

[Akceptuje](#)

W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej [Polityce Prywatności](#)

[Portal](#) [Informacje](#) [Katalog firm](#) [Praca](#) [Szkolenia](#) [Wydarzenia](#) [Porównania międzylaboratoryjne](#)
[Kontakt](#)



[Laboratoria](#)
[.net](#)
[Innowacje](#)
[Nauka](#)
[Technologie](#)

[Logowanie](#) [Rejestracja](#) [pl](#)

Newsletter

[zapisz się](#)



- [Nowe technologie](#)
- [Felieton](#)
- [Tygodnik "Nature"](#)
- [Edukacja](#)
- [Artykuły](#)
- [Przemysł](#)

[Strona główna](#) > [Artykuły](#)

Rybonukleazy: RNaza, RNaza P i onkonaza jako enzymy degradujące kwasy rybonukleinowe (RNA)

Rybonukleazy (RNazy) są enzymami, których główną funkcją jest rozkładanie wiązań fosfodiesterowych w kwasach rybonukleinowych (RNA). Obecność tych specyficznych enzymów stwierdzono u wszystkich organizmów, przy czym w zależności od gatunku różnią się one specyficznością oraz mechanizmem działania enzymatycznego [1]. Rybonukleazy występują także w skórze ludzkiej, gdzie niektóre RNazy z ludzkiego naskórka wykazują tylko aktywność hydrolityczną, podczas gdy inne uważane są za istotne w procesie

przyczepności i złuszczenia keratynocytów [6].

Scharakteryzowano dwie główne klasy rybonukleaz, a mianowicie:

1. Endorybonukleazy tj. enzymy rozkładające wiązania wewnątrz łańcucha RNA
2. Egzonukleazy, których zadaniem jest uwalnianie nukleotydów kwasu rybonukleinowego (RNA) na jego zakończeniach.

Jako enzymy rybonukleazy pełnią w komórce różnorodne funkcje. I tak przypisuje się im udział w procesie dojrzewania prekursorów kwasów nukleinowych oraz w rozkładzie RNA. Ponadto, RNaza I uczestniczy w układzie obronnym organizmu. Choć specyficzność RNaz wiąże się z jednoniciowymi fragmentami kwasu rybonukleinowego, znana jest też tzw. RNaza H, która atakuje hybrydy RNA-DNA.

Obok typowych RNaz występują też tzw. rybonukleazy cyklizujące, które rozkładają wiązania fosfodiesterowe z wytworzeniem pośredniego produktu cyklicznego. Reakcja zachodzi w dwóch etapach:

1. Rybonukleazy katalizują specyficzne rozbitcie wiązań fosfodiesterowych w kwasach rybonukleinowych. W wyniku ich działania powstają jedno- oraz kilkonukleotydy. W reakcji tej najpierw tworzy się końcowy cykliczny 2'3'-nukleotyd, powstający na skutek przeniesienia reszty fosforowej z węgla 5' rybozy sąsiedniego nukleotydu na węgiel 2' rybozy poprzedzającego nukleotydu.
2. W drugim etapie dochodzi do hydrolitycznego rozbitcia wiązania przy węglu 2', a następnie tworzy się nukleotyd końcowy, który jest zestryfikowany z kwasem fosforowym przy węglu 3'[1].

W komórkach roślinnych występują rybonukleazy roślinne, które również rozkładają wszystkie rodzaje RNA- najłatwiej jednak atakują mRNA. Aktywność enzymu zależy od bardzo wielu warunków i tak:

- od stanu fizjologicznego komórki
- warunków środowiska (wpływają one na syntezę nowych drobin enzymów, jak również na ich konformację, a to z kolei wpływa na stopień czynności biologicznej)
- aktywność RNaz zwiększa się w trakcie starzenia się komórki i w ekstremalnych warunkach, co prowadzi do nadmiernego rozkładu RNA oraz zaburzeń w syntezie białek [2].

Ponadto, aktywność RNaz ulega podwyższeniu np. w okresie kiełkowania nasion czy w trakcie zachodzenia procesu apoptozy. Dodatkowo, niektórzy autorzy (np. Lehmann i wsp. 2001, czy Raj i wsp. 2001), donoszą, że do stymulacji aktywności RNaz dochodzi także podczas ataku fitopatogenów i w warunkach niedoboru fosforu [3].

Udział RNazy P w powstawaniu tRNA

Wszystkie rodzaje tRNA powstają z dłuższych transkryptów tzw. pre-tRNA. Zanim cząsteczki staną się właściwym tRNA przechodzą proces dojrzewania, na który składa się kilka etapów:

1. Odcięcie sekwencji liderowej z końca 5'-
2. Odcięcie dwóch nukleotydów z końca 3'
3. Dodanie do końca 3' sekwencji CCA
4. Wycięcie centralnego intronu z cząsteczki pre-tRNA.

5. Ostatnim etapem dojrzewania jest chemiczna modyfikacja zasad azotowych. Cały ten proces katalizowany jest właśnie przez RNazy oraz inne enzymy, które modyfikują zasady. RNaza P odpowiada za dojrzewanie końca 5' tRNA.

RNaza P zbudowana jest z jednej cząsteczki RNA (tworzącej centrum) i jednej cząsteczki białka (odpowiedzialnego za utrzymanie aktywnej konformacji). Jako enzym RNaza P zalicza się do endonukleaz (podobnie jak RNazy D, E czy F) [4], [5]. Rybonukleaza P (RNaza P) jest więc kluczowym enzymem w biogenezie tRNA, który katalizuje endonukleolityczne rozszczepienie prekursorów tRNA oraz generuje ich dojrzały koniec 5' [5]. Jedną z pierwszych katalitycznie scharakteryzowanych rybonukleaz była RNaza P pochodząca z bakterii [5].

Izolacja RNazy P z keratynocytów skóry (wg Pavlidou D. i wsp. 2005).

Jako materiał do badań wykorzystano keratynocyty ludzkiej skóry, odpowiednio przygotowane. Komórki pobrano ze skóry pacjentów z otyłością poddanych wcześniej abdominoplastyce (plastyka brzucha). Komórki przygotowuje się przez odpowiednią preparatykę, na końcu próbki poddaje się wirowaniu w 4°C przez 5 minut, a żywotność keratynocytów mierzy się testem z błękitem trypanu [6].



Fig. 1. Complete separation of human epidermis from dermis subsequent to incubation with dispase (haematoxylin-eosin, $\times 400$). Zdjęcie: Kompletny podział ludzkiego naskórka od skóry właściwej po inkubacji z dispazą (naturalna proteaza), <http://www.medicaljournals.se/acta/content/?doi=10.2340/00015555-0019&html=1>

Oczyszczanie enzymu:

Uzyskane komórki w ilości 5×10^6 zawieszono w 4 ml lodowatego buforu A (tj. 10 mM HEPES o pH=7.9; 10 mM KCl; 0,1 mM EGTA; 1 mM ditiotritol (DTT); 0,5 mM fluorek fenylometrylosulfonylu (PMSF)) i pozostawiono do spęcznienia na 30 minut. Następnie, dodano (0,6% v/v) detergent Nonidet P-40 (octyl phenoxypolyethoxylethano), po czym zawiesinę homogenizowano, po czym odwirowano. Po wirowaniu otrzymane peletki zawieszono w 1 ml lodowatego buforu C (tj.: 20 mM HEPES o pH=7.9; 0,4 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM ditiotritol; 20% gliceryna), próbkę energicznie wytrząsano w temperaturze 4°C przez 30 minut. Zanieczyszczenia jądrowe usunięto przez 15 minutowe odwirowanie przy 14000 obr./minutę, po czym ekstrakt przechowywano w -20°C [6].

Komórkowe i jądrowe ekstrakty dializowano przez noc w 2 L buforu B (tj.: 50 mM fosforan potasu,

pH=7.0; 0,1 mM ditiotreitol; 10% glicerol objętościowo), po czym próbkę w obj. 3 ml naniesiono na kolumnę fosfocelulozową (P-11) zrównoważoną wcześniej buforem B (jak wyżej). Kolumnę przemywano tym samym buforem do momentu, aż nie zaobserwowano spadku absorbancji $A=280$ nm do zera. RNazę P eluowano z kolumny za pomocą 9 ml liniowego gradientu od 50 do 500 mM NH_4Cl w buforze B. Otrzymane aktywne frakcje enzymu połączono i dializowano przez noc w 2 L buforu K (tj.: 5 mM MgCl_2 ; 100 mM NH_4Cl ; 50 mM tris-HCl o pH=7.5) w obecności 20% glicerolu. Próbkę podzielono na małe porcje, po czym przechowywano w temperaturze -20 st.C [6].

Aktywność rybonukleolityczna

W homogenatach uzyskanych z komórek zwierzęcych występują dwa optymalne stężenia jonów wodorowych. W pH kwasowym mieszczącym się w granicach 5.2- 5.8 oraz pH zasadowym (7.8 - 8.2) stwierdza się optymalną aktywność RNaz. Co więcej, przeprowadzone badania wykazały, że aktywność tego enzymu w pH kwasowym jest mniejsza, niż w pH zasadowym. Między RNazami kwasowymi i zasadowymi występuje kilka różnic m.in. rybonukleazy kwasowe są wrażliwe na temperaturę i tracą swoją aktywność w rozcieńczonych kwasach, z kolei RNazy zasadowe są stosunkowo odporne na działanie wymienionych czynników [1].

Metoda Mc Donald- izolacja RNazy z tkanki trzustkowej

Metodę otrzymywania krystalicznej rybonukleazy po raz pierwszy opisał Kunitz (1940). Od tego czasu prowadzono badania, w trakcie których wykazano, że enzym ten nie tylko ma zdolność degradowania kwasu rybonukleinowego, ale także do hydrolizy białka [7]. Procedura opisana przez Kunitz'a została nieznacznie zmieniona na przestrzeni lat. W metodyce zmieniono kilka etapów, dzięki czemu udało się otrzymać RNazę wolną od wszelkich zanieczyszczeń, a cząsteczka RNazy jest praktycznie nienaruszona [7].

Metoda izolacji opiera się na ekstrakcji RNazy z tkanki za pomocą 0,12 M roztworu H_2SO_4 . Kolejnym etapem jest frakcjonowanie za pomocą $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Całą preparatykę należy wykonywać w temperaturze 4 st.C [1].

Otrzymywanie surowego preparatu rybonukleazy

Wykonanie:

Ekstrakcja I: Jako materiał do badań należy wykorzystać trzustkę bydlęcą, z której ekstrahuje się RNazę za pomocą lodowatego 0,12 M roztworu kwasu siarkowego (H_2SO_4). Cały proces prowadzi się przez 24 godziny, po czym kwasowy ekstrakt pozostawia się w niskiej temperaturze, a trzustkę poddaje się oczyszczaniu (usunięcie tłuszczu oraz tkanki łącznej).

Kolejnym etapem jest homogenizacja tkanki, którą ponownie zalewa się zimnym roztworem H_2SO_4 (0,12 M) w proporcji: 2 L kwasu na 1 L zmielonej tkanki. Kolejną ekstrakcję prowadzi się przez 18 do 24 godzin, ze sporadycznym wytrząsaniem. Po ekstrakcji, homogenat trzustki należy przesączyć przez gazę, a pozostałą tkankę zalewa się równą objętością 0,12M H_2SO_4 . Tak przygotowaną próbkę pozostawia się na 1 godzinę [1], [7].

Przesącz otrzymany z trzech kolejnych ekstrakcji należy połączyć, po czym doprowadzić do 65% nasycenia roztworem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. W tym celu dodaje się 430 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ w substancji na 1 litr przesączu. W celu uformowania osadu, otrzymany ekstrakt pozostawia się na 24 godziny, po czym odsącza wysolone białka przez sączki wykonane z bibuły Whatman nr 2 [1], [7].

Powstały przesącz zachowuje się, a osad traktuje się równą objętością wody (w stosunku do użytej ilości trzustki bydłowej) wraz z dodatkiem 430 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na 1 litr zawiesiny. Tak przygotowaną próbkę ponownie pozostawia się na 24 godziny. Po upływie czasu inkubacji próbkę odsącza się (jak wyżej), a osad odrzuca [1], [7].

Wysolenie surowej frakcji enzymu:

W tym celu połączone przesącze doprowadza się do do 80% nasycenia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dodając 105 gramów $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na 1 litr roztworu i odstawia na 24 godziny. Po wytrąceniu osadu ciecz należy ostrożnie zdekantować, a dalej odwirować przy 400 obr./minutę w wirówce z chłodzeniem. Otrzymany w ten sposób osad stanowi surowy preparat RNazy [1], [7].

Oczyszczanie RNazy

W celu oczyszczenia preparatu RNazy z enzymów proteolitycznych, należy wcześniej otrzymany osad enzymu rozpuścić w wodzie w proporcji 5 ml wody na 1 g osadu. Ponadto, do roztworu enzymu należy dodać 20% nasycony roztwór $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH=3) z wyliczeniem 20 ml roztworu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na 1 g RNazy. Roztwór $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ doprowadza się do odpowiedniego pH za pomocą 5M roztworu kwasu siarkowego.

Tak przygotowaną próbkę podgrzewa się do temperatury w granicach 95 st.C - 100 st.C stale mieszając, po czym próbkę gwałtownie się oziębia do temperatury ok. 20-25 st.C. Następnie, poddaje się próbkę 1-godzinnej inkubacji (w tej temperaturze). W trakcie inkubacji dochodzi do wytrącenia się enzymów proteolitycznych, które następnie adsorbowane są na ziemi okrzemkowej (1 g ziemi okrzemkowej na 100 ml zawiesiny). Osad przesącza się na lejku Buchnera, a następnie przemywa się 3-krotnie za pomocą małych ilości zakwaszonego do pH=3 roztworu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (20% nasycenie). W dalszym etapie oczyszczania, otrzymany przesącz doprowadza się do do 50% nasycenia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (dodając 18,8 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na 100 ml cieczy). Po upływie godzinnej inkubacji, osad należy odsączyć, po czym go odrzucić. RNazę odzyskuje się z przesączu po wysoleniu za pomocą siarczanu amonu o 80% nasyceniu (w tym celu dodaje się 21 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na 100 ml przesączu). Po upływie 24 godzin należy odwirować osad enzymu [1], [7].

Krystalizacja jest metodą oczyszczania związków chemicznych. Cały proces polega na otrzymaniu nasyconego roztworu substancji, którą oczyszczamy w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Następnie, roztwór poddaje się sączeniu (oddzielenie ewentualnych nierozpuszczalnych zanieczyszczeń) i ochłodzeniu (otrzymanego przesączu) [11].

Zazwyczaj, stałe związki organiczne, które są bezpośrednio wydzielone w określonej reakcji nie są chemicznie czyste (zawierają niewielkie ilości innych związków określanych mianem zanieczyszczeń). Zanieczyszczenia powstają jednocześnie z głównym produktem reakcji, w związku z czym próbki takie wymagają oczyszczenia. W większości przypadków oczyszcza się je przez krystalizację z odpowiednim rozpuszczalnikiem lub z mieszaniną rozpuszczalników.

Sam proces krystalizacji polega na wykorzystaniu różnicy rozpuszczalności związków w odpowiednich rozpuszczalnikach (lub ich mieszaninach) [12].

Do podstawowych etapów krystalizacji zalicza się:

1. rozpuszczenie zanieczyszczonej substancji w odpowiednio dobranym rozpuszczalniku- proces ten zachodzi w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika (lub w jej pobliżu)
2. odsączenie gorącego roztworu (od nierozpuszczalnych składników oraz zanieczyszczeń)
3. ochłodzenie przesączu (krystalizacja rozpuszczonego związku)
4. oddzielenie kryształów od roztworu (tzw. ługu pokrystalicznego)
5. wysuszenie otrzymanego związku stałego
6. określenie czystości związkku [12].

Przygotowanie RNazy do krystalizacji

Otrzymany czysty preparat RNazy (oczyszczony z enzymów proteolitycznych) w ilości 1 g rozpuszcza się w 5 ml wody, po czym za pomocą 5M roztworu wodorotlenku sodu doprowadza się go do pH=4.8. Po uzyskaniu pożądanego pH do próbki dodaje się 5 ml nasyconego roztworu siarczanu amonu (na 1 g enzymu dodaje się 1 g ziemi okrzemkowej na 100 ml cieczy). Osad odsącza się i odrzuca, zaś przesącz doprowadza się do niższego pH=4.2 (0,5 M roztworem kwasu siarkowego - H₂SO₄) i wysala RNazę, doprowadzając do 70% nasycenia siarczanem amonu przez dodanie 67 ml nasyconego roztworu (NH₄)₂SO₄ na 100 ml przesączu. Po upływie 24 godzin inkubacji w 4 st.C osad rybonukleazy należy odwirować przy 400 obr./minutę [1], [7].

Krystalizacja RNazy z siarczanem amonu

Całą preparatykę należy prowadzić w temperaturze 0- 4 st.C .

Enzym przygotowany do krystalizacji rozpuszcza się w 1 ml wody (w stosunku 1g enzymu : 1 ml H₂O). Występujące w próbce substancje zanieczyszczające adsorbują się na ziemi okrzemkowej dodanej w stosunku: 5 g ziemi okrzemkowej na 100 ml roztworu. Powstały osad odsącza się na bibule, po czym przemywa się za pomocą wody.

Następnie, otrzymany przesącz należy doprowadzić do pH równego 4.2- w tym celu stosuje się 1 M roztwór wodorotlenku sodu (NaOH) lub 0,5 M roztwór kwasu siarkowego (H₂SO₄)- próbkę należy delikatnie mieszać, aż do momentu pojawienia się opalizującego zmętnienia roztworu. Proces krystalizacji należy przeprowadzać w cieplarni o temp. 20-25 st.C. Po upływie 3 dni, powstały osad odwirowuje się, a ług pokrystalizacyjny doprowadza się ponownie do pH równego 4.2 i znów krystalizuje (jak wyżej) [1], [7].

Proces rekrystalizacji

Krystaliczną RNazę rozpuszcza się w wodzie, stosując proporcję: 2 ml wody na 1 g otrzymanego skrytalizowanego enzymu. Do rozpuszczonej próbki dodaje się 0,2 g ziemi okrzemkowej (na 2 ml roztworu), a całość odsącza się na bibule. Pozostały po sączeniu osad (znajdujący się na sączku) należy przemyć małymi porcjami wody, a następnie doprowadzić do pH=4.2 (dodaje się nasyconego roztworu (NH₄)₂SO₄ do momentu pojawienia się delikatnej opalescencji w próbce. Taką próbkę krystalizuje się ponownie (w temp. 20-25 st.C) przez 48 godzin. Otrzymany krystaliczny osad poddaje się wirowaniu, zaś otrzymany po wirowaniu supernatant doprowadza się ponownie do pH=4.2. Supernatant dalej krystalizuje się przez okres 3 dni (jak wyżej) [1], [7].

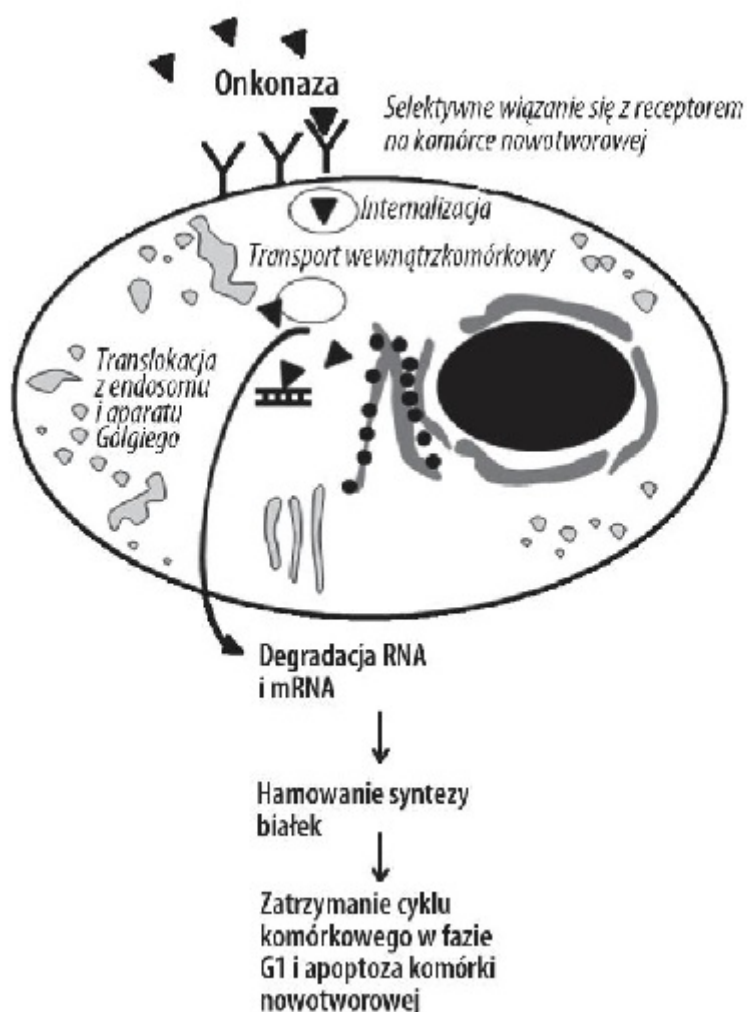
Rekrystalizowaną Rnaze można również rozpuścić w wodzie (w 1,5 ml) i dializować wobec wody. Cały proces należy prowadzić w temperaturze 0-4 st.C przez 24 godziny. Do dializatu w temp. 5 st.C , dodaje się następnie 96% roztwór etanolu (w stosunku: 12 ml etanolu na 1 ml roztworu). Dochodzi

do formowania się osadu (w trakcie odstania próbki przez 2 dni w temperaturze 10 do 20 st.C). Odstany po czasie inkubacji krystaliczny osad, należy przemyć kilka razy 96% etanolem, po czym wysuszyć w eksykatorze nad CaCl_2 . Opisany proces nazywa się krystalizacją z etanolu [1], [7].

Onkonaza - białko z aktywnością rybonukleazy

Onkonaza (ONC) jest stosunkowo niedawno poznanym białkiem, które otrzymuje się z jaj żaby *Rana pipiens*. Jest białkiem o masie cząsteczkowej równej 12000D, a buduje je pojedynczy łańcuch polipeptydowy składający się ze 104 aminokwasów. Onkonaza podobnie jak inne RNazy wykazuje wysoki stopień powinowactwa do niektórych RNaz występujących w organizmie człowieka (np. do RNazy trzustkowej czy wątrobowej)[8].

Przeprowadzone badania wykazały, że białko spełnia szereg bardzo ważnych funkcji. Działanie biologiczne tego białka, a zwłaszcza przeciwnowotworowe, jest ściśle związane z aktywnością rybonukleazy. Onkonaza prowadzi do śmierci komórki, przez rozkład wewnątrzkomórkowego RNA, ponadto odpowiada za hamowanie syntezy białek, a także wzrostu i proliferacji. Ponadto, wykazano, że odpowiada za selektywną indukcję apoptozy komórek nowotworowych (programowana śmierć). Ważnym elementem jej działania cytotoksycznego jest również aktywność antyoksydacyjna [8]. Podobnie jak inne RNazy, onkonaza ma zdolność rozkładania ds RNA (jednoniciowego RNA). Może również tworzyć aktywne biologicznie dimery.



Zdjęcie: Mechanizm działania białka onkonazy [8].
<http://www.phmd.pl/fulltxthtml.php?ICID=905228>

Onkonaza uważana jest za najmniejsze białko rodziny RNaz A, które zostało wyizolowane z oocytów lub wczesnych embrionów żaby (*Rana pipiens*). Onkonaza jest białkiem stabilnym (temperatura denaturacji) nawet w temperaturze sięgającej 87 st.C, ponadto jest odporna na degradację przez różne proteazy. Białko to indukuje apoptozę komórek nowotworowych, a samo posiada niską cytotoksyczność [9].

W przeprowadzonych badaniach Saxena S. K. i wsp. (2003), stwierdzili, że onkonaza jest mniej wydajnym enzymem niż RNaza A. W optymalnych warunkach onkonaza wykazała się kilkaset razy niższą szybkością reakcji w porównaniu do RNazy A. Optymalnym pH działania dla onkonazy okazało się pH=6.0, w którym to onkonaza wykazuje mniejszą różnicę szybkości reakcji w porównaniu do RNazy A [10].

Autor: Lidia Koperwas

Literatura:

- [1]. Kłyszajko-Stefanowicz L, 2003. Ćwiczenia z biochemii. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003, s.544-548
- [2]. Dolnicki A., 1979. Wpływa stymulatoró wzrostu na aktywność rybonukleaz i na metabolizm kwasów rybonukleinowych u roślin. Wiadomości botaniczne Tom XXIII - zeszyt 3, 1979.
- [3]. Sytykiewicz H., Czerniewicz P., Leszczyński B., Sempruch C., Goławska S., Sprawka I., 2011. Aktywność rybonukleolityczna w liściach Czeremchy Zwyczajnej w okresie żerowania mszycy czeremchowo-zbożowej (*Rhopalosiphum Padi* L.). *Progress in Plant protection /Postępy w Ochronie Roślin* 51 (1) 2011.
http://www.progress.plantprotection.pl/pliki/2011/PPP_51_1_29_Sytykiewicz_H.pdf
- [4]. Żak I. Kwasy nukleinowe, rozdział 19. <http://biochigen.sum.edu.pl/podrecznik/19.pdf>
- [5]. Kudła M. Rybozomy. RNA- nośnik informacji i narzędzie katalizy enzymatycznej. <http://www.igib.uw.edu.pl/~knbm/pdf/rybozomy.pdf>
- [6]. Pavlidou D., Vourekas A., Monastirli A., Kalavrizioti D., Tsambaos D., Drinas D., 2005. Isolation of Ribonuclease P Activity From Human Epidermis and its Regulation by Retinoids In vitro. *Acta Derm Venereol* 2006; 86: 114-118.
<http://www.medicaljournals.se/acta/content/?doi=10.2340/00015555-0019&html=1>
- [7]. McDonald M.R., 1948. A method for the preparation of "protease-free" crystalline ribonuclease. *The Journal of General Physiology*.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2213746/pdf/39.pdf>
- [8]. Zwolińska M., Smolewski P., 2010. Onkonaza-rybonukleaza o aktywności przeciwnowotworowej. *Postępy Hig Med Dosw.* (online), 2010; 64: 58-66. <http://www.phmd.pl/fulltxthtml.php?ICID=905228>
- [9]. Meng Qiao, Li-Dong Zu, Xiao-Hong He, Ru-Ling Shen, Qing-Cheng Wang, Mo-Fang Liu, 2012. Onconase downregulates microRNA expression through targeting microRNA precursors. *Cell Research* (2012) 22:1199-1202. doi:10.1038/cr.2012.67; published online 24 April 2012.
<http://www.nature.com/cr/journal/v22/n7/full/cr201267a.html>
- [10]. Saxena S.K., Shogen K., Ardelt W., 2003. Alfacell Corporation, Bloomfield, NJ. Onconase and it's therapeutic potential. *Laboratorymedicine*, may 2003. Number 5, volume 34.
<http://labmed.ascpjournals.org/content/34/5/380.full.pdf>

[11]. <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/krystalizacja>

[12]. <http://biomist.pl/chemia/artykuly/krystalizacja/43>

<http://laboratoria.net/artikul/20350.html>

Informacje dnia: [Zdrowych i Pogodnych Świąt Bożego Narodzenia Zapraszamy na wyjątkową edycję Targów PCI Days 2025!](#) [Zawał już dawno przestał być chorobą mężczyzn](#) [Świąteczna apteczka](#) [Radioaktywny pluton się nie ukryje](#) [Złoty Medal Chemii przyznany po raz 14](#) [Zdrowych i Pogodnych Świąt Bożego Narodzenia Zapraszamy na wyjątkową edycję Targów PCI Days 2025!](#) [Zawał już dawno przestał być chorobą mężczyzn](#) [Świąteczna apteczka](#) [Radioaktywny pluton się nie ukryje](#) [Złoty Medal Chemii przyznany po raz 14](#) [Zdrowych i Pogodnych Świąt Bożego Narodzenia Zapraszamy na wyjątkową edycję Targów PCI Days 2025!](#) [Zawał już dawno przestał być chorobą mężczyzn](#) [Świąteczna apteczka](#) [Radioaktywny pluton się nie ukryje](#) [Złoty Medal Chemii przyznany po raz 14](#)

Partnerzy