Izolowanie preparatu rybonukleazy z siewek bobu

Ribonuclease preparation from broad bean seedlings

W. MACIEJEWSKA-POTAPCZYKOWA I H. GÓRNIAK

WSTĘP

Rybonukleazy (RNazy) roślinne są jeszcze mało zbadane, co wiąże się z trudnościami izolowania tych enzymów, a także z brakiem tak dogodnego ich źródła, jakim jest trzustka dla RNaz zwierzęcych.

Do chwili obecnej wyizolowano ten enzym w mniej lub bardziej czystej postaci z niektórych roślin wyższych i niższych, a także z mikroorganizmów.

Doskonalenie metod izolowania RNaz może przyczynić się nie tylko do poznania ich budowy, ale także do wyjaśnienia roli tych enzymów w procesach komórkowych oraz rozszerzyć zastosowanie ich do badań oligonukleotydów i kwasów nukleinowych.

Sato-Asano i Egami (1960) przypisują duże znaczenie przyszłym badaniom kwasów nukleinowych na drodze ich hydrolizy enzymatycznej RNazami o różnej specyficy. Autorzy ci sądzą, że tym sposobem uda się ustalić za pomocą RNaz sekwencję nukleotydową kwasów nukleinowych tak, jak obecnie określa się sekwencję aminokwasów białek przez poddawanie ich powolnej hydrolizie enzymami proteolitycznymi.

Celem niniejszej pracy było otrzymanie preparatów RNazy z materiału roślinnego oraz przebadanie ich termostabilności i zdolności odszczepiania nukleotydów purynowych od KRN.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem, z którego otrzymywano preparaty RNazy, były 8-dniowe siewki bobu (*Vicia Faba*) odmiany Windsor. Za wyborem tego materiału przemawiała wysoka aktywność enzymatyczna siewek i kiełkujących nasion bobu.

Preparaty RNazy otrzymywano metodą Holden i Pirie (1955a). Oznaczenia mające na celu charakterystykę preparatów, jak oznaczanie aktywności enzymatycznej i zawartości fosforu przeprowadzono

również metodami Holden i Pirie (1955a). Azot oznaczano mikro-metodą Kjeldahla, opisaną przez Biełozierskiego (1952). Przy pomiarze ilości zasad purynowych stosowano metodę spektrofotometryczną Loringa (1952a). Wolne zasady purynowe uzyskane po hydrolizie $\text{KRN} \cdot 2\text{NH}_2\text{SO}_4$ oddzielano od towarzyszących im nukleotydów pirymidynowych przez wytrącanie osadu srebrowego puryn. Następnie z osadu przeprowadzano je do $0,1\text{N HCl}$, a otrzymany w ten sposób roztwór chlorowodoroków puryn służył do oznaczeń spektrofotometrycznych. Maksimum pochłaniania adeniny w $0,1\text{N HCl}$ leży w pasmie $262\text{ m}\mu$, maksimum pochłaniania guaniny w $247\text{ m}\mu$. Ponieważ w roztworach znajdowały się obok siebie obie puryny, wykonywano więc pomiary gęstości optycznej przy dwóch długościach fal, dla których różnice w wartościach molowych współczynników ekstynkcji były możliwie największe. Absorpcję oznaczano w spektrofotometrze Zeissa. Po wykonaniu pomiarów wyliczano stężenia adeniny i guaniny (w molach na litr) ze wzorów:

$$C_{\text{ad}} = \frac{6,66 \times D_{262} - 7,65 \times D_{280}}{5,11 \times 10^4},$$

$$C_{\text{gu}} = \frac{13,1 \times D_{280} - 4,72 \times D_{262}}{5,11 \times 10^4}.$$

Dane do obliczeń:

$$D_{262} = 0,595,$$

$$D_{280} = 0,310.$$

OPIS DOŚWIADCZEŃ

W poszukiwaniu odpowiedniego źródła do izolowania RNazy przebadano aktywność tego enzymu u szeregu roślin. W zależności od materiału roślinnego aktywność RNazy wahała się w dość szerokich granicach. Dla przykładu podajemy zestawienie tej aktywności u kilku roślin:

Roślina	Aktywność RNazy w jed- nostkach Holden i Pirie na 1 g świeżej masy
Płucnica islandzka	1,9
Szpinak (liście)	2,8
Szczaw (liście)	3,4
Kielkujące nasiona owsa	6,3
Kielkujące nasiona bobu	11,3
Siewki bobu bez liści	12,9

Uwzględniając wysoką aktywność enzymatyczną siewek i kiełkujących nasion bobu do izolowania RNazy użyto tego materiału.

Nasiona bobu moczo w wodzie przez 24 godziny i wysiewano do skrzynek z piaskiem. Po 8 dniach liście odrzucano, a siewki rozdrabniano w maszynce do mięsa. Z soku i ekstraktów uzyskanych przez kilkakrotne wytrząsanie miazgi z 0,2 M wodnym roztworem cytrynianu sodu o pH 7,5 uzyskiwano preparaty RNazy. Dalsze czynności wykonywane w trakcie oczyszczania preparatu przedstawia następujący schemat:

Przy poszczególnych etapach oczyszczania preparatu (oznaczonych literami A, B, D, E, F, J) badano aktywność enzymatyczną RNazy. Wyniki tych oznaczeń ilustruje tabela 1.

Jak wynika z powyższego zestawienia, w czasie dializy frakcji D zachodzą znaczne straty aktywności RNazy. Być może ujawniają się one w następstwie inaktywacji enzymu lub niecałkowitego jego wymycia 0,1 M buforem cytrynianowym o pH 4. Powodem tych strat mogło być także uwolnienie wyciągu od jonów albo związków organicznych, które pierwotnie mogły wpływać aktywująco na działalność enzyma-

Tabela 1

Aktywność RNazy przy różnych etapach oczyszczania preparatu, wyrażona w jednostkach Holden i Pirie (1955a)

Etapy oczyszczania	Preparat z siewek bobu						Preparat z kiełkujących nasion bobu					
	A	B	D	E	F	J	A	B	D	E	F	J
Ilość jednostek aktywności $\times 1000$	38,2	34,4	31,1	8,5	5,9	5,0	83,7	71,3	69,2	31	9,3	7,8
Ilość jednostek aktywności na 1 mg białka	—	—	—	—	—	869	—	—	—	—	—	158

tyczną wyciągu A. Mimo tych strat aktywności stosowano jednak powyższą procedurę, ponieważ pozwalała ona na uwolnienie preparatu od fosfatazy, czego nie osiąga się przez frakcjonowanie, wysalanie i użycie adsorbentów.

Preparat RNazy (J) przechowywano w lodówce jako roztwór stężony w 0,1 M buforze cytrynianowym o pH 4. W celu zabezpieczenia preparatu przed niszczącym działaniem drobnoustrojów, dodano do niego niewielką ilość fenolu.

Preparat z siewek bobu otrzymywano dwukrotnie. W obu przypadkach otrzymano podobną aktywność RNazy w poszczególnych etapach oczyszczania.

BADANIE TERMOSTABILNOŚCI RNazy

RNaza otrzymana przez Holden i Pirie (1955b) z liści grochu (LRNaza) wykazywała niższą odporność na ogrzewanie niż RNaza z trzustyki wołu. Dlatego też poddano badaniom termostabilność RNazy otrzymanej z siewek bobu.

Interesujące byłoby przebadanie termostabilności RNazy w roztworach o różnym jej stężeniu i przy różnych pH. Według Gajewskiej i Shugara (1955) czynniki te wywierają decydujący wpływ na przebieg procesu inaktywacji termicznej. Z uwagi jednak na brak dostatecznej ilości czystego preparatu doświadczenie prowadzono tylko z roztworem RNazy o stężeniu 12 jedn./ml w 0,1 M buforze cytrynianowym o pH 6. Próbkę tego roztworu ogrzewano na łaźni wodnej w temperaturze

rach 60, 80 i 100°C przez 5 minut i w temperaturze 100°C w ciągu 20 minut, a następnie oznaczano ich aktywność enzymatyczną. Do oznaczeń pobierano taką ilość roztworu RNazy, która przed ogrzaniem odpowiadałaby 1 jednostce aktywności w 1 ml inkubatu.

Zmiany aktywności enzymatycznej preparatu RNazy przedstawione są w tabeli 2.

Tabela 2

Wpływ ogrzewania na aktywność enzymatyczną RNazy wyizolowanej z siewek bobu

	Roztwór RNazy nieogrze- wanej	Roztwory RNazy ogrzewanej przez 5 minut w temp.			Roztwór RNazy ogrze- wanej 20' w 100°C
		60°C	80°C	100°C	
Aktywność w jednost- kach Holden i Pirie	1	0,92	0,74	0,64	0,60

Dane te wskazują, że największe zmniejszenie aktywności enzymatycznej na jednostkę czasu przypada na początkowe minuty ogrzewania w temperaturze 100° i nieco niższe w temperaturze 80°C. Przedłużenie czasu inaktywacji termicznej z 5 minut do 20 minut powoduje już niewielki spadek aktywności preparatu. Nasuwałoby to wniosek o zmniejszeniu wrażliwości termicznej preparatu po utracie 1/3 aktywności enzymatycznej.

Wpływ częściowej inaktywacji termicznej na zdolność odszczepiania przez RNazę nukleotydów i P całkowitego od KRN badano oznaczając ich zawartość we frakcji kwasorozpuszczalnej. W tym celu inkubowano w temperaturze 37°C próbki o następującym składzie:

Roztwór KRN w stęż. 400 mg P/l w 0,025 M buforze cytr. o pH 6.

Roztwór KRN w stęż. 400 mg P/l w 0,025 M buforze cytr. o pH 6 +
+ RNaza 1 jedn. akt/ml.

Roztwór KRN w stęż. 400 mg P/l w 0,025 M buforze cytr. o pH 6 +
+ RNaza ogrzew. w temp. 100° przez 20 minut.

Wyniki pomiarów ilości P całkowitego odszczepionego od KRN podane są w tabeli 3.

Z powyższych danych wynika, że RNaza inaktywowana termicznie traci zdolność całkowitego rozkładania KRN. Po ogrzewaniu w temperaturze 100°C przez 20 minut pozostaje nie zmienione około 24% KRN.

Tabela 3

Wpływ częściowej inaktywacji termicznej RNazy na ilość P całkowitego odszczepionego przez nią od KRN

Czas inkubacji w godz	1	2	4	8	12	16	20	24	48
KRN	1,7	1,8	2,1	3,9	4,8	7,3	10,1	12,4	31
KRN+RNaza 1 jedn/ml	32	62,4	127	254	361				
KRN+RNaza częściowo inaktywo- wana	19,3	40,8	81	153	211				

ZDOLNOŚĆ ODSZCZEPIANIA NUKLEOTYDÓW PURYNOWYCH OD KRN
PRZEZ PREPARATY RNazy Z SIEWEK BOBU

Inkubowano próbki o składzie identycznym jak przy oznaczaniu ilości odszczepionego P całkowitego. Z inkubatów pobierano próbki o takiej objętości, by zawierały w płynie niedosadowym (po strąceniu niezużytego KRN) około 200γP. Nukleotydy zawarte w płynie nadosadowym poddano 1-godzinnej hydrolizie w 2 N H₂SO₄ przy temperaturze 100°C.

Dalej postępowano już zgodnie z metodą Loringa (1952b), zwiększając jednak objętość AgNO₃ o ilość potrzebną do strącenia chlorków powstałych po rozłożeniu się TCA (TCA był użyty w odczynniku strącającym). Jako ślepe próby traktowano próbki pobierane z inkubowanego równolegle KRN bez dodatku RNazy, które poddano tym samym zabiegom co próbki właściwe.

Wyniki uzyskane z pomiaru ilości moli adeniny i guaniny w związkach odszczepionych od KRN przez RNazę nie inaktywowaną i inaktywowaną częściowo przedstawiają wykresy (fig. 1 i 2).

W celu stwierdzenia efektywności enzymatycznego działania RNazy oznaczano ilości adeniny i guaniny w KRN zawartym w 1 ml inkubatu.

Z obserwacji przebiegu przyrostu zasad purynowych można wyciągnąć następujące wnioski, dotyczące wpływu ogrzewania na aktywność enzymatyczną RNazy:

a. zachodzi zmniejszenie szybkości przyrostu zasad purynowych, szczególnie adeniny,

b. nukleotydy adenilowe odszczepiane są najwyżej w 67%,

c. ilość guaniny przy rozkładaniu KRN RNazą do chwili, kiedy prze-

staje wzrastać ilość P całkowitego we frakcji kwasorozpuszczalnej jest prawie na jednakowym poziomie tak w przypadku użycia do inkubacji RNazy częściowo inaktywowanej, jak i nie inaktywowanej.

Fig 1

Fig 2

Fig. 1. Zależność ilości moli adeniny i guaniny w nukleotydach kwasorozpuszczalnych od czasu inkubowania KRN w stężeniu 400 mg/ml P z RNazą nie inaktywowaną (1 jedn./ml)

Fig. 2. Zależność ilości moli adeniny i guaniny w nukleotydach kwasorozpuszczalnych od czasu inkubowania KRN w stężeniu 400 mg/l P z RNazą częściowo inaktywowaną w temp. 100°C przez 20 minut

WYNIKI I DISKUSJA

Reasumując wyniki niniejszej pracy można stwierdzić, że preparat RNazy z siewek bobu, który otrzymano metodą Holden i Pirie (1955a):

- 1) wykazywał około 220 razy wyższą aktywność właściwą od wyciągów pierwotnych;
- 2) ogrzewany w temperaturze 100°C przez 20 minut tracił około 40% aktywności;
- 3) przy zastosowaniu częściowo inaktywowanego preparatu enzymu około 24% KRN nie ulegało hydrolizie;
- 4) częściowo inaktywowany preparat RNazy wykazywał spadek

aktywności odszczepiania kwasorozpuszczalnych nukleotydów adenilowych o 30%.

Porównując przebieg oczyszczania preparatu z siewek bobu i preparatu z liści grochu otrzymanego przez Holden i Pirie nasuwa się przypuszczenie, że charakter połączenia RNazy z siewek bobu ze związkami strącającymi się w czasie dializy może być inny, niż w przypadku RNazy z liści grochu. Być może dlatego właśnie obserwuje się duże straty aktywności enzymatycznej RNazy z siewek bobu (43%) w czasie dializy frakcji D, mimo że na tym etapie oczyszczania preparatu LRNazy Holden i Pirie nie obserwowali strat aktywności enzymatycznej. Jest również możliwe, że RNaza z siewek bobu wymywa się z osadu wraz ze związkami blokującymi częściowo jej aktywność enzymatyczną lub też, że była ona inaktywowana przez nieznane związki jeszcze przed procesem dializy.

Inną cechą odróżniającą te dwie RNazy była znaczna termostabilność preparatu z siewek bobu. W czasie ogrzewania w temperaturze 100°C przez 20 minut w 0,1 M buforze cytrynianowym o pH 6 tracił on tylko 40% aktywności.

We wstępnych poszukiwaniach odpowiedniego źródła do izolowania RNazy stwierdzono, że wyciągi z liści szczawiu, których pH soku komórkowego wynosi 2,8, najefektywniej rozkładały KRN przy pH 6 w temperaturze 37°C.

Matthews (1960) stwierdził, że wydzielina liściowa rośliny owoadożernej *Nepentes* sp. o pH 3 zawiera RNazę charakteryzującą się optimum działania przy pH 5. Powyższe obserwacje przeczyłyby założeniu Holden i Pirie (1955b), że optimum działania RNazy danej rośliny leży w pH bliskim pH soku komórkowego.

Zakład Biochemii
Uniwersytetu Łódzkiego

(Wpłynęło: dn. 30.7.1961 r.)

SUMMARY

RNase preparations have been made from 8-days old broad bean seedlings by the method of Holden and Pirie (1955a).

1. The purified RNase preparations have shown about 220 times as much activity as the original sap.

2. Heating of the purified enzyme preparation at 100°C for 20 minutes causes a loss of about 40% of activity.

3. About 24% of RNA remain unaffected on application of this partially inactivated enzyme preparation.

4. This partially inactivated enzyme causes a 30% drop in the hydrolysis of acid soluble adenylic nucleotides.

LITERATURA

- Biełozierski A., Proskuriakow N., 1954, Ćwiczenia z biochemii roślin, 42—48. Warszawa.
- Gajewska E., Shugar D., 1955, VI Sympozjum Biochem., Łódź, Bull. Acad. Polon. Sci.
- Holden M., Pirie N., 1955a, Biochem. J., 60, 39.
- Holden M., Pirie N., 1955b, Biochem. J., 60, 53.
- Loring H. S., 1952a, J. Biol. Chem., 197, 809.
- Loring H. S., 1952b, J. Biol. Chem., 197, 822.
- Matthews P., 1960, Biochim. et Biophys. Acta, 38, 552.
- Sato-Asano K., Egami F., 1960, Nature, 185, 462.