

ÉTUDE SUR L'ACTIVITÉ DE LA RIBONUCLÉASE PANCRÉATIQUE BOVINE

APPLICATION D'UNE MÉTHODE DE MESURE AU DOSAGE
D'UN FACTEUR INHIBITEUR DE LA RIBONUCLÉASE ALCALINE
PRÉSENT DANS DES EXTRAITS CELLULAIRES DE FOIE DE RAT

Claudine REIGNIER et J.-F. BURI

avec la collaboration technique de Bernadette BERTIN

*Laboratoire de Biologie Physico-Chimique, I. N. R. A.,
École nationale vétérinaire,
94 - Maisons-Alfort*

RÉSUMÉ

L'activité de la ribonucléase pancréatique bovine mesurée par la technique dite de « libération d'oligonucléotides solubles » à partir d'ARN de levure *Torula* varie dans de larges limites selon le pH du tampon employé et la molarité du milieu, la température d'incubation, les concentrations d'enzyme et de substrat utilisés pour le test.

La vitesse initiale de la réaction enzymatique est sensiblement linéaire dans les 2 premières minutes.

La méthode de mesure choisie est applicable au dosage du facteur inhibiteur présent dans les surnageants d'extrait cellulaire de foie de rat ainsi que dans le précipité au sulfate d'ammonium entre 35 et 55 p. 100 de saturation, obtenu à partir de ce surnageant.

Toutefois l'obtention de mesures comparables exige la définition d'une unité arbitraire d'inhibiteur dans des conditions de milieu (pH, molarité, tampon, nature des sels) parfaitement définies.

Dans ces conditions, on remarque que les courbes de pourcentage d'inhibition en fonction de la quantité d'inhibiteur ajoutée au milieu passent par un maximum, et présentent une allure sigmoïde dans leur première partie.

I. — INTRODUCTION

L'existence d'enzymes nucléolytiques très variées dans les tissus d'animaux supérieurs rend difficile l'étude des mécanismes touchant la transcription et la traduction du message génétique.

L'isolement de complexes polysomaux fonctionnels est souvent conditionné par l'activité de certaines nucléases (UTSUNUMIYA et ROTH, 1966 ; BRENTANI *et al.*,

1968 ; BURKA, 1968 ; FENWICK, 1968). Il est donc intéressant de connaître le mécanisme d'action de ces dernières, et de disposer éventuellement d'un moyen de bloquer leur activité.

On connaît actuellement plusieurs ribonucléases (pour une revue générale, voir SHUGAR et SIERAKOWSKA, 1967).

Les ribonucléases acides sont actives à un pH optimum de 5 à 6. Elles catalysent habituellement la libération d'oligonucléosides 3' phosphate, mais ne semblent que peu ou pas actives sur les nucléosides phosphate cycliques.

Les ribonucléases alcalines sont généralement actives à un pH optimum situé entre 7 et 8 et sont largement répandues dans les tissus d'animaux supérieurs. (De LAMIRANDE, 1954 ; ROTH, 1958 ; ROTH, 1959 ; REID et NODES, 1959 ; FARKAS, 1969 ; UMEDA *et al.*, 1969 ; LEWIS et GAMBLE, 1969). Elles catalysent habituellement la libération d'oligonucléosides 2' 3' phosphate cycliques lorsque la base du nucléotide 3' est une pyrimidine.

La ribonucléase pancréatique de type A, obtenue et cristallisée à partir du pancréas de bœuf (KUNITZ, 1940), a un poids moléculaire de 13 700 daltons. Elle comporte une séquence primaire complètement élucidée (SMITH *et al.*, 1963) d'une seule chaîne de 124 amino-acides comprenant 4 résidus cystine qui établissent des ponts disulfures entre les positions 26 et 84, 40 et 95, 58 et 110, 65 et 72.

Son extrémité C-terminale est constituée par la séquence Ala-Ser-Val-(COOH), l'extrémité N-terminale par Thr-Glu-Lys-(NH₂).

Les structures secondaire et tertiaire de la molécule, ainsi que la configuration stérique du site catalytique auquel participent les histidines 12 et 119 et la lysine 41, (GUNLACH, STEIN et MOORE, 1959 ; BARNARD et STEIN, 1959 ; STEIN et BARNARD, 1959 ; STARK, STEIN et MOORE, 1961 ; CRESTFIELD, STEIN et MOORE, 1963 ; HIRS, HALMANN, KYCIA, 1965 ; HAMMES et SCHERAGA, 1966) ont pu être précisées grâce à des études en diffraction aux rayons X (AVEY *et al.*, 1967 ; KARTHA, 1967 ; KARTHA, BELLO et HARKER, 1967) et en RMN (MEADOWS et JARDETSKY, 1968 ; RUTERJANS et WITZEL, 1969). Ces dernières méthodes, ainsi que nos connaissances sur le mécanisme de l'hydrolyse des esters phosphorés (DENNIS et WESTHEIMER, 1966) et certaines investigations physico-chimiques (DEAVIN, MATHIAS et RABIN, 1966 ; HARRIS *et al.*, 1969) permettent de proposer plusieurs modèles possibles selon lesquels se ferait l'action catalytique de l'enzyme sur l'hydrolyse des liaisons 3', 5' phosphodiester de l'ARN, en produisant en deux étapes des oligonucléotides ayant une extrémité 3' pyrimidine phospho-monoester, par l'intermédiaire d'un dérivé terminé par un pyrimidine nucléoside 2' 3' phosphate cyclique. (FINDLAY *et al.*, 1962 ; WITZEL, 1963 ; ROBERTS *et al.*, 1969).

A côté de cette activité hydrolytique, on a pu observer dans certaines conditions une activité synthétique dissociable de la précédente, catalysant la formation d'oligonucléotides à partir de nucléotides cycliques (HEPPEL et WHITFIELD, 1955 ; RUTERJANS et WITZEL, 1969 ; USHER, 1969).

La ribonucléase A pancréatique bovine est stable à la chaleur et résistante aux pH acides. Son maximum d'activité se situe entre pH 7 et pH 8.

Si l'on considère le rôle majeur que ces diverses nucléases jouent dans le catabolisme des acides nucléiques porteurs de l'information génétique, on comprend l'intérêt qui s'attache à la connaissance d'inhibiteurs naturels de ces nucléases détectés dans certains tissus d'animaux supérieurs.

Un tel facteur inhibiteur de la ribonucléase alcaline a en particulier été mis en évidence dans le foie de rat par PIROTTE et DESREUX (1952) puis étudié par ROTH (1956, 1958, 1959) et par SHORTMAN (1961, 1962 *a* et *b*).

De nombreux travaux lui ont déjà été consacrés depuis plusieurs années et ont permis de préciser sa distribution dans les différents tissus du rat (ROTH, 1956 ; ROTH, 1958 ; GIRIJA et SREENIVASAN, 1966).

On a même démontré l'effet protecteur de cet inhibiteur de la ribonucléase sur l'intégrité des polyribosomes (BONT, REZELMAN, BLOEMENDAL, 1965 ; BLOBEL, POTTER, 1966 ; LAWFOORD, SADOWSKI et SCHACHTER, 1967 ; GRAU, FAVELUKES, 1968 ; GRIBNAU, SCHOENMAKERS, BLOEMENDAL, 1969).

Ce facteur, qui semble être de nature protéique, a été partiellement purifié par différentes équipes (ROTH, 1958 ; SHORTMAN, 1961 ; GRIBNAU, SCHOENMAKERS et BLOEMENDAL, 1969 ; BURI, VAILLANT, REIGNIER, 1969 ; BONT, GEELS et REZELMAN, 1969). L'existence de facteurs similaires a été signalée dans les tissus de plusieurs espèces (GUPTA et HERRIOTT, 1963 ; GIRIJA et SREENIVASAN, 1966 ; GRAU et FAVELUKES, 1968 ; SIRAKOV et KOCHAKIAN, 1969). Certains organes comme le foie de crapaud ou de poulet semblent, par contre, en être dépourvus (ROTH, 1962).

C'est afin de déterminer les conditions optimales de dosage d'un tel inhibiteur au cours des différentes étapes de sa purification, que nous avons été amenés à étudier une méthode de dosage de l'activité de la ribonucléase pancréatique bovine. Nous avons choisi le principe dit de « libération des oligonucléotides solubles ». C'est l'exploration de cette méthode et de l'influence du facteur inhibiteur sur l'activité ribonucléasique qui fait l'objet de ce travail.

II. — MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Choix d'une méthode

Les principales méthodes de dosage de l'activité ribonucléasique sont les suivantes :

— La méthode dite du « phosphore soluble » (KLEIN, 1933 ; KÜNITZ, 1940 ; CANTERO, DAoust et DE LAMIRANDE, 1950) dans laquelle le phosphore libéré à partir d'un ARN de levure est dosé par une technique classique. Cette méthode sensible mais longue donne des résultats trop élevés en raison de la présence interférente de phosphore inorganique.

— La méthode de ROTH (1952), calquée sur la précédente mais qui utilise de l'ARN marqué au ^{32}P comme substrat. La difficulté d'obtenir un marquage uniforme la rend critiquable.

— La méthode spectrophotométrique (CROOK, MATHIAS et RABIN, 1960) qui utilise des nucléotides cycliques, produits de synthèse d'un coût très élevé. La rupture du cycle sous l'action de la ribonucléase s'accompagne d'un déplacement du maximum d'absorption dans l'ultraviolet.

— La méthode de mesure de libération protonique en cours de réaction enzymatique par autotitration à pH constant. Elle utilise les nucléotides cycliques (VOLKIN et COHN, 1953 ; HERRIES, 1960) ou l'ARN (KALNITZKI, HUMMEL et DIERKS, 1959).

Nous leur avons préféré pour des raisons pratiques une méthode simple et rapide basée sur la mesure de la libération d'oligonucléotides acido-solubles par digestion ribonucléasique (KÜNITZ, 1940 ; ANFINSEN *et al.*, 1954). La réaction est arrêtée par précipitation à froid des ARN insuffisamment ou non attaqués, et le dosage est effectué par mesure de l'absorption du surnageant à 260 μ après centrifugation.

Détail de la méthode.

Des tubes de centrifugeuse contenant :

— de la ribonucléase en milieu tamponné pour les tubes de mesure ;

— de la gélatine à 0,1 p. 100 en milieu tamponné pour les blancs, sont maintenus dans la glace. Au temps t_0 , on ajoute une quantité donnée d'ARN. Les tubes sont alors placés, après

agitation, au bain-marie à 37° pendant un temps donné t , puis plongés dans de la glace et on arrête la réaction par précipitation à l'éthanol-acide glacé volume à volume. Après une attente de 15 minutes à - 20°, les tubes sont centrifugés dans une centrifugeuse Jouan refroidie G 60 à 6 500 rpm pendant 25 minutes. Le précipité est éliminé et le surnageant est dilué dans de l'eau distillée (au 1/15 ou au 1/20).

La densité optique des solutions diluées est alors lue à 260 m μ dans des microcuvettes de silice de 1 cm de trajet optique d'un spectrophotomètre Unicam SP 500. Un tube contenant tous les réactifs sauf la ribonucléase et l'ARN est utilisé pour régler le zéro de densité optique de l'appareil.

On déduit de chaque valeur de DO trouvée la DO des blancs correspondants (dépourvus de ribonucléase) pour obtenir la DO corrigée de chaque échantillon.

Les mesures de vitesse initiale se faisant sur un temps très court nous les avons réalisées selon la même technique en faisant subir à tous les réactifs une préincubation à 37° jusqu'à équilibration de la température, cette préincubation étant de 2 mn pour la solution d'ARN.

La RNase a été ajoutée en dernier pour les dosages correspondant aux figures 5, 7 et 8, ainsi que pour les valeurs portées dans le tableau 1.

TABLEAU I

Vitesse initiale en fonction de la molarité en tampon phosphate à pH 7,8 dilution 1/15

Molarité du tampon (mM/l)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	150
Molarité du milieu (mM/l)	9	15	21	27	33	39	45	51	57	63	93
V _t (DO corr. $\times 10^3$)	186	254	260	248	235	218	192	180	168	158	105

Les premières expériences ont été réalisées avec une quantité d'ARN de 4 mg ; par la suite nous avons diminué cette quantité à 3 ou à 2 mg dans le milieu réactionnel, après avoir vérifié que l'on se trouvait toujours dans des conditions de saturation de l'enzyme par le substrat.

Préparation du facteur inhibiteur du foie de rat

Toutes les opérations sont faites à 4° sans temps de latence entre chaque stade.

a) Préparation du surnageant à haute vitesse (SHV).

Des rats mâles pesant environ 150 g, à jeun depuis 24 heures, sont tués par décapitation. Les foies sont prélevés, broyés à l'aide d'un broyeur de Potter dans un volume V de tampon tel que V (en ml) = 2,5. P (en g), P étant le poids d'organe. Le tampon utilisé est un tampon phosphate 0,005 M, pH 7,4, NaCl 0,05 M, saccharose 0,25 M, EDTA 0,001 M.

Le broyage est effectué 2 fois de suite :

Le premier passage se faisant dans un Potter à large clearance.

Le deuxième dans un Potter de clearance serrée.

Nous avons vérifié que le résultat d'un tel traitement fournit un homogénat exempt de cellules entières, mais dont les structures nucléaires sont conservées.

L'homogénat est filtré sur 4 couches de gaze puis le filtrat est centrifugé à 12 000 rpm pendant 15 minutes dans le rotor 30 d'une Spinco L refroidie. Les culots sont éliminés et le surnageant postmitochondrial est centrifugé 90 minutes à 49 000 rpm, dans le rotor Ti 50 d'une Beckman L₆₅. Les culots sont éliminés ainsi que la graisse surnageante ; on obtient alors le surnageant postmicrosomal ou surnageant à haute vitesse (SHV). Ce surnageant est congelé immédiatement à - 30°C en petits flacons. Tout surnageant n'est utilisé qu'après une seule décongélation.

b) Précipitation au sulfate d'ammonium à pH 7,0 à 4°.

Le surnageant SHV est amené à 35 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium. Après un temps de contact de 20 minutes, une centrifugation 20 minutes à 35 000 rpm dans le rotor

40-2 d'une Spinco L. permet de séparer la fraction précipitant à 35 p. 100 de saturation dite P₃₅ et le surnageant dit S₃₅. Celui-ci est alors amené à 55 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium par le même procédé et on obtient le précipité à 55 p. 100 de saturation P₅₅ et le surnageant S₅₅. On calcule le volume de solution saturée de sulfate d'ammonium nécessaire pour passer de la saturation S à la saturation S_f suivant :

$$V = \frac{S_f - S_i}{1 - S_f} \times V_i$$

V_i = Volume initial (ml) de la solution de saturation S_i.

V_f = Volume de la solution de saturation S_f désirée (ml).

V = Volume (ml) de solution saturée de sulfate d'ammonium à ajouter.

Le précipité qui n'est pas utilisé aussitôt est conservé en principe tel quel à — 30°C, les dilutions adéquates en milieu tamponné se faisant immédiatement avant emploi.

*Activités inhibitrices du surnageant
(SHV) et des précipités au sulfate d'ammonium*

La libération à partir d'ARN par la ribonucléase, d'oligonucléotides qui ne sont pas précipités par l'éthanol acide et qui absorbent dans l'UV à 260 mμ, permet d'évaluer par spectrophotométrie l'activité de cette enzyme. La présence d'un facteur inhibiteur de la ribonucléase dans le milieu réactionnel entraîne une diminution de la quantité d'oligonucléotides libérés, donc une diminution de la DO à 260 mμ par rapport à un témoin ne contenant pas ce facteur.

Les activités ont été déterminées de façon standard selon une méthode dérivant de celle de SHORTMAN (1961) ; les tubes de centrifugeuse sont maintenus dans la glace.

Les tubes blancs contiennent :

Tampon phosphate pH 7,8	0,025 M	0,7 ml
Gélatine à 0,1 p. 100		0,1 ml

Les tubes témoins contiennent :

Tampon phosphate pH 7,8	0,025 M	0,7 ml
RNAse à 0,2 μg/ml		0,1 ml

Les tubes contenant la préparation dont on veut tester l'activité inhibitrice contiennent :

Tampon phosphate pH 7,8	0,025 M	0,6 ml
Échantillon		0,1 ml
0,2 μg/ml ou 0,4 μg/ml de ribonucléase		0,1 ml

Au temps *t*₀, on ajoute 0,4 ml d'une solution d'ARN à 10 mg/ml et les tubes sont placés au bain-marie à 37° pendant 30 minutes, et la suite du dosage est identique à celui de l'activité ribonucléasique. La DO corrigée est calculée de la même manière.

Le temps d'incubation de 30 minutes permet de détecter des quantités relativement faibles d'inhibiteur.

Nous avons toutefois effectué la plupart des mesures en V_i sur 2 minutes afin d'éliminer l'influence inhibitrice des propres produits de la réaction. Le pourcentage d'inhibition de la ribonucléase est calculé de la manière suivante :

$$I \text{ en P. } 100 = \frac{DO(T) - DO(i)}{DO(T)} \times 100$$

DO(T) = Densité optique corrigée du tube témoin.

DO(i) = Densité optique corrigée du tube contenant l'échantillon inhibiteur.

Nous avons dosé l'activité inhibitrice du surnageant et du précipité à 55 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium puis évalué l'influence de la température sur cette activité inhibitrice.

Produits et techniques utilisés

Les produits servant à faire les tampons et les réactifs proviennent des laboratoires Merck ou Baker.

Les protéines sont déterminées par la méthode de LOWRY *et al.*, (1951) en utilisant comme référence de l'albumine bovine provenant des laboratoires Poviet.

La ribonucléase cristalline A de pancréas de bœuf provient des laboratoires Sigma (Type XII A). Une solution mère à 20 μg/ml dans de la gélatine à 0,1 p. 100 est conservée à — 30° en petites fractions. Les dilutions nécessaires sont faites dans la gélatine à 0,1 p. 100 juste avant l'emploi.

La gélatine (Merck) qui permet une meilleure précipitation en cours de test, est dissoute

dans de l'EDTA 10^{-2} M puis dialysée contre une solution de NaCl 0,15 M et enfin contre de l'eau distillée. La solution dialysée est alors ajustée à pH 7,8 et à une concentration finale de 0,1 p. 100 avec de l'eau distillée.

L'acide ribonucléique provient des laboratoires Sigma. C'est un ARN de levure de *Torula* type VI. Une solution d'ARN à 2 p. 100 en tampon phosphate 0,05 M de pH 7,8 est dialysée (boudins Nojax) pendant 1 heure (une dialyse plus prolongée s'avérant défavorable) contre 10 volumes d'une solution de sel disodique d'EDTA 10^{-2} M de pH 7,8 puis contre 10 volumes de tampon phosphate 10^{-2} M au même pH pendant une nuit, afin d'éliminer d'éventuelles impuretés métalliques. La solution dialysée est alors ajustée à une concentration de 1 p. 100 avec le tampon phosphate 2×10^{-2} M et centrifugée dans une Spinco L en rotor 30 à 23 000 rpm pendant une heure pour débarrasser des contaminants polysaccharidiques (SHORTMAN, 1961 ; ROTH, WOJNAR, 1961 ; EICHEL 1962).

En ce qui concerne l'agent de précipitation plusieurs réactifs ont été proposés :

- Éthanol acide (ROTH et MILSTEIN, 1952) ;
- Éthanol-magnésium (RAZZEL, 1963) ;
- Éthanol-magnésium nitrate de lanthane (AMBELLAN et HOLLANDER, 1966) ;
- Acide trichloracétique-chlorure d'aluminium (EICHEL, 1962) ;
- Acide perchlorique (ZIMMERMAN et SANDEEN, 1965), perchlorate de baryum cellosolve (FIERS, 1961), acétate d'uranyle en milieu perchlorique.

Tous ces derniers agents n'ayant pas donné dans nos mains des résultats très reproductibles, nous avons choisi après quelques expériences comparatives l'éthanol préconisé par ROTH et MILSTEIN (1952).

Cet agent précipitant (éthanol à 76 p. 100 HCl N) est préparé en ajoutant à 12 ml d'eau 8 ml HCl concentré et en complétant à 100 ml avec de l'éthanol à 95 p. 100. Le sulfate d'ammonium (Merck) est employé en solution saturée à 4° plutôt qu'à l'état solide pour la précipitation (DIXON et WEBB, 1961).

Les résultats ainsi obtenus nous ont paru plus reproductibles qu'avec le sulfate sec.

III. — RÉSULTATS

I. — Étude des conditions d'activité de la ribonucléase. Détermination de la vitesse initiale de la réaction

La variation de la DO en fonction du temps d'incubation à 37° (dilution au 1/20) est indiquée sur la figure 1 pour une quantité de 0,06 μ g de ribonucléase par tube et 4 mg d'ARN dans les conditions de test décrites sous Matériel et Méthodes.

La vitesse initiale de la réaction est déterminée de la même façon mais avec 0,04 μ g de ribonucléase, en ne faisant des mesures que pour les premières minutes de la réaction.

Les valeurs obtenues sont portées sur la figure 2.

La DO varie linéairement en fonction du temps de réaction pendant les 2 premières mn environ. On a donc exprimé sous le terme vitesse initiale de réaction V_i , la densité optique corrigée obtenue pour 2 mn d'incubation.

L'influence de la concentration de ribonucléase sur la vitesse de la réaction apparaît bien sur la figure 3 où l'on a porté les valeurs obtenues pour des concentrations croissantes de ribonucléase en fonction du temps d'incubation.

La vitesse initiale de la réaction est dans ces conditions proportionnelle à la concentration d'enzyme au moins jusqu'à 0,08 μ g comme le montre la figure 4.

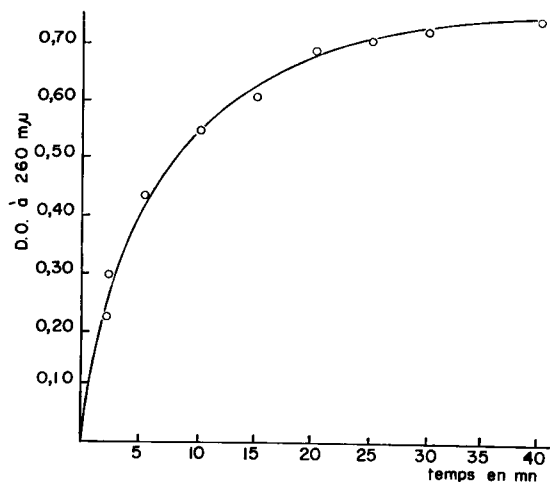


FIG. 1. — Influence du temps d'incubation à 37° sur l'activité de la ribonucléase mesurée par la densité optique du milieu réactionnel après précipitation à l'éthanol acide, pour 0,06 μ g de ribonucléase et 4 mg d'ARN. (Dilution du milieu au 1/20)

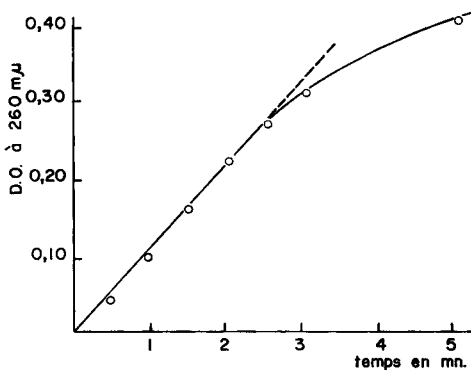


FIG. 2. — Variations de l'activité ribonucléasique en fonction du temps dans les premières minutes de la réaction, pour 0,04 μ g de ribonucléase et 4 mg d'ARN (Dilution du milieu au 1/20)

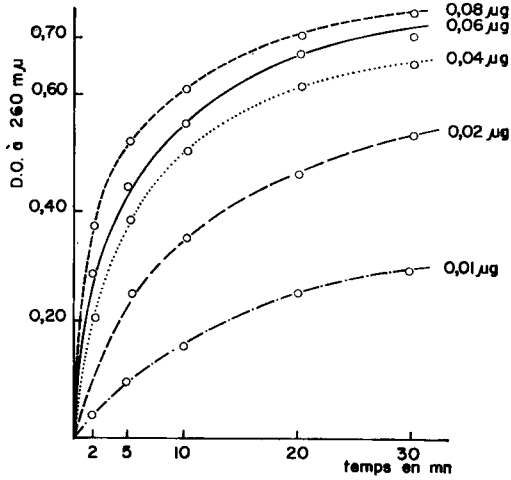


FIG. 3. — Influence de la quantité de ribonucléase sur la vitesse de réaction pour 4 mg d'ARN (Dilution du milieu au 1/20 avant lecture)

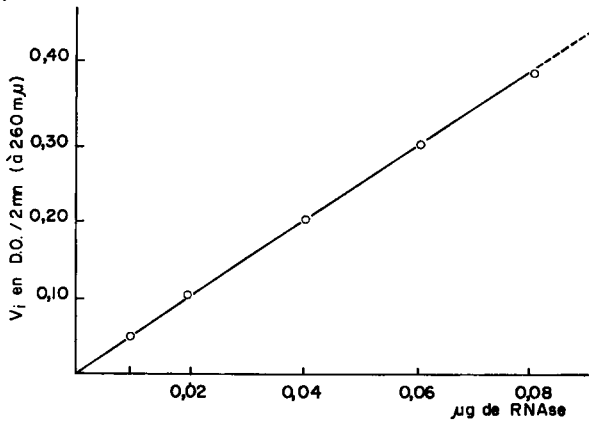


FIG. 4. — Influence de la concentration d'enzyme sur la vitesse initiale de réaction, exprimée en DO corr. pour 2 mn (Valeurs tirées de la fig. 3)

2. — *Influence du pH, de la nature et de la molarité du tampon sur la vitesse de la réaction*

La figure 5 montre l'effet du pH sur la vitesse initiale de réaction à force ionique constante. Dans les conditions choisies, la V_i est de 0,285 en tampon *Tris* HCl à un pH de 7,80.

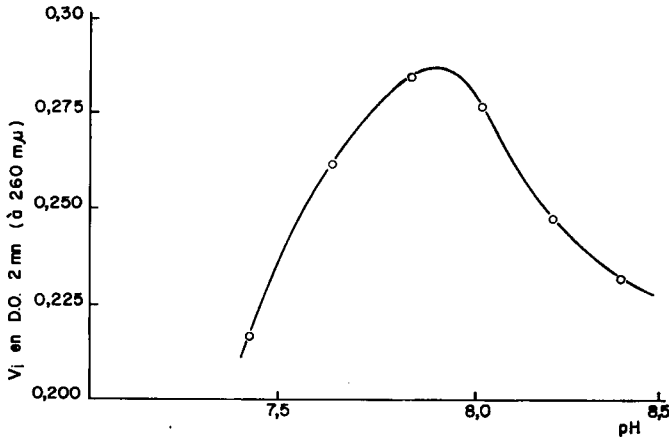


FIG. 5. — *Influence du pH sur la vitesse initiale de la réaction ribonucléasique à force ionique constante. La force ionique est de 0,055 (Tampon tris, HCl) (Dilution au 1/20)*

En tampon phosphate, 0,025 M dans les mêmes conditions, le pH optimum se situe entre 7,80 et 8,00 avec une V_i de 0,240. A un pH fixe de 7,80, nous avons étudié l'influence de la molarité du tampon phosphate sur les valeurs de la vitesse initiale.

Les tubes contiennent :

0,6 ml de tampon phosphate pH 7,8

0,3 ml d'ARN à 5 mg/ml en tampon phosphate 0,01 M pH 7,8

Après 2 mn de préincubation au bain-marie à 37°, on ajoute au temps t_0 0,1 ml de RNase à 0,4 μg/ml ; les résultats sont consignés dans le tableau 1. Le temps de réaction est 2 mn. A pH 7,80 la molarité optimale du milieu se situe vers 21 mM, qui correspond à une force ionique de 0,06.

3. — *Vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat*

Les tubes contenant :

0,4 ml de tampon phosphate 0,0325 M pH 7,8

0,5 ml d'ARN à des concentrations variables,

en solution dans un tampon phosphate 0,01 M pH 7,8 sont préincubés au bain marie à 37° pendant 2 mn ; au temps t_0 , on ajoute 0,1 ml d'une solution de ribonucléase à 0,4 μg/ml ou de gélatine à 0,1 p. 100 pour les « blancs ».

Les résultats sont consignés dans le tableau 2. La figure 6 donne les valeurs de $\frac{I}{V_i}$ en fonction de $\frac{I}{(\text{ARN})}$ tirées du tableau 2.

TABLEAU 2

Variation de la vitesse initiale de réaction en fonction de la concentration en substrat
La DO à 260 m μ est déterminée sur des dilutions au 1/15

ARN (mg/ml)	0,25	0,4	0,5	0,8	1	1,25	1,5	1,75	2	2,25	2,5	3
V_i (DO corr. $\times 10^3$)	134	177	200	233	240	246	248	246	240	238	232	222
$1/V_i$	7,4	5,6	5	4,3	4,16	4	3,95	4	4,16	4,2	4,3	4,5
$1/[ARN]$	4	2,5	2	1,25	1	0,8	0,66	0,57	0,5	0,44	0,4	0,33

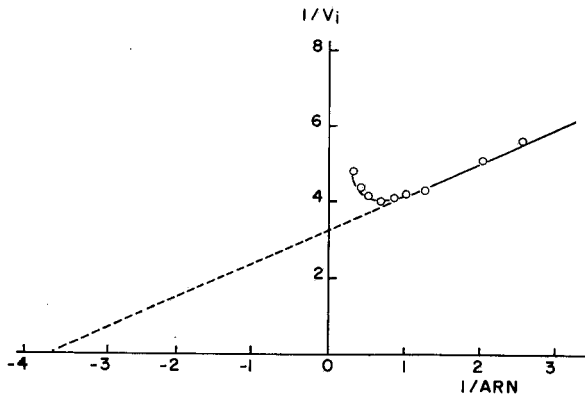


FIG. 6. — Courbe de $1/V_i$ en fonction de l'inverse de la concentration en substrat selon la représentation de LINEWEAVER et BURKE (1934)

4. — Vitesse de réaction en fonction de la température

La figure 7 indique les variations de la DO à 260 m μ en fonction du temps d'incubation (de 0 à 2 mn) pour différentes températures.

Les tubes contiennent :

0,7 ml de tampon phosphate 0,025 M pH 7,8

0,2 ml d'ARN à 10 mg/ml

Après 2 mn de préincubation à la température choisie, on ajoute 0,1 ml de ribonucléase à 0,4 μ g/ml au temps t_0 (ou 0,1 ml de gélatine à 0,1 p. 100 pour les tubes blancs).

La figure 8 montre la variation de la vitesse de la réaction en fonction de la température. Elle est obtenue en prenant les pentes à l'origine de chaque courbe de la figure précédente. On constate que le maximum de la vitesse initiale se situe vers 60°.

5. — Influence du facteur inhibiteur contenu dans le surnageant SHV et dans le précipité P_{65} sur la réaction ribonucléasique

Dans une préparation type, 40 g de foie permettent d'obtenir environ 50 ml de surnageant. Les quantités moyennes de protides dans le surnageant SHV et dans

le précipité P_{55} repris dans un volume égal au surnageant de départ sont respectivement de 20 mg/ml et de 10 mg/ml environ. L'activité inhibitrice du surnageant est retrouvée après précipitation au sulfate d'ammonium dans les fractions S_{35} et P_{55} .

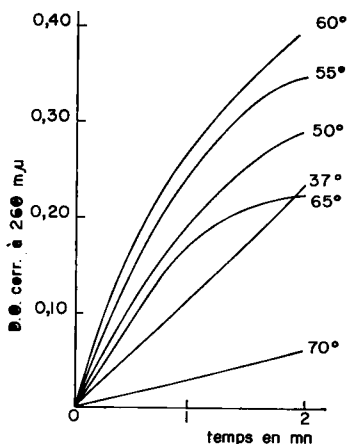


FIG. 7. — Cinétique de la réaction ribonucléasique pour différentes températures d'incubation
Le milieu contient 2 mg d'ARN et 0,04 μ g de ribonucléase pour 1 ml

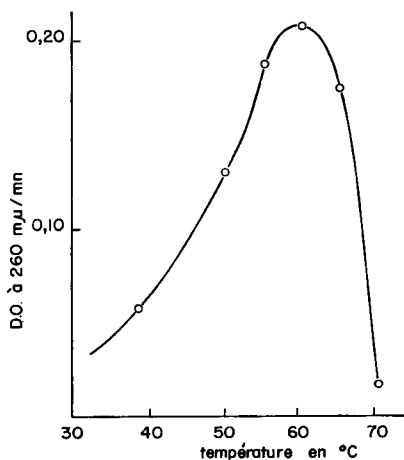


FIG. 8. — Variation de la vitesse initiale de réaction en fonction de la température
Valeur tirée de la figure 7 pour un temps d'incubation de 1 minute

a) *Activité inhibitrice du surnageant haute vitesse.*

Nous avons porté sur la figure 9 les variations du pourcentage d'inhibition en fonction de la quantité de surnageant ajoutée (ou de P_{55}) dans le milieu réactionnel. (Cf. Mat. et Meth.)

b) *Activité inhibitrice du P_{55} .*

Nous avons porté sur la figure 10 les valeurs du pourcentage d'inhibition pour différentes concentrations de ribonucléase en fonction de la quantité de P_{55} ajoutée au milieu. On constate que le 50 p. 100 d'inhibition est obtenu sur chaque courbe pour des quantités très variables de P_{55} .

Influence de la température sur l'activité inhibitrice du P_{55} .

L'augmentation de l'activité ribonucléasique avec la température s'accompagne d'une diminution du pourcentage d'inhibition lorsqu'on passe de 37° à 50°. Pour une même quantité de P_{55} dans ces conditions (0,9 mg) ce pourcentage passe de 40 p. 100 à 26 p. 100 par exemple.

Cinétique de la réaction en présence de P_{55} .

Nous avons étudié en outre les variations de la densité optique du milieu réactionnel en fonction du temps d'incubation à 37° en présence de quantités variables de P_{55} .

Les résultats en sont consignés sur la figure 11.

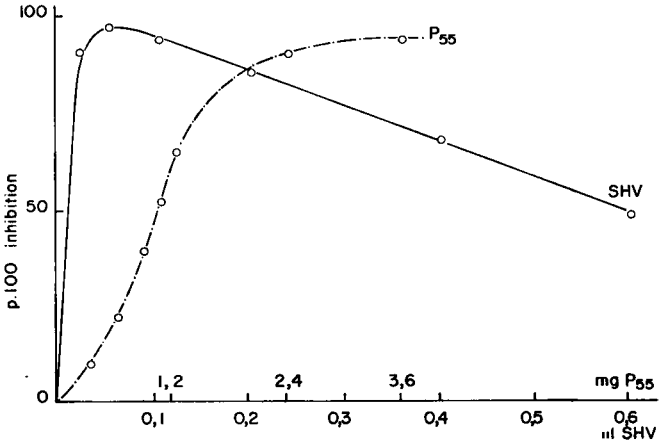


FIG. 9. — Influence du SHV et du P₅₅ sur l'activité ribonucléasique

Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la quantité de surnageant ou de P₅₅ ajoutée dans le milieu pour : Ribonucléase 0,02 µg ; ARN 4 mg (Dilution au 1/20)

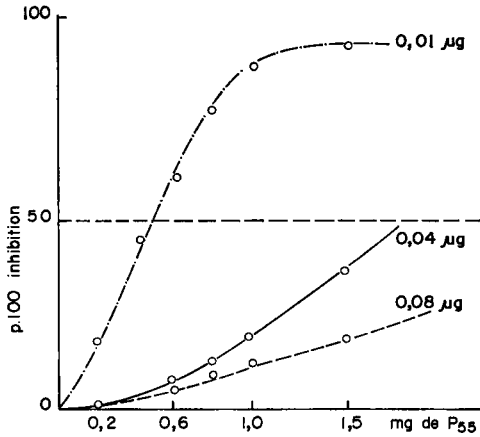


FIG. 10. — Influence du P₅₅ sur l'activité ribonucléasique

Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la quantité de P₅₅ ajoutée au milieu pour : 3 concentrations différentes de ribonucléase (0,01, 0,04, 0,08 µg/1,2 ml) ; ARN 4 mg

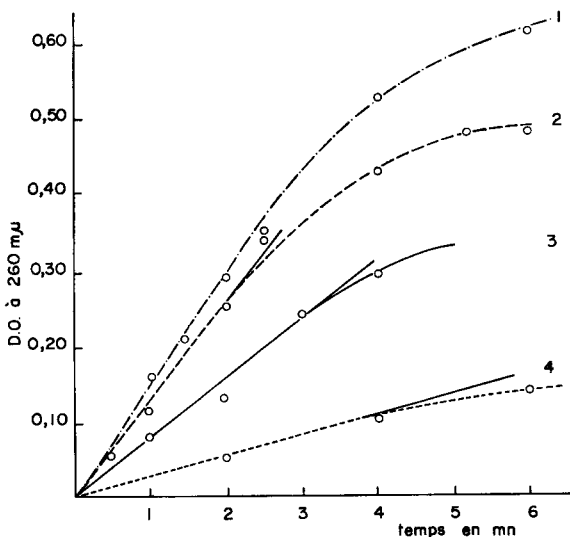


FIG. 11. — Cinétique de la réaction ribonucléasique en présence de P_{55}

Ribonucléase 0,04 μg , ARN 3 mg, pour un volume réactionnel de 1,2 ml.
Lecture photométrique à 260 $m\mu$ sur une dilution au 1/20.

Les courbes 1, 2, 3, 4, correspondent à des quantités respectives de P_{55} de 0, 1,27 mg, 2,55 mg et 4,25 mg.

Nous avons vérifié d'autre part qu'une préincubation des réactifs (2,5 et 10 mn) ne modifiait pratiquement pas le pourcentage d'inhibition par rapport à l'échantillon n'ayant pas subi de préincubation.

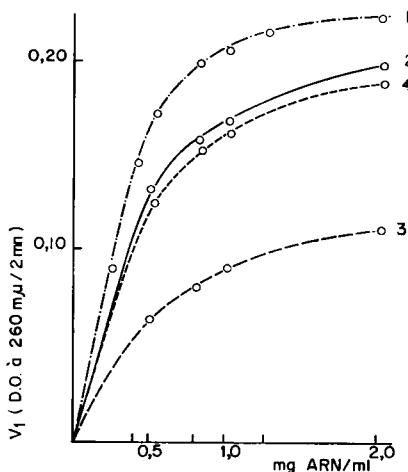


FIG. 12. — Vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration d'ARN et de l'ordre d'adjonction des réactifs

Ribonucléase 0,04 $\mu\text{g/ml}$.

Molarité du milieu 0,018 M phosphate à pH 7,8. Temps d'incubation à 37° : 2 mn.

Les courbes 1, 2, 3, correspondent à des quantités totales de P_{55} respectivement de 0, 1,34 et 2,68 mg.

La courbe 4 correspond à une quantité totale de P_{55} de 2,68 mg, la ribonucléase ayant été ajoutée en dernier.

Variation de la vitesse initiale de réaction en fonction de la concentration en substrat pour des concentrations variables de P_{55} .

Les courbes 1-2-3 de la figure 12 montrent bien que la vitesse initiale, pour une concentration donnée d'ARN diminue au fur et à mesure que les quantités de P_{55} augmentent dans le milieu. La comparaison des courbes 3 et 4 permet de préciser l'influence de l'ordre d'adjonction des réactifs sur l'inhibition de la ribonucléase.

IV. — DISCUSSION

Les résultats sont ceux d'une expérience type. Chaque expérience a été faite au moins trois fois ; chaque valeur de densité optique est la moyenne obtenue à partir de mesures faites en double exemplaire au cours de la même expérience. Il était intéressant d'étudier l'influence de différents facteurs sur la réaction enzymatique puisqu'au cours du processus de purification de l'inhibiteur, nous sommes amenés à faire varier certains de ces facteurs dans de larges limites.

La vitesse n'est linéaire que pendant les premières minutes de la réaction. Elle ne varie que faiblement entre la 30^e et la 120^e minute. En fait, lorsqu'on étudie la réaction dans les premières secondes, on constate que celle-ci ne démarre qu'avec un certain retard, probablement dû à la taille trop grande des produits de la réaction encore alcool-acido-insolubles dans ces conditions (HEPPEL, ORTIZ et OCHOA, 1957 ; KALNITSKI, HUMMEL et DIERKS, 1959 ; ZIMMERMAN et SANDEEN, 1965). Les mesures de la vitesse initiale se font sur 2 mn ; le calcul de cette V_i selon le principe de JOHNSTON et DIVEN (1969) donne des valeurs par rapport aux chiffres expérimentaux qui sont dans les limites d'erreur de la méthode.

L'influence du pH sur la réaction est sous la dépendance de la force ionique. L'optimum de pH de la réaction ribonucléasique varie en effet avec la force ionique comme l'avaient déjà montré KALNITZKI, HUMMEL et DIERKS (1959). Pour une force ionique de 0,06 environ, la vitesse initiale est de 0,285 pour un tampon *Tris* HCl et de 0,240 pour un tampon phosphate dans les conditions standard.

Vitesse de réaction en fonction de la température

On constate que si la vitesse initiale de réaction ribonucléasique présente un maximum vers 60°, le pourcentage d'inhibition diminue de 40 à 25 p. 100 lorsqu'on passe de 37° à 50°, par exemple.

L'influence de la concentration en substrat sur la vitesse initiale de réaction est objectivée par les résultats donnés dans le tableau 2 et dans la figure 6. Ces variations obtenues par des mesures en vitesse initiale, permettent d'exclure un blocage par les produits de la réaction. Il est impossible de trancher sur ces seules données entre une inhibition produite par un excès de substrat et l'intervention d'un autre phénomène, par exemple la présence dans le substrat d'un facteur inhibiteur de la réaction enzymatique.

Il faut se souvenir à ce propos de l'effet inhibiteur marqué non seulement de certaines impuretés, présentes dans les préparations d'ARN, mais également de nombreux ions métalliques dont l'influence sur la ribonucléase pancréatique varie

selon la nature du cation et sa concentration (ROTH et WOJNAR, 1961 ; EICHEL, 1962 ; SHORTMAN, 1962 ; NISHIMURA et NOVELLI, 1963 ; WOJNAR et ROTH, 1964 ; BELCHEV, 1966 ; BRESLOW et GIROTTI, 1966). C'est ainsi que le cuivre, le zinc et le magnésium par exemple, sont activateurs de l'enzyme à faible concentration mais se comportent tous comme des inhibiteurs aux fortes concentrations (EICHORN, CLARK et TARIEN, 1969). Certains cations métalliques interfèrent également avec l'inhibiteur de la ribonucléase pancréatique (WOJNAR et ROTH 1964).

Le pouvoir inhibiteur du surnageant de foie de rat varie quelque peu selon la technique de préparation et le lot d'animaux utilisés, comme l'avait déjà signalé ROTH (1956). Si la durée du jeûne avant le sacrifice des animaux joue probablement un rôle, on sait de plus l'importance de l'état de régénérescence hépatique sur la présence d'inhibiteur et sur l'activité ribonucléasique dans les cellules du foie (SHORTMAN, 1961 et 1962 b ; MAOR et ALEXANDER, 1968 ; TSUKADA, 1969 ; RAHMAN, CERNY et PERAINO, 1969). On peut signaler de plus que l'hypophysectomie paraît provoquer une augmentation du taux de ribonucléase alcaline du foie chez le rat (BREWER, FOSTER, SELLS, 1969).

On constate sur la figure 9 que la courbe du pourcentage d'inhibition en fonction de la quantité de SHV ajoutée au milieu passe par un maximum voisin de 100 p. 100 pour redescendre ensuite de façon très nette. De plus la figure 10 montre bien qu'une inhibition de la réaction de 50 p. 100 est provoquée par des quantités très variables de précipité P_{55} selon la concentration de ribonucléase utilisée pour le test. Il découle de ces deux remarques que la définition de l'unité d'inhibiteur (quantité d'inhibiteur nécessaire pour obtenir une inhibition de 50 p. 100 dans des conditions standard) est parfaitement arbitraire, et que les conditions de dosage doivent être rigoureusement précisées si l'on veut comparer des expériences quant à leur rendement ou au degré de purification qu'elles permettent d'obtenir. Nous avons constaté que selon les conditions, la valeur de l'unité pouvait varier d'un facteur 100.

On remarque sur la figure 12 que l'ordre d'adjonction des réactifs n'est pas indifférent ; la comparaison des courbes 3 et 4 indiquant que l'inhibition est nettement plus marquée lorsque la ribonucléase et l'inhibiteur sont mis en contact avant addition du substrat. Ce point est en cours d'étude au laboratoire.

En conséquence, le test de l'activité ribonucléasique et de son inhibition doit se faire dans des conditions bien déterminées. La comparaison des résultats au cours des différentes étapes de purification n'a de sens que si l'inhibiteur utilisé pour les tests se trouve toujours mis en solution dans le même milieu.

Reçu pour publication en octobre 1970.

SUMMARY

STUDY ON THE ACTIVITY OF PANCREATIC BOVINE RIBONUCLEASE. APPLICATION OF AN ASSAY PROCESS TO THE ESTIMATION OF AN ALKALINE RIBONUCLEASE INHIBITOR FROM RAT LIVER

The activity of bovine pancreatic ribonuclease, measured by the assay process based on liberation of soluble oligonucleotides with *Torula* yeast RNA as a substrate, undergoes marked variations with pH and buffer molarity, incubation temperature, enzyme and substrate concentrations.

The curve of the enzyme reaction progress remains fairly linear for the first two minutes.

The method is suitable for the estimation of a ribonuclease inhibitor found in rat liver supernatant and in the 35 to 55 per cent saturated ammonium sulfate fraction precipitated from this supernatant.

Reliability of the results can only be obtained when an inhibitor unit has been posited under defined test conditions of pH, molarity and composition of buffer, incubation temperature. Using our assay process, inhibition percentage curves depending upon inhibitor concentration first were of sigmoidal pattern, then reached a maximum, and decreased for high supernatant concentration values.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMBELLAN C., HOLLANDER V. P., 1966. A simplified assay for RNase activity in crude tissue extracts. *Anal. Biochem.*, **17**, 474-484.
- ANFINSEN C. B., REDFIELDS R. R., CHOATE W. L., PAGE J., CARROLL W. R., 1954. Studies on the gross structure, crosslinkages and terminal sequences in ribonuclease. *J. biol. Chem.*, **207**, 201-210.
- AVEY H. P., BOLES M. O., CARLISLE C. H., EVANS S. A., MORRIS S. J., PALMER R. A., WOOLHOUSE B. A., 1967. Structure of ribonuclease. *Nature*, **213**, 557-562.
- BARNARD E. A., STEIN W. D., 1959. The histidine residue in the active centre of ribonuclease. I. A specific reaction with bromoacetic acid. *J. molec. Biol.*, **1**, 339-349.
- BELCHEV B. G., 1966. On the role of cations of divalent metals and a ribonuclease inhibitor in the decomposition of RNA in rat liver homogenates. *Biochemistry (Rus.)*, **31**, 384-387.
- BLOBEL G., POTTER R., 1966. Relation of ribonuclease and ribonuclease inhibitor to the isolation of polysomes from rat liver. *Proc. nation. Acad. Sci. U. S. A.*, **55**, 1283-1288.
- BONT W. S., REZELMAN G., BLOEMENDAL H., 1965. Stabilizing effect of the supernatant fraction on the structure of polyribosomes from rat liver. *Biochem. J.*, **95**, 15 c-17 c.
- BONT W. S., GEELS J., REZELMAN G., 1969. An apparatus for preparative polyacrylamide electrophoresis: the isolation of a ribonuclease inhibitor. *Anal. Biochem.*, **27**, 99-107.
- BRENTANI R., BRENTANI M., RAW I., CUNHA J. L. M., WROTSCHINCKY N., 1968. The effect of ribonuclease on rat-liver ribosomes. *Biochem. J.*, **108**, 263-266.
- BRESLOW E., GIROTTI A. W., 1966. The interaction of ribonuclease with metal ions. I. Studies of cupric and zinc ions and the effect of cytidylic acid. *J. biol. Chem.*, **241**, 5651-5660.
- BREWER E. N., FOSTER L. B., SELLS B. H., 1969. A possible role for ribonuclease in the regulation of protein synthesis in normal and hypophysectomized rats. *J. biol. Chem.*, **244**, 1389-1392.
- BURI J. F., VAILLANT R., REIGNIER C., 1969. Purification d'un inhibiteur naturel de la ribonuclease alcaline present dans certains extraits tissulaires de foie de rat. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **269**, 1701-1703.
- BURKA E. R., 1968. Disappearance of polyribosomes during *in vivo* erythroid maturation and nuclease activity. *Nature*, **219**, 263-265.
- CANTERO A., DAoust R., DE LAMIRANDE G., 1950. Nucleodepolymerase activity of precancerous rat liver. *Science*, **112**, 221.
- CRESTFIELD A. M., STEIN W. H., MOORE S., 1963. Alkylation and identification of the histidine residues at the active site of ribonuclease. *J. biol. Chem.*, **238**, 2413-2428.
- CROOK E. M., MATHIAS A. P., RABIN B. R., 1960. Spectrophotometric assay of bovine pancreatic ribonuclease by the use of cytidine 2' 3' phosphate. *Biochem. J.* **74**, 234-238.
- DEAVIN A., MATHIAS A. P., RABIN R., 1966. Mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease. *Nature*, **211**, 252-255.
- DE LAMIRANDE G., ALLARD C., DA COSTA H. C., CANTERO A., 1954. Intracellular distribution of acid and alkaline ribonuclease in normal rat liver. *Science*, **119**, 351-353.
- DE LAMIRANDE G., BOILEAU S., MORAIS R., 1966. Distribution of the nucleases of the microsomal fraction of rat liver between ribosomes and endoplasmic membranes. *Canad. J. Biochem.*, **44**, 273-279.
- DENNIS E. A., WESTHEIMER F. H., 1966. The rates of hydrolysis of esters of cyclic phosphinic acids. *J. Amer. Chem. Soc.*, **88**, 3431-3432.
- DIXON M., WEBB E. C., 1961. Enzyme fractionation by salting-out, a theoretical note. *Adv. Protein Chem.*, **16**, 197-219.
- EICHEL H. J., 1962. Impurity in RNA preparations which inactivates RNase inhibitor and increases alkaline RNase activity. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **109**, 804-808.
- EICHHORN G. L., CLARK P., TARIEN E., 1969. The interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XIII. The effect of metal ions on the enzymatic degradation of ribonucleic acid by bovine pancreatic ribonuclease and of deoxyribonucleic acid by bovine pancreatic deoxyribonuclease I. *J. biol. Chem.*, **244**, 937-942.
- FARKAS W. R., 1969. Acid and alkaline ribonucleases of plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, **191**, 740-743.

- FENWICK M. L., 1968. The effect of ribonuclease on polysomes and ribosomes of bacteria and animal cells. *Biochem. J.*, **107**, 481-489.
- FIERS W., 1961. The determination of ribonuclease activity. *Anal. Biochem.*, **2**, 126-139.
- FINDLAY D., HERRIES D. G., MATHIAS A. P., RABIN B. R., ROSS C. A., 1962. The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease. 7. The catalytic mechanism. *Biochem. J.* **85**, 152-153.
- GIRIJA N. S., SREENIVASAN A., 1966. Characterization of ribonucleases and ribonuclease inhibitor in subcellular fractions from rat adrenals. *Biochem. J.*, **98**, 562-566.
- GRAU O., FAVELUKES G., 1968. Polyribosomes in extracts of bone marrow erythroid cells and their preservation by hepatic ribonuclease inhibitor. *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 647-657.
- GRIBNAU A. A. M., SCHOENMAKERS J. G. G., BLOEMENDAL H., 1969. Purification of rat liver RNAse inhibitor and its effect on polyribosome integrity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **130**, 48-52.
- GUNDLACH H. G., STEIN W. H., MOORE S., 1959. The nature of the amino acid residues involved in the inactivation of ribonuclease by iodoacetate. *J. biol. Chem.*, **234**, 1754-1760.
- GUPTA S., HERRIOT R. M., 1963. Nucleases and their inhibitors in the cellular components of human blood. *Arch. Biochem. Biophys.*, **101**, 88-95.
- HAMMES G. G., SCHERAGA H. A., 1966. A model of ribonuclease based on chemical evidence. *Biochemistry*, **5**, 3690-3693.
- HARRIS M. R., USHER D. A., ALBRECHT H. P., JONES G. H., MOFFATT J. G., 1969. The hydrolysis of uridine cyclic phosphonate catalyzed by ribonuclease A. Implications for the mechanism of actions of the enzyme. *Proc. nation. Acad. Sci. U. S. A.*, **63**, 246-252.
- HEPPEL L. A., WHITFIELD P. R., 1955. Nucleotide exchange reactions catalysed by ribonuclease and spleen phosphodiesterase. I. Synthesis and interconversion of simple esters of ribomononucleotides. *Biochem. J.*, **60**, 1-7.
- HEPPEL L. A., ORTIZ P., OCHOA S., 1957. Studies on polynucleotides synthesized by polynucleotide phosphorylase. I. Structure of polynucleotides with one type of nucleotide unit. *J. biol. Chem.*, **229**, 679-710.
- HERRIES D. G., 1960. A Kinetic analysis of the pH dependence of the action of bovine pancreatic ribonuclease A on cytidine 2' : 3' - phosphate. *Biochem. biophys. Res. Communic.*, **3**, 666-671.
- HIRS C. H. W., HALMANN M., KYCIA J. H., 1965. Dinitrophenylation and inactivation of bovine pancreatic ribonuclease A. *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**, 209-222.
- JOHNSTON M. M., DIVEN W. F., 1969. An integrated rate equation for determining initial velocities *J. theoret. Biol.*, **25**, 331-338.
- KALNITSKY G., HUMMEL J. P., DIERKS C., 1959. Some factors which affect the enzymatic digestion of ribonucleic acid. *J. biol. Chem.*, **234**, 1512-1516.
- KARTHA G., 1967. Tertiary structure of ribonuclease. *Nature*, **214**, 234 et 330.
- KARTHA G., BELLO J., HARKER D., 1967. Tertiary structure of ribonuclease. *Nature*, **213**, 862-865.
- KLEIN W. Z., 1933. Experimentelle Studien über den Nucleinstoffwechsel. XXXI. Über die fermentative Depolymerisierung der tierischen Nuclein-säure. *Z. Hoppe-Seyler's physiol. Chem.*, **218**, 164-180.
- KÜNZT M., 1940. Crystalline ribonuclease. *J. gen. Physiol.*, **24**, 15-32.
- LAWFORD G. R., SADOWSKY P., SCHACHTER H., 1967. Use of a ribonuclease inhibitor from rat liver supernatant fraction in the preparation of polyribosome-like particles from isolated rat liver nuclei. *J. molec. Biol.*, **23**, 81-87.
- LEWIS R. A., GAMBLE W., 1969. Purification and characterization of bovine aorta ribonucleases *Biochem. J.*, **115**, 95-101.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- MAOR D., ALEXANDER P., 1968. Changes in ribonuclease activity in rat liver following hepatectomy *Biochim. Biophys. Acta*, **157**, 627-629.
- MEADOWS D. H., JARDETSKY O., 1968. Nuclear magnetic resonance studies of the structure and binding site of enzymes. IV. Cytidine 3' - monophosphate binding to ribonuclease. *Proc. nation. Acad. Sci. U. S. A.*, **61**, 406-413.
- NISHIMURA S., NOVELLI C. D., 1963. Resistance of S-RNA to ribonucleases in the presence of magnesium ion. *Biochem. biophys. Res. Communic.*, **11**, 161-165.
- PIROTTE M., DESREUX V., 1952. Distribution de la ribonuclease dans les extraits de granules cellulaires du foie. *Bull. Soc. chim. Bel.*, **61**, 167-180.
- RAHMAN Y. E., CERNY E. A., PERAINO C., 1969. Studies on rat liver ribonucleases. IV. Liver ribonucleases in developing 2-Acetylaminofluorene fed and partially hepatectomized rats. *Biochim. biophys. Acta*, **178**, 68-73.
- RAZZELL W. E., 1963. The precipitation of polyribonucleotides with magnesium salts and ethanol. *J. biol. Chem.*, **238**, 3053-3057.
- REID E., NODES J. T., 1959. Liver ribonucleases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **81**, 618-633.
- ROBERTS G. C. K., DENNIS E. A., MEADOWS D. H., COHEN J. S., JARDETSKY O., 1969. The mechanism of action of ribonuclease. *Proc. nation. Acad. Sci., U. S. A.*, **62**, 1151-1158.

- ROTH J. S., MILSTEIN S. W., 1952. Ribonuclease. I. A new assay method with P³² labeled yeast ribonucleic acid. *J. biol. Chem.*, **196**, 489-498.
- ROTH J. S., 1956. Studies on the properties and distribution of ribonuclease inhibitor in the rat. *Biochim. Biophys. Acta.*, **21**, 34-43.
- ROTH J. S., 1958. Ribonuclease. VII. Partial purification and characterization of a ribonuclease inhibitor in rat liver supernatant fraction. *J. biol. Chem.*, **231**, 1085-1095.
- ROTH J. S., 1959. Comparative studies on tissue ribonucleases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **81**, 611-617.
- ROTH J. S., WOJNAR R., 1961. An impurity in RNA preparations that interferes with assays for ribonuclease and ribonuclease inhibitor. *Biochem. biophys. Res. Communic.*, **6**, 151-154.
- ROTH J. S., 1962. Ribonuclease. IX. Further studies on ribonuclease inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta*, **61**, 903-915.
- RUTERJANS H., WITZEL H., 1969. NMR studies on the structure of the active site of pancreatic ribonuclease A. *Eur. J. Biochem.*, **9**, 118-127.
- SHORTMAN K., 1961. Studies on cellular inhibitors of ribonuclease. I. The assay of the ribonuclease inhibitor system and the purification of the inhibitor from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **51**, 37-49.
- SHORTMAN K., 1962 a. Studies on cellular inhibitors of ribonuclease. II. Some properties of the inhibitor from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **55**, 88-96.
- SHORTMAN K., 1962 b. Studies on cellular inhibitors of ribonuclease. III. The levels of ribonucleases and ribonuclease inhibitor during the regeneration of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **61**, 50-55.
- SHUGAR D., SIERAKOWSKA H., 1967. Mammalian nucleolytic enzymes and their localization. *Progr. nucleic Acid Res.*, **7**, 369-429.
- SIRAKOV L. M., KOCHAKIAN C. D. 1969. The stability of ribonuclease inhibitor from guinea-pig liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **195**, 572-575.
- SMITH D. G., STEIN W. H., MOORE S., 1963. The sequence of amino acid residues in bovine pancreatic ribonuclease : revisions and confirmations. *J. biol. Chem.*, **238**, 227.
- STARK G. R., STEIN W. H., MOORE S., 1961. Relationship between the conformation of ribonuclease and its reactivity toward iodoacetate. *J. biol. Chem.*, **236**, 436-442.
- STEIN W. D., BARNARD E. A., 1959. The histidine residue in the active centre of ribonuclease. *J. molec. Biol.*, **1**, 350-358.
- TSUKADA K., 1969. Activity of serum ribonuclease after partial hepatectomy and acute stress in the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, **186**, 21-24.
- UMEDA T., MORIYAMA T., OURA H., TSUKADA K., 1969. Rat serum ribonuclease. *Biochim. Biophys. Acta*, **171**, 260-264.
- USHER D. A., 1969. On the mechanism of ribonuclease action. *Proc. nation. Acad. Sci., U. S. A.*, **62**, 661-667.
- UTSUNOMIYA T., ROTH J. S., 1966. Studies on the function of intracellular ribonucleases. *J. Cell. Biol.*, **29**, 395-403.
- VOLKIN E., COHN W. E., 1953. On the structure of ribonucleic acids. II. The products of ribonuclease action. *J. biol. Chem.*, **205**, 767-782.
- WITZEL H., 1963. The function of the pyrimidine base in the ribonuclease reaction. *Progr. nucleic Acid Res.*, **2**, 221-258.
- WOJNAR R. J., ROTH J. S., 1964. Metal ions in ribonucleic acid : their nature and interference with the assay for ribonuclease and ribonuclease inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta*, **87**, 17-27.
- ZIMMERMAN S. B., SANDEEN G., 1965. A sensitive assay for pancreatic ribonuclease. *Anal. Biochem.*, **10**, 444-449.