Die Ermittlung von Ribonucleinsäure im Pflanzenmaterial

Von HANS-GEORG FRITZ und BERND RÖTTGER

Aus dem Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen
(Z. Naturforsch. **18 b**, 124—132 [1963]; eingegangen am 17. August 1962)

Zur Ermittlung der RNS in Pflanzenmaterial wurde die Methode von Schmidt-Thannhauser modifiziert, so daß nicht nur die Gesamtmenge an RNS, sondern auch deren Basenzusammensetzung bestimmt werden. Nach Entfernung der säurelöslichen Phosphate, der Lipoide und eines Teils der Farbstoffe wird die RNS in alkalischer Lösung zu Mononucleotiden hydrolysiert und diese durch Säulenchromatographie getrennt. Die Chromatographie wurde zu einer Routine-Methode ausgearbeitet, die ohne kostspielige Apparaturen und mit geringen Mengen an Elutionsmittel durchführbar ist. In verschiedenen Versuchsreihen wurde die optimale Hydrolysezeit mit 1-n. KOH bei 37 °C zu 22 Std. ermittelt. Unter diesen Bedingungen wird nicht nur CMP, sondern auch AMP und UMP teilweise zerstört. Die infolgedessen notwendigen Korrekturfaktoren wurden ermittelt.

Die große Bedeutung der Nucleinsäuren für die Genetik und die Steuerung der Wachstums- und Vermehrungsprozesse erfordert die Ausarbeitung genauer Bestimmungsmethoden. Trotz zahlreicher Untersuchungen, eine der neuesten Zusammenfassungen¹ umfaßt mehr als 400 Zitate, sind die bisherigen Methoden noch nicht in jedem Fall befriedigend. Dies gilt besonders für die Ermittlung der Nucleinsäuren im Pflanzenmaterial, die deshalb bisher wenig untersucht worden sind. Die Schwierigkeiten sind hier besonders groß, da infolge des Reichtums an Kohlenhydraten die üblichen kolorimetrischen Bestimmungen, die auf Reaktionen des Zuckeranteils der Nucleinsäuren beruhen, unsicher werden. Ferner enthalten die Pflanzen eine große Menge stark im UV-Bereich absorbierender Substanzen, so daß auch die spektrophotometrische Bestimmung der Nucleinsäuren gestört wird.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine möglichst genaue und zuverlässige Methode für die Bestimmung der Ribonucleinsäure in Pflanzen auszuarbeiten. Sie sollte dabei so einfach sein, daß sie in jedem normal ausgestatteten biologischen Laboratorium durchgeführt werden kann und auch zur Serienbestimmung an zahlreichen Proben brauchbar ist. Neben der Absolutbestimmung der Ribonucleinsäure (RNS) sollte gleichzeitig das Molverhältnis der vier Mononucleotide erfaßt werden. Da Aussagen über den RNS-Gehalt, bezogen auf Frisch-

bzw. Trockengewicht, nicht wirklich vergleichbar sind, sollte gleichzeitig eine Absolutbestimmung der Desoxyribonucleinsäure (DNS) möglich sein. Man kann annehmen, daß der DNS-Gehalt der Zellzahl annähernd proportional ist, so daß dieser als Bezugssystem für den RNS-Gehalt sinnvoll erscheint. Von den drei Standardmethoden zur Bestimmung von RNS in Gegenwart von DNS ist die nach SCHNEIDER² in unserem Fall für Pflanzenmaterial ungeeignet, da bei diesem Verfahren RNS und DNS nicht getrennt, sondern nebeneinander kolorimetrisch bestimmt werden, was hier aus den oben genannten Gründen nicht möglich ist. Das Verfahren von OGUR-ROSEN³ erwies sich ebenfalls für unsere Zwecke als unbrauchbar, da mit verdünnter HClO₄ in der Kälte die RNS aus dem Blattmaterial nicht herausgelöst werden konnte, ohne daß die DNS ebenfalls angegriffen wurde. Dies steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen anderer Autoren⁴⁻⁷. Andere Extraktionsverfahren, z. B. mit 10-proz. NaCl-Lösung oder mit Phenol¹, waren für quantitative Untersuchungen ebenfalls nicht geeignet, so daß wir uns schließlich zu einer Modifikation der Methode von SCHMIDT-THANNHAUSER⁸ entschlossen. Kritisch ist bei diesem Verfahren die alkalische Hydrolyse des Pflanzenmaterials. Es mußte gezeigt werden, daß die RNS vollständig zu Mononucleotiden hydrolysiert werden kann, ohne daß die Säurefällbarkeit der DNS beeinträchtigt wird. Weiterhin war es notwen-

¹ W. C. HUTCHISON u. H. N. MUNRO, *The Analyst* **86**, 768 [1961].

² W. C. SCHNEIDER, *J. biol. Chemistry* **161**, 293 [1945].

³ M. OGUR u. G. ROSEN, *Arch. Biochem. Biophysics* **25**, 262 [1950].

⁴ H. KERN, *Planta* **55**, 259 [1960].

⁵ J. H. McLENDON, *Amer. J. Bot.* **39**, 275 [1952].

⁶ M. HOLDEN, *Biochem. J.* **51**, 433 [1952].

⁷ P. O. P. Ts'o u. C. S. SATO, *Exp. Cell. Res.* **17**, 227 [1959].

⁸ G. SCHMIDT u. S. H. THANNHAUSER, *J. biol. Chemistry* **161**, 83 [1945].

dig, die Wirkung von Alkali auf die Mononucleotide näher zu untersuchen, denn es ist bekannt, daß durch die Alkalihydrolyse die Cytidylsäure angegriffen wird^{9, 10}.

Für die Bestimmung der Mononucleotide selbst arbeiteten wir, in Anlehnung an bekannte Verfahren, eine einfache säulenchromatographische Trennung aus, da die Papierchromatographie wegen der hohen Blindwerte zu ungenau ist. Um die Brauchbarkeit der Methode zu prüfen, wurde Blattmaterial von verschiedenen Arten der Gattung *Nicotiana* und der Gattung *Epilobium* sowie eine Reihe anderer Testsubstanzen verwendet.

Durchführung der Analyse

Die anschließend beschriebene Methode ist geeignet für die Bestimmung von RNS aus pflanzlichem Material in einem Bereich zwischen 0,1–10 μ Mol/Mononucleotid, d. h. eine Messung erfordert mindestens 0,2–0,5 g Frischgewicht normales Pflanzen- gewebe. Die Mindestmenge ist abhängig von der Art des Pflanzenmaterials, es ist günstig, einer Bestimmung möglichst etwas größere Mengen (1–3 g) zugrunde zu legen.

a) Vorbereitung des Ausgangsmaterials

Nach Entfernung der Mittelrippen werden frisch geerntete Blätter gewaschen, grob zerkleinert, in einem mit einer Kältemischung von Methanol-Trockeneis vorgekühlten Mörser sehr schnell unter Zugabe von Trockeneis eingefroren, zerrieben und lyophilisiert. Das so erhaltene grüne Trockenpulver (GTS) wird fein zermahlen, trocken verschlossen hält es sich bei kühler Lagerung mehrere Wochen. In Anlehnung an die allgemein angewendete Methode zur Extraktion der säurelöslichen Phosphate^{1, 13} werden unter Eisbadkühlung 20 ml eiskalte 0,5-n. HClO_4 /g GTS zugegeben und 10 Min. gerührt. Nach Zentrifugation (5 Min., 2800 U/min, Kühlzentrifuge) wird das Sediment zweimal mit eiskaltem Wasser (je 20 ml/g GTS) gewaschen. Die Lipide und ein großer Teil der Farbstoffe werden zunächst mit kaltem 96-proz. Äthanol (20 ml/g GTS) und anschließend 3–5-mal, bis der Über-

stand klar bleibt, mit Äthanol–Äther [3 : 1 (v/v), 20 ml/g GTS] bei 55–65 °C je 3 Min. extrahiert. Danach wird das Sediment zweimal mit Äther (20 ml/g GTS) gewaschen und nach erneutem Abzentrifugieren im Exsikkator unter Wasserstrahlvakuum getrocknet.

Das weißliche Trockenpulver (WTS) wird fein zermörser und ist, verschlossen aufbewahrt, in der Kühltruhe mehrere Monate haltbar. Bei stark anthocyanhaltigem Material lassen sich diese Farbstoffe durch die Vorbehandlung nur z. T. entfernen, sie beeinflussen jedoch den weiteren Analysengang nicht.

b) Alkalihydrolyse

100 mg Trockenpulver (WTS), entsprechend 0,7 bis 3,5 mg RNS, werden in 10 ml 1-n. KOH bei 37 °C unter ständigem Rühren 22 Std. in einem Meßkölbchen hydrolysiert. Die Reaktion wird durch Abkühlen des Hydrolysats auf 0 °C unterbrochen, und auch alle weiteren Schritte werden bei möglichst tiefer Temperatur, 0–4 °C, ausgeführt. Nach Zugabe eines Tropfens einer 0,1-proz. wäßrigen Phenolrotlösung als Indikator wird mit 70-proz. HClO_4 angesäuert, bis der Farbumschlag eintritt (etwa 0,8 bis 0,9 ml/10 ml). Anschließend wird 3 Min. zentrifugiert (3000 U/min) und das Sediment zweimal mit je 1 ml eiskalter 0,25-n. HClO_4 gewaschen. Das Sediment wird für die weiter unten beschriebene DNS-Bestimmung verwendet. Die vereinigten Überstände werden mit 4-n. KOH neutralisiert (Farbumschlag) und zur besseren Abscheidung des gebildeten KClO_4 10 Min. im Eisbad belassen. Nach Zentrifugierung wird der Überstand auf die Austauschersäulen dekantiert. Der Salzurückstand wird dann nochmals in 2 ml eiskaltem Wasser aufgeschlämmt, abzentrifugiert und der Überstand ebenfalls auf die Säulen gegeben.

c) Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie werden Glasrohre verwendet, die zweckmäßig eine Länge von 30 cm und einen Durchmesser von 1,2 cm, am Auslauf etwas verengt und ausgezogen, besitzen und an den Boden eines 300-cm³-Erlenmeyerkolbens angeschmolzen sind (s. Abb. 1). Als Adsorbens wird

⁹ D. H. MARRIAN, V. L. SPICER, M. E. BALIS u. G. B. BROWN, J. biol. Chemistry **189**, 533 [1951].

¹⁰ J. N. DAVIDSON u. R. M. S. SMELLIE, Biochem. J. **52**, 594 [1952].

¹³ J. LESLIE, in: E. CHARGAFF, J. N. DAVIDSON, The Nucleic Acids II, 1, Academic Press, New York 1955.

Dowex 1×10 , 200 – 400 mesh, in der Formiatform benutzt. Die Harzpräparation und Säulenbergung wird in Anlehnung an das Verfahren von HURLBERT und Mitarbb.¹¹ durchgeführt. Hierzu wird das in

Abb. 1. Glasrohr für Säulentrennung.

der Cl-Form vorliegende Harz in Wasser (50 bis 100 g/l) mehrere Male aufgeschlämmt und die kleinsten Teilchen jeweils nach dem Sedimentieren der mittleren und groben Harzpartikel abdekantiert. Dieser Schritt ist wichtig, da die Durchlaufgeschwindigkeit der Säulen sonst unnötig stark verlangsamt wird. Nachdem das Harz relativ einheitlich sedimentiert, wird es auf einer Glasfritte (z. B. Schott 29D3), oder einer Nutsche, mit 3-m. NH_4 -Formiat gewaschen, bis keine Cl-Ionen in der Waschflüssigkeit auftreten. Anschließend wird mit Wasser nachgewaschen und schließlich das Harz in Wasser aufgeschlämmt. Die dünnflüssige Harzsuspension wird in die unten mit wenig Glaswatte verschlossenen Säulen eingefüllt und die Säulen möglichst einheitlich gegossen. Die Höhe der Harzfüllung beträgt zweckmäßigerweise 20 Zentimeter. Kürzere Säulen verschlechtern den Trenneffekt merklich. Den oberen Abschluß der Harzfüllungen bilden jeweils Wattepfropfen. Vor Gebrauch werden die Säulen mit 200 cm³ einer 1 : 1-Mischung von 6-n. HCOOH und

1-m. NH_4HCOO , dann mit 150 cm³ 88-proz. HCOOH und schließlich mit Wasser gewaschen, bis der Durchlauf neutral reagiert. Für Serienbestimmungen können 20 – 30 Säulen nebeneinander verwendet werden, wobei 1 – 2 Säulen als Kontrolle dienen, die mit denselben Elutionsmitteln, aber nicht mit Substanz beschickt werden.

Auf die so vorbereiteten Säulen werden in der oben angegebenen Weise (s. b) die Überstände der Perchloratfällung gegeben. Zur Trennung der Mononucleotide werden die folgenden Elutionsmittel nacheinander verwandt:

2-mal 10 ml 0,1-n. HCOOH,

6-mal 10 ml 0,4-n. HCOOH,

4-mal 10 ml 2-n. HCOOH,

8-mal 10 ml Elutionsmittel A =

0,6-n. HCOOH + 1,2-m. NH_4HCOO 1:1,

6-mal 10 ml Elutionsmittel B =

3-n. HCOOH + 3-m. NH_4HCOO 1:1.

Es werden jeweils 10 ml auf die Säule gegeben und mit der Zugabe der nächsten Fraktion wird gewartet, bis die erste Fraktion durchgelaufen ist. Man arbeitet ohne zusätzlichen Druck, die Durchlaufgeschwindigkeit ist abhängig von der Präparation des Harzes und dem Gießen der Säulen. Sie sollte möglichst im Bereich 0,15 – 0,5 ml/min liegen. Die Gesamtdauer der Trennung beträgt etwa 15 bis 20 Stunden. Der Trennungsgang kann nach dem Durchlauf einer jeden Fraktion ohne weiteres für einige Zeit (z. B. nachts) unterbrochen werden, doch sollten die Säulen nicht zu lange im stark sauren Milieu belassen werden (2-n. HCOOH). Eine Austrocknung der Säulen ist bei kürzeren Zeiten nicht zu befürchten. Langsam laufende Säulen erzielen gute Trennungen, benötigen aber lange Versuchszeiten, zu schnell laufende Säulen ergeben unscharfe Trennungen.

Die Eluate werden jeweils in 10-ml-Fractionen in Reagenzgläsern aufgefangen, ein automatischer Probenwechsler ist hierbei überflüssig. Nach Beendigung des Versuchs wäscht man das Harz mit etwa 200 cm³ 88-proz. HCOOH und anschließend mit Wasser bis zur neutralen Reaktion. Das Harz kann unmittelbar für neue Versuche verwendet werden, doch ist es zweckmäßig, zur Auflockerung des Harzes die Säulen neu zu gießen.

d) Berechnung der Analysenwerte

In den Eluatn wird die Extinktion einer Probe von jeder 10-ml-Fraktion bei 1 cm Schichtdicke und

¹¹ R. B. HURLBERT, H. SCHMITZ, H. F. BRUMM und V. R. POTTER, J. biol. Chemistry **209**, 23 [1953].

bei 260 und 280 m μ gemessen. Als Vergleichswert dient jeweils die entsprechende Fraktion aus der Kontrollsäule. Die ersten beiden Eluate (0,1-n. HCOOH) werden verworfen, sie enthalten absorbierende Verunreinigungen, Basen und Nucleoside. Bei den nun folgenden Fraktionen werden nur solche berücksichtigt, deren Extinktion über 0,02 liegt.

Als erstes Nucleotid wird Cytidylsäure (CMP, 2' + 3') mit 0,4-n. HCOOH eluiert. Das Verhältnis der Extinktionen 280 m μ /260 m μ für reines CMP beträgt 2,0. Um den Gesamtgehalt an CMP zu erhalten, werden nur solche Fraktionen berücksichtigt, deren Verhältnis 280/260 m μ über 1,5 liegt. Der Gehalt an CMP wird aus der Extinktion bei 260 m μ berechnet. Zweckmäßigerweise addiert man die 260 m μ Extinktionen aller in Frage kommenden Fraktionen zu einer Gesamttextinktion E_{260} CMP. Die Umrechnung in μ Mol bzw. in mg erfolgt dann mit den weiter unten angegebenen Faktoren.

Bei der folgenden Elution mit 2-n. HCOOH können zunächst noch kleine Mengen von CMP erscheinen, was sich in dem 280/260 m μ -Verhältnis bemerkbar macht. Dann tritt Adenylsäure (2' + 3', AMP) auf, deren 280/260 m μ -Verhältnis bei 0,22 liegt. Bei der Addition der Gesamttextinktion der AMP bei 260 m μ werden nur solche Fraktionen berücksichtigt, deren Verhältnis 280/260 m μ unter 0,35 liegt.

Mit dem nun folgenden Elutionsmittel A erhält man zunächst die Uridylsäure (2' + 3', UMP) und danach die ersten Fraktionen der Guanylsäure (2' + 3', GMP). Die 280/260 m μ -Verhältnisse betragen 0,33 bzw. 0,68. Es werden die Fraktionen mit einem Verhältnis 280/260 m μ unter 0,4 zur Gesamt-UMP-Extinktion bei 260 m μ addiert, während die Fraktionen mit 280/260 m μ zwischen 0,41 und 0,7 als GMP addiert werden. Den größten Teil des GMP erhält man mit dem Elutionsmittel B.

Zur Berechnung des Gehalts an den einzelnen Mononucleotiden bzw. der Gesamt-RNA benutzt man die molaren Extinktionskoeffizienten in μ Mol/10 cm³ und Korrekturfaktoren für die Zerstörung der Nucleotide. Für die hier beschriebenen Bedingungen ergeben sich die folgenden Formeln:

$$\mu\text{Mol CMP} = E_{260}\text{CMP} \cdot 1,86$$

$$\mu\text{Mol AMP} = E_{260}\text{AMP} \cdot 0,78$$

$$\mu\text{Mol GMP} = E_{260}\text{GMP} \cdot 0,87$$

$$\mu\text{Mol UMP} = (E_{260}\text{UMP} - 0,22 E_{260}\text{CMP}) \cdot 1,045.$$

Für die Berechnung der Nucleotidreste in der RNS (Mol.-Gew. minus H₂O) in mg bzw. für die Gesamt-

menge der RNS in mg ergeben sich folgende Formeln:

$$\text{mg CMP-Rest} = E_{260}\text{CMP} \cdot 0,568$$

$$\text{mg AMP-Rest} = E_{260}\text{AMP} \cdot 0,257$$

$$\text{mg GMP-Rest} = E_{260}\text{GMP} \cdot 0,300$$

$$\text{mg UMP-Rest} = (E_{260}\text{UMP} - 0,22 E_{260}\text{CMP}) \cdot 0,320$$

$$\text{mg RNS} = \text{Summe.}$$

e) DNS-Bestimmung

Die DNS, als Bezugssystem für die RNS notwendig, wurde kolorimetrisch nach der Methode von BURTON¹² bestimmt. Von 100 mg Trockenpulver (WTS) ausgehend, wird nach Beendigung der Hydrolyse mit Alkali und nach dem Ansäuern des Extrakts mit 70-proz. HClO₄ das Sediment abzentrifugiert und gewaschen. Dieses gewaschene Sediment wird mit 0,5-n. HClO₄, zunächst mit 3 cm³, danach mit 2 cm³, jeweils bei 70 °C für 15 Min. extrahiert. 1–2 ml davon werden mit 2 Volumina Burton-Reagenz versetzt und 16–20 Stdn. bei 30 °C im Thermostaten belassen. Gemessen wird gegen Kontrolle (0,5-n. HClO₄) und Standard-DNS bei 600 m μ . An Hand der mitgeführten Standard-DNS und einer Eichkurve kann die gefundene Extinktion $E_{600 \text{ m}\mu}$ sofort in γ DNS umgerechnet werden.

f) Papierchromatographische Untersuchung der Fraktionen

Bei der Ausarbeitung der Methode wurde jede Fraktion papierchromatographisch auf ihre Zusammensetzung geprüft. Bei schwierigen Trennungen empfiehlt es sich, diese Kontrollen zumindest bei den zweifelhaften Fraktionen ebenfalls durchzuführen. Hierzu werden die Fraktionen nach Messungen der Extinktion im Rotationsverdampfer eingeengt und die Nucleotide papierchromatographisch in einem System getrennt, das aus 65 Volumenteilen Isopropanol, 25 Volumenteilen konz. HCl und 10 Volumenteilen Wasser besteht. Bei absteigender Chromatographie beträgt die Laufzeit etwa 40 Stdn., bei Benützung der Papiere Schleicher-Schüll 2043 b Mg 1 und Macherey und Nagel Nr. 212. Die Kennzeichnung der Nucleotidflecken erfolgt in der üblichen Weise unter einer Quarzlampe mit UG-5-Filter (Schott & Genossen).

Als Bezugssubstanzen wurden Nucleotide, Nucleoside und die entsprechenden Basen der California

¹² K. BURTON, Biochem. J. **62**, 315 [1956].

Corporation of Biochemical Research (Reinheitsgrad A) benützt. Es ist jedoch darauf zu achten, daß diese Substanzen mehrere Prozent Verunreinigungen enthalten können und daher teilweise nochmals chromatographisch gereinigt werden müssen.

Besprechung des Analysengangs

Der Gesamttrennungsgang ist in dem Schema nochmals zusammengefaßt. Die günstigsten Arbeitsbedingungen ergeben sich im Bereich $0,5 - 3 \mu\text{Mol}$ je Mononucleotid, da bei höheren Konzentrationen sich die Banden bei der Säulenchromatographie überschneiden und bei niedrigeren Konzentrationen die Extinktionsmessungen unsicher werden. Die Durchführung des gesamten Trennungsgangs erfordert etwa 3 Tage, wobei allerdings ohne weiteres 20–30 Analysen gleichzeitig durchgeführt werden können. Eine Vereinfachung ist ohne Einbuße an Genauigkeit nicht möglich.

Bei der Vorbereitung des Pflanzenmaterials lehnten wir uns an die in der Literatur angegebenen Verfahren^{1, 13} an. Wichtig ist vor allem, daß ein enzymatischer oder chemischer Abbau der Nucleinsäuren vermieden wird, gleichzeitig aber alle säurelöslichen Phosphate, Phospholipide und stark absorbierenden Substanzen, wie Chlorophyll und andere Farbstoffe, entfernt werden. Die Extraktion der säurelöslichen Phosphate muß unbedingt in der Kälte und sehr schnell durchgeführt werden, da andernfalls die Hydrolyse der RNS und eine Abspaltung der Purinreste an der DNS eintreten können. Unsere Versuche ergaben, daß das anschließende Nachwaschen mit eiskaltem Wasser nicht zu Verlusten an RNS führt. Es ist aber streng darauf zu achten, daß die HClO_4 vollständig aus dem Gewebe-Rückstand entfernt wird, da sonst beim nachfolgenden Erhitzen mit organischen Lösungsmitteln eine Abspaltung der Purine erfolgt, die die spätere Säulenchromatographie stark stört.

Alkalische Hydrolyse

Die alkalische Hydrolyse ist der kritische Punkt des Trennungsgangs, und die von den verschiedenen Autoren angegebenen Bedingungen unterscheiden sich stark. Deshalb wurden die Bedingungen hierfür besonders sorgfältig geprüft. In den einzelnen Versuchsreihen wurde die Alkalikonzentration zwischen $0,2 - 2\text{-}n.$ KOH und die Temperatur zwischen 20 und 50°C variiert. Das Problem besteht darin, eine vollständige Hydrolyse der in dem Pflan-

zenmaterial vorhandenen RNS zu Mononucleotiden unter möglichst schonenden Bedingungen zu erreichen, ohne daß die DNS hierbei säurelöslich wird.

Wir prüften zunächst die Zersetzungsgeschwindigkeit jedes der vier Mononucleotide bei 37°C und bei 50°C mit $1\text{-}n.$ KOH, wobei der Verlust an Mononucleotiden durch Säulenchromatographie, aber auch papierchromatographisch ermittelt wurde. Abb. 2 zeigt die bei 37°C erhaltenen Ergebnisse.

Abb. 2. Einwirkung von $1\text{-}n.$ KOH auf $10^{-3}\text{-}m.$ Mononucleotide bei 37°C : 1 = CMP-Totalverlust, 2 = CMP-Verlust durch Desaminierung zu UMP, 3 = AMP-Verlust, 4 = UMP-Verlust.

Erwartungsgemäß ist die Zersetzung bei CMP am stärksten. Überraschenderweise werden jedoch AMP und in geringerem Maße UMP, die bisher als stabil galten, ebenfalls zersetzt. Nur bei GMP wurde unter den angegebenen Bedingungen kein Verlust beobachtet. Kurve 2 zeigt, daß nur ein Teil des verlorengegangenen CMP zu UMP desaminiert wird, während der übrige Teil auf eine unbekannte Weise verändert wird. Wegen des Verlusts der Extinktion bei $260\text{ m}\mu$ ist eine Aufspaltung des Pyrimidinrestes wahrscheinlich. Die Ursache für die Zerstörung der AMP und UMP ist ebenfalls unbekannt. Bei der Suche nach Zersetzungsprodukten der AMP konnten nach sehr langen Hydrolysezeiten geringe Spuren einer Substanz gefunden werden, die sich papierchromatographisch und uv-spektrometrisch wie Inosinsäure verhält. Nur durch Desaminierung läßt sich also der Verlust an AMP kaum erklären. Da bei allen AMP-Fractionen ein Extinktionsverlust im gesamten Meßbereich von $205 - 305\text{ m}\mu$ auftritt, wird auf eine teilweise Zersetzung des Purinskeletts geschlossen. Die Zersetzung von CMP, AMP und UMP folgt bei 37°C annähernd einer Reaktion erster Ordnung, so daß es einfach ist, aus der Abb. 2 die

Verluste auch für andere Hydrolysezeiten zu entnehmen.

Bei 50 °C (Abb. 3) steigt die Zersetzungsgeschwindigkeit bei allen Nucleotiden an, nur GMP bleibt auch hier stabil. Überraschenderweise ist die Zersetzung jedoch bei AMP ungewöhnlich hoch und

Abb. 3. Einwirkung von 1-n. KOH auf 10^{-3} -m. Mononucleotide bei 50 °C: 1 = CMP-Totalverlust, 2 = CMP-Verlust durch Desaminierung, 3 = AMP-Verlust, 4 = UMP-Verlust.

läßt sich nicht mehr durch eine Reaktion erster Ordnung beschreiben. Wegen dieser unübersichtlichen Verhältnisse ist die Anwendung höherer Hydrolysentemperaturen nicht zu empfehlen.

Anschließend wurde untersucht, mit welcher Geschwindigkeit die Mononucleotide aus den Ribonucleinsäuren in Freiheit gesetzt werden. Hierzu wurden sowohl mit reiner Hefe-RNS als auch mit dem RNS-haltigen Blattmaterial von *Nicotiana tabacum* (Samsun) und *Epilobium parviflorum* Hydrolyse-Versuche unternommen. Zu verschiedenen Versuchszeiten wurden Proben entnommen und die jeweils vorhandenen Mengen an Mononucleotiden durch Säulenchromatographie getrennt. Es ergab sich in allen Fällen ein gleichartiger Verlauf, so daß wir uns auf die Wiedergabe je eines Versuchsbeispiels für Hefe-RNS und Blattmaterial von Tabak beschränken können. Der Übersichtlichkeit halber ist der Verlauf für jedes Mononucleotid in den Abb. 4 a – 4 d wiedergegeben. In allen Fällen steigt

Abb. 4 a.

Abb. 4 b.

Abb. 4 c.

Abb. 4 d.

Abb. 4. Hydrolyse von Hefe-RNS (2 mg/10 cm³) und Tabakblattmaterial (100 mg Trockensubstanz/10 cm³) in 1-n. KOH bei 37 °C: a) CMP-Konzentration im Hydrolysat 1 = CMP aus Hefe gemessen, 2 = CMP aus Hefe berechnet (gemessen + Verlust), 3 = CMP aus Tabak gemessen, 4 = CMP aus Tabak berechnet (gemessen + Verlust). b) AMP-Konzentration im Hydrolysat 1 = AMP aus Hefe gemessen, 2 = AMP aus Hefe berechnet (gemessen + Verlust), 3 = AMP aus Tabak gemessen, 4 = AMP aus Tabak berechnet (gemessen + Verlust). c) GMP-Konzentration im Hydrolysat 1 = GMP aus Hefe gemessen, 2 = GMP aus Tabak gemessen. d) UMP-Konzentration im Hydrolysat 1 = UMP aus Hefe gemessen, 2 = UMP aus Hefe berechnet (gemessen + Verlust minus UMP aus CMP), 3 = UMP aus Tabak gemessen, 4 = UMP aus Tabak berechnet (gemessen + Verlust minus UMP aus CMP).

die Menge an Nucleotiden in den ersten 3 – 4 Stdn. stark an. Während dieser Zeit sind chromatogra-

phisch auch Oligonucleotide nachweisbar. Bei AMP (Abb. 4 b) und CMP (Abb. 4 a) erreicht die Kurve ein flaches Maximum, um dann infolge Zersetzung der Mononucleotide wieder abzusinken. Addiert man zu der experimentell gefundenen Menge von CMP und AMP jeweils ihre Verluste (entsprechend Abb. 2), so erhält man ab 22 Stdn. einen konstanten Wert, d. h. daß nunmehr kein weiteres Mononucleotid mehr freigesetzt wird und die Hydrolyse beendet ist. Bei GMP (Abb. 4 c) ergibt sich ohne Korrektur der Endpunkt der Hydrolyse ebenfalls nach 22 Stunden. Die Menge an UMP (Abb. 4 d) im Hydrolysat steigt nach 22 Stdn. noch weiter an, da das aus CMP neu gebildete UMP den Verlust übertrifft. Addiert man einerseits den Verlust und subtrahiert andererseits das aus CMP entstandene UMP unter Benützung der Kurven 2 und 4 der Abb. 2, so erhält man ebenfalls nach 22 Stdn. einen konstanten Wert.

Diese Versuchsserie zeigt also, daß die an den reinen Mononucleotiden gemessene Zerstörung in gleicher Weise auch bei der Hydrolyse von RNS in Gegenwart größerer Mengen von Proteinen und anderen Verunreinigungen auftritt. Um die hierfür notwendigen Korrekturen auf ein Minimum zu beschränken, sollte man daher die Hydrolyse nicht über 22 Stdn. hinaus durchführen. Bei niedrigeren KOH-Konzentrationen oder bei tieferen Temperaturen werden die Mononucleotide langsamer zersetzt, allerdings ergeben sich sehr lange Hydrolysenzeiten (z. B. bei 0,2-n. KOH mehr als 40 Stdn.). Diese langen Versuchszeiten sind für den Routine-Betrieb sehr unbequem. Eine Erhöhung der KOH-Konzentration etwa auf 2-n. oder eine Steigerung der Temperatur bis 50 °C setzt zwar die Hydrolysendauer

herab, aber die Zersetzung der Mononucleotide wird dann unübersichtlich.

In der Literatur¹ wird weiterhin darauf hingewiesen, daß bei höherer Temperatur die DNS säurelöslich wird. Wir überzeugten uns durch entsprechende Kontrollversuche, daß dies unter den von uns angegebenen Bedingungen bei 37 °C nicht der Fall ist. Zur Kontrolle, ob mit unseren Hydrolyse-Bedingungen wirklich die Gesamt-RNS erfaßt wird, extrahierten wir nach der Säurefällung den Rückstand der alkalischen Hydrolyse mit 0,5-n. HClO₄ (2-mal je 15 Min.) bei 70 °C. Die kolorimetrische Prüfung mit Orcin¹⁴ fiel jedoch negativ aus.

Säulentrennung

Die Trennung von Mononucleotiden mit Hilfe von Austauscherharzen hat sich vielfach bewährt, doch mußte die Methode den besonderen Bedingungen der Pflanzenanalyse angepaßt werden. Als Austauscherharz benützten wir Dowex 1 × 10 und prüften die Elutionsmittel Ameisensäure und Formiat in verschiedenen Konzentrationen. Mit Ammoniumformiat war die Trennung in die beiden Gruppen der Pyrimidin- und Purin-Nucleotide gut, innerhalb dieser Gruppen aber unbefriedigend. Mit reiner Ameisensäure verschiedener Konzentrationen war die Trennung aller 4 Nucleotide voneinander gut, wie dies aus Abb. 5 hervorgeht, doch waren die Werte für die einzelnen Nucleotide schwer reproduzierbar. Bei diesem Verfahren muß bis zu 6-n. HCOOH benützt werden, und bei diesen hohen Konzentrationen macht sich deren Eigenextinktion bei 260 m μ störend bemerkbar. Außerdem kann es durch die hohe Säurekonzentration schon zur Abspaltung von Purinen kommen.

Abb. 5. Trennung eines Hydrolysats aus Tabakblättern an Dowex 1 × 10 mit steigenden Konzentrationen von Ameisensäure (50 mg WTS/10 ml 1-n. KOH, 22 Stdn. bei 37 °C).

¹⁴ G. CERIOTTI, J. biol. Chemistry **214**, 59 [1955].

Abb. 6. Trennung eines Hydrolysats aus Tabakblättern an Dowex 1 $\times$ 10 mit Mischungen aus HCOOH und NH_4HCOO wie im Analysengang vorgeschlagen (50 mg WTS/10 ml, 1-n. KOH, 22 Std. bei 37 °C), schraffierte Flächen: Mononucleotide, weiße Flächen: absorbierende Begleitstoffe.

Wir arbeiteten daher ein Elutionsverfahren aus, bei dem die HCOOH-Konzentration nicht über 2-n. steigt, wodurch extrem niedrigere p_{H} -Werte vermieden werden. NH_4HCOO zeigt im Meßbereich keine Eigenabsorption und das Lösungsmittel läßt sich im Wasserstrahlvakuum leicht entfernen, wodurch die papierchromatographische Prüfung jeder einzelnen Fraktion möglich ist. Mit diesen Elutionsmitteln wird bereits mit einer 12 cm langen Säule eine gute Trennung erzielt, doch verwendet man zweckmäßigerweise 20 cm lange Säulen.

Wie aus Abb. 6 hervorgeht, sinkt die Extinktion zwischen den Hauptfraktionen praktisch auf Null außer zwischen UMP und GMP. Auf Grund der verschiedenen Extinktionsverhältnisse 280/260 $m\mu$ können die Fraktionen bestimmten Nucleotiden zugeordnet werden. Schwierigkeiten ergeben sich nur bei CMP, die als erste Fraktion erscheint. Hier können je nach Pflanzenart geringe Mengen an absorbierendem Material vorkommen, außerdem tritt hier das Guanin auf, das aus den Nucleinsäuren während der Analyse abgespalten wird. In Abb. 6 ist der Anteil an CMP in diesen Vorläufen eingezeichnet. Man sieht, daß der Fehler, der durch die Vernachlässigung der Fraktionen mit 280/260 $m\mu$ < 1,5 entsteht,

nicht allzu groß ist. Falls bei einer Analyse höhere E_{260} -Werte in diesen Fraktionen auftreten, deren Extinktionsverhältnis nicht den angegebenen Werten entspricht, ist eine papierchromatographische Nachprüfung zu empfehlen *. Um größere Genauigkeit zu erreichen, kann bei diesen Vorfraktionen aus dem Verhältnis E_{280}/E_{260} die Menge an Guanin und CMP berechnet und bei dem Gesamtwert berücksichtigt werden.

Fehlerdiskussion

Die für die Berechnung der Analysendaten zugrunde gelegten molaren Extinktionskoeffizienten, ferner die Verhältnisse der Extinktionen 280/260 $m\mu$ sind aus Tab. 1 zu entnehmen. Ferner enthält die Tabelle die Korrekturfaktoren, die sich infolge Verlusten bzw. Transformation von CMP zu UMP bei 22-stdg. Hydrolyse ergeben.

Mit der hier beschriebenen Methode wurden annähernd 100 Analysen, hauptsächlich an Tabak und an *Epilobium* durchgeführt. Über das Ergebnis dieser Untersuchungen wird in anderem Zusammenhang berichtet werden. Um die Genauigkeit der Methode zu prüfen, wurden einzelne Bestimmungen 6–8-mal wiederholt. Bei der statistischen Auswer-

Nucleotid	pH	$E_{280m\mu}/E_{260m\mu}^{15}$	E je $\mu\text{Mol}/10$ ml bei 260 $m\mu$	Verlust V in Mol-Proz.	$100/(100-V)E$
GMP	3–7	0,68	1,16	0	0,87
UMP	1–6	0,33	0,99	3,3	1,045
AMP	1–2	0,22	1,43	11,1	0,78
CMP ¹	1–2	2,0	0,67	20,4	1,86
CMP ²	1–2	2,0	0,67	11,8	

Tab. 1. Extinktionen der Mononucleotide und Verluste bei 22 Std. Hydrolyse in 1-n. KOH bei 37 °C. ¹ Totalverlust. ² Mol-Prozent CMP, die in UMP umgewandelt werden. Die Menge an UMP aus CMP ergibt sich zu $1,86 \cdot 0,118 \cdot E_{\text{CMP}}$.

¹⁵ K. BURTON, Data for Biochem. Research, The Clarendon Press, Oxford 1959.

* So konnten z. B. bei *Epilobium* bis zu 5% anormale Nucleotide, bezogen auf die Gesamt-RNS, nachgewiesen werden.

Schema des Trennungsgangs

tung dieses Materials ergab sich für die Einzelbestimmung ein mittlerer Fehler von ± 5 Prozent. In Anbetracht der zahlreichen Operationen, die durchzuführen sind, darf das als befriedigend betrachtet werden.

Herrn Prof. Dr. G. SCHRAMM danken wir für die Unterstützung der Arbeit und für wertvolle Diskussion, Herrn W. VÖTSCH für sorgfältige technische Mitarbeit.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem US Public Health Service für finanzielle Unterstützung.