

elektrostatisch positiv geladene Reaktionskomponente fungiert und eine Hämagglutination durch Virus dann zustande kommt, wenn die folgenden Voraussetzungen erfüllt sind:

1. Der IEP des *Virus* ist so gelagert, daß in dem für die Titerbestimmung üblichen p_H -Bereich eine relativ *hohe* negative Ladung erwartet werden kann.

2. Die Lage des IEPs der *Erythrocyten* bzw. Zellreceptoren garantiert einen möglichst *geringen* Überschuß an negativer Ladung im Meßbereich, der durch Elektrolyt-Kationen weitgehend abgeschirmt wird.

3. Die HA-hemmende Wirkung von Inhibitoren

ist ausgeschaltet, möglicherweise durch Verdrängung dieser Substanzen durch stärker positiv geladene Erythrocyten, durch die Wahl eines günstigen p_H -Wertes des Reaktionsmilieus oder durch irreversible Inaktivierung.

Es ist beabsichtigt, die Versuche unter diesen Gesichtspunkten fortzusetzen und es soll zunächst auch besonders der O-D-Phasenwechsel im Hinblick auf die physikalisch-chemischen Voraussetzungen für das Zustandekommen der HA untersucht werden.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung der Arbeiten.

Über Desoxyribonucleinsäure-Molekeln in Protein-Mischfilmen*

Von A. KLEINSCHMIDT, unter Mitarbeit von H. RÜTER und W. HELLMANN

Aus dem Hygiene-Institut der Stadt und Universität Frankfurt am Main
und

R. K. ZAHN, unter Mitarbeit von A. DOCTER, E. ZIMMERMANN, H. RÜBNER und A. M. AL AJWADY

Aus dem Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt am Main
(Z. Naturforschg. **14 b**, 770—779 [1959]; eingegangen am 13. Juli 1959)

A nucleoprotein of a vitrous consistency was extracted from the gonads of the coalfish (*Gadus virens*).

The preparation of deoxyribonucleic acid (DNA) from this nucleoprotein and from staphylococci is described. Both of these different kinds of DNA have been mixed with bovine serum albumin or cytochrom c respectively to produce solutions which subsequently were spread onto the Langmuir trough under defined conditions.

After transfer of aliquots from the surface monolayers to carbon support films the preparations were examined with the electron microscope. The micrographs show threads of various lengths, partly stretched, partly folded in loops, consisting of DNA molecules embedded in a protein envelope.

Measurements and calculations of 5900 particles of the complex of *Gadus virens*-DNA-Albumin, with relatively short threads show a distribution of discontinuous character. If length is plotted against number then it occurs that there are maxima of different lengths of threads. The abscissae of these maxima obey the ratio 1 : 2 : 4 : 8. This holds for longer threads too the maxima of which, however, have smaller ordinate values.

Bei der Charakterisierung von DNS-Molekeln tritt die Frage auf, wieweit bei einer Entfernung von Begleitstoffen und komplex gebundenen Anteilen im Verlauf der Präparation die Integrität der Makromoleküle gestört wird. Treten Änderungen im physikalisch-chemischen Zustand auf, so wird das meist auch eine Änderung der Funktion bedeuten. Dies hat ZAMENHOF¹ am Beispiel des transformierenden

Prinzips, vor allem von *Haemophilus influenzae* ausführlich beschrieben. Die Angaben der Mol.-Gew.^{2,3,4} waren stets von summierenden Verfahren, wie Ultrazentrifugation, Viskosimetrie und Lichtstreuung ausgegangen.

Mit der Darstellung von DNS-Molekeln durch das Elektronenmikroskop^{5,6,7,8} konnte ein neuer Weg beschritten werden, um Teilchengrößen und Varia-

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

¹ S. ZAMENHOF, *The Chemical Basis of Heredity* (eds. W. D. McELROY and B. GLASS), Baltimore 1957, S. 351.

² J. A. V. BUTLER, D. J. R. LAURENCE, A. B. ROBINS u. K. V. SHOOTER, *Proc. Roy. Soc. [London] Ser. A* **250**, 1 [1959].

³ S. KATZ u. H. K. SCHACHMAN, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **18**, 28 [1955].

⁴ CH. SADRON, J. POUYET u. R. VENDRELY, *Nature* [London] **179**, 263 [1957].

⁵ C. E. HALL, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 625 [1956].

⁶ H. KAHLER u. B. J. LLOYD, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **10**, 355 [1955].

⁷ R. VENDRELY, C. VENDRELY u. CH. SADRON, *C. R. hebd. Séances Acad. Sci.* **244**, 676 [1957].

⁸ R. C. WILLIAMS, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **9**, 237 [1952].

bilität der monomolekularen Fäden näher kennenlernen. Dem Verfahren ist aber bei einer kleinen Auswahl von Fäden, wie sie in den seitherigen Präparationen untersucht wurden, eine Grenze gesetzt. Die Auszählung und Messung elektronenmikroskopischer Aufnahmen führt nur dann zu richtigen Teilchenzahlen und Längenverteilungen, wenn aus der Gesamtheit eine repräsentative Beobachtungsreihe erhalten werden kann. Der Vorbereitung für dieses Ziel diene das an verschiedenen Objekten zuerst qualitativ geprüfte Spreitungsverfahren^{9, 10} von Protein-Mischfilmen. Hierbei wird eine verdünnte Proteinlösung, welche die morphologisch darzustellenden Teilchen in Suspension enthält, durch Spreiten des Eiweißanteiles auf wäßriger Oberfläche vom dreidimensionalen Zustand (in bulk) in den quasi zweidimensionalen Film (monolayer) überführt^{11, 12}. Dann wird der Film mit geeigneten Methoden auf elektronenmikroskopische Folien gebracht und morphologisch untersucht. Geschieht das so, daß der Film gleichmäßig mit den zu untersuchenden Objekten besetzt und die Fläche gemessen werden kann, so läßt sich die Methode für Beschreibungen und für eine quantitative Auswertung von langen fädigen Gebilden wie DNS heranziehen¹³.

Andererseits erleichtert die Elektronenmikroskopie von DNS-Protein-Mischfilmen dadurch, daß sie Gebilde von molekularer Größe und daran ausgeführte Reaktionen sichtbar macht, unsere biochemischen Präparationsmethoden. Man wird stets abwägen müssen, wieweit bei der „Reindarstellung“ der DNS die Reinigung getrieben werden soll. Die Entfernung der letzten Aminosäurereste geht stark auf Kosten des makromolekularen Zusammenhangs. Dabei spielt auch die Vorgeschichte eine wesentliche Rolle, ob hier die Möglichkeit einer, wenn auch noch so kurzfristigen Einwirkung von Desoxyribonucleasen (DNasen) gegeben war, ob Schwermetallionen zugegen waren und ob zu niedrige Ionenstärke herrscht hat.

Wir gehen in dieser Arbeit von der Reinigung des Ausgangsmaterials aus (Methodik: A), beschreiben die Besonderheiten eines Nucleoproteins, schließlich die Gewinnung unterschiedlich hoch gereinigter DNS-Präparate (B). Die Methodik der Oberflächen-

filme bis zur elektronenmikroskopischen Darstellung (C) und die Meßmöglichkeiten an DNS-Protein-Mischfilmen (D) werden dabei besprochen. Damit erhalten wir eine Basis für die Untersuchung von DNS-Präparaten mit DNasen verschiedener Herkunft und können versuchen, Reaktionsabläufe daran zu studieren.

Morphologische Resultate und Diskussion

An vielen anderen Nucleoproteinen, die über eine Zwischendarstellung der Spermatozoenkerne von Fischgonaden gewonnen wurden, waren wir gewöhnt, daß sie in unlöslichem Zustand Faserstrukturen aufwiesen. Bei der Reinigung von Seelachs-gonaden (Methodik A, 1, 2) bildeten sich bei einem Präparationsgang lichtmikroskopisch noch erkennbare, im Elektronenmikroskop gut darstellbare Plättchen aus (Abb. 1*), die wir zum Unterschied von einer echten kristallinen Struktur als glasartige Bildung ansprechen möchten. Aus diesem und faserig gewonnenen Nucleoprotein-Material wird dann die DNS mit Hilfe von Detergens (Dodecylsulfat) und Fällung in Äthanol als faseriges Produkt erhalten (B). Besonders die mehrfache Wiederholung der letzten Schritte führt schließlich zum Verschwinden der Begleitproteine bzw. Peptide, jedoch wird dies mit einem Viskositätsverlust erkauft. Dies mag die Nützlichkeit zahlreicher Umfällungen und die Trocknung mit Äther stark einschränken.

Elektronenmikroskopisch zeigt sich mit der Methode der Protein-Mischfilme (C, 3–6) bei dieser mehrfachen energetischen Nachreinigung ebenfalls eine sehr starke Verkürzung der DNS-Teilchen. Dabei war zunächst als spreitfähiges Protein Rinderserum-Albumin verwendet worden. In Abb. 2 treten die kurzen Fäden der hochgereinigten DNS größtenteils als wurstförmig verdickte Gebilde auf, gelegentlich auch mit scheinbaren Verzweigungen. Bei wesentlich längeren Teilchen von diesem und anderem Ausgangsmaterial (wie Staphylokokken-DNS) sieht man manchmal auch größere Strecken ähnlicher Auftreibungen (Abb. 3). Wir halten es für wahrscheinlich, daß es sich hierbei um partiell denaturierte Anteile der DNS handelt, wobei zwischen dem

⁹ R. E. HARTMANN, T. G. GREEN, J. B. BATEMAN, C. A. SENSENEY u. G. E. HESS, *J. appl. Physics* **24**, 90 [1953].

¹⁰ A. KLEINSCHMIDT, *Electron Microscopy, Proc. Stockholm Conference 1956*, S. 128.

¹¹ H. J. TRURNIT, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe [Wien]* **4**, 347 [1945].

¹² H. NETTER, *Theoretische Biochemie*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959, S. 245.

¹³ A. KLEINSCHMIDT u. R. K. ZAHN, *Verh. IV. Internat. Kongress Elektronenmikroskopie, Berlin 1958*, im Druck.

* Abb. 1–5 s. Tafel S. 772 a u. b.

oberflächen-denaturierten Protein und den nicht geordnet angelegten oder freigewordenen Wasserstoffbindungen zwischen den Nucleobasen in der DNS erhöhte zusätzliche Wechselwirkungen resultieren. Die kurzen und kontrastreichen „Würste“ der Abb. 2 oder der Fäden der Abb. 3 entsprechen dem DNS-Albumin-Komplex. Die Mischung der DNS mit Albumin (meist im Verhältnis 1 : 1) war jedoch bei den kurzen Fäden so bemessen, daß viel mehr fädiges Material hätte vorhanden sein sollen. Deshalb müssen wir annehmen, daß es sich nicht um eine der Gesamtmenge äquivalente Flächenbesetzung handelt. Ein Teil kann in Lösung gegangen sein, oder er tritt im Albuminfilmm nicht über das Niveau der gespreiteten Proteinteilchen heraus.

In diesem Zusammenhang und bei weiteren Längenmessungen hat die Längenverteilung des hochgereinigten Präparates der Seelachs-DNS interessiert, wovon Abb. 2 einen kleinen Ausschnitt zeigt. Ähnliche Längenmessungen, jedoch auf der Grundlage der proteinfreien Darstellung durch die Spraytechnik, wurden von HALL und DOTY¹⁴ an ultrabeschallten Bruchstücken durchgeführt und ergaben eine mit der zunehmenden Molekellänge etwa exponentiell abnehmende Häufigkeit. Zunächst erhielten wir in unseren Messungen an etwa 5900 Fäden bei einer Klassenbreite von 1000 Å Fadenlänge eine Häufigkeitsverteilung mit einem Maximum, die stark von der Normalverteilung abwich. Bei einer Klassenbreite von 250 Å wird die Verteilung mehrgipfelig (Abb. 6), ein Befund, der bei einer niedrigen Zahl von Messungen von fraglicher Bedeutung wäre. Werden die Klassenmitten untereinander fortlaufend verbunden, so resultiert eine mehrgipfelige Kurve, bei der die Abstände der Maxima sich wie 1 : 2 : 4 : 8 verhalten. Wir glauben nicht, daß dieses Ergebnis zufällig ist oder ein Selektionsphänomen in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen darstellt, zumal auch die kleinen Maxima bei höheren Molekellängen untereinander im Verhältnis ganzzahliger Vielfacher stehen. Es ist jedoch möglich, daß kürzere Bruchstücke der Ausmessung entgangen sind.

Neben den Versuchen mit Rinderserum-Albumin, dessen Eigenschaften als filmbildendes Protein in verschiedener Hinsicht beschrieben sind^{10, 15}, wurde auch Cytochrom c¹⁶ benutzt. Setzt man das Verhält-

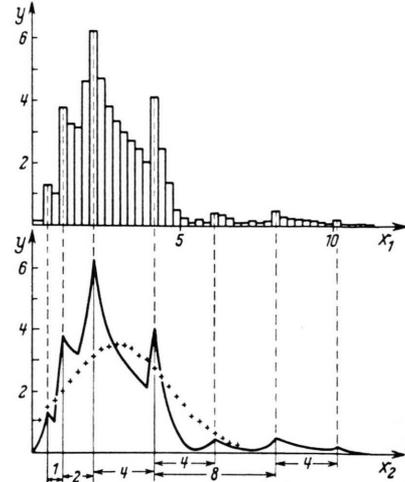


Abb. 6. Häufigkeitsverteilung der Längen des DNS-Albumin-Komplexes im Oberflächen-Mischfilm. x_1 -Achse: Längen der Molekeln (Einheit 1000 Å) bei Klassenbreite 250 Å. x_2 -Achse: Relative Breite der Häufigkeitsgipfel; Abstand der ersten Maxima ca. 500 Å (Einheit 500 Å). y -Achse: Häufigkeiten pro Klassenbreite (Einheit = 100). Teilchenzahl: 5878, zwischen 200 und 10 000 Å. Mittelwert \bar{x} = 2932 Å, bei einer Streuung von s^2 = 1694. Die Normalverteilung wurde errechnet, eingezeichnet (xxxx) und die Abweichung der beobachteten Verteilung für 27 kumulierte Werte mittels der χ^2 -Verteilung bestimmt. Die Schranke (5% Niveau) beträgt (bei f = 25) 14,6 (s. A. LINDER, Statistische Methoden, Basel 1945, S. 75), für die experimentellen Werte ergab sich χ^2 = 1450. Normalverteilung liegt also nicht vor.

nis von DNS zu Protein stark herab (DNS : Cytochrom c = 1 : 100), so erhält man praktisch keine Beeinflussung der Flächenbesetzung des Cytochrom c-Films und genügend freiliegende Fäden bei Präparationen unterschiedlicher Länge (Abb. 4 und 5). Kurze DNS-Fäden, wie sie bei intensiver Reinigung erhalten werden, ergeben eine annähernd gleichmäßige Besetzung, sehr lange Fäden oft größere Lücken, so daß man solche Präparate konzentrierter als 1-proz. des Cytochrom c ansetzen muß, um bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht zu unregelmäßige Besetzungen zu erhalten. Größere Lücken würden eine Auszählung der Teilchen pro Flächeneinheit in Frage stellen.

Bei optimaler Besetzung zeigen die zahlreichen Aufnahmen eine Vielzahl von gleichmäßig dicken, haarförmigen Fäden. Die zum Bedampfungsstrahl senkrechte Richtung scheint zuweilen bevorzugt besetzt zu sein, da die dazu parallel laufenden Fäden offensichtlich nicht so plastisch zu erkennen sind.

¹⁴ C. E. HALL u. P. DOTY, J. Amer. chem. Soc. **80**, 1269 [1958].

¹⁵ J. LLOPIS u. A. ALBERT, Arch. Biochem. Biophysics **81**, 146 [1959].

¹⁶ W. D. HARKINS u. T. F. ANDERSON, J. biol. Chemistry **125**, 369 [1938].

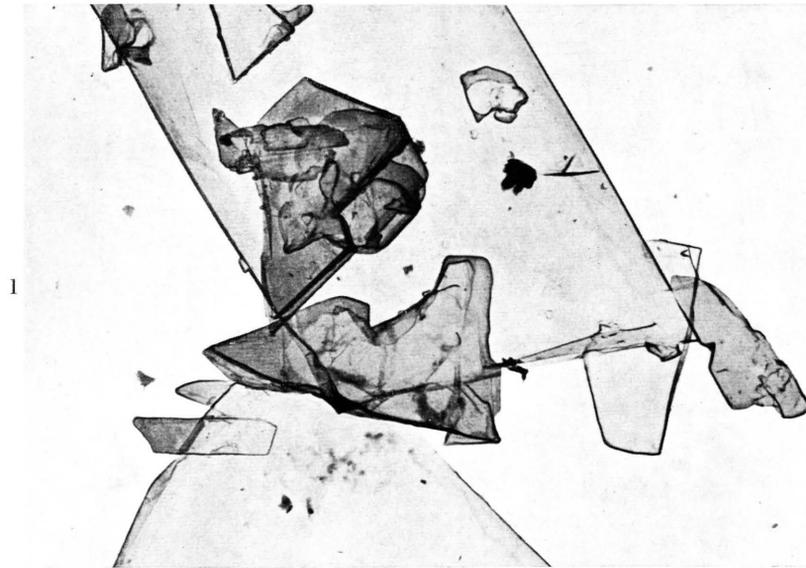


Abb. 1. Kohlehüllen-Abdruck des Nucleohistons aus *Gadus virens*. Vergrößerung 6000-mal. Ausgangsmaterial: Pulverisiertes Trockenmaterial, auf Kohlefolie aufgebracht. Nach Kegelbedampfung mit Kohle (nach Bradley) Herauslösen des Nucleoproteins mit 5% HCl und Wässern (Präparation und Aufnahme G. SCHIMMEL und J. KIENDL).

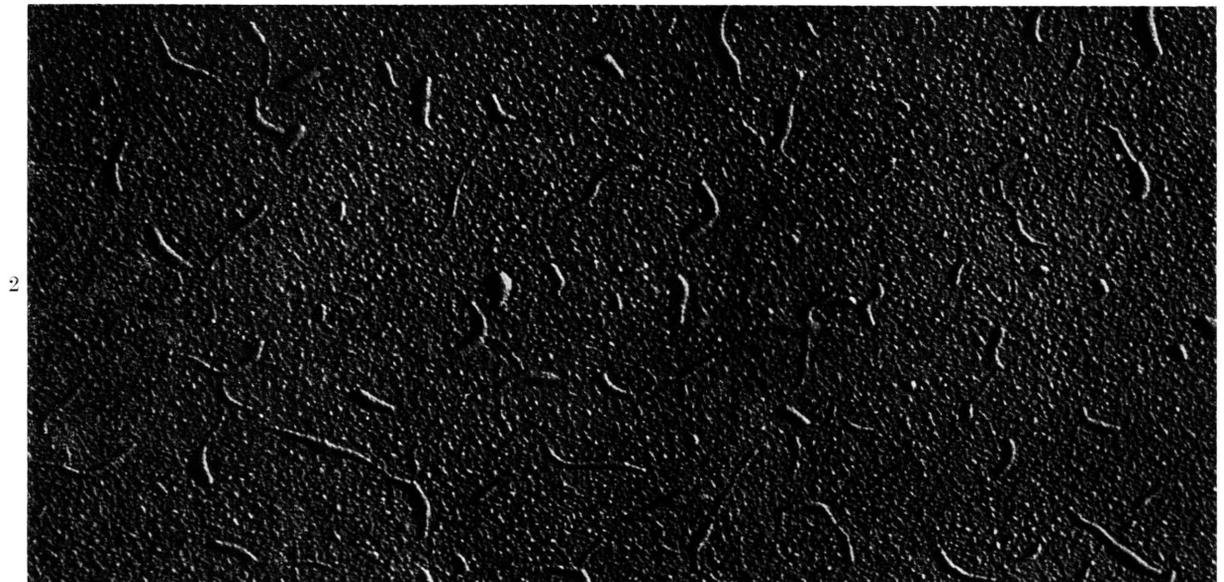


Abb. 2. DNS-Rindereserum-Albumin-Mischfilm (1 : 1), Wolframoxyd bedampft. Vergrößerung 47 000-mal. Präparation: 0,03% Rindereserum-Albumin + 0,03% DNS (aus Seelachsgonaden) in 0,67-m. Ammoniumacetat gelöst, auf 0,5-m. Ammoniumacetat als Substrat gespreitet. Unterschiedlich lange und teils stark verdickte Fäden, jedoch alle ziemlich gestreckt. Endpunkte einzelner Fäden treten manchmal nicht klar hervor.



Abb. 3. DNS-Rindereserum-Albumin-Mischfilm (1 : 100), Platin bedampft bei 6°. Vergrößerung 55 000-mal. Präparation: 0,05% Rindereserum-Albumin + 0,0005% DNS (aus Staphylokokken Stamm SAB s. Methodik A 3) in 1-m. Ammoniumacetat gelöst. Im Langmuir-Trog auf 0,25-m. Ammoniumacetat gespreitet. Ziemlich gestreckter einzelner Faden über das Gesichtsfeld ziehend. Länge ein Vielfaches des Bildausschnittes. Verbreiterung der Albuminablagerung deutet auf Längsdenaturierung (ohne Unterbrechung des Fadens) hin. Grobscholliger Untergrund des Proteinfilms.

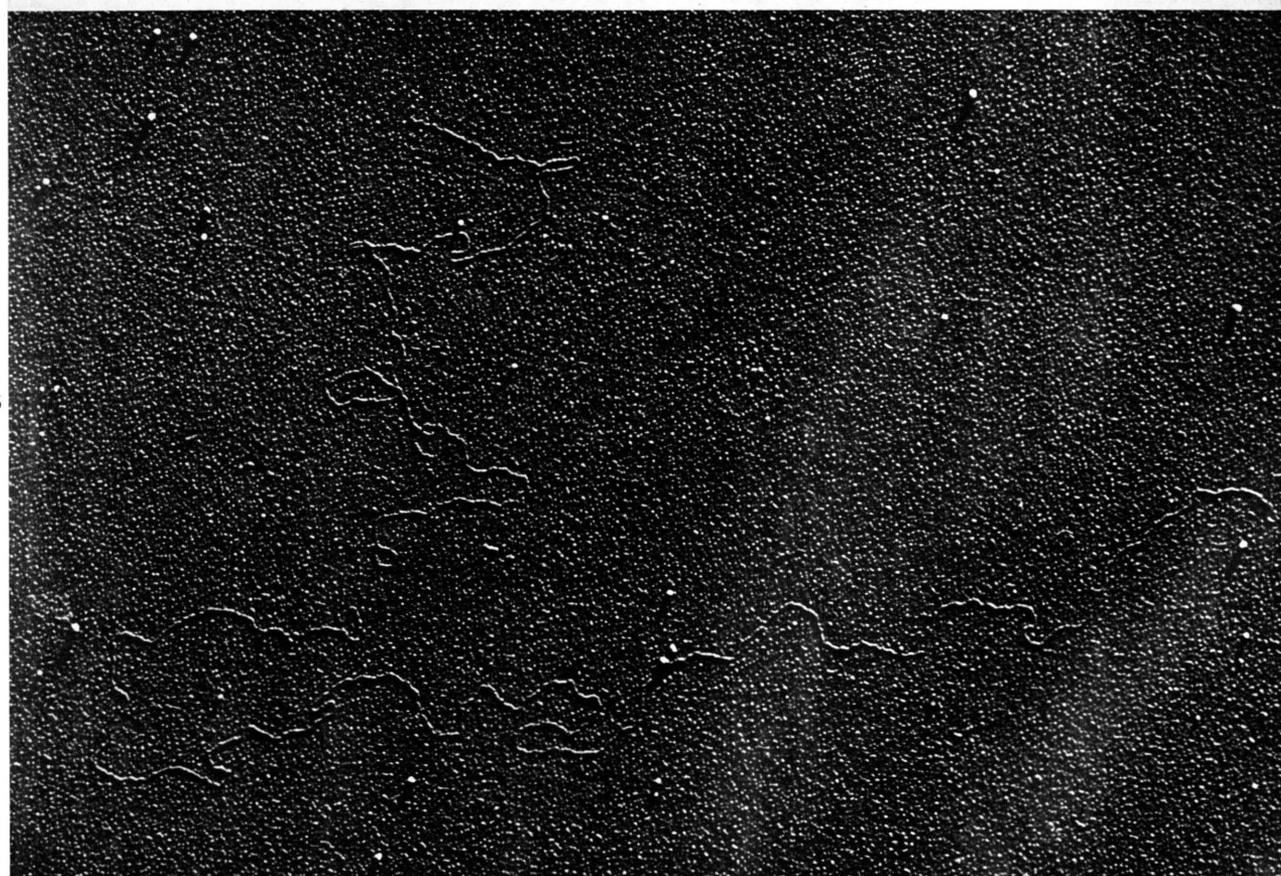
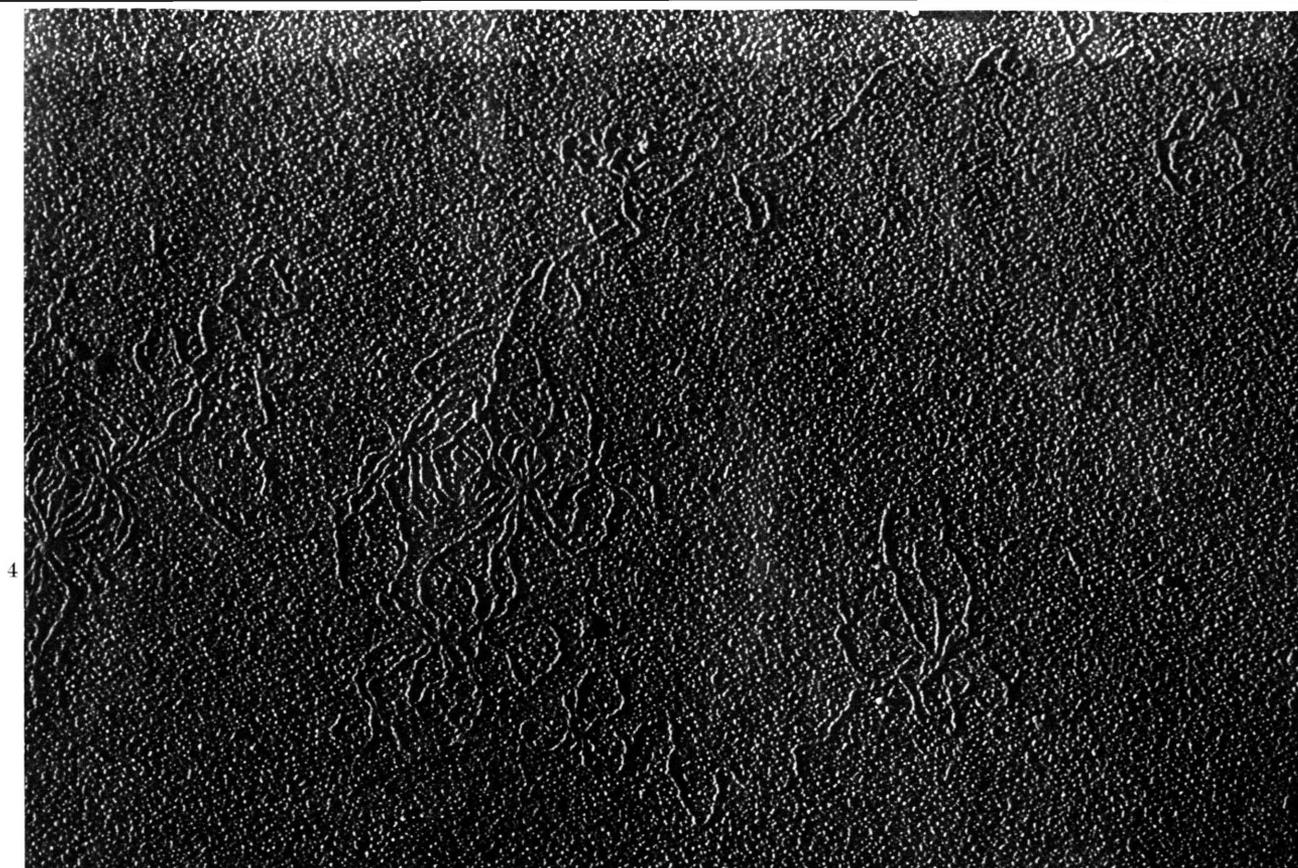


Abb. 4. DNS-Cytochrom c-Mischfilm (1 : 100), Platin bedampft. Vergrößerung 43 000-mal. Präparation: 0,05% Cytochrom c + 0,0005% DNS (Staphylokokken SAB) in 1-*m.* Ammoniumacetat gelöst. 0,1 ml auf ca. 500 m² Substratoberfläche (0,25-*m.* Ammoniumacetat) gespreitet. Neben langen, sich auflösenden DNS-Proteinfäden nesterartige Schlaufenbildungen mit einem „Zentrum“ als Kreuzung vieler Fäden. Feinkörniger Untergrund des Cytochrom c-Films.

Abb. 5. DNS-Cytochrom c-Mischfilm (ca. 1 : 100), Platin bedampft. Vergrößerung 27 000-mal. Präparation: Nur einmal mit Äthanol gefällte DNS mit extrem langen Fäden, sonst wie bei Abb. 4. Freies Ende eines sehr langen DNS-Fadens, über viele Gesichtsfelder reichend.

Bei sehr kurzen Fäden oder bei endständigem Verlauf parallel zum Bedampfungsstrahl ist es manchmal schwierig, den Endpunkt anzugeben. Die granuläre Struktur des Cytochrom c-Films allein ist ebenfalls in den verschiedenen Aufnahmen in gleicher Weise wiederzufinden.

Da die Fäden im Cytochrom c-Film alle gleich dick erscheinen, ist es unwahrscheinlich, daß sie aus einem mehrfach zusammengelegten DNS-Molekülbündel im Wechsel mit Einzelfäden bestehen. Nimmt man nach den Daten von WATSON und CRICK¹⁷ die queren Durchmesser des Doppelhelix mit 20 bis 25 Å an, wie es HALL und LITT¹⁸ auch morphologisch an proteinfreien Fäden wahrscheinlich machen konnten, so können die Breiten der Fäden von 60 bis 70 Å nur durch Anlagerung von Protein zustande gekommen sein. Bei der Neigung von Cytochrom c, mit abnehmender Ionenstärke mit DNS Komplexe zu bilden (C 3, Abb. 7), ist diese Erscheinung leicht zu erklären. Förderlich für die Adsorption kann auch noch die Oberflächen-Denaturierung des Proteins beim Spreiten sein. Das Cytochrom c hält also die DNS in der Oberfläche fest, wenn es nur einen vollständigen Überzug darüber liefert. Für die quantitative Auswertung aller Teilchen ist darum der einwandfreie Ablauf bei der Spreitung und die Ausbildung guter Protein-Mischfilme für die morphologische Darstellung wesentlich. Vor allem muß für eine verlustfreie Überführung der zu spreitenden Menge in dem Film Sorge getragen werden (C 4).

Von den gemessenen Breiten kann man etwa 20 bis 30 Å dem Cytochrom c zurechnen, unter Berücksichtigung der Bedampfungsschicht mit einer Dicke bis zu 20 Å. Die Proteinschicht umhüllt dann als 10 bis 15 Å dicke Auflage den Doppelhelix. Dieser wäre dann die zentrale Achse eines Fadens, ähnlich wie dies bei anderen Nucleoproteinen angenommen und in Einzelfällen nachgewiesen worden ist¹⁹. Dabei schützt das umhüllende Protein den Faden vor dem Zerfall oder vor sekundärer Aggregation bei der Herstellung der Präparate. Die zahlreichen Krümmungen und Windungen der Fäden weisen auf eine Flexibilität hin, die stark bei Cytochrom c, kaum oder schwach bei Rinderserum-Albumin ausgeprägt ist.

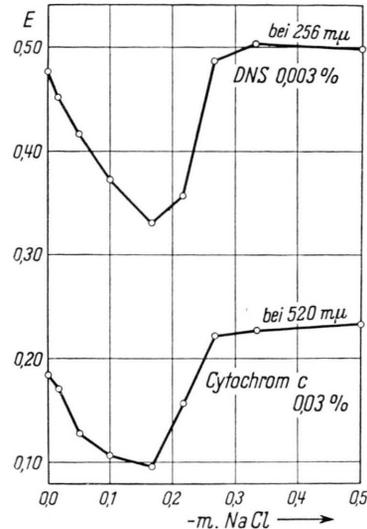


Abb. 7. Löslichkeit des DNS-Cytochrom c-Komplexes bei verschiedenen Salzkonzentrationen. Abszisse: Molarität NaCl. Ordinate: Extinktion E bei 256 $m\mu$ (obere Kurve) und 520 $m\mu$ (untere Kurve). Konzentration: DNS (aus Seelachs-gonaden) 0,003%, Cytochrom c 0,03% (1 : 10). Es wurde die Abnahme der Extinktion im Überstand des Reagenzglases nach Zentrifugieren des Präzipitates gemessen.

Einige bemerkenswerte morphologische Erscheinungen der DNS-Protein-Mischfilme von langen Fäden sind die Schlaufenbildung (Abb. 4) und das Freiliegen längerer Fäden. Bei relativ kurzen Gebilden treten Schlaufen und flache Verknäuelungen ganz selten auf. Diese Phänomene können ihre Erklärung dadurch finden, daß entweder die in Lösung paket- oder strangartig verknäuelten DNS-Molekel sich nur langsam auflösen, oder der Spreitungsvorgang führt selbst zu einer sekundären Verknäuelung. An der Freilegung von langen Einzelfäden aus solchen Anhäufungen ist nach Abb. 4 kein Zweifel. In nur einmal in Äthanol gefällten Präparaten, wie bei Abb. 5, können sie mit Längen bis über 70 μ ohne Verzweigung und Bruchstellen beobachtet werden. Diese außerordentlich großen Molekelausdehnungen sprechen dafür, daß sie in dieser Form auch in ihrem natürlichen Milieu, dem Zellkern, vorkommen können und wohl durch unsere präparativen Eingriffe abgebaut werden. Ob das für alle DNS-Teilchen der Zellkerne zutrifft, muß bei dieser Art des Nachweises der Molekellängen offen bleiben.

Proteinfilme

Zur Ausbildung eines monomolekularen unlöslichen Films auf wässrigem Substrat eignen sich zahl-

¹⁷ J. D. WATSON u. F. H. C. CRICK, Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol. **18**, 123 [1953].

¹⁸ C. E. HALL u. M. LITT, J. Biophys. Biochem. Cytol. **4**, 1 [1958].

¹⁹ Vgl. A. ENGSTRÖM u. J. B. FINEAN, Biological Ultrastructure, New York 1958, S. 270.

reiche Lösungen globulärer Proteine. Diese Filme entstehen durch Adsorption des Proteins in der Grenzfläche Wasser/Luft, wobei das darunter befindliche Substrat frei bleibt. Sind Proteinteilchen adsorbiert, so werden sie zusätzlich durch Entfaltung oberflächen-denaturiert. Seit den ersten qualitativen Untersuchungen von DEVAUX sind die Fähigkeit der Spreitung und mechanische Eigenschaften dieser kohärenten Proteinfilm vielfach Gegenstand ausführlicher Untersuchungen und Diskussionen gewesen^{20, 21, 22, 23, 24}.

Wie eigene Versuche ergeben haben, bildet reine proteinfreie DNS in Lösung keinerlei stabile Filme auf wäßrigem Substrat; tritt diese Erscheinung auf²⁵, so liegt ein Mischfilm vor; er bedingt die Eigenschaften des Films. In der Regel ist dann ein Teil des Gelösten Protein.

Proteinfilm auf wäßriger Oberfläche werden durch die Angaben der Flächenbesetzung A (in m^2/mg Protein) und des Filmdrucks II (in dyn/cm), dem Schub gekennzeichnet. Die dabei erhaltenen Kraft-Flächenkurven ergeben „Isothermen“ mit einem Kurvenverlauf, der wenig typisch ist für bestimmte Eiweißkörper, im Gegensatz zu vielen Isothermen organischer, einfach gebauter Moleküle^{26, 27}. Als graphisch zu ermittelnde Bezugsfläche wird seit den Untersuchungen GORTERS die Dichtpunktfläche, limiting area²⁸, bei Proteinen, wie überhaupt bei Hochpolymeren²⁹ angegeben; bei voll gespreiteten Proteinen ist sie etwa $1 \text{ m}^2/\text{mg}$.

Die entfaltbaren globulären Proteine, die in ihrer zunächst verknäuelten Polypeptidkette teils hydrophile, im Substrat sich verankernde, teils hydrophobe zur Oberfläche sich orientierende Gruppen und Reste je nach den eingebauten Aminosäuren aufweisen, ergeben bei der Spreitung und anschließenden Kompression eine Anordnung wie ein ober-

flächen-denaturiertes molekulares Netz. Am wenigsten geklärt ist dabei der Abwicklungsvorgang des Peptidfadens. Er ist bis jetzt unbekannt, weil für die spreitfähigen Proteine nicht die Aminosäuresequenz und sekundäre intramolekulare Bindungen angegeben werden können. Einen großen Einfluß übt dabei nicht nur der p_{H} -Wert des Lösungsmittels und sein Salzgehalt, sondern auch die Zusammensetzung des Substrats aus, wohl infolge der p_{H} -Abhängigkeit der Gesamtladung der Molekeln und ihres amphoterer Charakters als Zwitterionen. Davon hängt die flächenmäßige und zeitliche Ausbildung des Oberflächenfilms ab. Maximale Spreitungen findet man in der Regel im isoelektrischen Punkt des betreffenden Proteins³⁰. Ferner beeinflussen die Flächenbesetzungen auch die Proteinkonzentration der zu spreitenden Lösung und Diffusionsvorgänge beim vorsichtigen Einfließen^{31, 32}. Es ist wünschenswert, daß Substrat und Lösung von einander verschiedene Salzgehalte haben, jedoch im spezifischen Gewicht sich nicht stark unterscheiden.

Bei höheren Schüben erhält man in der Regel gelartige Filme mit rasch ansteigender Oberflächenviskosität und elastischen Eigenschaften, mitbedingt durch den Einfluß intermolekularer Kräfte³³. Für die Kompressibilität und Elastizität erhält man ebenfalls Kurven, deren Minima bzw. Maxima als spezifisch für bestimmte Proteine angesehen werden³⁴. Diese Untersuchungen, und ebenso Viskositätsmessungen der Filme³⁵, sind aber für die Flächenbesetzung eines Proteinfilmes nicht ausschlaggebend.

Der Proteinfilm stellt die Meßgrundlage für den DNS-Mischfilm dar. Werden nun, aus Gründen der günstigsten Verteilung zur Messung der Teilchen, niedrige Konzentrationen DNS zu Cytochrom *c* (z. B. 1 : 100) im Proteinfilm gewählt, so beeinflusst

Übersichten seit 1950 (außer 11 und 12) :

²⁰ H. SOBOTKA, in: *Medical Physics II* (ed. O. GLASSER) Chicago 1950, S. 550.

²¹ J. H. SCHULMAN, in: *Cytology and Cell Physiology 2nd ed.* (ed. G. H. BOURNE), Oxford-London-New York 1951, S. 119.

²² D. F. CHEESMAN u. J. T. DAVIES, *Advances Protein Chem.* **9**, 440 [1954].

²³ *Monomolecular Layers* (ed. H. SOBOTKA) Publ. Amer. Ass. Adv. Sci., Washington 1954.

²⁴ *Surface Phenomena in Chemistry and Biology* (ed. J. F. DANIELLI, K. G. A. PANKHURST and A. C. RIDDLEFORD), London-New York 1958.

²⁵ T. W. JAMES u. D. MAZIA, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **10**, 367 [1953].

²⁶ W. D. HARKINS, *Physical Chemistry of Surface Films*, New York 1952.

²⁷ N. K. ADAM, *The Physics and Chemistry of Surfaces*, 3rd. ed., London 1941.

²⁸ E. GORTER u. F. GRENDEL, *Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam* **29**, 1262 [1926].

²⁹ F. H. MÜLLER, *Z. Elektrochem. Ber. Bunsenges. physik. Chem.* **59**, 312 [1955].

³⁰ H. B. BULL, *Physical Biochemistry*, 2nd ed., New York-London 1952, S. 225.

³¹ M. JOLY, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. **208**, 975 [1939].

³² D. G. DERVICHIAN, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. **209**, 16 u. 156 [1939].

³³ J. B. BATEMAN, in: *Physical Chemistry of Cells and Tissues* (R. HÖBER), Philadelphia 1945, S. 187.

³⁴ H. B. BULL, *Advances Protein Chem.* **3**, 95 [1947].

³⁵ M. JOLY, *Surface Chemistry*, London 1948, S. 157.

das fädige Material den Proteinfilm bezüglich seiner Flächenbesetzung praktisch nicht, wenn nur die Spreitungstechnik gleich abläuft. Dabei kann auch nicht erkannt werden, wieviel Protein an 1% DNS gebunden wird, weil die angewendeten Methoden dafür zu unempfindlich sind. Wir benützen den Proteinfilm und seine Dichtpunktfläche zunächst als Bezugswert für die Auszählung der DNS-Teilchen, um bei der empfindlichen Technik eine ausreichende Kontrolle zu haben.

Methodik

Zur Untersuchung dienen eine größere Zahl DNS-Präparate. Sie stammen als teils unterschiedliche Chargen von den Gonaden des Seelachs (*Gadus virens*) und aus Staphylokokken³⁶.

A. 1. Der Seelachs wurde in der Zeit von Mitte Februar bis Mitte März im Gebiet der Lofoten* gefangen; an Bord des Fangschiffes wurden den reifen Männchen sofort die Gonaden entnommen, in Plastikbeutel gefüllt und tiefgefroren. Bis zur Aufarbeitung war die Temperatur nie über -25°C gestiegen. Die Darstellung der DNS erfolgte schrittweise. Zunächst haben wir möglichst reine Kerne gewonnen.

Hierzu werden die rasch aufgetauten Gonaden (1 Vol.) mit einer Lösung A (10 Vol.) bei -1 bis $+1^{\circ}\text{C}$ homogenisiert und die rahmige Suspension durch ein Tuch kolliert.

Lösung A:	[%]
NaCl	0,5
Natriumcitrat	0,1
Äthylendiamintetraessigsäure (ÄDTE)	0,15

$\text{pH } 6,0 \pm 0,2$, Temp. 0°C .

In dieser Lösung, die etwa einer 0,15-m. NaCl-Lösung entspricht, haben auch nach unserer Erfahrung die Zellkerne ein Quellungsminimum^{37,38}. Höhere oder niedrigere Salzkonzentration führt zur Kernquellung und raschem Zerfall; außerdem sedimentieren die Kerne in der Zentrifuge (3000 g, 0°C , 10 Min.) nicht gut, weil ihr sonst sehr kleines spezifisches Volumen³⁹ stark gewachsen ist. Das Sediment wird mit vorgekühlter Lösung A mehrmals aufgenommen, jeweils etwa 20 Min. bei 0°C gerührt und dann sedimentiert. Die fortschreitende Reinigung der Kerne gibt sich durch die rein weiße Farbe der Suspension und an der schnellen Sedimentation zu erkennen. Die einzelnen Kernchargen wurden dicht gepackt gesammelt und tiefgefroren. Sie sol-

len zu grünlich-glasigen Klumpen erstarren. Bei milchigem Aussehen haben sich wahrscheinlich kleine Eiskristalle gebildet, die bei späterem Auftauen das Präparat zerstören.

2. In einem zweiten Schritt wird aus den Kernen ein Nucleoprotein dargestellt. Das Lösen der Kerne geschieht in Lösung B.

Lösung B: NaCl 1-m. $\text{pH } 6,6 \pm 0,1$, Temp. 12°C .
ÄDTE 0,1%

1 Volumen gefrorener Kerne werden im Starmix mit Lösung B homogenisiert, dann auf 25 Volumina aufgefüllt und bis zur schwach getrübbten Lösung im Laufe von ca. 1 Stde. homogen gerührt.

Das visköse Präparat wird durch Zentrifugierung (bei 30 000 g, $10-12^{\circ}\text{C}$, ca. 1 Stde.) geklärt. Der klare Überstand (1 Vol.) wird durch Verdünnen mit Lösung C (6 Vol.) unter heftiger Durchmischung bei 0,15-m. NaCl feinfaserig gefällt.

Lösung C: ÄDTE 0,01% $\text{pH } 6,0 \pm 0,2$, Temp. 0°C .

Die Fällung muß rasch vor sich gehen, weil sonst zu viel DNS verloren geht. Dabei sollen sich keine Klumpen bilden, die eine ausreichende Reinigung verhindern⁴⁰.

Das Präparat wird 2–3-mal gefällt, bis seine Zusammensetzung etwa folgende Werte erreicht:

N-Gehalt	12,0%	N : P = 4,5
P-Gehalt	2,7%	

Schließlich wird das Präparat nach nochmaliger Lösung im vorgekühlten Äthanol endgültig gefällt und gereinigt. Wir betrachten es als ein Nucleohiston.

Zunächst läßt man das gelöste Nucleoprotein unter heftigem Rühren in 35% Äthanol, -2°C langsam eintropfen. Nach mehrmaligem Waschen wird 60-proz. und dann 96-proz. Äthanol verwendet. Endlich wird der Alkohol mit Äther gründlich ausgewaschen, im Vakuum auf ca. 20–25% Feuchtigkeit getrocknet. Zu scharfe Trocknung macht das Präparat teilweise unlöslich.

Auf Grund der Tatsache, daß es im Elektronenmikroskop parakristalline Strukturen zeigt (Abb. 1), haben wir weitere Analysen vorgenommen und finden folgende mittlere Zusammensetzung:

	[%]	
N-Gehalt	$12,0 \pm 0,3$	(5 Bestimmungen)
P-Gehalt	$2,8 \pm 0,2$	(7 Bestimmungen)
Na ⁺	1,36	
K ⁺	0,12	
Ca ²⁺	0,36	

Das Präparat ist schwach cremefarben und erdig. Wir vermeiden es, ein faseriges oder transparent scholliges Präparat zu erhalten.

3. Zur Gewinnung von DNS aus Staphylokokken wird der Stamm SAB von CATLIN und CUNNINGHAM³⁶

³⁶ W. B. CATLIN u. I. S. CUNNINGHAM, J. gen. Microbiol. **19**, 522 [1958]. Für die Überlassung des Stammes SAB danken wir Herrn Dr. CATLIN, Marquette Univ. School of Medicine, Milwaukee, Wisconsin.

* Herrn Dr. ULRICH SCHMIDT und der Besatzung der „Anton Dohrn“ danken wir für die freundliche Unterstützung und Aufnahme, die sie einem von uns (E. Z.) zuteil werden ließen.

³⁷ A. E. MIRSKY, Adv. in Enzymol. **3**, 1 [1943].

³⁸ C. F. R. CRAMPTON, E. LIPSHITZ u. J. CHARGAFF, J. biol. Chemistry **206**, 499 [1954].

³⁹ M. BEHRENS u. M. TANKERT, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **291**, 213 [1956].

⁴⁰ J. A. LUCY u. J. V. A. BUTLER, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **16**, 431 [1955].

benützt. Man erzielt eine reichliche Abscheidung von schleimig-fädigem Sediment, wenn die Kultur bei 37 °C 48 Stdn. lang unter Belüftung in folgender Nährlösung angesetzt wird:

	[g]
Brain Heart Infusion (Difco)	37
NaCl	53,3
ÄDTE	0,01
Dest. Wasser	ad 1000

In gleicher Weise gelingt es, DNS-haltiges Material aus einer belüfteten Kultur in einem Chemostaten^{41, 42, 43} bei 36 °C mit kontinuierlichem Einlauf dieser Nährlösung und dem Auslauf gleicher Mengen Kultur zu gewinnen. Der Zulauf wird so bemessen, daß zu dem Reaktionsgefäß von 300 ml weitere 700 ml Nährlösung in ca. 40 Stdn. zutropfen. Der Überlauf wird bei Zimmertemperatur in einem Gefäß gesammelt, wobei sich das schleimige zellhaltige Material noch vermehrt. Nach Zentrifugieren (3000 U/min), Zimmerterp., 20 Min.) wird das extrazelluläre DNS enthaltende zelluläre Sediment in 1-m. NaCl aufgenommen, gut homogenisiert, zentrifugiert und der klare Überstand in Äthanol gefällt und wieder in 1-m. NaCl gelöst.

B. Die erhaltenen Nucleoproteine werden dann zu DNS verarbeitet. Bei der Seelachs-DNS gehen wir dabei von der nicht in Alkohol gefällten Stufe aus. Das aus A. 2 und A. 3 erhaltene Präparat wird zunächst mit 25 Vol. der Lösung B gelöst und nach MARKO und BUTLER⁴⁴ mit Dodecylsulfat die DNS dargestellt. Wiederholung der Prozedur und mehrmaliges Lösen und Fälen stellen die wesentlichen Präparations-Schritte zur Gewinnung reiner DNS dar, wobei Verluste und Verringerung der Viskosität je nach Zahl der Wiederholungen auftreten. Bei zahlreichen Umfällungen erhält man von Seelachs-DNS ein Präparat, dessen Analyse folgende Daten ergab:
Gewichtsverhältnis

Stickstoff ⁴⁵ : Phosphor ⁴⁶	1,6 ± 0,05
Basenzusammensetzung ⁴⁷ :	
Adenin	27,2 ± 0,04
Thymin	27,2 ± 0,05
Guanin	22,6 ± 0,05
Cytosin	22,9 ± 0,05

Wir halten es für möglich, daß im Laufe der Darstellung eine Fraktionierung eingetreten ist, wodurch ein Teil eines Nucleoproteins anderer Zusammensetzung durch Lösung oder Denaturierung verloren wurde³⁸.

⁴¹ J. MONOD, Ann. Inst. Pasteur **79**, 390 [1950].

⁴² A. NOVICK u. L. SZILARD, Science [New York] **112**, 715 [1950].

⁴³ H. MOSER, The Dynamics of Bacterial Population Maintained in the Chemostat, Washington 1958.

⁴⁴ A. M. MARKO u. G. C. BUTLER, J. biol. Chemistry **190**, 165 [1951].

⁴⁵ J. K. PARNAS u. R. WAGNER, Biochem. Z. **125**, 253 [1921].

⁴⁶ R. J. L. ALLEN, Biochem. J. **34**, 860 [1940].

⁴⁷ G. R. WYATT, Biochem. J. **48**, 584 [1951].

⁴⁸ I. LANGMUIR, J. Amer. chem. Soc. **39**, 1848 [1917].

C. Filmt echnik

Zur Flächenmessung eines Oberflächenfilms wird ein LANGMUIR-Trog⁴⁸ benützt, der es erlaubt, mit einem geeigneten Schubmesser die Schübe fortlaufend zu registrieren, wobei eine Barriere den Film komprimiert und dekomprimiert. Wegen der einfachen Handhabung verwenden wir die Methode mit vertikal in den Film eintauchenden Schwimmer^{49, 50}, der nach dem Prinzip der WILHELMYSchen Waage⁵¹ den Schub mißt. Auf das im Trog befindliche Substrat, eine wäßrige Lösung, wird die zu untersuchende Proteinlösung in geeigneter Weise abgeschwemmt.

1. Trog

Der Kunststofftrog (Vinidur) von den Innenmaßen 600·100·10 mm lagert auf einem Grundaufbau, der mit seiner Mechanik für den Barrierschlitten, die Antriebsuntersetzung und den Vor- und Rückwärtsgang der Barriere eingerichtet ist. Der Schlitten führt mittels eines Halters die filmbegrenzende Barriere aus dem gleichen Material (Maße 150·10·10 mm) über den planen 10 mm breiten Trogrand. Die Laufgeschwindigkeit läßt sich kontinuierlich unter Benützung verschiedener Untersetzungen mit einem regelbaren Motor steuern von minimal 0,05 cm/sec bis zu 10 cm/sec. Die Flächenwerte sind an einem außen angebrachten Maßband abzulesen. Vor der Füllung wird der Trog mit reinem Paraffin* eingerieben und poliert. Ein Staubschutz deckt ihn nach oben ab.

2. Schubmessung

Statt der senkrecht in das Substrat eintauchenden Glas- oder Platinplatte, die verschiedene Untersucher zur Schubmessung bei unlöslichen Oberflächenfilmen angeben⁵², verwenden wir einen Schwimmer aus Filtrierpapier**, dessen oberer Rand durch Paraffinieren dem hochsteigenden Wasser des Substrats eine horizontale Grenze setzt (Abb. 8). Bleibt er in seiner Höhe konstant, so vereinfacht sich die Bestimmung des Schubs in eine Differenzwägung. Man benützt hierzu eine Torsionswaage mit feststehender Nullstellung des Waagebalkens. Die Kapillarwirkung des Filtrierpapiers erlaubt es, den Kontaktwinkel Wasseroberfläche zu Schwimmeroberfläche als Null anzunehmen, so daß der Schub des Films auf den Schwimmer vollständig übertragen wird. Voraussetzung ist, daß er völlig frei durch die Wasseroberfläche treten kann, und die an-

⁴⁹ D. G. DERVICHIAN, J. Physique Radium **6**, 221 [1935].

⁵⁰ W. D. HARKINS u. T. F. ANDERSON, J. Amer. chem. Soc. **59**, 2189 [1937].

⁵¹ L. WILHELMY, Poggendorfs Ann. Physik **119**, 177 [1863].

* Für diesen Zweck erhielten wir molekular dest. Paraffin (mittl. Fraktion 68–72°) dankenswerterweise von BASF Ludwigshafen/Rh., Dr. K. SCHÄFER.

⁵² D. F. CHEESMAN, Ark. Kemi **22** B, 1 [1946].

** Nach einem Vorschlag von A. GOESCHL (Dipl. Arbeit II. phys. Inst. Univ. München).

fangs durch Gewichtsänderung bemerkbare Quellung der Cellulose beendet ist. Der Schub ist dann definiert durch

$$\Pi = \frac{(a-b) \cdot 0,981}{u} \text{ dyn/cm.}$$

(a = scheinbares Gewicht ohne Film, b = Gewicht mit Film in mg, u = Umfang des Schwimmers mit einem Korrekturglied für die Kurvenform s. Abb. 8). Die Genauigkeit der dynamischen Messung beträgt etwa $\pm 1/10$ dyn/cm (Meßbereich der Torsionswaage* 500 mg). Die Vorteile dieser Anordnung liegen in der einfachen Handhabung jeder Messung, der Benützung stets neuer Schwimmer für jeden Versuch und in dem geringen Aufwand.

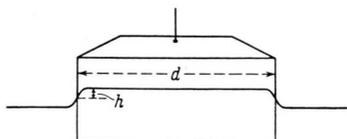


Abb. 8. Schwimmer aus Filtrierpapier zur Schubmessung, oberer Teil mit Paraffinabschluß, und Kontaktlinie des Wassers. Umfang $u = 2\{d + h[(\pi/2) - 1]\}$, wobei nach den Messungen $h = 1,5$ mm beträgt. Daraus ergibt sich als Vereinfachung der Berechnung der gemessenen Schubwerte $d = 4,48$ cm, und für die abgelesenen Differenzwerte der Waage in $\text{mg} = 1/10$ dyn/cm.

3. Spreitung

Die nach vielen Varianten überprüfte Technik, die uns für die meisten Versuche am brauchbarsten erschien, berücksichtigt einige methodische Punkte: a) Für jede Spreitung wird eine neue Trogfüllung als Substrat benützt. Trog und Barrieren werden regelmäßig paraffiniert. b) Nur Lösungen niedriger Proteinkonzentration lassen sich zu einem Film ausbreiten^{31, 32}. Wir benützen in der Regel 0,05% als obere Konzentrationsgrenze. c) Das Abschwemmen soll kontinuierlich und langsam aus einem Vorratsgefäß erfolgen. Dabei hat sich die hand- oder motorgetriebene AGLA-Mikrometerspritze bewährt. d) Das eigentliche Spreiten soll in einem Auslaufen kleiner Flüssigkeitsmengen in die Trogoberfläche über eine Ablauframpe mit einer dünnen Wasserschicht bestehen. Es soll so langsam geschehen, daß alle Proteinteilchen in die Oberfläche adsorbiert werden können⁵³. Wir lassen auf einem mit dem Substrat völlig benetzten, sehr wenig geneigten Glas-Objektträger die Proteinlösung etwa 3 mm oberhalb des Wasserniveaus ablaufen. e) Die vollständige Spreitung benötigt eine Wartezeit. Innerhalb 15 Min. soll das Protein ganz die Oberfläche besetzen³⁴. Dabei ist über den Verlauf des sofort einsetzenden Denaturierungs-Prozesses nichts Näheres ausgesagt.

4. Filmübertragung auf Trägerfolien

Ist der gewünschte Protein- oder Mischfilm ausgebildet, so wird er durch Kontakt mit einer Trägerfolie ad-

sorbiert und das anhaftende Substrat durch Ersatz der wäßrigen Phase entfernt (Abb. 9). Das Abtupfen mit einer kohlebedampften Formvarfolie muß sorgfältig geschehen; horizontale Haltung ist Grundbedingung. Mit dem anhaftenden Substrattropfen geht man sofort in die Oberfläche von absolutem Alkohol (30 Sek.) und anschließend in Isopentan (10 Sek.)⁵⁴, wobei bis dahin die Folie an keiner Stelle trocknen darf. Bei diesem Verfahren ist — neben der Herabsetzung der Oberflächenspannung des Wassers um das Sechsfache — beim Antrocknen noch vorteilhaft, daß beim Verdunsten von Isopentan keine Wasserkondensation aus der Luft eintritt; Wassertröpfchen auf der Folie können zu Aggregatbildung oder Zerfall der DNS-Teilchen führen.

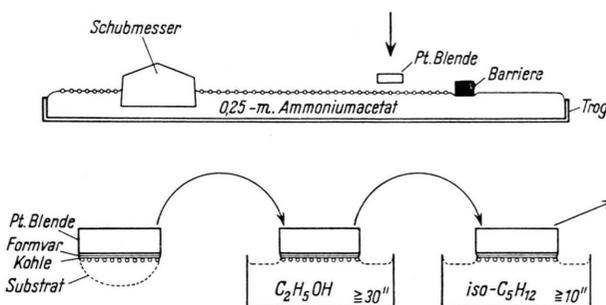


Abb. 9. Übertragungsschema des DNS-Protein-Mischfilms auf befilmte Blenden. Oben: Längsschnitt durch den Trog mit Schwimmer (links), Wasserfüllung und DNS-Proteinteilchen (schematisch -o-o-) in der Wasseroberfläche. Filmbegrenzende Barriere (rechts). Unten: Übertragung der besetzten Blende zur Äthanol-Oberfläche, Isopentan-Oberfläche und zum Trocknen an Luft, bei Zimmertemperatur.

5. Bedampfung

Die Kontrasterhöhung durch Schrägbedampfung ist bei dem getrockneten Film unerlässlich. Nur bei sehr flacher Beschattung treten partikuläre Anteile so deutlich hervor, daß eine Morphologie von fädigen Gebilden gelingt. Wir verwenden die Flachbedampfung mit Platin¹⁸: Bedampfungswinkel 6 Grad mit 4,5 cm Pt-Draht ϕ 0,1 mm, auf 0,7 mm starkem Wolframdraht, Abstand Bedampfungsquelle — Objekt 13 cm. Wir sehen auch gute Resultate, wenn nach der Pt-Bedampfung im Hochvakuum Kohle nochmals in sehr dünner Schicht aufgedampft wird. Wir stellen uns vor, daß dadurch eine kristalline Umwandlung der Pt-Schicht mit Aggregation der Teilchen im Elektronenmikroskop hintangehalten wird.

6. Elektronenmikroskopie

Zur Herstellung von Serienaufnahmen verschiedener Stellen der Protein-Mischfilme im Elmiskop I genügt die 10 000-fache Vergrößerung, Einzelheiten der Fäden benötigen jedoch die 20 000-fache Originalaufnahme. Ihre Beobachtung auf dem Leuchtschirm erfordert die

* Hartmann u. Braun AG, Frankfurt a. M.

⁵³ L. LANGMUIR u. D. F. WAUGH, J. Amer. chem. Soc. **62**, 2771 [1940].

⁵⁴ D. PETERS u. R. GEISTER, 7. Tagg. Dtsch. Gesellsch. Elektronenmikroskopie, Darmstadt 1957, S. 1. c. ¹³.

ständige Arbeit mit einer Vergrößerungslupe (10-fach). Die Ausmessung der Aufnahmen (6,5·9 cm, Perutz-Kontrastplatte) erfolgt durch Nachvergrößerung in einem Projektionsgerät und Abfahren der Teilchen mit einem Kurvenmesser.

D. DNS-Protein-Mischfilme

1. Als reine Proteine verwenden wir Rinderserum-Albumin* reinst und Cytochrom c**, die als lyophilisiertes Trockenpulver vorliegen. Wir gehen dabei von einer 1-proz. Lösung aus. Zum Ansatz von DNS und Protein sind je 1 bis 2 ml verdünnte Lösung notwendig, um Pipettierfehler und Adsorption der hochverdünnten DNS-Mischungen für die quantitativen Bestimmungen klein zu halten.

2. Salzlösung

Zur Herstellung der Lösung bevorzugen wir 1-m. Ammoniumacetat (p. a. Merck), p_H 7, Zimmertemperatur, mit Aufbewahrung bei 4 °C. Die Konzentration kann auf 0,3-m. erniedrigt werden, höhere Molarität und andere Salzlösungen ergaben keine Vorteile. Da das spezifische Gewicht nahe bei 1 liegt, sind beim Spreiten dieser Lösungen keine Unterschichtungs-Erscheinungen zu befürchten. Größere Unterschiede zum Salzgehalt des Substrats ergeben jedoch stärkere Diffusionsvorgänge, die für eine maximale Spreitung des Proteins offensichtlich notwendig sind.

3. Salzgehalt des Substrats

Der Trog wird für die DNS-Mischfilme mit 0,25-m. Ammoniumacetat p_H 7, Zimmertemperatur, gefüllt. Seine rasche und leichte Löslichkeit in Alkohol, vor Isopentan, begünstigt seine Verwendung. Außerdem sublimieren Reste im Hochvakuum bei der Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate⁵⁵. Die Konzentration wurde auf Grund der Präzipitation des DNS-Cytochrom c-Gemisches bei fallendem Salzgehalt (mit NaCl geprüft, Abb. 7) so ausgewählt, daß nach Entfernung des Lösungsmittels (1-m.) die Zone der beginnenden Ausfällung von DNS mit Cytochrom c während des Spreitungsvorganges erreicht wird. Dies gibt eine sichere Fixierung aller DNS-Teilchen in der Oberfläche. Bei Rinderserum-Albumin tritt eine solche Präzipitation nicht auf, möglicherweise der Grund für die anzunehmenden Verluste in das Substrat bei sehr kurzen DNS-Fäden (Abb. 2).

Sowohl bei 2. und 3. wirkt Ammoniumacetat als Pufferlösung. Mit Essigsäure erhält man einen Puffer von p_H 3 bis 7, der sich für die Anwendung in der Filmtchnik gut eignet.

4. Spreitung der Proteinlösungen

Der Ansatz der DNS-Protein-Mischung soll kurz vor der Spreitung geschehen. Die Ausflußgeschwindigkeit

aus der AGLA-Injektionsspritze beträgt (bei einer 0,05-proz. Lösung) höchstens 25 μ g Protein pro Min., um konstante Flächenbesetzung zu erreichen. Nach 10 Min. Wartezeit beginnt man mit der langsamen Kompression (Barrieren-Verschiebung ca 0,08 cm/sec), bis der Schub auf 0,1 dyn/cm angestiegen ist. Nach Übertragung einer ausreichenden Zahl von Filmstellen auf Blenden wird die Kompression bis auf einen kleinen Teil, etwa $\frac{1}{5}$ der Gesamtfläche fortgesetzt und die Kraft-Flächenkurve aufgenommen, ebenso bei der Dekompression. Sie dient zur Ermittlung der Dichtpunktfläche¹⁷, dem Vergleichswert für eine regelrechte Spreitung.

Maximale Spreitung kann man experimentell beobachten, wenn man die Konzentration von Cytochrom c im Lösungsmittel erniedrigt, jedoch gleichbleibende Gesamtmengen unter Standardbedingungen in die Oberfläche aufbringt. Dabei nähert sich die Dichtpunktfläche bei höheren Verdünnungen 1 m²/mg (Abb. 10). Diesen optimalen Bedingungen^{31,32} steht entgegen, daß große Flüssigkeitsmengen mit sehr langer Auslaufzeit abgeschwemmt werden müssen. Wir gehen deshalb von einer 0,05-proz. Proteinlösung aus.

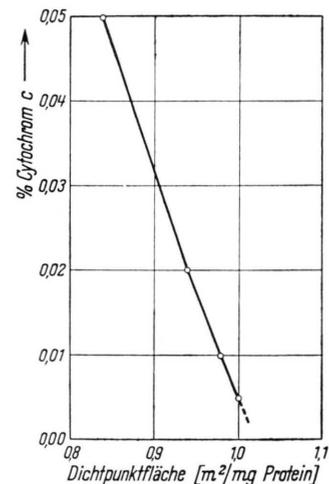


Abb. 10. Zunahme der Dichtpunktfläche bei Konzentrations-Abnahme der spreitfähigen Cytochrom c-Lösung. Abszisse: Dichtpunktfläche in m²/mg Protein, auf 0,25-m. Ammoniumacetat im Langmuir-Trog gespreitet. Versuchsbedingungen s. Methodik (D, 2—4). Ordinate: Konzentration der verwendeten Cytochrom c-Lösung.

Die Übertragung eines Protein-Mischfilms auf Kohleformvarfolie kann entsprechend Abb. 9 bei verschiedenen Schüben geschehen. Da der Film möglichst expandiert sein soll, jedoch keine Löcher aufweisen darf, wird in der Regel bei 0,1 (bis 0,3) dyn/cm die Kohleschicht mit dem Film in der beschriebenen Weise besetzt und im Elektronenmikroskop abgebildet. Die Granulierung bei diesen niedrigen Schüben wird bei Kompression bis auf 15 dyn/cm geringer, da der gelartige Film Lücken

* Wir danken Herrn Prof. Dr. H. E. SCHULTZE, Behring-Werke Marburg/Lahn, für das Präparat.

** Fa. Mack, Illertissen.

⁵⁵ R. C. WILLIAMS u. D. FRASER, J. Bacteriol. **66**, 458 [1953].

in der Proteinschicht auffüllen kann. Diese dickeren Schichten lassen jedoch DNS-Fäden z. T. verschwinden. Stufen oder Mehrfachsichten, wie sie bei Kollapszuständen von Fettsäuremolekülen beobachtet werden können^{56, 57}, wurden bei Rinder Serum-Albumin und Cytochrom c und in ihren Mischfilmen nicht gefunden. Selten treten, und das nur bei höheren Schüben, im Film plaquesartige Verdickungen unregelmäßiger Form und Größe auf. Kristallniederschläge findet man bei anderen Substraten (wie NaCl), deren Löslichkeit in Alkohol und Isopentan gering ist. Hier hilft manchmal eine Zwischenwässerung der Blendenoberfläche mit der Filmschicht.

Verschiedene Einflüsse qualitativer Art können den Film in seiner Ausbreitung ändern. Wird statt „nativem“ Cytochrom c eine Lösung (1%) verwendet, die 5 Min. auf 100 °C erhitzt worden war, so nimmt die Dichtpunktfläche von 0,84 m²/mg auf etwa die Hälfte (Mittelwert 0,47 m²/mg) bei gleichem Ansatz von 0,05% ab. Ferner gelingt es nicht, in doppelt dest. Wasser gelöstes Cytochrom c auf reinem Wasser als Sub-

strat (bei p_H 5,8 bis 6, im Gleichgewicht mit CO₂ der Luft) mit der hier angegebenen Technik zu spreiten. Dagegen bildet sich auf jedem salzhaltigen Substrat, auf $n/1000$ -NaOH¹⁶, auf HCl, verdünnt bis p_H 3 und auf 0,1-proz. Formaldehydlösung ein künstlich gespreiteter Film von diesem Protein aus. Löst man in einem der zuletzt genannten Substrate Cytochrom c (0,005%) auf, so tritt durch Diffusion spontan Filmbildung und Oberflächen-Denaturierung nach kurzer Zeit auf, nicht dagegen in dest. Wasser (RAMSDEN-Effekt)⁵⁸.

Wir danken Herrn Professor Dr. K. HERZBERG, Direktor des Hygiene-Instituts Frankfurt am Main für seine Unterstützung, Herrn Dr. G. SCHIMMEL und Fr. Dr. J. KIENDL, Battelle-Institut e. V. Frankfurt für ihre Hilfe bei der Präparation und den Aufnahmen, Herrn Dr. Dipl.-Phys. D. LANG für die Mitarbeit am Elektronenmikroskop sowie Frau C. PLESCHER und Fr. J. HAASS für ihre wertvolle Assistenz am Elmiskop I und bei Photoarbeiten. Allen Beteiligten danken wir ebenso für anregende Diskussionen.

⁵⁶ H. E. RIES jr. u. W. A. KIMBALL, Proc. 2nd Internat. Congr. Surface Activity 1957, S. 75.

⁵⁷ H. E. RIES jr. u. W. A. KIMBALL, Nature [London] **181**, 901 [1958].

⁵⁸ W. RAMSDEN, Z. physik. Chem. A **47**, 336 [1904].

Strukturuntersuchungen und Analysen von Pulvern durch Messung der Dielektrizitäts-Konstanten

Von FRIEDRICH OEHME

Aus dem Institut zur Entwicklung chemisch-physikalischer Analysemethoden
(Dozent Dr. habil. K. SLEVOGT), Weilheim/Obb.

(Z. Naturforschg. **14 b**, 779—789 [1959]; eingegangen am 13. Oktober 1959)

Dielektrische Messungen an als Pulver vorliegenden Festkörpern können sowohl aus theoretisch-strukturellen als auch aus analytischen Gründen Bedeutung erlangen. Die Meßtechnik weist bekanntermaßen gegenüber Messungen an Flüssigkeiten einen nicht unwesentlich höheren Schwierigkeitsgrad auf. Nachstehend werden die verschiedenen Methoden der Bestimmung der Dielektrizitäts-Konstanten von Pulvern kritisch betrachtet. Besonderes Augenmerk wird dabei einer „Pulvermethode“ und einigen neuen Anwendungsmöglichkeiten gewidmet.

1. Verschiedene prinzipielle Möglichkeiten zur DK-Messung von Pulvern

Für die DK-Messung von Pulvern stehen folgende Meßmethoden zur Verfügung.

1. Die Tablettierung,
2. die Immersionsmethoden mit ihren Varianten,
3. die verschiedenen Pulvermethoden.

Bei der *Tablettierung* wird das Pulver in einer geeigneten Form unter entsprechend hohem Druck in einen Festkörper umgewandelt. Durch hinreichend hohe Preßdrucke sollen dabei Füllfaktoren (vgl. unten) von 0,98 – 1,00 (98 – 100-proz. Raum-

erfüllung durch den Festkörper) erreicht werden. Bei Festkörpern mit relativ niedriger Fließgrenze (Beispiel Kaliumbromid oder Bleistearat) kann dieser Forderung leicht entsprochen werden. Bei zahlreichen Substanzen treten jedoch Schwierigkeiten entweder durch eine nur sehr geringe Fließfähigkeit oder durch strukturelle Umlagerungen auf. Hier versagt die Tablettierung grundsätzlich.

Im Schrifttum finden sich Angaben über die DK-Messung an Tabletten organischer Substanzen zur Bestimmung der quasi-optischen DK $\epsilon'_{\infty} = n^2$ (n = Brechungsindex)¹ sowie zur Untersuchung der dielektrischen Eigenschaften von Mineralien² und an-

¹ S. T. BAYLEY, Trans. Faraday Soc. **47**, 509 [1951].

² A. I. AUGUSTINIK u. L. KOSLOWSKI, C. A. **48**, 7949.