

Laboratorul de virologie (cond.: prof. V. Vendeg) și Catedra de chimie generală  
(cond.: șef de lucrări L. Bukaresti) din Tîrgu-Mureș

## CERCETARI POLAROGRAFICE PRIVIND CONȚINUTUL PROTIDIC AL ACIZILOR NUCLEICI

V. Blazsek, L. Bukaresti

Cunoașterea conținutului protidic al acizilor nucleici este foarte importantă pentru cercetarea activității lor biologice. Acizii nucleici „deproteinați” obținuți pînă acum conțin ca „impuritate” mai puțin de 1% protide. Dacă se utilizează metodele uzuale (*Lowry*, biuret, etc.) determinarea unei cantități de protide atît de mici întîmpină multe greutăți (1, 2).

Este cunoscut că protidele se pot determina prin prezența grupelor — SH, folosind metoda polarografică a lui *Brdicka* (3—7). Reacția polarografică fiind foarte sensibilă, am studiat aplicabilitatea ei în cazul determinării „impurității” protidice a acizilor nucleici\* (ARN și ADN). Experiența efectuată de *Berg* (8) se referă la folosirea metodei polarografice.

### Partea experimentală

#### Prepararea ARN și ADN

*Metoda I-a.* Am preparat ARN din drojdie prin procedeul *Crestfield* (9) modificat de noi (10).

*Metoda a II-a.* ARN preparat din extract de drojdie a fost deproteinizat cu ajutorul metodei *Sevag* (11), fie folosind un detergent (12), fie prin degradare termică (13). Extractul s-a preparat congelînd drojdia la  $-60^{\circ}$ , pulverizîndu-l și omogenizîndu-l cu trei volume de soluție de NaCl 0,14 M (60 mM  $Zn^{2+}$ +pH 7,0). Omogenizatul se clarifică prin centrifugare (30 minute, 10.000×g, 2°) și se utilizează supernatantul.

*Metoda a III-a.* Am preparat ARN din ficat de bovine sau de găină, folosind o metodă fenolică, electuînd apoi fracționarea cu NaCl 1,5 M (14).

*Metoda a IV-a.* S-a izolat ADN din PDN nuclear al eritrocitelor de găină, folosind metoda de deproteinizare fenolică (15). Am evitat degradarea PDN, utilizînd soluții cu tîrie ionică mică.

Histonul s-a izolat din PDN nuclear de eritrocite de găină, folosind metoda fenolică elaborată de noi (16).

*Analizele.* S-a calculat cantitatea de ARN și ADN prezentă în soluțiile de cercetat din conținutul fosforului, determinînd-o prin metoda *Fogg* (17). Am determinat concentrația ASB cristalizat cu metoda *Kjeldahl*, iar concentrația histonului cu metoda biuret (raportînd rezultatele la o curbă de ASB) (18).

*Metoda polarografică.* La 2 ml soluție de bază\*\* am adăugat 2 ml soluție de cercetat. Polarografierea s-a efectuat într-o atmosferă de hidrogen începînd de la 1 V. În cursul determinărilor s-a folosit un polarograf LP 55A, tip *Heyrovsky*. Sensibilitatea galvanometrului: 1/150; timpul de picurare: 3.33 sec. (la 1,4 V).

### Rezultate și discuții

*Studierea ARN.* ARN din drojdie preparat prin metoda I-a n-a dat undă polarografică nici la o concentrație de 1 mg/ml (curba 8). Dacă soluția de cercetat a conținut și o proteină (ASB) pe lingă ARN, am constatat o undă ascendentă, proporțională cu concentrația proteinelor (0,6—10,0 μg/ml de ASB (vezi curbele 1—

5). Mărind cantitatea de ARN, înălțimea unei polarografice a proteinei (ASB) nu s-a modificat (în concentrații de 100—1000  $\mu$ g/ml de ARN). În concentrații de 200  $\mu$ g/ml de ARN maximul de cobalt s-a stins. Acest fenomen este în legătură cu structura ARN. Din datele obținute în urma experiențelor noastre rezultă următoarele:

a) cu metoda polarografică se poate determina pe lângă ARN o cantitate de 0,3% de proteină (această proporție e raportată la ASB);

b) ARN din drojdie preparat cu metoda I-a poate să conțină mai puțin de 0,06% proteină, deoarece o cantitate de 1 mg/ml ARN n-a prezentat polaroactivitate.

În cele ce urmează a fost necesar să clarificăm în ce măsură cisteina liberă (nelegată în molecula de proteină) jenează determinarea proteinei (cisteinei legate în proteină) în prezența ARN. Cisteina liberă arată o undă polarografică numai într-o concentrație de 20 de ori mai mare, decât proteina (12  $\mu$ g/ml). Menținând concentrația stabilă a ARN și ASB (200 respectiv 10  $\mu$ g/ml) și în același timp mărind cantitatea cisteinei (12—100  $\mu$ g/ml) s-a schimbat numai înălțimea undei a doua. În concordanță cu observațiile lui *Jirsa* și *Kalous* (19), am constatat apariția primei unde la concentrații mai mari de cisteină. Experiențele noastre arată în mod clar că dacă un preparat de ARN prezintă un conținut protidic de cel mult 5%, atât prima cât și cea de a doua undă catalitică se datorește proteinei. Acest fapt este cu atât mai probabil, cu cât nici nu se poate presupune ca 200  $\mu$ g/ARN să conțină 100—200  $\mu$ g/ chiar nici 12  $\mu$ g/ de cisteină. Un preparat de ARN obținut printr-o metodă corespunzătoare are un conținut protidic de cel mult 5%.

În prezența ARN insolubil în soluții de NaCl 1,5 M obținut cu metoda I-a și III-a activitatea polarografică atât a cisteinei, cât și a ASB a crescut, fapt care se poate explica prin formarea unor complecși între ARN și proteină și între ARN și cisteină. *Ivanov* (4) a observat un efect similar și în cazul complecșilor între ADN și proteină.

ARN din ficat de bovine și găină, preparat cu metoda III-a a dat polarograme identice (curbele 9—10) cu cea a ARN din drojdie (obținut cu metoda I-a), în timp ce pe polarogramele ARN, obținut prin „deproteinizare” cu metode proteindenaturante, am observat unde proteice (curbele 11—13). Nu s-a putut obține un ARN deproteinizat nici din virusul Cocksackie cu ajutorul metodei *Sevag* (20). S-a constatat că ARN extras din drojdie cu această metodă conține aminoacizi (21). Polaroactivitatea ARN se datorește într-adevăr grupării —SH a cisteinei, fiindcă unda proteică a dispărut după o oxidare cu acid performic (v. curbele 19—20). Este cunoscut faptul că acidul cistic, obținut prin oxidarea cisteinei (22), este inactiv din punct de vedere polarografic. Cercetările comparative de mai sus au pus în evidență efectul deproteizant remarcabil al fenolului.

ARN nefracționat (obținut prin metoda III-a) s-a dovedit a fi activ și după trei tratări repetate cu fenol. Prin fracționarea cu NaCl 1,5 M am obținut două fracții dintre care ARN insolubil în soluție sărată (ARN „ribosomal”) n-a arătat activitate, în timp ce fracțiunea solubilă (ARN „transfer”) a continuat să dea o undă polarografică (curbele 14—18). Polaroactivitatea ARN „transfer” ar putea fi atribuită unei proteine conținând cisteină, care nu se leagă de ARN prin legături de hidrogen. O altă cauză a undei proteice ar putea să fie cisteina legată de grupa terminală a ARN „transfer” fapt care este cu atât mai interesant, cu cât până în prezent nu s-a pus în evidență cisteină, în ARN „transfer”. În cursul viitoarelor noastre cercetări ne-am propus să elucidăm această problemă.

*Studierea ADN.* ADN obținut prin metoda a IV-a a dat din punct de vedere polarografic rezultate asemănătoare cu ARN. ADN nu a dat undă proteică nici în concentrații de 4 mg/ml, iar cercetarea soluțiilor mai concentrate este imposibilă din cauza viscozității lor mari (curba 3). Pe polarograme s-a văzut că înălțimea undelor este proporțională cu cantitatea proteinei. Cisteina liberă n-a avut efect

jenant nici în acest caz. Lipsa activității ADN nu dovedește însă absența proteinelor din preparate, căci cisteina, care provoacă activitatea polarografică, nu este prezentă în histon\*\*\* (23). ADN micșorează maximum de cobalt în concentrații mai mari decât ARN (curba 6—7 respectiv 23—24). Acest fapt pare a fi în legătură cu diferența dintre structura celor doi acizi nucleici. Am mai observat și formarea complexilor dintre ADN și proteină, respectiv ADN și cisteină.

Histonul preparat de noi nu a dat undă catalitică nici în concentrații de 10  $\mu$ g/ml (v. curbele 21—22). Această observație dovedește absența proteinei „reziduale”, adică omogenitatea histonului. Metoda polarografică este atât de sensibilă încât cu ajutorul ei se poate pune în evidență o legătură disulfidică în concentrații de 10  $\mu$ g/ml fiind în considerare și greutatea moleculară a histonului a cărui mărime e de  $10^4$ . Lipsa activității histonului obținut din eritrocitele de găină dovedește probabil absența cisteinei. Prin urmare conținutul în histon al ADN nu se poate determina polarografic.

În concluzie se constată că determinarea polarografică a proteinelor din ARN are multe avantaje și anume:

1. folosind vase micro, într-o cantitate de 40  $\mu$ g ARN se poate pune în evidență 0,3% proteină, în timp ce reacția *Sakaguchi* necesită 3 mg. metoda biuret 13 mg, metoda *Lowry* 1 mg de ARN;

2. măbind cantitatea de ARN se poate pune în evidență 0,06% proteină (raportată la ASB), fapt care, utilizând alte metode nu se poate realiza, sau realizarea lui întîmpină mari greutăți;

3. determinarea polarografică arată că unda polarografică este cauzată de prezența proteinei, ceea ce se poate dovedi numai cu metoda biuret, care este însă cu mult mai puțin sensibilă;

4. metoda este simplă și rapidă.

\* Prescurtări: ARN: acidul ribonucleic; ADN: acidul dezoxiribonucleic; ASB: albumin din ser de bovină; PDN: proteidă dezoxiribonucleică.

\*\* Compoziția soluției de bază: 2 mM  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ , 0,2 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  și 1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

\*\*\* În ADN depoteinizat cu detergent (24) s-a pus în evidență cisteina care arată prezența „proteinei reziduale”. (Relatarea acestui rezultat a avut loc după terminarea lucrării de față).

Sosit la redacție: 19 iunie 1962.

#### Bibliografie

1. O. H. LOWRY, N. J. ROSENBROUHI, N. I. FARR, R. J. RANDALL: *J. Biol. Chem.* (1951), 193, 265; 2. G. E. L. ELLEM: *Anal. Biochem.* (1962), 5, 49; 3. M. BREZINA, P. ZUMAN: *Die Polarographie in der Medizin, Biochemie und Pharmazie*, Akad. Verl., Leipzig (1957); 4. I. D. IVANOV: *Polarografiia belkov, enzimov i anionokislot*, Izd. Akad. Nauk., Moscova (1961); 5. L. M. BURUIANA, V. PAVLU, I. DEMA, C. DIOCONESCU, A. DFMA: *Studii și cerc. biochim.* (1961), 4, 172; 6. R. BRAUNER, S. COMOROȘAN: *Studii și cerc. biochim.* (1960), 3, 261; 7. I. D. IVANOV: *Biofizica* (Moscova), (1962), 7, 9; 8. H. BERG: *Biochem. Z.* (1957), 329, 275; 9. A. M. CRESTFIELD, K. C. SMITH, F. W. ALLEN: *J. Biol. Chem.* (1955) 216, 185; 10. V. BLAZSEK, L. BU-KĂREȘTI: sub tipar; 11. M. G. SEVAG, D. B. LACKMAN, J. SMOLENS: *J. Biol. Chem.* (1938), 124, 425; 12. E. R. M. KAY, A. L. DOUNCE: *J. Am. Chem. Soc.* (1953), 75, 4041; 13. C. A. KNIGHT: *J. Biol. Chem.* (1952), 197, 241; 14. M. ROSENBAUM, R. A. BROWN: *Anal. Biochem.* (1961), 2, 15; 15. J. S. COLTER, R. A. BROWN, K. A. O. ELLEM: *Biochim. Biophys. Acta* (1962), 55, 31; 16. V. BLAZSEK: sub tipar; 17. D. N. FOGG, N. T. WILKINSON: *The Analyst* (1958), 83, 406; 18. W. H. ROBINSON, C. G. HOGDEN: *J. Biol. Chem.* (1951) 135, 707; 19. M. JIRSA, V. KALOÛS: *Chemicky Listy* (1954), 48, 775; 20. V. BLAZSEK: *Rev. Medico-Chir.* (Iași), (1963), 47, 87; 21. S. AKASHI, H. ISHIHARA: *J. Biochem.* (1961), 49, 481; 22. C. H. W. HIRS: *J. Biol. Chem.* (1956), 219, 611; 23. D. M. P. PHILLIPS: *Prog. in Biophys. and Biophys. Chem.* (1962), 12, 213; 24. C. MEZEL, S. H. ZBARSKY: *Can. J. Biochem. Physiol.* (1962), 40, 1167;

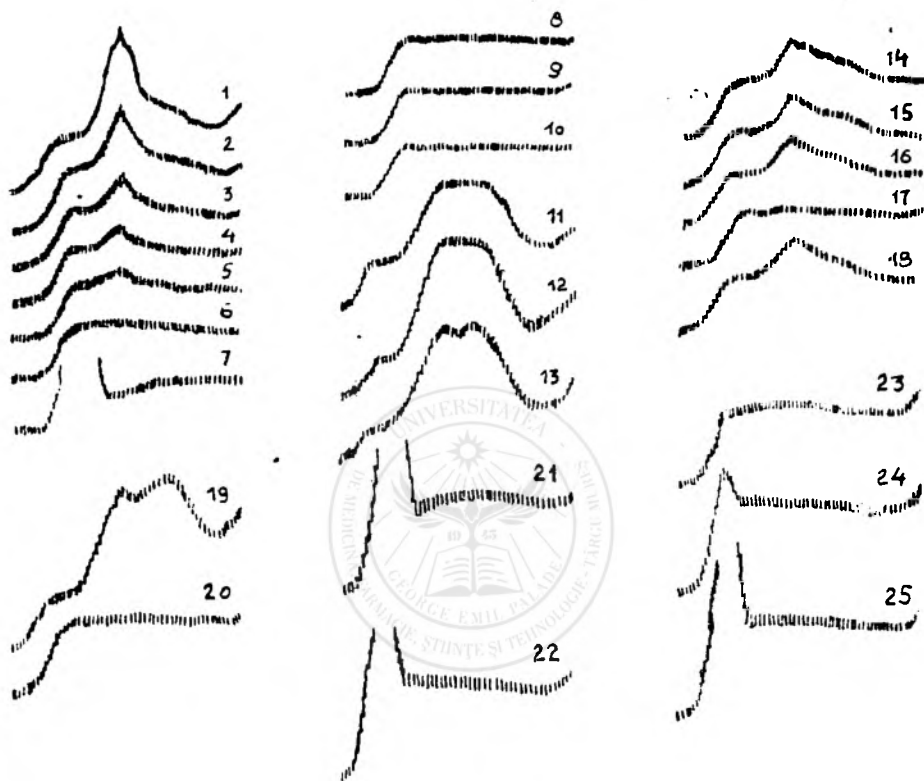


Fig. nr. 1: Curbele 1-5: ARN preparat din drojdie (200  $\mu$  g/ml) + ASB (10,0-5,0-2-0,6  $\mu$  g/ml); curba 6: ARN obținut din drojdie (200  $\mu$  g/ml); curba 7: soluție de bază; curba 8: ARN din drojdie: (1 mg/ml); curba 9: ARN din ficat de bovine (200  $\mu$  g/ml); curba 10: ARN din ficat de găină (200  $\mu$  g/ml); curba 11: ARN din drojdie (200  $\mu$  g/ml, tratat de cinci ori după metoda Sevag); curba 12: ARN din drojdie (200  $\mu$  g/ml prin denaturare termică); curba 13: ARN din drojdie (200  $\mu$  g/ml cu detergent); curbele 14-16: ARN din drojdie (tratată cu fenol o dată, de două ori și de trei ori, 200  $\mu$  g/ml); curba 17: ARN din drojdie: (200  $\mu$  g/ml, 1,5 M insolubil în NaCl); curba 18: ARN drojdie (200  $\mu$  g/ml 1,5 M solubil în NaCl); curba 19: ARN din drojdie: (200  $\mu$  g/ml, tratat de trei ori după metoda lui Sevag); curba 20: ARN din drojdie (200  $\mu$  g/ml), după oxidare cu acid performic; curba 21: histon (10  $\mu$  g/ml), 22: histon (10  $\mu$  g/ml) + ADN (200  $\mu$  g/ml); curba 23: ADN (4 mg/ml); curba 24: ADN (1 mg/ml); curba 25: ADN (200  $\mu$  g/ml).