

Dr. J. BABIČKA:

Polarografické stanovení změn v klidném a dělicím se jádře.

Ústav pro fyziologii rostlin Karlovy university.

Sledujeme-li literaturu zabývající se chemickými změnami v klidném a dělicím se jádře, seznáme, že teprve hlavně v nejnovější době se jim počíná věnovati patričná pozornost. Vedle řady autorů — SCHWARZ (15.), ZACHARIAS (19.), OSBORNE (12.), ZALESKI (20.), FISCHER (3.), STRASBURGER (17.), JONES (7.), KIESEL (8.) a j. — sluší především jmenovati B. NĚMCE (10., 11.), který již celou řadu let na věci pracuje a vzbudil pro ni svými pracemi veliký zájem.

Pracemi jmenovaných badatelů bylo zvikláno neudržitelné mínění, že chromosomy, které, jak známo, jsou značně bohaté nukleinem, se stanoviska chemického se chovají stejně v klidném a dělicím se jádře.

Na rozdíl od často komplikovaných mikrochemických metod použil B. NĚMEC (10., 11.) jednoduchých, avšak přesvědčivých důkazů. Zjistil nápadné změny, které probíhají v jádrech buněk různého vývojového stáří tím, že ponořoval na určitou dobu do destilované vody, jejíž teplotu podle potřeby měnil, jednak rostlinné orgány odlišného stáří a jednak jejich jednotlivé části.

Mimo destilované vody použil i roztoků zředěných elektrolytů, jako KOH, NaOH, HCl, H₂SO₄ a j.; při tom dosáhl obdobných výsledků.

Bylo dokázáno, že struktura jádra se mění s jeho fyziologickou funkcí a že chemické složení jádra se podstatně liší od složení plasmu.

V úvahu zde přicházejí hlavně nukleoproteidy, podstatná to součást buněčného jádra. Zahříváním jader pletiv meristematických v destilované vodě nastává rozštěpení substance chromosomů, resp. nukleoproteidů (α -nukleoproteidů) v kyselinu nukleinovou a bílkoviny. Bílkoviny takto vzniklé se pak vlivem kyselého prostředí nekoagulují. Množství kyseliny nukleinové počínaje profází stoupá a v klidném jádře naopak klesá. Horká voda, podle výsledků plynoucích z pokusů, uspišuje rozpad nukleoproteidů, neboť dochází k němu i v chladné vodě, ovšem za delší dobu.

K zajímavému poznání došel OES (12.). Domnívá se, že rostoucí a dělicí se buňky obsahují zvláštní enzym, který rozpouští jaderný chromatin. Označil jej nukleasa. Podle něho se uplatňuje nukleasa při metafázi, anafázi, telofázi, méně při profázi, kdy vlastně začíná; nukleasa nepůsobí v klidných jádrech.

I v našem případě by se dalo říci, že snad nukleasa je příčinou uvedené rozpustnosti. Blána jaderná a nukleolus klidných jader zůstávají nerozpustěny. Aby se i starší jádra rozpustila, je nutno na ně působiti kyselinami nebo louhy.

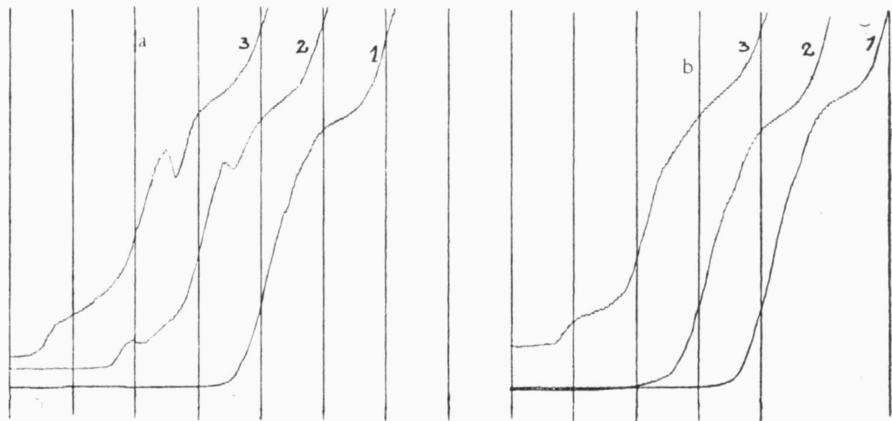
V louhu draselném nebo sodném se jaderné retikulum rozpouští rychleji

než cytoplasma. Chromosomy se rozpouštějí zcela až po 24 hodinách, působí-li na ně 1% KOH (B. NĚMEC 10., 11.).

Mikrochemické reakce spojené s cytologickou technikou různých metod jasně stanovily uvedené rozdíly, speciálně pak FEULGENOVA metoda, jíž užíval P. MILOVIDOV (9.).

Pokusy v této práci uvedené mají dokázat, zda jsou to opravdu bílkoviny, ovšem vedle řady jiných sloučenin, které z rostlinných orgánů difundují do rozpustidla a způsobují jeho opalescenci.

Při elektrolýse se rtuťovou kapkovou katodou lze bílkoviny dobře stanovit, neboť jako redukce schopné látky se projevují na tak zv. polarografických vlnách.



Obr. 1: Extrakt ze 60 kořenů bobu (*Vicia faba*). Vlna bílkovinná úměrně stoupá s koncentrací analysované látky. Pletiva nedělivá neskýtají bílkovinných vln.

Křivky:

- a) 1. 20 ccm NH_4Cl , LiCl (n/20).
- 2. 20 " " " " + 1 ccm extraktu ze špiček kořenů.
- 3. 20 " " " " + 2 " " " " " "
- b) 1. 20 ccm NH_4Cl , LiCl (n/20).
- 2. 20 " " " " + 1 ccm extr. ze střed. části kořenů.
- 3. 20 " " " " + 2 " " " " " "

Čitl. $1/300$, G. $5 \cdot 10^{-8}$, A. 4 volt.

O metodě polarografické se zde nezmiňují, neboť bylo o ní již mnoho psáno v článkách J. HEYROVSKÉHO (4., 5.) a jeho spolupracovníků. Popis přístroje s technického stanoviska podal J. HEYROVSKÝ (4., 5.) a S. PRÁT (13.).

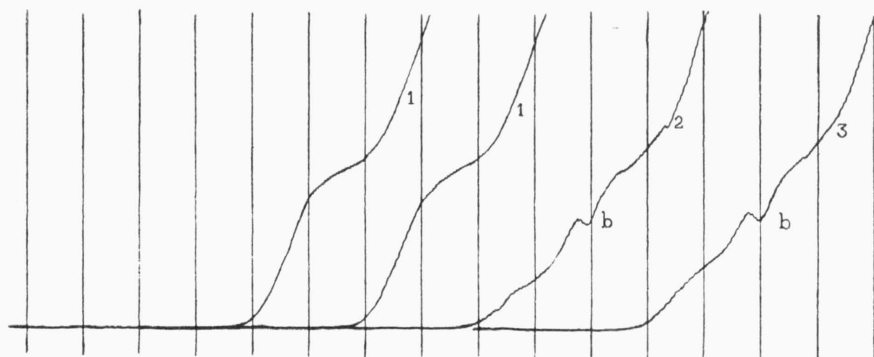
Při pokusech zde uvedených bylo použito polarografického přístroje systém HEYROVSKÝ-SHIKATA s citlivostí zrcátkového galvanometru $5 \cdot 10^{-8}$ až $5 \cdot 10^{-9}$ ampér na jeden milimetr vychylky a čtyřvoltového akumulátoru. Vylučování vodíkových iontů z bílkovin nastává asi při -1.5 voltu, kdežto z normálních roztoků kyselin asi při -1.1 voltu a z ammonného iontu při -1.7 voltu. Tento vylučovací potenciál je závislý na konstituci bílkoviny a je pro ni charakteristický co do kvality.

Z výšky vzniklé tak zvané polarografické vlny lze pak vypočítat kvantitu analysované látky, takže při rozboru obdržíme jak kvalitu tak kvantitu, a to

současně; při tom můžeme sledovati průběh celého rozboru od počátku až do konce. Už r. 1926 upozornil PRÁT, že polarografická metodika (13.) se hodí pro sledování rostlinných extraktů.

Po analýsách, kdy se nám s J. HEYROVSKÝM (6.) podařilo stanovití bílkoviny v nepatrných koncentracích (0·001%) a za použití zcela malých kvant analysované látky, použil jsem na podnět prof. dra B. NĚMCE metody se rtuťovou kapkovou katodou ke sledování rostlinných extraktů.

První rozborů byly provedeny na meristémeh kořenů, po té os a listů, po případě jejich jednotlivých partií. Výsledků a zkušeností získaných při rozbořech bílkovin a jejich rozpadných produktů nejrůznějšího původu dalo se zde s výhodou použítí.



Obr. 2: Extrakt získaný z listů kukuřice (*Zea mays*). Se stoupající koncentrací analysované látky stoupá i polarografická vlna.

Křivky:

1. 20 ccm NH_4Cl , LiCl (n/20); pro kontrolu dvakrát opakováno.
2. 20 „ „ „ „ + 1 ccm extraktu.
3. 20 „ „ „ „ + 2 „ „

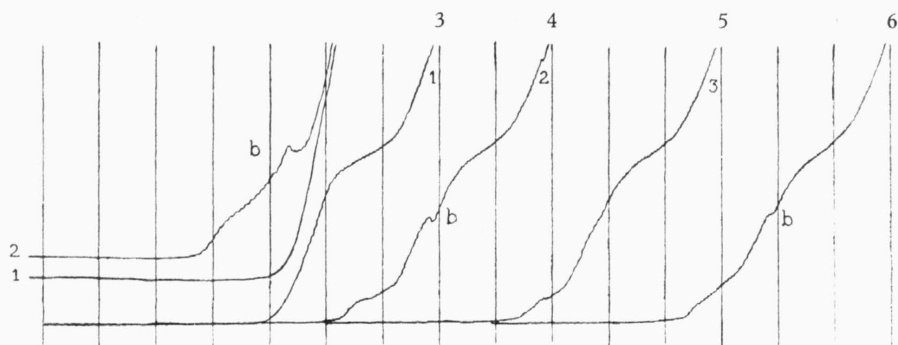
Citl. 1/300, G. $5 \cdot 10^{-8}$, A. 4 volt. *b* značí vlnu bílkovin.

Rozborů extraktů pletiv meristematických a stálých vidíme nejlépe znázorněny na obrázcích, kde jsou přítomné bílkoviny označeny písmenou *b*. Tak obrázek č. 1 poskytl extrakt ze špiček 60 kořenů bobu (*Vicia faba*) deset dní starých. Kořeny po očištění byly na 5 minut ponořeny do destilované vody 80°C. Na polarografických křivkách je patrné, jak výška bílkovinné vlny úměrně stoupá s postupným přidáváním extraktu (a). Mimo to je viděti, že odlišné partie téhož orgánu mají odlišné chemické složení (b). Zatím co z meristematického pletiva přecházejí do rozpustidla bílkovinné látky, není tomu tak u pletiva nemeristematického. Zvyšuje-li se koncentrace analysovaného roztoku přidáváním analysované látky, stoupá úměrně vlna, jen když je přítomna bílkovina, jinak nikoliv. Obr. č. 2 nám představuje extrakt získaný z listů kukuřice (*Zea mays*). Meristematické partie 60 kukuřic byly ponořeny na 5 minut do destilované vody 80°C. Rozpustidlo, když látky z listů vydifundovaly, silně opalísuje. Vlna bílkovinná stoupá s koncentrací analysované látky.

Obrázek č. 3 (vpravo) znázorňuje, jak se při zakládání postranních kořenů vytvářejí látky, které se nápadně liší od okolních partií. Jde o meristematická pletiva, která skýtají bílkoviny, kdežto klidná pletiva toho schopna nejsou. Po-

stup při znázorněné analýze byl tentýž jako v předchozím případě; analysováno 60 kořenů hrachu (*Pisum sativum*).

Na obrázku č. 3 (vlevo) vidíme, že meristém os vlčince (*Lupinus albus*) skýtají tentýž případ.



Obr. 3: Meristém 60 os vlčince (*Lupinus albus*). Rovněž i meristém os skýtají bílkovinné látky, které se projevují na tak zv. polarografických vlnách.

Křivky:

1. 20 ccm NH_4Cl , LiCl (n/20).
 2. 20 „ „ „ „ „ + 1 ccm extraktu z os vlčince.
- Citl. $1/300$, G. $5 \cdot 10^{-8}$, A. 4 volt.

Zakládají-li se postranní kořeny, tu tato pletiva se nápadně chemicky počínají lišiti od svého okolí. V extraktu nalézáme bílkoviny, kdežto v okolních nedělicích se partiích ne.

Křivky :

3. 20 ccm NH_4Cl , LiCl (n/20).
4. 20 „ „ „ „ „ + 1 ccm extraktu ze špiček kořenů.
5. 20 „ „ „ „ „ + 1 ccm extraktu z kořene 1 cm nad meristémem.
6. 20 „ „ „ „ „ + 1 ccm z části, kde se zakládají nové kořeny.

Citl. $1/300$, G. $5 \cdot 10^{-8}$, A. 4 volt., *b* značí vlnu bílkovin.

Polarographic tests for the changes in the dividing and resting nuclei.

Resting nuclei differ in their chemical composition from dividing nuclei, since the distilled water at 80°C prevents the solution of resting nuclei through coagulation of their proteins; proteins of dividing nuclei however pass into solution; this was shown by NĚMEC already in the year 1909.

The strongest solution (solubility) of albuminous matter take place in the metaphase, anaphase and telophase, whilst in the prophase is weaker. This may be followed both microchemically as well as by means of microscope, by means of FEULGEN's reaction, as has been demonstrated already by NĚMEC and MILOVIDOV.

The present author demonstrates, on the other hand, in this paper, how the presence of soluble proteins may be followed microchemically by means of the polarographic method with the dropping mercury cathode; it has been proved that the proteins of nondividing nuclei remain insoluble. The sensitivity of this method is so great that even 0.001% of proteins may be observed on the polarographic curve.

Plant-Physiology Laboratory, Charles University.

LITERATURA.

1. BABIČKA, J., Použití analyzy se rtuťovou kapkovou katodou ke stanovení proteinů. Rozpr. II. tř. Č. A. XL. č. 38. 1930. Praha. — The determination of proteins by means of the analysis with the dropping mercury cathode. Bull. inter. de l'Acad. de Bohême. Prague.
2. BABIČKA, J., Polarografický výzkum extraktů rostlinných elektrolysou se rtuťovou kapkovou katodou. Rozpr. II. tř. Č. A. XLI. č. 13. 1931. Praha. Polarographic examination of extracts from plants by means of electrolysis with the dropping mercury cathode. Bull. inter. de l'Acad. de Bohême. Prague.
3. FISCHER, A., Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas. 1899. Jena.
4. HEYROVSKÝ, J., Elektrolysa se rtuťovou kapkovou katodou. Chemické listy 16:256. 1922.
5. HEYROVSKÝ, J., Sur la méthode analytique d'électrolyse avec la cathode à goutte de mercure. Bull. de la Soc. Chim. de France. 47:1224. 1927. Paris.
6. HEYROVSKÝ, J.—BABIČKA, J., The effect of albumins. The Chemical News. 141:3687—3688. 1930. London.
7. JONES, W., Nucleic acids. 1920. London.
8. KIESEL, A., Chemie des Protoplasmas. 1930. Berlin.
9. MILOVIDOV, P., Einfluß von Wasser hoher Temperatur auf den Kern... Protoplasma 17:32—88. 1932.
10. NĚMEC, B., Zur Mikrochemie der Chromosomen. B. d. d. b. G. 27:43. 1909.
11. NĚMEC, B., Nauka o buňce a anatomic rostlin. 1930. Praha.
12. OES, A., Neue Mitteilung über enzymatische Chromatolyse. Zeitschr. f. Botan. 2:39. 1910.
13. OSBORNE, T. B., The vegetable proteins. 1924. London.
14. PRÁT, S., Die Anwendung der polarographischen Methodik in der Biologie. Biochem. Zeitschr. 175:268—273. 1926.
15. PRÁT, S., Die polarographische Methode. Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethoden. Abt. IIIA11. 1928.
16. SCHWARZ, F., Die morphologische und chemische Zusammensetzung des Protoplasmas. Beitr. z. Biol. d. Pfl. 5:1. 1887.
17. STRASBURGER, E., Zellbildung und Zellteilung. 1880. Jena.
18. STRASBURGER, E., Über den Bau und Wachstum der Zellhäute. 1882. Jena.
19. ZACHARIAS, E., Über den Zellkern. Bot. Ztg. 40. 1882.
20. ZALESKI, W., Ber. d. d. bot. Gesel. 29, 1911.