Zur Hexosamin- und Hexosenbestimmung wurden die Kollagenpräparate mit Alkohol und Äther gewaschen und über Phosphorpentoxyd getrocknet (Stickstoffgehalt 17,5–18%).

Die Hexosaminbestimmung wurde nach ELSON und MORGAN in der von BOAS³⁰ beschriebenen Form durchgeführt. Dabei wurde die Differenz der Extinktionen bei 530 und 600 m μ ausgewertet.

Die Hexosenbestimmung wurde mit der Anthronmethode in der von YEMM und WILLIS³¹ angegebenen Weise durchgeführt. Es wurde die Differenz der Extinktionen bei 625 und 700 m μ ausgewertet.

Zur Herstellung von Desaminokollagen (4 Stdn. bei pH 4) und von Guanidokollagen wurden die kürzlich

von KÜHN, GRASSMANN und HOFMANN²² beschriebenen Methoden benutzt.

Zur Herstellung von Methylkollagen wurde nach einer Methode von BURTON und Mitarbb.³² verfahren. 1 g methanolfeuchtes, lösliches Kollagen wurde eine Woche mit 20 cm³ Methylalkohol und 0,4 cm³ 10-n. HCl behandelt. Beim Waschen mit Methylalkohol quoll das Kollagen stark und ging bei Behandeln mit Wasser bis zu 60% in Lösung.

³⁰ N. F. BOAS, J. biol. Chemistry **204**, 553 [1953].

³¹ E. W. YEMM u. A. J. WILLIS, Biochem. J. **57**, 508 [1954].

³² D. BURTON, J. P. DANBY u. R. L. SYKES, J. Soc. Leather Trades' Chemists **37**, 219 [1953].

Über den Reinheitsgrad der in einem nichtwässrigen spezifischen Gewichtsgradienten gewonnenen Chloroplasten

VON RUDOLF THALACKER und MARTIN BEHRENS

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Justus Liebig-Universität in Gießen

(Z. Naturforschg. **14 b**, 443–446 [1959]; eingegangen am 17. März 1959)

Es wird die Gewinnung von Chloroplasten aus Blättern von *Elodea canadensis* in nichtwässrigem Milieu beschrieben. Die Abtrennung der Chloroplasten von den anderen Zellbestandteilen erfolgt auf Grund des verschiedenen spezifischen Gewichts.

Die isolierten Chloroplasten sind frei von Zellkernen und Zellkernfragmenten; die Menge der als Verunreinigung vorhandenen übrigen Zellbestandteile ist sehr gering und dürfte bei analytischen Untersuchungen keine wesentlichen Fehler verursachen.

Morphologische Zellbestandteile lassen sich in wässrigem und in nichtwässrigem Milieu (Behrens-Methode) präparativ gewinnen. Seither sind aus Pflanzenzellen Zellkerne^{1–6} und Chloroplasten^{7–12} nach beiden Methoden isoliert worden. Die isolierten Zellbestandteile sind häufig verunreinigt, da eine Reindarstellung mitunter sehr schwierig ist. Bis jetzt liegen nur Mitteilungen über die Verunreinigungen von im wässrigen Milieu gewonnenen Chloroplasten vor^{13–16}. Im folgenden wird über die Gewinnung von Chloroplasten in nichtwässrigem Milieu und über deren Reinheit auf Grund mikroskopischer Untersuchungen berichtet. Als Ausgangsmaterial für

die Chloroplastengewinnung wählten wir *Elodea canadensis* RICH. in MICH. Die Isolierung der Chloroplasten wurde mit Hilfe eines nichtwässrigen spezifischen Gewichtsgradienten vorgenommen. Bei diesem Vorgehen werden außer den Chloroplasten noch andere chloroplastenhaltige Fraktionen erhalten. Sie wurden ebenfalls mikroskopisch auf ihre Bestandteile hin untersucht.

Gewinnung der Chloroplasten

Anfangs haben wir das Gradientenverfahren zur Ermittlung des spez. Gewichts der jeweils vorliegenden Chloroplasten herangezogen und deren Abtrennung von

¹ R. FEULGEN, M. BEHRENS u. S. MAHDIHASSAN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **246**, 203 [1937].

² H. STERN u. A. E. MIRSKY, J. gen. Physiol. **36**, 181 [1952].

³ N. M. SSISAKJAN, N. A. WASSILJEWA u. G. I. SPIRIDONOWA, Biochemie **22**, 813 [1957]; ref. im C. **129**, 9239 [1958].

⁴ F. B. JOHNSTON, M. NASATIR u. H. STERN, Plant Physiol. **32**, 124 [1957].

⁵ R. BROWN, Nature [London] **168**, 941 [1951].

⁶ V. M. CUTTER JR., K. S. WILSON u. G. R. DUBÉ, Science [Washington] **115**, 58 [1952].

⁷ T. E. WEIER u. C. R. STOCKING, Bot. Rev. **18**, 14 [1952].

⁸ K. A. CLENDENNING, Ann. Rev. Plant Physiol. **8**, 137 [1957].

⁹ M. BEHRENS, Gewinnung morphologischer Zellen- und Ge-

webebestandteile in nichtwässrigem Milieu, in: Biochemisches Taschenbuch, S. 910. Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer 1956.

¹⁰ M. BEHRENS u. R. THALACKER, Naturwissenschaften **44**, 621 [1957].

¹¹ U. HEBER, Ber. dtsch. bot. Ges. **70**, 371 [1957].

¹² C. R. STOCKING, Plant Physiol. **32**, Suppl. [1957].

¹³ T. E. WEIER u. C. R. STOCKING, Amer. J. Bot. **39**, 720 [1952].

¹⁴ J. H. MCCLENDON, Amer. J. Bot. **39**, 275 [1952].

¹⁵ A. T. JAGENDORF u. S. G. WILDMAN, Plant Physiol. **29**, 270 [1954].

¹⁶ Y. CHIBA u. K. SUGAHARA, Arch. Biochem. Biophysics **71**, 367 [1957].

den übrigen Zellbestandteilen durch Zentrifugieren in Mischungen aus Tetrachlorkohlenstoff und Petroläther mit einem nur wenig leichter und schwereren spez. Gewicht als das der Chloroplasten vorgenommen¹⁷. Inzwischen ist das Gradientenverfahren verbessert worden, so daß wir es nun direkt für die präparative Gewinnung von Chloroplasten heranziehen. Der Arbeitsgang zerfällt in drei Abschnitte:

1. Gefrieretrocknung des Pflanzmaterials. Junge Sproßteile von *Elodea canadensis* werden 48 Std. im Dunkeln gehalten, um den Stärkegehalt der Chloroplasten zu reduzieren. Stärkehaltige Chloroplasten lassen sich infolge des durch den Stärkegehalt bedingten höheren spez. Gewichts weniger gut isolieren. Nach dem Aufbewahren im Dunkeln werden die Sproßspitzen mit den jüngsten Blättern entfernt, weil aus diesen die Chloroplasten schwierig zu gewinnen sind. Anschließend werden die Sproßteile gründlich gewaschen und mit Filtrierpapier abgetrocknet. 50 bis 60 g werden in einem Mullbeutel fest zusammengepackt und in Kohlensäure-Äther oder in Kohlensäure-Petroläther bei ca. -78°C eingefroren. Der durch Ausschleudern von dem anhaftenden Äther bzw. Petroläther weitgehendst befreite Mullbeutel kommt in einen mit einer ausreichenden Menge konz. Schwefelsäure (ca. 800 ml) und wenig Kaliumbichromat (zur Verhinderung einer Reduktion der Schwefelsäure) beschickten Exsikkator. Dieser wird sofort evakuiert. Täglich wird der Exsikkator zweimal nachevakuiert. Um eine Verdünnung der Schwefelsäure an der Oberfläche zu verhindern, wird die Säure durch einen Magnetrührer in Bewegung gehalten. Nach 4 Tagen ist die Trocknung beendet.

2. Anreicherung der Chloroplasten. Die gefrieretrockneten Sproßstücke werden mit 250 ml Petroläther (Siedebereich $60-80^{\circ}\text{C}$) übergossen und im „Starmix“ bei voller Tourenzahl 90 sec zerkleinert. Wegen der geringen Flüssigkeitsmenge und der Feuergefahr benutzen wir an Stelle des normalen Glasbehälters (ca. 1 l Inhalt) ein mit einem passenden Gewinde versehenes geschlossenes Glasgefäß von nur 350 ml Inhalt. Die erhaltene Suspension wird in einen 250 ml fassenden Meßzylinder überführt und 10 Min. stehen gelassen. Dabei setzen sich die groben Partikel (Stengel- und Blattfragmente) ab. Die wegen ihres Luftgehaltes an der Oberfläche schwimmenden Teilchen werden durch Abschöpfen weitgehendst entfernt. Anschließend wird die Suspension 10 Min. bei 2000 g zentrifugiert, wobei alle Teilchen zu Boden gehen. Das Sediment wird in 50 ml Petroläther suspendiert und nach Überführen der Suspension in ein 50 ml fassendes Zentrifugenglas $2\frac{1}{2}$ Min. bei 800 g zentrifugiert. Dabei gehen die Chloroplasten und alle größeren Teilchen zu Boden, während die Teilchen unterhalb der Größenordnung der Chloroplasten im Überstehenden verbleiben und so von den Chloroplasten abgetrennt werden. Das Sediment wird wiederum in 50 ml Petroläther suspendiert und abermals unter den angegebenen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt,

bis das Überstehende nur noch schwach getrübt erscheint. Dies ist meist nach dem 4. oder 5. Zentrifugieren der Fall. Die Überstände werden verworfen. Sie enthalten sehr kleine Teilchen, nur wenige Chloroplasten und einige größere Partikel (Abb. 2 *).

Abb. 1. Gewinnung von Chloroplasten in einem nichtwäßrigen spezifischen Gewichtsgradienten. Links die Zahlen geben das spezifische Gewicht der übereinandergeschichteten Mischungen aus Tetrachlorkohlenstoff und Petroläther an. P = Petroläther, Gew. = Gewebefragmente, F = Fraktion, Chloro. = Chloroplasten.

3. Reinigung der Chloroplasten. Die Chloroplasten enthalten als Verunreinigung noch eine größere Menge unzerstörter Zellen, Gewebsfragmente, Zellmembranen und Zellkerne. Ihre Abtrennung von den Chloroplasten wird folgendermaßen vorgenommen: In einem Zentrifugenglas (Inhalt 50 ml) wird ein spez. Gewichtsgradient hergestellt. Je 10 ml von Tetrachlorkohlenstoff-Petroläther-Mischungen fallender spez. Gewichte (1,40; 1,35; 1,30; 1,25) werden übereinandergeschichtet. Zuerst wird die Mischung mit dem spez. Gewicht von 1,40 zusammen mit einem passenden Korkscheibchen in das Zentrifugenglas gegeben. Die anderen Mischungen werden in der angegebenen Reihenfolge vorsichtig auf das an der Oberfläche schwimmende Korkscheibchen fließen gelassen. Durch dieses Vorgehen wird die Vermischung der einzelnen Flüssigkeiten eingeschränkt. Auf die oberste Flüssigkeitsschicht mit dem spez. Gewicht von 1,25 wird die Hälfte der in 15 ml Petroläther suspendierten angereicherten Chloroplasten gegeben. Nach Entfernen des Korkscheibchens wird 15 Min. bei 2000 g zentrifugiert. Hierbei verteilen sich die in dem Petroläther suspendierten Teilchen nach ihrem spez. Gewicht in dem Gradienten. Man erhält so außer der Chloroplastenfraktion (Fraktion I) noch andere chloroplastenhaltige Fraktionen (II–IV, Abb. 1). Die in der Petrolätherschicht verbleibenden gröberen Partikel sind Gewebsfragmente mit einem spez. Gewicht unter 1,25. Mit der anderen Hälfte der angereicherten

¹⁷ Siehe I. c. ¹⁰.

* Abb. 2—6 s. Tafel S. 442 a u. b.

Chloroplasten-Suspension wird ebenso verfahren. Nach Entfernen der Petrolätherschicht werden die Fraktionen I aus beiden Gradienten abgesaugt und vereinigt*. Zur Verminderung des spez. Gewichts wird die Suspension mit der gleichen Menge Petroläther versetzt und durchmischt. Beim anschließenden Zentrifugieren sedimentieren die Chloroplasten sehr schnell. Sie werden in einem Zentrifugenglas mit Petroläther gewaschen. Nach dem Zentrifugieren wird der überstehende Petroläther abgegossen und die Chloroplasten im Vakuum über konz. Schwefelsäure kurze Zeit getrocknet.

Mikroskopische Untersuchung

Methoden. Zur mikroskopischen Untersuchung wurden die einzelnen Fraktionen aus den beiden spez. Gewichtsgradienten abgesaugt, die gleichen Fraktionen vereinigt und zur Verminderung des spez. Gewichts jeweils auf das Doppelte ihres Volumens mit Petroläther versetzt, so daß beim Zentrifugieren die gesamten suspendierten Teilchen leicht zu Boden gingen. Die Sedimente wurden dreimal mit wenig Petroläther gewaschen und für die Herstellung von Ausstrichpräparaten in folgenden Mengen Petroläther suspendiert: Fraktion I, II und III in je 5 ml, Fraktion IV in 10 ml Petroläther.

Zellkerne wurden mit der Nuklealfärbung von Feulgen oder durch Anfärben mit Toluidinblau nachgewiesen. Für die Nuklealfärbung wurden die Ausstriche nach Verdunsten des Petroläthers 20 Min. in 1-n. HCl bei 60 °C hydrolysiert, in Wasser gewaschen, 2¹/₂ Stdn. in fuchsinschweflige Säure eingelegt, durch die drei SO₂-haltigen Spülbäder gezogen und anschließend kurz in Leitungswasser gewässert. Nach dem Trocknen wurden die Präparate in Glycerin-Gelatine eingebettet. Da die Ausstriche von der Fraktion IV (Zellmembranen) während der Hydrolyse z. T. von den Objektträgern sich lösten, wurde die Nuklealfärbung mit dieser Fraktion in einem Zentrifugenglas vorgenommen. 5 ml von der Petroläther-Suspension wurden zentrifugiert, der überstehende Petroläther entfernt und das Sediment im Vakuum von dem Petroläther vollends befreit. Das Sediment wurde dann zur Hydrolyse 20 Min. mit 1-n. HCl bei 60 °C behandelt, mit Wasser gewaschen, 2¹/₂ Stdn. in fuchsinschweflige Säure belassen, mit den SO₂-haltigen Spülflüssigkeiten gewaschen und nach kurzem Wässern in Leitungswasser in 5 ml dest. Wasser suspendiert. Die von dieser Suspension hergestellten Ausstriche wurden nach dem Trocknen ebenfalls in Glycerin-Gelatine eingebettet.

Die Kernfärbung mit Toluidinblau wurde in der Weise ausgeführt, daß die Ausstriche 30 Min. in einer 1-proz. wäßrigen Lösung des Farbstoffes eingelegt, anschließend gewässert und nach Trocknen in Glycerin-Gelatine eingebettet wurden. Diese einfache und schnell auszuführende Methode erbrachte aber nicht immer den eindeutigen Nachweis von Zellkernen.

Zellmembranen wurden mit Chlorzinkjodlösung, stärkehaltige Chloroplasten mit Jodjodkaliumlösung nachgewiesen. Außerdem wurden von jeder Fraktion

Ausstriche nach Verdunsten des Petroläthers und Einbetten in Glycerin-Gelatine untersucht.

Beschreibung der Fraktionen

Fraktion I (Abb. 3 a und 3 b). Diese Fraktion (Chloroplastenfraktion) bestand aus stärkefreien Chloroplasten, deren spez. Gewicht zwischen 1,25 und 1,30 lag. Sie war sehr rein und praktisch zellkernfrei. Bei der Durchsicht von 5 Ausstrichen (Feulgen-Färbung) fanden sich lediglich 3 Zellkerne. Nur in wenigen Präparaten waren einige größere Partikel zwischen den Chloroplasten zu sehen. Da die Reaktion auf Zellmembranen mit Chlorzinkjodlösung negativ ausfiel, dürfte es sich dabei um Partikel aus Zellplasma gehandelt haben. Als geringe Verunreinigung konnten außerdem in einigen Ausstrichen Partikel unterhalb der Größenordnung der Chloroplasten festgestellt werden.

Fraktion II (Abb. 4). Das spez. Gewicht der Bestandteile dieser Fraktion war kleiner als 1,35 und größer als 1,30. Im wesentlichen bestand die Fraktion aus Chloroplasten, die z. T. stärkehaltig waren. Daneben waren in größerer Menge Partikel von verschiedener Größe vorhanden. Wenige Zellkerne wurden nachgewiesen. Zellmembranfragmente fehlten.

Fraktion III (Abb. 5). Während die Chloroplasten noch den Hauptbestandteil der Fraktion II bildeten, setzte sich diese Fraktion (spez. Gewicht zwischen 1,35 und 1,40) etwa zu gleichen Teilen aus Chloroplasten (überwiegend stärkehaltig) und anderen Zellbestandteilen zusammen. Neben zahlreichen, nicht näher bestimmbaren Teilchen von verschiedener Größe konnten viele Zellkerne und einige Zellmembran-Bruchstücke nachgewiesen werden.

Fraktion IV (Abb. 6). Alle Partikel mit einem spez. Gewicht von mehr als 1,40 befanden sich in dieser Fraktion. Sie bestand überwiegend aus ganzen Blattzellen, Zellbruchstücken und Zellmembran-Fragmenten. Die Menge der frei vorliegenden Chloroplasten (fast nur stärkehaltig) und der Zellkerne war gering. Der größte Teil der Zellkerne und Chloroplasten war noch vom Plasma umgeben.

* Zum Absaugen benutzen wir das von W. BOGUTH entwickelte Mikropipettier-Gerät (W. BOGUTH, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **285**, 93 [1950]).

Ergebnis

Wie die Untersuchungen ergeben haben, lassen sich mit dem geschilderten Verfahren stärkefreie Chloroplasten (Fraktion I) gewinnen. Sie sind praktisch frei von Zellkernen. Die Verunreinigung mit anderen Zellbestandteilen ist so gering, daß sie bei den meisten analytischen Untersuchungen nicht stören dürfte. Stärkehaltige Chloroplasten (Fraktion II und III) haben ein spez. Gewicht, das gleich oder annähernd dem von anderen Zellkomponenten (z. B. Zellkernen) ist. Deshalb lassen sich stärkehaltige Chloroplasten mit der beschriebenen Methode nicht

in einer für analytische Untersuchungen erforderlichen Reinheit isolieren. Um eine gute Ausbeute an Chloroplasten zu erzielen, ist es notwendig, zum Abbau der Chloroplastenstärke das Pflanzenmaterial vor der Gefriertrocknung genügend lange im Dunkeln aufzubewahren.

Da mit organischen Lösungsmitteln gearbeitet wird, haben die isolierten Chloroplasten einen Teil ihrer Lipide verloren. Über die Höhe des Lipidverlustes werden wir demnächst berichten.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ihre Unterstützung.

Gesetzmäßiges Vorkommen cytoplasmatischer Lamellensysteme in Abhängigkeit vom Funktionsrhythmus einer Zelle

Von K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN und V. MOERICKE

Aus dem Zentrallaboratorium für angewandte Übermikroskopie am Zoologischen Institut
und dem Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn
(Z. Naturforsch. 14 b, 446—450 [1959]; eingegangen am 15. April 1959)

In den Deckzellen der Hauptdrüse von Speicheldrüsen der Blattlaus *Myzus persicae* (SULZ.) läßt sich das gesetzmäßige Auftreten und die Rückbildung cytoplasmatischer Doppelmembran-Systeme („flat vesicles“), die im Schrifttum allgemein als Golgi-Apparate bezeichnet werden, in Abhängigkeit vom Funktionsrhythmus der Zellen erkennen. Diese „Doppelmembran-Komplexe“ fehlen während der Bildung der Prosekretgranula (Abb. 2), treten dagegen in Vielzahl und verstärkter Ausprägung in der Zelle auf, wenn nach der Auflösung der Prosekretgranula die gleichzeitig abgebauten cytoplasmatischen Strukturen (Ergastoplasma) sich neu bilden müssen (Abb. 3 und 4). Ist dies geschehen, so erscheinen die Doppelmembran-Komplexe wieder stark reduziert (Abb. 1). Somit stehen diese in fast allen bislang untersuchten Zellen beschriebenen Lamellenkomplexe im vorliegenden Falle offensichtlich in unmittelbarem Zusammenhang mit der *Morphogenese cytoplasmatischer Strukturen*. Die möglichen morphogenetischen Mechanismen im Rahmen des Funktionszyklus dieser Drüsenzellen werden diskutiert.

In den letzten Jahren sind auf Grund elektronenmikroskopischer Untersuchungen sowohl in tierischen^{1,2} als auch in pflanzlichen³⁻⁶ Zellen cytoplasmatische Lamellensysteme beschrieben worden, die auf Grund ihrer eigentümlichen Bauweise von den meisten Autoren homologisiert werden. Es handelt sich um parallel zueinander angeordnete Doppelmembran-Systeme („flat vesicles“), vergesellschaftet mit mehr oder weniger typischen vakuolären Ele-

menten („spheroidal vesicles“). Ihr regelmäßiges Vorkommen in vielen Zellen und ihre prinzipiell übereinstimmende Feinstruktur hat zu der fast allgemein anerkannten Auffassung geführt, daß es sich hierbei um das elektronenmikroskopische Äquivalentbild des lichtmikroskopisch viel diskutierten Golgi-Apparates^{7,8} der tierischen und pflanzlichen Zelle handelt. Im allgemeinen werden die Doppelmembran-Komplexe als die wesentlichen

¹ F. S. SJÖSTRAND u. V. HANZON, *Experientia* [Basel] **10**, 367 [1954].

² A. J. DALTON u. M. D. FELIX, A study of the Golgi substance and ergastoplasm in a series of mammalian cell types, in: *Fine structure of cells*. Internat. Union Biol. Sci. Ser. B, Nr. 21, p. 274, Groningen 1955; A. J. DALTON u. M. D. FELIX, *J. biophysical biochem. Cytol.* **2**, 79 [1956].

³ A. J. HODGE, J. D. METEAU u. F. V. MERCER, *J. biophysical biochem. Cytol.* **2**, 597 [1956].

⁴ E. S. PERNER, *Naturwissenschaften* **44**, 336 [1957].

⁵ P. SITTE, *Protoplasma* **49**, 447 [1958].

⁶ E. HEITZ, *Z. Naturforsch.* **13 b**, 663 [1958].

⁷ G. C. HIRSCH, Form- und Stoffwechsel der Golgi-Körper, *Protoplasma-Monographien* 18. Band, Bornträger Berlin 1939; G. C. HIRSCH, Allgemeine Stoffwechselmorphologie des Cytoplasmas, in: *Handb. d. allg. Pathol.* II, 1, Springer-Verlag, Berlin 1955.

⁸ K. ZEIGER, Morphologie des Cytoplasmas, in: *Handb. d. allg. Pathol.* II, 1, Springer-Verlag, Berlin 1955.