

If we plot the values of  $\log k_B$  versus  $\log [H^+]$ , a straight line is obtained having the slope approximately equal to one. The values of constant  $k_B$ , calculated from the experimental data of Larsson, confirm scheme II, obeying eqn. (2).

1. Larsson, L. *Acta Chem. Scand.* **7** (1953) 306.
2. Larsson, L. *Svensk Kem. Tidskr.* **70** (1958) 405.
3. Heath, D. F. and Casapieri, P. *Trans. Faraday Soc.* **47** (1951) 1093.

Received May 9, 1963.

## Spaltung eines Desoxyribo-nukleinsäure-Präparates nach Abscheidung niedrig-molekularer Bestandteile durch Sephadex

HANS v. EULER und HANS HASSELQUIST

*Institut für organisch-chemische Forschung, Universität, Stockholm, Schweden*

Das Ziel der hier mitzuteilenden Versuche war, ein reines Ausgangsprodukt für die Untersuchung der Desoxyribo-nukleinsäure-Spaltung zu gewinnen. Wie R.K. Zahn<sup>1</sup> in einer Arbeit aus dem Institut von K. Felix betont, sind von DNS in der biochemischen Literatur stets nur Teilanalysen veröffentlicht worden, so dass die Beziehung zwischen Reinheit und Eigenschaften dieser Stoffklasse "etwas wagt" ist. Ausgangspunkte unserer Versuche über die enzymatischen Spaltungen der Desoxyribo-nukleinsäuren (DNS) liegen in den Ergebnissen, die wir über die Spaltung unseres ursprünglichen DNS-Sperma-Präparates von Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio, gewonnen haben.

An verschiedenen Gelsäulen und mit verschiedenen Eluierungsflüssigkeiten fanden wir, dass unser DNS-Präparat niedrig-molekulare Fraktionen von der gleichen Absorption wie freies Adenin enthält, so dass es schwierig ist, durch direkte Ablebung der mit UVICORD erhaltenen Kurven zu entscheiden, ob eine wirkliche Spaltung

vorliegt. Es erschien deswegen notwendig, unser von NBC, Cleveland, bezogenes DNS-Präparat vor dem nächsten Spaltungsversuch zu reinigen und möglichst alle niedrig-molekularen Reste aus diesem Präparat zu entfernen, dessen Absorption im UV mit der Absorption der in der Gelsäule gefundenen Basen, Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin, übereinstimmt.

Eine schnelle Entfernung der niedrig-molekularen Teile des Präparates wurde erreicht durch Filtration der Gelsäule SE-Sephadex C-25 (Sulfo-äthyl-äther-Derivat von Sephadex, Kationaustauscher).

*Ausführung.* SE-Sephadex C-25 liess man 2 St. bei Raumtemp. in Wasser quellen; die überstehende trübe Lösung wurde abdekantiert und der Rückstand mit dem 20-fachen Volumen Wasser unter Umrühren versetzt und zur Sedimentierung gestellt. Dieses Verfahren wurde wiederholt bis die überstehende Lösung keine festen Partikelchen mehr enthielt. Hierauf wurde das Gel in einen Filtertrichter überführt und darin gewaschen, und zwar zuerst mit 0,5 M NaOH, sodann mit Wasser, hierauf mit 0,5 M HCl und schliesslich mit Wasser bis das Washwasser sich frei von HCl erwies. Das so behandelte Gel wurde in eine Säule von 14 × 300 mm übergeführt. Die Gelsäule wurde mit dem Detektor, UVICORD 4701 A LKB, UV-abs. 2537 Å, sowie mit dem Schreiber und dem Fraktionssammler in Verbindung gesetzt.

Die DNS-Lösung enthielt 100 mg DNS NBC, Cleveland in 2,5 ml Wasser gelöst und wurde mit einer Gesättigten Soda-Lösung bis pH 7 versetzt.

Diese Lösung wurde auf die Gelsäule gegossen, die zuerst mit dest. Wasser eluiert wurde, wobei die erste Spitze (siehe Spitze I) gesammelt wurde (20 ml Lösung, kräftig sauer); ihr Gehalt an Trockensubstanz DNS wurde ermittelt. Diese 20 ml enthielten 90 mg DNS, war somit die Hauptfraktion mit schwach gelbem Farbton.

Bei fortgesetzter Eluierung der Säule mit Wasser konnte man noch weitere Fraktionen sammeln, die eine Absorption bei 2537 Å gaben, die aber weniger als 1 mg Substanz je Fraktion enthielten. Nach 220 ml Wasser-Eluierung ging man zu 0,5 M NaOH-Lösung über, wobei noch weitere 5 Fraktionen erhalten wurden. Kein Anzeichen für die Gegenwart von DNS. Abb. 1.

Die Hauptfraktion, 20 ml mit 90 mg DNS wurde nun kontrollgespalten und

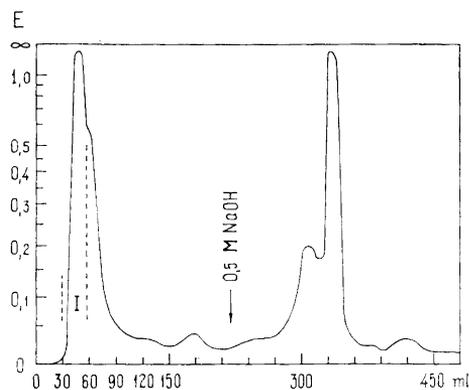


Abb. 1. Reinigung von DNS auf SE-Sephadex C-25. Spitze I = hochmolekulare Hauptfraktion. Die übrigen Spitzen enthalten nur niedrigmolekulare Teile.

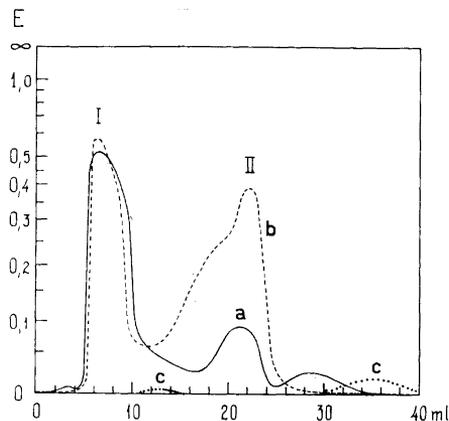


Abb. 2. Trennung der Lösungen (a), (b) und (c) mit Sephadex G-75. (a) Eigenspaltung von DNS. (b) Spaltung von DNS mittels Tumorextrakt. (c) Absorption aus dem Tumorextrakt.

zwar in der Gelsäule Sephadex G-75, die bei der Spaltung der Enzym-behandelten DNS zur Anwendung kommt.

**Ausführung.** Man liess Sephadex G-75 1 Tag in Wasser quellen; nach Umrühren und Sedimentieren wurde die überstehende Flüssigkeit, die die langsam sedimentierenden Partikeln enthält, abdekantiert. Dieses Verfahren wurde wiederholt bis die überstehende Flüssigkeit klar war. Nun wurde zur Elution eine Lösung auf die Säule von  $11 \times 350$  mm gegossen, die sodann mit dem Detektor verbunden wurde.

0,3 ml der DNS-Hauptfraktion wurde nun auf die Säule gegossen und mit Wasser eluiert. Dabei wurde nur 1 Spitze der Absorptionskurve bei 2537 Å erhalten, was andeutet, dass diese DNS-Fraktion von niedrig-molekularen Substanzen befreit war.

Die kontrollierte DNS-Fraktion wird nun dazu verwendet, DNS mittels Enzym-Präparaten zu spalten.

**Spaltungsversuche an einem Tumor-Aceton-Trockenpräparat.** 22,5 mg DNS (gereinigt durch Behandlung mit SE-Sephadex C-25; Hauptfraktions-Lösung, siehe oben) gelöst in 5 ml Wasser + 50 mg wasserfreier  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . (a) Von obiger DNS + Soda-Lösung wurde 1 ml als 0-Probe verwendet. (b) Die übrigen 4 ml wurden mit 8 mg feingepulvertem Tumor-Trockenpräparat (Jensen-Sarkom der BD I-Ratten erhalten von Herrn Prof. H. Druckrey,

Freiburg) versetzt. (c) 8 mg Tumor-Trockenpräparat gelöst in 4 ml Wasser + 40 mg wasserfreier Soda.

Ausführung des Versuches: Die Lösungen (a), (b) und (c) blieben bei  $37^\circ\text{C}$   $3\frac{1}{2}$  Stunden im Thermostaten stehen und wurden dann mit HAc bis auf  $\text{pH} = 7$  neutralisiert. Die neutralen Lösungen wurden hierauf einzeln in der Gelsäule mit Sephadex G-75 und Wasser als Eluierungsmittel behandelt. Absorptionskurven der einzelnen Lösungen siehe Abb. 2.

**Ergebnis.** Die Lösung (c) enthält so geringe Mengen von UV-absorbierender Substanz, dass diese keine erhebliche additive Wirkung auf die Kurven der Lösungen (a) und (b) ausüben konnte. Die Kurve der Lösung (a) (0-Probe) zeigt, dass eine gewisse Eigenspaltung ohne Enzymwirkung eingetreten ist. In der Kurve der Lösung (b) tritt eine deutliche Enzymwirkung hervor, wobei die Spitze II stark erhöht war.

Ein Vergleich des Tumor-Trockenpräparates mit den Trockenpräparaten von Milz, Niere, Leber und Darm zeigt eine erhöhte Spaltungswirkung des Tumor-Präparates. Weitere Isolierungsversuche bezgl. der DNS-Spaltprodukte an Tumor-Präparaten sollen ausgeführt werden.

1. Zahn, R. K. *Z. physiol. Chem.* **313** (1958) 77.

Eingegangen am 21. Juni, 1963.