Izolowanie kwasu dezoksyrybonukleinowego z liści *Vicia faba*

Isolation of deoxyribonucleic acid from leaves of Vicia faba

H. URBANEK

WSTĘP

Otrzymanie czystych preparatów wysokomolekularnego kwasu dezoksyrybonukleinowego (KDN) z materiału zwierzęcego, a nawet bakteryjnego, nie przedstawia obecnie poważniejszych trudności, natomiast wyizolowanie tego kwasu z roślin pozostaje nadal zagadnieniem niedostatecznie rozwiązany. Trudności w otrzymywaniu KDN z materiału roślinnego wynikają przede wszystkim z niskiej jego zawartości. Ponadto, ponieważ materiał roślinny charakteryzuje się dużą zawartością różnych polisacharydów, stanowiących bądź to składniki błon komórkowych, bądź też materiały zapasowe, ekstrahowanie i oczyszczanie wyizolowanych preparatów KDN jest szczególnie trudne.

Potrzebę preparatów wysokopolimeryzowanego kwasu dezoksyrybonukleinowego pochodzenia roślinnego odczuwa się szczególnie przy badaniach nad strukturą KDN oraz jego właściwościami genetycznymi.

Dotychczas otrzymano szereg preparatów KDN z tkanek różnych roślin, ale otrzymano je za pomocą drastycznych metod ekstrakcji. Thomas i Sherratt (1956) ekstrahowali kwasy nukleinowe z liści roztworem NaCl, w temp. 100°C, a Trim (1959) ekstrahował je buforem fosforanowym również w temp. 100°C. Uzyskane tymi metodami preparaty były częściowo zdepolimeryzowane i mogły służyć raczej do badań nad składem zasad azotowych i właściwościami polinukleotydów.

Tylko nieliczne, jak dotąd, próby otrzymania KDN ze źródeł roślinnych przy zastosowaniu łagodnych środków ekstrakcji zostały uwieńczone powodzeniem. Do takich należy zaliczyć wyizolowanie przez Lipschitz i Chargaffa (1956) czystych preparatów dezoksyrybonukleinianu sodu z kielków pszenicy. Materiał użyty przez tych autorów okazał się bogaty w KDN, ale trudno jest go otrzymać w większych ilościach. Wang Tung-Yue i Commoner (1956) wyizolowali KDN z liści *Nicotiana tabacum*, a ostatnio Thomas (1959) donosi o otrzy-

maniu KDN z liści, łyka i tumorów marchwi. W dwóch ostatnich pracach autorzy nie podają parametrów (zawartość fosforu, zanieczyszczenia kwasem rybonukleinowym i białkiem) charakteryzujących czystość otrzymanych preparatów ani też uzyskanej wydajności.

Zadaniem niniejszej pracy było oznaczenie zawartości KDN w liściach szeregu roślin, w celu znalezienia materiału o możliwie wysokiej wydajności, oraz otrzymanie czystych preparatów wysokopolimeryzowanego kwasu dezoksyrybonukleinowego jak najbardziej łagodnymi metodami ekstrakcji.

MATERIAŁ I METODY

1. Materiał. Jako materiału do oznaczania zawartości KDN użyto młodych liści *Phaseolus vulgaris*, *Trifolium pratense*, *Lupinus luteus*, *Vicia faba*, *Urtica dioica* i *Nicotiana tabacum*, a do izolowania KDN — młodych liści *Vicia faba*.

2. Oznaczanie KDN. Frakcję kwasu dezoksyrybonukleinowego ekstrahowano według metody Ogura i Rosen (1950), zmodyfikowanej przez Urbanka (1960) i określano w niej ilość KDN w oparciu o reakcję Dischego (1930). Jako wzorzec używany był KDN firmy The British Drug Houses.

W celu oznaczenia suchej masy liście suszono w temperaturze 105°C w ciągu 8 godzin.

3. Otrzymywanie KDN z liści *Vicia faba*. W celu otrzymania KDN z liści *Vicia faba* opierano się na metodzie Kay (1952) wprowadzając do niej pewne modyfikacje.

100 g młodych liści *Vicia faba* zamrażano w temperaturze -6°C w ciągu 2 godzin, następnie rozdrabniano je w homogenizatorze przez 2 minuty w 250 ml 75% etanolu i odwirowywano przy 4000 obr./min. w ciągu 10 minut. Do osadu wprowadzano 400 ml mieszaniny alkoholowo-eterowej (1:1), wstrząsano przez 15 minut i sączono w lejkach Büchnera. Ekstrakcję mieszaniną alkoholowo-eterową powtarzano aż do całkowitego usunięcia barwników zwykle 3—4 razy. Tkanę suszono na powietrzu. Wysuszony biały proszek przemywano dwukrotnie 400 ml roztworu: 0,1 M NaCl + 0,05 M cytrynianu sodu, za każdym razem wstrząsając zawiesinę 5 minut i odwirowując osad w ciągu 15 minut przy 10 000 obr./min. Do osadu wprowadzano 400 ml 0,2 M NaCl + 36 ml 5% siarczanu dodecyłu sodu w 45% etanolu i wytrząsano 2 godziny. Mieszaninę wyciskano przez płótno, a do płynu dodawano NaCl aż do uzyskania 1 M roztworu i wytrząsano jeszcze 15 minut. Mieszaninę wirowano przy 10 000 obr./min. w ciągu 15 minut i w otrzymanym klarownym płynie wytrącano KDN przez dodanie 0,8 objętości etanolu. Włóknisty strął zbierano przez owijanie na bagietce szklanej i rozpuszczano

go w 200 ml 0,2 M NaCl + 18 ml alkoholowego roztworu siarczanu do-decyłu. Po rozpuszczeniu KDN dodawano NaCl do otrzymania roztworu o koncentracji 2 M i odstawiano na noc. Następnie wirowano go w ciągu 15 minut przy 10 000 obr./min. i w otrzymanym płynie wytrącano KDN jak poprzednio. Otrzymany preparat zanieczyszczony był jeszcze kwasem rybonukleinowym. W celu usunięcia KRN rozpuszczano preparat w 1 M NaCl i wytrącano KDN przez powolne wprowadzanie najpierw 0,5 obj. etanolu, a po usunięciu włóknistego strątu jeszcze 0,3 obj. etanolu, znów zbierając powstałe włókna KDN i łącząc je z otrzymanymi poprzednio. Czynność powyższą powtórzono dwukrotnie, po czym KDN przemyto kolejno 75%, 96% i absolutnym etanolem, następnie acetonem i eterem i suszono na powietrzu.

Oznaczanie fosforu w otrzymanych preparatach KDN wykonano wg metody Kutnera i Lichtensteina (1932) po wprowadzeniu do niej modyfikacji Krajewskiego i Urbanka (1961), zubożeniu płynu po mineralizacji.

KRN oznaczano na podstawie reakcji orcynowej (Schneider 1945), KDN na podstawie reakcji z dwufenylaminą (Dische 1930), a białko wykrywano według reakcji biuretovej.

WYNIKI

Wyniki doświadczeń zamieszczone są w tabelach 1 i 2.

Dane tabeli 1 wykazują duże różnice w zawartości kwasu dezoksyrybonukleinowego w liściach różnych gatunków roślin. Biorąc za punkt wyjścia wyniki odniesione do suchej masy zauważono, że liście *Vicia faba*, które charakteryzują się bardzo wysoką zawartością KDN, mają go około 20 razy więcej niż liście *Urtica dioica*.

Tabela 1 — Table 1

Zawartość KDN w młodych liściach niektórych roślin
The DNA contents in the young leaves of several plants

Species	mg% KDN w stosunku do świeżej masy DNA in mg/100 g of fresh matter	mg% KDN w stosunku do suchej masy DNA in mg/100 g of dry matter
<i>Urtica dioica</i>	16,58	68,5
<i>Lupinus luteus</i>	29,18	176,4
<i>Phaseolus vulgaris</i>	26,73	238,2
<i>Trifolium pratense</i>	92,36	409,5
<i>Nicotiana tabacum</i>	49,65	441,8
<i>Vicia faba</i>	138,22	1368,0

Tabela 2 — Table 2

Charakterystyka preparatów KDN
The specificity of the DNA preparations

Preparat Preparation	P w % P in %	Białka Proteins	KRN w % RNA in %	Wydajność* Yield
I	8,7	—	1,05	78,5
II	8,9	—	—	106,4
III	8,9	—	—	110,5

* Ilość mg KDN otrzymana ze 100 g świeżej masy liści.

DNA in mg from 100 g of the fresh weight of leaves.

Wobec stwierdzenia wysokiej zawartości KDN w liściach *Vicia faba*, materiału tego użyto do prób ekstrahowania kwasu dezoksyrybonukleowego.

Otrzymane preparaty nie zawierały białka i były wolne od KRN (z wyjątkiem drobnych zanieczyszczeń w preparacie I) (tab. 2).

Wyizolowana ilość KDN w preparacie II stanowi przeszło 76% całkowitej jego zawartości w materiale wyjściowym, a w preparacie III prawie 80% (patrz zawartość KDN w liściach *Vicia faba* — tab. 1).

DYSKUSJA

Przy otrzymywaniu KDN z liści należy zwrócić szczególną uwagę na uprzednie usunięcie barwników i lipidów z tkanki, w przeciwnym bowiem przypadku otrzymuje się niższą jego wydajność, a oczyszczanie preparatów jest bardzo trudne. Należy przy tym zauważyć, że mieszanina alkoholowo-eterowa łatwiej ekstrahuje związki lipidowe niż aceton.

Zagadnienie oddzielenia KRN od KDN nie jest dotychczas dostatecznie rozwiązane. Usuwanie kwasu rybonukleinowego z materiału przed ekstrakcją KDN za pomocą przemywania 0,14 M roztworem NaCl nie jest wystarczające, chociaż jest korzystne, ponieważ poza częściowym usunięciem KRN oddziela się duża ilość białek.

Wydaje się, że dla rozdzielenia KRN od KDN bardzo ważnym momentem jest wytrącanie kwasu dezoksyrybonukleinowego z roztworu NaCl za pomocą alkoholu. Jak wiadomo, KDN wytrąca się zwykle w postaci galaretowatych włókien, które można usunąć z roztworu przez nawijanie na bagietkę, podczas gdy KRN wytrącany jest jako delikatny kłaczkowaty osad. Po dodaniu etanolu do roztworu zawierającego kwasy nukleinowe w NaCl wytrącająca się galareta złożona z włókien KDN adsorbuje osad KRN. Jeżeli wprowadzać etanol bardzo powoli, a wytrącające się stopniowo włókna szybko usuwać, to osad KRN w dużo

mniejszym stopniu zaadsorbuje się na włóknach KDN. Dodanie 0,8 objętości etanolu okazało się zupełnie wystarczające do całkowitego wytrącenia KDN z 1 M roztworu NaCl. W dotychczas używanych metodach stosowano zwykle dla wytrącenia KDN stężenie alkoholu w granicach 1,5—3,0 objętości (Chargaff i Zamenhof 1948, Crampton i współpr., 1954, Signer i Schwander 1949, Thomas 1959). Zmniejszenie ilości etanolu używanego do wytrącenia KDN do 0,8 objętości jest korzystne, dlatego że osad KRN w tak niskim stężeniu alkoholu wytrąca się bardzo powoli.

Stosując powyżej opisany sposób oddzielenia KRN od KDN udało się otrzymać preparaty dezoksyrybonukleinianu sodu wolne od kwasu rybonukleinowego. Jedyne preparat I wykazuje drobne zanieczyszczenie KRN.

Zawartość fosforu w otrzymanych preparatach dezoksyrybonukleinianu sodu, wynosząca 8,7—8,9%, pokrywa się z danymi dla preparatów dezoksyrybonukleinianu sodu otrzymanymi przez Lipshitz'a i Chargaffa (1956), które wykazują 8,7% P.

Dotychczas nie stwierdzono tak wysokiej zawartości KDN w wegetatywnych organach roślin, jaką wykryto w młodych liściach *Vicia faba*. Wysoka zawartość KDN oraz dostępność materiału wyjściowego w dużych ilościach sprawia, że liście *Vicia faba* stanowią bardzo dogodne źródło dla otrzymywania wysokopolimeryzowanego KDN.

Panu profesorowi drowi A. Dmochowskiemu i pani doc. W. Potapczykowej składam serdeczne podziękowania za merytoryczne przedyskutowanie pracy oraz za szereg cennych rad i wskazówek.

STRESZCZENIE

Oznaczono zawartość KDN w liściach *Phaseolus vulgaris*, *Trifolium pratense*, *Lupinus luteus*, *Vicia faba*, *Urtica dioica* i *Nicotiana tabacum*. Frakcję KDN ekstrahowano metodą Ogura i Rosen (1950), a zawartość jego oznaczano za pomocą reakcji Dischego (1930).

Najwyższą zawartość KDN stwierdzono w liściach *Vicia faba* (1,36%).

Izolowano z młodych liści *Vicia faba* KDN w następujący sposób: po usunięciu z liści barwników i lipidów mieszaniną alkoholowo-eterową ekstrahowano KDN wg detergentowej metody Kay (1952). Zanieczyszczenia preparatów KDN kwasem rybonukleinowym usuwano przez kilkakrotne wytrącenie KDN z roztworu 1 M NaCl za pomocą stopniowego wprowadzenia 0,8 objętości etanolu.

Otrzymano KDN wolny od zanieczyszczeń KRN i białek.

SUMMARY

The DNA contents of the leaves of *Phaseolus vulgaris*, *Trifolium pratense*, *Lupinus luteus*, *Vicia faba*, *Urtica dioica* i *Nicotiana tabacum* were determined. The DNA fractions were extracted by the method described by Ogura and Rosen (1950); the DNA contents were determined by the diphenylamine method of Dische (1930).

A very high DNA level was found in the leaves of *Vicia faba* (1,36%).

DNA was isolated from the leaves of *Vicia faba* according to the following procedure: after removal of pigments and lipids from the fresh tissue, DNA was extracted as in the detergent method used by Kay (1952).

RNA contaminants were removed by several precipitations of DNA from the 1 M NaCl solution by slowly adding of a 0,8 volume of ethanol.

DNA preparations isolated in this way were generally almost free from RNA and proteins.

LITERATURA

- Chargaff E., Zamenhof S., 1948, J. Biol. Chem. 173, 327.
Crampton C. F., Lipshitz R., Chargaff E., 1954, J. Biol. Chem. 206, 499.
Dische Z., 1930, Mikrochemie 8, 4.
Kay E.R.M., Simmons N. S., Dounce A. L., 1952, J. Am. Chem. Soc. 74, 1724.
Krajewski T., Urbanek H., 1961, Zesz. Nauk. UŁ., s. II (w druku).
Kutner T., Lichtenstein L., 1932, J. Biol. Chem., 95: 661.
Lipshitz R., Chargaff E., 1956, Bichim. Biophys. Acta 19: 256.
Ogur M., Rosen G., 1950, Arch. Biochem: 25: 262.
Schneider W. C., 1945, J. Biol. Chem. 161: 293.
Signer R., Schwander H., 1949, Helv. Chim. Acta, 32, 8533.
Thomas A. J., 1959, Arch. Biochem. Biophys., 79: 162.
Thomas A. J., Sherratt H. S. A., 1956, Biochem. J., 62: 1.
Trim A. R., 1959, Biochem. J., 73: 298.
Urbanek H., 1960, Zesz. Nauk. UŁ., s. II, 8: 153.
Wang Tung-Yue, Commoner B., 1956, Proc. Nat. Acad. Sci., 42: 831.