Badania nad rybonukleazą z porostu *Cetraria islandica* (Ach)

Ribonuclease from lichen Cetraria islandica

A. RENNERT, M. GUBAŃSKI

WSTĘP

Jakkolwiek literatura z dziedziny chemii porostów oraz ich praktycznego wykorzystania do celów leczniczych jest obszerna, to wiadomości dotyczące ich fizjologii są raczej skąpe. Prac eksperymentalnych, poświęconych tak ważnemu zagadnieniu, jak enzymy w porostach, jest w literaturze zaledwie kilka. Stosunkowo najdokładniej od strony enzymatycznej porosty przebadali: Moiseewa (1958) i Sosa Bonrdouil (1941) stwierdzając w tej grupie roślin bardzo szerokie spektrum enzymów. Interesujący jest jednocześnie fakt, iż wiele enzymów zachowuje swą aktywność także w materiale zielnikowym. W pracach wspomnianych badaczy nie wymienia się jednak rybonukleazy, której znaczenie w świetle ostatnich badań jest wyjątkowo duże. Należy nadmienić iż enzym ten jest jednocześnie silnym inhibitorem wirusa mozaiki tytoniowej (Bawden 1950).

W pracach wykonanych w naszym laboratorium (Moycho i współpracownicy 1959-1960, Rennert, Gubański 1960) stwierdzono obecność inhibitorów WMT w wyciągach z niektórych gatunków porostów. Autorzy przypuszczają, że inhibitorowe właściwości wyciągów porostowych pozostają w związku z obecnością w nich takich czynników, jak kwasy porostowe i rybonukleaza.

Celem niniejszej pracy są dalsze badania dotyczące własności rybonukleazy porostowej oraz jej działania na WMT.

MATERIAŁ

Materiał do izolowania rybonukleazy stanowił handlowy porost *C. islandica* (nazwa techniczna *Lichen islandicus*) pochodzący z roku 1959 z Mazowieckiej Wytwórni Produktów Zielarskich. Preparat drożdżowego KRN firmy „Merck” oczyszczano przez wytrącanie alkoholem wg

Frisch-Niggemeyera i współpracowników (1957) i stosowano go jako substrat dla RNazy. Próby biologiczne przeprowadzano na roślinach *Nicotiana glutinosa* wyhodowanych w szklarni.

Próby izolowania RNazy porostowej

Wzorując się na metodach McDonalda (1948) i Frisch-Niggemeyera oraz Reddiego (1957) przeprowadzono następujący proces izolowania RNazy: 100 g sproszkowanego porostu ekstrahowano 1 litr wody destylowanej przez 1 dobę w temperaturze pokojowej. Fragmenty tkanek oddzielano za pomocą tkaniny styłonowej, płyn odwirowywano przy 4 tys. obr/min w ciągu 20 min, w celu usunięcia pozostałych

Izolowanie RNazy z porostu *C. islandica*

100 g sproszkowanego porostu	
ekstrakt	ekstrakcja 1 l H ₂ O dest. przez 1 dobę
	oddzielić części stałe, usunąć
powtórzyć 3 ×	wirować przez 20 min przy 4 tys. obr/min
	osad odrzucić
	(NH ₄) ₂ SO ₄ do 40+ nasycenia, 30 min w temp. 4°, sączyć przez bibułę Wh. Nr 1.
	osad odrzucić
przesącz	(NH ₄) ₂ SO ₄ do 80% nasycenia, kilka godz w temp. 4°, sączyć przez bibułę Wh. 1.
osad	przesącz odrzucić
eluat	eluować buforem octanowym pH 5,0, wirować
	osad odrzucić
Klarowny płyn	
powtórzyć trzykrotnie proces wytrącania (NH ₄) ₂ SO ₄ , jak z roztworem	
dializować w temp. 4° przez 48 godz. wirować 15 min przy 10 tys. obr/min	
preparat końcowy	

drobnych cząstek tkanki. Otrzymywano w ten sposób wodny wyciąg porostowy, do którego dodawano siarczanu amonu do 40% nasycenia roztworu i pozostawiano przez pół godziny w temperaturze 4°. Następnie sączono przez bibułę Whatman 1, osad odrzucano, a klarowny przesącz

zadawano powtórnie siarczanem amonu do 80% nasycenia. W tym stanie roztwór pozostawiano przez kilka godzin w temperaturze 4°. Po wytrąceniu RNazy roztwór sączone przez bibułę Whatman 1, przesącz usuwano, natomiast RNazę znajdującą się w osadzie, eluowano z sączka buforem octanowym o pH 5,0 i wirowano. Klarowny płyn ponownie traktowano siarczanem amonu, najpierw do 40, a następnie do 80% nasycenia. Proces ten powtarzano trzykrotnie celem dokładniejszego oczyszczenia preparatu. W ten sposób uzyskano ciemnobrazowy, papkowaty preparat, który rozpuszczano w 20 ml buforu octanowego (pH 5,0) i wirowano. Klarowny płyn dializowano w temperaturze 4° przez dwie doby wobec wody destylowanej w woreczku celofanowym. Szczegóły procesu izolowania RNazy z porostu przedstawiono w załączonym schemacie.

Otrzymany preparat RNazy posłużył do następujących badań:

Aktywność RNazy w zależności od pH

1 ml preparatu RNazy inkubowano z 1 ml 0,5% KRN w obecności buforów octanowych o różnych pH (3,5—5,6) w temp. 28°. Po upływie 40 min wytrącono 15% kwasem trójchlorooctowym niestrawiony KRN i odwirowywano go. Z klarownego płynu pobierano próbki, które spalano wg Biełozierskiego, Proskuriakowa (1954) i oznaczano w nich fosfor całkowity kolorymetrycznie w fotometrze Pulfricha (filtr czerwony S66 Zeiss).

Wpływ temperatury na aktywność RNazy

Próbkę preparatu enzymatycznego podgrzewano w ciągu 15—20 min do temp. 100°. Aktywność RNazy oznaczano identycznie jak poprzednio.

Oznaczanie ogólnej zawartości azotu

Oznaczanie azotu przeprowadzano metodą mikro-Kjeldahla w modyfikacji Parnasa-Wagnera (opisanej przez Brzeskiego i Kaniugę 1957).

Wpływ RNazy porostowej na aktywność WMT

Biologiczne próby inaktywacji WMT otrzymanym preparatem RNazy przeprowadzono na liściach *Nicotiana glutinosa*, identycznie jak w pracy poprzedniej (Moycho i współpracownicy 1959). Zawiesinę WMT poddawano działaniu preparatu *in vitro* i zakażano nią roślinę stosując metodę połówek liściowych. Porównywano ilość plamek nektrotycznych na połówkach doświadczalnych i kontrolnych.

WYNIKI

Wstępne badania przeprowadzone metodą studzienek (Rennert, Gubański 1960) wykazały niewielką, lecz uchwytłą aktywność rybonukleazy w wodnym wyciągu z porostu *C. islandica*. Izolowanie enzymu z *C. islandica* wykonano metodą dostosowaną do warunków pracowni wg

Tabela 1

*Cetraria islandica*Działanie RNazy z *C. isl.* na aktywność WMT *in vitro*Action of lichen (*Cetraria islandica*) ribonuclease on activity of TMV *in vitro*

	Kontrola Control	WMT+RNaza TMV+RNase
Suma nekroz na 6 połówkach liści Number of necroses on 6 halves of leaves	418	4

znanych schematów McDonała (1948) i Frisch-Niggemeyera (1957). Na tej drodze uzyskano płynny preparat wykazujący aktywność RNazy. Zawiesina WMT poddana działaniu otrzymanego preparatu

Ryc. 1. Aktywność RNazy z *Cetraria islandica* w zależności od pH

Ryc. 2. Wpływ temperatury na aktywność RNazy z *Cetraria islandica*: 1 — Preparat RNazy kontrolnej, pH 4,4, przyrost P 0,148 mg; 2 — Preparat RNazy inaktywowanej w temp. 100° w ciągu 15 min pH 4,4, przyrost P 0,133 mg

rybonukleazy porostowej traci w około 99% zdolność wywoływania plamek nekrotycznych na liściach tytoniu. Efekt ten przedstawiono w tabeli 1.

Na 6 połówkach kontrolnych powstało w sumie 418 nekroz, podczas gdy na tyluż połówkach doświadczalnych powstały tylko 4 nekrozy.

Aktywność otrzymanego preparatu RNazy badano w różnych pH w zakresie od 3,5 do 5,5 (patrz wykres na ryc. 1). Najwyższą aktywność uzyskano przy pH 4,4. Przyrost fosforu w tym pH wynosił 0,15 mg na 1 ml RNazy inkubowanej z 1 ml 0,5% KRN przez 40 min. Innego optimum nie stwierdzono. Działanie temperatury 100° w ciągu 15 min zmniejszało aktywność enzymu bardzo nieznacznie.

Obliczono również ilość azotu przypadającą na 1 ml otrzymanej RNazy. Wynosi ona 0,361 mg, co odpowiada 2,26 mg białka w jednym ml preparatu (ryc. 2).

DYSKUSJA

Opierając się na znanych dotąd metodach izolowania RNazy zwierzęcej, jak i roślinnej, otrzymano płynny preparat stopniem oczyszczenia w przybliżeniu odpowiadający fazie surowego enzymu w metodach McDonalda (1948), Frisch-Niggemeyera i Reddiego (1960). Preparat taki zawiera znaczne ilości fosfatazy. Z dość wysokiej zawartości białka i brunatnej barwy uzyskanego preparatu można sądzić o dużym stopniu jego zanieczyszczenia, które wynika z pewnych uproszczeń stosowanej metody izolowania enzymu. Fakty te z pewnością nie pozostają bez wpływu na przedstawione tu wyniki. Uzyskane dla RNazy porostowej optimum aktywności, przypadające na pH 4,4, oraz nieznaczne tylko obniżenie aktywności preparatu poddanego 15 min gotowaniu pozwala sądzić, iż RNaza porostowa ma właściwości zbliżone do rybonukleaz izolowanych z innych źródeł. Frisch-Niggemeyer i Reddi (1957) oznaczyli optimum aktywności RNazy wyizolowanej z liści tytoniu. Przypada ono na pH 4,5, podobnie jak w przypadku RNazy porostowej. Również stosunkowo duża odporność rybonukleaz na inaktywację termiczną jest faktem ogólnie znanym.

Otrzymany preparat enzymatyczny, podobnie jak wodny wyciąg z *C. islandica*, inaktywuje wirusa mozaiki tytoniowej. Wydaje się prawdopodobne, iż frakcja ta może mieć związek ze stwierdzonym uprzednio inhibitorem wirusowym.

Autorzy składają serdeczne podziękowania Kierownikowi Katedry p. Doc. Dr Maciejewskiej-Potapczykowej za merytoryczne przedyskutowanie niniejszej pracy.

STRESZCZENIE

Z porostu *Cetraria islandica* izolowano rybonukleazę. Określano jej aktywność w zależności od pH i temperatury oraz własności antywirusowe.

(Wpłynęło: dn. 23.V.1961 r.)

SUMMARY

Ribonuclease from lichen *Cetraria islandica* was isolated. Influence of pH and temperature on activity of lichen ribonuclease and its anti TMV properties were studied.

LITERATURA

- Bawden F. C., 1950, Plant viruses and virus diseases, Waltham (Mass), Chronica Botanica.
- Biełozierski A., Proskuriakow N., 1954, Ćwicz. bioch. rośl. PWRL, 300.
- Brzeski W., Kaniuga Z., 1957, Ćwicz. bioch. rośl. PWN, 92.
- Frisch-Niggemeyer W. a. Reddi K. K., 1957, Bioch. et Bioph. Acta 26: 40.
- McDonald M. R., 1948, J. Gen. Phys. 32, 39.
- Moiseewa E. N., 1958, Bot. Z, 43; 29 (USSR).
- Moycho W., Gubański M., Kędziora T., 1960, Bul. de L'Acad. Sci. Pol. (in press).
- Moycho W., Gubański M., Rennert A., 1959, Acta Soc. Bot. Pol. 28; 185.
- Rennert A., Gubański M., 1960, Naturwis. 47; 18.
- Sosa Bourdouil C., 1944, Sur la biologie et le chimisme d'un Lichen C. R. Acad. Sci. Paris, 218: 475.