

- [6] D. H. Whiffen, *Mol. Physics* 6, 233 (1963).
[7] R. W. Fessenden & R. H. Schuler, *J. chem. Physics* 39, 2147 (1963); R. H. Schuler, G. P. Laroff & R. W. Fessenden, *J. phys. Chemistry* 77, 456 (1973).
[8] F. Gerson, J. Heinzer & E. Vogel, *Helv.* 53, 95 (1970).
[9] F. Gerson, 'Radical Ions of Nonbenzenoid Aromatics' in 'Nonbenzenoid Aromatics' (J. P. Snyder Ed.), Vol. II, Academic Press, New York 1971, pp. 145-149.
[10] A. Carrington, *Quart. Reviews* 17, 67 (1963).
[11] F. Gerson, "Hochauflösende ESR.-Spektroskopie, dargestellt anhand aromatischer Radikalkationen", Verlag-Chemie, Weinheim, 1967, English Edition: "High Resolution ESR.-Spectroscopy", Verlag-Chemie, Weinheim and J. Wiley and Sons, New York 1970. a) Chapter 2.5. b) Chapter 2.4.
[12] A. W. Hanson, *Acta crystallogr.* 18, 599 (1965).
[13] F. Gerson, E. Heilbronner & B. Weidmann, *Helv.* 47, 1951 (1964).
[14] M. Iwazumi & T. Isobe, *Bull. chem. Soc. Japan* 38, 1547 (1965).
[15] See, e.g., A. Hudson & G. R. Luckhurst, *Chem. Rev.* 69, 191 (1969).

136. Isolierung und Charakterisierung von nativer nuklearer Desoxyribonukleinsäure aus Tabakblättern

von A. Temperli, U. Künsch und H. Türlér

Eidg. Forschungsanstalt, Sektion Biochemie, CH-8820 Wädenswil
und Département de Biologie Moléculaire, Université de Genève,
30 Quai Ernest Ansermet, CH-1211 Genève

(4. III. 75)

Summary. Tobacco nuclear DNA (nDNA) was isolated from tobacco leaf nuclei which were prepared according to our previously published procedure [8]. The nDNA was characterized by base analysis, absorption spectrophotometry, analytical CsCl density gradient equilibrium centrifugation and by its melting behaviour. The results show that the isolated tobacco nDNA is native, high molecular weight DNA, which is free of detectable amounts of chloroplast DNA, RNA, protein and polysaccharides. From its melting behaviour it was concluded that tobacco nDNA can be placed close to calf thymus DNA with respect to intramolecular heterogeneity. Experiments on the partial and complete denaturation of tobacco nDNA and its ability to renature are also reported.

Einleitung. - Die Untersuchung des genetischen Materials, der Desoxyribonukleinsäuren (DNS) höherer Pflanzen wird dadurch erschwert, dass die DNS sowohl im Zellkern (nukleare DNS) als auch in Mitochondrien und Chloroplasten vorkommt. Die Mitochondrien-DNS und die Chloroplasten-DNS unterscheiden sich oft, aber nicht immer von der nuklearen-DNS (nDNS). Dieser Befund und die Tatsache, dass in den meisten Fällen nur grob angereicherte Zellkernfraktionen (sog. «nuclear pellets») zur Gewinnung von nDNS zur Verfügung standen, mögen die Gründe sein, dass bisher über die Eigenschaften pflanzlicher nDNS relativ wenige und zum Teil recht widersprüchliche Untersuchungen vorliegen [1-7].

Wir haben kürzlich ein Verfahren zur Gewinnung einer reinen Kernfraktion aus Tabakblättern veröffentlicht [8]. Nachstehend beschreiben wir die Isolierung von reiner Tabak-nDNS sowie deren Charakterisierung.

Experimenteller Teil. - 1. *Isolierung und Reinigung der Tabak-nDNS.* Als Ausgangsmaterial für die Isolierung der nDNS dienten nach unserem Verfahren gewonnene Zellkerne aus jungen Tabakblättern [8]. Aus 10 g Blättern liessen sich etwa 4×10^8 Kerne isolieren, die einen DNS-Gehalt von ca. 4 mg aufwiesen. Die Kerne wurden entweder direkt weiterverarbeitet oder bis zur

Aufarbeitung bei -70° gelagert (2–3 Monate). Pro Ansatz wurden 4×10^8 Zellkerne in 3,0 ml 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7,6 enthaltend 0,1 M Saccharose und 0,002 M $MgCl_2$ suspendiert und anschliessend während 10 Min. bei $1000 \times g$ und 4° abzentrifugiert. Der Rückstand wurde in 10 ml des oben beschriebenen Puffers suspendiert, und nach Zugabe von 10 mg Pronase (*Calbiochem*, B-Grade, nukleasefrei) während 20–25 Min. bei 41° inkubiert. Zunächst entstand eine hochviskose Suspension mit schleimigen Verklumpungen, welche sich aber im Laufe der Inkubation allmählich auflösten; besonders nach Zugabe einer Suspension von Pankreas- α -Amylase (500 μg , *Boehringer*), und Inkubieren während weiteren 5 Min. Anschliessend wurden 2,0 ml einer wässrigen 10% (g/v) Natriumlaurylsulfatlösung zugegeben und unter gelegentlichem Umrühren während 10 Min. bei 57° inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur (RT.) wurde die Lösung mit 10 ml Phenol, gesättigt mit 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7,6, unter leichtem Schütteln (1 Min., *Vortex Mixer*) vorsichtig extrahiert. Die wässrige Phase wurde abgehebert, noch 2mal mit ges. Phenol extrahiert, und danach während 20 Min. bei 30 000 g und RT. zentrifugiert. Nach Zugabe von 2 Volumenteilen Äthanol (-20°) zum Überstand liess sich beim Umrühren die ausfallende nDNS mit einem Glasstab aufwickeln. Die nDNS wurde zu 4 ml SSC (0,15 M NaCl in 0,015 M Trisnatriumcitrat, pH 7,0) gegeben, wo sie sich bei 4° innerhalb von 2–3 Tagen auflöste, und anschliessend während 48 Std. bei 4° gegen SSC dialysiert. Diese Lösung mit einer DNS-Konzentration von 300 bis 500 $\mu g/ml$ wurde bis zur Weiterverwendung bei -25° aufbewahrt.

Die weitere Reinigung der DNS erfolgte durch Zentrifugierung in einem neutralen CsCl-Gradienten: 3,75 g CsCl (*Merck*, p.a.) wurden in einem dickwandigen Polypropylenröhrchen mit 1 ml DNS-Lösung (400 μg) versetzt und mit SSC zum Endgewicht von 6,8 g aufgefüllt. Nach refraktometrischer Kontrolle der Dichte und Einstellung auf 1,706 gml^{-1} , sowie Überschichtung mit Paraffinöl, wurde in einem Winkelrotor während 60 Std. bei 40 000 U/Min. und 25° zentrifugiert (MSE TC 50). Die Fraktionierung der Gradienten erfolgte durch Anstechen der Röhrchen (10 Tropfen pro Fraktion). Nach UV.-Spektrophotometrie wurden die Fraktionen mit den höchsten DNS-Konzentrationen vereinigt und 2mal je 12 Std. gegen das 500fache Volumen SSC bei 4° dialysiert. Für die nachfolgenden Untersuchungen diente ausschliesslich im CsCl-Gradienten gereinigte DNS.

2. *Thermische Denaturierung.* Lösungen von 15–20 μg Tabak-nDNS/ml in SSC wurden auf 95° erwärmt unter gleichzeitiger Messung der Absorptionzunahme in einem modifizierten *Beckman*-Spektralphotometer, Modell DU. Die durch die thermische Ausdehnung des Lösungsmittels verursachten Konzentrationsänderungen wurden bei der Berechnung der Absorptionswerte berücksichtigt [9].

3. *Alkalische Denaturierung und Renaturierung.* Eine Lösung von 200 μg DNS in 2,0 ml SSC wurde mit 1 M NaOH auf pH 12 eingestellt, während 15 Min. bei 22° inkubiert und mit 0,5 M KH_2PO_4 neutralisiert. Die Hälfte der denaturierten DNS wurde 12 Std. bei 4° gegen das 500fache Volumen SSC dialysiert. Der Rest wurde für die Renaturierung zunächst 60 Min. gegen das 500fache Volumen $2 \times$ SSC dialysiert, hierauf 2 Std. bei 70° inkubiert, und schliesslich wie oben erwähnt gegen SSC dialysiert.

4. *Analytische Ultrazentrifugierung.* Konzentrierte Lösungen von nativer, alkalisch denaturierter sowie von renaturierter Tabak-nDNS (ca. 100 $\mu g/ml$) wurden mit $0,1 \times$ SSC auf eine Endkonzentration von 2–3 $\mu g/ml$ verdünnt. Als Referenz wurde DNS von *Micrococcus lysodeikticus* (*M. lys.*), isoliert nach *Marmur* [10], bis zu einer Endkonzentration von 1–1,5 $\mu g/ml$ zugefügt und anschliessend mit kristallinem CsCl (*Merck*, *suprapur.*) auf eine Dichte von 1,718 gml^{-1} eingestellt. Als Vergleichslösung in den Doppelsektorzellen diente eine Lösung von CsCl in $0,1 \times$ SSC der gleichen Dichte.

Alle Proben wurden gleichzeitig in einem AnG-Titanrotor bei 40 000 U/Min. und einer Temperatur von 25° während 25 Std. in einer *Beckman*-Ultrazentrifuge, Modell E, ausgerüstet mit UV.-Registriereinheit und Multiplexzusatz, zentrifugiert. Die Aufnahme der Absorptionskurven erfolgte bei 265 nm mit mittlerer Registriergeschwindigkeit und einem Papiervorschub von 5 mm/Sek. Die Schwebedichten wurden nach *Schildkraut et al.* [11] berechnet, wobei DNS von *M. lys.* von der Dichte 1,7310 gml^{-1} als Referenz diente.

5. *Übrige Bestimmungen.* Phosphor wurde nach nasser Veraschung kolorimetrisch bestimmt [12]. Für die quantitative Bestimmung von Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C), 5-Methylcytosin (MC) und Thymin (T) wurden die Basen nach Hydrolyse mit Ameisensäure papierchromatographisch aufgetrennt, eluiert und spektrophotometrisch ihre Molverhältnisse bestimmt [13]. Der Proteingehalt liess sich durch Bestimmung der Aminosäuren in einem salzsauren Hydrolysat er-

mitteln [14]. Der DNS-Gehalt in Tabakblättern und in Kernen wurde nach *Hamilton et al.* [8] bestimmt, die DNS-Konzentrationen in Lösungen entweder mit der Diphenylaminreaktion [15] oder durch direkte Messung der Absorption bei 258 nm, wobei 10 μg DNS/ml eine Absorption von 0,220 ergaben. Die direkte photometrische Bestimmung des A+T-Gehaltes erfolgte durch Auswertung des nativen Spektrums nach der Methode von *Hirschmann & Felsenfeld* [16].

Resultate und Diskussion. – 1. *Eigenschaften der isolierten Tabak-nDNS.* – 1.1. *Basenanalyse.* Tab. 1 zeigt die nach verschiedenen Methoden ermittelte Basenzusammensetzung von Tabak-nDNS sowie die zum Vergleich angeführten Literaturwerte von Tabak-Chloroplasten- und Kalbsthymus-DNS. Der Hauptunterschied zwischen Tabak-nDNS und Tabak-Chloroplasten-DNS besteht im Gehalt an 5-Methylcytosin, einer Base, die in pflanzlicher nDNS häufig vorkommt. Interessanterweise unterscheiden sich die Anteile der restlichen Basen in den drei angeführten Nukleinsäurenpräparaten – mit Ausnahme des 5-Methylcytosins – nur geringfügig. Die analytisch bestimmten Werte für G+C respektive A+T stimmen gut mit den aus der Schwebedichte und den aus dem nativen Absorptionsspektrum ermittelten Werten überein. Aus der Schmelzkurve wurde ein etwas höherer G+C-Gehalt errechnet (vgl. Abschnitt 2.1.).

Tabelle 1. *Basenzusammensetzung von Tabak-nDNS im Vergleich mit Literaturwerten von Tabak-Chloroplasten- und Kalbsthymus-DNS*

	Tabak-nDNS	Tabak-Chloroplasten-DNS [3]	Kalbsthymus-DNS [17]
Adenin (A)	30,8	30,4	28,3
Thymin (T)	29,6	29,0	28,3
Guanin (G)	19,2	19,5	21,9
Cytosin (C)	15,1	21,1	21,5
5-Methylcytosin (MC)	5,3	–	–
A+T	60,4	59,4	56,6
G+C+MC	39,6	40,6	43,4
A+T/G+C+MC	1,53	1,46	1,30
G/C+MC	0,94	0,92	1,02
G+C ¹⁾	44,3		
G+C ²⁾	36,7		
G+C ³⁾	38,7		

Die Konzentrationen der Basen sind ausgedrückt in mol/100 g Atome DNS-Phosphor.

¹⁾ Berechnet aus T_m nach der Gleichung $G+C = 2,44 (T_m - 69,3)$ [18].

²⁾ Berechnet aus der Schwebedichte nach der Gleichung $G+C = (\rho - 1,660) \times 100/0,098$ [11].

³⁾ A+T Gehalt berechnet aus dem UV.-Spektrum von nativer DNS [16].

1.2. *Optische Eigenschaften.* Die molare Extinktion bezogen auf den P-Gehalt [$\epsilon_{(P)}$] [17] ergibt einen Wert von 6400. Diese Grösse ist charakteristisch für native, doppelsträngige DNS [17]. Das Absorptionsmaximum liegt bei 258, das Minimum bei 230 nm. Aus dem Spektrum wurden die folgenden Verhältnisse für $A_{258\text{nm}}/A_{230\text{nm}} = 1,9$; für $A_{258\text{nm}}/A_{260\text{nm}} = 2,4$ berechnet.

1.3. *Analytische Ultrazentrifugierung.* Native Tabak-nDNS zeigt im CsCl-Gradienten ein symmetrisches Band mit einer Schwebedichte von 1,6960 g ml⁻¹ bezogen auf die DNS von *M. lys.* von der Dichte 1,7310 g ml⁻¹ (Fig. 1A). Im neutralen CsCl-Gradienten lässt sich Tabak-Chloroplasten-DNS infolge des geringen Dichteunterschiedes nicht von Tabak-nDNS unterscheiden [3]. Zur Prüfung auf verunreinigende

Chloroplasten-DNS muss das Präparat einer alkalischen Denaturierung und Renaturierung unterworfen werden. Da Chloroplasten-DNS infolge ihrer grösseren Homogenität vollständiger renaturiert als nDNS, kommt es zu einem Dichteunterschied und dadurch zu einer Auftrennung.

Die alkalische Denaturierung bei pH 12 (15 Min., 22°) führt zu einem Anstieg der Schwebedichte um $0,0160 \text{ g ml}^{-1}$ (Fig. 1B). Dieser Wert entspricht dem bei andern DNS-Präparaten gefundenen Anstieg für den Übergang von Doppelstrang- zur Einzelstrang-DNS [3]. Inkubieren der alkali-denaturierten Tabak-nDNS während 2 Stunden bei 70° in $2 \times \text{SSC}$ bewirkt eine partielle Abnahme der Schwebedichte um $-0,0057 \text{ g ml}^{-1}$ (Fig. 1C). Links davon (um $1,70 \text{ g ml}^{-1}$) lässt sich keine renaturierte Chloroplasten-DNS nachweisen.

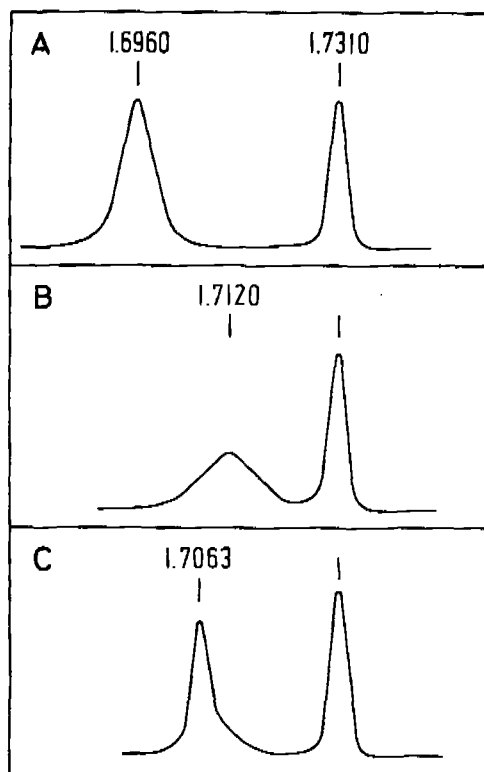


Fig. 1. Analyse von Tabak-nDNS durch Gleichgewichtszentrifugierung im CsCl Dichtegradienten
A: nativ; B: alkalisch denaturiert; C: nach alkalischer Denaturierung renaturiert. Als Referenz
dient DNS von *M. lys.* von der Dichte $1,7310 \text{ g ml}^{-1}$.

1.4. *Reinheit der isolierten Tabak-nDNS.* Aus den oben erwähnten Resultaten (Abschnitt 1.3.) lässt sich schliessen, dass die isolierte Tabak-nDNS keine nachweisbaren Mengen von Chloroplasten-DNS enthält. Die Präparate sind ausserdem frei von RNS (in den DNS Hydrolysaten ist papierchromatographisch kein Uracil nachweisbar) und von Polysacchariden (negative Anthronreaktion). Der Proteingehalt beträgt weniger als 1,4%.

2. *Untersuchungen über die Sekundärstruktur der Tabak-nDNS.* – 2.1. *Schmelzverhalten.* Das Schmelzverhalten einer bestimmten DNS lässt sich durch 3 Parameter

charakterisieren: a) die Hyperchromie $R | R := A_{258 \text{ nm}} (1\%) / A_{258 \text{ nm}} (25\%)$, wobei R ein Mass für die thermische Denaturierung darstellt und oft in % der totalen Hyperchromie ausgedrückt wird; b) die Schmelztemperatur $T_m [T_m = T_{(0,5 \text{ R})}]$ entspricht dem sogenannten «transition point» (Helix-Knäuel-Übergang), bei dem die Hälfte der Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basen gelöst sind. Der T_m -Wert ist von der Basenzusammensetzung der betreffenden DNS sowie von der Salzkonzentration der Lösung abhängig; c) das Schmelzintervall $\Delta T [\Delta T = T_{(0,84 \text{ R})} - T_{(0,16 \text{ R})}]$, das den Schmelzbereich in °C zwischen 16 und 84% der totalen Hyperchromie umfasst.

Die Schmelzkurve der Tabak-nDNS ist in Fig. 2A wiedergegeben. Der aus der Schmelzkurve ermittelte Wert für die Hyperchromie ergibt 1,39. Dies entspricht dem für native, doppelsträngige DNS allgemein charakteristischen Wert [18]. Die Schmelztemperatur in SSC beträgt 87,4°. Aus dieser wurde nach *Marmur & Doty* [18] der G+C Gehalt zu 44,3% errechnet (Tab. 1). Die Diskrepanz zwischen dem errechneten Wert aus T_m und demjenigen aus der Basenanalyse lässt sich dadurch erklären, dass die Gleichung von *Marmur & Doty* [18] streng genommen, nur für DNS-Präparate ohne 5-Methylcytosin gilt. Das ermittelte Schmelzintervall beträgt 6,6°. Für eine doppelsträngige DNS, die eine Normalverteilung der Basen über die ganze Molekel aufweist, ist die Schmelzkurve eine Sigmoide, die sich bei Umwandlung ins Normalwahrscheinlichkeitsnetz in eine Gerade überführen lässt. Aus dieser lässt sich nach *Knittel et al.* [19] T_m und ΔT leicht ermitteln (Fig. 2B).

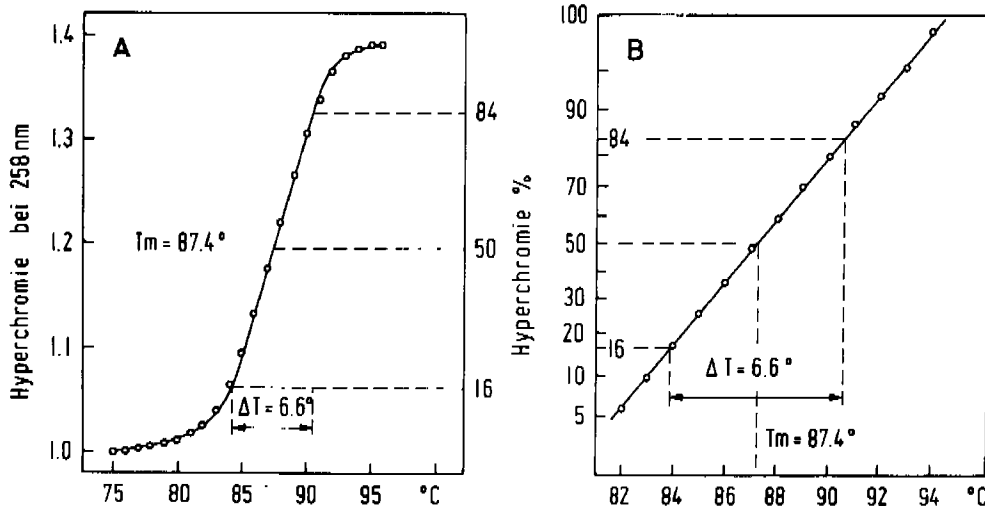


Fig. 2. Thermische Denaturierung von Tabak-nDNS

A: Schmelzkurve (in SSC); B: Schmelzkurve transformiert ins Normalwahrscheinlichkeitsnetz.

Nach *Doty et al.* [20] kann unter Berücksichtigung des idealen Schmelzverhaltens einer Poly-A-| T-DNS nach der in Tab. 2 angegebenen Gleichung σ berechnet werden. Dieser Wert gibt die mittlere Abweichung der G-| C-Verteilung vom G | C-Gehalt der DNS wieder und ist somit ein Mass für die Heterogenität der DNS. Aus den in Tab. 2 angeführten Werten ist ersichtlich, dass Tabak-nDNS in bezug auf die intramolekulare Heterogenität ähnlich derjenigen von Kalbsthymus ist, sich aber von *E. coli*- und Weizen-DNS unterscheidet.

Tabelle 2. Schmelzintervalle (ΔT) und Standardabweichung (σ) vom G+C Gehalt verschiedener DNS-Präparate

Material	ΔT	$\Delta T - 3$	$2\sigma^1$ %	Literatur
Poly-A+T-DNS	3,0	0	0	[20]
<i>E. coli</i> (K-12)	5,2	2,2	5,5	[20]
Tabak-nDNS	6,6	3,6	9,0	
Kalbsthymus	6,5	3,5	8,8	
Weizen	10,0	7,0	17,5	[7]

¹⁾ Die Standardabweichung ist in mol-% G+C ausgedrückt und wurde nach der Formel $2\sigma = 2,5 (\Delta T - 3,0)$ bestimmt [20].

2.2. *Heterogenität der thermischen Denaturierung.* Eine weitere Möglichkeit zur Erfassung der intramolekularen Heterogenität liefert die Dispersionskurve [21], bei der die Änderung der Schmelztemperatur als Funktion der Wellenlänge aufgetragen wird [$\Delta T_m = T_m(nm_i) - T_m(260nm)$]. Fig. 3 zeigt, dass Tabak-nDNS und Kalbsthymus-DNS fast identische Dispersionskurven ergeben, sich aber deutlich unterscheiden von der homogen schmelzenden DNS des Bakteriophagen T_4 von ähnlicher Basenzusammensetzung [21]. Tabak-nDNS und Kalbsthymus-DNS sind sich sehr ähnlich in bezug auf die Heterogenität der thermischen Denaturierung und damit auch in bezug auf ihre intramolekulare Heterogenität.

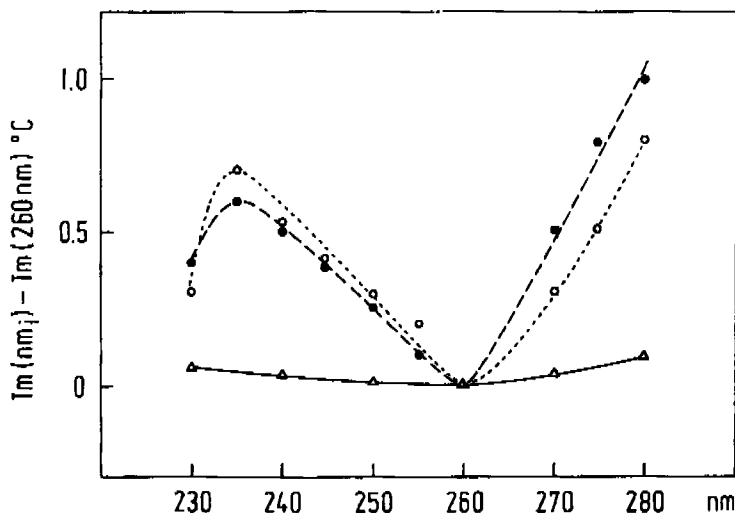


Fig. 3. Heterogenität der thermischen Denaturierung (Dispersionskurve) [21]
Tabak-nDNS (●); Kalbsthymus-DNS (○); DNS des Bakteriophagen T_4 (Δ).

3. *Untersuchungen über Denaturierung und Renaturierung.* - 3.1. *Denaturierung durch Salzzug.* Die Untersuchungen von *Lin & Chargaff* [22] zeigten, dass sich Kalbsthymus DNS durch Salzzug (Dialyse gegen Wasser) vollständig denaturieren liess. Auf diese Weise denaturierte DNS konnte durch Salzzugabe ganz oder teilweise, je nach vorangegangener Dialysedauer, renaturiert werden. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stellen wir bei der Tabak-nDNS keine oder höchstens nur sehr geringfügige Denaturierung durch Dialyse gegen Wasser fest. Nach 7tägiger Dialyse von

Tabak-nDNS gegen Wasser bei 4°, und thermischer Denaturierung in Wasser kann keine Veränderung der Hyperchromie beobachtet werden. Hingegen erniedrigt sich die Schmelztemperatur um 25° und der Schmelzbereich nimmt um 9,4° zu (Fig. 4 A, Kurve 1). Wird die gegen Wasser dialysierte nDNS zusätzlich 24 Stunden gegen SSC bei 4° dialysiert und anschliessend in SSC geschmolzen, so wird das Schmelzverhalten von nativer DNS wieder gefunden: $R = 1,39$, $T_m = 86^\circ$, $T = 6,6^\circ$ (Fig. 4 A, Kurve 2). Wir vermuten, dass divalente Kationen (Mg^{2+}) bei der Zellkernisolierung an die DNS gebunden werden und entscheidend zur Stabilisierung der Doppelhelixstruktur beitragen. Eine vollständige und irreversible Denaturierung wird erst dann erreicht, wenn die Tabak-nDNS zuerst 24 Stunden gegen 0,01 M EDTA, pH 7,0 und anschliessend 6 Tage gegen Wasser dialysiert wird (Fig. 4 B, Kurve 1). Anschliessende Dialyse gegen SSC vermag in diesem Fall das ursprüngliche Schmelzverhalten der nativen DNS nicht wieder herzustellen (Fig. 4 B, Kurve 2).

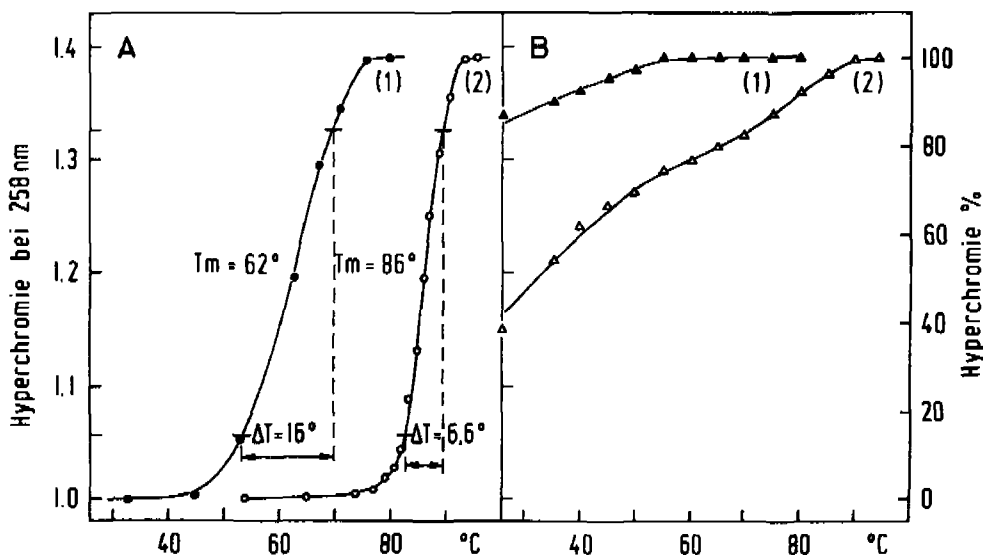


Fig. 4. Denaturierung von Tabak-nDNS durch Salzentzug

A (1): dialysiert gegen Wasser (7 Tage), geschmolzen in Wasser (●).

(2): dialysiert gegen Wasser (7 Tage), anschliessend gegen SSC (1 Tag), geschmolzen in SSC (○).

B (1): dialysiert gegen 0,01 M EDTA, pH 7,0 (1 Tag), anschliessend gegen Wasser (6 Tage), geschmolzen in Wasser (▲).

(2): dialysiert wie B (1), zusätzlich aber noch gegen SSC (1 Tag), geschmolzen in SSC (△).

3.2. Renaturierung nach partieller thermischer Denaturierung. Tabak-nDNS wird durch Erwärmen entweder vollständig oder partiell denaturiert. Die DNS-Lösungen werden anschliessend innerhalb von 30 Min. auf 25° gekühlt und nach 15stdg. Stehenlassen erneut geschmolzen. Nach vollständiger Denaturierung (Fig. 5 A, Kurve 1) und Abkühlen auf 25° beträgt die Hyperchromie 1,1; beim Wiedererhitzen wird das typische Schmelzverhalten der nativen DNS nicht mehr gefunden (Fig. 5 A, Kurve 2). Kurve 1 in Fig. 5 B zeigt die partielle Denaturierung von nativer DNS bis zu 78% der totalen Hyperchromie. Beim Abkühlen dieser Lösung wird die ursprüngliche Absorption nur annähernd erreicht ($R = 1,04$), doch kann beim nachfolgenden Erwärmen das typische Schmelzverhalten nativer DNS mit praktisch unverändertem

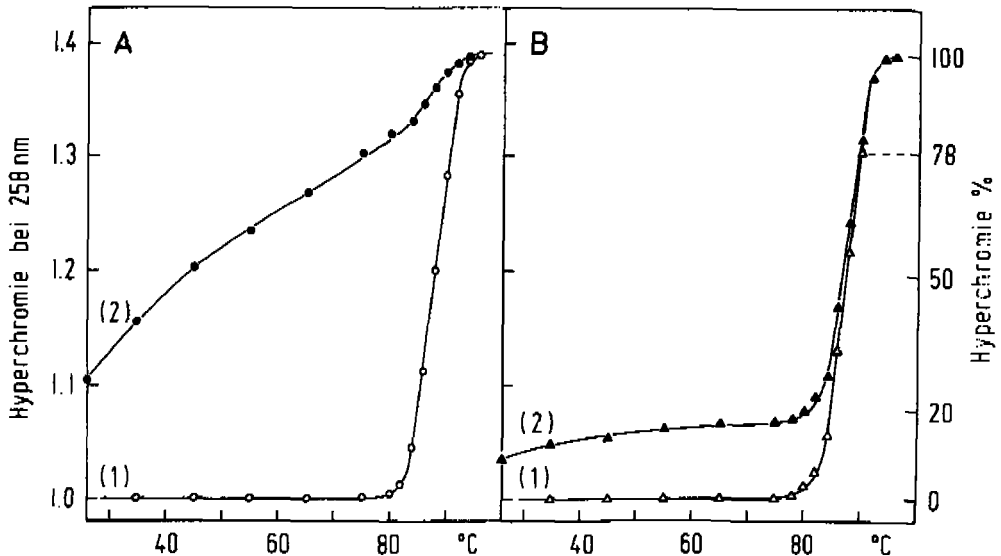


Fig. 5. Renaturierung von Tabak-nDNS nach vollständiger und partieller thermischer Denaturierung
 A (1): vollständige thermische Denaturierung (○).
 (2): nach langsamem Abkühlen wieder geschmolzen (●).
 B (1): partielle thermische Denaturierung bis zu 78% Hyperchromie (△).
 (2): nach langsamem Abkühlen wieder geschmolzen (▲).

Schmelzpunkt beobachtet werden (Fig. 5B, Kurve 2). Dieser Befund weist auf das beträchtliche Renaturierungsvermögen von partiell denaturierter Tabak-nDNS hin.

Herrn O. Jenni danken wir für die sorgfältige Anfertigung der Figuren.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. W. Lytleton & G. B. Petersen, *Biochim. biophys. Acta* **80**, 391 (1964).
- [2] K. K. Tewari & S. G. Wildman, *Science* **153**, 1269 (1966).
- [3] P. R. Whitfeld & D. Spencer, *Biochim. biophys. Acta* **157**, 333 (1968).
- [4] B. R. Green & M. P. Gordon, *Biochim. biophys. Acta* **145**, 378 (1967).
- [5] S. A. Bard & M. P. Gordon, *Plant Physiol.* **44**, 377 (1969).
- [6] S. D. Kung, M. A. Moscarello & J. P. Williams, *Biochim. biophys. Acta* **232**, 614 (1971).
- [7] T. Huguet & L. Jouanin, *Biochim. biophys. Acta* **262**, 431 (1972).
- [8] R. H. Hamilton, U. Künsch & A. Temperli, *Analyt. Biochemistry* **49**, 48 (1972).
- [9] M. Mandel & J. Marmur, *Methods in Enzymology*, S. P. Colowick & N. O. Kaplan, ed., vol. 12B, p. 195, Academic Press, New York 1968.
- [10] J. Marmur, *J. mol. Biol.* **3**, 208 (1961).
- [11] C. L. Schildkraut, J. Marmur & P. Doty, *J. mol. Biol.* **4**, 430 (1962).
- [12] E. J. King, *Biochem. J.* **26**, 292 (1932).
- [13] E. Chargaff, R. Lipshitz, C. Green & M. E. Hodes, *J. biol. Chemistry* **192**, 223 (1951).
- [14] S. Blackburn, *Amino Acid Determination*, p. 11, M. Dekker, Inc. New York 1968.
- [15] K. Burton, *Biochem. J.* **62**, 315 (1956).
- [16] S. Z. Hirschman & G. Felsenfeld, *J. mol. Biol.* **16**, 347 (1966).
- [17] E. Chargaff, *The Nucleic Acids*, E. Chargaff & J. N. Davidson ed., vol. 1, p. 307, Academic Press, New York 1955.
- [18] J. Marmur & P. Doty, *J. mol. Biol.* **5**, 109 (1962).
- [19] M. D. Knittel, C. H. Black, W. E. Sandine & D. K. Fraser, *Canad. J. Microbiol.* **14**, 239 (1968).
- [20] P. Doty, J. Marmur & N. Sueoka, *Brookhaven Symp. Biol.* No. 12, 1 (1959).
- [21] G. Felsenfeld & G. Sandeen, *J. mol. Biol.* **5**, 587 (1962).
- [22] H. J. Lin & E. Chargaff, *Biochim. biophys. Acta* **123**, 66 (1966).