

that the extraction methods³ used did not produce a native nucleic acid.

The extraction methods used by us were different to those of MANIL *et al.*². The nucleic acid we obtained was transferred together with specific 'wound juice'. This gave tumors which were morphologically, histologically, and physiologically identical with tumors induced by the microbe alone.

The strain 5.6 of *Agrobacterium tumefaciens* was first cultivated for 48 h on a nutrient agar at room temperature, transferred to Fernbach flasks and finally to aerated culture bottles which contained 10 l of the following liquid culture medium: KH_2PO_4 2 g, Na_2HPO_4 1.5 g, KNO_3 0.25 g, K_2SO_4 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, Rochelle salt 2 g, dextrose 40 g, distilled water ad 1000 cm³. The pH was adjusted with KOH to 7.6–8.0. Incubation was for 48 h at 27°C. The bacteria were collected with a Sharpless type centrifuge at 40,000 r. p. m. and washed three times in a Tris-buffer 0.1 M at pH 8.0. The organisms were suspended in a solution of 18.6 g Versene (Komplexon III) in sodium-potassium-phosphate-buffer 0.01 M at pH 7.4 to which was added 9 g of NaCl in 1 l. The bacterial suspension was then frozen at –60°C and defrozen at room temperature several times to enhance the breakage of the cell walls. Total lysis was realised in a 10% sodium lauryl sulfonate solution at pH 8.0 at 37°C. The very high amount of proteins required frequent deproteinisation with the Sevag method: the liquid was shaken with a mixture of chloroform-amyl alcohol 9:1 and centrifuged until no more protein could be collected in the zone between the two phases. Precipitation of all the nucleic acid was with 1.3 volumes of ethanol at 95%. It was then purified by solution in 0.9% NaCl and reprecipitation several times with ethanol. The final precipitate was dissolved in sterile NaCl 0.9% and stored at 0°C. The 'wound juice' was obtained from 4–6 weeks old plants of *Datura stramonium*. The upper internodes of the stem were slit spirally with a razor blade. 48 h later these internodes were 'homogenized' in a blender together with solid CO_2 . After filtering by pressing through a cheese cloth, 3 cm³ of 'wound juice' were easily obtained from each plant. This sap was clarified in a MSE-centrifuge at 5000 r. p. m. for 15 min. The supernatant was now lyophilized. For each experiment, the dried material was reconstituted with distilled water to the original volume and sterilized by passing through a Seitz-filter. The sterility of each sample was tested.

Three successive experiments were made with 5–7 replications in each. Inoculation of the 4-weeks old plants of *Datura stramonium* was by means of special pipettes. These were closed at the end, but had a hole of similar size at the side. They were pushed into and then fastened to the 'wound' made on removal of one of the upper leaves. Through them 0.3 cm³ of liquid was infiltrated in 24–36 h into each plant. After the liquid had been taken up, the pipettes were removed.

The test series were as follows:

- (A) A 48-h old culture on nutrient agar of strain 5.6 of *Agrobacterium tumefaciens* in 0.9% NaCl.
- (B) The sterile nucleic acid fraction described alone.
- (C) An equal mixture of the nucleic acid fraction and 'wound juice', the nucleic acid being added to the 'wound juice' just before the infiltration of the plant.

The results after a 50-day period were:

- (A) In every case tumors had been formed from 10 to 30 mm diameter.
- (B) No tumors had been formed on any plant.
- (C) Tumors on each plant could be observed, the size varying between 5 and 20 mm diameter.

Photographs of these tumors are probably being published⁴.

The following conclusions have been drawn from these results: The function of *Agrobacterium tumefaciens* in the induction of Crown-Gall tumor is due to the nucleic acids and very probably to the deoxyribonucleic acid. However TIP can not be identical with the nucleic acids of *Agrobacterium*, because their infiltration gave rise to no tumors. We suggest that an important protein fraction of the 'wound juice' is modified by the nucleic acid and this becomes the TIP. This is the first time—so far as we know—that a *Crown-Gall tumor* has been induced without the presence of the *microbe* in any one of the different phases.

It is intended to determine in the future which nucleic acid is active and to fractionate the important principle of the 'wound juice' as well as to elucidate the reaction mechanism of the induction.

We want to acknowledge our thanks to Dr. P. SCHAEFFER (Institut Pasteur de Paris) who has been assisting us in developing the nucleic acid extraction method. The second author is grateful for the help and accommodation provided by the Pasteur Institute.

P. MANIGault and CH. STOLL

Institute Pasteur, Paris, and Institute for special Botany of the E. T. H., Zürich, September 11, 1958.

Zusammenfassung

Die Arbeit befasst sich mit der Induzierung von Pflanzentumoren durch das *Agrobacterium tumefaciens*. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Nukleinsäurefraktion aus dem Bacterium imstande ist, nach Zugabe zu einem Homogenisat von verletzten *Datura-stramonium*-Pflanzen ein Tumor auslösendes Prinzip aufzubauen. Eine derartige (sterile) Fraktion ist in der Lage, echte Crown-Gall-Tumoren zu induzieren, deren Identität mit den bakteriell erzeugten Tumoren morphologisch, histologisch und physiologisch erwiesen ist.

⁴ P. MANIGault and CH. STOLL, Ann. Inst. Pasteur, in press (1958).

Zur Biosynthese des Ubichinons

LOWE, MORTON und HARRISON¹ haben im Jahre 1953 gefunden, dass im Unverseifbaren der Leber von Vitamin-A-Mangelratten Substanzen unbekannter Natur angereichert werden, die auf Grund typischer UV.-Spektren erkannt werden können. Die weitere Bearbeitung führte zur Reindarstellung einer Komponente, die später als Ubichinon bezeichnet wurde². Am 18. Juli 1958 wurde in Shef-

¹ J. S. LOWE, R. A. MORTON und R. G. HARRISON, Nature 172, 716 (1953).

² G. N. FESTENSTEIN, F. W. HEATON, J. S. LOWE und R. A. MORTON, Biochem. J. 59, 558 (1955). – N. F. CUNNINGHAM, J. S. LOWE, L. MERVYN, R. A. MORTON und J. VERNON, Proc. biochem. Soc. 60, xviii (1955). – F. W. HEATON, J. S. LOWE und R. A. MORTON, J. chem. Soc. 1956, 4094. – J. S. LOWE, R. A. MORTON und J. VERNON, Biochem. J. 67, 228 (1957). – R. A. MORTON, G. M. WILSON, J. S. LOWE und W. M. F. LEAT, Chem. & Ind. 1957, 1649.

³ A. MIRSKY and A. POLLISTER, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 28, 344 (1942).

field von MORTON *et al.*³ in den Grundzügen die Struktur des Ubichinons bekanntgegeben. Ubichinon wurde als ein tetrasubstituiertes Benzochinon angesprochen, welches in 2- und 3-Stellung eine Dimethoxy-Gruppe und ausserdem eine lange isoprenartige Seitenkette enthält. Von CRANE *et al.*⁴ wurde im Jahre 1957 über die Isolierung einer Substanz mit identischem UV.-Spektrum berichtet, von welcher angenommen wird, dass sie in der Atmungskette eine funktionelle Bedeutung hat. Sie wurde als Mitochinon bezeichnet.

Am IV. Internationalen Kongress für Biochemie in Wien (1.–6. September 1958) wurde in der Diskussion von beiden Gruppen die endgültige Struktur mitgeteilt und damit erkannt, dass Ubichinon und Mitochinon identisch sind. Es handelt sich um ein 2,3-Dimethoxy-5-methyl-benzochinon-Derivat, das eine isoprenoide Seitenkette enthält, die im Aufbau derjenigen des Vitamin K₂ entspricht, aber aus 50 Kohlenstoffatomen besteht.

Frühere Untersuchungen⁵ über die aktivierende Wirkung von Ubichinon auf extrahierte Cytochrom-c-Reduktase ergaben einen Hinweis auf das Vorhandensein einer isoprenartigen Seitenkette und veranlassten Untersuchungen über die Biosynthese des Ubichinons.

Durch Verfütterung von ¹⁴C-signierter Mevalonsäure an Ratten konnte nun nachgewiesen werden, dass diese in beträchtlichem Ausmass in das Ubichinon eingebaut wird. Aus den bisherigen Ergebnissen geht hervor, dass die Einbaurate von Mevalonsäure in das Ubichinon mindestens so gross ist wie bei der Cholesterin-Biosynthese.

Nach den bisherigen Kenntnissen sind höhere Tiere zum Aufbau von Benzochinonstrukturen nicht befähigt, hingegen ist bekannt, dass das Vitamin E durch Öffnung des Chromanringes in ein Benzochinonderivat umgewandelt werden kann. Wir haben deshalb schon vor der genauen Kenntnis der Struktur des Ubichinons uns die Frage vorgelegt, ob Vitamin E an seiner Biosynthese beteiligt ist. Verfütterung von Tritium-markiertem DL- α -Tocopherolacetat zeigte jedoch eindeutig, dass dies nicht der Fall ist⁶. Es ist deshalb zu vermuten, dass die Ringkomponente des Ubichinons als solche dem tierischen Organismus zugeführt werden muss und dass die Isoprenseitenkette ganz oder teilweise durch Mevalonsäure aufgebaut wird.

Eine ausführliche Mitteilung über diese Ergebnisse wird in den *Helv. chim. Acta* erscheinen.

U. GLOOR und O. WISS

Biochemische Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG. Basel, 19. September 1958.

Summary

¹⁴C labelled mevalonic acid is incorporated by the rat into the ubiquinone molecule. Vitamin E, however, is no precursor of ubiquinone. It is suggested that the ring component is essential for animals and that the isoprene side chain is at least partly built up by mevalonic acid.

³ 375th Meeting of the Biochemical Society.

⁴ F. L. CRANE, Y. HATEFI, R. L. LESTER und C. WIDMER, *Biochim. biophys. Acta* 25, 220 (1957).

⁵ F. WEBER, U. GLOOR und O. WISS, *Helv. chim. Acta* 41, 1046 (1958).

⁶ Nach persönlicher Mitteilung sind J. C. JOHNSON und P. ALAUF-POVIC, University of Illinois, Urbana, zum gleichen Ergebnis gekommen.

Electrophorèse sur gel d'amidon des lipoprotéines sériques humaines

L'électrophorèse en gel d'amidon, découverte par SMITHIES¹, ajoutée à la simple migration électrophorétique des protéines ou de leurs complexes, une véritable ultrafiltration à travers le gel, et sépare ces composants plasmatiques en tenant compte à la fois de leurs potentiels électrocinétiques et de leurs masses moléculaires. Cette méthode permet donc de distinguer un beaucoup plus grand nombre de composants dans un mélange de protéines que ne le permettraient les autres techniques d'électrophorèse.

L'identification des différentes fractions protéiques du sérum humain a pu être réalisée grâce à l'électrophorèse bidimensionnelle² et a abouti à la nomenclature des fractions que nous employons. En ce qui concerne les lipoprotéines, l'existence de deux zones soudanophiles a été démontrée par SILBERMAN³.

Dans cette note, nous allons essayer de préciser la nature des fractions soudanophiles sériques que l'on décrit après électrophorèse sur gel d'amidon.

On sait en effet qu'il existe plusieurs groupes de lipoprotéines que l'on sépare par la méthode de fractionnement de COHN, par ultracentrifugation d'après GOFMAN, par électrophorèse sur papier.

Les lipoprotéines de faible densité de GOFMAN (1063 g/cm³) correspondent aux bêta lipoprotéines sur papier⁴ et aux bêta lipoprotéines de COHN⁵.

Il a été démontré précédemment⁶ que l'on peut précipiter sélectivement les bêta lipoprotéines par le sulfate de Dextrane en présence de Chlorure de Calcium (1 volume de sérum + 0,02 volume d'une solution de Sulfate de Dextrane à 10 p. 100 + 0,1 volume de Cl₂CaM). Nous avons donc comparé, après électrophorèse sur gel d'amidon, le sérum normal, le sérum sélectivement débarrassé de la totalité des bêta lipoprotéines et les bêta lipoprotéines seules.

Protocole expérimental. L'électrophorèse sur gel d'amidon a été réalisée dans les conditions décrites dans une précédente communication⁷. Une des conditions essentielles, lorsque l'on veut obtenir une coloration nette des fractions lipoprotéiques, est le dépôt d'une quantité suffisante de sérum.

Nos expériences ont été réalisées dans des cuves larges (234·80·6 mm de dimensions intérieures) en déposant dans un réservoir de 40·2 mm un mélange à parties égales de 0,5 ml de sérum et 0,5 ml d'amidon soluble Merck à 30% dans du tampon borate 0,025 M. La durée de l'électrophorèse est de 16 à 18 heures à 140 V sous 10 mA par cuve d'amidon.

Après électrophorèse, les gels sont découpés transversalement, une des tranches obtenues est colorée par l'Amidoschwarz 10 B (en solution à 1% dans un tampon Acétate 0,1 M. Acide Acétique M à parties égales), l'autre tranche est colorée pendant 16 heures par une solution alcoolique de Noir Soudan (Noir Cérol B Kulh-

¹ O. SMITHIES, *Biochem. J.* 61, 629 (1955).

² M. D. POULIK et O. SMITHIES, *Biochem. J.* 68, 636 (1958).

³ H. J. SILBERMANN, *Bioch. Biophys. Acta*, 24, 647 (1957).

⁴ F. A. PEZOLD, O. F. DE LALLA et I. W. GOFMAN, *Clin. Chem. Acta* 2, 43 (1957).

⁵ H. A. EDER, *Amer. J. Med.* 23, 269 (1957).

⁶ M. BURSTEIN et J. SAMAILLE, *Pathol. Biol.* 6, 543 (1958). – M. BURSTEIN, *C. r. Acad. Sci.* 243, 527 (1956).

⁷ J. M. FINE, E. WASZCZENKO, J. LOEB et J. MOULLEC, *Revue d'Hématologie* 12, 698 (1957).