

# **Undersøgelse af nukleinsyreomsætning**



## *Kapitel 37*

### **DNase- og RNaseprøver**

Prøver der påviser bakteriers evne til at danne enzymet deoxyribonuklease, som kan spalte polynukleotidet DNA til oligonukleotider.

#### **1. Historisk indledning**

I 1868 isolerede Miescher fra laksesperma nukleinsyre, et dengang fuldstændigt ukendt organisk molekyle (se Miescher 1897). Albert Kossel (1879, 1894) viste, at det indeholdt 4 forskellige organiske baser, en sukkerart og fosforsyre. Det fik han Nobel-prisen for i 1910, og 52 år senere fik Watson, Crick & Wilkins Nobel-prisen for at have opklaret, hvordan disse komponenter er bygget sammen til den berømte dobbeltspiral, som udgør nukleinsyremolekylet (DNA) (Watson & Crick 1953; Wilkins et al. 1953). De 4 baser, adenin, guanin, thymin og cytosin, blev i daglig jargon blandt tyske fysiologiske kemikere før århundredskriftet betegnet som "Xanthinkörper", idet xanthin er mellemprodukt ved nedbrydning af adenin og guanin til urinsyre, og man havde i talrige undersøgelser (fx. Schutzenberger 1874 og Salkowski 1890) over den spontane nedbrydning af plante- og dyrevæv vist, at sådanne "Xanthinkörper" var almindelige blandt nedbrydningsprodukterne. Det tydede på, at der i vævet fandtes særlige enzymer med evne til spaltning af nukleinsyre, men analysen kompliceredes af den samtidige forekomst af proteaser, som man dengang kun vidste lidt om (Araki 1903). Den første adskillelse mellem nuklease- og proteaseaktivitet findes i arbejder fra 1903 af Iwanoff fra det botaniske institut i Leipzig og af Plenge som arbejdede i det fysiologiske institut i Heidelberg hos Kossel. Begge undersøgte mikroorganismers evne til at smelte en nukleinsyregel. Iwanoff undersøgte svampe og Plenge 25 forskellige arter af bakterier, hvoraf nogle smeltede gelen og andre ikke. Plenge antydede, at hans resultater kunne blive af interesse ved inddelingen af bakterierne, og Iwanoff foreslog navnet nuklease for det nukleinsyrespaltende enzym.

I 1928 viste Griffith, at avirulente, ikke-kapselbærende pneumokokker af én bestemt type kunne transformeres til virulente kapselbærende pneumo-

kokker af en anden type. Hvorledes dette kunne gå til, var et spørgsmål, der først flere år senere blev besvaret af Avery og hans medarbejdere fra Rockefeller instituttet i New York. Avery havde i mange år arbejdet med pneumokokker og bl.a. undersøgt den kemiske struktur af nogle kapselantigener. I 1944 isolerede han sammen med MacLeod og McCarty den substans, der var ansvarlig for transformation af pneumokoktyper, og viste, at det drejede sig om deoxyribonukleinsyre (DNA) (Avery et al. 1944). Det viste sig meget vanskeligt at udvinde bare små mængder af DNA fra pneumokokkulturer, og senere fremsatte McCarty & Avery (1946) den antagelse, at pneumokokker ved lysering afgiver DNase, som nedbryder det samtidig frigjorte DNA. McCarty's fortsatte undersøgelser over deoxyribonuklease resulterede i en publikation 2 år senere, hvori han påviste, at 36 stammer af gruppe A hæmolytiske streptokokker under væksten afgav DNase og RNase til den omgivende kulturvæske (McCarty 1948). Et arbejde med de samme resultater blev samme år offentliggjort af Tillet et al. (1948).

Dette blev indledningen til en række bakteriologiske arbejder, der påviste ekstracellulær DNase og/eller RNase hos mange bakterier såvel inden for *Enterobacteriaceae*, clostridier og andre grampositive stave som inden for slægten *Micrococcaceae*.

I de første år efter offentliggørelsen af McCarty's og Tillet et al.'s arbejder var det specielt streptokokkers nukleasedannende evne, der blev undersøgt. Det blev vist, at alle gruppe A samt  $\frac{1}{4}$  af gruppe B streptokokker producerede både DNase og RNase. De fleste stammer fra andre streptokokgrupper dannede ikke nuklease, men undtagelsesvis fandtes enkelte stammer, som producerede DNase (Brown 1950). I 1949 viste McCarty, at streptokok-DNase virkede antigenet ligesom streptokinase og streptolysin, og dette blev senere bekræftet af Wannamaker (1958).

Under arbejdet med at finde DNaser fra forskellige bakterier lykkedes det i 1956 Cunningham et al. at påvise en DNase hos *Staphylococcus aureus*. Den var ret usædvanlig, idet den krævede  $\text{Ca}^{++}$  joner som aktivator i modsætning til de tidligere kendte DNaser, der krævede  $\text{Mg}^{++}$  joner, men det mest bemærkelsesværdige var, at den tålte kogning i 15 minutter uden aktivitetstab. Senere arbejder har vist, at også *S. albus* danner DNase, men at det kun er *S. aureus*, der danner termostabil DNase (Weckman & Catlin 1957; Lachica et al. 1971a, b). Flere forfattere har fundet god overensstemmelse mellem koagulasedannelse og produktion af termostabil DNase og anbefalet at supplere koagulaseprøven med en prøve for termostabil DNase, hvorved koagulase-negative *S. aureus* kan skelnes fra *S. albus* (DiSalvo 1958; Lachica et al. 1969; Dornbusch et al. 1976).

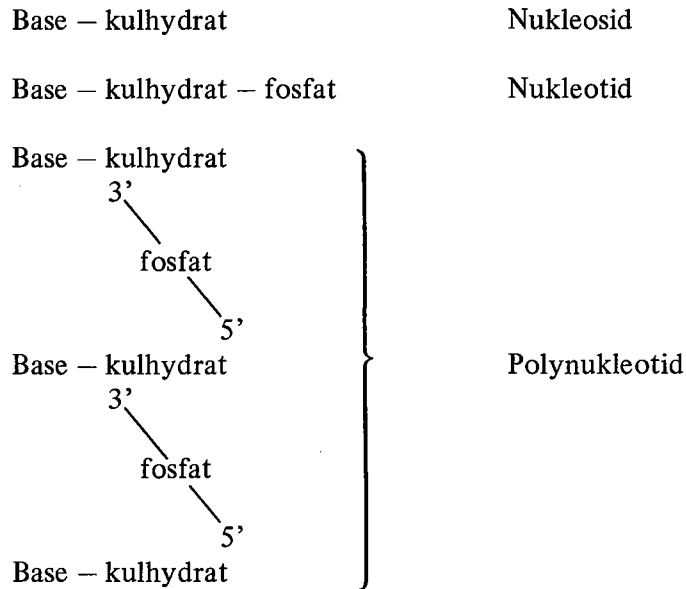
Også inden for enterobakterierne har evnen til at danne DNase vist sig at have en vis taxonomisk betydning. Jeffries et al. (1957) fandt under udarbej-

delsen af den første hurtige plademetode, at *Serratia* danner en ekstracellulær DNase af samme art som streptokoknukleaserne. Senere store undersøgelser af gramnegative stave har bekræftet dette, men har samtidig vist, at nogle stammer af *Alcaligenes*, *Proteus vulgaris*, *Vibrio*, *Aeromonas* og *Pseudomonas aeruginosa* ligeledes danner DNase (Streitfeld et al. 1962; Rothberg & Swartz 1965; Martin & Ewing 1967; Blazevic 1969). Martin & Ewing og Blazevic fandt desuden, at *Enterobacter liquefaciens* danner DNase. Dette i forbindelse med andre iagttagelser har medført, at disse stammer nu henregnes til *Serratia*.

Også grampositive stave er blevet undersøgt. I 1951 blev det vist, at forskellige clostridier producerer DNase (Oakley & Warrack 1951; Warrack et al. 1951) og dette er senere blevet bekræftet (Princewill & Oakley 1972). De russiske forskere Messinova et al. undersøgte i 1963 over hundrede forskellige corynebakterier og fandt, at alle toksindannende *Corynebacterium diphtheriae* producerede DNase, hvorimod ingen af de ikke-toksindannende var i stand dertil. Forfatterne foreslog derfor at anvende DNase-prøven til at bestemme en difteribakteries virulens eller rettere evne til toksindannelse. Det er desuden vist, at *Bacillus subtilis* danner RNase (Lanyi & Lederberg 1966), og at leptospirer producerer DNase (Liven 1975).

## 2. Biokemisk baggrund

Et nukleinsyremolekyle har form som en dobbeltspiral snoet af to lange kæder, der er opbygget af ensartede elementer kaldet nukleotider; det er med andre ord en polynukleotid. Hver nukleotid består af en kvælstofholdig base, en ringformet pentose og en fosfatgruppe. Den del af molekylet, der omfatter basen og pentosen, kaldes en nukleosid. Nukleotiderne holdes sammen i kæder af fosfatgrupperne, som danner esterbindinger med pentoserne på den måde, at der går en binding til kulstofatom nr. 3 i den ene pentose og en anden binding til kulstofatom nr. 5 i den næste pentose i rækken. Der er altså tale om en diesterbinding, hvoraf navnet diesterase for nukleaser er afledet. De to kæder, som udgør spiralen, er indbyrdes bundet sammen ved at baserne i de enkelte nukleotider vender ind mod spiralens centrale akse, hvor de parvis forenes med baserne fra den modstående kæde gennem brintbindinger. Der indgår ialt fire forskellige baser i et nukleinsyremolekyle, som regel adenin og guanin, som er purinbaser, og thymin og cytosin, som er pyrimidinbaser, men i nogle tilfælde findes uracil i stedet for thymin. Pladsforholdene i molekylets indre medfører, at et basepar altid består af en purinbase fra den ene kæde og en pyrimidinbase fra den anden kæde, idet purinbaser rumligt fylder mere end pyrimidinbaser, og desuden at adenin altid parres med thymin og guanin altid med cytosin. De to kæder er således ikke identiske, men udgør



Skema over navnene på de underkomponenter nukleinsyrerne kan opdeles i. To steder er markeret diesterbindinger mellem kulhydratmolekylerne i polynukleotidet.

et komplementært par, dvs. at en bestemt rækkefølge af baserne i den ene kæde modsvares af en bestemt – anden – rækkefølge i den modstående kæde, for at de kan parres sammen på rette måde.

Denne særlige opbygning af nukleinsyremolekylet forklarer, hvordan det er i stand til at fungere som bærer af de arvelige egenskaber. Den ganske bestemte rækkefølge, hvori de fire forskellige baser forekommer i en bestemt bakteriecelles nukleinsyremolekyle, udgør et biokemisk tegnsprog, som nøjagtigt fastlægger alt, hvad der kan og skal foregå i den pågældende celle. En colibakteries nukleinsyremolekyle indeholder ca. 3 millioner basepar i en for colibakterier karakteristisk rækkefølge og kan sammenlignes med en meget lang telegrafstrimmel med morsetegn, der rummer alle de "oplysninger", hele den "plan", der netop gør cellen til en colibakterie. Når en bakterie skal dele sig, begynder dobbeltspiralens to kæder at skilles fra hinanden, og med hver af enkeltkæderne som model eller skabelon dannes ved hjælp af særlige enzymer to nye komplementære kæder, som hver forener sig med en af de gamle enkeltkæder, så man ender med to dobbeltspiraler, en til hver af døtrecellerne. De to nydannede dobbeltspiraler er begge identiske med den oprindelige, da de består af een kæde fra den oprindelige dobbeltspiral og en hertil svarende nydannet komplementær kæde. Døtrecellerne må derfor nødvendigvis blive tro kopier

af modercellen, dvs. de arver alle modercellens egenskaber.

Det har vist sig, at der er to slags nukleinsyremolekyler; i den ene er pentosen desoxyribose og molekylet kaldes desoxyribonukleinsyre eller DNA, i det andet er pentosen ribose og molekylet kaldes ribonukleinsyre eller RNA. I bakterier findes både DNA og RNA. DNA er det ovenfor beskrevne store molekyle, som udgør cellens arvemasse eller dens kromosom, mens RNA er mindre molekyler, som medvirker til at omsætte DNA molekylets biokemiske tegnsprog til faktiske biokemiske processer i cellen.

Nukleaser er fællesbetegnelse for enzymer, der er i stand til at depolymerisere nukleinsyremolekyler, så enten enkelte nukleotider frigøres fra enden af en kæde (exonukleaser) eller en kæde overskæres et eller flere steder, så der frigøres større eller mindre kædestykker = oligonukleotider (endonukleaser). En anden betegnelse for disse enzymer er diesteraser, og der skelnes mellem diesteraser, som spaltes 3-bindingen eller 5-bindingen mellem fosfat og pentose. Endelig kan der skelnes mellem enzymer, som alene spaltes DNA = DNaser eller alene spaltes RNA = RNaser, men der findes også uspecifikke nukleaser, som spaltes både DNA og RNA.

Disse enzymer findes i og kan udvindes af forskellige dyr og planter, og desuden findes de i bakterier. Deres normale funktion er dels at gøre nukleinsyrens bestanddele tilgængelige for andre organismer som led i naturens almindelige omsætningsprocesser, dels har de særlige funktioner i forbindelse med den enkelte celledes interne nukleinsyrestofskifte, måske især ved reparationsprocesser, hvis der opstår fejl ved DNA-kædernes replikation.

De forskellige typer af nukleaser har spillet en vigtig rolle ved arbejdet med at analysere baserækkefølgen i DNA og RNA.

I det følgende skal omtales nogle af de bedst kendte bakterielle nukleaser: *S. aureus*-nukleasen, de 4 nukleaser som streptokokker danner og *Serratia*-nukleasen.

Særlig karakteristisk for nukleasen dannet af *S. aureus* er, at enzymet tåler kogning i 15 minutter. Det er en uspecifik fosfodiesterase, der angriber både DNA og RNA. Det spaltes polynukleotidkæden ved 5'-bindingen og danner derved oligonukleotider med det terminale fosfat fasthæftet ved 3'-positionen. Det angriber fortrinsvis nukleotidkæden ved baserne adenin eller uracil (thymine) (Cunningham 1959). Det er et protein, der består af en enkelt polypeptidkæde, som indeholder 149 aminosyrer. Molekylvægten er ca. 16000. pH-optimum ligger mellem 9 og 10, og temperaturoptimum ved 35°C (Abramson 1972). Enzymet aktiveres af Ca<sup>++</sup>-joner i koncentrationen 0,01 M (Frank et al. 1975).

Erickson & Deibel (1973) har vist, at produktionen af stafylokoknuklease ikke kan foregå under anaerobe forhold, samt at god iltning har en stimule-

rende effekt. Glukose i vækstmediet virker hæmmende, sandsynligvis på grund af syredannelse og derved sænkning af pH til under det optimale.

Streptokokker danner 4 forskellige nukleaser: A og C, der kun kan nedbryde DNA, og B og D, der spalter både DNA og RNA. I modsætning til stafylokok-nukleasen angriber de polynukleotidkæden ved 3'-bindingen, hvilket resulterer i oligonukleotid med terminalt fosfat knyttet til 5'-positionen. Molekylvægten er ca. 25000 til 30000. pH-optimum er for nuklease A og B 8-9, for C 5-6 og for D 6-9 (Gray 1972). Tillet et al. (1948) har vist, at opvarmning ødelægger nukleasen, og at  $Mg^{++}$  joner stimulerer dannelsen. Det er senere vist, at tilstedeværelsen af både  $Mg^{++}$  og  $Ca^{++}$  joner har den største aktiverende virkning, men at mange andre divalente katjoner udøver nogen effekt på enzymaktiviteten (Gray 1972).

Nestle & Roberts (1969a, b) har undersøgt nukleasen fra *Serratia marcescens* og fundet, at det er en uspecifik fosfodiesterase, der kan spalte både enkelt- og dobbeltstrenget DNA og RNA. Produkterne er fortrinsvis di-, tri- og tetranukleotider med terminalt fosfat ved 5'-positionen. pH-optimum ligger mellem 7 og 10, og temperaturoptimum er 30°C. Enzymet kræver  $Mg^{++}$  joner eller  $Mn^{++}$  joner for at virke. Enzymproduktionen stiger under celle-væksten og når et toppunkt lige efter at den stationære fase er indtrådt. Ved opvarmning til 44°C og derover reduceres enzymaktiviteten, således at al aktivitet er væk efter 40 minutters forløb.

Der findes mange metoder til påvisning af nukleaseaktivitet. En metode, der hyppigt anvendes af biokemikere, er at måle ændringen i en DNA-opløsnings lysabsorption ved 260 nm. Denne metode er baseret på, at opløsninger af nukleinsyrer på grund af de parrede purin- og pyrimidinbaser absorberer det ultraviolette lys med absorptionsmaximum ved 260 nm.

De fleste biokemiske metoder er for besværlige i det daglige mikrobiologiske arbejde, så det var et fremskridt, da Jeffries et al. i 1957 beskrev en agar-metode, som kunne bruges i ethvert bakteriologisk laboratorium. Den bygger på, at uspaltet DNA præcipiteres af syre, mens oligonukleotiderne, der fremkommer efter spaltningen, er opløselige i syre. Den kultur, der skal undersøges, stryges ud i en stribe midt på en agarplade, som indeholder DNA. Efter inkubering 1-2 døgn flydes pladen med 1 N HCl, og en positiv reaktion viser sig ved en klar zone omkring kolonierne, mens resten af pladen er uklar.

I 1969 beskrev Schreier en modifikation af denne metode, idet hun satte toluidinblåt til agaren. Dette var allerede tidligere forsøgt af Streitfeld et al. i 1962 ved undersøgelse af DNase-produktion hos pseudomonader. Uspaltet DNA farves blåt med toluidinblåt, hvorimod det spaltede DNA farves meta-kromatisk og giver en lyserød farve. Fordelen ved denne metode er, at inkubationstiden kan forlænges efter behov, og at man kan subkultivere fra pladen



efter at reaktionen er aflæst. En ulempe er, at toluidinblåt hæmmer grampositive bakterier, således at streptokokker og stafylokokker har svært ved at vokse på pladen.

Dette problem blev løst af Lachica og medarbejdere (1971a, b, 1972) ved indførelse af en direkte enzymtest, hvor udstansede huller i toluidinblåt-agaren blev fyldt med kulturen, der skulle undersøges. Denne prøve kan aflæses allerede efter 2–4 timer og har den store fordel, at kulturen kan opvarmes, inden den fyldes i hullet, dvs. at man kan teste for varmemestabil DNase.

En anden metode, med inkorporering af et farvestof i mediet, blev angivet af Smith et al. i 1969. De anvendte metylgrønt på grundlag af Kurnick's observationer (1950), der går ud på, at metylgrønt forbinder sig med uspaltet DNA og danner et grønt kompleks; ved spaltning af DNA afgives metylgrønt igen og bliver farveløst ved den anvendte pH. Dette medium hæmmer ikke grampositive bakterier.

Wolf et al. (1969) har benyttet det farveløse 5-bromo-4-kloro-3-indolylthymidin-3'-fosfat som substrat i stedet for DNA. Ved spaltning frigøres en uopløselig blågrøn indigoforbindelse.

Fluorescensmetoder med acridin-orange-agar er angivet af Lanyi & Lederberg (1966) og Lachica & Deibel (1969).

En hurtig og direkte metode baseret på viskositetsændring af DNA, når det påvirkes af DNase, er i 1976 beskrevet af Greenwood & Pickett.

### 3. Valg af metode

Jeffries' metode har i flere år været anvendt på Serumintituttet. Det er en praktisk og nem metode, men har den væsentlige ulempe, at man ikke kan skelne mellem varmelabile og varmemestabile DNaser. Til dette formål bør man anvende Lachica's direkte enzymmetode, hvor kulturene kan opvarmes, inden de anbringes i hullerne.

### 4. Teknisk udførelse, aflæsning og fortolkning

#### *A. Jeffries' plademethode*

##### *Substrat*

Oksebouillonagar 100 ml

4% DNA-opløsning 5 ml

20 ml ophædles i 9 cm petriskåle, hvis låg er mærket DNA.

*Reagens:* 1N HCl.

*Udførelse:* Pladen tilsås med en enkelt stribe af den pågældende bakterie. Flere bakterier kan undersøges på samme plade. Pladen inkuberes 1–2 døgn ved 35°C, overhældes derefter med 1N HCl og aflæses efter 15–20 minutter.

*Aflæsning og fortolkning:* En positiv prøve viser sig ved, at agaren vedbliver at være klar i en zone omkring kolonierne, mens resten af pladen bliver uklar. Det kan være nødvendigt at skrabe kolonierne væk ved svag DNase-produktion for at kunne se den klare zone.

#### *B. Lachica's direkte enzymmetode*

*Substrat* (Lachica et al. 1971b, 1972)

Trisbuffer (0,05M, pH 9,0)	100 ml
DNA (Difco)	0,03 g
CaCl <sub>2</sub> (0,01M)	0,1 ml
NaCl	1 g
Toluidinblåt (0,1M)	0,3 ml
Agar (Difco granuleret)	1 g

3,0 ml af det smeltede substrat anbringes på flade plastikplader, der måler 2,5 x 7,5 cm, hvilket giver et 1,6 mm tykt lag. Når agaren er stivnet, udstanses huller på 2 mm i diameter. Der er plads til 10 huller på hver plade.

*Udførelse:* Hullerne fyldes med 3 µl kultur fra varmebehandlede (15 minutters kogning) og ikke-varmebehandlede, udvoksede serumbouillon. Pladen inkuberes 2–4 timer ved 35°C.

*Aflæsning og fortolkning:* Udvikling af en lyserød farve omkring et hul betyder produktion af DNase. Størrelsen af den lyserøde zone giver et tilnærmet kvantitativt indtryk af DNase-dannelsen.

#### **5. Sikkerhedsforanstaltninger**

Ingen særlige.

#### **6. Fortegnelse over de vigtigste bakterier med positiv reaktion**

Ved udarbejdelse af listen er hentet oplysninger ikke blot fra Bergey's Manual, men også fra speciallitteraturen.

*Pseudomonas*: de fleste *P. aeruginosa*

*Alcaligenes*: enkelte stammer

*Serratia*: næsten alle stammer

*Proteus*: nogle *P. vulgaris*

*Erwinia uredovora*

*Vibrio*: de fleste stammer (baseret på et enkelt arbejde)

*Aeromonas*: de fleste *A. hydrophila*

*Branhamella catarrhalis*

*Staphylococcus*: de fleste *S. aureus* danner varmemestabil nuklease; nogle stammer af *S. epidermidis* danner varmelabil nuklease.

*Streptococcus*: alle gruppe A streptokokker samt nogle stammer fra andre grupper.

*Bacillus*: *B. subtilis* danner RNase.

*Clostridium*: *Cl. perfringens*, *Cl. septicum* og *Cl. chauvoei*.

*Corynebacterium*: alle toksindannende *C. diphtheriae* (baseret på eet arbejde).

## 7. Diagnostisk værdi og særlige anvendelsesområder

Prøven har fundet størst anvendelse inden for diagnostikken af stafylokokker. Mange forfattere har fundet god korrelation mellem koagulase- og DNase-produktion, og man har benyttet testen til at identificere patogene stafylokokker specielt til at finde de *S. aureus*, som ved mutation er blevet koagulase-negative. Da mange *S. albus* danner nuklease, der er varmelabil, har prøven kun værdi, hvis man samtidig undersøger enzymets varmemestabilitet.

Her ud over kan DNase-prøven være en hjælp ved diagnosticeringen af atypiske *Serratia*-stammer, hvor en positiv DNase-test kan understøtte diagnosen.

Om prøven kan anvendes til at bestemme difteribakteriers evne til toksindannelse, kan ikke siges med sikkerhed, idet kun et enkelt russisk arbejde foreligger. En bekræftelse ville betyde en værdifuld praktisk forenkling af undersøgelsen for difteribakteriers evne til toksindannelse.

## 8. Referencer

- Abramson, C.: Staphylococcal enzymes. In: Cohen, J.O. (ed.): The Staphylococci. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1972, p. 187.
- Araki, T.: Über enzymatische Zersetzung der Nucleinsäure. Z. physiol. Chem. 38: 84, 1903.
- Avery, T.O., MacLeod, C.M. & McCarty, M.: Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III, J. exp. Med. 79: 137, 1944.

- Blazevic, D.J.: Identification of *Serratia* in the diagnostic microbiology laboratory. *Amer. J. clin. Path.* 51: 277, 1969.
- Brown, A.L.: A survey of nuclease production by streptococci. *J. Bact.* 60: 673, 1950.
- Cunningham, L., Catlin, B.W. & Privat de Garilhe, M.: A deoxyribonuclease of *Micrococcus pyogenes*. *J. Amer. chem. Soc.* 78: 4642, 1956.
- Cunningham, L.: Micrococcal nuclease and some products of its action. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 81: 788, 1959.
- DiSalvo, J.W.: Desoxyribonuclease and coagulase activity of micrococci. *Med. Techn. Bull.* 9: 191, 1958.
- Dornbusch, K., Nord, C.-E., Olsson, B. & Wadström, T.: Some properties of coagulase-negative deoxyribonuclease-producing strains of staphylococci from human infections. *Med. Microbiol. Immunol.* 162: 143, 1976.
- Erickson, A. & Deibel, R.H.: Production and heat stability of staphylococcal nuclease. *Appl. Microbiol.* 25: 332, 1973.
- Frank, J.J., Hawk, I.A. & Levy, C.C.: Polyamine activation of staphylococcal nuclease. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* 390: 117, 1975.
- Gray, E.D.: Nucleases of group A streptococci. In: Wannamaker, L.W. & Matsen, J.M. (eds): *Streptococci and Streptococcal Diseases. Recognition, Understanding, and Management.* Acad. Press, New York, 1972, p. 143.
- Greenwood, J.R. & Pickett, M.J.: Deoxyribonuclease: Detection with a three-hour test. *J. clin. Microbiol.* 4: 453, 1976.
- Griffith, F.: The significance of pneumococcal types. *J. Hyg. (Lond.)* 27: 113, 1928.
- Iwanoff, L.: Über die fermentative Zersetzung der Thymonucleinsäure durch Schimmelpilze. *Z. physiol. Chem.* 39: 31, 1903.
- Jeffries, C.D., Holtman, D.F. & Guse, D.G.: Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *J. Bact.* 73: 590, 1957.
- Kossel, A.: Ueber das Nuclein der Hefe. *Z. physiol. Chem.* 4: 290, 1879.
- Kossel, A.: Weitere Beiträge zur Kenntniss der Nucleinsäure. *Arch. f. Anat. u. Physiol. Physiol. Abt.* 1894, p. 194. *Verh. physiol. Ges. Berlin.*
- Kurnich, N.B.: The determination of desoxyribonuclease activity by methyl green; application to serum. *Arch. Biochem.* 29: 41, 1950.
- Lachica, R.V.F. & Deibel, R.H.: Detection of nuclease activity in semisolid and broth cultures. *Appl. Microbiol.* 18: 174, 1969.
- Lachica, R.V.F., Weiss, K.F. & Deibel, R.H.: Relationships among coagulase, enterotoxin, and heat-stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 18: 126, 1969.
- Lachica, R.V.F., Hoeprich, P.D. & Genigeorgis, C.: Nuclease production and lysostaphin susceptibility of *Staphylococcus aureus* and other catalase-positive cocci. *Appl. Microbiol.* 21: 823, 1971a.
- Lachica, R.V.F., Genigeorgis, C. & Hoeprich, P.D.: Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.* 21: 585, 1971b.
- Lachica, R.V.F., Hoeprich, P.D. & Franti, C.E.: Convenient assay for staphylococcal nuclease by the metachromatic well-agar-diffusion technique. *Appl. Microbiol.* 24: 920, 1972.
- Lanyi, J.K. & Lederberg, J.: Fluorescent method for the detection of excreted ribonuclease around bacterial colonies. *J. Bact.* 92: 1469, 1966.
- Liven, E.: Deoxyribonuclease production by leptospire. *Acta vet. scand.* 16: 477, 1975.

- McCarty, M.: The occurrence of nucleases in culture filtrates of group A hemolytic streptococci. *J. exp. Med.* 88: 181, 1948.
- McCarty, M.: The inhibition of streptococcal desoxyribonuclease by rabbit and human antisera. *J. exp. Med.* 90: 543, 1949.
- McCarty, M. & Avery, O.T.: Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. III. An improved method for the isolation of the transforming substance and its application to pneumococcus Types II, III, and IV. *J. exp. Med.* 83: 97, 1946.
- Martin, W.J. & Ewing, W.H.: The desoxyribonuclease test as applied to certain gram-negative bacteria. *Canad. J. Microbiol.* 13: 616, 1967.
- Messinova, O.V., Yusupova, D.V. & Shamsutdinov, N.S.: Desoxyribonuclease activity of *Corynebacterium* and its relation to virulence. *Fed. Proc.* 22: T1033, 1963.
- Miescher, F.: Die histochemische und physiologische Arbeiten. Leipzig 1897.
- Nestle, M. & Roberts, W.K.: An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. I. Purification and some properties of the enzyme. *J. biol. Chem.* 244: 5213, 1969a.
- Nestle, M. & Roberts, W.K.: An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. II. Specificity of the enzyme. *J. biol. Chem.* 244: 5219, 1969b.
- Oakley, C.L. & Warrack, G.H.: The ACRA test as a means of estimating hyaluronidase, desoxyribonuclease and their antibodies. *J. Path. Bact.* 63: 45, 1951.
- Plenge, H.: Über die a-nucleinsaures Natron lösende Wirkung einiger Microorganismen. *Z. physiol. Chem.* 39: 190, 1903.
- Princewill, T.J.T. & Oakley, C.L.: The desoxyribonucleases and hyaluronidases of *Clostridium septicum* and *Cl. chauvoei*. I. An agar plate method for testing for desoxyribonuclease. *Med. Lab. Technol.* 29: 243, 1972.
- Rothberg, N.W. & Sartz, M.N.: Extracellular desoxyribonucleases in members of the family *Enterobacteriaceae*. *J. Bact.* 90: 294, 1965.
- Salkowski, E.: Ueber Autodigestion der Organe. *Z. klin. Med.* 17: 77, Suppl. 1890.
- Schreier, J.B.: Modification of desoxyribonuclease test medium for rapid identification of *Serratia marcescens*. *Amer. J. clin. Path.* 51: 711, 1969.
- Schutzenberger, P.: Faits pour servir a l'histoire de la levûre de bière. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 78: 493, 1874.
- Smith, P.B., Hancock, G.A. & Rhoden, D.L.: Improved medium for detecting desoxyribonuclease-producing bacteria. *Appl. Microbiol.* 18: 991, 1969.
- Streitfeld, M.M., Hoffmann, E.M. & Janklow, H.M.: Evaluation of extracellular desoxyribonuclease activity in *Pseudomonas*. *J. Bact.* 84: 77, 1962.
- Tillett, W.S., Sherry, S. & Christensen, L.R.: Streptococcal desoxyribonuclease: Significance in lysis of purulent exudates and production by strains of hemolytic streptococci. *Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.)* 68: 184, 1948.
- Wanamaker, L.W.: The differentiation of three distinct desoxyribonucleases of group A streptococci. *J. exp. Med.* 107: 797, 1958.
- Warrack, G.H., Bidwell, E. & Oakley, C.L.: The beta-toxin (desoxyribonuclease) of *Cl. septicum*. *J. Path. Bact.* 63: 293, 1951.
- Watson, J.D. & Crick, F.H.C.: A structure for desoxyribose nucleic acid. *Nature (Lond.)* 171: 737, 1953.
- Weckman, B.G. & Catlin, B.W.: Desoxyribonuclease activity of micrococci from clinical sources. *J. Bact.* 73: 747, 1957.

- Wilkins, M.H.F., Stokes, A.R. & Wilson, H.R.: Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature (Lond.)* 171: 738, 1953.
- Wolf, P.L., Horwitz, J., Mandeville, R., Vazquez, J. & von der Muehl, E.: A new and unique method for detecting bacterial deoxyribonuclease in the clinical laboratory. *Amer. J. clin. Path.* 51: 663, 1969.