

Das Verhalten der echten Nucleinsäure zu Farbstoffen.

I. Mitteilung.

Von

R. Feulgen.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 27. Juni 1912.)

Über die genaueren chemischen Bindungsverhältnisse der Substanzen des Zellkernes besitzen wir trotz vieler hierauf gerichteter Arbeiten noch lange nicht die wünschenswerte Klarheit. Die Gründe hierfür liegen nicht darin, daß man sich nicht genügend viel und genügend gleichmäßiges Material von Zellkernen verschaffen könnte: das ist leicht zugänglich, seitdem zuerst Hoppe-Seyler die roten Blutkörperchen zu seinen bekannten quantitativen Untersuchungen¹⁾ benutzt, und seitdem Miescher²⁾ in den Spermatozoen der Fische ein so ausgezeichnetes Material aufgefunden hat.

Die Schwierigkeiten, eine tiefere Einsicht in die eigenartigen Bindungsverhältnisse des Zellkernes zu gewinnen, sind vielmehr darin zu suchen, daß man bisher über den genaueren chemischen Aufbau der in Frage kommenden Bestandteile des Kernes nicht genügend orientiert war. Zwar wissen wir durch die grundlegenden Arbeiten von A. Kossel,³⁾ daß der Hauptbestandteil des Zellkernes, ein Nucleoproteid schon bei leichten Eingriffen einen Teil seines Eiweißes abgibt und in eine phosphorreichere Substanz, das Nuclein, übergeht, und daß dieses Nuclein erst bei energischerer Spaltung sich in Nucleinsäure und Eiweiß weiter trennen läßt.

Diese Ansicht wird durch das bekannte Schema ausgedrückt:

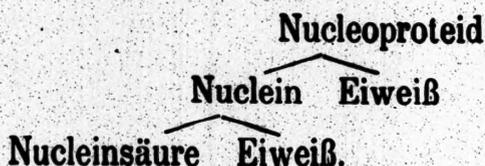
¹⁾ Mediz.-chem. Untersuchungen, Tübingen, Heft 3, S. 366.

²⁾ Gesammelte Arbeiten, Leipzig, C. F. W. Vogel.

³⁾ Untersuchungen über die Nucleine und ihre Spaltungsprodukte. Straßburg, 1881.

Diese Zeitschrift, Bd. 8, S. 512 u. a. m.

Lilienfeld, Diese Zeitschrift, Bd. 18, S. 478, Bd. 20, S. 103.



Demgegenüber ist aber eingewendet worden, daß die Existenz des Nucleins zweifelhaft sei, und daß das Nucleoproteid weiter nichts sei als eine salzartige Verbindung von Nucleinsäure und basischem Eiweiß.¹⁾

Solange man nun weder die genaue Konstitution der Nucleinsäure noch die der Eiweißkomponente kannte, schien eine exakte Lösung dieser Streitfrage wenig aussichtsvoll; seitdem aber die Struktur der Nucleinsäure sicher festgestellt²⁾ ist, dürfte auch eine Entscheidung zugunsten der einen oder anderen Ansicht möglich werden, wenn man das Verhalten der Nucleinsäure zu anderen hochmolekularen Basen untersucht. Zeigen derartige Salze, deren Natur ja nach der Art der Darstellung vollkommen zweifellos ist, das gleiche Verhalten wie die Nucleoproteide, so wäre damit die Frage dahin entschieden, daß die Nucleoproteide in der Tat nur salzartige Verbindungen von Nucleinsäure und einem Eiweißkörper sind.

Ich habe es nun unternommen, die nucleinsäuren Salze von Farbbasen darzustellen, — ich habe gerade diese basischen Stoffe gewählt, weil die Farbbasen trotz des verhältnismäßig hohen Molekulargewichtes gegen mäßig starke Eingriffe (z. B. Hydrolysieren mit verdünnten Mineralsäuren) sehr resistent sind, sich leicht wiedergewinnen und identifizieren lassen. Ferner aber hoffte ich bei dieser Gelegenheit Aufschlüsse darüber zu bekommen, ob die allgemein bekannte Färbbarkeit des Zellkernes mit basischen Farbstoffen eine wirkliche Salzbildung ist odernur eine Adsorptionserscheinung, bei der chemische Bindungen zwischen Säure und Base nicht die Hauptrolle spielen. Die Gegenwart der stark sauren Nucleinsäure im Zellkern ließ immerhin an die Möglichkeit denken, daß es sich bei der Färbung auch um eine reine Salzbildung handele.

Als ersten Versuch in dieser Richtung habe ich die Ver-

¹⁾ J. Bang, Hofmeisters Beiträge, Bd. 4, S. 331, Bd. 5, S. 317.

²⁾ H. Steudel, Diese Zeitschrift, Bd. 77, S. 497.

bindung der Nucleinsäure mit dem Malachitgrünleukohydrat, also das nucleinsaure Tetramethyldiamidotriphenylcarbinol, dargestellt.

Da das Malachitgrün des Handels für meine Versuche unbrauchbar war, habe ich aus dem käuflichen oxalsauren Salz die freie Base durch überschüssiges Alkali abgeschieden und wiederholt aus Ligroin umkrystallisiert. Nach fünfmaligem Umkrystallisieren erhielt ich ein vollkommen farbloses Produkt, das den verlangten N-Gehalt besaß.

0,4314 g liefern 30,0 ccm N (über 33% Kalilauge gem.)
 $t = 18^{\circ}$; $p = 750$ mm; entsprechend 8,05% N (ber. 8,09%).

Aus der freien Base wurde durch Zugabe der berechneten Menge Salzsäure das Chlorid hergestellt, auf dem Wasserbade eingeeengt und im Vakuum getrocknet.

Da die Nucleinsäure eine vierbasische Säure ist, so lag es am nächsten, analog dem vierbasischen Natriumsalze auch für die Nucleinsäurefarbstoffverbindung ein vierbasisches Salz vorauszusetzen; in einem dementsprechenden Verhältnis wurde deshalb zunächst das nucleinsaure Natrium mit dem Chlorsalz des Malachitgrünleukohydrats zusammengebracht und zwar in etwa 10% Lösung. Als Nucleinsäureformel habe ich die von H. Steudel¹⁾ angegebene gewählt: $C_{43}H_{61}N_{15}P_4O_{34} + 9 H_2O$.

Mol.-Gew. der Nucleinsäure = $1455 + 9 H_2O = 1617$.

Farbbase = $C_{23}H_{26}N_2O$. Mol.-Gew. = 346.

Der Verbindung von Nucleinsäure mit vier Molekülen der Base kommt also ein Molekulargewicht von nicht weniger als 2929 zu, entsprechend einer Formel: $C_{135}H_{157}N_{23}P_4O_{34} + 9 H_2O$.

Hierin wurde die gleiche Menge Konstitutionswasser (9 Moleküle) angenommen wie in der Nucleinsäure.

Bei meinen Versuchen ließ ich 10 g nucleinsaures Natrium in Reaktion treten mit 8,54 g Farbsalz, und zwar wurde die etwa 10%ige Lösung des nucleinsauren Natriums langsam und unter Umschwenken in die 10%ige Lösung der salzsauren

¹⁾ Das nucleinsaure Natrium verdanke ich Herrn Prof. H. Steudel, es war dasselbe Material, das er seinen letzten Arbeiten über die Konstitution der Nucleinsäure, Diese Zeitschrift, Bd. 77, S. 497, zugrunde gelegt hatte.

Farbbase hineingegossen. Es schied sich zunächst eine gallertige Masse ab, die aber bald verschwand und allmählich einem schwarzen, flockigen, weichen Niederschlag Platz machte. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht stehen gelassen, am anderen Tage abzentrifugiert, wiederholt mit Wasser aufgerührt und zentrifugiert, dann der Niederschlag auf einem Tonteller abgepreßt und im Vakuumexsikkator bei gewöhnlicher Temperatur getrocknet. Beim Auswaschen gelang es nicht, das Waschwasser auch nur annähernd farblos zu bekommen; es war jedesmal intensiv grün gefärbt, während die Substanz anscheinend quoll. Die trockene Substanz stellte eine schwarze, an der Oberfläche rötlich schillernde poröse Masse dar, die sich infolge ihrer Porosität zwar leicht zerdrücken, aber wegen ihrer großen Härte sich außerordentlich schwer pulverisieren ließ. (Im Gegensatz zu dem nucleinsauren Natrium und dem ursprünglichen Farbsalz.)

Die Prüfung auf Halogen verlief vollkommen negativ. Die Substanz gab weder nach Carius einen Niederschlag von Chlor Silber noch die Beilsteinsche Flammenreaktion, sie war also vollständig chlorfrei; es muß also bei der Reaktion wirklich eine doppelte Umsetzung unter Salzbildung eingetreten sein, um eine Adsorption kann es sich wegen der Chlorfreiheit der Substanz nicht handeln.

Bei der Beurteilung der Analysenwerte stößt man bei diesem Körper auf ähnliche Schwierigkeiten wie bei dem nucleinsauren Natrium wegen des sehr wechselnden Wassergehaltes, indem es auch in unserem Falle anscheinend unmöglich ist, den Körper bis zu einem Grade absoluter Trockenheit zu trocknen, so daß die absoluten Prozentzahlen nur annähernd zu verwerten sind. Auch hier muß man auf das Verhältnis des Stickstoffs zum Phosphor, das unabhängig von einem unbekanntem Wassergehalte ist, das größere Gewicht legen. Im folgenden sind die Werte je zweier P- und N-Bestimmungen wiedergegeben.

I.

N-Bestimmung (Dumas).

0,2740 g liefern 29,0 ccm N über 33% Kalilauge gem.
 $b = 758$; $t = 20^{\circ}$.

N-Gehalt = 12,12 %.

P-Bestimmung (Neumann).

0,1773 g entsprechen 15,4 ccm $n/2$ -NaOH = 4,81 % P.

0,1726 „ „ 15,0 „ $n/2$ -NaOH = 4,85 % P.

II.

N-Bestimmung (Dumas).

0,2858 g liefern 29,8 ccm N über 33 % Kalilauge gem.

b = 752; t = 18°.

N-Gehalt = 11,94 %.

P-Bestimmung (Neumann).

0,1936 g entsprechen 16,8 ccm $n/2$ -NaOH = 4,81 % P.

Berechnet für

das einbasische Salz	das zweibasische Salz	das dreibasische Salz
$C_{66}H_{85}N_{17}P_4O_{34} + 9H_2O$	$C_{87}H_{109}N_{19}P_4O_{34} + 9H_2O$	$C_{112}H_{133}N_{21}P_4O_{34} + 9H_2O$
% N = 12,27	11,71	11,34
% P = 6,38	5,45	4,77
N : P = 1,93	2,15	2,38

Berechnet für

Gefunden:

das vierbasische Salz

$C_{135}H_{157}N_{23}P_4O_{34} + 9H_2O$:

% N = 11,00

% P = 4,24

N : P = 2,60

Mittel

12,12 11,94 12,03

4,81 4,85 4,81 4,82

2,50

Das Verhältnis von Stickstoff zu Phosphor, das in diesem Falle ja allein maßgebend ist, paßt entschieden am besten für das vierbasische Salz.

Ich habe mich bemüht, für diese Ansicht noch eine weitere Stütze zu gewinnen, indem ich die Menge der Farbbase bestimmte, die in die Verbindung eingegangen war. Das Malachitgrünleukohydrat ist mit Alkali leicht aus seinen Salzen abzuscheiden und mußte also bei der Behandlung der Substanz mit Natronlauge ungelöst zurückbleiben, während die Nucleinsäure als nucleinsaures Natrium in Lösung blieb. In der Tat löste sich auch die Substanz in Natronlauge unter Entfärbung leicht auf, indem sich gleichzeitig ein weißer milchiger Niederschlag abschied. Dieser Niederschlag blieb aber, offenbar wegen der Anwesenheit der Nucleinsäure, in kolloidaler Lösung, und ließ sich nicht von der Flüssigkeit trennen. Erst wenn durch mehrstündiges

Kochen mit 5%iger Schwefelsäure die Nucleinsäure vorher zerstört worden war, konnte der mit Natronlauge erzeugte Niederschlag bei Gegenwart von viel Talkum in eine leicht filtrierbare Form gebracht werden. Nach nochmaligem Lösen in Essigsäure, Filtration und Ausfällung mit Natronlauge ließ sich so eine Substanz gewinnen, deren Menge 41% des angewandten nucleinsäuren Malachitgrüns betrug (berechnet für ein vierbasisches Salz 47% Malachitgrünleukohydrat).

Nach diesen Ergebnissen wird man zu der Annahme geführt, daß in der Tat die Verbindung der Nucleinsäure mit dem Malachitgrün ein Salz ist, dessen Bildung durch doppelte Umsetzung zustande kommt.

Nucleinsaures Natron + salzsaures Malachitgrün = nucleinsaures Malachitgrün + Chlornatrium.

Ich beabsichtige, die gleichen Versuche wie hier beschrieben, noch mit anderen Farbbasen auszuführen; sollten sich auch hier die gleichen Resultate ergeben, so wird es von besonderem Interesse sein, das Verhalten der Nucleoproteide den Farbstoffen gegenüber zu untersuchen; es wäre dann zu erwarten, daß, wenn wirklich auch hier eine doppelte Umsetzung stattfindet, sich nur ein Teil des Moleküls des Nucleoproteides, der saure Anteil, mit der Farbbase verbindet, während die basische Komponente, an die Säure der Farbbase gebunden, sich im Filtrat vorfinden müßte.

Aber derartige Untersuchungen stoßen auf große Schwierigkeiten, die schon selbst die Deutung der so leicht übersehbaren Verhältnisse der Wechselwirkung von Nucleinsäure und Farbbase erschweren. Merkwürdigerweise löst sich nämlich schon beim einfachen Auskochen des nucleinsäuren Malachitgrüns mit Alkohol auf dem Wasserbade ein Teil des Farbstoffes im Alkohol auf. Ob bei dieser Operation schon das so labile Molekül der Nucleinsäure zerstört oder ein Äther der Farbbase gebildet wird, muß ich vorläufig dahingestellt sein lassen — phosphorhaltige Substanz war jedenfalls nicht in das alkoholische Extrakt hineingegangen.

Die Untersuchungen werden von mir fortgesetzt.