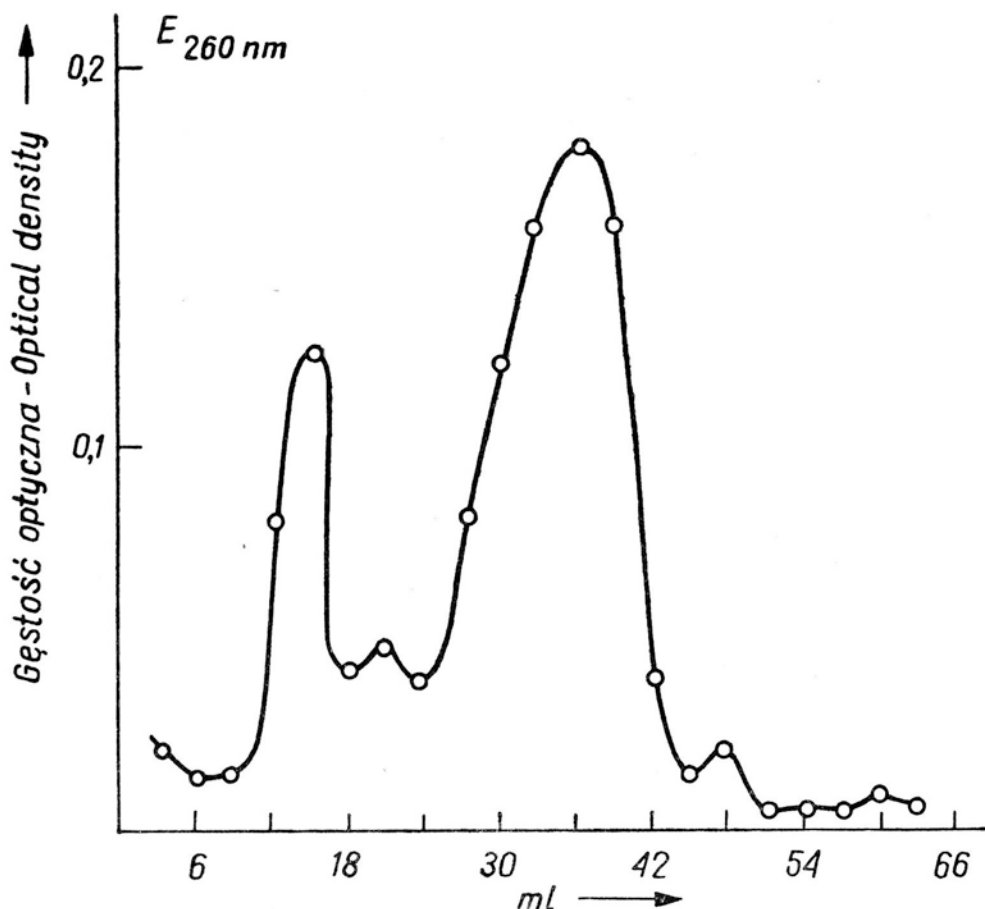
Dla zilustrowania stopnia oczyszczenia surowych preparatów RNA w porównaniu z preparatami RNA otrzymanymi po rozdziale na kolumnie z sephadexem, przeprowadzono analizę spektrofotometryczną. Obliczono stosunki wartości ekstynkcji dla kilku długości fal. Wartości te przedstawiono w tabeli 2. Dla czystych preparatów RNA wartości te przedstawiają się następująco: 220/260 wynosi 0,5; 250/260 wynosi od 0,6 do 0,7; 280/260 wynosi od 0,4 do 0,5. W porównaniu z czystymi preparatami RNA wydzielonymi z drożdży lub pszenicy przez Allena (1962) i Ceriotti (1955), surowy preparat RNA II wykazuje około trzykrotnie wyższy stosunek absorpcji 220/260, natomiast dla surowych preparatów I stosunek ten wynosi 0,48, co może świadczyć o małej zawartości zanieczyszczeń cukrowych i aminocukrowych (Shugar i wsp. 1964). Wartości stosunku obliczone dla ekstynkcji 250/260 w obu preparatach wynoszą około 0,90 i są wyższe od opisanych dla jednorodnych preparatów RNA drożdżowego. Stosunek wartości ekstynkcji 280/260 przed rozdzielaniem na kolumnie dla preparatu I wynosił 0,48 a dla preparatu II 0,57. Obie te wartości wskazują na małe zanieczyszczenia materiałem białkowym badanych preparatów. Preparat I po wypływie z kolumny nie zmienił swojej charakterystyki spektrofotometrycznej. Preparat II po rozdziale na kolumnie okazał się materiałem polidispersyjnym, z którego frakcję pierwszą i trzecią poddano analizie spektrofotometrycznej. Frak-



Ryc. 2. Rozdział RNA wydzielonego metodą fenolową z kielków jęczmienia jarego na Sephadexie G-200. Surowy preparat RNA I eluowano z kolumny buforem octanowo-wersenianowym o pH 5,0

Fig. 2. Separation on Sephadex G-200 of RNA isolated by the phenol method from barley germs. Crude RNA was eluted from the column with acetate-EDTA buffer, pH 5.0

cja pierwsza RNA II w porównaniu do preparatu II przed naniesieniem na Sephadex G-200 wykazuje znaczne obniżenie wartości stosunku ekstynkcji 220/260, a pozostałe wartości stosunku ekstynkcji są zbliżone do wartości RNA II przed rozdziałem. Frakcja trzecia preparatu II natomiast posiada wyższą wartość stosunku ekstynkcji 280/260 i niższą wartość stosunku ekstynkcji 280/260 w porównaniu z całym preparatem II. Wyniki tej analizy wskazują na oczyszczenie frakcji pierwszej z materiału aminocukrowego, a frakcji trzeciej z materiału białkowego. W oparciu o analizę chemiczną i spektrofotometryczną wykazano, że preparacja RNA z kielków jęczmienia metodą chloroformową prowadzi do uzyskania mieszaniny RNA zawierającej białka i substancje drobnocząsteczkowe. Izolacja RNA z kielków jęczmienia metodą fenolową w porównaniu do



Ryc. 3. Rozdział RNA wydzielonego metodą chloroformową z kielków jęczmienia jarego na Sephadexie G-200. Surowy preparat RNA II eluowano z kolumny buforem octanowo-wersenianowym o pH 5,0

Fig. 3. Separation on Sephadex G-200 of RNA isolated by the chloroform method from barley germs. Crude RNA was eluted from the column with acetate-EDTA buffer, pH 5.0

chloroformowej pozwala na otrzymanie makrocząsteczkowego i homogennego preparatu RNA pozbawionego białka i substancji drobnocząsteczkowych.

STRESZCZENIE

Z kielków jęczmienia jarego (*Hordeum sativum*) wydzielono kwas rybonukleinowy (Preparat RNA I) metodą fenolową wg modyfikacji Clicka i Hacketta (1966), oraz metodą chloroformową (Preparat RNA II). Podano ich charakterystykę chemiczną, spektrofotometryczną oraz poddano je rozdzielaniu na kolumnie z Sepha-

Tabela 2 — Table 2

Stosunki wartości ekstynkcji preparatów RNA otrzymanych metodą fenolową (I) oraz metodą chloroformową (II), przed i po rozdziale na Sephadexie G-200. Extinction ratios of RNA preparation obtained by the phenol (I) and chloroform (II) method, before and after separation on Sephadex G-200.

Materiał Material		$\frac{220^*)}{260}$	$\frac{250}{260}$	$\frac{280}{260}$
RNA I	przed rozdziałem before separation	0,48	0,90	0,48
	po rozdziale after separation	0,49	0,91	0,47
RNA II	przed rozdziałem before separation	1,43	0,93	0,57
	po rozdziale (szczyt I) after separation (peak I)	1,00	0,93	0,60
	po rozdziale (szczyt III) after separation (peak III)	1,94	0,97	0,49

*) Wartość ekstynkcji odczytanej w naczyniu o grubości warstwy 1 cm.
Extinctions were read in 1 cm cells.

deksem G-200. W analizie chemicznej wykazano, że preparat I zawierał: cukru całkowitego 37,5%, rybozy 18,5%, dezoksyrybozy ślad, azotu 8,25%, fosforu 5,5%, białka ślad, stosunek N/P wynosił 1,50. Preparat II zawierał: cukru całkowitego 40,8%, dezoksyrybozy 0,40%, azotu 1,96%, fosforu 1,24%, białka 0,40%, stosunek N/P wynosił 1,58. Rozdział preparatu I na Sephadexie G-200 dał pojedynczy szczyt symetryczny, preparat II dzielił się na pięć frakcji. Analiza spektrofotometryczna preparatu RNA I wykazała, że jest on pozbawiony zanieczyszczeń białkowych i drobnocząsteczkowych, a preparat RNA II zarówno przed naniesieniem, jak i po wypływie z kolumny z Sephadeksem G-200, wykazuje obecność białka i substancji drobnocząsteczkowych.

(Wpłynęło dn. 14.9.1970 r.)

SUMMARY

The isolation of ribonucleic acid from barley (*Hordeum sativum*) germs by the phenol method (RNA I) modified by Click and Hackett (1966) as well as by the chloroform method (RNA II) has been described. Both the RNA preparations were separated on Sephadex G-200 and their chemical and spectrophotometric characteristics are given. RNA I contained: total sugar 37,5%, ribose 18,5%, deoxyribose traces, nitrogen 8,25%, phosphorus 5,5%, traces of protein, the N/P ratio was 1,50. RNA II contained: total sugar 40,8%, deoxyribose 0,40%, nitrogen 1,96%, phosphorus 1,24%, protein 0,40%, the N/P ratio was 1,58. A single symmetric peak was obtained after separation on Sephadex G-200 for RNA I, and 5 components for RNA II. In spectrophotometric analysis it is free of protein and low-molecular-weight impurities, whereas some proteins and low-molecular-weight substances were associated with the RNA II preparation.

LITERATURA

- Allen F. W., 1962, Ribonucleoproteins and Ribonucleic Acid, Elsver. Publ. Co., New York, 11.
- Cerioti G., 1955, Biochem. J., 214, 59 - 70.
- Chibnall A. C., Rees M. W., Williams E. F., 1943, Biochem. J., 37, 354.
- Dische Z., 1962, Methods of Carbohydrate Chemistry, Academic Press, 1, 477.
- Dubois M., Gieles K. A., Smith F., 1956, Anal. Chem., 28, 350.
- Filipowicz B., Gniazdowski M., Więckowski M., 1960, Bull. WAM, Łódź 3, 145.
- Click R. E., Hackett D. P., 1966, Biochim. Bioph. Acta, 129, 74 - 84.
- Kirby K. S., 1956, Biochem. J., 64, 405.
- Lowry J. O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., 1951, J. Biol. Chem., 193, 265.
- Mejbaum W., 1939, Z. Physiol. Chem., 258, 117.
- Ralph R. K., Bellamy A. R., 1964, Biochim. Bioph. Acta, 87, 9 - 16.
- Sevag M. G., Lackman O. B., Smolens J., 1938, J. Biol. Chem., 124, 425.
- Shugar D., Laren A. D., 1964, Photochemistry of Proteins and Nucleic Acids, Academic Press. Inc., N. Y., London.