

nach der Elektrophorese von Kartoffelhomogenat nur eine, durch EDTA hemmbare Zone (Figur).

Ausser bei den Beispielen der Figur wurde Phosphodiesterase I auch in Blättern von Spinat (*Spinacia oleracea*), Neuseeländer Spinat (*Tetragonia expansa*), Bohnen (*Phaseolus vulgaris*), Schnittlauch (*Allium schoenoprasum*) und Stiefmütterchen (*Viola tricolor*) gefunden. In Extrakten aus ruhenden Zuckerrübensamen konnte nach Disk-Elektrophorese dieselbe Phosphodiesterase nachgewiesen werden wie in Blättern, jedoch in schwächerer Aktivität. Die Aktivität nimmt mit dem Alter der Blätter zu. In den Blättern von Zuckerrüben (Figur) und von Weizen⁸ kommt Phosphodiesterase I in multiplen Formen vor.

Dass Phosphodiesterase I in Pflanzen wahrscheinlich weit verbreitet ist, wurde bereits ausgesprochen⁹. Sie wurde angereichert aus Malzkeimen¹¹ und Möhren¹², konnte jedoch nicht ganz von einer Phosphomonoesteraseaktivität getrennt werden. Nach Disk-Elektrophorese von Zuckerrübenblattsaft tritt an der Stelle der Phosphodiesterasezone keine Phosphomonoesteraseaktivität auf (geprüft mit α -Naphthylphosphat).

Dieselben Zonen wie mit α -Naphthyl-pU erhält man mit dem Thymidin-5'-phosphorsäure- α -naphthylester, der auf dem gleichen Weg synthetisiert wurde. Dem Verhalten der *p*-Nitrophenylester entsprechend¹³ reagiert der Thymidylsäurenaphthylester noch wesentlich schneller. Der hohe Preis der Thymidylsäure rechtfertigt jedoch für den vorliegenden Zweck die Verwendung des Uridylsäureesters.

Summary. The α -naphthylester of uridine-5'-phosphate was synthesized as a specific substrate for phosphodiesterase I which allows the identification of the enzyme after disc electrophoresis. Thus, phosphodiesterase I was shown to be present in several plants, in some of which it occurs in multiple forms.

B. LERCH^{14,15}

*Institut für Biochemie der Biologischen Bundesanstalt,
351 Hann.-Münden (Deutschland),
10. Mai 1968.*

¹¹ J. HOLBROOK, F. ORTANDERL und G. PFLEIDERER, *Biochem. Z.* 345, 427 (1966).

¹² C. HARVEY, L. MALSMAN und A. L. NUSSBAUM, *Biochemistry* 6, 3689 (1967).

¹³ H. G. KHORANA in *The Enzymes* (Ed. P. D. BOYER, H. LARDY und K. MYRBÄCK; Academic Press, New York and London 1961), Vol. 5, p. 79.

¹⁴ Herrn Dr. H. STEGEMANN sei für sein ständiges Interesse an dieser Arbeit gedankt, Herrn Dr. C.-E. BÜCHTING (Kleinwanzlebener Saatzucht AG, Einbeck) für finanzielle Unterstützung, Fräulein F. HOLLENSSEN und Herrn K. MASSIE für gute Mitarbeit.

¹⁵ Neue Anschrift: Institut für Biochemie der Biologischen Bundesanstalt, 33 Braunschweig (Deutschland).

Nachweis pflanzlicher Ribonukleasen in Polyacrylamid-Gelen nach Disk-Elektrophorese

In Agar-Gelen wurden sowohl RNasen als auch DNasen nach elektrophoretischer Trennung entweder auf indirekte Weise mit Hilfe der Kontaktfilm-Methode¹⁻⁴ oder direkt durch Inkubation der Gel-Schicht in einer Nukleinsäurelösung⁵ nachgewiesen.

Für Polyacrylamid-Gele liegt bisher, soweit bekannt, nur eine Arbeit über Trennung und Identifizierung von DNasen vor⁶. In diesem Fall wurde hochmolekulare DNS während der Polymerisation in das Gel eingeschlossen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass bei Inkubation der Polyacrylamid-Gele in einer Lösung von niedermolekularer RNS ausreichende Mengen der Nukleinsäure eindringen, so dass auf diese Weise ein Nachweis von RNasen nach Disk-Elektrophorese möglich ist.

Material und Methoden. Bohnen (*Phaseolus vulgaris*, Sorte Favorit bzw. Sorte Red Kidney) und Weizen (*Triticum aestivum*, Sorte Nordgau) wurden im Thermostaten bei 25°C und 6000 Lux, Zuckerrübenpflanzen (*Beta vulgaris*, ssp. *esculenta* f. *altissima*, Sorte Erta) im Gewächshaus bei 12°C und 2000 Lux angezogen. Kallusgewebe aus Bohnen-Hypocotyl (*P. vulgaris*, Sorte Favorit) wurde auf White'schem Nährmedium kultiviert, dem 2,4-D, Kinetin und Erbsenextrakt hinzugefügt worden war⁷.

Primärblätter des Weizens (20 g Frischgewicht) wurden 10 Tage nach Aussaat, Bohnenwurzeln (20 g Fgw.) 15 Tage und Rübenblätter (20 g Fgw.) 60 Tage nach Aussaat, Bohnen-Kalli (30 g F.Gw.) 30 Tage nach Übersetzen auf ein neues Nährmedium geerntet.

Das Pflanzenmaterial wurde nach Zugabe der jeweils gleichen Gewichtsmenge Extraktionspuffer (0,05M Tris-HCl pH 7,5, 0,5M KCl, 0,1% Cystein-HCl, 10% Saccharose) im Mörser bei 5°C mit Quarzsand zerrieben, über

ein Nesseltuch filtriert und anschliessend 20 min bei 30000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde nach Reinigung über eine Sephadex-(G-25-)Säule mit Hilfe von Polyäthylenglycol Typ 20000 (Fluka) auf 2-5 ml eingengt. Von diesem Extrakt wurde eine ca. 500 µg Protein enthaltende Flüssigkeitsmenge aufgetragen.

Die Herstellung der Gele erfolgte nach DAVIS⁸. Bei einer Stromstärke von 2,6 mA pro Röhrchen ($\varnothing 6 \times 110$ mm) dauerte die Trennung ca. 3-4 h. Sie wurde beendet, wenn die Bromphenolblaubande den unteren Rand des Röhrchens erreicht hatte.

Die aus den Glasröhrchen entfernten Gele wurden zunächst 10 min in 0,2M Acetat-Puffer pH 5,0 bzw. 0,05M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 gewaschen und anschliessend in einer RNS-Lösung (Hefe-RNS, Fa. Böhlinger, in 0,2M Acetat-Puffer pH 5,0 bzw. 0,05M Tris-HCl-Puffer pH 7,5) 2 h inkubiert. Das Fixieren und gleichzeitige Anfärben der nicht abgebauten RNS erfolgte in 0,2M Acetat-Puffer, der 1% Lanthanacetat und 1% Methylenblau enthielt.

¹ G. RIOU und C. PAOLETTI, *Nature* 199, 65 (1963).

² M. WAGNER, *J. Chromat.* 15, 108 (1964).

³ C. POORT und W. J. W. VAN VENROY, *Nature* 204, 684 (1964).

⁴ N. RESSLER, E. OLIVERO, G. R. THOMPSON und R. R. JOSEPH, *Nature* 210, 695 (1966).

⁵ J. URIEL und JANINE COURCON, *C. r. hebdom. Acad. Sci., Paris* 253, 1876 (1961).

⁶ J. BOYD und H. K. MITCHELL, *Analyt. Biochem.* 13, 28 (1965).

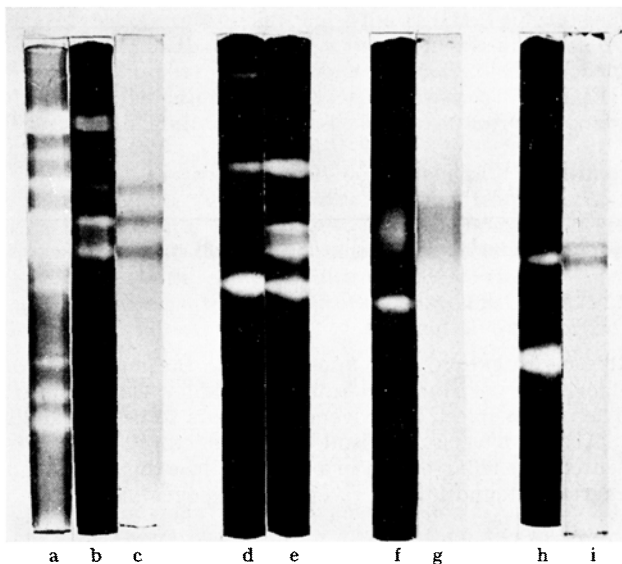
⁷ R. WARICK, in Vorbereitung.

⁸ B. J. DAVIS, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404 (1964).

Für eine ausreichende Anfärbung waren mindestens 2 h erforderlich. Gewöhnlich aber wurden die Gele für ca. 12 h in der Farblösung belassen. Der nicht adsorbierte Farbstoff liess sich durch Waschen in 0,1prozentiger Essigsäure entfernen. Sobald die als helle Zonen erscheinenden RNase-Banden zu erkennen waren (nach ca. 12 h), wurde der Waschprozess abgebrochen. Durch längeres Auswaschen konnten in begrenztem Masse auch schwache Zonen noch sichtbar gemacht werden (Figur a).

Der Phosphodiesterase-Nachweis erfolgte nach LERCH⁹.

Durch Zusammenpressen der Gele zwischen zwei Plexiglasplatten wurde die photographische Wiedergabe der Zonen verbessert.



Ribonukleasen und Phosphodiesterasen verschiedener Pflanzen nach Disk-Elektrophorese in Polyacrylamid-Gele. (a) RNasen aus Weizenblättern. Nach dem Anfärben wurden die Gele ca. 24 h gewaschen. (b) RNasen aus Weizen. Die gleiche Trennung wie (a), jedoch wurden die Gele in diesem Fall nur ca. 12 h gewaschen. (c) Phosphodiesterasen aus Weizenblättern. (d) RNasen aus Kallus-Kulturen von Bohnen der Sorte Favorit. (e) RNasen aus Bohnenwurzeln der Sorte Favorit. (f) RNasen aus Bohnenwurzeln der Sorte Red Kidney. (g) Phosphodiesterase aus Bohnenwurzeln der Sorte Red Kidney. (h) RNasen aus Zuckerrübenblättern. (i) Phosphodiesterasen aus Zuckerrübenblättern.

Ergebnisse und Diskussion. Ähnlich wie für andere Enzyme (vgl. MAURER¹⁰) konnten auch für RNasen Unterschiede in Zahl und Position der Zonen zwischen verschiedenen Pflanzengattungen, -sorten und auch -geweben gleichen genetischen Ursprungs festgestellt werden.

So wurden nach Inkubation bei pH 5 für Weizenblätter 11, für Bohnenwurzeln der Sorte Favorit 4, für Kallusgewebe der gleichen Sorte 3, für Bohnenwurzeln der Sorte Red Kidney 2 und für Zuckerrübenblätter 3 Zonen nachgewiesen (Figur a, b, d, e, f, h). Grundsätzlich das gleiche Bild ergab sich, wenn die Gele bei pH 7,5 inkubiert wurden, jedoch deutet die unterschiedliche Stärke der Banden auf verschiedene pH-Optima der einzelnen Enzyme hin.

Von den RNS-spaltenden Enzymen haben beim Weizen 3, bei Bohnen der Sorte Red Kidney 1 und bei Zuckerrüben 2 Phosphodiesterase-Eigenschaften (Figur c, g, i).

Im Vergleich mit dem bisher am häufigsten verwendeten, indirekten Nachweis von Nukleasen führt die hier beschriebene Methode zur Ausbildung schärfer abgegrenzter Zonen; gegenüber dem von BOYD und MITCHELL beschriebenen Verfahren hat sie den Vorteil, einfacher und weniger kostspielig zu sein. Durch Kombination mit dem Phosphodiesterase-Nachweis nach LERCH⁹ bietet sie zudem die Möglichkeit, Nukleasen nach ihrem Spaltungsmechanismus zu differenzieren^{11,12}.

Summary. Detection of ribonucleases in polyacrylamide gels after disc-electrophoresis is possible by incubation of the gels in a solution of low molecular RNA followed by staining with methylene blue. Application of this method to protein extracts of wheat leaves, sugar beet leaves and roots of different bean varieties as well as callus cultures and roots of the same bean variety shows differences in number and position of RNase zones.

G. WOLF

Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz der Universität, 34 Göttingen (Deutschland), 13. Mai 1968.

⁹ B. LERCH, *Experientia* 24, 889 (1968).

¹⁰ H. R. MAURER, *Disk Elektrophorese* (W. de Gruyter & Co., Berlin 1968).

¹¹ Herrn Prof. Dr. W. H. FUCHS danke ich für anregende Diskussionen, Frl. M. H. MEIER für ihre Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

¹² Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Effect of β -Aminoethylisothiuronium-bromide-hydrobromide on the Acetate-1-¹⁴C Incorporation into Tissue Lipids of Irradiated Rats

X-irradiation in rats is known to lead to increased synthesis of fatty acids from acetate in liver¹⁻⁶ and kidney⁷. Disturbances in the lipid levels of tissue have been reported⁸ as a result of whole-body γ -irradiation and also after β -Aminoethylisothiuronium-bromide-hydrobromide (AET) administration. Disappearance of epididymal fat pads was noted 48 h after 2400 R irradiation in early stages of this study. The adipose tissue is an important site for synthesis of triglycerides from carbohydrates and other 2-carbon precursors^{9,11}. In irradiated rats the disappearance of this important site of lipogenesis would result in an increased out-put of lipids by tissues

less important for lipogenesis, in the presence of adipose tissue. Liver and kidney synthesize lipids to a smaller extent in normal rats. With a view to evaluate relative contribution of different tissues, in irradiated and AET treated rats, in vivo acetate-1-¹⁴C incorporation into lipids was studied.

Methods and materials. Young male albino rats weighing 100-110 g were divided into 4 groups with 4 animals in each group. Rats of group A were sham-irradiated and served as controls. Animals of group B were subjected to 2400 R whole body γ -irradiation in a γ -cell from all the sides. Rats of group C and D were injected with a neutral