

Zakład Chemii Fizjologicznej. Instytut Chemii Podstawowych. Wydział Farmaceutyczny.
Akademia Medyczna w Lublinie.

Kierownik: prof. dr med. Tomasz Borkowski

Tomasz BORKOWSKI i Zbigniew PRASAŁ

Oscylopolarograficzne badania DNA jądrowego i mitochondrialnego mózgu cielęcego

Осциллополярографические исследования ядерного и митохондриального ДНК мозга
теленка

Oscillopolarographic Studies of Nuclear and Mitochondrial DNA from the Calf Brain

Od czasu, kiedy obecność DNA w mitochondriach różnych gatunków została udowodniona (10, 12, 16), pojawił się szereg prac wskazujących na różnice w niektórych właściwościach między DNA jądrowym i mitochondrialnym (4, 32, 33). Spośród metod stosowanych dla bliższej charakterystyki DNA należy wymienić również metodę oscylopolarografii. W r. 1965 pierwszy Paleček zastosował tą metodę do wykazywania i określenia stopnia denaturacji DNA (20). Jedną z zalet oscylopolarografii jest możliwość śledzenia zmian w strukturze DNA w zakresie temperatur poniżej T_m (27). Celem naszej pracy było wykazanie podobieństw i różnic we właściwościach DNA jądrowego i mitochondrialnego metodą oscylopolarograficzną.

MATERIAŁ I METODY

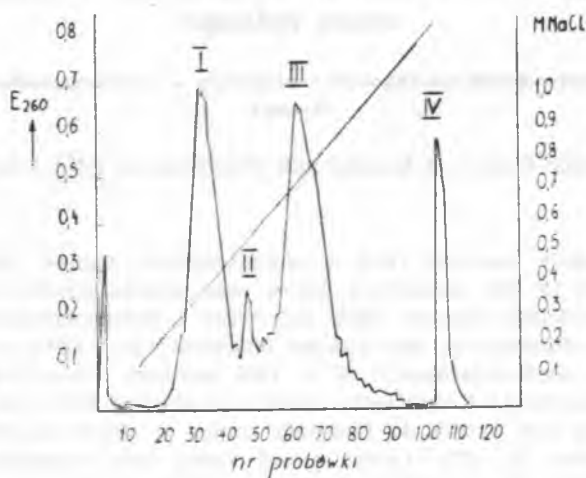
Czyste frakcje jąder komórkowych i mitochondriów izolowano z kory mózgowej cieląt metodą różnicowego wirowania w różnych stężeniach sacharozy (2, 11). Kwasy nukleinowe izolowano metodą ekstrakcji fenolowo-detergentowej (3). DNA jądrowy i mitochondrialny po trawieniu RNazą oczyszczano dodatkowo chromatograficznie na kolumnie z metylowaną albuminą (13). Frakcje zawierające DNA precipitowane etanolem służyły do dalszych badań. Porównawczo używano również wysokopolimeryzowanego DNA grascicy cielęcej firmy Sigma, Chem. Comp. St. Louis, USA oraz preparaty dezoksycytyny (dCM) i dezoksygwanozyny (dGM) firmy Calbiochem, Loevengraben, Szwajcaria. Wysokooczyszczone preparaty RNazy i DNazy pochodziły również z firmy Calbiochem.

Do badań oscylopolarograficznych poszczególne preparaty DNA rozpuszczano w 0,1 M mrówczanie amonowym i 0,02 M buforze fosforanowym o pH 7,0. Roztwory DNA o stężeniu 250 $\mu\text{g/ml}$ umieszczano w termostatowanym naczynku polarogra-

ficznym. Zmiany polarograficzne obserwowano na ekranie polaroskopu LP 600 (Laboratori Pístroje, Praga, Czechosłowacja) z rtęciową elektrodą kroplową polaryzowaną prądem zmiennym o częstotliwości 50 cyków/sek. i natężeniu 0,15 mA. Obrazy były rejestrowane fotograficznie za pomocą aparatu Exacta Varex na filmie o wysokiej czułości.

WYNIKI BADAŃ

Preparat kwasów nukleinowych otrzymany z czystych mitochondriów mózgowych rozdzielano chromatograficznie na kolumnie z metyloowaną albuminą. Stosując elucję gradientem ciągłym NaCl zbierano frakcje o objętości 3 ml, w których określano gęstość optyczną przy 260 nm. Obraz rozdziału kwasów nukleinowych mitochondrialnych przedstawia ryc. 1.



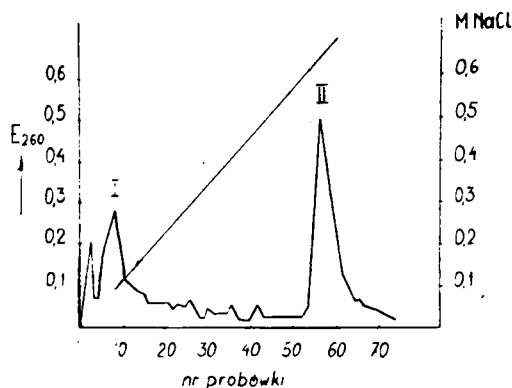
Ryc. 1. Rozdział kwasów nukleinowych mitochondrialnych na kolumnie z metyloowaną albuminą; I — sRNA, II — DNA mitochondrialny, III — rRNA, IV — frakcja eluująca się 1 M NaCl w środowisku alkalicznym

Separation of mitochondrial nucleic acids on the methylated albumin column; I — sRNA, II — mitochondrial DNA, III — rRNA, IV — fraction eluting with 1 M NaCl in an alkaline medium

Frakcja II zebrana z kilku kolejnych preparatów rozdzielonych chromatograficznie była następnie precypitowana etanolem i po rozpuszczeniu w buforze SSC poddawana trawieniu RNazą w ciągu 30 min. Po kolejnej precypitacji etanolowej rozpuszczony w buforze Tris 0,01 M o pH 7,4 z dodatkiem 0,14 M NaCl preparat наносzono ponownie na kolumnę z metyloowaną albuminą. Rozdział prowadzono w warunkach poprzednio podanych, a obraz rozdziału przedstawia ryc. 2.

Jak wynika z ryciny, otrzymuje się w tych warunkach dwie frakcje,

z których pierwsza stanowi część produktów degradacji RNA, druga zaś odpowiada czystemu DNA mitochondrialnemu. Preparat kwasów nukleinowych ekstrahowany z czystej frakcji jąder komórek mózgowych zawierał głównie DNA, który z fazy wodnej wytrącony był w formie nici jedną objętością etanolu. Po trawieniu RNazą rozdzielony na kolumnie z metylovaną albuminą DNA stanowił jedną czystą frakcję eluującą się 0,6 M NaCl.

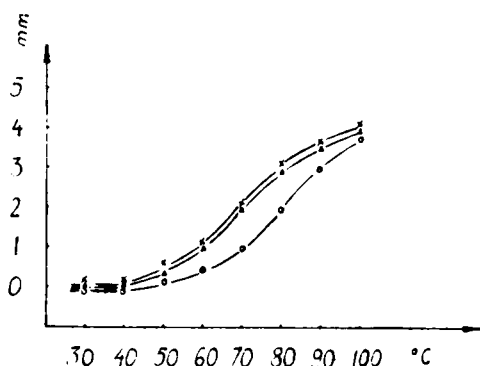


Ryc. 2. Oczyszczanie DNA mitochondrialnego na kolumnie z metylovaną albuminą; I — produkty degradacji RNA, II — DNA mitochondrialny
Purification of mitochondrial DNA on the methylated albumin column; I — RNA degradation products, II — mitochondrial DNA

Wszystkie preparaty badanych DNA nie posiadały wyraźnych wcięć w temp. 30°, lecz tylko płytkie zagłębienia w obu częściach krzywej oscylopolarograficznej. Zmiany termiczne w poszczególnych preparatach śledzono w gradiencie ciągłym temperatury zmieniającym się o 0,5° C na minutę od 30° do 100° i ponownie obniżanej do 30°C. W miarę ogrzewania pojawiały się przy temp. 40° dwa wcięcia katodowe o wartości $Q = 0,73$ (mocniej zaznaczone) i $Q = 0,80$ (słabo widoczne). Wartości Q wyliczano na podstawie oscylogramów ze stosunku odległości wcięcia od lewego punktu końcowego do odległości między obydwoma punktami końcowymi (ryc. 4). Dalszy wzrost temperatury powodował stopniowe pogłębienie wcięcia o $Q = 0,80$ i zanikanie wcięcia o $Q = 0,73$. Zanik wcięcia o $Q = 0,73$ nastąpił w niższej temperaturze na oscylogramach DNA grasiczego i mitochondrialnego w porównaniu do DNA jądrowego. Wcięcie o wartości $Q = 0,80$ podczas wzrostu temperatury roztworu ulegało wykształceniu na tyle, że głębokość jego mogła być łatwo zmierzona (ryc. 3).

Wcięcie powyższe zmieniało nieco swoją wartość potencjału i dla zrenaturowanych DNA osiągało wartość wyrażoną ilorazem bezwymiarowym $Q = 0,85$. Podczas termicznej denaturacji trzech preparatów DNA

wcięciu katodowemu towarzyszyło symetryczne do niego wcięcie anodowe. W czasie ochładzania roztworów DNA głębokość wcięcia katodowego ulegała stopniowemu zmniejszeniu. Po doprowadzeniu ponownym do temp. 30° jednak nie nastąpił całkowity powrót do wyjściowego kształtu krzywej oscylpolarograficznej: w miejscu wyjściowego płytkiego zagięcia pozostało wyraźnie zaznaczone wcięcie. Odkładając na osi rzędnych względne wartości głębokości wcięcia katodowego, a na osi odciętych odpowiednie temperatury, można było określić procent renaturacji badanych DNA (ryc. 4).



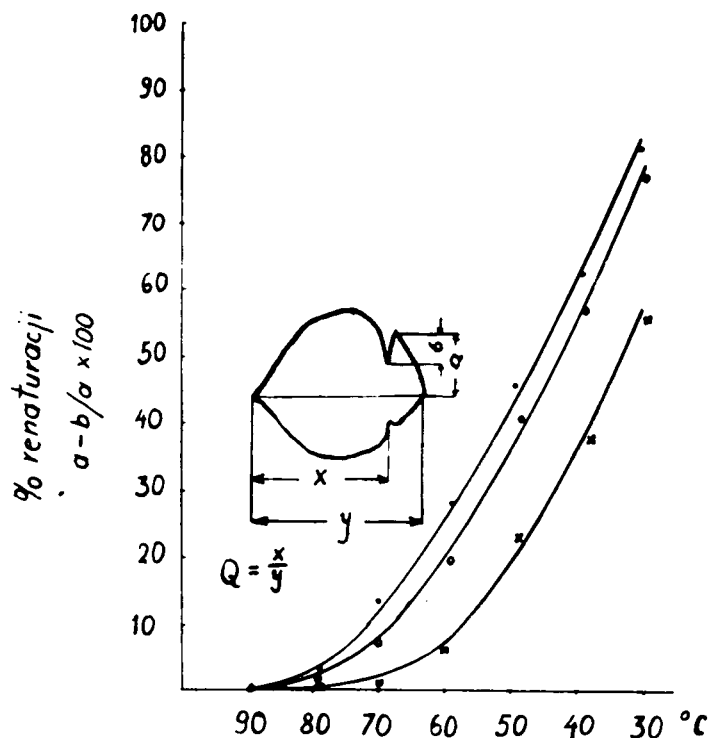
Ryc. 3. Przebieg termicznej denaturacji DNA; x — DNA grasiczy, Δ DNA jądrowy, o — DNA mitochondrialny

The course of thermal denaturation of DNA; x — calf-thymus DNA, Δ — nuclear DNA, o — mitochondrial DNA

Stopniowemu zmniejszaniu wcięcia katodowego towarzyszyło wspomniane już wyżej symetryczne wcięcie anodowe aż do temp. 40°. Podczas ochładzania roztworów DNA powstawało również drugie wcięcie anodowe o wartości $Q = 0,18$ od strony dodatnich potencjałów, które po ochłodzeniu roztworów do temp. wyjściowej 30° utrzymywało się nadal na oscylogramach badanych preparatów DNA (ryc. 7, 8, 9).

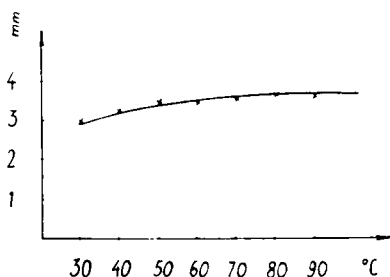
W celu określenia działania czynników (promienie gamma, DNaza) rozszczepiających pojedynczą nić w podwójnej spirali DNA poddano preparat DNA grasiczy trawieniu DNazą. Okazało się, że już po 1 minucie inkubacji w temp. 30° w obrazie oscylpolarograficznym DNA trawionego enzymem powstawało wcięcie katodowe o analogicznym położeniu względem osi potencjałów jak na oscylogramie termicznie zdenaturowanego preparatu DNA. Przebieg trawienia DNA grasiczego DNazą przedstawia ryc. 5.

Trawione DNazą preparaty poddawano następnie działaniu podwyższonej temperatury w sposób analogiczny jak preparaty natywne. Wy-



Ryc. 4. Przebieg renaturacji DNA; x — DNA jądrowy, · — DNA grasiczy, o — DNA mitochondrialny

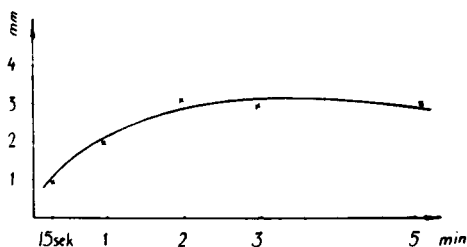
The course of DNA renaturation; x — nuclear DNA, · — calf-thymus DNA, o — mitochondrial DNA



Ryc. 5. Trawienie DNA grasiczego dezoksyrybonukleazą w temp. 30° obserwowane na podstawie wzrostu głębokości wcięcia katodowego. Mieszanina reakcyjna zawierała w 3 ml 0,1 M mrówczanu amonu i 0,02 M buforu fosforanowego o pH 7,0 750 µg DNA grasiczego, 30 µg DNazy i 1,2 mg MgCl₂

Digestion of calf-thymus DNA with deoxyribonuclease at 30° observed on the basis of the deepening of cathodic indentation. 3-ml reaction mixture contained 0.1 M amonium formate with 0.02 M phosphate buffer pH 7.0, 750 µg calf-thymus DNA, 30 µg DNase and 1.2 mg MgCl₂

tworzone działaniem DNazy wcięcie katodowe w miarę podgrzewania roztworu ulegało początkowo nieznacznemu pogłębieniu, a następnie stabilizacji (ryc. 6).



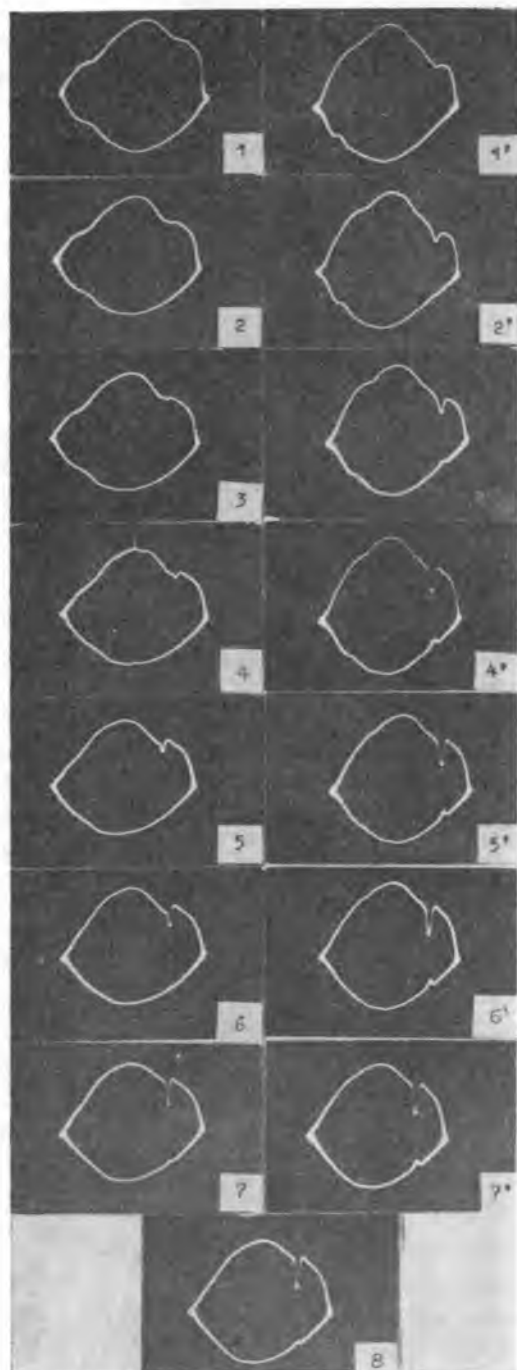
Ryc. 6. Wpływ temperatury na głębokość wcięcia katodowego DNA po uprzednim trawieniu dezoksyrybonukleazą

The effect of temperature on the depth of cathodic indentation of DNA earlier digested with deoxyribonuclease

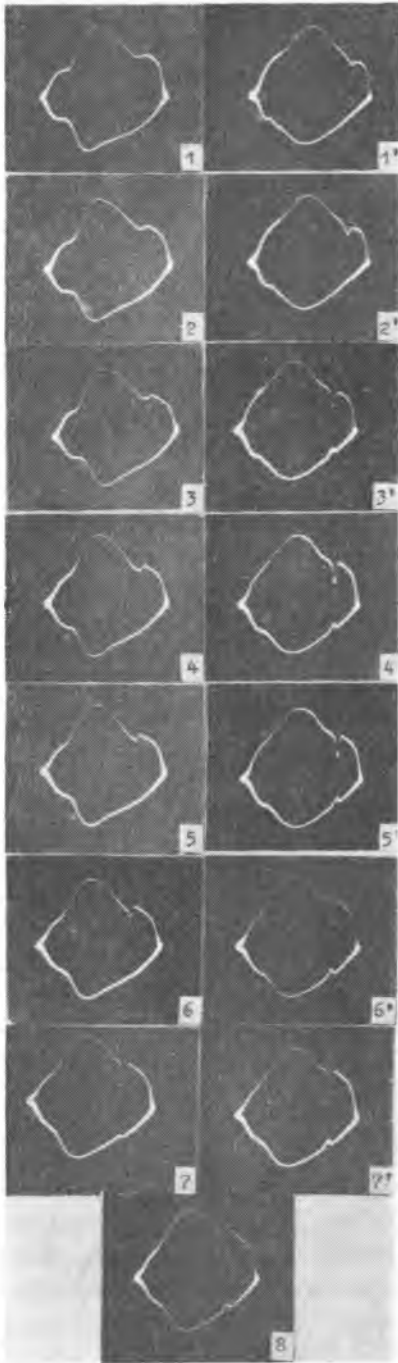
Z wcześniejszych prac wynikało (17, 19), że przy pH 7,0 aktywność oscylpolarograficzną przejawiają reszty cytozyny i gwaniny w DNA. Stosując mieszaninę dezoksycytydyny i dezoksygwanozyny wykazano dużą zgodność w wielkości potencjałów wcięć (wyrażonych w wartościach bezwymiarowych Q) pochodzących od tych nukleozydów i DNA zdenaturowanego (ryc. 10). Wartości Q wcięć katodowych (wyliczonych z oscylogramów dla mieszaniny dCM i dGM oraz DNA zdenaturowanego — ryc. 10) wyniosły odpowiednio 0,178 i 0,172, wartości zaś Q wcięć anodowych — 0,857 i 0,855.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ I WNIOSKI

W badaniu właściwości DNA pochodzącego z różnych struktur komórkowych (jądra, mitochondria) określano wpływ temperatury na stan pobudzenia cząsteczek. Dokonano tego rejestrując wcięcia na oscylogramach odzwierciedlających procesy zachodzące na polaryzowanej elektrodzie kroplowej i w jej otoczeniu. Pochodzenie i mechanizm powstawania tych wcięć były przedmiotem badań Palečka i innych autorów. Wcięcia katodowe określone na naszych oscylogramach wartością $Q = 0,73$ [wg Palečka (23) $Q = 0,76 \pm 0,02$] i spostrzegane jako fala I w impulsowej polarografii posiada naturę pojemnościową i świadczy o desorpcji DNA (15), który ulega adsorpcji na elektrodzie kroplowej tylko przy dodatnich potencjałach (23). Wcięcie o $Q = 0,85$ (fala III) występuje na oscylogramach zdenaturowanego DNA, powstaje kosztem prądu elektrolitycznego i dowodzi elektroredukcji reszt cytozyny w łańcuchu DNA (19, 30). Wcięcie to na naszych oscylogramach (ryc. 7, 8, 9 od 1—6) w obszarze przedtopieniowym DNA przyjmowało nieco zmie-



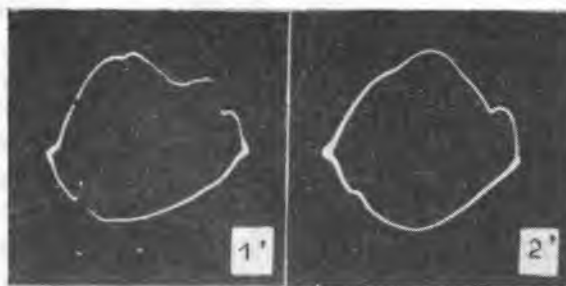
Ryc. 7. Oscylogramy ilustrujące wpływ temperatury na DNA grasiczy. Zdjęcia oscylogramów z ekranu polaroskopu wykonywano w odstępach 10°C w przedziale temperatur 30° — 100° podczas denaturacji (lewa kolumna) i od temp. 100° (oscylogram nr 8) do 30° (oscylogram nr 1') w czasie renaturacji. Oscillograms illustrating the effect of temperature on calf-thymus DNA. Pictures of oscillograms from a polaroscope screen were taken every 10°C within 30° — 100° during denaturation (left column) and from 100° (oscylogram No. 8) to 30° (oscylogram No 1') during renaturation



Ryc. 8. Oscylogramy ilustrujące wpływ temperatury na DNA jądrowy. Objasnienie jak w opisie ryc. 7
Oscillograms illustrating the effect of temperature on nuclear DNA. Explanation as in fig. 7



Ryc. 9. Oscylogramy ilustrujące wpływ temperatury na DNA mitochondrialny. Objasnienia jak w opisie ryc. 7
Oscillograms illustrating the effect of temperature on mitochondrial DNA. Explanation as in fig. 7



Ryc. 10. Porównanie potencjałów odpowiednich wcięć (wyrażonych w wartościach Q) roztworu mieszaniny dCM i dGM z roztworem zrenaturowanego DNA grasiczego, 1') — roztwór dCM i dGM w stęż. 0,3 mg/ml każdego składnika w 0,1 M mrówczanie amonu i 0,02 M buforze fosforanowym (Na) o pH 7, 2') — 250 $\mu\text{g/ml}$ DNA w środowisku jak wyżej

A comparison between the potentials of corresponding indentations (expressed in Q values) of dCM and dGM mixture solution and those of renatured calf-thymus DNA solution, 1') — dCM and dGM solution in a concentration of 0,3 mg/ml of each component in 0.1 M ammonium formate and 0.02 M phosphate buffer (Na) o pH 7, 2') — 250 $\mu\text{g/ml}$ DNA in the above medium

nioną wartość $Q = 0,80$. Za występowanie wcięcia anodowego o $Q = 0,18$ na $dE/dt = f(E)$ dla roztworów DNA odpowiedzialne są reszty kwasu dezoksygwanozynowego, które uwalniają się z podwójnej spirali na powierzchni elektrody przez powtarzające się okresy prądu polaryzującego (18). Jeśli poszczególne krople rtęci są polaryzowane pojedynczym okresem prądu (tzw. „technika pierwszej krzywej”), to wcięcie anodowe nie pojawia się na oscylogramie DNA natywnego, lecz na oscylogramie DNA zdenaturowanego (22). Wcięcia anodowe tworzą również monomeryczne nukleozydy i nukleotydy gwaniny (ryc. 10) w środowisku mrówczanu przy pH 7,0. Głębokość jego jest uzależniona od temperatury i wraz z jej wzrostem zmniejsza się (8, 9, 28). Pochodzenie wcięcia anodowego symetrycznego z katodowym (ryc. 7, 8, 9 od 7'—4') tłumaczono (6) przebiegiem elektroredukcji reszt cytozyny zarówno na powierzchni elektrody, jak i w warstwie przylegającej do elektrody kroplowej. Wykluczało ono rozpoznanie dalszych składników DNA, gdyż przy pH 7,0 adenina i tymina okazały się polarograficznie nieaktywne (7).

Zachowanie się omówionych wcięć podczas denaturacji i renaturacji DNA pozwoliło ujawnić podobieństwa i różnice strukturalne trzech badanych preparatów DNA. Stwierdzono, że charakteryzowały się one wspólną cechą polegającą na odsłonięciu reszt dezoksycytydyny i dezoksygwanozyny w cząsteczkach DNA termicznie denaturowanych. Reszty te zidentyfikowano na podstawie zgodności ilorazów Q przy pomocy wzorców (ryc. 10).

Obserwowane przez nas przejście (zanik) wcięcia katodowego o $Q = 0,73$ we wcięcie o $Q = 0,80$ (ryc. 7, 8, 9) znalazło potwierdzenie w pracy Boháček i Palečka (1). Wymienieni autorzy poprzez ustalenie liniowej zależności między ilością pary $G + C$ w DNA, a temperaturą zaniku tego wcięcia opracowali metodę oznaczania zawartości pary $G + C$ dla różnych DNA. Wyższej temperaturze zaniku wcięcia o $Q = 0,73$ na oscylogramie odpowiadała wyższa zawartość pary $G + C$ w odpowiednim DNA. Boháček i Paleček nie badali DNA mitochondrialnego i DNA jądrowego z mózgu cieląt. Z załączonych oscylogramów (ryc. 7, 8, 9) można było przekonać się, że istotnie DNA jądrowy wykazywał wyższą temperaturę zaniku tego wcięcia od dwu pozostałych DNA. Temperatura zaniku tego wcięcia dla DNA mitochondrialnego i grasiczego nie różniła się od siebie. Zgodnie z wynikami pracy powyższych autorów DNA jądrowy powinien wykazywać wyższą zawartość molową pary $G + C$ przy jednakowym składzie pary $G + C$ DNA mitochondrialnego i DNA grasiczego. Podanie konkretnych wartości składu zasad badanych preparatów DNA wymagałoby wyznaczenia temperatury z dokładnością $\pm 0,7^{\circ}\text{C}$ zaniku wcięcia o $Q = 0,73$. Na podstawie naszych oscylogramów było to niemożliwe, ponieważ zdjęcia rejestrowano w odstępach 10°C .

Poszukując zależności między innymi wcięciami na krzywej $dE/dt = f(E)$ a własnościami DNA zwrócono uwagę na dość znaczne zmniejszenie (o 30%) głębokości wcięcia katodowego o $Q = 0,80$ w temperaturach $70\text{--}80^{\circ}$ na oscylogramie DNA mitochondrialnego (ryc. 7, 8, 9 — 5, 6). Mniejsza głębokość tego wcięcia w porównaniu z pozostałymi DNA wpłynęła na różny kształt krzywych DNA w obszarze przedtopnieniowym (ryc. 3). Wyraźnie odbiegający swym przebiegiem kształt krzywej DNA mitochondrialnego mógłby sugerować przewagę pary $G + C$ w tym DNA. Z obserwacji Palečka (23) nad wieloma DNA różnego pochodzenia wynika, że różnica w zawartości pary $G + C$ nie jest proporcjonalna do przesunięcia temperatury, przy której następują różnice głębokości wcięcia katodowego. Własność tą spełnia natomiast temperatura zaniku wcięcia o $Q = 0,73$, z której skorzystano w niniejszej pracy przy ocenie zawartości składu pary $G + C$ w trzech preparatach DNA. Mniejsza głębokość wcięcia katodowego DNA mitochondrialnego w porównaniu z DNA grasiczym lub jądrowym mogła zatem pozostawać w związku z różnicami w sekwencji nukleotydowej tego DNA. Wydaje się, że analogicznie jak w przypadku DNA pochodzenia bakteryjnego (21, 22) termiczne uwalnianie reszt cytozyny na elektrodzie kroplowej z DNA mitochondrialnego winno zachodzić z obszarów cząsteczki tym trudniej, im mniejsza liczba par $A + T$ otaczała pary $G + C$. Sytuacja taka mogła sugerować inną sekwencję nukleotydową DNA mitochondrialnego bo-

gatszego w regiony o zwiększonej liczbie par G + C. Jak dowiódł tego Paleček (23, 24), na podstawie różnic głębokości wcięcia katodowego w temperaturach przedtopnieniowych udaje się metodą oscylopolarograficzną stwierdzić różnice w sekwencjach nukleotydowych DNA posiadających jednakowy skład pary G + C. Zgodność naszych obserwacji z wynikami autora wskazywałaby na różnicę w sekwencji nukleotydowej DNA mitochondrialnego.

Obserwacje wcięcia anodowego o $Q = 0,18$ mogą również dostarczyć informacji odnośnie właściwości DNA. W tym celu pomiary głębokości tego wcięcia należałoby wykonywać w temperaturze pokojowej po nagłym oziębieniu ogrzanego do 100° roztworu DNA; w tych warunkach głębokość wcięcia anodowego wykazuje korelację z ilością pary G + C (22, 26). Pomiary nasze były wykonywane w podwyższonych temperaturach w celu zaobserwowania zmian podczas renaturacji badanych DNA. Procesy renaturacyjne DNA, których szybkość jest proporcjonalna do siły jonowej roztworu i masy cząsteczkowej, a odwrotnie proporcjonalna do lepkości roztworu i niejednorodności preparatu (31) posłużyły do scharakteryzowania badanych preparatów od strony ich niejednorodności. Z porównania oscylogramów (ryc. 7, 8, 9 — 1, 1') i ryc. 4 wynikało, że proces renaturacji badanych DNA nie był całkowity. Pełna odwracalność tej przemiany termicznej zachodzi jedynie w przypadku jednorodności struktury DNA podczas powolnego ochładzania roztworu (5). Struktura DNA z komórek ssaków jest z reguły niejednorodna w przeciwieństwie do struktury DNA wirusów i bakterii (5, 14). Spośród trzech badanych DNA najniższy stopień renaturacji (58%) stwierdzono dla DNA jądrowego.

Jak wiadomo, działanie DNazy trzustkowej polega na rozkładzie DNA do oligonukleotydów mających przeciętnie cztery ogniwa w łańcuchu, wolną grupę hydroksylową w pozycji 3' i resztę fosforanową w pozycji 5'. Niskie stężenia DNazy powodują roszczepienie pojedynczej nici w podwójnej spirali DNA (25). Nie jest możliwa spektrofotometryczna analiza tych zmian z pomiarów ekstynkcji przy 260 nm w temperaturach przedtopnieniowych DNA z powodu nienaruszenia pionowego oddziaływania pomiędzy zasadami w łańcuchu (25). Zmiany powyższe mogą być stwierdzone metodą oscylopolarograficzną (ryc. 5), a dokładnie jej udoskonaloną modyfikacją tzw. „techniką pierwszej krzywej” (29). W otoczeniu rozerwanych wiązań fosfodwuestrowych w DNA odsłaniały się już w temperaturze wyjściowej reszty nukleozydów, z których jakościowo dwie były przy pH 7 aktywne oscylopolarograficznie. Ilość tych reszt widocznie była na tyle wysoka, że wzrost temperatury nie miał już większego wpływu na pogłębienie wcięcia katodowego (ryc. 6).

PIŚMIENNICTWO

1. Boháček J., Paleček E.: Coll. Czech. Chem. Commun., **30**, 3455—3461, 1965.
2. Borkowski T., Harth S., Mardell R., Mandel P.: Nature **192**, 456—458, 1961.
3. Borkowski T., Sikorska K., Borkowska I.: In Macromolecules and the Function of the Neuron; Lodin Z., Rose S. P. R., Excerpta Medica Fond., 1968, p. 187.
4. Borst P., Ruttenberg G. K. C. M.: Biochim. Biophys. Acta **114**, 645—653, 1966.
5. Davidson J. N.: Biochemia kwasów nukleinowych, PWRL, Warszawa 1969, str. 64.
6. Filipowski J., Chmielowski J., Choraży M.: Biochim. Biophys. Acta **232**, 451—461, 1971.
7. Heath J. C.: Nature **158**, 23—25, 1946.
8. Janik B., Paleček E.: Abhandl. Deut. Akad. Wiss., **4**, 513—521, 1966.
9. Janik B., Paleček E.: Zeitschr. für Naturforschung **21**, 1117—1118, 1966.
10. Kalf G. F.: Biochemistry **3**, 1702—1709, 1964.
11. Lovtrup S., Zelander T.: Exptl. Cell Res., **27**, 468—476, 1962.
12. Luck D. J. L., Reich E.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., **52**, 931—942, 1964.
13. Mandell J. D., Hershey A. D.: Analyt. Biochem., **1**, 66—73, 1960.
14. Marmur J., Doty P.: J. Mol. Biol., **3**, 585—596, 1961.
15. Miller J. R.: J. Mol. Biol., **3**, 229—239, 1961.
16. Nass M. M. K., Nass S., Afrelius B. A.: Exptl. Cell Res., **37**, 516—522, 1965.
17. Paleček E.: Coll. Czech. Chem. Commun., **25**, 2283—2285, 1960.
18. Paleček E.: Nature **188**, 4751—4753, 1960.
19. Paleček E., Janik B.: Arch. Biochem. Biophys., **98**, 527—534, 1962.
20. Paleček E.: Biochem. Biophys. Acta, **94**, 293—301, 1965.
21. Paleček E.: Abhandl. Deut. Akad. Wiss., Berlin, Kl. Med. 1966, str. 501.
22. Paleček E.: Coll. Czech. Chem. Commun., **31**, 2360—2373, 1966.
23. Paleček E.: J. Mol. Biol., **20**, 263—281, 1966.
24. Paleček E., Lukášová E.: Biophysik, **3**, 272—283, 1966.
25. Paleček E.: Arch. Biochem. Biophys., **125**, 142—151, 1968.
26. Paleček E.: In Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology ed. J. N. Davidson, W. E. Cohn, Academic Press, N.Y., London, v. **9**, 1969, p. 54.
27. Paleček E.: *ibid.*, p. 59.
28. Praszał Z.: Annale Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, sec. D, **26**, 51—55, 1971.
29. Sevčík F., Metzl K.: Chem. zvesti, **18**, 458—464, 1964.
30. Smith D. L., Elving P. J.: J. Am. Chem. Soc., **84**, 2741—2747, 1962.
31. Subirana J. A., Doty P.: Biopolymers **4**, 171—176, 1966.
32. Suyama Y.: Biochemistry **5**, 2214—2224, 1966.
33. Van Bruggen E. F. J., Borst P., Ruttenberg G. J. C. M., Gruber M., Kroon A. M.: Biochim. Biophys. Acta, **119**, 437—445, 1966.

РЕЗЮМЕ

Проведены осциллополярографические исследования чистых препаратов ядерного и митохондриального ДНК мозга телят и ДНК зубной железы. Все анализированные препараты при нагревании до 100° активно денудировали осциллополярографические остатки дезоксицитидина, а при охлаждении — остатки дезоксигуанозина. На основе относительно высокой температуры атрофии катодной выемки с $Q=0,73$ на осциллограммах, характеризующих состояние ДНК перед плавлением, констатировано молярное преобладание G+C в ядерном ДНК. На основе уменьшения глубины катодной выемки этого ДНК на 30% во время денатурации в частице митохондриального ДНК обнаружен перевес нуклеотидовых секвенций, состоящих из пары G+C. Неоднородность структуры ДНК подтверждена и другими изменениями, выступающими на осциллограммах после ренатурации. Короткое действие DN-азы на ДНК зубной железы вызывало те же изменения, что и при термической денатурации. Полученные результаты сравнены с данными из литературы.

SUMMARY

Oscillopolarographic studies of pure preparations of nuclear and mitochondrial DNA from the calf brain and of calf-thymus DNA were carried out for the first time. All the analysed preparations when heated to 100° unmasked active oscillopolarographic residues of deoxycytidine and when cooled down unmasked deoxyguanosine residues. On the basis of a relatively higher temperature, the disappearance of the cathodic indentation of $Q = 0.73$ on the osillograms characterizing the premelting state of DNA, the molar prevalence of the G + C pair was found in the nuclear DNA. The predominance of nucleotide sequences consisting of the G + C pair in the mitochondrial DNA molecule was demonstrated on the basis of a 30% decrease in the depth of cathodic indentation of this DNA during denaturation. The heterogeneity of the DNA structure was confirmed by other changes on the oscillograms after renaturation. A short-lasting effect of DNase on the calf-thymus DNA caused the appearance of the same changes on the oscillogram as during thermal denaturation. The above results were discussed.

ANNALES UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA

Nakład: 700 + 25 egz. — Ark. wyd. 33,75, ark. druk. 21,25 + 12 str. kred.

Pap. druk. sat., kl. III, B-1, 80 g.

Oddano do składu w styczniu 1973 r., podpisano do druku w czerwcu 1973 r., wydrukowano we wrześniu 1973 r.

Cena zł 105.—

Tłoczono w Oficynie Drukarskiej UMCS w Lublinie, nr zam. 2/73, G-4.

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXVI

SECTIO D

1971

16. A. Dobrzańska i J. Kostrzewski: Familial Occurrence of the Down's Syndrome.
17. I. Trojnecka: Clinical Suitability of Excretory Urography for the Diagnosis of Genital Organ Tumours in Women.
18. M. Bieganska: Partition Chromatography of Pyridyl Alkyl Ketones in the Systems: Weakly Polar Solvent — Aqueous Solutions of Citric Acid.
19. Z. Kleinrok, A. Książek, E. Przegaliński: Some Pharmacological Properties of New 3- and 4-aminoacetamide Derivatives of Phtalimid.
20. M. Litwin: Ultrastructural Changes in the Hepatic Cells During the Experimental Obstructive Jaundice.
21. R. Buliński i K. Kutulas: Investigations on the Content of Tocopherols in Vegetable Oils and in Different Sorts of Market Margarine.
22. H. Jawłowski: Histological Structure of the Brain of *Melolontha melolontha* L. (Coleoptera).
23. J. Staszyc: Effect of Experimental Vagotomy on the Cytophysiology of the Enterochromaffin Cells.
24. N. Popkowska: The Epidemiology of Mental Deficiency in the Lublin Voivodeship.
25. L. Kurylcio i A. Panecka: The Obturator Hernia as a Cause of Acute Mechanical Intestinal Obstruction.
26. E. Kifer i Z. Korybska: Morphological Variability of some Long Bones of *Sorex araneus* L. and *Sorex minutus* L.
27. W. Szymański: Ergothioneine Concentration in the Umbilical Blood of the New-born Children and in the Venous Blood of Their Mothers.
28. W. Szymański: Alternations in the Level of Ergothioneine in the Blood of New-born Children and Infants.
29. W. Szymański: Ergothioneine Concentration in the Children from 1 to 15 Years of Age in Comparison to Ergothioneine Concentration in the New-born Children and Infants.
30. N. Popkowska: The Epidemiology of Mental Diseases in the Lublin Voivodeship.
31. J. Kozak: The Influence of Atropine, Diamox and Lasix on the Secretory Action of Dog Gastric Mucosa Stimulated by Histamine.

1972

Cena zł 105.-