

ersten Schockreaktion erholen sie sich und zeigen bis zum 5.–7. Tag nach Bestrahlung keine Änderung im Gehaben, ausser einer gewissen Indifferenz gegenüber der Umgebung. Dann treten äusserlich erkennbare Schädigungszeichen auf: Mattigkeit, Gewichtsverlust, struppiges Fell und Diarrhöe. Der Strahlentod scheint für beide Strahlenarten gleich zu verlaufen. Wird die kritische Zeit von 7 bis 23 Tagen überstanden, scheinen die Tiere normal weiterzuleben, jedoch ohne viel an Gewicht zuzunehmen (keine weiteren Todesfälle 6 Monate nach Betatronbestrahlung und 3 Monate nach 180 keV). Bei den Überlebenden tritt nach beiden Bestrahlungen (180 keV und 31 MeV) eine Ergrauung des schwarzen Fells ein, die arealweise einsetzt und nach 1–2 Monaten auf den ganzen Körper übergreift.

**Diskussion.** Im Gegensatz zu den Versuchen von JOYET<sup>1</sup> (Vergleich 400 keV und 31 MeV) konnten wir eine schwächere Wirksamkeit der gleichen mit Victoreenkammer gemessenen Dosisseinheit in r bei 31-MeV-Strahlen gegenüber 180-keV-Strahlen feststellen. JOYET benützte allerdings höhere r-Dosen, die nach unserer Ansicht einen gewissen Schwellenwert überschritten haben und für vergleichende Betrachtungen nicht tunlich sind. Bei steigender Dosis verläuft die Dosiseffekt-kurve zusehends flacher, und eine Erhöhung der Dosis von 1700 auf 2500 r scheint auf den Eintritt des Todes keine zusätzliche Wirkung mehr auszuüben. Mit der Dosis von 800 r in unsern Versuchen haben wir wahrscheinlich den Schwellenwert beinahe erreicht, und bereits vorgenommene Experimente mit niedrigeren Dosen zeigen an, dass sich der Unterschied im biologischen Effekt der ultraharten und der 180-keV-Strahlen mit abnehmender Dosis zusehends verschärft.

Die Feststellung einer geringern biologischen Wirksamkeit des Betatrons deckt sich mit den Resultaten, die wir aus Experimenten zur Feststellung der Mitosenrate der Wurzelspitze von *Vicia faba*, der Mutationsrate bei *Drosophila*, der Mitosenrate des Ehrlich-Karzinoms der weissen Maus, der Letalität von 4-h- und 7-h-Eiern von *Drosophila* (FRITZ-NIGGLI<sup>2</sup>) und einer Phänokopie bei *Drosophila* (FRITZ-NIGGLI<sup>3</sup>) gewonnen haben. Ebenso stimmen sie mit den Versuchen von QUASTLER<sup>4</sup>, der mit 20 MeV und 200 keV Mäuse bestrahlte, überein (Dosis 700–2000 r).

Eine Ursache dieser unterschiedlichen Wirkung kann die eventuell nicht wirklichkeitsgerechte Messung der ultraharten Strahlen mit Luftionisationskammern sein. Gleichzeitig muss aber auch die Art des Strahlentodes diskutiert werden, die bei verschiedenen Dosen unterschiedlich ist. Anscheinend wirken die ersten Schädigungen der sogenannten Initialperiode (siehe Zusammenstellung CURTIS<sup>5</sup>), wie Zirkulationsstörungen, erhöhte Permeabilität und Fragilität der Gewebe, zelluläre Zerstörungen, Lymphopenie und gastrointestinale Beschwerden durch Bestrahlungsdosen unter einem Schwellenwert von 850 r bis 900 r nicht unmittelbar tödlich. Der Tod, der erst einige Tage später einsetzt und dem hohes Fieber und schneller Puls vorangehen, wird wahrscheinlich durch eine allgemeine Infektion und Toxaemie verursacht. Bei höheren Dosen hingegen müssen bereits die primären Störungen zum Tode führen.

Ob eine unterschiedliche Dosis Betatron- und 180-keV-Strahlen in den einzelnen Organen der Maus von Bedeutung ist, kann vor einer eingehenden Analyse des inneren Dosismusters einer totalbestrahlten Maus nicht abgeklärt werden. Vor diesen Untersuchungen und vor allem vor einem eingehenden qualitativen Studium des Strahlentods der Maus können wir der Tatsache der geringeren Wirksamkeit der Betatronstrahlen keine Erklärung beifügen.

HEDI FRITZ-NIGGLI

*Strahlenbiologisches Laboratorium des Röntgeninstituts der Universität Zürich, den 18. Januar 1954.*

### Summary

Mice were subjected to irradiation of the whole body with a homogeneous dose of 31 MeV and 180 keV roentgen rays. A quantitative evaluation of effectiveness was obtained, using the survival time of mice (between irradiation and death). The 180 keV rays were more effective than the 31 MeV rays.

## Über die quantitative Bindung von Ribonukleinsäure mit Gallozyaninchromalaun<sup>1</sup>

Den spezifischen und quantitativen färbereischen Nachweismethoden beider Nukleinsäuren (NS.) hat man seit den grundlegenden ultraviolett-mikroskopischen Untersuchungen von CASPERSSON<sup>2</sup> und seinen Mitarbeitern erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt. Während eine Differentialfärbung der Nukleinsäuren mit der Methylgrünpyroninfärbung und der Fermentbehandlung (BRACHET<sup>3</sup>) heute keine Schwierigkeiten mehr bietet, ist eine quantitative und spezifische Färbung der NS. immer noch ein schwieriges Problem. Der quantitative und qualitative Wert der Feulgen-Reaktion und Methylgrünfärbung (KURNICK<sup>4</sup>) für Desoxyribonukleinsäure ist nicht unbestritten geblieben (siehe SANDRITTER<sup>5</sup>). Für viele basische Farbstoffe wurde eine quantitative Verbindung mit NS. vermutet (MICHAELIS<sup>6</sup>, KELLEY<sup>7</sup>). Aber lediglich HERRMANN<sup>8</sup> et al. haben in jüngster Zeit für Toluidinblau die stöchiometrische Verbindung mit Ribonukleinsäure (RNS) nachweisen können.

Wir haben in früheren Untersuchungen<sup>9</sup> den Farbstoff Gallozyaninchromalaun (GC.), dessen progressiver Färbungscharakter erhebliche Vorteile bietet, für quantitative Untersuchungen benutzt. EINARSON<sup>10</sup> hat in ausgedehnten Untersuchungen den hohen qualitativen und quantitativen Wert dieser Färbung für beide NS. wahrscheinlich machen können, jedoch nicht den exakten Beweis geliefert.

<sup>1</sup> Ausgeführt mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

<sup>2</sup> T. CASPERSSON, *Cell Growth and Cell Function* (W. W. Norton, New York 1950).

<sup>3</sup> J. BRACHET, C. r. Soc. Biol. (Paris) 133, 88 (1940); Arch. Biol. 53, 207 (1941).

<sup>4</sup> N. B. KURNICK und A. E. MIRSKY, J. gen. Physiol. 33, 265 (1950).

<sup>5</sup> W. SANDRITTER, Z. Wiss. Mikr. (im Druck).

<sup>6</sup> L. MICHAELIS, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 12, 131 (1947).

<sup>7</sup> E. G. KELLEY, J. Biol. Chem. 127, 55 und 73 (1939).

<sup>8</sup> H. HERRMANN, J. S. NICHOLAS und J. K. BORICIOUS, J. Biol. Chem. 184, 321 (1950).

<sup>9</sup> W. SANDRITTER, Frankf. Z. Path. 63, 387 (1952); Z. Wiss. Mikr. 61, 30 (1952).

<sup>10</sup> L. EINARSON, Acta Path. Scand. 28, 82 (1951).

<sup>1</sup> G. JOYET, W. MAUDERLI und E. ROESCH, Brown-Boveri-Mitt., Sonderheft 1953, S. 56.

<sup>2</sup> H. FRITZ-NIGGLI, Brown-Boveri-Mitt., Sonderheft 1953, S. 60; Fortschr. Geb. Röntgenstr. 80, 28 (1954).

<sup>3</sup> H. FRITZ-NIGGLI, Schweiz. med. Wschr. 81, 1218 (1951).

<sup>4</sup> H. QUASTLER, Amcr. J. Roentgenol. 54, 723 (1945).

<sup>5</sup> H. J. CURTIS, *Advances in Biological and Medical Physics II* (Academic Press Inc., New York 1951), S. 1.

Wir stellten es uns zur Aufgabe, die stöchiometrische Verbindung von GC. mit NS. zunächst *in vitro* nachzuweisen. Zu den Versuchen wurde RNS. der Firma Böhringer verwendet. Es handelt sich um ein grauweisses Pulver mit einem Phosphorgehalt von 7,58 %. Papierchromatographisch liessen sich im HCl-Hydrolysat keine Aminosäuren nachweisen.

Zum Nachweis der quantitativen Bindung zwischen GC. und RNS. wählten wir verschiedene Wege.

1. *Filtrierpapiermethode mit Extraktion des Farbstoffes.* Als Stammlösung diente eine 5%ige Lösung von RNS. in 1 m Natriumazetat. Fallende Konzentrationen (5–0,25 %) wurden in Tropfen von je 0,1 ml auf Filtrierpapierstreifen (Schleicher und Schüll, Selekt 2043 b) von  $8 \times 2$  cm Grösse aufpipettiert. Die Papierstreifen wurden bei Zimmertemperatur getrocknet und anschliessend in Färbeküvetten 48 h mit GC. gefärbt. Die Farblösung wurde nach EINARSON hergestellt (pH 1,64). RNS. ist in der Farbstofflösung nicht löslich. Nach der Färbung wurden die Papierstreifen 72 h in grösseren Mengen öfters gewechselten A. dest. gewässert. Ein Kontrollstreifen wurde jeweils mitgeführt. Anschliessend wurden die Papierstreifen einzeln in je 20 ml 1/10 nHCl eingelegt und nach 48 h die ausgezogene Farbe durch eine Glasfritte IGI Schott filtriert. Die im Papier verbliebenen Farbstoffreste wurden durch Erhitzen in 1/10 nHCl extrahiert. Die Lösungen wurden auf 30 cm<sup>3</sup> aufgefüllt und im Pulfrich-Photometer bei 570 m $\mu$  Wellenlänge die Extinktion bestimmt. In früheren Untersuchungen hatten wir das Absorptionsmaximum des Farbstoffes festgelegt<sup>1</sup>. Als Leerwert wurde die aus den leeren Papierstreifen gewonnene Farblösung benutzt. Die unspezifische Anfärbung des Filtrierpapiers ist nur sehr gering.

2. *Filtrierpapiermethode mit direkter Tropfenphotometrie.* Die Menge des gebundenen Farbstoffes kann wesentlich einfacher durch direkte Photometrie der gefärbten Tropfen bestimmt werden. Die Papierstreifen wurden wie oben mit 0,01 ml RNS. beschickt und gefärbt. Das Filtrierpapier wurde mit einer Mischung aus Paraffinöl und  $\alpha$ -Bromnaphthalin aufgehellt. Die Durchlässigkeit der Farbflecke wurde in unserem Ultraviolett-mikrospektrographen bestimmt. Als Beleuchtung diente statt der Quecksilberhochdruckdampfampe eine Niedervoltlampe mit vorgeschaltetem Schottfilter (570 m $\mu$  Wellenlänge). Die Streifen wurden mittels einer Spezialvorrichtung vor dem Projektionsprisma angebracht.

3. *Direkte Färbung im Reagenzglas.* Wie in den ersten Versuchen wurden fallende Konzentrationsreihen verwendet. 0,1 ml der RNS.-Lösung wurde in einem Zentrifugenglas mit 8 ml GC. durchmischt, 48 h gefärbt, dann 30 min bei 2500 Umdrehungen zentrifugiert und vorsichtig dekantiert. Der Bodensatz wurde mehrmals mit 10 ml A. bidest. aufgeschüttelt und wieder zentrifugiert, bis die Waschflüssigkeit keinen Farbstoff mehr enthielt. RNS. konnte in der Waschflüssigkeit nach maximaler Einengung im Exsikkator mit Lanthanchlorid nicht nachgewiesen werden. Der gefärbte Bodensatz wurde mit 2 m Harnstoff durch Aufkochen gelöst, auf 30 ml aufgefüllt und im Pulfrichphotometer gemessen.

*Ergebnis.* Schon allein die Betrachtung der gefärbten Filtrierpapierstreifen zeigt, dass mit steigender Konzentration der aufgetropften RNS.-Lösung die Anfärbung der Tropfen stärker wird. Die geringste im Tropfen noch fassbare Menge ist 2  $\gamma$  RNS. in 0,01 cm<sup>3</sup> Natriumazetat (0,02%ige Lösung). Wie Abbildung 1 zeigt, nimmt mit steigender Konzentration der RNS. die Extinktion des

jeweils gebundenen Farbstoffes linear zu. Da der Farbstoff GC. in den hier in Frage kommenden Konzentrationen dem Lambert-Beerschen Gesetz folgt, ist damit die quantitative stöchiometrische Bindung des GC. an RNS. bewiesen. Wir sind der Ansicht, dass es sich hierbei um eine elektrostatische Adsorption handelt, eine salzartige Bindung zwischen der negativen Ladungsgruppe der Nukleinsäure und dem positiv geladenen Farbstoffmolekül GC.

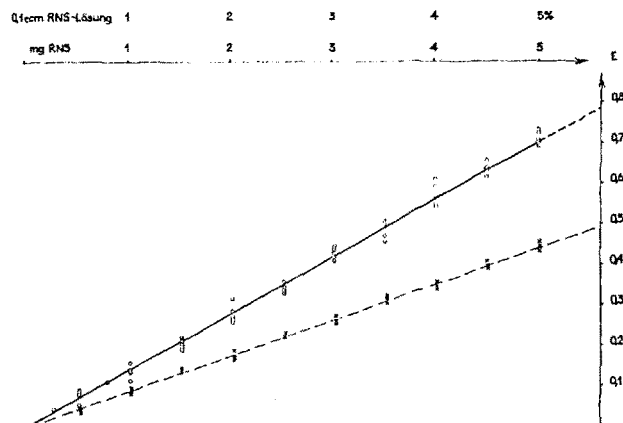


Abb. 1. Graphische Darstellung der Extinktionswerte bestimmter, mit Gallozyaninchromalaun angefarbter RNS.-Konzentrationen. — Polymerisierte RNS. - - - - Depolymerisierte RNS.

Diese quantitative Farbbindung ist auch noch nach Depolymerisation der RNS. im Wasserbad (6 h bei 100°C) nachzuweisen (Filtrierpapierversuche). Die Extinktionswerte liegen allerdings wesentlich niedriger (Abb. 1). Bei der Depolymerisation entstehen demnach Bruchstücke der RNS., die den Farbstoff nicht mehr binden können. Es müssen aber auch grössere Komplexe vorhanden sein, die eine Farbstoffanlagerung erlauben.

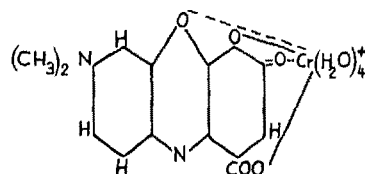


Abb. 2. Strukturformel des Gallozyaninchromalaun-Moleküls nach EINARSON.

Wir haben versucht, das Verhältnis der Phosphor-Atome zu den GC.-Molekülen zu bestimmen. Das GC.-Molekül enthält wie Abbildung 2 zeigt, 2 Stickstoff-Atome. Wir bestimmten im Kjeldahl die Stickstoffmenge einer GC.-Lösung bestimmter Konzentration mit bekanntem Extinktionswert. Vergleicht man die Extinktionswerte dieser GC.-Lösungen mit den entsprechenden Konzentrationen RNS., deren Gehalt an Phosphor bekannt ist, so ergibt sich für die polymerisierte RNS. ein Verhältnis der GC.-Moleküle zu RNS.-Phosphor-Atomen wie 1:15,2, das heisst auf 15,2 P-Atome kommt ein GC.-Molekül. Für depolymerisierte RNS. (siehe Abbildung 1) errechneten wir auf 22,8 Phosphor-Atome 1 Molekül GC.

Diese Versuche haben gezeigt, dass sich GC. mit RNS. quantitativ verbindet. Im Gewebe sind aber die Phosphorsäuregruppen der NS. mit Eiweisskörpern verbunden, so dass die Farbstoffanlagerung möglicherweise ganz oder zum Teil verhindert wird. HAMMARSTEN und

<sup>1</sup> W. SANDRITTER, Z. Wiss. Mikr. 61, 30 (1952).

TEORELL<sup>1</sup> haben nachgewiesen, dass *in vitro* kleinste Proteinmengen die Anfärbung der NS. maskieren können (Versuche mit Malachitgrün, Methylviolett u.a.). Entsprechende eigene Versuche mit GC. haben gezeigt, dass selbst bei relativ hohen Konzentrationen von Eiweisskörpern (2,5% RNS. mit 5% Albumin) die Anfärbung der RNS. nicht gestört wird. Das stark positiv geladene GC.-Molekül hat eine weitaus stärkere Affinität zur RNS. als die Eiweisskörper und verdrängt vielleicht sogar die Eiweisskörper aus ihrer Bindung mit der Nukleinsäure, wie dies zum Beispiel von Lanthan bekannt ist. Im histologischen Schnitt scheinen ähnliche Verhältnisse zu bestehen. Es ist zudem anzunehmen, dass die Bindung zwischen Eiweisskörpern und Nukleinsäure durch die Fixation so weit gelockert wird, dass die Phosphorsäuregruppe der NS. frei wird und dem Farbstoffmolekül zur Verfügung steht.

Die Frage des spezifischen Charakters der GC.-Färbung und der quantitativen Verbindung mit Desoxyribonukleinsäure soll in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

W. SANDRITTER, H. DIEFENBACH  
und F. KRANTZ

Aus dem Senckenbergischen Pathologischen Institut der Universität Frankfurt am Main, den 11. Januar 1954.

### Summary

It is shown that the dye galloxyaninchromalum combines quantitatively with ribonucleic acid. 1 molecule galloxyanin is equivalent to approximately 15 phosphorus atoms. The quantitative combination *in vitro* is not disturbed by proteins.

<sup>1</sup> E. und G. HAMMARSTEN und T. TEORELL, Acta Med. Scand. 68, 219 (1928).

## Observations on the Nucleic Acids During the Development of the Lethal Hybrid *Triton palmatus* ♀ × *Salamandra atra* ♂<sup>1</sup>

The view that the nucleic acid content is closely related to the morphogenetic activity has drawn support from cytochemical and microphotometrical studies during the development of various organisms. Recently evidence has been cited that the developmental failure in amphibian lethal hybrids is primarily due to an interruption in the synthesis of nucleic acid<sup>2</sup>. Like most of the interspecific crosses between anurans<sup>3</sup>, the hybrids obtained by fertilizing *Triton palmatus* eggs with *Salamandra atra* sperms are lethal and their development is arrested at the late blastula or the early gastrula<sup>4</sup>. By means of the FEULGEN reaction and UNNA's methyl green-pyronin mixture, approaches were made by BALTZER and SCHÖNMANN<sup>5</sup> to estimate the nucleic acid content in the embryonic cells of such lethals. Their results showed that the hybrid cell is poor in desoxyribonucleic acid (DNA) while its amount of ribonucleic acid (RNA) is normal<sup>6</sup>. Obviously a more accurate

method is needed in order to give a definite answer to this problem. Therefore further efforts have been made by subjecting the lethal hybrid *T. palmatus* ♀ × *S. atra* ♂ to microphotometrical analysis. The present report deals with quantitative measurements of RNA and DNA at different developmental stages of both hybrids and controls.

Eggs taken out of the oviduct of *T. palmatus* females, which had been treated previously with gonadotropic hormone, were partly inseminated with *S. atra* sperms (*pat* hybrid) and partly with sperms of the same species (*pp* control). Both types of eggs were kept at 18°C until the desired stages were reached. For assaying the nucleic acid content, the microphotometrical method of OGUR and ROSEN<sup>1</sup> was used. Briefly, each egg was fixed in 96% ethyl alcohol and then treated twice with 10% trichloroacetic acid for at least half an hour in the refrigerator. After washing again in alcohol it was treated with tetrahydrofuran under reflux for 4 h. The extraction of RNA was made in 3 cm<sup>3</sup> of 5% perchloric acid at room temperature for 20 h and that of DNA at 70°C for 40 min. The nucleic acid content in the egg extract was finally determined by the BECKMAN spectrophotometer at 220–280 mμ.

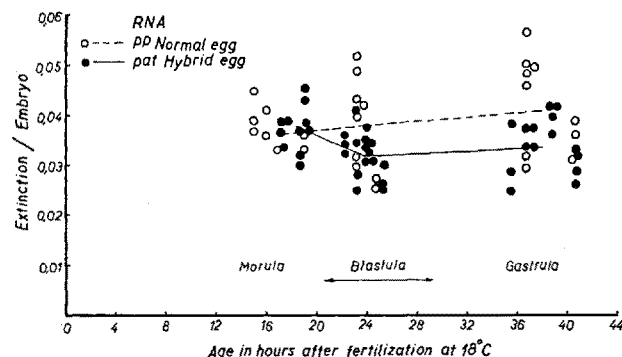


Fig. 1.—Content of RNA during the early development of *Triton palmatus* and the lethal hybrid *Triton palmatus* ♀ × *Salamandra atra* ♂.

Very recently the method of OGUR and ROSEN for the determination of nucleic acid in amphibian eggs was criticized by SZE<sup>2</sup>. According to him the value given by this method is too high, probably due to the presence of other disturbing substances. We have standardized the method with a solution of pure nucleic acid (Hoffmann-La Roche, Basel). A concentration of 54 γ/cm<sup>3</sup> gave an extinction of 1.39 units. The RNA content in the early gastrula of the controls has a value of 4.78 γ/embryo. Taking the size of the egg into consideration, this value is essentially in accordance with that obtained by STEINERT<sup>3</sup> in *Rana esculenta*, but apparently too high compared with the DNA content given by SZE<sup>4</sup> for *Rana pipiens*. However, in this work the hybrid and the control eggs were measured under identical conditions and the technical error inherent in the method can be considered as insignificant.

The extinction values at 260 mμ are presented graphically in Figures 1 and 2. We shall consider first the changes of RNA and DNA in the *pp* controls. From the morula to the early gastrula there is a hardly detectable increase of RNA. This is in agreement with the observations by STEINERT<sup>3</sup> in anurans. According to

<sup>1</sup> This work was supported by a grant from the Karl-Hescheler-Stiftung.

<sup>2</sup> J. BRACHET, Symp. Soc. Exp. Biol. 6, 173 (1952).

<sup>3</sup> J. BRACHET, Ann. Soc. Zool. Belg. 75, 49 (1944). — J. A. MOORE, J. Exp. Zool. 101, 173 (1946).

<sup>4</sup> W. SCHÖNMANN, Roux' Arch. 138, 345 (1938).

<sup>5</sup> F. BALTZER and W. SCHÖNMANN, Rev. suisse Zool. 58, 459 (1951).

<sup>6</sup> F. BALTZER, Symp. Soc. Exp. Biol. 6, 230 (1952).

<sup>1</sup> M. OGUR and G. ROSEN, Arch. Biochem. 25, 262 (1950).

<sup>2</sup> L. C. SZE, J. Exp. Zool. 122, 577 (1953).

<sup>3</sup> M. STEINERT, Bull. Soc. Chim. biol. 33, 549 (1951).

<sup>4</sup> L. C. SZE, J. Exp. Zool. 122, 577 (1953).