

Über die quantitative fluorometrische Bestimmung von DNA mit Ethidiumbromid in der Zelle und die Konstanz der Quantenausbeute des Ethidium-DNA-Komplexes im biologischen Milieu

On the Quantitative Fluorometric Determination of Cellular DNA by Ethidium Bromide and the Constancy of the Quantum Yield of the Ethidium-DNA-Complex in the Biological Environment

Jürgen Pauluhn, Annemarie Naujok und Herbert W. Zimmermann

Institut für Physikalische Chemie der Universität Freiburg i. Br., Albertstraße 21, D-7800 Freiburg i. Br.

Z. Naturforsch. **35 c**, 585–598 (1980); eingegangen am 14. Januar/21. April 1980

DNA-determination, Ethidium Bromide, Mouse Fibroblasts, Specific Fluorescent Staining, Quantum Yield, Microspectrophotometer

The fluorescent staining of fixed A9 cells (mouse fibroblasts) with ethidium bromide E has been investigated qualitatively and quantitatively. E is bound to DNA, RNA and protein. After enzymatic RNA digestion and staining at pH = 4.0 the dyestuff is bound to DNA specifically. The formed E-DNA-complex is stoichiometric if DNA will be saturated by high dye concentration, $C_F = 1.0 \times 10^{-2}$ M. The stoichiometric factor $n = 0.21$ was determined from Scatchard binding isotherms and by spectrophotometric titration.

The binding of E to DNA and RNA has been investigated by binding isotherms. E is bound to DNA by intercalation and by ionic interaction. It is bound to RNA by ionic interaction only. The ionically bound dyestuff can be replaced by salts like LiCl from DNA and RNA. Only intercalated E remains. The competitive salt effect can be used to avoid the enzymatic RNA digestion in the specific staining of DNA.

Within the cell the E-DNA-complex fluoresces strongly. Using a microspectrophotometer we determined the fluorescence intensity J and the extinction E in cell sections of $q = 1 \mu^2$ area. The fluorescence was excited in the minimum of the absorbance of the E-DNA-complex at $\lambda_1 = 365$ nm. The extinction E_2 was measured in the short wavelength band at $\lambda_2 = 260$ nm. Under these conditions we received a linear relation $J = J(E_2)$ up to high extinctions E_2 . The quantum yield Q of the E-DNA-complex is nearly constant and independent of the biological environment. Q is also unaltered by LiCl. Within the limits of error intercalated and ionic bound dye have the same quantum yield. Under the conditions of stoichiometric staining the amount of E-DNA-complex and therefore DNA in the cell can be determined by J .

The extinction coefficient $\varepsilon_2 = 45\,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ of the E-DNA-complex at 260 nm was calculated from the concentration dependence of the absorbance spectra using the law of mass action. By ε_2 the amount of DNA in the cell is accessible from J . According to our measurements with A9 cells the superficial density of DNA has the order of magnitude $\varrho_N = m_N/q = 10^1 \text{ nmol cm}^{-2}$, the amount m_N of DNA per section $q = 1 \mu^2$, $m_N = 10^{-1} \text{ fmol}$, and the DNA concentration in the cell nucleus $C_N = 10^{-1} \text{ M}$.

The ray pass and diagram of electronics of the used microspectrophotometer are described.

Einleitung

Farbstoffe werden in der Cytochemie und Histochemie als analytische Reagenzien eingesetzt, um Substrate, die sie anfärbten, in der Zelle qualitativ nachzuweisen oder – in günstigen Fällen – quantitativ zu bestimmen. Für den qualitativen Nachweis genügt es, wenn der Farbstoff spezifisch gebunden wird. Bei einer quantitativen Bestimmung muß

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Herbert W. Zimmermann.

0341-0382/80/0700-0585 \$ 01.00/0

darüberhinaus die Stöchiometrie des Farbstoff-Substrat-Komplexes bekannt sein. Nur wenn die Komplexbildung durch andere Substanzen nicht gestört wird, kann man mit einer spezifischen und stöchiometrischen Färbung rechnen. In der chemischen Analyse werden störende Substanzen im Analysengang entfernt. In der Zelle ist das nur ausnahmsweise möglich. Man muß deshalb bei qualitativen und quantitativen Färbungen mit Störungen rechnen und darf keine zu hohen Erwartungen an Spezifität und Genauigkeit analytischer Farbreaktionen in der Zelle stellen.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Ethidiumbromid E ist einer der Farbstoffe, der zum Nachweis von DNA in der Zelle verwendet wird, vgl. z. B. [1–5]. Er kann zwar nur schlecht als Absorptionsfarbstoff eingesetzt werden, weil die im Sichtbaren gelegene Absorptionsbande des E-DNA-Komplexes nur kleine Extinktion hat. Dafür ist E ein ausgezeichnetes Fluorochrom. Der gebundene Farbstoff fluoresziert bereits bei Zimmertemperatur [6] und läßt sich unter dem Fluoreszenzmikroskop leicht nachweisen, vgl. z. B. [7, 8]. Hinzu kommt, daß E – im Gegensatz zu vielen anderen Fluorochromen – gegen Lichteinwirkung relativ stabil ist. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, aus der Fluoreszenzintensität Rückschlüsse auf die Menge DNA, an die der Farbstoff in der Zelle gebunden wird, zu ziehen. Das setzt allerdings voraus, daß man Bedingungen wählt, unter denen die Färbung spezifisch und stöchiometrisch ist. Außerdem darf die Quantenausbeute der Fluoreszenz nicht vom Milieu abhängen, in dem sich der E-DNA-Komplex in der Zelle befindet.

Die Fluoreszenzquantenausbeute hängt nun im allgemeinen von vielen, schwer standardisierbaren Faktoren ab. Zu nennen sind u. a. Viskosität des Mediums, Temperatur, Konzentration an fluoreszierender Substanz und Anwesenheit und Konzentration sog. Fluoreszenzlöscher, die die Fluoreszenzintensität anderer Moleküle erniedrigen. Sie übernehmen in einem strahlunglosen Prozeß die Lichtenergie und deaktivieren sie. Geringe Fluoreszenzintensität in einem fluorochromierten Präparat kann deshalb verschiedene Ursachen haben: Entweder ist die Menge fluoreszierender Substanz gering, oder die Quantenausbeute wird durch einen der oben genannten Faktoren erniedrigt, obwohl die Menge fluoreszierender Substanz groß ist. Im zweiten Fall dürfte es sehr schwer sein, DNA quantitativ fluorometrisch zu bestimmen.

Wir haben Untersuchungen zur quantitativen fluorometrischen Bestimmung von DNA mit Ethidiumbromid in der Zelle durchgeführt. Ausgangspunkt waren physikalisch-chemische Modellversuche zur Bindung des Farbstoffs an Nucleinsäure. Zahlreiche Arbeiten wurden bereits diesem Problem gewidmet, vgl. z. B. [6, 9–18]. Trotzdem haben einige Parameter, die die Bindung beeinflussen, bisher nicht die Beachtung gefunden, die sie nach unserer Auffassung verdienen [19–21]. Darauf gehen wir weiter unten ein. Es wurden die Bedingungen analysiert, unter denen eine spezifische und stöchiometrische Fluorochromierung von DNA in der Zelle zu er-

warten ist. Schließlich haben wir untersucht, ob die Quantenausbeute der Fluoreszenz des E-DNA-Komplexes in der Zelle für eine quantitative Bestimmung hinreichend konstant ist. Ziel unserer Arbeiten war es, die Möglichkeiten und Grenzen einer quantitativen mikrofluorometrischen Bestimmungsmethode für DNA in der Zelle und in kleinen Zellausschnitten zu ermitteln.

Materialien und Methoden

1. Zellmaterial

Die Untersuchungen wurden an Gewebekulturen von A9-Zellen (Mäusefibroblasten, Fa. Flow) durchgeführt. Die Kulturen wurden als Monolayer auf Quarzdeckplättchen gezüchtet und vor der Präparation mit Hanks Lösung abgespült.

2. Fluorochromierung bei pH = 4,0

- Fixieren in Methanol, 5 min. b-d. Analog zu Einlegen in Natriumzitrat-Puffer nach Sörensen, pH = 4,0, 5 min. Wenn nicht anders vermerkt, wird hier und im folgenden stets 0,1 M Zitrat-Puffer verwendet.
- Färben mit einer Lösung aus $1,0 \times 10^{-2}$ M Ethidiumbromid (Fa. Serva, dünnenschichtchromatographisch rein) in Zitrat-Puffer, pH = 4,0, 5 min.
- d. Abspülen und Differenzieren mit Zitrat-Puffer, pH = 4,0, 5 min.
- e. Eindecken in 0,01 M Zitratpuffer, pH = 4,0.

3. Fluorochromierung bei pH = 4,0 in Gegenwart von LiCl

- Fixieren in Methanol, 5 min. b-d. analog zu 2b-d.; es wird jedoch stets anstelle von 0,1 M Zitrat-Puffer eine Lösung aus 1 M LiCl in 0,1 M Zitrat-Puffer, pH = 4,0, verwendet.
- e. Eindecken in eine Lösung aus 0,1 M LiCl in 0,01 M Zitrat-Puffer, pH = 4,0.

4. Fluorochromierung nach RNA-Abbau bei pH = 4,0

- Fixieren in Methanol, 5 min. b-d. Analog zu Methanol, 10% Formol, 5% Eisessig), 10 min.
- b. Abspülen und Einlegen in Tris-Puffer (0,05 M Tris, 0,01 M Na₂ EDTA, 0,01 M NaCl), pH = 7,7, 5 min.
- c. RNA-Abbau bei pH = 7,7 mit einer Lösung aus 1 mg RNase/1 ml Tris-Puffer, Inkubationszeit 90 min, 37 °C [22, 23] (RNase A, Fa. Boehringer).
- d. Abspülen und Einlegen in Zitrat-Puffer, pH = 4,0, 5 min.
- e.

Färben mit einer Lösung aus $1,0 \times 10^{-2}$ M Ethidiumbromid in Zitrat-Puffer, pH = 4,0, 5 min. f. Abspülen und Differenzieren mit Zitrat-Puffer, pH = 4,0. g. Eindecken in 0,01 M Zitrat-Puffer, pH = 4,0.

5. Fluorochromierung nach RNA-Abbau bei pH = 4,0 in Gegenwart von LiCl

a–c. Wie bei 4a–c. d–f. Analog zu 4d–f.; es wird jedoch stets anstelle von 0,1 M Zitrat-Puffer eine Lösung aus 1 M LiCl in 0,1 M Zitrat-Puffer, pH = 4,0, verwendet. g. Eindecken in eine Lösung aus 1 M LiCl in 0,1 M Zitrat-Puffer oder aus 0,1 M LiCl in 0,01 M Zitrat-Puffer, jeweils bei pH = 4,0.

6. Fluorochromierung nach DNA- und RNA-Abbau bei pH = 4,0

a. Fixieren in Methanol, 5 min. b. Abspülen und Einlegen in Natriumacetat-Puffer, pH = 7,0, 5 min. Der 0,05 M Acetat-Puffer wird kurz vor der Verwendung mit 1% MgCl₂ versetzt und anschließend auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. c. DNA-Abbau bei pH = 7,0 mit einer Lösung aus 1 mg DNase/1 mg Acetat-Puffer, Inkubationszeit 90 min, 37 °C [22, 23] (DNase I, Fa. Boehringer). d. Abspülen mit Acetat-Puffer, pH = 7,0. e. Nachfixieren mit FEM, 10 min. f. Abspülen und Einlegen in Tris-Puffer, pH = 7,7. g. RNA-Abbau bei pH = 7,7 wie bei 4c. h–k. Wie bei 4d–g.

7. Messung der Bindungsisothermen des E-DNA- und E-RNA-Systems in Gegenwart von LiCl

Die experimentellen Bedingungen für die Messung der Bindungsisothermen wurden bereits früher ausführlich beschrieben [19]. Kalbsthymus-DNA wurde von der Fa. Worthington bezogen. Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient, bezogen auf Phosphat, in Tris-Puffer, pH = 7,7, bei 260 nm $\epsilon = 6500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [19]. Das tRNA-Gemisch aus Bäckerhefe war ein analytisch reines Präparat der Fa. Boehringer. Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient, bezogen auf Phosphat, in Tris-Puffer, pH = 7,7, bei 260 nm $\epsilon = 9600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Literaturwerte $\epsilon = 8700 - 10000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [24].

8. Mikrospektralphotometer

Der optische Teil des Mikrospektralphotometers wurde aus Bauelementen der Fa. Zeiss zusammengestellt. Der Strahlengang ist in Abb. 1 schematisch

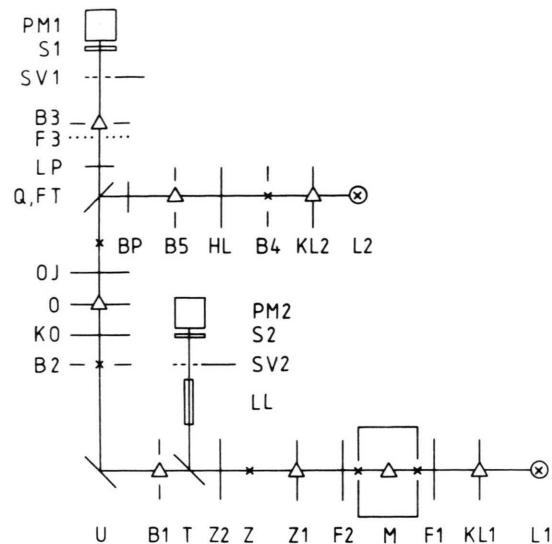


Abb. 1. Schematische Darstellung des Strahlengangs im Mikrospektralphotometer, bestehend aus Lichtquellen, Monochromator, Meßmikroskop, Empfänger. Erläuterung siehe Text.

dargestellt [25]. Für die Extinktionsmessung wird das Licht der Lichtquelle L1, Osram XBO 450 W, durch das Kollektorsystem KL1 auf den Eintrittsspalt des Monochromators M, Zeiss M4Q III, abgebildet. M besteht aus dem Prisma, dem Collimatorsystem und den Feldlinsen F1, F2 vor bzw. hinter dem Eintritts- und Austrittsspalt.

Das monochromatische Licht gelangt über die Zwischenoptik Z, Zeiss, und den Strahlenteiler T in die Ebene der Feldblende B1. Z besteht aus den Linsensystemen Z1, Z2 und hat die Aufgabe, den Monochromator optisch an das Meßmikroskop zu adaptieren. Das Prisma wird bei Köhlerscher Beleuchtung durch F2 in Z1, durch Z2 in die Ebene B1 und über den UV-reflektierenden Umlenkspiegel U und den Kondensor KO in die Objektebene O abgebildet. Das Licht der Lichtquelle im Austrittsspalt wird durch Z1 und Z2 in die Aperturblende B2 des Kondensors abgebildet. Als Kondensor verwenden wir ein Spiegelobjektiv, Beck Vergrößerung 74, eingestellte Apertur 0,65, und als Objektiv OJ einen Ultrafluar, Zeiss 100/1,25 Gly, mit Glycerinimmersion. Bei Extinktionsmessung wird das Long Pass Filter LP entfernt und der dichroitische Spiegel FT durch eine Quarzplatte Q gleicher Dicke ersetzt. OJ entwirft ein Zwischenbild des Präparats in der Ebene der Feldblende B3. Außerdem ist es möglich, das Zwischenbild direkt mit dem Okular zu beobachten

(in Abb. 1 nicht eingezeichnet). B3 blendet einen runden Bildausschnitt des Präparats von $1,12 \mu$ Durchmesser aus. Die konjugierten Ebenen der Lichtquelle (\times) und des Prismas bzw. Präparats (\triangle) sind in Abb. 1 markiert.

Im üblichen Strahlengang würde jetzt die Feldlinse F3 vor B3 das Bild der Lichtquelle aus der hinteren Brennebene des Objektivs auf den Empfänger abbilden. Als Empfänger verwenden wir einen hochempfindlichen GaAs-Photomultiplier PM1, RCA C 31034 A. Um eine punktuelle Überlastung der Photokathode zu vermeiden, empfiehlt es sich, den GaAs-Multiplier mit diffusem Licht zu belichten. Wir haben deshalb auf die Feldlinse F3 verzichtet. Außerdem erzeugt die Streuscheibe S1 unmittelbar vor dem Fenster von PM1 diffuses Licht, das die Photokathode ausleuchtet. Der Multiplier wird mit einer Peltierkühlkammer auf ca. -30°C gekühlt. Der Dunkelstrom wird dadurch stark verringert. Um Schwankungen der Lichtintensität während der Messung zu registrieren, kann der monochromatische Lichtstrahl im Strahlteiler T geteilt und über den Lichtleiter LL mit dem GaAs-Photomultiplier PM2 als Referenzintensität gemessen werden. PM2 ist ebenfalls mit einer Streuscheibe S2 versehen und befindet sich in einer Peltierkühlkammer. GaAs-Multiplier werden durch Überbelichten leicht zerstört. Wenn der Anodenstrom von PM1, PM2 einen einstellbaren Grenzwert übersteigt, lösen Sicherungen die Schnellverschlüsse SV1, SV2 aus, die den Strahlengang unterbrechen.

Wegen der unvermeidlichen Reflektionsverluste etc. muß man außer der Intensität I des Meßlichts auch die Intensität I_0 des Leerwerts bestimmen. I wird in der Zelle gemessen, I_0 neben der Zelle an einer Stelle des Präparats, die nur von Puffer erfüllt ist.

Zur Messung der Fluoreszenzintensität verwenden wir den Auflichtkondensor, Zeiss III RS. Die Quecksilberlampe L2, Osram HBO 100 W, wird durch das Kollektorsystem KL2 in die Ebene der Aperturblende B4, und durch die Hilfslinse HL über den Filter BP 365, den dichroitischen Spiegel FT in die hintere Brennebene des Objektivs OJ abgebildet. Durch BP 365 wird die Quecksilberlinie 365 nm ausgesiebt. Die Ebene der Feldblende B5 ist zur Objektebene O konjugiert. Um zu hohe Strahlenbelastung des Präparats zu vermeiden, blenden wir mit B5 einen runden Ausschnitt von 8μ Durchmesser im Objekt aus. Das Fluoreszenzlicht in O wird durch OJ

über FT 395 und das Long Pass Filter LP 395 in B3 abgebildet. Da FT und Q gleiche Dicke haben, wandert der in B3 ausgeblendete Präparatausschnitt von $1,12 \mu$ Durchmesser beim Umschalten von Extinktions- auf Fluoreszenzmessung nicht aus. Für beide Messungen ist der Strahlengang hinter B3 identisch.

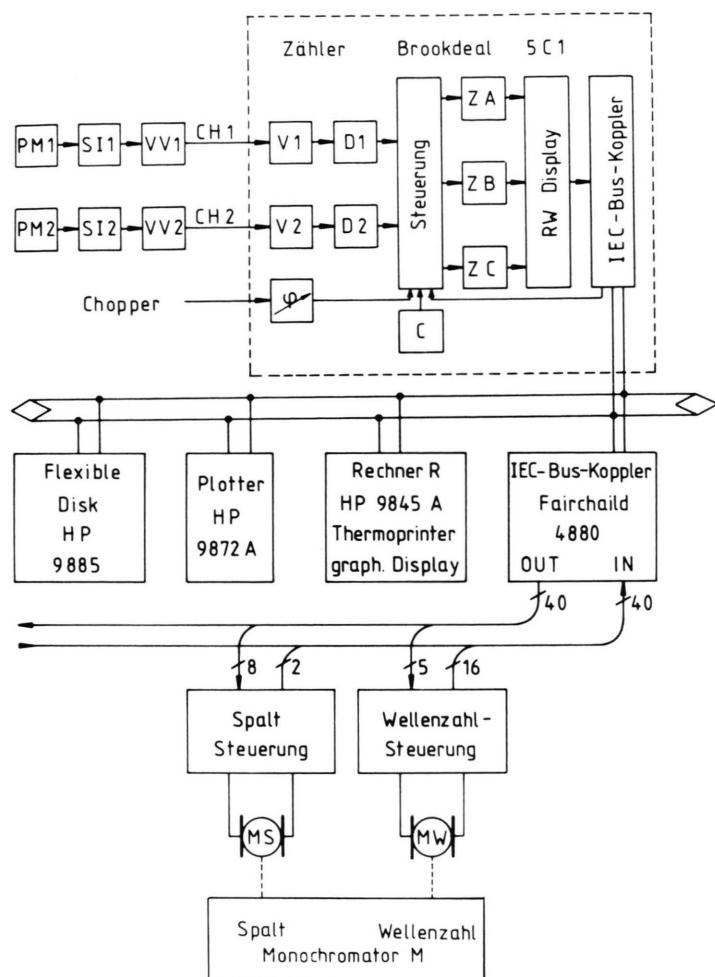
Das Blockschema der elektronischen Anordnung des Mikrospektralphotometers ist in Abb. 2 wiedergegeben. Bei Extinktionsmessung gelangen die Signale von PM1, PM2 über die Sicherungen SI1, SI2 und die Vorverstärker VV1, VV2, Ortec 574, auf die Eingänge CH1, CH2 eines Photonenzählers, Brookdeal 5C1. Der Photonenzähler enthält zwei identisch aufgebaute Eingangskanäle mit den Verstärkern V1, V2 und den Diskriminatoren D1, D2, Brookdeal 5C14. Durch eine einstellbare Steuerung gelangen die Impulse wahlweise auf drei Zähler ZA, ZB, ZC. Mit dem Rechenwerk RW können aus den Zählerinhalten die Anzeigewerte A/C, B/C, (A+B)/C und (A-B)/C erzeugt und über einen Koppler auf den IEC-BUS zur Auswertung an den Rechner R gegeben werden. Im allgemeinen zählt ZC die Pulse der Clock C. In ZA, ZB kann dann die Anzahl der Photonen von PM1, PM2 pro Zeiteinheit gemessen werden. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, das Experiment mit PM1 zu beobachten und in ZA zu zählen und die Beleuchtungsintensität mit PM2 zu registrieren und in ZC zu zählen. Intensitätsschwankungen der Lichtquelle L1 können dann bei Extinktionsmessungen eliminiert werden.

Bei der Messung der Fluoreszenzintensität werden die Signale von PM1 über SI1, VV1 auf CH1 des Photonenzählers gegeben und in ZA gezählt. Integrationszeit 3 sec.

Weiterhin bietet der Zähler Brookdeal 5C1 die Möglichkeit, gechoppte Signale zu verarbeiten. Signal + Rauschen werden in ZA, das Rauschen in ZB gezählt. Das Referenzsignal des Choppers bewirkt über einen einstellbaren Phasenschieber, Brookdeal 5C21, und über die Steuerung die richtige Verteilung der Signale auf die Zähler.

Die Datenverarbeitung übernimmt der Rechner R, Hewlett-Packard 9845 A. Er enthält ca. 60 k Byte Arbeitsspeicher, einen Thermoprinter, ein graphisches Display und zwei Kassettenlaufwerke. Der Rechner übernimmt auch die Steuerung des Monochromators M. Der Daten- und Befehlstransfer vom und zum Rechner erfolgt über den IEC-BUS. Die vom Rechner verarbeiteten Spektren werden auf der

Abb. 2. Blockschema der elektronischen Anordnung des Mikrospektralphotometers, bestehend aus Empfänger, Photonenzähler, Rechner mit Plotter, Flexible Disk, Wellenzahl- und Spaltsteuerung für den Monochromator und IEC-BUS-Koppler. Erläuterung siehe Text.



Floppy Disk HP 9885 abgespeichert und können dann entweder auf dem graphischen Display oder dem Plotter HP 9872 A wiedergegeben werden. Auch der Plotter wird über den IEC-BUS angesteuert.

Die Steuerung von Monochromator und Hilfsgeräten und die Datenübertragung zwischen M, etc., und R erfolgt mit einem IEC-BUS-Koppler, Fairchild 4880. Mit ihm können bis zu 40 Bit gespeichert und ausgegeben (OUT), sowie bis zu 40 Bit eingelesen (IN) werden. Über diese 80 Datenleitungen werden Monochromator und Hilfsgeräte angesteuert.

Die Monochromatorsteuerung besteht aus der Wellenzahl- und der Spaltsteuerung. Sie erfolgt über die Motoren MW und MS. Durch die Wellenzahl-

steuerung kann ein einstellbarer Wellenzahlbereich wellenzahllinear in einstellbaren Schritten durchfahren werden. Die Spaltsteuerung gewährleistet eine optimale Beleuchtung der Photomultiplier bei den verschiedenen Wellenzahlen und kann an die jeweilige Aufgabenstellung durch entsprechende Spaltprogramme adaptiert werden. Alle Ansteuergrößen erscheinen auf dem Display.

Ergebnisse und Diskussion

Spezifische und quantitative Färbung der DNA mit Ethidiumbromid

Mit Ethidiumbromid fluorochromierte, fixierte A9-Zellen (Mäusefibroblasten) – die wir als Zellmaterial verwendeten – zeigen unter dem Fluores-

zenzmikroskop einen kräftig fluoreszierenden Zellkern, der sich vom schwächer fluoreszierenden Cytoplasma deutlich abhebt. Die Fluoreszenz im Cytoplasma wird von Farbstoffkationen verursacht, die an anionische Bindungspositionen der Proteine und RNA gebunden sind. Baut man nämlich die RNA vor der Fluorochromierung enzymatisch ab und protoniert die anionischen Gruppen der Proteine in saurem Milieu bei pH = 4,0, so verschwindet die Fluoreszenz im Cytoplasma praktisch vollständig, während sie im Kernbereich erhalten bleibt. Letztere wird von Farbstoffmolekülen verursacht, die an DNA gebunden sind. Wird dem RNA-Abbau noch ein enzymatischer DNA-Abbau vorgelagert, so verschwindet auch die Fluoreszenz im Zellkern. Diese Befunde zeigen, daß Ethidiumbromid im allgemeinen DNA, RNA und Proteine anfärbt, nach RNA-Abbau und bei saurer Fluorochromierung aber nur noch an DNA gebunden wird.

Das Milieu darf bei der Färbung nicht zu sauer sein, da für pH < 4 mit Protonierung der Nucleotide [26] und des Farbstoffs [27] zu rechnen ist. Wir haben deshalb unsere Färbung bei pH = 4 durchgeführt. Die basischen Gruppen der Proteine sind dann schon weitgehend protoniert, während E und DNA als freie Moleküle vorliegen.

Die Bindung von E an DNA haben wir in jüngster Zeit nochmals eingehend untersucht und insbesondere den Einfluß von Salzen auf die Menge gebundenen Farbstoffs quantitativ analysiert [19]. Diejenigen Gesichtspunkte, die für die stöchiometrische Fluorochromierung wesentlich sind, wurden an anderer Stelle ausführlich dargelegt [28]. Zum Verständnis des folgenden sollen einige Ergebnisse kurz zusammengefaßt werden.

Die Bindung eines Farbstoffs F an Nucleinsäure N läßt sich am einfachsten mit der Scatchard-Bindungsisotherme [29] beschreiben:

$$r/C_{Ff} = K_S (n - r). \quad (1)$$

Es bedeuten: $C_F = C_{Ff} + C_{Fb}$ = Einwaagekonzentration des Farbstoffs; C_{Ff} , C_{Fb} = Gleichgewichtskonzentrationen des freien (f) bzw. gebundenen (b) Farbstoffs; C_N = Einwaagekonzentration an Mononucleotideinheiten Nucleinsäure; $r = C_{Fb}/C_N$ = pro Mononucleotideinheit gebundene Menge Farbstoff; nC_N = Einwaagekonzentration an Bindungspositionen für F in N, $0 < n < 1$; K_S = Scatchard-Bindungskonstante. r hängt nach Gl. (1) von C_F und C_N ab. Außerdem beobachtet man eine Abhängigkeit

von der Art S und der Konzentration C_S von Salzen in der Lösung und der Temperatur T. C_S und T sind in Gl. (1) nicht explizit enthalten. Sie verbergen sich in der Bindungskonstante K_S , die von C_S und T abhängt: $K_S = K_S(C_S, T)$. Die Nucleinsäure ist mit Farbstoff gesättigt, wenn alle nC_N Bindungspositionen mit Farbstoff belegt sind. Daraus ergibt sich die maximale Konzentration gebundenen Farbstoffs zu $C_{Fb, max} = nC_N$ oder $r_{max} = (C_{Fb}/C_N)_{max} = n$.

n kann experimentell aus Scatchard-Bindungsisothermen und durch Titration [19] bestimmt werden und stellt den stöchiometrischen Faktor des E-DNA-Komplexes bei Sättigung des Biopolymeren mit Farbstoff dar [6, 9–21]. Nur im Sättigungsbereich ist der stöchiometrische Faktor $r_{max} = n = 0,21 \pm 0,01$ des Farbstoff-Nucleinsäure-Komplexes konstant und unabhängig von S und C_S . Bei Untersättigung kann r , je nach Versuchsbedingungen, empfindlich von S und C_S abhängen. Da über die Art und Verteilung von Salzen in einer Zelle in der Regel nur wenig bekannt ist, ergibt sich die Notwendigkeit, die stöchiometrische Färbung bei hoher Farbstoffkonzentration im Sättigungsbereich durchzuführen. C_F darf jedoch auch nicht zu hoch gewählt werden, da sonst – trotz sauren Milieus – wieder das Protein angefärbt wird. Wir verwendeten bei unseren Versuchen eine mittlere Konzentration $C_F = 1 \times 10^{-2}$ m im Färbebad.

Der Farbstoff geht mit DNA zwei verschiedene Bindungen ein: a. Die intercalative Bindung 1 von E an DNA, die durch Salze praktisch nicht beeinflußt wird. b. Die ionische Bindung 2 zwischen dem Kation E und den anionischen Bindungspositionen der DNA. Aus 2 kann E durch Metallkationen M der Salze S verdrängt werden. M wirkt als Kompetitor auf E. Folgerichtig gibt es noch eine ionische Bindung 3 von M an die gleichen anionischen Bindungspositionen der DNA, die auch von E eingenommen werden können. Die Bindungen 1, 2 und 3 lassen sich durch drei Bindungskonstanten K_{S1} , K_{S2} , K_{S3} charakterisieren, die mit der Gleichgewichtskonstanten K_S , Gl. (1), durch die Beziehung verknüpft sind [19, 28]:

$$K_S = K_{S1} + \frac{K_{S2}}{1 + K_{S3} C_S}. \quad (2)$$

Die Gültigkeit von Gl. (2) wurde am Modellsystem Ethidiumbromid-Kalbsthymus-DNA bewiesen [19]. In unseren früheren Arbeiten verwendeten wir NaCl, KCl und MgCl₂ als Kompetitor für

Tab. I. Bindungskonstanten K_{S1} , K_{S2} , K_{S3} [M^{-1}] für die intercalative und ionische Bindung von Ethidiumbromid E an DNA und RNA. Kompetitor für E ist LiCl. $n = 0,21$ für DNA und RNA. $T = 298$ K. Fehlerbreiten sind einfache Standardabweichungen.

	K_{S1}	K_{S2}	K_{S3}
DNA	$(8 \pm 5) \times 10^3$	$(8,0 \pm 0,5) \times 10^5$	31 ± 4
RNA	$(5 \pm 2) \times 10^2$	$(2,5 \pm 0,5) \times 10^5$	58 ± 4

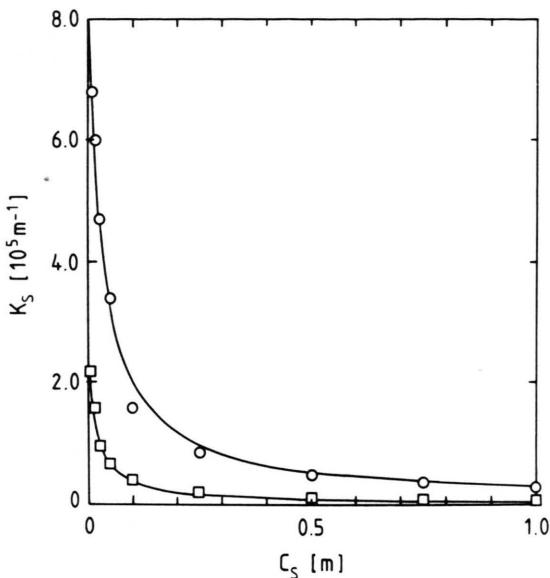


Abb. 3. Abhängigkeit der Scatchard-Bindungskonstante K_s von der LiCl-Konzentration C_s , Tris-Puffer, pH = 7,7, $T = 298$ K, DNA (\circ), RNA (\square). Berechnete Kurven Gl. (2) (—), Bindungskonstanten Tab. I.

ionisch gebundenes E . Bei den im folgenden beschriebenen Färbeversuchen bevorzugen wir LiCl. Die Abhängigkeit der Bindungskonstante K_s von der LiCl-Konzentration C_s ist in Abb. 3 wiedergegeben. Aus den experimentellen Werten lassen sich die Bindungskonstanten K_{S1} , K_{S2} , K_{S3} durch Ausgleichsrechnung mit Gl. (2) bestimmen, Tab. I. Die mit diesen Bindungskonstanten berechnete Kurve ist in Abb. 3 den experimentellen Werten gegenübergestellt. Die Übereinstimmung ist gut. Die Kurve zeigt, daß die Scatchard-Bindungskonstante K_s bei kleiner Salzkonzentration empfindlich von C_s abhängt, mit steigender Salzkonzentration jedoch asymptotisch dem Grenzwert $K_s = K_{S1}$ zustrebt. Analoges Verhalten wurde ebenfalls bei den Salzen NaCl, KCl und MgCl₂ beobachtet. Für alle Salze sind die gemessenen K_{S1} bzw. K_{S2} innerhalb der Fehlergrenzen

jeweils gleich. Desgleichen ist der experimentell bestimmte stöchiometrische Faktor $r_{max} = n = 0,21$ unabhängig von der Art des Salzes S und seiner Konzentration C_s in der Lösung [19]. Wir nehmen an, daß die an Kalbsthymus-DNA gewonnenen Ergebnisse auf DNA von A 9-Zellen übertragbar sind.

Tab. I kann man entnehmen, daß die Bindungskonstante K_{S1} der intercalativen Bindung 1 etwa zwei Zehnerpotenzen kleiner ist als die Konstante K_{S2} für die ionische Bindung 2. Die Intercalation ist damit keineswegs der dominierende Bindungseffekt, wie es in der Regel angenommen wird. Auf die Konsequenzen aus diesem Bindungsverhalten für die spezifische Färbung werden wir später nochmals zurück kommen.

Im Sättigungsbereich wird zwar ein stöchiometrischer E-DNA-Komplex konstanter Zusammensetzung gebildet. Der Komplex ist jedoch uneinheitlich in bezug auf die gebundenen Farbstoffmoleküle. Bei hoher Salzkonzentration C_s wird E aus der ionischen Bindung 2 an DNA verdrängt. Die nC_N verfügbaren Bindungspositionen sind nur mit intercalativ gebundenen Farbstoffmolekülen besetzt. Bei verschwindender Salzkonzentration C_s sind die Farbstoffmoleküle an die nC_N Bindungspositionen alternativ intercalativ und ionisch gebunden. Das Mengenverhältnis der verschiedenen gebundenen Molekülspartien wird durch die Bindungskonstanten K_{S1} , K_{S2} bestimmt. Da $K_{S2} \gg K_{S1}$ ist, sind die Farbstoffmoleküle dann vorzugsweise ionisch gebunden. Durch Variation von C_s kann man demnach das Mengenverhältnis von intercalativ zu ionisch gebundenen Ethidiumkationen zwischen diesen Extremen verschieben. An Hand von isosbestischen Punkten läßt sich zeigen, daß die Absorptionsspektren der beiden Molekülspartien praktisch gleich sind. Für die quantitative Absorptionsmikroskopie ist der beschriebene Salzeffekt deshalb bedeutungslos. Bei der quantitativen Fluoreszenzmikroskopie muß man jedoch damit rechnen, daß der Salzeffekt eine Rolle spielt, da die beiden Molekülspartien auch verschiedene Quantenausbeute besitzen können. Es muß deshalb untersucht werden, welchen Einfluß die Salzkonzentration C_s auf die Quantenausbeute der Fluoreszenz hat.

Fluorochromierung von Zellen mit Ethidiumbromid in Gegenwart von Salzen

Der kompetitive Salzeffekt kann für die spezifische Fluorochromierung der DNA in der Zelle nutzbar gemacht werden. Der enzymatische RNA-

Abbau vor der sauren Fluorochromierung mit Ethidiumbromid ist ein zeitraubender Schritt. Er läßt sich umgehen, wenn man die Bindungsverhältnisse von E an RNA berücksichtigt. Dazu haben wir an Hand von Bindungsisothermen die E-DNA-Bindung mit LiCl als Kompetitor untersucht. Als Nucleinsäurepräparat verwendeten wir tRNA aus Bäckerhefe. Wir nehmen an, daß sich die Bindungsverhältnisse bei anderen Ribonucleinsäuren nicht wesentlich von unserem Präparat unterscheiden.

Die Abhängigkeit der Scatchard-Bindungskonstante K_S von der LiCl-Konzentration C_S ist ebenfalls in Abb. 3 dargestellt. Aus den experimentellen Werten wurden mit Gl. (2) die Bindungskonstanten K_{S1} , K_{S2} und K_{S3} durch Optimierungsrechnung bestimmt, Tab. I. Die Übereinstimmung zwischen berechneter Kurve und experimentellen Werten ist befriedigend, Abb. 3. Ebenso wie für DNA beträgt auch für RNA $n = 0,21 \pm 0,02$.

Wie man Tab. I entnehmen kann, ist die Bindungskonstante K_{S1} für die Intercalation von E in DNA um etwa eine Zehnerpotenz größer als für RNA. Hinzu kommt, daß K_{S1} bei RNA in einem ungünstigen Bereich an der Grenze des experimentell Möglichen bestimmt werden mußte. Ein Artefakt ist deshalb nicht auszuschließen. Der gesicherte Nachweis der Intercalation von E in RNA muß weiteren Versuchen vorbehalten bleiben [30]. Die Röntgenstrukturuntersuchung von Sundaralingam *et al.* [31] spricht eher gegen als für die Intercalation von E in RNA. Unabhängig davon zeigen die Bindungskonstanten aber bereits jetzt, daß unter üblichen Färbebedingungen die Intercalation in RNA – im Vergleich zu DNA – näherungsweise vernachlässigbar ist.

E geht mit RNA ebenso wie mit DNA bevorzugt eine ionische Bindung ein. Die Bindungskonstante K_{S2} hat für beide Nucleinsäuren die gleiche Größenordnung, jedoch ist der Betrag für DNA um ca. einen Faktor 3 größer als für RNA. Dafür ist die Bindungskonstante K_{S3} von Li^+ an DNA um ca. einen Faktor 1/2 kleiner als für RNA. Ähnliches beobachtet man auch bei anderen Metallkationen [32, 33]. Beide Effekte verstärken sich gegenseitig. Die Farbstoffmoleküle werden deshalb durch Li^+ aus der ionischen Bindung an RNA wesentlich leichter verdrängt als aus der ionischen Bindung an DNA.

Die oben beschriebenen Befunde lassen sich nun dazu verwenden, den enzymatischen RNA-Abbau

vor der sauren Fluorochromierung zu umgehen. Aus Abb. 3 und den Bindungskonstanten K_{S1} , K_{S2} , K_{S3} geht nämlich hervor, daß bei LiCl-Konzentrationen von $C_S \geq 1 \text{ m}$ der Farbstoff praktisch nur noch intercalativ an DNA gebunden wird, während seine Bindung an RNA vernachlässigbar ist. Führt man demnach eine saure Fluorochromierung bei Gegenwart von 1 m LiCl durch, so beobachtet man eine starke Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns, während das Cytoplasma annähernd fluoreszenzfrei ist. Unterläßt man den LiCl-Zusatz bei der Färbung, so tritt die Fluoreszenz im Cytoplasma auch bei pH = 4,0 auf. Wir nehmen an, daß der Unterschied im Fluoreszenzverhalten auf den kompetitiven Effekt der Li^+ -Ionen zurückzuführen ist. Leider ist der kompetitive Salzeffekt erst bei hoher Salzkonzentration genügend wirksam. Die Bindungskonstante K_{S3} für Li^+ an RNA ist nämlich um mehrere Zehnerpotenzen kleiner als die Konstante K_{S2} für die ionische Bindung von E an RNA. Der Quotient $K_{S2}/(1 + K_{S3} C_S)$, Gl. (2), wird deshalb erst bei Konzentrationen $C_S \geq 1 \text{ m}$ drastisch gegenüber dem Wert für $C_S = 0$ erniedrigt.

Die Färbung bei Gegenwart von Salzen hat gravierende Nachteile, die nicht verschwiegen werden dürfen. Durch die hohe Salzkonzentration wird die Morphologie der Zelle in Mitleidenschaft gezogen. Zellkern und Cytoplasma lassen sich zwar deutlich unterscheiden, feinere Strukturen erscheinen jedoch diffus und verquollen. Auch werden die Fluoreszenzunterschiede verwischt, die man normalerweise im Kern fluorochromierter Zellen beobachten kann. Die Salzkonzentration sollte deshalb bei der Färbung so groß wie nötig, aber so klein wie möglich gehalten werden. $C_S = 1 \text{ m}$ LiCl stellt einen Kompromiß dar.

Außerdem muß man damit rechnen, daß durch die Einwirkung von Salzen DNA aus der Zelle herausgelöst wird. Ein Maß für das Mengenverhältnis von Nucleinsäure zu Protein in der Zelle ist das Extinktionsverhältnis E_{260}/E_{280} bei den Wellenlängen 260 bzw. 280 nm. An Methanol- und FEM-fixierten A9-Zellen wurde dieses Verhältnis bei steigender Einwirkungszeit einer 1 m LiCl-Lösung gemessen. Bei kurzen Zeiten ist die Änderung von E_{260}/E_{280} vernachlässigbar. Offenbar diffundiert die hochmolekulare DNA nur langsam aus dem Proteinkäfig.

Kurze Zeiten zum Färben und Differenzieren empfehlen sich auch aus einem anderen Grund. Beim Differenzieren wird überschüssiger Farbstoff ent-

fernt. Die Färbung ist nun eine Gleichgewichtsreaktion. Bei übermäßigem Differenzieren würde deshalb der Farbstoff wieder von der Nucleinsäure abgelöst werden. Das Ablösen ist aber ein kinetisch kontrollierter Prozeß, der bei den fest gebundenen Farbstoffmolekülen langsam abläuft. Deshalb ist es bei genügend kurzen Differenzierungszeiten möglich, eine quantitative Färbung zu realisieren.

Um den Farbstoff durch Li^+ aus der Bindung an RNA zu verdrängen, wurde in Gegenwart von 1 M LiCl gefärbt und differenziert. Es ist bemerkenswert, daß der kompetitive Salzeffekt auf die Färbung auch dann erhalten bleibt, wenn man das Präparat nach dem Differenzieren bei $\text{pH} = 4,0$ nicht in 1 M LiCl, sondern nur in 0,1 M LiCl-Lösung eindeckt. Mit der gleichen Lösung kann der Farbstoff in der Zelle nicht von der RNA verdrängt werden. Auch diese Versuche weisen auf die kinetische Kontrolle beim Differenzieren hin.

Der enzymatische RNA-Abbau bei nachfolgender saurer Fluorochromierung ist die sauberste Methode für die quantitative spezifische Färbung der DNA in der Zelle. Sie hat den Nachteil, zeitraubend zu sein. Sofern man nur an einer Bestimmung des Gesamt-DNA-Gehalts in der Zelle interessiert ist, läßt sich – bei Reduktion der Anforderungen – ersatzweise die Färbung in Gegenwart von Salzen einsetzen. Unabhängig davon sollte man sich jedoch stets vergegenwärtigen, daß die quantitative spezifische Färbung eines Substrats in einer Zelle ein Idealbild ist, dem man sich bestenfalls nähern kann. Wie wir gesehen haben, ist die Optimierung der Färbung ein Weg zwischen Scylla und Charybdis, nämlich zwischen den physikalisch-chemischen Notwendigkeiten auf der einen Seite und den von der Natur vorgegebenen biologischen Randbedingungen auf der anderen Seite. Ein Kompromiß ist deshalb unumgänglich.

Konstanz der Fluoreszenzquantenausbeute des E-DNA-Komplexes in der Zelle

Für die fluorometrische Bestimmung der DNA in der Zelle muß die Quantenausbeute der Fluoreszenz des gebundenen Farbstoffs unabhängig vom biologischen Milieu sein. Da die Quantenausbeute im allgemeinen empfindlich auf Umwelteinflüsse reagiert, hat man mit Störungen zu rechnen. Als Störfaktoren kommen u. a. Viskositätsunterschiede in der Zelle, Fluoreszenzlöscher und Salze in Frage.

Letztere ändern das Mengenverhältnis von intercalativ zu ionisch gebundenen Farbstoffmolekülen. Da die beiden verschiedenen gebundenen Molekülspesies im Absorptionsspektrum praktisch ununterscheidbar sind, wirkt sich der Salzeffekt auf die Extinktion nicht aus. Sind jedoch die Quantenausbeuten beider Molekülspesies in der Zelle deutlich verschieden, so beeinflussen Salze die Fluoreszenzintensität. Entsprechendes gilt für andere Störfaktoren. Wir haben deshalb untersucht, wie weit die Fluoreszenzquantenausbeute Q vom biologischen Milieu in der Zelle abhängt. Dazu wurde die Fluoreszenzintensität J und die Extinktion E von kleinen Präparatausschnitten in der Zelle mit einem Mikrospektrophotometer gemessen und geprüft, ob die Funktion $J = J(E)$ den theoretischen Erwartungen entspricht.

Die Fluoreszenzintensität J ist durch die bekannte Beziehung gegeben:

$$J = A Q (I_0 - I). \quad (3)$$

Es bedeuten: A = Apparatekonstante, $I_0 - I$ = vom Präparat absorbierte Lichtintensität. Die Intensitäten I_0 und I des ein- bzw. austretenden Lichts sind durch das Lambert-Beersche-Gesetz mit der Extinktion E verknüpft:

$$E = \lg (I_0 / I) = \varepsilon C d. \quad (4)$$

Es bedeuten: ε = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient des E-DNA-Komplexes, C = molare Konzentration des Komplexes, d = Schichtdicke des untersuchten Präparatausschnitts. Mit Gl. (3) folgt:

$$J = A Q I_0 (1 - 10^{-\varepsilon}). \quad (5)$$

Um einen funktionalen Zusammenhang zu überprüfen, empfiehlt es sich, eine lineare Beziehung zu verwenden. Für die Funktion $J = J(E)$, Gl. (5), ist das mit einem Kunstgriff möglich. Regt man nämlich die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge λ_1 an, bei der die zugehörige Extinktion sehr klein ist, $E_1(\lambda_1) \ll 1$, so läßt sich die Exponentialfunktion näherungsweise durch die Entwicklung ersetzen:

$$10^{-\varepsilon_1} = 1 - 2,30 E_1, \quad J = 2,30 A Q I_0 E_1. \quad (6)$$

Wenn die Quantenausbeute keinen störenden Einflüssen unterliegt, $Q = \text{const.}$, und die Meßbedingungen konstant gehalten werden, $A = \text{const.}$, hängt J nach Gl. (6) linear von E_1 ab. J und E_1 charakterisieren dann die Menge des E-DNA-Komplexes im untersuchten Zellausschnitt. Wegen $E_1 \ll 1$ ist die Anregungsbedingung für die Emission ungünstig.

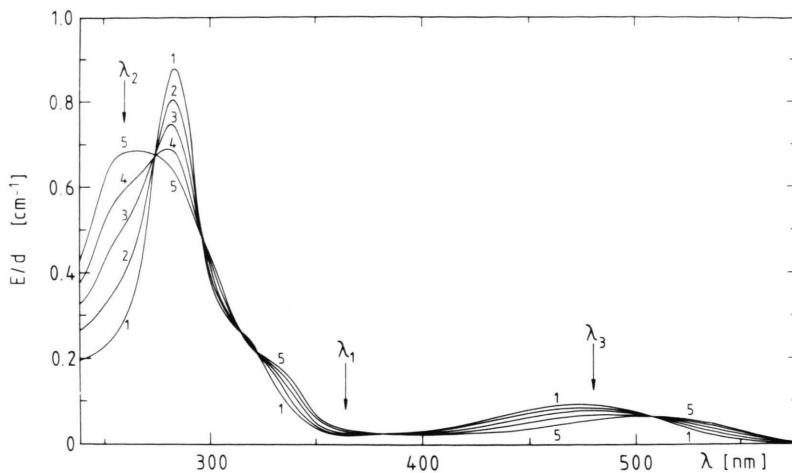


Abb. 4. Gesamtextinktion pro Einheit der Schichtdicke E/d von Mischungen aus Ethidiumbromid und DNA in reinem Tris-Puffer, pH = 7,7, $T = 298$ K. Die Farbstoffkonzentration war konstant $C_F = 1,5 \times 10^{-5}$ M. Die DNA-Konzentration variiert: 1. $C_N = 0$ M, 2. $1,8 \times 10^{-5}$ M, 3. $3,7 \times 10^{-5}$ M, 4. $5,5 \times 10^{-5}$ M, 5. $7,1 \times 10^{-5}$ M.

Zur Kompensation muß man deshalb hohe Beleuchtungsintensitäten I_0 verwenden.

Die kleine Extinktion E_1 ist schwer zu messen. Als Maß für die Menge E-DNA-Komplex kann aber auch jede andere Extinktion E_2 bei einer beliebigen Wellenlänge λ_2 verwendet werden, denn nach Gl. (4) sind für einen gegebenen Zellausschnitt E_1 und E_2 durch die Beziehung $E_1/E_2 = \varepsilon_1/\varepsilon_2$ verknüpft:

$$J = 2,30 A Q I_0 (\varepsilon_1/\varepsilon_2) E_2. \quad (7)$$

Demnach ergibt sich auch dann eine lineare Beziehung zwischen J und E_2 , wenn die Extinktion E_2 groß ist, vorausgesetzt, die Fluoreszenz wird bei einer Wellenlänge λ_1 mit kleiner Extinktion E_1 angeregt. Damit kann man die Menge E-DNA-Komplex aus einer experimentell besser zugänglichen Extinktion E_2 bestimmen und gleichzeitig den Vorteil der linearen Beziehung zwischen J und E_2 beibehalten.

Für die praktische Anwendung müssen λ_1 und λ_2 passend gewählt werden. Wir haben deshalb die Absorptionsspektren des E-DNA-Systems untersucht. Abb. 4 zeigt eine Meßreihe, bei der die Gesamtextinktion pro Einheit der Schichtdicke (E/d) von Lösungen aus Ethidiumbromid und Kalbsthymus-DNA über der Wellenlänge λ aufgetragen ist. Die Farbstoffkonzentration wurde konstant $C_F = 1,48 \times 10^{-5}$ M gehalten, die DNA-Konzentration von $C_N = 0$ auf $7,10 \times 10^{-5}$ M gesteigert. Die isosbestischen Punkte zeigen, daß überschüssiger Farbstoff mit dem E-DNA-Komplex im Gleichgewicht steht. Bei der Lösung höchster DNA-Konzentration beträgt das Konzentrationsverhältnis $C_F/C_N = n = 0,21$. Da der

vorgelegte Farbstoff in diesem Fall weitgehend gebunden wird, $C_F \approx C_{Fb}$, entspricht das Spektrum 5 nahezu dem E-DNA-Komplex im Sättigungsbereich. In Abb. 5 ist dieses Spektrum der Absorption einer fluorochromierten A9-Zelle im kurzweligen Spektralbereich gegenübergestellt. Die Analogie beider Spektren ist unverkennbar. Insbesondere ist hervorzuheben, daß im Spektrum der fluorochromierten Zelle die Bande des freien Farbstoffs bei 283 nm nicht beobachtet wird. Unter unseren Fluorochromierungsbedingungen enthält die Zelle keinen überschüssigen Farbstoff.

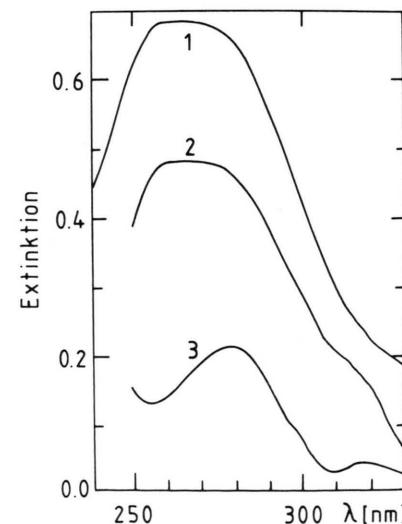


Abb. 5. 1. Lösungsspektrum des E-DNA-Komplexes bei Sättigung, $r_{\max} = n = 0,21$, siehe auch Abb. 3, Kurve 5. 2. Spektrum einer fixierten fluorochromierten A9-Zelle, gemessen im Zellkern. 3. Spektrum einer fixierten A9-Zelle nach DNA- und RNA-Abbau, gemessen im Cytoplasma.

Im Sichtbaren ist die Extinktion des E-DNA-Komplexes klein. Die Fluoreszenz wurde deshalb im Langwelligen mit einer Quecksilberlampe im Bereich des Extinktionsminimums bei $\lambda_1 = 365 \text{ nm}$ angeregt.

Zur Messung von E_2 empfiehlt es sich, eine Wellenlänge λ_2 zu wählen, bei der die Extinktion des E-DNA-Komplexes möglichst groß, die Absorption störender Substanzen in der Zelle aber möglichst klein ist. Als störende Zellbestandteile kommen Proteine und RNA in Frage. RNA kann enzymatisch abgebaut und damit entfernt werden. Das gleiche ist bei den Proteinen nicht möglich, da wir für die experimentelle Verifizierung von Gl. (7) fixierte Zellen benötigen, die ihren Ort während der Messung von J und E_2 nicht ändern. Wir führten die mikrospektralphotometrische Messung von E_2 in der Zelle im kurzweligen Maximum des E-DNA-Komplexes bei $\lambda_2 = 260 \text{ nm}$ durch. Zellen, die einem enzymatischen DNA- und RNA-Abbau unterzogen wurden, haben bei dieser Wellenlänge ein Minimum der Eigenabsorption, Abb. 5.

Die Extinktion E_2 wird im Mikrospektralphotometer in Durchlicht gemessen, die Fluoreszenz J in Reflexion mit einer Filterkombination, die verhindert, daß Primärlicht auf den Empfänger der Apparatur gelangt. Die Messung von E_2 und J muß am gleichen Zellausschnitt erfolgen. Der Ausgeblendete Präparatausschnitt darf deshalb beim Umschalten der Apparatur von Absorption auf Emission nicht auswandern (siehe experimenteller Teil).

Die untersuchten Zellausschnitte hatten eine Fläche von $q = 0,99 \mu^2$. Das entspricht etwa 1–5% der Fläche des Zellkerns der verwendeten A9-Zellen.

Wir haben fünf Meßreihen an fixierten, fluorochromierten A9-Zellen durchgeführt. Die Versuche unterscheiden sich in den Präparationsbedingungen, die im folgenden kurz zusammengestellt sind (siehe experimenteller Teil):

Meßreihe 1: a. Fixierung mit Methanol. b. Kein Nucleinsäure-Abbau. c. Färbung bei pH = 4,0 ohne LiCl-Zusatz, $C_F = 1,0 \times 10^{-2} \text{ M}$. d. Eindeckung wäßrig pH = 4,0. Abb. 6 (○).

Meßreihe 2: a. Fixierung mit FEM. b. RNA-Abbau bei pH = 7,7. c. Färbung bei pH = 4,0 ohne LiCl-Zusatz, $C_F = 1,0 \times 10^{-2} \text{ M}$. d. Eindeckung wäßrig pH = 4,0. Abb. 6 (△).

Meßreihe 3: a. Fixierung mit FEM. b. RNA-Abbau bei pH = 7,7. c. Färbung bei pH = 4,0 mit LiCl-Zu-

satz, $C_F = 1,0 \times 10^{-2} \text{ M}$, $C_S = 1 \text{ M}$. d. Eindeckung wäßrig pH = 4,0, $C_S = 1 \text{ M}$. Abb. 6 (●).

Meßreihe 4: a. Fixierung mit Methanol. b. DNA-Abbau bei pH = 7,0. Nachfixierung mit FEM. d. RNA-Abbau bei pH = 7,7. e. Färbung bei pH = 4,0 ohne LiCl-Zusatz, $C_F = 1,0 \times 10^{-2} \text{ M}$. f. Eindeckung wäßrig pH = 4,0. Da DNase auf FEM-fixierte Zellen unzureichend einwirkt, wurde der DNA-Abbau an Methanol-fixierten Präparaten durchgeführt und für den RNA-Abbau mit FEM nachfixiert. Abb. 6 (◇).

Meßreihe 5: a–c. Wie bei Meßreihe 3, jedoch d. Eindeckung wäßrig pH = 4,0, $C_S = 0,1 \text{ M}$. Abb. 6 (×).

Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten J sind in Abb. 6 über der Extinktion E_2 aufgetragen. Vergleicht man die Daten, so erkennt man, daß sich die Meßwerte der fünf Versuchsreihen – trotz ihrer unterschiedlichen Vorgeschichte – innerhalb der Fehlergrenzen durch eine einzige Korrelationsgerade beschreiben lassen. Dieses zunächst überraschende Ergebnis zeigt, daß die Fluoreszenzquantenausbeute, die den Anstieg der Geraden bestimmt, bei allen fünf Meßreihen konstant ist. Die Schwankung der Meßwerte ist einsteils auf die Absorption störender Substanzen bei 260 nm zurückzuführen, die in verschiedenen Zellausschnitten unterschiedlich stark sein kann. Anderenteils machen sich beim Umschalten der Meßapparatur von Absorption auf Fluoreszenz Aperturfehler bemerkbar. Bei den vorliegenden Messungen mußte mit relativ hoher Beleuchtungsapertur gearbeitet werden, um genügend hohe I_0 und damit kleine q realisieren zu können.

Die Korrelationsgerade schneidet die Abszisse bei der Extinktion $E_2^0 = 0,14$, die durch die mittlere Eigenabsorption der untersuchten A9-Zellen nach DNA- und RNA-Abbau gegeben ist und vorzugsweise von Protein verursacht wird (Meßreihe 4). Es ist bemerkenswert, daß die Zelle nach totalem Nucleinsäure-Abbau unter den gegebenen Versuchsbedingungen praktisch nicht mehr fluoresziert. Der Farbstoff wird demnach bei pH = 4,0 nicht mehr an Protein gebunden. Außerdem ist die Autofluoreszenz der Zelle vernachlässigbar klein. Beides sind Voraussetzungen für die fluorometrische DNA-Bestimmung in der Zelle.

Die Meßwerte der Präparate, die keinem enzymatischen Nucleinsäure-Abbau unterworfen wurden (Meßreihe 1), liegen innerhalb der Schwankungsbreite auf der gleichen Korrelationsgeraden wie Präparate mit RNA-Abbau (Meßreihen 2, 3 und 5). Die

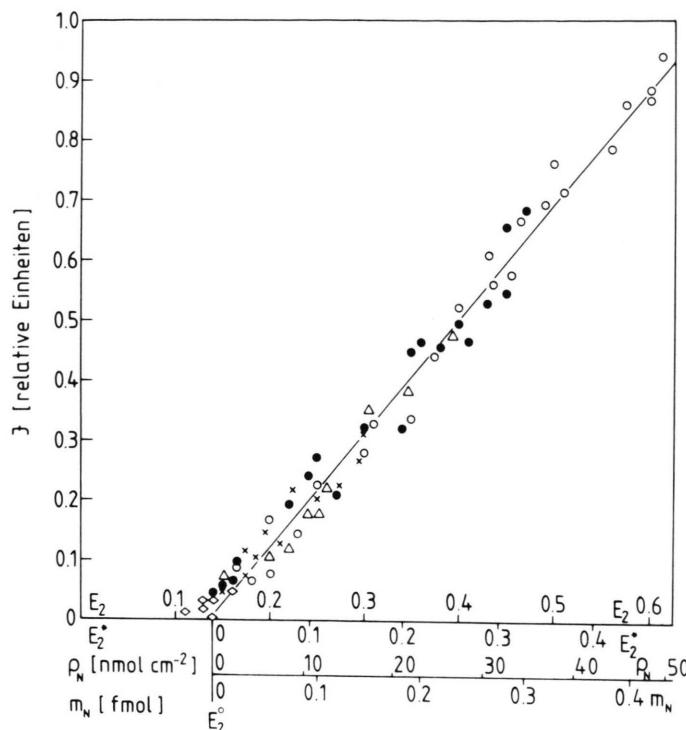


Abb. 6. Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität J und der Extinktion E_2 bei 260 nm von A9-Zellen unter verschiedenen Präparationsbedingungen: Meßreihe 1 (\circ), Meßreihe 2 (\triangle), Meßreihe 3 (\bullet), Meßreihe 4 (\diamond), Meßreihe 5 (\times). Erläuterung siehe Text. Fluoreszenzanregung bei $\lambda_1 = 365$ nm. E_2^* = auf Restabsorption korrigierte Extinktion E_2 , ρ_N = Flächendichte der Nucleinsäure, m_N = Molzahl Nucleinsäure pro vermessenem Zellausschnitt $q = 0,99 \times 10^{-8}$ cm 2 .

Fluoreszenz der unbehandelten Zellen wird von Farbstoff verursacht, der an DNA und RNA gebunden ist. Offenbar sind die Extinktionskoeffizienten ε_1 , ε_2 und die Quantenausbeute Q für den E-DNA- und E-RNA-Komplex in der Zelle nur wenig verschieden. Orientierende Versuche an Zellen; bei denen entweder nur DNA oder nur RNA abgebaut wurden, bestätigen diesen Befund. Unter den Versuchsbedingungen der Meßreihe 1 wird demnach der totale Nucleingehalt der Zelle erfaßt.

In den Meßreihen 2 und 3 wurden die Präparate nach RNA-Abbau entweder ohne Salzzusatz oder bei Gegenwart von 1 M LiCl fluorochromiert. Beide Meßreihen zeigen im optischen Verhalten keine typischen Unterschiede. Der Farbstoff wird nun unter den Versuchsbedingungen der Reihen 2 und 3 entweder bevorzugt ionisch oder aber bevorzugt intercalativ an DNA gebunden. Offensichtlich beeinflußt die Art der Bindung die Fluoreszenzausbeute in der Zelle nur wenig. Damit ist es möglich, den DNA-Gehalt von Zellen auch ohne RNA-Abbau fluorometrisch zu bestimmen, wenn man durch genügend hohe LiCl-Konzentrationen verhindert, daß der Farbstoff an RNA gebunden wird.

In der Meßreihe 5 haben wir schließlich untersucht, ob sich Verdünnen der LiCl-Lösung von 1 M

auf 0,1 M nach der Fluorochromierung auf die Quantenausbeute auswirkt. Es ließ sich kein signifikanter Effekt nachweisen. Vielmehr liegen die Meßwerte auf der gleichen Korrelationsgeraden, die auch durch die anderen Meßreihen vorgegeben ist.

Fluorometrische Absolutbestimmung der DNA in der Zelle

Aus der Fluoreszenzintensität kann der DNA-Gehalt in der Zelle bestimmt werden, wenn man die störende RNA entweder vor der sauren Fluorochromierung enzymatisch abbaut oder durch hohe LiCl-Konzentration den Farbstoff von der RNA verdrängt. In beiden Fällen kann die in Abb. 6 wiedergegebene Korrelationsgerade als empirische Eichkurve dienen, um aus der gemessenen Fluoreszenzintensität J die auf Restabsorption korrigierte Extinktion $E_2^* = E_2 - E_2^0$ des E-DNA-Komplexes zu bestimmen. Ist außerdem der molare dekadische Extinktionskoeffizient ε_{Fb2} bei λ_2 bekannt, kann aus E_2^* die Menge E-DNA-Komplex und damit DNA im untersuchten Zellausschnitt ermittelt werden.

Den Extinktionskoeffizienten ε_{Fb2} des E-DNA-Komplexes haben wir mit Kalbsthymus-DNA als Modellsubstanz *in vitro* bestimmt. Dabei muß berücksichtigt werden, daß in Lösung ein Gleichge-

wicht zwischen gebundenem Farbstoff (Fb), freiem Farbstoff (Ff) und freier Nucleinsäure (Nf) vorliegt. Alle drei Moleküslespezies absorbieren bei $\lambda_2 = 260 \text{ nm}$:

$$(E_2/d_2) = \varepsilon_{\text{Ff}2} C_{\text{Ff}} + \varepsilon_{\text{Fb}2} C_{\text{Fb}} + \varepsilon_{\text{Nf}2} C_{\text{Nf}}. \quad (8)$$

Die Einwaagekonzentration an Mononucleotideinheiten DNA (N) beträgt $C_N = C_{\text{Nf}} + C_{\text{Nb}}$, an Bindungspositionen $nC_N = nC_{\text{Nf}} + nC_{\text{Nb}} \cdot nC_{\text{Nb}}$ ist die Konzentration an Bindungspositionen in der DNA, an die Farbstoff bereits gebunden wurde, $nC_{\text{Nb}} = C_{\text{Fb}}$:

$$C_N = C_{\text{Nf}} + (C_{\text{Fb}}/n). \quad (9)$$

Für $C_{\text{Fb}} = 0$ ist $C_N = C_{\text{Nf}}$. Bei Sättigung der DNA mit Farbstoff ist $C_{\text{Nf}} = 0$ und $nC_N = C_{\text{Fb}, \max}$. Mit der Einwaagekonzentration an Farbstoff $C_F = C_{\text{Ff}} + C_{\text{Fb}}$ und dem Massenwirkungsgesetz

$$K_S = C_{\text{Fb}} / [(nC_N - C_{\text{Fb}}) C_{\text{Ff}}] \quad (10)$$

erhält man:

$$(E_2/d_2) = \varepsilon_{\text{Ff}2} C_{\text{Ff}} + \varepsilon_{\text{Nf}2} C_N + (n\varepsilon_{\text{Fb}2} - \varepsilon_{\text{Nf}2}) K_S C_N C_{\text{Ff}} / (1 + K_S C_{\text{Ff}}). \quad (11)$$

In Gl. (11) geht die Konzentration an freiem Farbstoff C_{Ff} ein. Sie kann aus der Extinktion der längstwelligen Absorptionsbande des E-DNA-Systems bei $\lambda_3 = 480 \text{ nm}$ bestimmt werden, Abb. 4. Im langwelligen Spektralbereich wird die Absorption nur von freiem und gebundenem Farbstoff verursacht:

$$(E_3/d_3) = \varepsilon_{\text{Ff}3} C_{\text{Ff}} + \varepsilon_{\text{Fb}3} C_{\text{Fb}}. \quad (12)$$

Daraus folgt:

$$C_{\text{Ff}} = [(E_3/d_3) - \varepsilon_{\text{Fb}3} C_{\text{Fb}}] / [\varepsilon_{\text{Ff}3} - \varepsilon_{\text{Fb}3}]. \quad (13)$$

Die Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{\text{Ff}3}$ und $\varepsilon_{\text{Fb}3}$ bei $\lambda_3 = 480 \text{ nm}$ wurden bereits früher bestimmt [17, 19]: $\varepsilon_{\text{Ff}3} = 5800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\varepsilon_{\text{Fb}3} = 2500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Damit ist C_{Ff} aus Gl. (13) zugänglich. Die Extinktionskoeffizienten des freien Farbstoffs und der freien Nucleinsäure bei $\lambda_2 = 260 \text{ nm}$ betragen $\varepsilon_{\text{Ff}2} = 17600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\varepsilon_{\text{Nf}2} = 6500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [24]. n ist aus Scatchard-Bindungsisothermen bekannt, $n = 0,21$. In Gl. (11) treten damit nur noch der gesuchte Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{\text{Fb}2}$ und die Bindungskonstante K_S als Unbekannte auf.

Zur Bestimmung von $\varepsilon_{\text{Fb}2}$ und K_S wurden (E_2/d_2) und (E_3/d_3) bei λ_2 und λ_3 gemessen. Die Farbstoffkonzentration war konstant $C_F = 2,04 \times 10^{-5} \text{ M}$. Die Nucleinsäurekonzentration wurde von $C_N = 0$ auf $C_N = 2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$ gesteigert, $T = 298 \text{ K}$, $\text{pH} = 7,7$

$(0,041 \text{ M Tris-Puffer}, 1,0 \times 10^{-3} \text{ M Na}_2\text{EDTA})$. Aus den Meßwerten wurden mit Gl. (11) und (13) die Iterationsparameter $\varepsilon_{\text{Fb}2}$ und K_S durch Ausgleichsrechnung ermittelt:

$$\varepsilon_{\text{Fb}2} = 45200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}, K_S = 7,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}.$$

Der Betrag von K_S steht mit früheren Messungen aus Scatchard-Bindungsisothermen in guter Übereinstimmung [6, 9–21]. Der Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{\text{Fb}2} = 45200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bezieht sich auf den Ethidium-Kalbsthymus-DNA-Komplex. Wir nehmen an, daß sich der Wert für A9-Zellen nicht wesentlich davon unterscheidet.

Für die auf Restabsorption korrigierte Extinktion $E_2^* = E_2 - E_2^0$ gilt in Analogie zu Gl. (7):

$$J = K E_2^* = K \varepsilon_{\text{Fb}2} C_{\text{Fb}} d = K \varepsilon_{\text{Fb}2} Q_{\text{Fb}}. \quad (14)$$

$K = 2,30 A Q I_0 (\varepsilon_{\text{Fb}1}/\varepsilon_{\text{Fb}2})$ ist der empirisch zugängliche Anstieg der Korrelationsgeraden in Abb. 6. Er ist konstant, wenn die Anregungsbedingung für die Fluoreszenz konstant gehalten wird, $A I_0 = \text{const.}$ und die Quantenausbeute in Näherung unabhängig von den Präparationsbedingungen in der Zelle ist, $Q = \text{const.}$

Die Schichtdicke des durchstrahlten Präparats ist nicht leicht zugänglich. Deshalb ist es zweckmäßig, im ersten Schritt anstelle von C_{Fb} das experimentell leichter meßbare Produkt $C_{\text{Fb}} d = Q_{\text{Fb}}$ als Maß für die Menge E-DNA-Komplex im untersuchten Zellausschnitt zu bestimmen. Die physikalische Bedeutung von Q_{Fb} ist leicht einzusehen. Der im Meßmikroskop ausgeblendete Zellausschnitt hat die Fläche q . Im Idealfall stellt dann $q d = v$ das durchstrahlte Volumen dar, dessen Lichtemission unter konstanten Bedingungen gemessen wird. $m_{\text{Fb}} = v C_{\text{Fb}}$ ist dann die Molzahl E-DNA-Komplex im durchstrahlten Volumen v und $C_{\text{Fb}} d = m_{\text{Fb}}/q = Q_{\text{Fb}} \cdot Q_{\text{Fb}}$ hat damit die Bedeutung der beobachteten „Flächendichte“ der Substanz im untersuchten Zellausschnitt. Summiert man über alle unabhängigen Bildausschnitte q_i in der Zelle, so erhält man die Gesamtmenge gebundenen Farbstoffs, $M_{\text{Fb}} = \sum_i m_{\text{Fbi}}$, die in einer Scanning-Prozedur zugänglich ist.

Die Fläche q des ausgeblendeten Zellausschnitts kann empirisch bestimmt werden und betrug bei unseren Messungen $q = 0,99 \times 10^{-8} \text{ cm}^2$. Damit ist auch die Molzahl m_{Fb} des E-DNA-Komplexes, der im ausgeblendeten Zellausschnitt der Fläche q im Mikroskop „sichtbar“ ist, näherungsweise zugänglich, $m_{\text{Fb}} = Q_{\text{Fb}} q$.

Im Sättigungsbereich der Nucleinsäure mit Farbstoff, der bei unseren Färbebedingungen angestrebt wird, beträgt $C_{Fb, \max} = nC_N$ oder $\varrho_{Fb, \max} = n\varrho_N$ bzw. $m_{Fb, \max} = n m_N$. Da der stöchiometrische Faktor $n = 0,21$ – bezogen auf Mononucleotideinheiten – bekannt ist, können die Flächendichte ϱ_N und die Molzahl m_N der Nucleinsäure im untersuchten Zellausschnitt bestimmt werden. Die entsprechenden Skalen sind in Abb. 6 auf der Abszisse dargestellt.

Die Flächendichte ϱ_N hat nach unseren Messungen an A9-Zellen die Größenordnung $10^1 \text{ nmol cm}^{-2}$ ($1 \text{ nmol} = 10^{-9} \text{ mol}$), die Molzahl m_N pro Zellausschnitt die Größenordnung 10^{-1} fmol ($1 \text{ fmol} = 10^{-15} \text{ mol}$). Die kleinen Flächendichten ϱ_N dürfen nicht täuschen. Sie wurden an sehr dünnen Zellschichten d gemessen. d und v haben die Größenordnung 10^{-4} cm bzw. 10^{-12} cm^3 . Damit sind die Nucleinsäurekonzentrationen $C_N = m_N/v = \varrho_N/d$ von der Größenordnung $10^{-1} \text{ mmol cm}^{-3} = 0,1 \text{ M}$. Das sind respektable Konzentrationen. Dabei muß man noch beachten, daß die Nucleinsäure im Volumen v nicht gleichmäßig verteilt, sondern lokal angereichert ist. Die abgeschätzte Größenordnung stellt deshalb eine untere Grenze dar, die während der Mitose in den Chromosomen überschritten werden kann.

Die Flächendichte ϱ_N , Molzahl m_N und Nucleinsäurekonzentration C_N wurden unter der Annahme berechnet, daß die Nucleinsäure mit Farbstoff gesättigt ist, d. h. keine maskierenden Reaktionen die Komplexbildung zwischen Nucleinsäure und Farbstoff verhindern. Bei den hohen Farbstoffkonzentrationen C_F , die wir bei der Fluorochromierung einsetzen, sollte die DNA – ebenso wie im Modellversuch – wenigstens näherungsweise mit E gesättigt sein. Andernfalls wäre die lineare Korrelation in Abb. 6 schwer verständlich. Eine Maskierung der Komplexbildung ist jedoch nicht ganz auszuschließen. Die ermittelten ϱ_N , m_N und C_N beziehen sich dann auf denjenigen Anteil der DNA, der der Komplexbildung zugänglich ist.

Danksagung

Dem Bundesministerium für Forschung und Technologie, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie sind wir für Sachbeihilfen sehr zu Dank verpflichtet. Den Herrn Dr. E. Ohmes und Dr. W. Seiffert danken wir für Hilfe beim Bau des Mikrospektralphotometers. Herrn Prof. Dr. D. Wittekind und Frau V. Kretschmer sind wir für Ratschläge zur Gewebekultur sehr dankbar.

- [1] E. Sprenger, M. Schaden, D. Wagner, M. Hilgarth u. W. Sandritter, Beitr. Path. **151**, 373 (1974).
- [2] J. W. Gray, A. V. Carrano, L. L. Steinmetz, M. A. Moor, B. H. Mayall u. M. L. Mendelsohn, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **72**, 1231 (1975).
- [3] H. A. Crissman, M. S. Oka u. J. A. Steinkamp, J. Histochem. Cytochem. **24**, 64 (1976).
- [4] E. Sprenger, W. Sandritter, H. Naujoks, M. Hilgarth, D. Wagner u. M. Vogt-Schaden, Acta Cytologica **21**, 435 (1977).
- [5] R. H. Jensen, R. G. Langbois u. B. H. Mayall, J. Histochem. Cytochem. **25**, 954 (1977).
- [6] J.-B. LePecq u. C. Paoletti, J. Mol. Biol. **27**, 87 (1967).
- [7] E. Heinen, R. Basseler, C. M. Calberg-Bacq, C. Desaive u. A. Lepiont, Biochem. Pharmacol. **23**, 1549 (1974).
- [8] E. Heinen, R. Basseler u. C. M. Calberg-Bacq, Beitr. Path. **159**, 207 (1976).
- [9] M. J. Waring, J. Mol. Biol. **13**, 269 (1965).
- [10] M. J. Waring, Mol. Pharmacol. **1**, 1 (1965).
- [11] M. J. Waring, J. Mol. Biol. **54**, 247 (1970).
- [12] E. F. Gale, E. Cundliff, P. E. Reynolds, M. S. Richmond u. M. J. Waring, The Molecular Basis of Antibiotic Action, John Wiley and Sons, London, New York, Sydney, Toronto 1972.
- [13] M. J. Waring, Chemistry and Industry **1**, 105 (1975).
- [14] J. Paoletti u. J. B. LePecq, J. Mol. Biol. **59**, 43 (1971).
- [15] M. LeBret, J. B. LePecq, J. Barber u. B. P. Roques, Nucl. Acids Res. **4**, 1361 (1977).
- [16] W. Bauer u. J. Vinograd, J. Mol. Biol. **33**, 141 (1968).
- [17] J. M. Bresloff u. D. M. Crothers, J. Mol. Biol. **95**, 103 (1975).
- [18] H. Porumb, Prog. Biophys. Molec. Biol. **34**, 175 (1978).
- [19] J. Pauluhn u. H. W. Zimmermann, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. **82**, 1265 (1978).
- [20] J. Pauluhn u. H. W. Zimmermann, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. **83**, 76 (1979).
- [21] J. Pauluhn, R. Grezes u. H. W. Zimmermann, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. **83**, 708 (1979).
- [22] J. Chayen, L. Bitensky u. R. G. Butcher, Histochemistry, Verlag Chemie, Weinheim 1975.
- [23] M. Arnold, Histochemistry, Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1969.
- [24] D. O. Jordan, The Nucleic Acids, Vol. I, (E. Chargaff u. J. N. Davidson, Hrsg.), S. 476, Acad. Press, New York 1955.
- [25] H. Piller, Microscope Photometry, Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1977.
- [26] A. L. Lehninger, deutsche Übersetzung von K. Fischer und E. Ries, S. 571, Verlag Chemie, Weinheim 1975.
- [27] I. Zimmermann u. H. W. Zimmermann, Z. Naturforsch. **31 c**, 656 (1976).
- [28] J. Pauluhn, R. Grezes u. H. W. Zimmermann, Acta Histochem., im Druck.
- [29] G. Scatchard, An. N.Y. Acad. Sci. **51**, 660 (1949).
- [30] R. Bittman, J. Mol. Biol. **46**, 251 (1969).
- [31] M. Lieberman, J. Rubin u. M. Sundaralingam, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **74**, 4821 (1977).
- [32] P. D. Ross u. R. L. Scuggs, Biopolymers **2**, 79 (1964).
- [33] A. Danchin, Biopolymers **11**, 1317 (1972).