

zur Kenntnis der Gleichgewichtskonstanten derartiger Reaktionen gelangen kann.

2. Während der Y-Komplex des Co^{II} eine durch H_2O besetzte Koordinationslücke aufweist, ist dies beim Co^{III} -Komplex CoY^- nicht der Fall. Es wurden 12 verschiedene Salze mit diesem Anion präparativ dargestellt und analysiert.

3. Man kann auch beim Co^{III} -Komplex zu Anionen mit einem Fremdliganden gelangen, wenn man den Co^{II} -Komplex mit Br_2 , H_2O_2 oder NO_2 oxydiert, wobei Br^- , OH^- oder NO_2^- am Zentralatom hängen bleiben. Es wurden 12 Bromokomplexe und 2 Nitrokomplexe präparativ dargestellt und analysiert. Die Hydroxokomplexe kann man hingegen nicht als feste Salze fassen, da $[\text{CoY}(\text{OH})]^{-2}$ sehr leicht in CoY^- übergeht.

Der *Chemischen Fabrik Uetikon* und der Firma *B. Siegfried*, Zofingen, danke ich für die Lieferung von Chemikalien. Fr. *Elsi Freitag* danke ich für die Ausführung der Messungen am „Leifo“ und dem Laboranten *R. Müller* für seine Hilfe bei der Analyse der Komplexsalze.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

109. Isolierung hochmolekularer Nucleinsäure aus Kalbsthymus

von **R. Signer** und **H. Schwander**.

(5. XII. 48.)

1938 veranlassten uns *T. Caspersson* und *E. Hammarsten*, eine von ihnen präparierte Thymonucleinsäure mit Hilfe der Strömungsdoppelbrechung auf Grösse und Gestalt der Molekeln zu untersuchen¹). Die wässrige Lösung hatte die typischen Eigenschaften einer Dispersion von Kettenmolekeln. Inzwischen wurde der Darstellung von Nucleinsäuren und Nucleoproteinen angesichts ihrer biologischen Bedeutung von verschiedenen Autoren viel Aufmerksamkeit geschenkt²). Wir selbst bemühten uns, die Nucleinsäure unter möglichst geringem Abbau der Makromolekel zu gewinnen³). Anhaltspunkte über die Kettenlänge verschiedener Präparate lieferten uns

¹) *Nature* **141**, 122 (1938).

²) Zusammenfassende Darstellungen: *Nucleic Acid*, Symposia of the Society for experimental Biology, Cambridge: At the University Press 1947 und Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, Vol. XII, 1947.

³) Vgl. Diss. *A. Knapp*, Bern 1946, und *Signer* und *Knapp*, *Makromol. Ch.* **1**, 89 (1947).

die Strömungsdoppelbrechung und die Viskosität verdünnter Lösungen. Bei der Fortsetzung dieser Versuche gelang es, die Arbeitsweise durch Kombination der bekannten Verfahren zu vereinfachen und dabei den Abbau noch weiter auszuschalten. Hierüber wird im folgenden berichtet.

Die Extraktion des Nucleoproteins aus dem zerkleinerten Gewebe wird nach *Mirsky* und *Pollister* mit 10-proz. Kochsalzlösung durchgeführt, unter Zusatz von Natriumfluorid zur Verminderung des Abbaus durch die Desoxyribonucleinase. Nach den Angaben der gleichen Autoren fällt man das Nucleoprotein aus. Man hat hierzu nur durch starke Verdünnung der Lösung eine Verminderung der Ionenstärke vorzunehmen. Durch wiederholtes Aufnehmen in konzentrierter Salzlösung und Ausfällen durch Verdünnen lassen sich Fremdstoffe entfernen.

Die Abtrennung des Proteins von der Nucleinsäure wird von *Mirsky* und *Pollister* nach dem Verfahren von *Sevag*, *Lackman* und *Smolens* ausgeführt¹⁾. Durchschütteln der wässrigen Lösung mit einer Mischung von Chloroform und Octylalkohol führt zu einer teilweisen Abscheidung des Proteins in einer Schicht zwischen organischer und wässriger Phase. Durch mehrfache Wiederholung dieses Prozesses kann das Eiweiss weitgehend von der im Wasser verbleibenden Nucleinsäure getrennt werden. Viel einfacher kann nach unseren Erfahrungen das Eiweiss abgetrennt werden, wenn man an dieser Stelle zum Verfahren von *Bang* und *Hammarsten*²⁾ übergeht. Die Nucleoproteinlösung wird mit Kochsalz gesättigt. Sie scheidet in einigen Tagen das Protein filtrierbar ab. Aus dem Filtrat wird die Nucleinsäure mit Alkohol-Wassermischung gefällt und aus Wasser mit Alkohol mehrmals umgefällt.

*Caspersson*³⁾ gibt ein Druckfiltrationsverfahren an, um die letzten Spuren von Eiweiss abzutrennen. Die Eiweissentfernung kann nach *Caspersson* nephelometrisch verfolgt werden. Die Druckfiltration lässt sich nach *A. Knapp*⁴⁾ durch eine Zentrifugierung in der *Sharples*-Zentrifuge ersetzen. Man hat dafür zu sorgen, dass das sehr geringe Eiweiss-sediment beim Anhalten und Entleeren des Rotors nicht wieder aufgewirbelt wird. Belegen der Rotorinnenfläche mit einer Lage von Filterpapier und Zugabe von etwas Aktivkohle haben den gewünschten Effekt.

Im folgenden wird die vereinfachte Präparation etwas genauer beschrieben.

¹⁾ J. Biol. Chem. **124**, 425 (1938).

²⁾ Bioch. Z. **144**, 386 (1923).

³⁾ Bioch. Z. **270**, 161 (1934).

⁴⁾ Diss. Bern 1946.

Extraktion des Nucleoproteins.

700 g Milken werden unmittelbar nach dem Schlachten des Tieres mit fester Kohlensäure tiefgekühlt. 3 Liter einer wässrigen Lösung, enthaltend 300 g Natriumchlorid und 40 g Natriumfluorid, werden auf 0° gekühlt. In einer Zerkleinerungsvorrichtung (Turmix) werden kleine Anteile des tiefgekühlten Gewebes mit der auf 0° gekühlten Extraktionslösung homogenisiert. Die Mischung wird zur Vervollständigung der Extraktion 24 Stunden bei 0° aufbewahrt. Auch die folgenden Operationen werden bei 0° vorgenommen. Durch Filtrieren oder Dekantieren wird Ungelöstes abgetrennt. Fällung der Nucleoproteine durch Verdünnen mit Wasser auf das sechsfache Volumen. Mehrmalige Extraktion der Fällung mit Kochsalzlösung von 10 g NaCl im Liter.

Zerlegung des Nucleoproteins.

Auflösen des Nucleoproteins in 3 Liter einer Natriumchloridlösung mit 100 g NaCl im Liter, Zugabe von 5 Liter gesättigter Kochsalzlösung und Sättigung der ganzen Lösung mit Kochsalz. Stehenlassen während 10–14 Tagen bei 0°. Abfiltration des ausgeschiedenen Proteins.

Abscheidung und Reinigung des Natriumsalzes der Nucleinsäure.

Einlaufenlassen des obigen Filtrates in das 1½-fache Volumen Äthanol unter Rührung. Auflösen des gefällten Thymonucleinats in 2 Liter Wasser und portionenweises, dreistündiges Zentrifugieren in der *Sharples*-Zentrifuge. Zweimalige Umfällung aus Wasser mit dem vierfachen Volumen Äthanol. Trocknung bei tiefer Temperatur im Hochvakuum oder Trocknung mit Alkohol und Äther.

Ausbeute: 5 g trockenes Natriumnucleinat.

Eigenschaften des Natriumthymonucleinates.

Wassergehalt: Im Exsikkator über gesättigter Kochsalzlösung (relative Feuchtigkeit 75%) beträgt der Wassergehalt des Natriumthymonucleinats 28,9% (bestimmt durch Trocknung im Hochvakuum bei 50°). Alle Gewichts- und Konzentrationsangaben dieser Arbeit beziehen sich auf wasserfreie Substanz.

Trübungsgrad verdünnter wässriger Lösung: Eine Lösung, in 100 cm³ enthaltend 0,0163 g Thymonucleinat und 10 g NaCl, ergibt eine absolute Trübung von 0,0025. Die Messung wurde im *Zeiss*-Trübungsmesser mit *Pulfrich*-Photometer ausgeführt.

Viskosität der wässrigen Thymonucleinatlösung: A. *Knapp* hat den Einfluss von Neutralsalz auf die Viskosität verdünnter Thymonucleinatlösungen untersucht¹⁾. Fig. 1 zeigt den Gang der spezifischen Viskosität mit der Kochsalzkonzentration für Präparat I der Arbeit *Knapp*.

Das Thymonucleinat zeigt die für ionogene Kettenmolekeln typischen Viskositätseigenschaften, nämlich starken Abfall bei kleinen Elektrolytzusätzen und fast konstante spezifische Viskosität bei hohen Elektrolytkonzentrationen. Um aus den Viskositäten Anhaltspunkte über die Molekulargewichte verschiedener Präparate zu ge-

¹⁾ Diss. A. *Knapp*, Bern 1946, S. 42.

winnen, führt man zweckmässigerweise Messungen bei Kochsalzkonzentrationen von etwa 10 g in 100 cm³ aus.

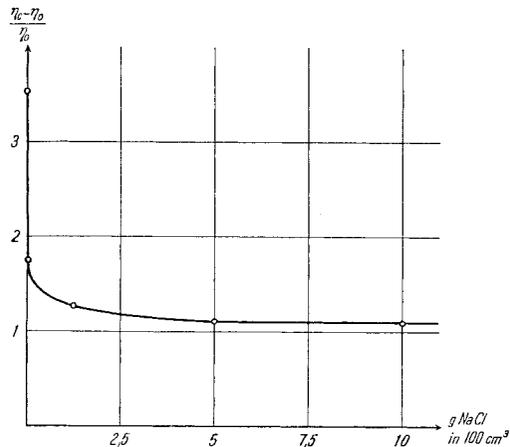


Fig. 1.

Spezifische Viskosität einer wässrigen Lösung von 0,147 g Natriumthymonucleinat in 100 cm³ bei variabler Natriumchloridkonzentration.

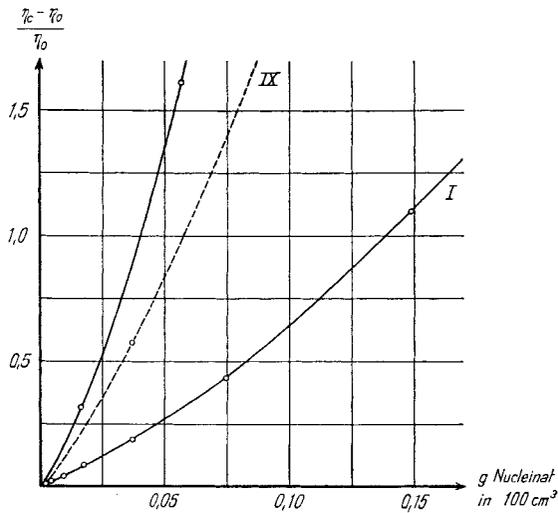


Fig. 2.

Spezifische Viskositäten von drei Natriumthymonucleinaten in Abhängigkeit der Konzentration. Kochsalzkonzentration 10 g in 100 cm³ Lösung.

Kurve I: Nucleinat von *Hammarsten* und *Caspersson*.

Kurve II: Höchstmolekulares Nucleinat von *A. Knapp*.

Höchstgelegene Kurve: Präparation wie in dieser Arbeit beschrieben.

Fig. 2 zeigt Viskositätskonzentrationskurven einiger Thymonucleinate in wässriger Lösung mit 10 g NaCl pro 100 cm³. Die höchstgelegene Kurve entspricht dem Präparat, dessen Herstellung oben beschrieben wurde. Die Lage der Viskositätskonzentrationskurve zeigt, dass die Molekeln noch etwas grösser sind als die des schonendst isolierten Präparates von *Knapp* (Kurve IX) und viel grösser als die des Präparates von *Hammarsten* und *Caspersson* aus dem Jahre 1937 (Kurve I).

Die Viskositäten wurden im *Ostwald*-Kapillarviskosimeter bestimmt. Nähere Angaben über die Messungen an den Präparaten I und IX finden sich in der Dissertation *Knapp*. Das neue Präparat wurde mit einem Viskosimeter folgender Daten untersucht.

Volumen zwischen den Marken: 0,80 cm³.

Kapillarlänge: 7,8 cm.

Auslaufzeit von Wasser: 148,7 Sek.

Strömungsdoppelbrechung. Fig. 3 zeigt den Orientierungswinkel einer Lösung des neu hergestellten Nucleinates. Ein Vergleich mit den entsprechenden Kurven früher hergestellter Präparate¹⁾ bestätigt den geringeren Abbau bei der Isolierung, wie sie oben beschrieben wurde.

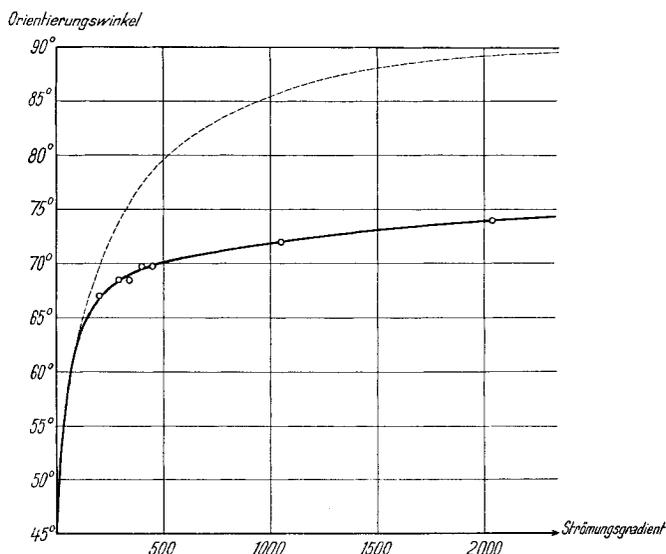


Fig. 3.

Orientierungswinkel des hochmolekularen Natriumthymonucleinates. Die Lösung enthält in 100 cm³ 0,056 g Nucleinat und 10 g NaCl.

¹⁾ Vgl. Diss. *A. Knapp*, Bern 1946 und Diss. *A. Wissler*, Bern 1941.

Eine genaue Ermittlung der Molekelmasse und Form unter Heranziehung der Sedimentations- und Diffusionsgeschwindigkeit ist in gemeinsamer Arbeit mit *Ch. Sadron* in Strassburg im Gang.

Aus der Orientierungswinkelkurve ergeben sich Anhaltspunkte über die Polydispersität von Stoffen, die aus Kettenmolekeln aufgebaut sind¹⁾. Fig. 3 zeigt einen raschen Anstieg des Orientierungswinkels bis etwa zum Gradienten 200. Bei höheren Gradienten steigt der Winkel viel langsamer an, als es bei einer monodispersen Substanz der Fall wäre. Der ungefähre Kurvenverlauf für monodisperses Material ist in Fig. 3 gestrichelt eingezeichnet. Es ist also auch bei der letzten Präparation noch ein teilweiser Molekelabbau eingetreten, so dass neben den grossen, eventuell nativen Molekeln Spaltstücke verschiedener Grösse in beträchtlicher Menge vorliegen.

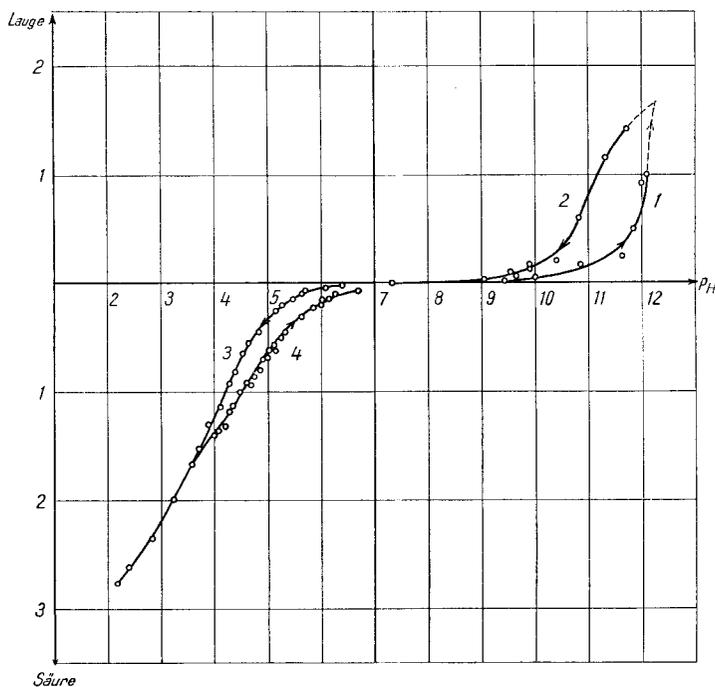


Fig. 4.

Elektrometrische Titration von Natriumthymonucleinat. Ordinate: Äquivalente NaOH bzw. H_2SO_4 auf 4 P-Atome des Nucleinates.

Kurve 1 p_{H} 7 nach p_{H} 12

Kurve 3 p_{H} 7 nach p_{H} 2

Kurve 2 p_{H} 12 nach p_{H} 7

Kurve 4 p_{H} 2 nach p_{H} 7

¹⁾ Vgl. *R. Signer* und *H. Liechti*, *J. chim. phys.* **44**, 58 (1947); *Makromol. Chem.* **2**, 267 (1948).

Potentiometrische Titration. Elektrometrische Titrationsen verschiedener Thymonucleinate wurden kürzlich von *Gulland, Jordan* und *Taylor*¹⁾ ausgeführt. Es wurden unter anderm folgende wichtige Eigenschaften beobachtet:

1. Schonend präpariertes Nucleinat geht bei p_H -Werten von 2,5 und 12 eine irreversible Änderung ein.

2. Die Titrationskurven sind von der Art der Präparation abhängig.

Wir führten mit dem oben beschriebenen Nucleinat zur weiteren Kennzeichnung entsprechende Titrationsen durch. Die Ergebnisse sind in Fig. 4 enthalten.

Die irreversible Veränderung bei hohen und niederen p_H -Werten konnte auch bei dem neu hergestellten Nucleinat festgestellt werden. Die Titrationskurven stimmen mit denen überein, die *Gulland* und Mitarbeiter bei schonender Präparation beobachteten.

Titriert wurden Lösungen mit 60 mg Thymonucleinat in 8 cm³ Wasser. Titration mit 0,1-n. NaOH und H₂SO₄. Wasserstoff-Elektrode. Genauigkeit der p_H -Messung $\pm 0,01$ p_H -Einheiten.

Ausführung der Messungen nach *Fletcher, Gulland* und *Jordan*²⁾. Korrektur für die Titration des Wassers bei extremen p_H -Werten nach *Jordan* und *Taylor*³⁾.

Zusammenfassung.

Es wird eine Abänderung der bekannten Verfahren zur Isolierung von Desoxyribonucleinsäure angegeben. Die so hergestellten Präparate zeichnen sich durch hohes Molekulargewicht aus. Die Nucleinsäure wird gekennzeichnet durch Viskosität, Strömungsdoppelbrechung und Trübungsgrad verdünnter Lösungen und durch die Säure- und Basenbindung.

Universität Bern,
Institut für allgemeine und spezielle organische Chemie.

1) Soc. **1947**, 1131.

2) Soc. **1944**, 33.

3) Soc. **1946**, 994.