ЦЗЦИЅЦЪР ЧЪЪИЦРЦЪЦЧЦЪ 2ЦЪРԵИ БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

XXXII, 1, 1979

УДК 599.323:576.312.31:535.37.07

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ХРОМАТИНА И ЕГО КОМПОНЕНТОВ ПРИ ИНДУКЦИИ ГИДРОКОРТИЗОНОМ

М. А. ДАВТЯН, Р. Р. КАЗАРЯН, Ю. М. ДЕМИН

Проведен флуоресцентный анализ выделенного из печени белых крыс хроматина и его компонентов при различных длинах волны энергии активации. При гормональной (гидрокортизон) индукции аргиназы обнаруживаются качественные изменения в флуоресцентных характеристиках хроматина и его компонентов. В области спектра экстинкции 230—270 нм у индуцированного хроматина проявляются новые флуоресцирующие комплексы в пределах спектра эмиссии 330—485 нм. Аналогичные комплексы проявляются также у негистоновых белков.

В последние годы стало известно, что многие гормоны животных действуют как генетические индукторы, включая или усиливая ДНКзависимый синтез РНК и соответствующих белков в клетках-мишенях [1—5]. В предыдущей работе была предпринята попытка исследования хроматина при гормональной индукции с применением метода флуоресцентного анализа [6], который отличается высокой чувствительностью и дает достоверную информацию о конформационных изменепиях структуры белков [7]. При этом были установлены характерные для триптофанилов максимумы спектров экстинкции и эмиссии, равные 295 и 340 нм соответственно. При гормональной индукции (гидрокортизон) аргиназы и ряда других катаболических ферментов [8—11] изменений в указанных флуоресцентных характеристиках хроматина не происходит [6].

В настоящей работе мы задались целью продолжить исследования в этом направлении, изучая флуоресцентные свойства хроматина при различных длинах волны энергии активации как в норме, так и при гормональной индукции.

Материал и методика. В экспериментах использовались белые крысы весом 120—150 г. Хроматин из печени животных с предьарительным выделением ядер получали по общеизвестному методу Марушиге и Боннера [12], с некоторой нашей молификацией. После убоя животных печень перфузировали 0,9%-ным раствором NaCl, быстро ее извлекали и хорошо измельченную ткань гомогенизировали в растворе 0,25 M сахарозы+1 мМ MgCl₂ (pH 7,5), фильтровали через четырехслойный нейлон, затем центрифугировали при 600 g 10—15 мин. После повторной гомогенизации ядер в растворе 0,25 M сахарозы+0,5%-ный тритон—×—100+1 мМ MgCl₂ (pH 7,5) их очищали центрифугированием в растворе 2,2 M сахарозы+1 мM MgCl₂, pH 7,5, при 16000 g в течение 50 мин.

Все растворы с сахарозой были приготовлены на 0,01 М трис-HCl буфере (рН 7,5). Во всех использованных растворах присутствовал 0,5 мМ метабисульфит калия для

предотвращения действия протезз. Хроматин получали отмыванием (4-5 раз) очещенных клеточных ядер 0.024 М ЭДТА+0.075 М NaCl буфером (pH 8), а затем подва раза 0.05, 0.01. 0.002 и 0.001 М трис-HCl буфером (pH 8). Каждый этап этой пронедуры сопровождался тщательным ресуспендированием и центрифугированием при 7000 g в течение 15 мин.

В экспериментах использовали также хроматии, выделенный из печени крыс после кортикостероидной индукции гидрокортизопом. Суспензию гормона вводили внутримышечно (с расчетной концентрацией 5 мг на 100 г веса тела) в течение четырсх дней. На четвертый день через 4—5 час. после введения гормона в период наивысшел активации снитеза РНК, а также аргиназы (КФ 3.5.3.1) [8—11], тирозин т-кето глутарат трансаминазы (КФ 2.6.1.5), триптофанпирролазы (КФ 1.11.1.4) и некоторых других катаболических ферментов (3.13) животные забивались и проводилось выделение хроматина по указанному методу.

Диссоциацию проводили с помощью раствора 2 М NaCl, приготовленного на 0.01 М трис-HCl буфере (pH 8). Выделенный хроматии имел следующие спектральные характеристики: А -0.78, А 280/260=0.59, А 320/260=0.016.

ные характеристики: А ______0.78. А _____0.59. А _____0.59. А _____0.016. Концентрацию белка определяли по Лоури [14]. ДНК-по Лише [15]. РНКспектрофотометрически после гидролиза 1 N HClO₄. Соотношение белок/ДНК во нсех исследованных препаратах составляло 2.1. соотношение РНК/ДНК--0.041. Спектральные характеристики снимали на спектрофотометрах СФ-4А и СФ-10.

Все операции по выделению и очистке хроматина проводились в холодной комнате при температуре 1-3°. Исходная концентрация хроматина составляла 1 мг/мл.

Из полученного хроматина гистоны экстрагировались дважды 0.2 N HCl на холоду, осаждались голуторными объемами спирта при —20. Поскольку с кислотой из хроматина частечно экстрагьруются также кислые белки, гистоны очищались от этих примесей на колонке (1×25 см) с КМЦ, уравновешенной 0.03 М трис-буфером (рН 7). Сопутствующие гистонам кислые белки элюпровались этим буфером, а суммарные гистоны—0.1 N HCl (рис. 1). Количество примесных белков обычно составляло 2—3%.

В экспериментах использовались также гистоны, полученные по методу, описанному Арбузовым и др. [16].

Перед экстракцией гистонов хроматин гомогенизировали в 1×10-3 М НСІ для удаления триптофансодержащих кислоторастворимых белков, обычно экстрагируемых вместе с гистонами, но отделяющихся от них при очистке на карбоксиметилисялюлозе (см. выше).

Гистоны экстрагировали дважды по 5 мин, гомогенизируя осадок в 0.5 N H_2SO_4 на холоду. После центрифугирования при 2000 g надосадочные жидкости объеднияли и диализовали на холоду против дистиллированной воды, после чего раствор просветляли центрифугированием при 14000 g. Содержание гистонов в экстракте определяли по Лоури [14]. Флуоресцентный анализ обоих гистоновых препаратов показал, что по своим флуоресцентным характеристикам они почти идентичны. Чистоту гистоновых препаратов контролировали электрофоретически [17] в полнакриламидном геле. Имеются литературные данные [18, 19] о присутствии в гистопах примесей кислых полисахаридов. Методами инфракрасной спектроскопни и хроматографии на бумаге было показено [20] что в гистонах, выделенных полисахаридов. Доти (21] на тимуса крупного рогатого скота и по Марушиге и Боннеру [12] из чечени крыс, может содержаться значительное (до 5%) количество кислых полисахаридов. Поэтому нами, как и в работе Лавриненко и др. [22], применен способ получения хроматина с промежуточным выделением ядер, описанный в [23]. Установлено, что кислые полисахариды отмываются в процессе центрифугировация ядер 2.2 М сахарозой.

Получение негистоповых белков осуществлялось по способу, описанному Маруынге и др. [24]. Кислотонерастворимый материал после удаления гистопов (дегистоппрованный хроматии) промывали 0,05 М трис-буфером (рН 8) и растворяли в 100—200 мл этого буфера, содержащего 1% додочилсульфата натрия, который способствует разделению негистопового белка и ДНК. После перемешивания на магнитной мешалке в течение ночи вязкий раствор ДНК и негистоповых белков диализовали против 10 объемов воды в течение 12 час. и центрифугировали при 150000 g в течение 8 час. при 37°. При этом на дно центрифужной пробирки оседала ДНК. Надосадочную жидкость, содержащую преимущественно кислые белки, диализовали против большого количества воды, после чего раствор концентрировали при комнатной температуре до 1/2 объема. Для осаждения неотдиализованного додецилсульфата к раствору добавляли 0,5—1 мл насыщенного КСІ. При этом натриевая соль додецилсульфата переходила в малорастворимый додецилсульфат калия, который удаляли из раствора центрифугированием при 14000 g в течение 10—15 мин. Для осаждения негистонового белка к супернатанту добавляли сухой сернокислый аммоний (2,04 г на 10 мл раствора). В течение 20—60 мин на холоду (0°) формировался хлопьевидный осадок белка, который отделяли центрифугированием при 16000 g в течение 10—15 мин. Очистку белка производили двукратным осаждением растворенного в минимальном объеме воды осадка сульфатом аммония. Количество ДНК в препарате негистонового белка, полученного таким образом, не превышало 4—5%. Выделенный препарат растворяли 1 N NaOH при 100°, а содержахие определяли по Лоури [14].

Все концентрации конов буферных расдеороз проверяли Na-селективным электродом на pH-метре 340.

Спектры экстинкции и эмиссии хроматина и его компонентов регистрировали на флуоресцентном спектрофотометре MPF-2A фирмы «Hitachi» (Япония), в кварцеьых прямоугольных кюветах, при компатной температуре, с чувствительностями прибора SS-4, SS-5 и SS-6.

Результаты и обсуждение. В первой серии экспериментов были получены данные, подтверждающие результаты флуоресцентного анализа хроматина, выделенного из печени интактных белых крыс, а именно: хроматии имеет один максимум спектра эмиссии при 340 нм, обусловленный триптофановой флуоресценцией; диссоциация его лишь незначительно сдвигает максимумы спектров экстинкции и эмиссии в ультрафиолетовую область, не выходя при этом за пределы величин, характерных для триптофанильных остатков [6] (рис. 2).





Рис. 2.

Рис. 1. Профиль элюции гистонов с карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ). 1. Элюция 3×10-2 М трис-НСІ буфером, рН 7; 2. 0,1 М НСІ. Рис. 2. Спектры экстинкции (А) и эмиссии (Б) хроматина, выделенного

на печени белых крыс. Ширина щелей монохроматоров экстинкции и эмиссии—4 им. 1. Нативный хроматин, разбавленный ×20 в 1×10⁻³ М трис-НСІ буфере, рН 8; 2. Диссоципрованный хроматин, разбавленный ×10 в 1×10⁻³ М трис-НСІ буфере, рН 8.

7

Поскольку фенилалании и тирозин возбуждаются в области 270 нм [7. 25], мы исследовали флуоресценцию полученного нами хроматина при этой длине волны экстинкции. Как видно из рис. 3, характерные ве личины спектров эмиссии фенилаланина (282 нм) и тирозина (303 нм) не были обнаружены в области 270 нм. Обнаруживаемый небольшой пик при 540 нм является проявлением феномена рассеяния возбуждающего света Реелея и Тиндаля второго порядка [7]. Диссоциация хроматина незначительно сдвигает указанный спектр эмиссии хроматина при длине волны экстинкции 270 нм в ультрафиолетовую область (рис. 3).



Рис. 3. Спектры эмиссии хроматина при Е_x W--270 им. Ширина вцелей монохроматеров экстинкции и эмиссии—1.—4 им (слабое разрешение): 2, 3.—6 нм (сильное разрешение). 1. 2. Нативный хроматии, разбавленный ×20 в 1×10⁻³ М трис-HCl буфере, pH 8; 3. Диссоциированный хроматии, разбавленный ×10 в 1×10⁻³ М трис-HCl буфере, pH 8.

Нами было обращено внимание на то, что при эмиссии 340 им обнаруживается помимо основного пика экстинкции, 295 им, и другой, 237 им (рис. 2). Как видно из рис. 4, спектры обоих хроматинов при длине волны экстинкции 237 им идентичны, за исключением интенсивности эмиссии с более высоким квантовым выходом флуоресценции у диссоцинрованного хроматина. При этом обнаруживается основной флуоресцирующий комплекс хроматина при 340 им, обусловленный триптофановой флуоресценцией Выявленный выраженный пик при 475 им является проявлением феномена рассеяния возбуждающего света, так же как при 540 им (рис. 3). Проявление же пика эмиссии при 398 им (который, по нашим данным, не имеет ни вода, ни трис-HCl буфер) может явиться результатом комбинационного рассеяния возбуждающего сигнала, зависящего от молекулярной структуры флуоресцирующих групп белка [7].

На рис. 5 приведены спектры экстинкции нативного и диссоциированного хроматина при выявленных пиках эмиссии 398 и 475 им (рис. 4), а на рис. 6—спектры эмиссии обоих состояний хроматина при полученных пиках экстинкции 353 и 380 нм (рис. 5). Как видно из рис. 4—6, нативный и диссоциированный хроматин при приведенных параметрах флуоресценции имеют почти идентичные пики экстинкции и эмиссии и отличаются лишь повышенной интенсивностью эмиссии и более высоким квантовым выходом флуоресценции диссоциированного хро-



Рис. 4. Спектры эмиссии хроматина при Е_x W—237 нм. Ширина щелей монохроматоров экстинкции и эмиссии—1.—4 нм (слабое разрешение); 2,3—8 нм (сильное разрешение). 1. 2. Нативный хроматин, разбавленный ×20 в 1×10⁻³ М трис-HCl буфере, pH 8; 3. Диссоциированный хроматин, разбавленный ×10 в 1×10⁻³ М трис-HCl буфере, pH 8.



Рвс. 5. Спектры экстинкцин при $\mathrm{F_m}$ W—398 нм (2,4) $\mathrm{E_m}$ W—475 нм (1,3). Ширина щелей монохроматоров экстинкции и эмиссии—8 нм. 1. 2. Нативный хроматин, разбавленный $\times 20$ в $^{1}\times 10^{-3}$ М трис-HCl буфере, рН 8; 3. 4. Диссоциированный хроматин, разбавленный $\times 10$ в 1×10^{-3} М трис-HCl буфере, рН 8.

матина, что, несомненно, свидетельствует об отсутствии значительных качественных перестроек флуоресцирующих комплексов при диссоциации хроматина.



Рис. 6. Слектры эмиссин хроматина при E_x W—353 им (2,4) E_x W—380 им (1.3). Ширина щелей монохроматоров экстинкции и эмиссин—8 им 1. 2. Нативный хроматин, разбавленный $\times 20$ в 1 $\times 10^{-3}$ М трис-HCl буфере, pH 8: 3. 4. Диссоципрованный хроматин, разбавленный $\times 10$ в 1 $\times 10^{-3}$ М трис-HCl буфере, pH 8.

Известно, что при введении кортикостерона, 11-дегидрокортикостерона [26, 27]. кортизона [8, 10, 28, 29] и гидрокортизона [8—11] происходит индукция как ферментов орнитинового цикла, так и многих других катаболических ферментов, присутствующих в печени крыс.

Изучение хроматина, выделенного из печени крыс после гормональной индукции гидрокортизоном, показало, что он имеет один максимум экстинкции, при 295 нм, и один максимум эмиссии, при 330 нм (рис. 7). По спектру экстинкции он не отличается от нативного хроматина, если не считать того, что основной флуоресцирующий комплекс сго, обусловленный триптофанильными остатками, несколько сдвигается (на 10 нм) в коротковолновую область, и незначительно подавляєтся квантовый выход флуоресценции. Однако детальный флуоресцентный анализ индуцированного хроматина при всех длинах воли энергии активации показал, что в области спектра экстинкции 230—270 им происходят значительные качественные конформационные изменения структуры хроматина с проявлением новых флуоресцирующих комплексов в пределах спектра эмиссии 330—485 нм (рис. 8, 9).

Таким образом, при гормональной индукции аргиназы и ряда других катаболических ферментов выявляются новые флуоресцирующие группы в указанной области спектра экстинкции.



Рис. 7.

Рис. 8.

Рис. 7. Спектры экстинкани (А) и эмиссии (Б) нативного и индуцированного хроматина. Ширина щелей монохроматоров экстинкции и эмиссии— 4 им. 1. Нативный хроматин, разбавленный ×20 в 1×10⁻³ М трис-HCl буфере, pH 8; 2. Индуцированный хроматин, разбавленный ×20 в 1× 10⁻³ М трис-HCl буфере, pH 8.

Рис. 8. Слектры эмиссии хроматина при Е_x W—270 нм. Ширина щелей монохроматоров экстинкции и эмиссии—4 нм (1,3), слабое разрешение, 6 нм (2,4), сильное разрешение; 1. 2. Нативный хроматин, разбавленный ×20 в 1×10⁻³ М трис-HCl буфере, pH 8; 3. 4. Индуцированный хроматин, разбавленный ×20 в 1×10⁻³ М трис-HCl буфере, pH 8.



Рис. 9.

Рис. 10.

Рис. 9. Спектры эмиссии хроматина при E $_{\rm x}$ W—237 нм. Ширина щелей монохроматоров экстинкции и миссии—4 им (1), слабое разрешение; 8 нм (2.3), сильное разрешение. 1. 2. Нативный хроматин, разбавленный ×20 в 1×10⁻³ М трис-HCl буфере, рН 8; 3. Индуцированный хроматин,

разбавленный ×20 в 1×10⁻³ М трис-НСі буфере, рН 8. Рис. 10. Спектры экстинкцин (А) и эмиссии (Б) гистонов, полученных из пативного и индуцированного хроматина. Ширина щелей монохроматоров экстинкцин и эмиссии—5 им. 1. Нативный гистоновый белок; 2. Индуцированный гистоновый белок.

В следующей серии экспериментов исследовались флуоресцентные характеристики гистонов и негистоновых белков. полученных из нативного и индуцированного хроматина. Как видно из рис. 10. гистоны, выделенные из нативного хроматина, имеют один максимум спектра экстинкции, при 275 им, и один максимум спектра эмиссии. при 305 им. Максимум спектра эмиссии при 305 им обусловлен флуоресценцией тирозина, так как ароматические аминокислоты фенилалании, тирозии и триптофан в свободном состоянии имеют максимумы спектров экстинкцин при 260, 275 и 287 им и максимумы спектров эмиссии при 382, 303 и 348 нм. соответственно, и обусловливают идентичную флуоресценцию белков, в состав которых они входят [7, 25]. Флуоресцентный анализ гистонов, полученных из индуцированного хроматина, показал, что эти максимумы сдвигаются в длинноволновую область (275 против 292 и 305 против 330 им), а квантовый выход флуоресценции подавляется (рис. 10). При остальных же длинах волн экстинкции другие изменения в структуре гистонов, полученных из индуцированного хроматина, не обнаруживались.

Таким образом, при гормональной индукции гистоновые белки претерпевают определенные изменения.

Флуоресцентный анализ негистоновых белков, полученных из нативного хроматина, показал, что они имеют два максимума спектров экстинкции, при 275 и 290 нм, и два максимума спектров эмиссии, при 305 и 350 нм (рис. 11, 12), т. е. проявляется характерная флуоресцен-



200 240 280 320 300 340 380 420 460 500 A. MMX

Рис. 11. Спектры экстинкции (А) и эмиссии (Б) негистоновых белков, полученных из нативного и индуцированного хроматина. Ширина щелей монохроматоров экстинкции и эмиссии—З им (1), слабое разрешение: 6 им (2,3), сильное разрешение. 1. 2. Индуцированный негистоновый белок; 3. Нативный негистоновый белок.

шия для тирозина и триптофана. У негистоновых белков, полученных из индуцированного хроматина, были обнаружены конформационные изменения в структуре с проявлением новых флуоресцентных комплексов в пределах 330—470 им и 318—390 им спектров эмиссии при обоих максимумах спектров экстинкции.

На основании анализа полученных данных можно заключить, что наблюдаемые при гормональной индукции качественные сдвиги флу-

12

оресцентной характеристики хроматина (изменение интенсивности, сдвиги в коротковолновую область, появление новых флуоресцирую-



Рис. 12. Спектры эжиссии (А) при E_x W—275 им и спектр экстинкции (Б) негистоновых белков хроматина. Ширина щелей монохроматоров экстинкции и эмиссии—6 им. 1. Нативный негистоновый белок; 2. Индуцированный негистоновый белок.

щих комплексов) отражают изменения, претерпеваемые как гистоновыми, так и негистоновыми белками хроматина.

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии Филиал ВНИИ клинической и экспериментальной хирургии МЗ СССР По

Поступило 20.ХІ 1978 г.

ՔՐՈՄԱՏԻՆԻ ԵՎ ՆՐԱ ԿՈՄՊՈՆԵՆՏՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀԻԴՐՈԿՈՐՏԻՉՈՆԻ ԻՆԴՈՒԿՑԻԱՅՈՎ ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՏԱՅԻՆ ԱՆԱԼԻՉԻ ՄԻՋՈՑՈՎ

Մ. Ա. ԳԱՎԹՅԱՆ, Ռ. Ռ. ՂԱԶԱՐՅԱՆ, Յու. Մ. ԴՅՈՄԻՆ

Կատարված է սպիտակ առնետների լլարդից ստացված քրոմատինի և նրա կոմպոնենտների ֆլուորեսցենտային անալիզ՝ էներգիայի տարբեր երկարության ալիջների ակտիվացման պայմաններում։ Արգինազայի Հորմոնալ (Հիդրոկորտիզոն) ինդուկցիայի դեպքում քրոմատինի և նրա կոմպոնենտների ֆլուորեսցենտային ցուցանիշներում Հայտնաբերվում են որակական փոփոխություններ։ Էքստինցիայի սպեկտրի 230—270 մմկ շրջանում ինղուկցիայի ենթարկված քրոմատինի մեջ երևում են նոր ֆլուորեսցենտող կոմպլեքսներ էմիսիայի սպեկտրի 330—485 մմկ սաՀմաններում։ Համանման կոմպլեքսներ դիտվում են նաև ոչ Հիստոնային սպիտակուցների մեջ։

STUDIES OF CHROMATIN AND ITS COMPONENTS BY FLUORESCENT ANALYSIS UNDER HYDROCORTISON INDUCTION

M. A. DAVTIAN, R. R. KAZARIAN, Yu. M. DYOMIN

The fluorescent analysis of chromatin and its components singled out from the white rat liver at different wave lengths of energy activation has been carried out.

In the case of hormonal (hydrocortison) induction of arginase the quantitative changes in the fluorescent characteristics of chromatin and its components take place. In the range of excitement spectrum 230—270 nm the inducted chromatin reveals new fluorescent complexes in the limits 330—485 nm of emission spectrum. The analogous complexes reveal the non-histone chromosomal proteins.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Fanestil D., Edelman J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 54, 1370, 1965.
- 2. Kenney F., Wicks W., Greenman D. J. Cellular and Compar. Physiol., 66, 1, 125, 1965.
- Knox W. Synthesis of molecular and cellular structure, 13, N. Y., Ronald Press Co., 1960.
- 4. Talwar G., Segal S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 50, 227, 1963.
- 5. Williams-Ashman H. J. Cellular and Compar. Physiol., 66, 1, 111, 1965.
- 6. Казарян Р. Р., Демин Ю. М., Тирациян С. Г., Манвелян А. Г. Биологический журнал Армении, 31, 7, 1978.
- 7. Юденфренд С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине, М, 1965.
- 8. Schimke R. T. J. Biol. Chem., 138, 1012, 1963.
- 9. Grillo M. A. Clinica Chimica Acta, 10, 259, 1964.
- Kochakian C. D. Mechanisms of hormone action. 256. Edit. by P. Karlson, Academic Press, N. Y. and London, 1965.
- 11. Давтян М. А., Петросан Л. А. Биологический журнал Армении, 23, 5, 1970.
- 12. Marushige K., Bonner J. J. Mol., Biol., 15, 160, 1966.
- Kenney F. T., Wicks W. D., Greenman D. L. J. Cell Compar. Physiol., 66, 1, 125, 1965.
- 14. Lowry D. U., Rosenbrough N. J. et al. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
- 15. Dishe Z. Microchemie, 8, 9, 1930.
- Арбузова Г. С., Грязнова И. М., Морозова Т. М., Салганик Р. И. Молекулярная биология, 2, 3, 1968.
- 17. Panium S., Chalkley R. Arch. Biochem. Biophys., 130, 337, 1969.
- 18. Agreel J. P. S., Christensson E. G. Nature, 207, 638, 1965.
- 19. Agreel J. P. S., Christensson E. G. Nature, 191, 284, 1961.
- 20. Лавриненко И. А. Мат-лы конф. мол. уч. Ин-та цитологии и тенетики СО АН СССР, Новосибирск, 1969.
- 21. Zubay G. Doty P. J. Mol. Biol., 1, 1, 1959.
- 22. Лавриненко И. А., Морозова Т. М., Юшкова Л. Ф. Молекулярная биология, 5, 1, 1971.
- 23. Chauveau J., Moule Y., Rouiller C. Exptl. Cell. Res., 11, 317, 1956.
- 24. Marushige K., Brutlag D., Bonner J. Biochemistry, 7, 9, 3149, 1968.
- 25. Shore V. G., Pardee A. B. Arch. Biochem. Biophys. 60, 100, 1956.

14

- 26. Fraenkel-Conrat H., Simpson M. E. and Evans H. M. Amer. J. Physiol., 138, 439, 1943.
- 27. Fraenkel-Conrat H., Simpson M. E. and Evans H. M. J. Biol. Chem., 147, 99, 1943a.
- 28. Kochakian C. D. and Robertson E. J. Biol. Chem., 190, 481, 1952.
- 29. Mclean P. and Gurney M. W. Biochem. J., 87, 96, 1963.