

Die Anwendung der Neutronenaktivierungsanalyse auf Spurenelementuntersuchungen in Nukleinsäuren

Von

G. Stehlik und **H. Altmann**

Aus dem Institut für Biologie und Landwirtschaft
des Reaktorzentrums Seibersdorf
(Leiter: Doz. Dr. K. Kaindl)

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 26. August 1963)

Es wird ein Verfahren beschrieben, Spurenelemente in Nukleinsäuren nach Neutronenaktivierung und nasser Veraschung des organischen Materials chemisch aufzutrennen und quantitativ zu bestimmen. Dabei wurden nach Trägerzusatz die einzelnen Elemente durch spezifische Komplexbildner bei verschiedenen pH-Werten mit Hilfe von Flüssigextraktionen voneinander getrennt. Durch Vergleich der erhaltenen Gammapektren mit solchen aus Standards, die unter gleichen Bedingungen aufgenommen wurden, konnten diese Spurenelemente quantitativ bestimmt werden. Für die Ermittlung des spezifischen Gehaltes der Nukleinsäuren an diesen Metallionen war es besonders vorteilhaft, gleichzeitig im selben Arbeitsgang auch den aktivierten Phosphor mitzumessen. Der nach dieser Methode untersuchte Spurenelementgehalt verschiedener Nukleinsäuren wird angegeben.

I. Einleitung

Die Bedeutung der Spurenelemente in biologischem Material und das Interesse an ihnen stieg in den letzten Jahren stark an. Seit sich aber das Hauptaugenmerk der Analytiker vom komplexen biologischen Material (Pflanzenteile, Gewebeschnitte usw.) immer mehr den einzelnen Zellorganellen und noch feineren Fraktionen zuwandte, wurden die Spurenelement-Bestimmungen immer schwieriger. Man benötigte entweder große Mengen an Ausgangsmaterial, wobei sich natürlich bei der Aufarbeitung leicht Verunreinigungen einschleichen können, oder aber

man mußte bei Verwendung geringerer Quantitäten nahe an der Nachweisbarkeitsgrenze der einzelnen Ionen arbeiten.

In letzter Zeit wurde dem Analytiker mit der „Aktivierungsanalyse“ eine Methode in die Hand gegeben, bei der mit Hilfe der entstandenen radioaktiven Nuklide die einzelnen Elemente noch in sehr kleinen Konzentrationen relativ genau bestimmt werden können.

Mit Hilfe der Neutronenaktivierung kann nun die Erfäßbarkeit der meisten Elemente gegenüber den bis jetzt empfindlichsten Methoden mindestens um den Faktor 10 unterboten werden. Neben der hohen Genauigkeit dieser Methode besteht aber, wie erwähnt, ihr größter Vorteil darin, daß alle Elemente, die uns interessieren — es sind dies Kupfer, Zink, Mangan, Nickel, Cadmium, Kobalt, Molybdän, Silber, Natrium, Kalium, Chrom und Eisen —, in einem Arbeitsgang bestimmt werden können. Das ist von wesentlicher Bedeutung, da uns meistens nur geringe Mengen Untersuchungsmaterial zur Verfügung stehen.

Für die Ermittlung des spezifischen Spurenelementgehaltes der Nukleinsäuren erwies es sich als besonders günstig, nach Abtrennung der Metallionen im gleichen Arbeitsgang auch noch den Phosphor zu bestimmen. Es ist dies ohne größere Schwierigkeit möglich. Durch diese zusätzliche Bestimmungsgröße hat man neben der sonst üblichen UV-Extinktionsmessung bei 260 bzw. 290 μ eine gute Kontrolle für etwaige Verluste während der Aufarbeitung in der Hand.

Von den zahlreichen isolierten und untersuchten Fraktionen einer Zelle zählen die Nukleinsäuren zu den wichtigsten und interessantesten.

Bei vielen Enzymen wurde die Rolle der Metalle, die diese auf Struktur und Funktion ausüben, bereits genauestens untersucht. In den Nukleinsäuren wurden zwar bereits von mehreren Autoren¹⁻³ Spurenelemente nachgewiesen, doch besteht über ihre biologische Bedeutung noch Unklarheit.

Untersuchungen von *Loring* und *Waritz*¹ am Tabakmosaikvirus (*TMV*) zeigten, daß die in der Viruspartikel enthaltenen Spurenelemente zum größten Teil an dessen *RNS* gebunden sind. Nach Entfernung von Metallionen wurde die Infektiosität des kompletten *TMV* und der daraus isolierten Nukleinsäure erheblich vermindert.

Auch in-vitro-Versuche bewiesen verschiedene Einflüsse von Spurenelementen auf Nukleinsäureeigenschaften.

Dove und *Davidson*⁴ fanden eine Stabilisierung der *DNS* gegen Hitzedenaturierung durch Kobalt, Magnesium und vor allem durch Silber.

¹ *H. S. Loring* und *R. S. Waritz*, *Science* [New York] **125**, 646 (1957).

² *K. Fuwa*, *W. E. C. Wacker*, *R. Druyan*, *A. F. Bartholomay* und *B. L. Vallee*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **46**, 1298 (1960).

³ *W. E. C. Wacker* und *B. L. Vallee*, *J. Biol. Chem.* **234**, 2357 (1959).

⁴ *W. F. Dove* und *N. Davidson*, *J. Mol. Biol.* **5**, 467 (1962).

Yamane und *Davidson*^{5, 6} bemerkten eine starke Abnahme der „intrinsic viscosity“ und eine Änderung der UV-Absorption von *DNS* nach Zugabe von verschiedenen Schwermetallionen. Inwieweit die hier in vitro gefundenen Ergebnisse, daß Spurenelemente Wasserstoffbrücken ersetzen, allgemein anwendbar sind, bedarf noch genauerer Klärung.

Schwermetallionen können viele Enzymreaktionen stimulieren bzw. hemmen^{7, 8}. Auch in Zusammenhang mit der Strahlenresistenz dürfte den Spurenelementen in den Nukleinsäuren eine wichtige Rolle zukommen^{9, 10}. In den Nukleinsäuren sind die stark negativ geladenen Phosphatgruppen gute Bindungsstellen für Kationen, doch dürften verschiedene Metallionen, besonders der Übergangsmetalle, teilweise chelatartig an die Basen der Nukleinsäuren gebunden sein. Die genannten Übergangselemente können auf Grund ihrer Elektronenkonfiguration in die 3d-Schale Elektronen aufnehmen, sie können kovalente Bindungen eingehen und somit Molekülkomplexe bilden. Die meisten von ihnen sind leicht zum Valenzwechsel befähigt. Auf Grund dieser Eigenschaften können diese Elemente auch bevorzugt jene katalytischen Funktionen ausüben, die sie als Co-Fermente und möglicherweise auch als Stoffwechselregulatoren in Organismen zu erfüllen haben.

Nachfolgend sind die Methode und die Ergebnisse der Spurenelementanalysen in Nukleinsäuren angegeben. Durch Untersuchung derselben Nukleinsäure nach verschiedenen Vorbehandlungen sollte geprüft werden, inwieweit es bei verschiedenen Nukleinsäurepräparationen bzw. -reinigungen zu Abspaltungen von Spurenelementen kommen kann. Es sollte ein Weg gefunden werden, bei dem einerseits die untersuchten Schwermetallionen noch nicht herausgespalten, andererseits aber auch nicht während des Aufarbeitungsganges aus dem „pool“ freier Ionen der Zelle angelagert werden. Gleichzeitig sollte aus der Menge der nach verschiedenen Behandlungen abgespaltenen Metallionen darüber nähere Auskunft erhalten werden, wie fest an die Nukleinsäure gebunden die einzelnen Elemente vorliegen. Aus dieser Bindungsstärke könnte man nämlich ersehen, ob das betreffende Metallion nur elektrostatisch an der Phosphatgruppe oder chelatartig gebunden an den Purinbasen sitzt oder aber eine Chelatbindung eingegangen ist, an der Base und Phosphatgruppe beteiligt sind.

⁵ *T. Yamane* und *N. Davidson*, *Biochim. Biophys. acta* [Amsterdam] **55**, 609 (1962).

⁶ *T. Yamane* und *N. Davidson*, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 2599 (1961).

⁷ *G. Pfeleiderer* und *H. M. Rauen*, „Biochemisches Taschenbuch“ Springer-Verlag, 1956, 973.

⁸ *H. Altmann*, *G. Stehlik* und *K. Kaindl*, *Nature* [London] **199**, 823 (1963).

⁹ *G. Stehlik*, *H. Altmann* und *K. Kaindl*, *Nature* [London], in Druck.

¹⁰ *H. Altmann*, *G. Stehlik* und *K. Kaindl*, *Atompraxis* **9**, 255 (1963).

II. Methodik

a) *Präparation der Nukleinsäuren*

Hefe-Ribonukleinsäure: Für die Testuntersuchungen wurde in allen Fällen *RNS* pract. aus Hefe der Firma Serva Entwicklungslabor, Heidelberg, Nr. 34410, verwendet.

RNS umgefällt: Hefe-*RNS* wurde in 0,1 mol Trispuffer [Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan] von pH 7,0 gelöst, mit dem doppelten Volumen Äthanol in der Kälte gefällt und abzentrifugiert.

RNS, 3fach umgefällt: Wie oben beschrieben, nur dreimal wiederholt.

RNS + EDTA: Hefe-*RNS* umgefällt aus 0,1 mol Trispuffer von pH 7,0, dem 1% *EDTA* (Äthylendiaminotetraessigsäure) bzw. beim 2. Umfällen 0,1% *EDTA* zugesetzt waren. Das dritte Umfällen wurde in reinem 0,1 Mol Trispuffer vorgenommen.

RNS + DTPA: Dem Trispuffer waren 0,1 bzw. 0,01% bzw. kein *DTPA* (Diäthylentriaminopentaessigsäure)* zugesetzt.

RNS nach Ammonformiat: Hefe-*RNS* wurde in 1,0 mol Ammonformiat gelöst, 3 Min. bei 100°C belassen, nach raschem Abkühlen mit dem doppelten Volumen Äthanol gefällt und abzentrifugiert.

RNS nach γ -Bestrahlung: Eine 0,02proz. Lösung der Hefe-*RNS* in 0,1 mol Trispuffer von pH 7,0 wurde 20000 rad ausgesetzt. Die Bestrahlung selbst erfolgte bei 23°C mit Hilfe einer 600 Curie ^{60}Co -Quelle. Die *RNS* wurde anschließend sofort mit dem doppelten Volumen Äthanol in der Kälte ausgefällt und abzentrifugiert.

RNS acetyliert: Es wurde acetylierte Hefe-*RNS* der Firma Serva Entwicklungslabor, Heidelberg, verwendet (Nr. 34420).

DNS aus Heringsperma: Untersucht wurde ein Präparat *DNS* pract. aus Heringsperma der Firma Serva Entwicklungslabor, Heidelberg (Nr. 18580).

DNS aus Lachssperma: Präparat *DNS* reinst, hochpolymer, aus Lachssperma, ebenfalls der Firma Serva Entwicklungslabor, Heidelberg (Nr. 18570).

TMV-RNS: Tabakmosaikvirus wurde aus *Nicotiana tabacum*-Pflanzen durch Extraktion mit 0,1 mol Phosphatpuffer von pH 7,0 gewonnen. Nach Fällung und Zentrifugation der cytoplasmatischen Nukleoproteide bei pH 4,7 in der Kälte wurde das *TMV* bei pH 3,4 ebenfalls in der Kälte gefällt und abzentrifugiert. Zur Reinigung wurde mehrmals aus 0,1 mol Phosphatpuffer und zuletzt aus 0,1 mol Trispuffer umgefällt. Aus dem so gereinigten *TMV* wurde die Nukleinsäure durch dreimaliges kurzzeitiges Kochen mit 1,0 mol Ammonformiat¹¹ herausgespalten und in der Kälte mit dem doppelten Volumen Äthanol gefällt.

NS aus Tabakpflanzen: Tabakpflanzen der Species:

Nicotiana glauca
Nicotiana semperante
Nicotiana debneyi
Nicotiana bigelovii
Nicotiana bigelovii \times *glauca*

* *DTPA* wurde uns von der Firma Ciba für die Versuche zur Verfügung gestellt.

¹¹ H. Altmann und G. Stehlik, *Atompraxis* 8, 471 (1962).

wurden in einem Mixer mit 60proz. Äthanol homogenisiert und dadurch die freien Nukleotide herausgelöst. Nach Zentrifugation wurden die Zellrückstände zur Entfernung der Farbstoffe und Lipide mit Alkohol, Alkohol—Äther (3:1) und zuletzt mit reinem Äther erschöpfend extrahiert¹¹. Das Herausspalten der Nukleinsäuren erfolgte wieder durch kurzzeitiges Erhitzen mit 1,0 mol Ammonformiat und anschließende Fällung mit Äthanol. Zur Prüfung der Reinheit wurde von aliquoten Teilen mit Hilfe eines Zeiss-Spektralphotometers PMQ II in Quarzküvetten das Spektrum im UV-Bereich aufgenommen.

b) Proben- und Standardbereitung für die Bestrahlung

Die Quarzutröhrchen (Länge 65 mm, Durchmesser 8 mm) wurden vor Verwendung mit rauch. HNO₃ und mehrmals mit dreifach destill. H₂O gewaschen. Die Proben ließ man in diesen Röhrchen zur Trockene dampfen und verschloß sie mit einem Teflonstopfen. Nach sorgfältiger Reinigung ihrer Außenseite wurden die Röhrchen unter vermindertem Druck in spurenelementfreiem Plastik (Wye Plastics, Ltd. 5774/57) eingeschmolzen. Als Dosimeter für eine Neutronenfluß-Korrektur wurde jeder Probe ein in Plastik eingeschmolzener 50,0 mm langer Molybdändraht (Gewicht ca. 0,98 mg) beigefügt. Da die Versuchsbedingungen bei der Bestrahlung jeweils etwas differieren, wurden in jeder Bestrahlungsposition Standards mit bekanntem Spurenelementgehalt gleichzeitig mitaktiviert. Obwohl sich theoretisch aus einer vorhandenen Aktivität die Gesamtmenge des jeweiligen Elements nach Formel I berechnen läßt, kommt man mit Vergleichsstandards zu genaueren Resultaten, da sowohl die Ungenauigkeiten der Werte für Neutronenfluß und Einfangsquerschnitt als auch die methodischen Fehlerquellen im Aufarbeitungsgang eliminiert werden können.

$$A_t = 6 \cdot 10^{23} f \sigma \Theta \frac{W}{M} (1 - e^{-0,693 t/T}) \cdot e^{-0,693 d/T} \quad (I)$$

wobei: f = Neutronenfluß (in Neutronen pro cm² und sec)

σ = Einfangsquerschnitt (in barn)

Θ = Häufigkeit des Isotops (in %)

W = Probengewicht (in g)

A_t = Aktivität zur Zeit t (in Zerfällen pro sec)

M = Atomgewicht

T = Halbwertszeit

d = Abklingzeit

Die Eichlösungen wurden jeweils in den Quarzutröhrchen auf einem Filterstreifen eingedampft und wie Analysenproben weiterbehandelt. Die Zusammensetzung der Elemente in den Eichlösungen siehe Tab. 3.

Diese Proben wurden in 2 oder 3 Schichten zu je 3 Stück zusätzlich noch in einen Plastikschlauch eingeschmolzen, mit einer 0,5 mm starken, leicht aufrollbaren Aluminiumhülle umgeben und so in *Containern* direkt im Core des Astra-Reaktors bestrahlt oder zu 3—4 Stück in verschraubbaren Polyäthylenbehältern (100 ml Inhalt) mit Hilfe der pneumatischen Rohrpostanlage in Core-Nähe gebracht. Die Dauer der Bestrahlung variierte zwischen 1 und 2 Stdn. (integrierter therm. Neutronenfluß ca. $1 \cdot 10^{16}$ n/cm²) bei der Bestimmung von Cu, Ni, Zn, Mn, Cd, Na, K und P. Nach Beendigung der Bestrahlung wurden während einer Wartezeit von 45 Min. die Radionuklide mit kurzer Halbwertszeit abklingen gelassen. Bei der Bestimmung von Co,

Fe, Cr, Mo, Ag und wieder P wurden die Proben in Quarzglasröhrchen, die mit Schliffstopfen verschlossen werden konnten, zur Trockene gedampft und in verschweißten Aluminiumbehältern im Reaktorcore neutronenbestrahlt. Nach einer diskontinuierlichen Bestrahlung während 8—10 Tage (integrierter therm. Neutronenfluß ca. $5 \cdot 10^{18} \text{ n/cm}^2$) ließ man störende kürzerlebige Radionuklide bei einer Wartezeit von einer Woche abklingen. Für eine Neutronenflußkorrektur wurden diesen Proben Dosimeter aus einer Aluminium—Kobalt-Legierung (Bestimmung der therm. Neutronen) bzw. aus einer Aluminium—Nickel-Legierung (Bestimmung der schnellen Neutronen) beigegeben.

c) Veraschung

Die vorteilhafte Veraschung der Proben auf trockenem Wege läßt sich hier leider nicht anwenden, da ein Teil der untersuchten chemischen Elemente selbst bei relativ niederen Temperaturen flüchtig ist. Bei den uns interessierenden Elementen entstehen z. B. nach einer 12stdg. Veraschung bei 500°C folgende Verluste: Eisen ca. 19%, Kobalt ca. 25% und beim Silber sogar ca. 33%. Bei der nassen Veraschung mit einem Säuregemisch $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4:\text{H}_2\text{SO}_4 = 3:1:1$ treten hingegen keine nennenswerten Verluste auf¹².

Wir verwendeten eine Veraschungssäure der Zusammensetzung $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4:\text{H}_2\text{SO}_4 = 50:5:1$, deren Siedepunkt noch etwas tiefer liegt, und konnten ebenfalls keine Verluste feststellen. Da wir auch besonderen Wert auf die quantitative Bestimmung des Phosphors legten, untersuchten wir eventuelle Verluste an Phosphorsäure nach 3-, 6- und 9stdg. Kochen und konnten hier ebenfalls keine nennenswerten Abnahmen bemerken. Das bestrahlte Probenmaterial wurde nach der oben beschriebenen Wartezeit mit einer Trägerlösung von inaktiven Metallionen (s. Tab. 1) versetzt und anschließend mit 10 ml der Veraschungssäure in Kjeldahl-Veraschkungskölbchen gespült.

Tabelle 1. Zusammensetzung der Trägerlösung (in Milligramm)

I. Bestimmung bei integriertem Neutronenfluß von ca. $1 \cdot 10^{18} \text{ n/cm}^2$		II. Bestimmung bei integriertem Neutronenfluß von ca. $5 \cdot 10^{18} \text{ n/cm}^2$	
Cu 0,02	Cd 0,02	Ag 0,08	Mo 0,06
Zn 0,06	Na 0,10	Co 0,05	Cr 0,10
Mn 0,02	K 0,10	Fe 0,40	P 0,50
Ni 0,15	P 0,50		

Um das zur Trockene gedampfte Probenmaterial quantitativ aus den Röhrchen zu lösen, wurden diese nach sorgfältiger Reinigung ihrer Außenseite mit der Öffnung nach unten in die Veraschkungskölbchen gebracht und mit einem Glasstab derart aufgespießt, daß die Röhrchenöffnung über der Säureoberfläche zu liegen kam (s. Abb. 1).

Die jeweils verdampfte Veraschungssäure wurde durch Zugabe von rauchender HNO_3 ersetzt. Nach vollkommener Veraschung der Proben wurde Wasser zugegeben und nochmals aufgeköcht, um nitrose Gase zu entfernen.

¹² J. Pijck, J. Gillis und J. Hoste, Internat. J. appl. Rad. Isotopes **10**, 149 (1961).

d) *Chemische Trennung*

Bei der chemischen Auftrennung der Elemente wurde eine modifizierte Methode des Aufarbeitungsganges von *Höfner*¹³ angewendet. Nach dem Erkalten wurden die veraschten klaren Lösungen mit wenig Wasser in 150 ml-Schütteltrichter gespült und mit 5 Tropfen Kresolrot versetzt. Nach Einstellen eines pH-Wertes von 8,5 mit NH_3 konz. (Indikator schlägt nach Violett um) wurden 4 ml einer 40proz. Natriumcitratlösung zugefügt und Cu bzw. Ag mittels Bleidiäthylthiocarbaminat (*DDTC*) nach *Scharrer* und *Schaumlöffel*¹⁴ quantitativ abgetrennt. Gegenüber der kolorimetrischen Bestimmung wurde das Cu 2- bis 3mal je 2 Min. lang mit 15 ml Portionen einer ca. 0,02proz. chloroformischen $\text{Pb}(\text{DDTC})_2$ -Lösung geschüttelt und anschließend die vereinigten Extrakte mit Wasser von pH 8,5 gewaschen. Das Waschwasser ent-

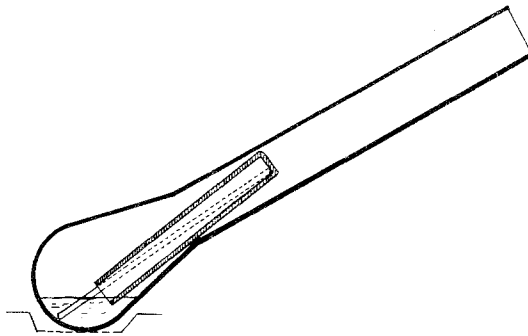


Abb. 1. Herauslösen und Veraschen des Analysenmaterials nach Neutronenaktivierung

hielt Na-, K- und Citrat-ionen. Nach dem Waschen wurde zur vollständigen Phasentrennung 30 Min. gewartet und anschließend die das Cu enthaltende CHCl_3 -Phase in Aluminiumschälchen (Durchmesser 59 mm, Höhe 7 mm, Blechdicke 0,4 mm) zur Trockene gedampft. Zur Aufnahme der Gamma-spektren in einem R.I.D.L. 200 Kanalgerät wurden diese Aluminiumschälchen direkt auf einen $3'' \times 3''$ NaJ-(Tl)-Kristall gestellt und bei gleicher Geometrie unter Berücksichtigung der Totzeit des Spektrometers gleich lang gemessen.

In der Cu-freien Lösung wurde bei unverändertem pH durch Zugabe von 1,5 ml einer 2proz. alkohol. Dimethylglyoximlösung das Ni gefällt und der gebildete Komplex zweimal mit je 15 ml CHCl_3 extrahiert. Vor der letzten Extraktion wurden nochmals 0,5 ml Reagenslösung zugefügt. Die vereinigten CHCl_3 -Extrakte wurden wieder, wie bereits beim Cu beschrieben, mit Wasser von pH 8,5 gewaschen und nach völliger Phasentrennung in Aluminiumschälchen gemessen. Wegen der kürzeren Halbwertszeit wurde das Ni noch vor dem Cu gewaschen, eingedampft und gemessen.

In der Restlösung wurden ohne Veränderung des pH-Wertes Co, Zn und Cd mit einer 0,05proz. Lösung von Dithizon in CHCl_3 3mal je 5 Min. geschüttelt und dadurch als primäre Dithizonate extrahiert. Die abgetrennten organischen Phasen wurden wieder, wie schon beim Cu beschrieben, mit Wasser

¹³ W. Höfner, Landwirtsch. Forsch. **13**, 287 (1960).

¹⁴ K. Scharrer und E. Schaumlöffel, Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenkde. **87**, 1 (1959).

von pH 8,5 gewaschen und nach dem Eindampfen zur Gamma-Messung gebracht.

In der wäßrigen Phase, die nach Abtrennung obiger Elemente verblieb, konnten Mn und Fe nach Fällung als Diäthylthiocarbamate mit CHCl_3 extrahiert werden. Um die zeitraubende Oxydation des Mn mittels Luft-sauerstoff¹³ zu umgehen, wurden die Proben mit 1 ml Bromwasser (ca. 0,2 mol) versetzt, wobei der Indikator in ein intensives Violett umschlägt. Durch Zugabe etwa einer Spatelspitze voll festem Na-DDTC bilden sich die innerkomplexen Diäthylthiocarbamate. Diese wurden mit 2×15 ml CHCl_3 je 2 Min. lang extrahiert und die vereinigten CHCl_3 -Lösungen wieder mit Wasser von pH 8,5 gewaschen. Da die Dissoziation des citratgebundenen Fe durch Ansäuern auf pH 6,5 (Umschlag des Indikators von Violett nach Gelb) gesteigert wird, wurde nach Einstellen dieses pH-Wertes noch 2mal mit CHCl_3 extrahiert, wobei erneut Na-DDTC zugefügt wurde. Die CHCl_3 -Lösung wurde mit Wasser von pH 6,5, das keine Citrat-ionen enthielt, gewaschen und anschließend nach Vereinigung mit obigen CHCl_3 -Extrakten eingedampft und gemessen.

Zur Isolierung von Mo wurde die nach Abtrennung von Mn und Fe verbliebene wäßrige Restphase nach *Schaumlöffel*¹⁵ mit verd. H_2SO_4 (1:1) bis zum Umschlag des Indikators auf Rot gebracht und durch Zugabe von weiteren 0,5 ml dieser Säure auf einen pH-Wert von ca. 0,5 eingestellt. Nach Mischen und Abkühlen wurden tropfenweise 2 ml einer 6proz. wäßrigen Kupferron-Lösung zugesetzt und das ganze mit 10 ml CHCl_3 2 Min. lang extrahiert. Nach weiterer Zugabe von 1 ml Kupferron-Lösung wurde nochmals mit 10 ml CHCl_3 geschüttelt und die vereinigten organischen Phasen, wieder in Aluminiumschälchen eingedampft, zur Messung gebracht.

Für die Bestimmung von Na und K genügte es, nach Auffüllen der verbliebenen Restlösung auf 100 ml eine 10 ml-Portion eingedampft zur Messung zu bringen. Die restlichen 90 ml dienten der Phosphatbestimmung.

Das Phosphat wurde in der Hitze als MgHPO_4 gefällt¹⁶.

Zu diesem Zwecke wurde die saure Restlösung nach Zugabe von 60 mg K_2HPO_4 als Träger und je 20 mg NaCl und KCl als Rückhaltsträger mit einem Überschuß an Magnesiamixtur versetzt, 10 ml einer gesätt. NH_4Cl -Lösung zugefügt und bis zum beginnenden Sieden erhitzt. Unter ständigem Umrühren wurde 2,5proz. NH_4OH zufließen gelassen. Nach dem Erkalten wurden noch 10 ml konz. NH_4OH zugesetzt. Während einer Wartezeit von einer Woche ließ man mitgerissene Spuren an ^{24}Na und ^{42}K ¹⁷ abklingen und bestimmte dann im abgesaugten und gewaschenen Niederschlag die Beta-Aktivität des P mittels eines Endfensterzählrohres. Nach Auflösen des Phosphatniederschlages in verd. HCl kann man die ^{32}P -Aktivität auch mittels eines Flüssigkeitszählrohres messen.

e) Auswertung der Meßergebnisse

Die vom Gammaskpektrometer gemessenen und gespeicherten Impulsraten wurden nach automatischer Leerwertsubtraktion mit Hilfe eines Schnelldruckers auf Papierstreifen registriert. Abb. 2 zeigt an Hand eines Gamma-Spektrums von ^{64}Cu die Auswertung in quantitat. Hinsicht. Diese

¹⁵ E. Schaumlöffel, Landwirtsch. Forsch. **13**, 278 (1960).

¹⁶ B. Schmitz, Z. anal. Chem. **45**, 512 (1906).

¹⁷ A. H. A. Heyn und H. L. Finston, Analyt. Chem. **32**, 328 (1960).

wurde so gewählt, daß man, ohne das Spektrum zeichnen zu müssen, nur durch Ablesen vom Papierstreifen mit einfachen Rechenoperationen zum Endresultat gelangen konnte. Ausgehend vom jeweiligen Höchstwert wurden die Impulse einer konstanten Anzahl von Kanälen addiert. Für eine Hintergrundkorrektur wurde jenes Produkt abgezogen, das in Abb. 2 als schraffierte Fläche zu sehen ist. Man erhält es durch Multiplikation des Impulsratenmittels der beiden dem ausgewerteten Peak benachbarten Kanäle mit der Anzahl der insgesamt summierten Kanäle.

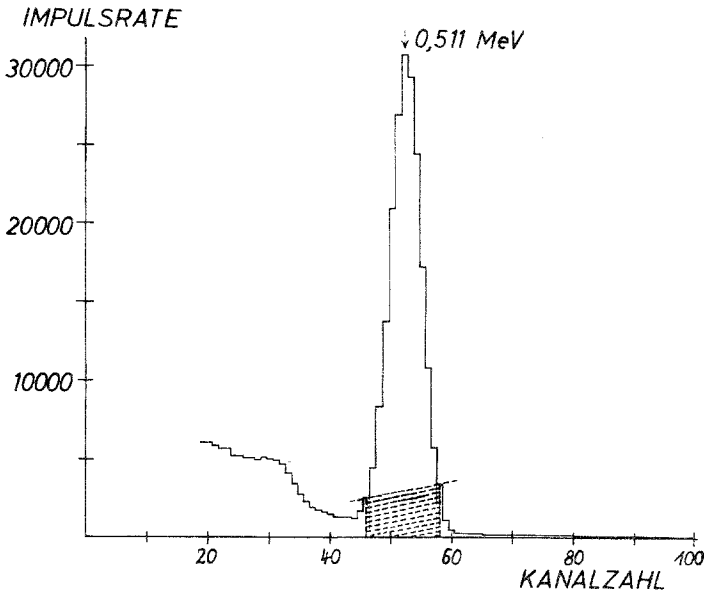


Abb. 2. Auswertung eines Gammaskpektrums

Die auf diese Weise erhaltenen Peakflächen sind den Aktivitäten der verschiedenen durch die Neutronenaktivierung erzeugten Radionukliden direkt proportional. Diese Aktivitäten sind aber wieder ein Maß für die in der betreffenden Probe vorhandenen Menge jener Kernarten, die für diese Reaktion in Frage kommen, und somit auch ein Maß für die Menge des gesuchten Elements selbst, da die Isotopenzusammensetzung der natürlichen Elemente praktisch immer konstant ist.

Die Photo-Peakflächen wurden nach Auswertung der den einzelnen Proben beigegebenen Molybdändraht-Dosimeter auf gleichen Neutronenfluß und durch Berücksichtigung der Halbwertszeiten der verschiedenen Nuklide auf identische Meßzeiten korrigiert. Durch Vergleich dieser Flächen mit solchen, die aus analog behandelten Standardmischungen (Zusammensetzung s. Tab. 3) gewonnen wurden, konnte der Gehalt der angeführten Elemente in den Nukleinsäuren quantitativ mittels der einfachen Relation

$$\frac{\text{Photopeakfläche der Probe}}{\text{Photopeakfläche des Standards}} = \frac{\text{Gewicht des Elements in der Probe}}{\text{Gewicht des Elements im Standard}}$$

estimmt werden.

Tabelle 2. Ausgewertete γ -Energie, Nachweisgrenze* und störende Reaktionen der untersuchten Elemente bei Neutronenaktivierung

Element	Ausgewertetes Radionuklid	Halbwertszeit	Ausgewertete Gammaenergie (MeV)	Nachweisgrenze in $10^{-6}g$	Störende Reaktionen
Kupfer	^{64}Cu	12,88 Stdn.	0,511	0,001	^{64}Zn (n, p) ^{64}Cu
Zink	^{69}Zn	13,8 Stdn.	0,44	0,1	^{61}Ga (n, p) ^{69}Zn
Mangan	^{56}Mn	2,58 Stdn.	0,85	0,00005	^{56}Fe (n, p) ^{56}Mn , ^{59}Co (n, α) ^{56}Mn
Nickel	^{65}Ni	2,56 Stdn.	0,37; 1,12		
Kobalt	^{60}Co	5,24 Jahre	1,49	0,5	^{65}Cu (n, p) ^{65}Ni
Cadmium	^{115}In	1,17; 4,5 Stdn.	1,17; 0,335	0,5	^{60}Ni (n, p) ^{60}Co , ^{63}Cu (n, α) ^{60}Co
		(nach 54 Stdn.)			
Natrium	^{24}Na	15,0 Stdn.	1,37	0,005	^{24}Mg (n, p) ^{24}Na , ^{27}Al (n, α) ^{24}Na
Kalium	^{42}K	12,5 Stdn.	1,51	0,5	^{42}Ca (n, p) ^{42}K , ^{45}Sc (n, α) ^{42}K
Molybdän	^{99}Mo	67 Stdn.	0,745	0,1	
Eisen	^{59}Fe	45,1 Tage	1,10; 1,29	200	^{59}Co (n, p) ^{59}Fe
Chrom	^{51}Cr	27,7 Tage	0,32	1	
Silber	^{110}Ag	270 Tage	0,656; 0,885	0,0001	^{110}Cd (n, p) ^{110}Ag
Phosphor	^{32}P	14,3 Tage	β	0,5	^{32}S (n, p) ^{32}P , ^{35}Cl (n, α) ^{32}P

* Nachweisgrenze für 1stündige Bestrahlung bei einem thermischen Neutronenfluß von $1,8 \cdot 10^{12} n/cm^2 \cdot sec$ nach *Buchanan*.¹⁸

¹⁸ *J. D. Buchanan, Atompraxis 8, 272 (1962).*

Die Tab. 2 soll eine kurze Übersicht geben über Halbwertszeiten, ausgewertete Gamma-Energien, Nachweisbarkeitsgrenze und eventuell auftretende störende Kernreaktionen jener Elemente, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit von Interesse sind. Allerdings bezieht sich die Nachweisgrenze auf 1stdg. Bestrahlung und wurde für die langlebigen Isotope wie Silber, Kobalt usw. bei 8tägiger, allerdings nur diskontinuierlicher Bestrahlung mindestens um den Faktor 10 unterboten. Da sich der max. Neutronenfluß im Astra-Reaktor später bei voller Leistung mit $5 \cdot 10^{13} \text{ n/cm}^2 \cdot \text{sec}$ ebenfalls beträchtlich über dem der Tabelle zugrunde liegenden Wert befinden wird, kann auch hier die Empfindlichkeit dieser Methode noch wesentlich gesteigert werden.

Ergebnisse und Diskussion

Wie aus Tab. 3 ersichtlich ist, besteht eine recht gute Übereinstimmung zwischen berechneten und durch die Neutronenaktivierung gefundenen Standardzusammensetzungen. Die größte Abweichung bei den Kupferbestimmungen liegt unter 8%, beim Zink beträgt sie etwa 12%, beim Mangan ca. 10%. Um zu prüfen, wie weit die in Tab. 2 angegebenen, durch die schnellen Neutronen hervorgerufenen n,p-Reaktionen unter den von uns angewandten Versuchsbedingungen störend wirken, wurden als Extremfall 3,6 mg $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{ H}_2\text{O}$ (= 0,5 mg Eisen) aktiviert und das gebildete ^{56}Mn bestimmt (siehe Standard 9 in Tab. 3). Selbst bei diesen großen, in unseren Proben niemals auch nur annähernd anwesenden Mengen konnten nur 0,052 μg Mangan gefunden werden. Wenn man bedenkt, daß davon bis zu 0,029 μg als Verunreinigung im Eisenstandard (Merck-Präparat pro Analyse) vorhanden sein konnten, darf man diese Nebenreaktion sicherlich vernachlässigen.

In Tab. 4 und 5 ist der Spurenelementgehalt für verschiedene Nukleinsäuren angegeben. Auffallend ist der hohe Kupfer- und Mangan-gehalt der untersuchten Hefe-RNS, der im Vergleich zu den DNS-Präparaten um den Faktor 10 höher liegt. Allerdings handelt es sich dabei um käuflich erworbene Nukleinsäuren. Der Metallionengehalt der aus TMV isolierten RNS liegt ebenfalls — besonders was die Elemente Mangan und Zink betrifft — weit unter dem der Hefe-RNS.

Bei der Gamma-Bestrahlung wurden beträchtliche Mengen an Spurenelementen aus der Nukleinsäure abgespalten. Ähnliche Resultate erhielten wir auch bei Bestrahlungsversuchen an Hefezellen⁸ in vivo. Es wurde schon verschiedentlich darauf hingewiesen, daß in Makromolekülen Energietransport über relativ weite Strecken möglich ist. Unter diesem Gesichtspunkt kann man verstehen, daß Anregungs- bzw. sogar Energien, die zu Ionisationen führen können, nicht zu Kettenbrüchen oder Basen- und Zuckerveränderungen führen müssen, sondern daß Spurenelemente, ähnlich wie in Proteinen die Schwefel-Atome, Elek-

Tabelle 3. Berechnete und gefundene

Standard	Integr. therm. Neutronenfluß (n/cm^2)		Cu	Zn	Mn	Ni	Na
1	$1 \cdot 10^{16}$	ber.	0,50	3,00	0,50	0	2,0
		gef.	0,52	3,09	0,46	0	2,9
2	$1 \cdot 10^{16}$	ber.	5,00	15,00	4,00	30,0	10,0
		gef.	5,02	15,49	4,26	31,5	9,3
3	$1 \cdot 10^{16}$	ber.	1,00	5,00	0,20	0	0
		gef.	1,07	5,28	0,22	0	0,5
4	$1 \cdot 10^{16}$	ber.	5,00	15,00	4,00	30,0	10,0
		gef.	4,88	13,15	3,59	28,3	10,0
5	$1 \cdot 10^{16}$	ber.	5,00	20,00	3,00	30,0	5,0
		gef.	5,28	22,40	3,28	30,5	4,8
6	$1 \cdot 10^{16}$	ber.	3,00	15,00	3,00	30,0	5,0
		gef.	2,76	16,06	3,01	29,7	5,2
7	$1 \cdot 10^{16}$	ber.	2,00	20,00	2,00	—	—
		gef.	1,98	21,42	1,87	—	—
8	$1 \cdot 10^{16}$	ber.	2,00	20,00	2,00	4,0	—
		gef.	2,01	18,65	2,15	4,1	—
9	$1 \cdot 10^{16}$	ber.	—	—	0	—	—
		gef.	—	—	0,052	—	—
10	$5 \cdot 10^{18}$	ber.	—	—	—	—	—
		gef.	—	—	—	—	—
11	$5 \cdot 10^{18}$	ber.	—	—	—	—	—
		gef.	—	—	—	—	—
12	$5 \cdot 10^{18}$	ber.	—	—	—	—	—
		gef.	—	—	—	—	—

tronen aufnehmen und abgeben können und dadurch als Stabilisierungsfaktoren ausgleichend wirken. Ein Valenzwechsel bedingt allerdings auch eine Verschiebung in der räumlichen Anordnung des Moleküls. Die dadurch entstehenden schwächeren Bindungskräfte werden auf diese Weise oft zerstört, so daß es zur Spurenelementabspaltung kommt.

Obwohl in den Nukleinsäuren beträchtliche Mengen an Metallionen sitzen, sind die noch freien Bindungsstellen aber bei weitem noch nicht abgesättigt. Wie aus Tab. 5 ersichtlich, kommt auf je 50—100 Nukleotide in der Nukleinsäurekette erst eines dieser Elemente.

An Hand der Hefe-*RNS* wurden eventuelle Spurenelementabspaltungen bei verschiedenen Isolierungs- und Reinigungsschritten untersucht. Es zeigte sich, daß bei einfachem Umfällen der Nukleinsäure in Puffer bei pH 7,0 praktisch noch nichts abgespalten wird. Das *TMV* mußte von uns zur Reinigung zwar mehrmals umgefällt werden, doch ist in diesem Falle die *RNS* von einem Proteinmantel umgeben und dadurch weitgehend geschützt.

Beim Vergleich der Metallionenabspaltung durch die verschiedenen Reinigungsschritte kann man die relativ feste Bindung des Kupfers

Standardzusammensetzung (in μg)

K	Cd	P	Co	Ag	Fe	Mo	Cr
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	100,0	—	—	—	—	—
—	—	101,4	—	—	—	—	—
—	—	100,0	—	—	—	—	—
—	—	95,2	—	—	—	—	—
—	—	200,0	—	—	—	—	—
—	—	206,6	—	—	—	—	—
—	5,0	—	—	—	—	—	—
—	5,7	—	—	—	—	—	—
—	5,0	—	—	—	—	—	—
—	4,7	—	—	—	—	—	—
50,0	10,0	200,0	—	—	—	—	—
54,7	9,7	202,1	—	—	—	—	—
80,0	—	200,0	—	—	—	—	—
76,3	—	199,1	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	500	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	200,0	10,0	—	100,0	20,0	25,0
—	—	195,0	12,4	—	102,9	21,9	25,8
—	—	300,0	10,0	20,00	100,0	10,0	—
—	—	304,2	8,8	19,86	97,1	11,7	—
—	—	200,0	20,0	20,00	—	10,0	15,0
—	—	202,4	19,8	20,16	—	9,4	14,5

an die Nucleinsäuren erkennen. Man kann sich dies mit der stärkeren Chelatbindung an die *NS*-Basen erklären.

Zink, Mangan und vor allem natürlich Natrium dürften dagegen hauptsächlich an die Phosphatgruppen gebunden vorliegen. Durch Zusatz starker Komplexbildner, wie *EDTA* oder *DTPA*, kommt es zur fast vollständigen Abspaltung der Spurenelemente.

Die aus verschiedenen Tabaksorten isolierten „pufferunlöslichen Nucleinsäuren“ stellen ein Gemisch von *RNS* und *DNS* dar. Um sie mit der Virusnucleinsäure vergleichen zu können, müßte erst ein Weg gefunden werden, sie ohne Zerstörung und Spurenelementabspaltung voneinander zu trennen. Untersuchungen auf diesem Gebiet sind im Gange, doch soll darüber, sowie über die mögliche biologische Wirkung der Metallionen in den Nucleinsäuren, an anderer Stelle noch ausführlich berichtet werden.

Herrn Dr. *W. Höfner* und Herrn o. Prof. Dr. *H. Linser* danken wir für wertvolle methodische Hinweise.

Der Austria Tabakwerke AG. danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Tabelle 4. Spurenelementgehalt verschiedener Nukleinsäuren (in ppm)

Probematerial	Cu	Mn	Zn	Ni	Cd	Na	Fe	Mo	Cr	Ag
Hefe-RNS	155,6 ± 6,8	57,1 ± 4,8	1434 ± 44	130 ± 40	< 0,2	1586 ± 37	43 ± 7	0	71 ± 5	0
RNS, umgefällt	153,5 ± 7,5	55,8 ± 4,9	1320 ± 40	—	< 0,2	526 ± 18	—	—	—	—
RNS, 3fach umgefällt	148,8 ± 7,3	35,0 ± 3,3	781 ± 28	—	< 0,2	< 2	—	—	—	—
RNS + EDTA, umgefällt	1,9 ± 0,2	0,3 ± 0,1	< 5	0	0	< 2	—	—	—	—
RNS + DTPA, umgefällt	3,9 ± 0,3	0,6 ± 0,1	< 5	0	0	30 ± 3	—	—	—	—
RNS nach Ammoniumformiatbehandlung	149,0 ± 6,7	55,6 ± 2,2	1002 ± 20	—	< 0,2	221 ± 10	—	—	—	—
RNS nach Gammastrahlung	65,1 ± 3,0	25,3 ± 1,5	493 ± 10	39 ± 18	0	268 ± 17	—	—	—	—
RNS, acetyliert	96,6 ± 9,9	20,5 ± 2,9	850 ± 32	0	0	332 ± 19	—	—	—	—
DNS aus Heringssperma	12,3 ± 1,3	4,5 ± 0,5	1253 ± 44	—	0	382 ± 15	129 ± 10	0	90 ± 8	0
DNS aus Lachs-sperma	8,1 ± 0,9	5,9 ± 0,4	95 ± 8	—	—	365 ± 15	—	—	—	—
TMV-RNS	104,5 ± 6,5	3,1 ± 0,3	344 ± 18	0	0,4	765 ± 23	—	—	—	—
NS aus Nic. glauca	25,0 ± 0,7	504 ± 35	1090 ± 58	0	0	77 ± 7	—	—	—	—
NS aus Nic. semperante	18,5 ± 0,9	731 ± 41	947 ± 43	1,1 ± 0,4	0	75 ± 8	—	—	—	—
NS aus Nic. debneyi	13,2 ± 0,4	419 ± 32	1073 ± 54	0	0	76 ± 13	—	—	—	—
NS aus Nic. bigelovii	5,2 ± 0,3	477 ± 28	564 ± 50	4,1 ± 1,0	0	66 ± 10	—	—	—	—
NS aus Nic. bigelovii × glauca	20,0 ± 0,7	813 ± 44	1641 ± 63	0	0	60 ± 4	—	—	—	—

Tabelle 5. Spurenelementgehalt der Nukleinsäuren, berechnet als Anzahl Metallionen pro 1000 Nukleotide

Probenmaterial	Cu	Mn	Zn	Ni	Cd	Na	Fe	Cr
Hefe-RNS	0,84	0,36	7,54	0,76	< 0,001	23,7	0,26	0,47
TMV-RNS	0,57	0,02	1,81	0	0,001	11,4	—	—
DNS aus Heringsperma	0,06	0,03	6,28	—	0	5,4	0,76	0,57
DNS aus Lachssperma	0,04	0,04	0,48	—	0	5,2	—	—
NS aus Nic. glauca	0,13	3,09	5,60	0	0	1,1	—	—
NS aus Nic. semperante	0,10	4,47	4,87	< 0,01	0	1,1	—	—
NS aus Nic. debneyi	0,07	2,56	5,52	0	0	1,1	—	—
NS aus Nic. bigelovii	0,03	2,92	2,90	0,02	0	1,0	—	—
NS aus Nic. bigelovii × glauca . .	0,10	4,98	8,43	0	0	0,9	—	—