ACTA SOCIET
BOTANICORUM POLONIAE
vol. XXXVI — 1
1967

Rybonukleazy zielonych i etiolowanych liści żyta (*Secale cereale*)

Ribonucleases of green and etiolated rye leaves (*Secale cereale*)

T. GOŁASZEWSKI, J. W. SZARKOWSKI, M. OMBACH

W trakcie naszych badań nad heterogennością roślinnego kwasu rybonukleinowego (Szarkowski i Gołaszewski 1961; Szarkowski i Gołaszewski 1963; Szarkowski 1965; Ombach, Gołaszewski i Szarkowski 1966) stwierdziliśmy, że proces różnicowania się tego związku jest zależny od warunków oświetlenia roślin w czasie hodowli. Kwas rybonukleinowy pierwszych liści zielonych kiełków żyta daje się rozdzielić na większą ilość frakcji niż etiolowanych. Dotyczy to zarówno kwasu rybonukleinowego chloroplastów i odpowiadających im genetycznie plastydów roślin etiolowanych, jak również kwasu rybonukleinowego supernatantu postmitochondrialnego roślin zielonych i etiolowanych. Zaobserwowane zjawisko nasunęło pytanie, czy różnice w RNA roślin zielonych i etiolowanych znajdują swoje odbicie we wzorze enzymatycznym. W związku z tym, w przedstawionej pracy zajęliśmy się rozmieszczeniem aktywności rybonukleazowej we frakcjach podkomórkowych zielonych i etiolowanych pierwszych liści żyta. Podjęliśmy również próby izolowania i oczyszczania rybonukleaz z pełnych homogenatów obydwu rodzajów liści oraz przebadaliśmy niektóre własności tych enzymów.

Uprzednio stwierdziliśmy aktywność rybonukleazową w plastydach żyta (Szarkowski, Gołaszewski i Ombach 1962) i zwróciliśmy uwagę na heterogenny charakter tego enzymu w supernatancie postmitochondrialnym pierwszych liści (Gołaszewski i Szarkowski 1963).

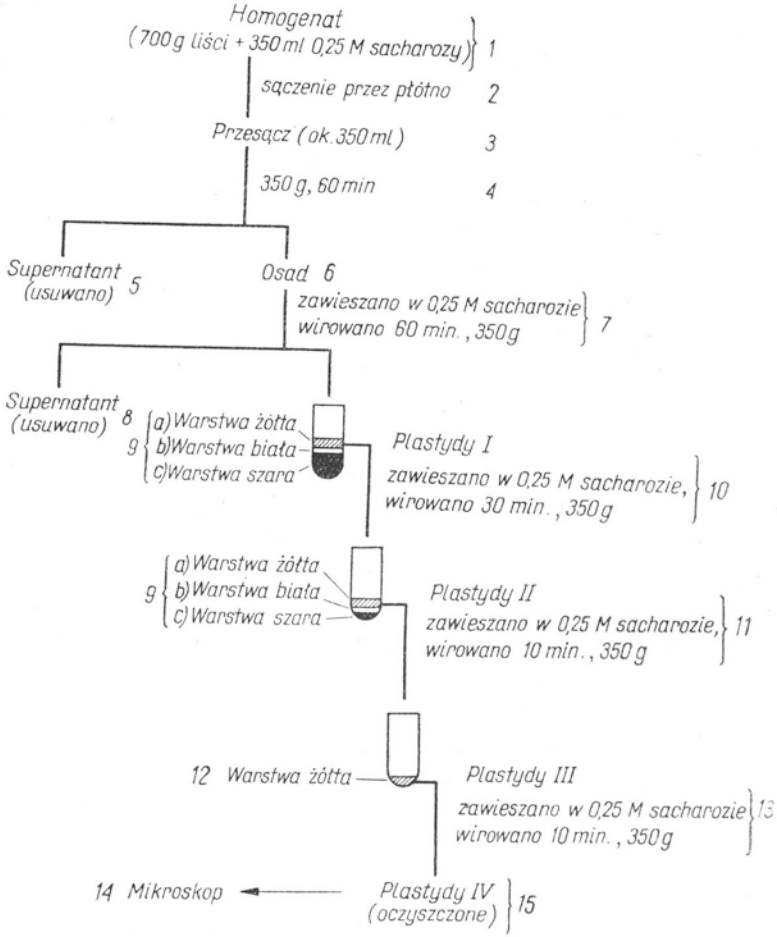
MATERIAŁ I METODY

Rośliny. Materiałem do badań były pierwsze liście zielonych i etiolowanych kiełków żyta. Żyto (*Secale cereale*), odmiana Dańkowskie pochodziło z Zakładu Doświadczalnego Reguły Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa. Hodowlę prowadzono w warunkach opisanych uprzednio (Ombach, Gołaszewski i Szarkowski 1966). Czas wzrostu roślin wynosił 12 dni, wielkość liści ok. 10 cm.

Chloroplasty. Liście cięto na fragmenty długości ok. 0,5 cm i homogenizowano ręcznie, porcjami w chłodzonym lodem moździerzu porcelanowym z 0,25 M roztworem sacharozy (700 g liści na 350 ml roztworu sacharozy). Chloroplasty izolo-

wano z homogenatu metodą opisaną przez Stäubli (1957) w temperaturze 0—4°, stosując 0,25 M roztwór sacharozy. Ilość zanieczyszczeń innymi organellami w preparatach chloroplastów obliczano w polu widzenia mikroskopu przy powiększeniu 450 razy. Średnio znajdowano 5—10% zanieczyszczeń. Stosunek ilości chlorofilu do ilości azotu całkowitego wynosił ok. 1 zgodnie z danymi Jagendorfa (1955).

Plastydy etiolowane. Liście roślin etiolowanych krajano i homogenizowano z 0,25 M roztworem sacharozy jak podano wyżej dla chloroplastów. Odpowiadające genetycznie chloroplastom plastydy roślin etiolowanych (plastydy etiolowane)



Ryc. 1. Izolowanie plastytów etiolowanych

Fig. 1. Isolation of etiolated plastids

1 — Homogenate (700 g leaf tissue plus 350 ml 0.25 M sacharose); *2* — Filtration through cheese-cloth; *3* — Filtrate (ca 350 ml); *4* — 350 g, 60 min; *5* — Supernatant (discarded); *6* — Pellet; *7* — Suspended in 0.25 M sacharose, centrifuged at 350 g, 60 min.; *8* — Supernatant (discarded); *9* — Layers: *a)* yellow *b)* white *c)* grey; *10* — Plastids I (yellow layer); suspended in 0.25 M sacharose, centrifuged at 350 g, 30 min.; *11* — Plastids II, suspended in 0.25 M sacharose centrifuged at 350 g, 10 min.; *12* — Yellow layer (plastids III); *13* — Plastids III, as for 11; *14* — Light microscope examination; *15* — Plastids IV — purified

izolowano z homogenatu wg podanego schematu (ryc. 1). Warstwa żółta zawierała plastydy, warstwa biała — skrobię, warstwa szara — nie roztarte fragmenty komórkowe i jądra.

Analogicznie jak w przypadku chloroplastów ustalono mikroskopowo ilość zanieczyszczeń. Znajdowano przeciętnie 5—10% zanieczyszczeń.

Mitochondria. Liście homogenizowano z 0,25 M roztworem sacharozy w 0,1 M buforze cytrynianowo-fosforanowym, pH 5,0. Homogenat sączono przez płótno i odwirowywano przy 1000 g w ciągu 20 min. jądra, plastydy i nieroztarte fragmenty komórkowe. Mitochondria odwirowywano z supernatantu przy 17 000 g w ciągu 20 minut. Używano wirówki Serval Superspeed, rotor SS-34. Siłę wirowania kalkulowano na podstawie promienia średniego.

Aktywność rybonukleazy. Aktywność rybonukleazy oznaczano metodą Anfinsena i wsp. (1954), stosując inne proporcje substancji reagujących. Do 1 ml 0,4% roztworu RNA w 0,1 M buforze cytrynianowo-fosforanowym, pH 5,0 (Ostrowski i Walczak 1961) lub odpowiednich buforach o innym pH) dodawano 0,1—1,0 ml roztworu badanego na aktywność rybonukleazy. Próbkę uzupełniano buforem do 2 ml i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°. Reakcję przerywano przez dodanie 0,5 ml 0,75% roztworu octanu uranylu w 25% kwasie nadchlorowym. Próbki pozostawiano przez 15 min. w lodówce, a następnie odwirowywano osad białka i nierozłożonego RNA przy 6000 g. Z supernatantu pobierano równocześnie dwie próbki po 0,2 ml, dodawano do każdej po 3 ml wody i mierzono ekstynkcję przy 260 mμ w warstwie 1-centymetrowej. Przygotowywano dwie próby kontrolne, wobec których odczytywano wielkość ekstynkcji. Jedna próba kontrolna zawierała enzym, druga zaś zawierała enzym i inkubowana była bez RNA, które dodawano wraz z octanem uranylu po inkubacji. Odczyty prób badanych wobec obydwu prób kontrolnych nie różniły się między sobą. Jako jednostkę aktywności rybonukleazy (j.R) przyjęto tę ilość enzymu, która w podanych warunkach doświadczenia i przy podanych rozcieńczeniach powodowała przyrost ekstynkcji $\Delta E^{1\,cm}_{260m\mu} = 0{,}001$. Aktywność właściwą określano ilością jednostek rybonukleazy w przeliczeniu na 1 mg białka, względnie stosunkiem $\Delta E_{260}/E_{280}$.

Aktywność dezoksyrybonukleazy. Aktywność dezoksyrybonukleazy oznaczano metodą analogiczną jak aktywność rybonukleazy. Substratem był kwas dezoksyrybonukleinowy. Jako jednostkę aktywności przyjęto tę ilość enzymu, która w warunkach doświadczenia powodowała przyrost ekstynkcji $\Delta E^{1\,cm}_{260\,\mu m} = 0{,}001$.

Aktywność niespecyficznej fosfodwuesterazy. Jako substrat stosowano Ca -[bis(p-nitrofenylo)fosforan]$_2$ (Sinsheimer i Koerner 1952). Badany preparat enzymatyczny przed oznaczaniem dializowano celem usunięcia jonów fosforanowych. Do 0,4 ml roztworu enzymu dodawano 0,6 ml 0,1 M buforu glicynowego, pH 8,8, 1 ml 0,001 M roztworu substratu w takim samym buforze i 0,2 ml 0,3 M octanu magnezu jako aktywatora. Mieszaninę inkubowano 1 godzinę w temperaturze 37°. Reakcję hamowano dodając 2 ml 0,1 M NaOH. Wytrącony osad odwirowywano, pobierano 1 ml supernatantu, rozcieńczano 2 ml wody i mierzono ekstynkcję przy 440 mμ w warstwie 1 cm. Ekstynkcję prób badanych odczytywano wobec wody. Próby kontrolne nie zawierały roztworu enzymu, ich ekstynkcję odczyty-

wano również wobec wody. Różnicę ekstynkcji między próbą badaną a próbą kontrolną przyjmowano jako miarę aktywności enzymu. Jako jednostkę aktywności enzymu przyjęto tę jego ilość, która w opisanych warunkach reakcji powodowała wzrost ekstynkcji $\Delta E^{1\,cm}_{440\,m\mu} = 0{,}001$.

Określenie ilości plastydów w zawiesinie. Organelle zawieszano w 0,25 M roztworze sacharozy. Pobierano określoną ilość zawiesiny do mieszalnika na krwinki czerwone i liczono organelle przy powiększeniu 400-krotnym w kamerze Thoma-Zeissa. Plastydy etiolowane barwiono fioletem krystalicznym.

Chromatografia kolumnowa. Używano kolumny z DEAE-celulozy o wymiarze 12×0,8 cm i kolumny z CM-celulozy zmieszanej z hydroksyapatytem w stosunku wagowym 2 : 1 o wymiarze 6×0,8 cm. Kolumnę z DEAE-celulozy przepłukiwano 0,1 M buforem cytrynianowo-fosforanowym o pH 5,0, kolumnę z CM-celulozy z hydroksyapatytem — 0,01 M buforem fosforanowym o pH 6,0.

Tabela 1 — Table 1

Aktywność nukleolityczna frakcji podkomórkowych zielonych i etiolowanych liści żyta *

Nucleolitic activity of subcellular fractions of green and etiolated rye leaves *

Liście Leaves	Frakcja podkomórkowa Subcellular fractions	Aktywność j. R./1 mg białka Specific activity R. u./1 mg protein
Zielone Green	Chloroplasty Chloroplasts	73
	Mitochondria	84
	Supernatant	1215
Etiolowane Etiolated	Plastydy Plastids	112
	Mitochondria	—
	Supernatant	2150

* Organelle izolowano z pierwszych liści 12-dniowych, zielonych i etiolowanych kiełków żyta. j. R. = jednostki aktywności rybonukleazowej. Skład i warunki doświadczenia jak podano w tekście.

* The organeelae were isolated from the primary leaves of 12-day old green and etiolated rye seedlings. R. u. = ribonuclease activity units. Experimental conditions as described in the text.

Analizy chemiczne. Azot całkowity oznaczano mikrometodą Kjeldahla. Przy spalaniu stosowano katalizator miedziowo-selenowy. Amoniak oddestylowywano do 3% roztworu kwasu borowego. Miareczkowano 0,01 N HCl wobec wskaźnika Tashiro.

Białko organelli komórkowych, jak również preparatów enzymatycznych oznaczano metodą Lowry i wsp. (1951) wg procedury dla białek nierozpuszczalnych.

Wymywanie białek z kolumn chromatograficznych śledzono na podstawie pomiaru ekstynkcji eluatu przy długości fali 280 mμ.

Chlorofil w chloroplastach oznaczano metodą Arnona (1949).

Pomiary spektrofotometryczne przeprowadzano za pomocą spektrofotometru Unicam SP 500.

Odczynniki. Kwas rybonukleinowy drożdżowy, preparat handlowy (BDH, Anglia) oczyszczano metodą Kunitza (1940) w modyfikacji Woodwarda (1944). Kwas dezoksyrybonukleinowy ze śledzi i rybonukleaza trzustkowa, krystaliczna (Light, Anglia).

Wielonukleotyd graniczny RNA („core") otrzymywano z handlowego preparatu RNA (BDH, Anglia) działaniem rybonukleazy trzustkowej sposobem Hilmoe (1960) po uprzednim odbiałczeniu go metodą Sevaga i wsp. (1938).

Ca-[bis(p-nitrofenylo)fosforan]$_2$ przygotowywano wg procedury cytowanej przez Gołaszewskiego (1963).

Wymieniacze jonowe DEAE-celulozę i CM-celulozę przygotowywano ze sproszkowanej celulozy Whatman wg metody Petersona i Sobera (1956).

Hydroksyapatyt otrzymywano wg Tiseliusa i wsp. (1956).

RNA z liści zielonych żyta otrzymywano jak opisano uprzednio (Ombach, Gołaszewski i Szarkowski 1966).

WYNIKI

Aktywność nukleolityczna frakcji podkomórkowych

Badano aktywność rybonukleazową w poszczególnych frakcjach podkomórkowych pierwszych liści zielonych i etiolowanych kiełków żyta.

Wyizolowane chloroplasty, plastydy etiolowane lub mitochondria zawieszano w 0,1 M buforze cytrynianowo-fosforanowym pH 5,0 i rozcierano w szklanym homogenizatorze Pottera w temp. ok. 2°. Do oznaczeń pobierano określoną ilość homogenatu zawierającą 2—3 mg białka, a w przypadku supernatantu pozostałego po odwirowaniu mitochondriów, 0,5 ml zawierającego 1—2 mg białka. Badano rozkład kwasu rybonukleinowego wg procedury opisanej dla oznaczania aktywności rybonukleazy w rozdziale »Materiał i metody«.

Uzyskane wyniki (tab. 1) wskazują, że wszystkie badane frakcje podkomórkowe, zarówno liści zielonych, jak i etiolowanych, posiadają zdolność rozkładania kwasu rybonukleinowego. Aktywność nukleolityczna wyrażona w jednostkach aktywności rybonukleazowej w przeliczeniu na 1 mg białka preparatu, jest najwyższa w supernatancie pozostałym po odwirowaniu mitochondriów. Supernatant liści etiolowanych jest przy tym dwukrotnie aktywniejszy niż supernatant liści zielonych. Podobnie, w takim przeliczeniu, frakcja plastydów etiolowanych bardziej intensywnie rozkłada RNA niż frakcja chloroplastów.

Przebadano również zdolność rozkładania RNA przez chloroplasty i plastydy etiolowane w odniesieniu do znanej ilości organelli. W tym celu oznaczono ilość

Tabela 2 — Table 2

Zawartość białka oraz aktywność rybonukleolityczna chloroplastów i plastydów etiolowanych *

Protein contents and ribonucleolitic activity of chloroplasts and etiolated plastids *

Plastydy Plastids	Białko μg/10⁹ organelli Protein μg/10⁹ organellae	Aktywność j. R./10⁹ organelli Activity R. u./10⁹ organellae
Chloroplasty — (Chloroplasts)	3000 (2910—3100)	220
Plastydy etiolowane — (Etiolated plastids)	800 (770—820)	90

* Organelle izolowano z pierwszych liści 12-dniowych, zielonych i etiolowanych kiełków żyta. Aktywność nukleolityczną wyrażono w jednostkach aktywności rybonukleazowej (j. R.). Zawartość białka jest średnią z 3 oznaczeń.

* The organellae were isolated from the primary leaves of 12-day-old green and etiolated rye seedlings; ribonucleolitic activity is expressed in ribonuclease activity units (R u.). The protein contents are expressed as mean values of 3 measurements.

białka w znacznej ilości obydwu typów plastydów i przeliczono aktywność enzymatyczną na określoną ich ilość.

Uzyskane dane (tab. 2) wskazują, że chloroplasty zawierają przeszło trzykrotnie więcej białka niż plastydy etiolowane. Ilości te wynoszą odpowiednio 3000 μg/10^9 chloroplastów i 800 μg/10^9 plastydów etiolowanych. Aktywność nukleolityczna wyrażona w jednostkach aktywności rybonukleazowej w przeliczeniu na 10^9 chloroplastów wynosi 220 jednostek (j.R). W przypadku plastydów etiolowanych jest przeszło dwukrotnie niższa i wynosi 90 jednostek na 10^9 organelli.

Izolowanie enzymu

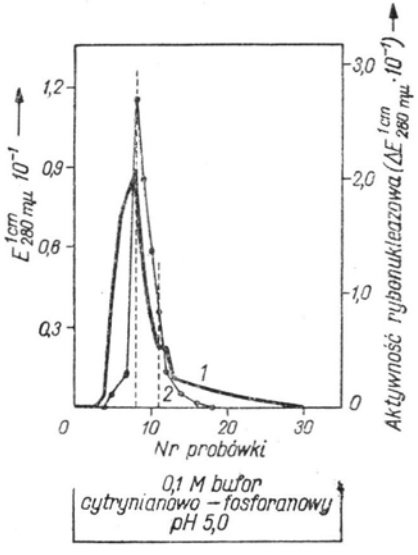
Zastosowano następującą kilkuetapową procedurę oczyszczania rybonukleazy:

1. *Ekstrakcja enzymu i wysalanie siarczanem amonu.* Liście, 150 g, cięto na fragmenty długości ok. 0,5 cm. chłodzono przez 30 min. w lodówce, a następnie homogenizowano w homogenizatorze „Turmix" z 400 ml 0,1 M buforu cytrynianowo-fosforanowego, pH 5,0 w temp. 4°. Każdą porcję homogenizowano trzy razy po 30 sekund z przerwami 30-sekundowymi. Homogenat sączono przez płótno. Przesącz pozostawiano przez 30 minut w lodówce (2°) ciągle mieszając, a następnie wirowano 20 minut przy 1000 g. Odwirowany osad ekstrahowano ponownie w ciągu 30 minut 250 ml takiego samego buforu i odwirowywano jak poprzednio. Ekstrakty łączono i zakwaszano kwasem octowym do pH 4,5. Wytrącony osad odwirowywano i odrzucano, a pH supernatantu doprowadzano do wartości 5,5 za pomocą 1 N NaOH. Otrzymywano ok. 600 ml surowego ekstraktu, do którego dodawano stałego siarczanu amonu do nasycenia 35%. Wytrącony osad odwirowywano w ciągu 30 minut przy 12 000 g i odrzucano. Do supernatantu dodawano stałego siarczanu amonu do nasycenia 90% i pozostawiano na noc w lodówce. Wytrącony osad odwirowywano jak poprzednio i rozpuszczano w 70 ml 0,1 M buforu cytrynianowo-fosforanowego, pH 5,0, a następnie dializowano kolejno wobec: 0,01 M 0,001 M buforu

i wody, aż do usunięcia jonów siarczanowych. Zawartość woreczka dializacyjnego liofilizowano do objętości ok. 40 ml. Kolejne etapy ekstrakcji, wysalania i dializę prowadzono w temperaturze 0—4°.

2. *Chromatografia na DEAE-celulozie.* Roztwór białka, otrzymany jak opisano w punkcie 1, podawano na kolumnę wypełnioną DEAE-celulozą. Kolumnę przepłukiwano uprzednio 200 ml 0,1 M buforu cytryniano-fosforanowego, pH 5,0. Białko wymywano z kolumny takim samym buforem, a następnie 0,09 M roztworem NaCl w buforze.

W przypadku liści zielonych (ryc. 2) otrzymano jedną frakcję białkową, pokrywającą się częściowo ze szczytem aktywności rybonukleazowej. Odzysk z kolumny



Ryc. 2. Chromatografia białek wysolonych siarczanem amonu z surowego ekstraktu z zielonych liści żyta, na kolumnie DEAE-celulozy

1 — białko; *2* —•—•— aktywność rybonukleazowa. Liniami przerywanymi zaznaczono próbowki, których zawartość po liofilizacji do małej objętości podano na kolumnę z CM-celulozy zmieszanej z hydroksyapatytem

Na kolumnę (12×0.8 cm) dano frakcję 0,35—0,90 nasycenia siarczanem amonu po dializie i liofilizycji. Preparat zawiera 100 000 j. R. rybonukleazy ($\triangle E_{260}$), aktywność specyficzny 1,51 ($\Delta E_{260}/E_{280}$). Białka wymywano 0,1 M buforem cytrynianowo-fosforanowym, pH 5,0; szybkość wypływu 1 ml/min. zbierano 2 ml probówki; temp. 10°

Fig. 2. Column chromatography of proteins desalted with solid ammonium sulphate from the crude extract of green rye leaves on DEAE-cellulose.

1 — protein; *2* —•—•— ribonuclease activity. Ordinate left — extinction at 280 mμ; right — ribonuclease activity; abscissa — test tube No. The dashed lines mark the test tubes the contents of which were put, after liophylisation to a small volume, into CM-cellulose mixed with hydroxyapatite column.

Into DEAE-cellulose column (12×0.8 cm) the protein fraction 0.35—0.90 of ammonium sulphate saturation was put, after dialysis and liophylisation, containing 100 000 R. u. (ΔE_{260}), specific activity 1.51. Eluent: 0.1 M citrate-phosphate buffer, pH 5.0. Effluent velocity: 1 ml/min., 1 ml samples were collected, temp. 10°C

wynosił ok. 70% aktywności podanej na kolumnę (tab. 3). Dodatek NaCl do buforu nie powodował już wymywania dalszych frakcji białkowych.

Rozdzielając preparat z liści etiolowanych otrzymano dwie frakcje białkowe

(ryc. 3): pierwszą, stosując 0,1 M bufor cytrynianowo-fosforanowy, pH 5,0, a drugą —gdy do buforu dodano NaCl. Jednakże prawie cała aktywność rybonukleazowa związana była z frakcją pierwszą. Odzyskano, podobnie jak w przypadku preparatu z liści zielonych, ok. 70% aktywności podanej na kolumnę. Po kolumnie z DEAE-celulozy otrzymano z liści zielonych preparat enzymatyczny 2-krotnie oczyszczony, a z liści etiolowanych 2,5 krotnie. Przebadano wpływ pH na aktywność otrzymanych preparatów. W zakresie wartości pH od 4—7 używano bufor cytrynianowo-fosforanowy, pH 7—9 bufor tris-HCl i dla pH 10 bufor węglanowy.

Tabela 3 — Table 3

Izolowanie rybonukleazy zielonych liści żyta

Isolation of ribonuclease from green rye leaves

Etap Stage	Aktywność całkowita j. R.* Total activity *	Aktywność specyficzna $\Delta E^{260}/E^{280}$ Specific activity	Aktywność względna Relative activity
Siarczan amonu (0,35—0,90 nasyc.) po dializie i liofilizacji Solid ammonium sulphate (0,35—0,90 saturation) after dialysis and liophylisation	600 000	1,51	1,00
DEAE-celuloza DEAE-cellulose column na kolumnę dano: introduced into:	100 000	1,51	1,00
z kolumny odzyskano: recovered from a column:	67 800	3,12	2,07
CM-celuloza+hydroksyapatyt (2:1) CM-cellulose+hydroxyapatite (2:1) na kolumnę dano: introduced into:	35 000	3,12	2,07
z kolumny odzyskano: recovered from a column: szczyt I I peak	20 000	37,00	24,50
szczyt II II peak	9 000	15,50	(10)

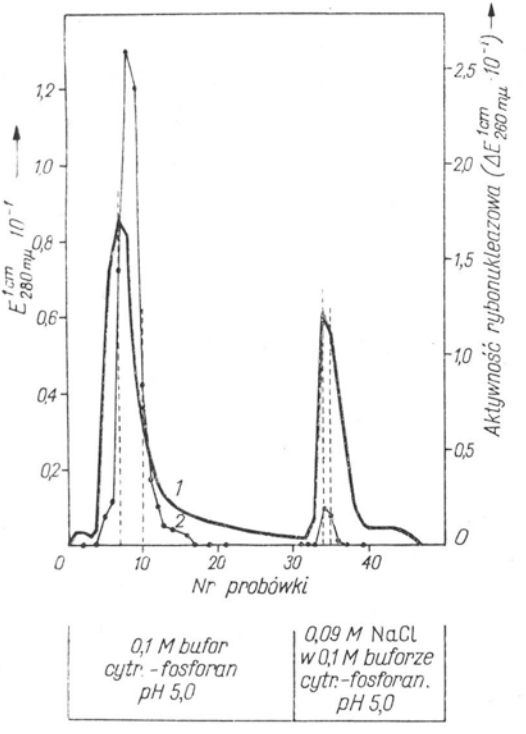
* j. R. = jednostki aktywności rybonukleazowej. Aktywność szczytu II po CM-celulozie z hydroksyapatytem mierzono w pH 8,0.

* R. u. = ribonuclease activity units. Ribonuclease activity of the second peak after CM-cellulose mixed with hydroxyapatite column was measured at pH 8,0.

Stwierdzono, że zarówno preparat z liści zielonych, jak i etiolowanych posiadał dwa optima aktywności enzymatycznej. Jedno optimum leżało w okolicach pH 5,5 drugie przy pH 8,0 (ryc. 4 i 5). Druga frakcja preparatu z liści etiolowanych, wymywająca się z kolumny buforem z dodatkiem NaCl posiadała optimum aktywności w pH 6,0 (ryc. 5).

Fakt występowania dwu optimów pH wskazywał na „niejednorodność enzymatyczną" białka po kolumnie z DEAE-celulozy i sugerował obecność w badanych preparatach dwóch enzymów rozkładających kwas rybonukleinowy.

3. *Chromatografia na CM-celulozie z hydroksyapatytem.* Preparat wypłukany z kolumny z DEAE-celulozy 0,1 M buforem (połączone najaktywniejsze frakcje



Ryc. 3. Chromatografia białek, wysolonych siarczanem amonu z surowego ekstraktu z etiolowanych liści żyta, na kolumnie z DEAE-celulozy

1 — białko; 2 —•—•— aktywność rybonukleazowa

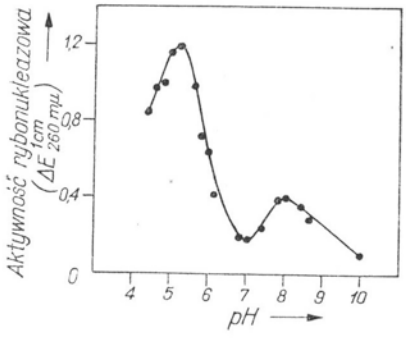
Na kolumnę (12×0,8 cm) dano frakcję 0,35—0,90 nasycenia siarczanem amonu po dializie i liofilizacji. Preparat zawierał 102 000 J. R., aktywność specificzna 1,19. Białka wymywano 0,1 M buforem cytrynionowo-fosforanowym pHś5.0; a następnie 0,09 M NaCl w takim samym buforze. Warunki doświadczenie jak podano pod ryc. 2.

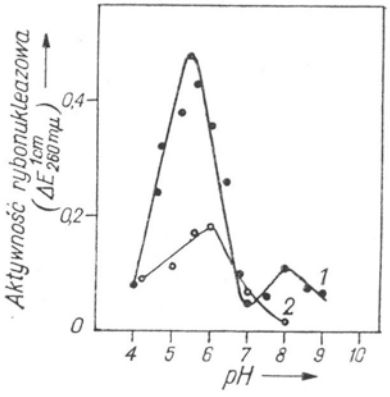
Fig. 3. Column chromatography of proteins, desalted with colid ammonium sulphate from a crude extract of etiolated rye leaf homogenate, on DEAE-cellulose.

1 — protein (E_{280}) — left ordinate; *2* —•—•— ribonuclease activity (ΔE_{260}) — right ordinate; abscissa — test tube No. Into a column (12×0.8 cm) the protein fraction desalted in the range of 0.35—0.90 of ammonium sulphate saturation after dialysis and liophylisation was introduced. The preparation contained 102 000 R. u., specific activity — 1.19. The stepwise elution of protein was carried out with 0.1 M citrate-phosphate buffer, pH 5.0 (fraction on the left) and with 0.09 M sodium chloride in the same buffer (fraction on the right). The experimental conditions — see fig. 2

kolektorowe) dializowano przez noc wobec wody (2°) i liofilizowano do małej objętości. Określoną próbkę podawano na kolumnę wypełnioną CM-celulozą zmieszaną z hydroksyapatytem, po czym wymywano kolejno 0,01 M buforem fosforanowym, pH 6,0 i 0,1 M buforem fosforanowym pH 7,5 wg Ostrowskiego i Walczaka (1961).

Preparat z liści zielonych, jak również preparat z liści etiolowanych rozdzielił się na dwie aktywne enzymatyczne frakcje białkowe (ryc. 6 i 7). Pierwsza wymywa-





Ryc. 4. Zależność aktywności rybonukleolitycznej od pH. Preparat enzymatyczny z zielonych liści żyta otrzymany po kolumnie z DEAE-celulozy

Fig. 4. Ribonucleotic activity versus pH. Enzyme preparations obscissa after DEAE-cellulose chromatography.

Ordinate — ribonucleotic activity; abscissa — pH values

Ryc. 5. Zależność aktywności rybonukleolitycznej od pH. Preparaty enzymatyczne z etiolowanych liści żyta otrzymane po kolumnie z DEAE-celulozy

Fig. 5. Fractions eluted from the column (DEAE-cellulose) isolated from etiolated rye leaves.

1 _•_•_ preparat wypłukany z kolumny 0,1 M buforem cytrynianowo-fosforanowym, pH 5,0; *2* -o-o-o- prepatat wypłukany z kolumny 0,09 M chlorkiem sodu w 0,1 M buforze cytrynianowo-fosforanowym

1 _•_•_ fraction eluted with 0.1 M citrate-phosphate buffer, pH 5.0; *2* -o-o-o- fraction eluted with 0.09 M sodium chloride in the same buffer; ordinate — enzyme activity, abscissa — pH values.

ła się z kolumny 0,01 M buforem fosforanowym, pH 6,0, a druga — 0,1 M buforem fosforanowym, o pH 7,5. W przypadku preparatu z liści zielonych drugi szczyt białkowy, składał się z dwóch mniejszych szczytów, jednak ze względu na ich wzajemne bliskie położenie, jak również ze względu na nakładanie się ze szczytami aktywności rybonukleazowej potraktowano je jako jedną frakcję.

Przez chromatografię na kolumnie z CM-celulozy z hydroksyapatytem otrzymano dalsze oczyszczenie preparatu i rozdział na dwie enzymatyczne frakcje. Frakcja I preparatu z liści zielonych zawierała ok. 60% aktywności podanej na kolumnę, zaś w przypadku preparatu z liści etiolowanych — ok. 25% (Tab. 3 i 4). Aktywność specyficzna preparatu z liści zielonych mierzona w pH 5,0 była prawie dwuna-

Tabela 4 — Table 4

Izolowanie rybonukleazy etiolowanych liści żyta

Isolation of ribonuclease from etiolated rye leaves

Etap Stage	Aktywność całkowita j. R.* Total activity *	Aktywność specyficzna $\Delta E^{260}/E^{280}$ Specific activity	Aktywność względna Relative activity
Siarczan amonu (0,35—0,90 nasyc.) po dializie i liofilizacji Solid ammonium sulphate (0,35—0,90 saturation) after dialysis and lyophilisation	220 000	1,19	1,00
DEAE-celuloza DEAE-cellulose column na kolumnę dano: introduced into:	102 000	1,19	1,00
z kolumny odzyskano: recovered from a column: szczyt I I peak	73 000	3,02	2,54
szczyt II II peak	4 200	0,27	0,23
CM-celuloza + hydroksyapatyt (2:1) CM-cellulose + hydroxyapatite (2:1) na kolumnę dano: introduced into: (szczyt I po DEAE) (I peak after DEAE)	30 000	3,02	2,54
z kolumny odzyskano: recovered from a column: szczyt I I peak	7 620	20,00	16,81
szczyt II II peak	2 500	7,10	(7)

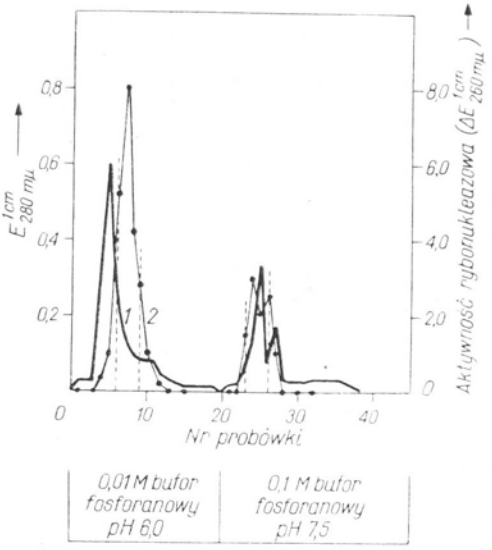
* j. R. = jednostki aktywności rybonukleazowej. Aktywność szczytu II po CM-celulozie z hydroksyapatytem mierzono w pH 8,0.

* R. u. = ribonuclease activity units. The activity of ribonuclease peak II from CM-cellulose with hydroxyapatit- was measured at pH 8.0.

stokrotnie wyższa od aktywności specyficznej preparatu uzyskanego po DEAE--celulozie i prawie dwadzieścia pięć razy przewyższała aktywność specyficzną białek wysolonych z surowego ekstraktu siarczanem amonu. Aktywność specyficzna pre-

paratu z liści etiolowanych przewyższała aktywność specyficzną preparatu po DEAE-celulozie tylko sześciokrotnie i aktywność specyficzną białek wysolonych siarczanem amonu ok. siedemnastokrotnie.

Stwierdzono, że frakcja I zarówno z liści zielonych jak i etiolowanych posiada optimum aktywności w pH 5,2—5,4 frakcja II natomiast przy pH 8,0 (ryc. 8). Za-



Ryc. 6. Chromatografia preparatu enzymatycznego z zielonych liści żyta, otrzymanego po DEAE--celulozie, na kolumnie z CM-celulozy z hydroksyapatetem

1 — Białko; *2* —•—•— aktywność rybonukleazy

Na kolumnę (6×0,8 cm) dano preparat po DEAE-celulozie. Preparat zawierał 35 000 j. R. (ΔE_{260}), aktywność specyficzna: 3,12 ($\Delta E_{260}/E_{280}$). Białka wymywano kolejno: 0,01 M buforem fosforanowym, pH 6,0 i 0,1 M buforem fosforanowym, pH 7,5. Szybkość wypływu 1 ml/min.; zbierano 2 ml próbki; temp. 10°. Liniami przerywanymi zaznaczono probówki, z których preparaty enzymatyczne pobierano do badań własności enzymu

Fig. 6. Column chromatography of the enzyme fractions isolated from green rye leaf homogenate, obtained from DEAE-cellulose, on CM-cellulose mixed with hydroxyapatite.

1 — protein (E_{280}); *2* —•—•— ribonuclease activity. Ordinate — right: ribonuclease activity, left: extinction at 280mμ; abscissa — test tube No.

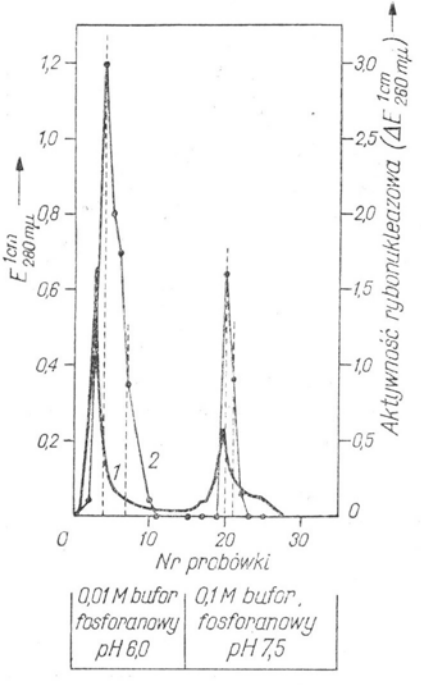
Into the column (6×0.8 cm) enzyme preparation contained 35 000 R. u. (ΔE_{260}), specific activity 3.12 ($\Delta E_{260}/E_{280}$). was introduced. Stepwise elution was carried out with 0.01 M phosphate buffer, pH 6.0 (peak on the left) and with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.5 (peak on the right). Effluent velocity — 1 ml/mln, 2 ml samples were collected, temp. 10°. Dashed lines mark the test-tubes the contents of which was used for an examination of some properties of enzyme preparation.

tem w wyniku rozdziału chromatograficznego na kolumnie z CM-celulozy z hydroksyapatytem uzyskano dwie różne rybonukleazy, które w kolejności wypłukiwania z kolumny i w zależności od optimum pH nazwano: rybonukleaza I (optimum pH 5,2) i rybonukleaza II (optimum pH 8,0).

Niektóre własności wyizolowanych rybonukleaz

Enzymy towarzyszące. Preparat rybonukleazy I z liści zielonych i etiolowanych nie wykazywał aktywności ani niespecyficznej fosfodwuesterazy (E.C. 3.1.4.1),

ani dezoksyrybonukleazy (E.C. 3.1.4.6). Natomiast preparat rybonukleazy II z liści zielonych zawierał, w przeliczeniu na 1 mg białka 58 jednostek aktywności niespecyficznej fosfodwuesterazy, a preparat rybonukleazy II z liści etiolowanych 104 jednostki. Ponieważ preparat rybonukleazy I nie zawierał zanieczyszczeń innymi enzymami, w dalszym ciągu pracy badano tylko te preparaty.



Ryc. 7. Chromatografia preparatu enzymatycznego z etiolowanych liści żyta otrzymanego po DEAE-celulozie, na kolumnie z CM-celulozy z hydroksyapatytem

1 — białko; *2* —•—•— aktywność rybonukleazowa

Preparat zawierał 30 000 J. R.; aktywność specyficzna — 3,02. Warunki doświadczenia — patrz ryc. 6.

Fig. 7. Column chromatography on CM-celullose mixed with hydroxyapatite of enzyme preparation from etiolated rye leaf homogenate, after DEAE-cellulose column chromatography.

1 — (left ordinate) — protein, extinction at 280 mu; *2* —•—•— (right ordinate) — ribonuclease activity (ΔE_{260}); abscissa — test tube No.

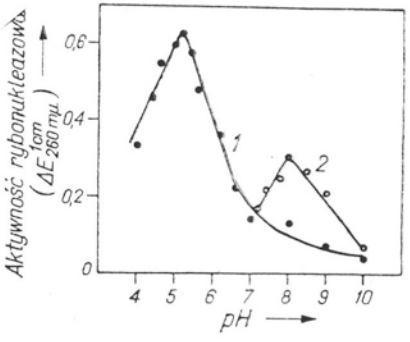
Into a column the preparation containing 30 000 R. u.; specific activity 3.02 was introduced. The stepwise elution was carried out with 0.01 M phosphate buffer, pH 6.0 (the fraction on the left), and with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.5 (fraction on the right).

Termostabilność rybonukleazy I. Wpływ ogrzewania na aktywność enzymu badano w optymalnym pH 5,2 i w pH 8,0. Próbki doprowadzone do odpowiedniego pH ogrzewano przez 5 minut w 70° oraz w 100°. Po oziębieniu dodawano RNA i inkubowano 1 godzinę w 37°.

Wyniki (tab. 5) wskazują, że rybonukleaza I liści zielonych i etiolowanych jest enzymem termolabilnym. Po ogrzaniu w 70° przez 5 min. w pH 5,2 enzym z liści zielonych tracił 75% aktywności, a enzym z liści etiolowanych 90%. Enzymy ogrze-

wane w pH 8,0 w temperaturze 70° zachowywały jedynie 10% aktywności. Ogrzewanie w 100° powodowało praktycznie całkowitą inaktywację.

Wpływ dwuwartościowych jonów metali. Badano wpływ jonów miedziowych, kobaltawych i magnezowych na aktywność rybonukleazy I obydwu rodzajów liści. Chlorki metali rozpuszczano w buforze cytryniano-fosforanowym, pH 5,0 i dodawano do prób. Próby kontrolne nie zawierały enzymu.



Ryc. 8. Zależność aktywności rybonukleolitycznej od pH. Preparaty enzymatyczne z zielonych liści żyta otrzymane po CM-celulozie z hydroksyapatytem.

1 — Preparat wypłukany z kolumny 0,01 M buforem fosforanowym, pH 6,0 (rybonukleaza I); *2* — Praparat wypłukany z kolumny 0,1 M buforem fosforanowym, pH 7,5 (rybonukleaza II).

Fig. 8. Ribonucleolitic activity versus pH. Enzyme preparations isolated from green rye leaves. obtained after CM-cellulose mixes with hydroxyapatite column.

1 — Preparation eluted from the column with 0.01 M phosphate buffer, pH 6.0 (ribonuclease I); *2* — Preparation eluted with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.5 (ribonuclease II); ordinate — ribonuclease activity, abscissa — pH values.

Wyniki (tab. 6) wskazują, że jony Co^{2+} w stężeniu 20 mM hamują w 50% aktywność enzymu z obu rodzajów liści. W tym samym stężeniu jony Cu^{2+} hamują silniej w 75%—85%. Najmniejszy hamujący wpływ wywierają jony Mg^{2+}. Aktywność zmniejszyła się jedynie o ok. 20%.

Tabela 5 — Table 5

Termostabilność oczyszczonej rybonukleazy I zielonych i etiolowanych liści żyta *

Thermostability of purified ribonuclease I from green and etiolated rye leaves *

Temperatura ogrzewania (5 min.) Temperature of heating	Liście zielone Green leaves		Liście etiolowane Etiolated leaves	
	pH 5,2	pH 8,0	pH 5,2	pH 8,0
70°	25	12	10	10
100°	5	—	7	—

* Wyniki podano w % aktywności preparatu nie ogrzewanego.

* The results are expressed as per cent of activity preserved after heating in comparision to that measured without prior heating.

Tabela 6 — Table 6

Wpływ jonów metali na aktywność rybonukleazy I zielonych i etiolowanych liści żyta *

The influence of metalic cations on I RNA-se activity of green and etiolated rye leaves *

Dodatek Addition	Liście zielone Green leaves		Liście etiolowane Etiolated leaves	
	Aktywność j. R. Activity R. u.	Aktywność zachowana Activity preserved	Aktywność j. R. Activity R. u.	Aktywność zachowana Activity preserved
Bez dodatku None	625	100	520	100
Co^{2+}	310	50	263	50
Cu^{2+}	94	15	131	25
Mg^{2+}	480	75	468	90

* Mieszanina reagująca zawierała: 3 mg RNA w 1 ml 0,1 M buforu cytrynianowo-fosforanowego, pH 5,0; rybonukleaza I z liści zielonych (aktywność specyficzna 37) lub rybonukleaza I z liści etiolowanych (aktywność specyficzna 20); $CoCl_2$ $CuCl_2$, $MgCl_2$ — końcowe stężenie 2×10^{-2}: M. Czas inkubacji 60 min.; temperatura 37°.

* The incubation mixture contained: 3 mg RNA (purified, BDH) in 1 ml of 0.1 M citrate-phosphate buffer, pH 5.0.; ribonuclease I from green leaves (specific activity 37) or ribonuclease I from etiolated leaves (specific activity 20); final concentration of $CoCl_2$, $CuCl_2$ or $MgCl_2$ — 2×10^{-2} M. The time of incubation: 60 min. at 37°.

Tabela 7 — Table 7

Porównanie aktywności rybonukleazy I zielonych i etiolowanych liści żyta w stosunku do różnych substratów

Comparision of relative activities of ribonuclease I of green and etionated leaves toward various substrates

Substrat Substrate	Aktywność względna Relative activity	
	Liście zielone Green leaves	Liście etiolowane Etiolated leaves
RNA z drożdży deproteinezed yeast RNA	1,00	1,00
Wielonukleotyd graniczny „core"	0,47	0,51
RNA z zielonych liści żyta Green rye leaf RNA	1,50	—

Mieszanina reagująca zawierała: 4 mg RNA drożdżowego lub wielonukleotydu granicznego w 1 ml 0,1 M buforu cytrynianowo-fosforanowego, pH 5,0. Rybonukleaza I z zielonych liści (aktywność specyficzna 37) lub etiolowanych (aktywność specyficzna 20). Czas inkubacji 60 min; temperatura 37°.

Incubation mixture contained: 4 mg yeast RNA (purified, BDH) or „core" fraction of that RNA, or RNA isolated by phenol procedure from the postmitochondrial fraction of green rye leaf homogenate in 1 ml of 0.1 M citrate-phosphate buffer, pH 5.0; Ribonulease I from green leaves (specific activity 37) or etiolated leaves (specific activity 20). The time of incubation-60 min, at 37°.

Aktywność w stosunku do różnych substratów. Rybonukleaza I zarówno z liści zielonych, jak i etiolowanych rozkłada wielonukleotyd graniczny („core") uzyskany działaniem rybonukleazy trzustkowej na RNA drożdżowy. Szybkość rozkładania tego wielonukleotydu była, w porównaniu z szybkością rozkładania RNA drożdżowego, dwukrotnie mniejsza. Rybonukleaza I z liści zielonych rozkłada RNA wyizolowany z supernatantu postmitochondrialnego tych liści 1,5 razy szybciej niż RNA drożdżowy. Kwas dezoksyrybonukleinowy był zupełnie oporny na działanie rybonukleazy I. Podobnie nie stwierdzono rozkładu syntetycznego dwuestru kwasu fosforowego, tj. bis(-p-nitrofenylo)fosforanu.

DYSKUSJA

Przedstawione wyniki wskazują, że homogenaty chloroplastów, mitochondriów i supernatant postmitochondrialny zielonych liści żyta rozkładają kwas rybonukleinowy. Podobnie, homogenat plastydów liści etiolowanych, odpowiadających genetycznie chloroplastom, rozkłada kwas rybonukleinowy. Najwyższą aktywność rybonukleazową w przeliczeniu na 1 mg białka stwierdzono w supernatancie postmitochondrialnym. Poważna część aktywności rybonukleazowej tego supernatantu jest wykrywana we frakcji rybosomowej (Szarkowski i Gołaszewski 1966). U liści zielonych aktywność supernatantu przewyższała aktywność homogenatu chloroplastów szesnastokrotnie. W przypadku liści etiolowanych aktywność rybonukleazowa supernatantu była prawie dwudziestokrotnie wyższa od aktywności plastydów etiolowanych.

Porównując aktywność rybonukleazową odpowiadających sobie frakcji podkomórkowych liści zielonych i etiolowanych widać, że jest ona prawie dwukrotnie wyższa u liści etiolowanych. Jednakże, w przeliczeniu na tę samą ilość organelli aktywność rybonukleazowa chloroplastów okazała się być wyższa niż aktywność plastydów etiolowanych. Z uwagi na szczupłość danych o znaczeniu fizjologicznym rybonukleazy trudno wyrobić sobie dziś pogląd, czy zaobserwowane przez nas różnice mają biologiczne znaczenie.

Przeprowadzone próby izolowania i oczyszczania enzymu wykazały, że zielone i etiolowane liście żyta zawierają dwie różne rybonukleazy. Zasadniczą wskazówką było tu stwierdzenie — w preparatach częściowo oczyszczonych na kolumnie z DEAE-celulozy — dwóch optimów pH w środowisku kwaśnym i zasadowym. Obie frakcje rybonukleazy rozdzielone na kolumnie z CM-celulozy zmieszanej z hydroksyapatytem posiadały: jedna — optimum aktywności w pH 5,2 (rybonukleaza I), a druga w pH 8,0 (rybonukleaza II). Tak więc rybonukleaza I kiełków żyta jest zbliżona pod tym względem do większości rybonukleaz występujących u roślin wyższych (Holden i Pirie 1955; Maciejewska-Potapczyk i Górniak 1962).

Rybonukleazy I nie wykazywały zanieczyszczeń niespecyficzną fosfodwuesterazą. Rybonukleazy II były zanieczyszczone tym enzymem. Badając własności enzymów bardziej czystych, tj. rybonukleaz I z obu rodzajów liści, nie obserwowano

między nimi zasadniczych różnic. Enzymy te, podobnie jak inne rybonukleazy roślinne (Holden i Pirie 1955; Fiers i Lepoutre 1961), są enzymami termolabilnymi. Traciły one w znacznym stopniu aktywność przy ogrzewaniu w temperaturze 70° i 100° w pH kwaśnym i zasadowym. Jest to jedna z cech odróżniających między innymi, niektóre rybonukleazy roślinne od zwierzęcych. Rybonukleaza trzustki wołu (E.C. 2.7.7.16) wytrzymuje np. ogrzewanie w 100° przez 30 minut (Kunitz 1940). Stwierdzony przez nas hamujący wpływ jonów miedziowych i kobaltawych na aktywność rybonukleazy I jest powszechnie obserwowany u rybonukleaz roślinnych i zwierzęcych (Markham i Smith 1952; Gołaszewski 1964). W obecności jonów magnezowych aktywność rybonukleazy I była również hamowana, jednakże w bardzo niewielkim stopniu.

Rybonukleaza I zielonych i etiolowanych liści rozkłada wielonukleotyd graniczny („core"). Szybkość rozkładu jest w tym przypadku dwa razy mniejsza niż RNA drożdżowego. Zdolność rozkładania wielonukleotydu granicznego opornego na działanie rybonukleazy trzustkowej wskazuje, że podobnie jak inne rybonukleazy roślin wyższych (Gołaszewski 1964), rybonukleaza I jest mniej specyficzna niż rybonukleaza trzustki wołu. Wielonukleotyd graniczny jest, jak wiadomo, mieszaniną cztero- lub pięcionukleotydów o przewadze nukleotydów purynowych zakończonych zawsze resztą nukleotydu pirymidynowego (Markham i Smith 1952). Rybonukleaza I z zielonych liści żyta rozkładała RNA wyizolowanych z tych liści 1,5 razy szybciej niż RNA drożdżowy. Badaną rybonukleazę I można by sklasyfikować jako nukleotydo-2-transferazę rybonukleinianu(cyklizującą) o pozycji katalogowej (E.C.2.7.7.17), analogicznie jak inne rybonukleazy roślin wyższych. Kwas dezoksyrybonukleinowy był zupełnie oporny na działanie tego enzymu. Badane przez nas właściwości rybonukleaz zielonych i etiolowanych liści żyta nie wykazywały jakichś podstawowych różnic wynikających z odmiennych warunków oświetlenia roślin w czasie hodowli. Śledząc jednakże zachowanie się poszczególnych frakcji rybonukleaz w trakcie oczyszczania, można zauważyć odmienne zachowanie się ich szczególnie na kolumnie z CM-celulozy zmieszanej z hydroksyapatytem. Znajduje to odbicie w osiągalnym stopniu oczyszczania. Obserwacje te wydają się sygnalizować pewne różnice w strukturze białek zielonych i etiolowanych liści, które wynikać mogłyby z warunków oświetlenia w czasie hodowli.

Wykazany w nieniejszej pracy hetorogenny charakter rybonukleaz liści żyta jest jak dotychczas jednym z nielicznych dowodów na występowanie złożonego systemu rybonukleaz u roślin wyższych. Rybonukleaza chloroplastów i plastydów etiolowanych ma optimum aktywności w środowisku alkalicznym w pH 8,0 (Gołaszewski i Szarkowski 1966), jest więc prawdopodobne, że odpowiada rybonukleazie II pełnego homogenatu liści badanej w niniejszej pracy. Uprzednio stwierdziliśmy u marchwi występowanie dwóch rybonukleaz o odmiennych optymalnych pH działania (Gołaszewski i Szarkowski 1964). W chloroplastach i mitochondriach tej rośliny mamy do czynienia — jak się wydaje z enzymami homogennymi. Zjawisko heterogenności rybonukleaz jest więc być może, odbiciem kompertamentyzacji komórki i odmiennych warunków panujących w organellach.

Streszczenie

Opisano występowanie heterogennego zespołu enzymów rybonukleolitycznych w homogenatach pierwszych liści kiełków żyta (*Secale cereale* L.). Stwierdzono występowanie przynajmniej dwóch enzymów nukleolitycznych u zielonych i etiolowanych roślin. Enzymy te wykazują różne optymalne pH ich aktywności, dają się rozdzielić za pomocą techniki chromatografii kolumnowej na CM-celulozie. Enzym o optymalnym pH działania równym 8 stanowi frakcję poboczną i jest zlokalizowany głównie w chloroplastach lub plastydach etiolowanych. Stwierdzono, iż homogenaty mitochondriów wykazują również aktywność rybonukleolityczną, lecz najwyższą aktywność właściwą enzymu wykryto w supernatancie uzyskanym po odwirowaniu mitochondriów. Frakcja główna enzymu („rybonukleaza kwaśna") została wyizolowana i wysoce oczyszczona. Badania nad jej niektórymi własnościami wykazały, że jest to enzym termolabilny, silnie hamowany przez jony miedziowe i kobaltawe i hydrolizujący tzw. wielonukleotyd graniczny kwasu rybonukleinowego. W pracy dyskutowana jest możliwość, że heterogenność enzymu jest odbiciem zróżnicowania organellowego komórki.

Za doskonałą pomoc techniczną w czasie wykonywania niniejszej pracy składamy podziękowania Pani Danucie Klarkowskiej.

SUMMARY

Heterogenous system of ribonucleolitic enzymes in primary leaf homogenates of rye (*Secale cereale* L.) seedlings is described. At least two ribonucleolitic enzymes, separable on CM-cellulose (carboxymethyl) column were found in green and etiolated plants (Fig. 6, 7), differing in optimal pH values of their activities (Fig. 8). The enzyme fraction showing its optimal activity at pH 8 is a minor one, being localised chiefly in chloroplasts and in plastids of etiolated plants. Mitochondria showed also the ribonucleolitic activity, the highest specific activity, however, was stated in the postmitochondrial supernatant (Table 1). The main enzyme fraction ("acidic ribonuclease"), was isolated and highly purified (the procedure applied — see Table 3 and 4) and some of its properties were studied. It is thermolabile (Table 5), strongly inhibited by Co^{++} and Cu^{++} ions (Table 6), and digesting the "core" fraction of yeast RNA (Table 7), enzyme. Hypothesis that heterogenity of ribonucleolitic enzymes is a reflection of the organellar differentiation of the cell is disscused.

LITERATURA

Anfinsen C. B., Redfield R. R., Choate W. L., Page J., Carrol W., 1954, J. Biol. Chem. 207:201.

Anfinsen C. B., White F. H., 1961, in The Enzymes (P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck eds/Vol. V, Part B, p. 95, Acad. Press, New York and London.

Arnon D. I., 1949, Plant Physiol. 24:1.

Fiers W., Lepoutre L., 1961, Arch. Intern. Physiol. Biochim. 69:582.

Gołaszewski T., 1964, Praca Doktorska, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa.

Gołaszewski T., 1964, Postępy Biochem. 10:369.

Gołaszewski T., Szarkowski J. W., 1964, Acta. Soc. Bot. Polon. 33:749.

Gołaszewski T., Szarkowski J. W., 1963, I Krajowy Kongres Biochemii Łódź 1963, str. 34, Polskie Towarzystwo Biochemiczne, Warszawa.

Gołaszewski T., Szarkowski J. W., 1966, Dane niepublikowane.

Hilmoe R. J., 1960, J. Biol. Chem. 235:2117.

Holden M., Pirie N. W., 1955, Biochem. J. 60:53.

Jagendorf A. T., 1955, Plant Physiol. 30:138.

Kunitz H., 1940, J. Gen. Physiol. 24:15.
Lowry D. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., 1951, J. Biol. Chem. 193:265.
Maciejewska-Potapczyk W., Górniak H., 1962, Acta Soc. Bot. Polon. 31:67.
Markham R., Smith J. D., 1952, Biochem. J. 52:552.
Ombach M., Gołaszewski T., Szarkowski J. W., 1966, Bull. Acad. Polon. Sci. Sér. Sci. Biol. 14: 533.
Ostrowski W., Walczak Z., 1961, Acta Biochim. Polon. 8:345.
Peterson E. A., Sober H. A., 1956, J. Am. Chem. Soc. 78:751.
Sevag M. G., Lackman D. B., Smolens J., 1938, J. Biol. Chem. 124:425.
Sinsheimer R. L., Koerner J. F., 1952, J. Biol. Chem. 198:293.
Stäubli W., 1957, Disseration E. T. H., Zürich, Prom. Nr. 2662, Juris-Verlag, Zürich.
Szarkowski J. W., 1965, Monografie Biochemiczne, Polskie Tow. Biochem., Zeszyt 10, PWN, Warszawa.
Szarkowski J. W., Gołaszewski T., — w przygotowaniu 1966.
Szarkowski J. W., Gołaszewski T., 1963, Bull. Acad. Polon. Sci. Sér. Sci. Biol. 11:123.
Szarkowski J. W., Gołaszewski T., 1961, Naturwiss. 48:622.
Szarkowski J. W., Gołaszewski T., Ombach M., 1962, Naturwiss. 49:15.
Tiselius A., Hjérten S., Levin Ö., 1956, Arch. Biochem. Biophys. 65:132.
Woodward G. E., 1944, J. Biol. Chem. 156:143.